

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



Université Aboubekr Belkaïd Tlemcen
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie,
des Sciences de la Terre et de l'Univers
Département de Biologie



Laboratoire :
Antibiotiques Antifongiques : physico-chimie, synthèse et activité biologique

Thèse

en vue de l'obtention du diplôme de

DOCTORAT

En sciences biologiques

Option: Biochimie appliquée

Présentée

Par

M^r AISSAOUI Mohammed

Thème

**Recherche des composés à activités biologiques à partir des graines
vertes de *Coffea canephora* et *Coffea arabica***

Soutenu le : 18/04/2021

Devant le jury :

Présidente	: M ^{me} Boucherit-Otmani Zahia	Professeur	Université de Tlemcen
Directeur de thèse	: M ^r Rahmoun Mohammed Nadjib	Professeur	Université de Tlemcen
Examineurs	: M ^r Benabdallah Mohammed	MCA	Université de Tlemcen
	M ^r Gherib Mohammed	MCA	Centre Universitaire de Naama
	M ^r Ghellai Lotfi	MCA	Université de Saida

Année Universitaire : 2020 – 2021

Remerciements

Je remercie Allah le tout puissant pour la patience qu'il m'a donné pour effectuer ce travail afin d'atteindre mon objectif.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à M^r Rahmoun Mohammed Nadjib, Professeur, au département de Biologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la vie, des Sciences de la Terre et de l'Univers. Université Aboubekr Belkaïd Tlemcen, pour avoir accepté la charge de m'encadrer. Il a su me donner une grande liberté d'initiative tout en restant toujours présent pour discuter les problèmes rencontrés, les résultats obtenus avec les orientations à suivre. Son enthousiasme, son dynamisme, sa générosité et sa grande patience m'ont à chaque fois permis de rebondir dans les moments difficiles. Je le remercie vivement pour l'aide scientifique précieuse et pour tous les conseils qu'il a pu me fournir tout au long de cette thèse.

Je voudrais remercier particulièrement M^{me} Bouchéri-Otmani Zahia, Professeur au département de Biologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la vie, des Sciences de la Terre et de l'Univers. Université Aboubekr Belkaïd Tlemcen pour son aide, son soutien et sa disponibilité. Je lui exprime ma profonde gratitude et ma sincère reconnaissance pour avoir accepté de présider ce jury.

Ma profonde reconnaissance s'adresse également à M^r Benabdallah Mohammed Maître de Conférences A au département de Chimie, Faculté des Sciences. Université Aboubekr Belkaïd Tlemcen pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Je remercie également M^r Gherib Mohammed Maître de Conférences A au centre universitaire de Naama pour l'honneur qu'il m'a fait d'être examinateur de ce travail.

Je tiens à remercier M^r Ghellai Lotfi Maître de Conférences A à l'université de Saaida pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Mes vifs remerciements s'adressent également à M^{me} Kazi-Tani, Maître de Conférences A au département de Biologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la vie, des Sciences de la Terre et de l'Univers. Université Aboubekr Belkaïd Tlemcen et directrice du laboratoire Antibiotiques Antifongiques : physico-chimie, synthèse et activité biologique (Lapsab) pour son soutien et sa disponibilité.

Mes vifs remerciements à M^r Choukchou-Braham Noureddine, Professeur au département de chimie, Université Aboubekr Belkaïd-Tlemcen et directeur du laboratoire de Catalyse et

Synthèse en Chimie Organique (LCSCO) pour toute son aide pour le bon déroulement de cette thèse, ainsi que M^r Hassaine Ridha Maitre de recherche A au Centre de Recherche scientifique et technique en Analyses Physico-Chimiques (CRAPC) à Bou-Ismaïl, pour son aide précieuse dans l'interprétation des résultats, ses conseils ainsi que son soutien morale.

Mes sincères remerciements à M^r Latrache Hassan, Professeur et directeur du Laboratoire des Bioprocédés et Biointerfaces, Faculté des Sciences et Techniques, Université de Sultan Moulay Slimane, Maroc, de m'avoir accueilli dans son laboratoire. Je le remercie vivement pour l'aide scientifique précieuse et tous les conseils qu'il a pu me fournir tout le long de mon stage.

Je tiens à remercier M^r El-Haci Abdelhamid Imad Maitre de recherche A au Centre de Recherche scientifique et technique en Analyses Physico-Chimiques (CRAPC) à Bou-Ismaïl, pour son aide précieuse, ses conseils ainsi que son soutien morale.

Je remercie énormément Mr Bensouici Chawki Maitre de recherche A au Centre de Recherche en Biotechnologie Ali Mendjli à Constantine de m'avoir accueilli dans son laboratoire. Je le remercie vivement pour l'aide scientifique précieuse et tous les conseils qu'il a pu me fournir pendant la durée de ce travail.

Je remercie également Mr Berek Said, doctorant à l'université Aboubekr Belkaïd Tlemcen, pour son soutien et les moments de détente et de plaisir que nous avons partagés ensemble.

Je tiens à remercier aussi M^{elle} Khattabi Latifa ingénieure principale au Centre de Recherche en Biotechnologie Ali Mendjli à Constantine pour sa disponibilité durant mon stage.

Mes vifs remerciements s'adressent également à tous mes enseignants durant mon cursus universitaire, en particulier M^{me} Merghache-Bouhafs D., M^{me} Hassaine H., M^{me} Klouche N., M^{me} Sari L., M^{elle} Belkacem N., M^{me} Benariba N., M^{me} Dali M., M^{me} Loukidi B., M^{me} Lemrini, M^{me} Bendi A., M^{me} Benmansour M., M^{me} Chaker H., M^{elle} Mezouaire D., M^r Gaour S., M^r Boucherit K., M^r Lahfa F., M^r Azzi R., M^r Chaouche T.

Dédicaces

Avec l'aide de Dieu, j'ai pu réaliser ce modeste travail que je dédie à :

Mon adorable mère AICHA qui est toujours présente et continue de l'être pour faire mon bonheur, qui n'a jamais cessé de ménager ses efforts pour que j'atteigne ce niveau. Ni sacrifices, ni privatisations ne l'ont empêché d'accomplir son devoir de mère soucieuse de l'avenir de ses enfants. Merci pour tous ces sacrifices pour que tes enfants grandissent et prospèrent.

A Mon cher père ABDELKADER qui a su se montrer patient, compréhensif, pour ses encouragements incessants. Sa chaleur paternelle et son soutien moral ont été et seront toujours pour moi d'un grand réconfort dans les moments difficiles qui furent pour moi les meilleurs gages de réussite.

Que Dieu les protèges et que ce travail soit la preuve modeste d'une reconnaissance infinie et d'un profond amour pour eux.

Veuillez trouver ici, le témoignage de mon amour éternel.

Que dieu vous procure santé, prospérité et bonheur...

A mes deux précieuses sœurs NAWAL et NADIA, que dieu vous garde et vous protège que vos chemins soient pleins de succès.

A mon beau frère Anis en témoignage de ma profonde affection et de ma reconnaissance pour tous les soutiens morales qu'ils ont consentis pour moi.

A mon petit cher neveu Sidi Mohammed Lotfi en témoignage de mon amour et ma profonde admiration.

A ma famille. Que Dieu la garde et la bénisse

A mes chers collègues ami (e)s Zakaria, Mohammed, Abdessalem, Ahmed, Ikram, Fayza et à tous ceux qui sont restés à mes côtés et qui ont rendu l'ambiance fort-sympathique, pour les bons moments passés ensemble et pour leur amitié.

A tous les membres du Laboratoire Antibiotiques Antifongiques: Physico-chimie, Synthèse et Activité Biologique, pour leur soutien.

Mohammed

ملخص

يركز هذا العمل على دراسة المكونات الكيمونباتية و الأنشطة البيولوجية للمستخلصات المختلفة المستخرجة من البذور الخضراء ل *Coffea arabica* و *Coffea canephora*.

تم إجراء تحليل التركيب الكيميائي لمستخلصات البذور الخضراء لنباتة *C. arabica* و *C. canephora* باستخدام الفصل الكروماتوجرافي عالي الاستبانة مع وسم البنية الكيميائية بأسلوب التصوير بالرنين المغناطيسي وبالأشعة تحت الحمراء. تم تقييم نشاط مضادات الأكسدة بطرق تعتمد على نقل ذرة الهيدروجين و/او نقل الإلكترون الفردي. كما تم تقدير النشاط المثبط لإنزيم الكولين استيراز بواسطة إنزيمين أسيتيل كولين استيراز (AChE) وبيبتيريل كولي استيراز (BChE). تم تقييم النشاط المضاد للميكروبات للمستخلصات ضد السلالات البكتيرية والفطرية المختلفة من خلال تحديد الحد الأدنى للتركيز المثبط. كما تم اختبار تأثير عدم الالتصاق في الوقت صفر وبعد المعالجة المسبقة للبوليسترين مع جميع المستخلصات ضد ثلاث سلالات بكتيرية مرجعية. في الوقت نفسه، تم تحديد اختبار انحلال الدم للمستخلصات المختلفة ضد خلايا الدم الحمراء.

أظهر التحليل الكروماتوجرافي عن وجود أحماض الفينول وحمض الهيدروكسيناميك والفلافونويد. كما سمح لنا التوصيف بواسطة الرنين المغناطيسي النووي والأشعة تحت الحمراء بتوضيح بنية Kahweol acétate و Caféine. تبين أن قدرة مضادات الأكسدة لمستخلص n- بيوتانول من البذور الخضراء لـ *C. arabica* و *C. canephora* عالية جدًا مع $IC_{50} = 0,08 \pm 3,96$ ميكروغرام / مل و $0,19 \pm 5,28$ ميكروغرام / مل على التوالي ومع $A_{0.5} = 0,36 \pm 4,09$ و $0,49 \pm 1,17$ ميكروغرام / مل. بالإضافة إلى ذلك، أظهرت جميع مستخلصات *C. arabica* و *C. canephora* تأثيرًا مثبطًا تجاه BChE والذي وصل إلى 40% و 13% على التوالي. أظهرت نتائج النشاط المضاد للميكروبات أن المستخلص الميثانولي و n- بيوتانول من *C. canephora* أظهرتا قوة كبيرة مضادة للجراثيم ضد *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 بتركيز يساوي 40 ميكروغرام / مل. بينما أظهر مستخلص n- بيوتانول من *C. arabica* نجاعته بتركيز أدنى مثبط يساوي 13,02 ميكروغرام / مل ضد *Citrobacter freundii* ATCC 8090 و *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

أظهر اختبار مقاومة الالتصاق أن جميع المستخلصات، باستثناء مستخلص أسيتات الإيثيل من *C. canephora*، تظهر تأثيرًا جيدًا مضادًا للالتصاق ضد *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 مع نسبة تثبيط التي تصل إلى 74% و 57% على التوالي. أخيرًا، أظهرت اختبارات انحلال الدم أن جميع المستخلصات ليست سامة ضد خلايا الدم الحمراء البشرية، باستثناء المستخلص المتبقي من *C. canephora* و مستخلص أسيتات الإيثيل من *C. arabica*.

الكلمات المفتاحية: *C. arabica*، *C. canephora*، الفصل الكروماتوجرافي عالي الاستبانة، التصوير بالرنين المغناطيسي، الأشعة تحت الحمراء، النشاط المضاد للأكسدة، التركيز الأدنى المثبط، البيبتيريل كولين استيراز، أسيتيل كولين استيراز.

Résumé

Ce travail se focalise sur l'étude *in-vitro* des activités biologiques des différents extraits à partir des graines vertes de *Coffea canephora* et *Coffea arabica*.

L'analyse de la composition chimique des extraits des graines vertes de *C. canephora* et *C. arabica* a été effectuée à l'aide d'une chromatographie liquide à haute performance RP-HPLC-PDA, RMN ^1H , ^{13}C , 2D et l'infrarouge. L'activité antioxydante a été évaluée par des méthodes basées sur le transfert d'atome d'hydrogène et le transfert d'électron singulier. Alors que, l'inhibition du cholinestérase a été estimée par deux enzymes l'acétylcholinestérase (AChE) et la butyrylcholinestérase (BChE). L'évaluation de l'activité antimicrobienne des extraits vis-à-vis des différentes souches bactériennes et fongiques a été effectuée par la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI). L'effet antiadhésif au temps zéro et après prétraitement du polystyrène par de l'ensemble des extraits a été testé contre trois souches bactériennes de références. En parallèle, le test d'hémolyse des différents extraits a été déterminé vis-à-vis des globules rouges.

L'analyse chromatographique a mis en évidence la présence des acides phénoliques, des acides hydroxycinnamiques et des flavonoïdes. Ce pendant, la caractérisation par RMN et l'infrarouge nous ont permis d'élucider la structure de la Kahweol acétate et de la Caféine. Le potentiel antioxydant de l'extrait n-butanolique des graines vertes de *C. canephora* et *C. arabica* s'est montré très important avec des $\text{CI}_{50\text{ABTS}} = 3,96 \pm 0,08 \mu\text{g/mL}$ et $5,28 \pm 0,19 \mu\text{g/mL}$ respectivement et avec une $\text{A}_{0,5\text{CUPRAC}} = 4,09 \pm 0,36$ et $1,17 \pm 0,49 \mu\text{g/mL}$. De plus, tous les extraits de *C. arabica* et *C. canephora* ont révélé un effet inhibiteur vis-à-vis de la BChE qui atteint 40% et 13% respectivement. Les résultats de l'activité antimicrobienne a montré que l'extrait méthanolique et n-butanol de *C. canephora* présentent un pouvoir antibactérien important contre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 avec une CMI de $40 \mu\text{g/mL}$. Alors que l'extrait n-butanol de *C. arabica* présente une bonne CMI vis-à-vis de *Citrobacter freundii* ATCC 8090, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ($13,02 \mu\text{g/mL}$). Le test d'antiadhésion a montré que l'ensemble des extraits mis à part l'extrait d'acétate d'éthyle de *C. canephora* présentent un bon effet antiadhésif vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 avec un pourcentage d'inhibition qui atteint 74% et 57% respectivement. Enfin les tests d'hémolyse ont montré que l'ensemble des extraits ne sont pas toxique vis-à-vis des globules rouges humains, à l'exception de la phase résiduelle de *C. canephora* et celui d'acétate d'éthyle de *C. arabica*.

Mots clés: *C. canephora*, *C. arabica*, RP-HPLC-PDA, RMN, Infrarouge, activité antioxydante, CMI, acétylcholinestérase, butyrylcholinestérase.

Abstract

This work is focused on the *in-vitro* study of the biological activities of various extracts from the green seeds of *Coffea canephora* and *Coffea arabica*.

The chemical compositions analysis of *C. canephora* and *C. arabica* green seeds extracts were carried out using the high performance liquid chromatography RP-HPLC-PDA, ^1H , ^{13}C NMR, 2D and by infrared. Antioxidant activity was assessed using hydrogen atom and single electron transfer. Whereas, the cholinesterase inhibition was estimated by acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BChE) enzymes. The evaluation of the antimicrobial activity of the extracts against different bacterial and fungal strains was performed using the determination of the minimum inhibitory concentration (MIC). The anti-adhesion effect before and after pretreatment of polystyrene by the extracts was tested against three bacterial strains. The hemolysis test of the different extracts was determined against human blood cells. The chemical analysis showed the presence of phenolic acids, hydroxycinnamic acids and flavonoids. However, The NMR and FTIR spectroscopy allowed the characterization of Kahweol acetate and Caffeine.

The antioxidant potential of the n-butanol extract of *C. canephora* and *C. arabica* green seeds showed to be very high with $\text{IC}_{50\text{ABTS}} = 3.96 \pm 0.08 \mu\text{g} / \text{mL}$ and $5.28 \pm 0.19 \mu\text{g} / \text{mL}$ respectively and with an $\text{A}_{0.5\text{CUPRAC}} = 4.09 \pm 0.36$ and $1.17 \pm 0.49 \mu\text{g} / \text{mL}$. In addition, the all extracts of *C. canephora* and *C. arabica* showed a BChE inhibitory activity which can reach 13% and 40% respectively.

The results of the antimicrobial activity showed that the methanolic and n-butanol extract of *C. canephora* exhibited the effective antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 with $\text{MIC} = 40 \mu\text{g} / \text{mL}$. While the n-butanol extract of *C. arabica* exhibited a low MIC against *Citrobacter freundii* ATCC 8090 and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ($13.02 \mu\text{g} / \text{mL}$). The anti-adhesion activity showed that all of the extracts with the exception of the ethyl acetate extract of *C. canephora* exhibited a higher anti-adhesion effect against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. When, the hemolysis tests showed that all the extracts didn't have any toxic effect against human blood cells, with the exception of the residual phase of *C. canephora* and that of ethyl acetate extract of *C. arabica*.

Keywords: *C. canephora*, *C. arabica*, RP-HPLC-PDA, NMR, FTIR, antioxidant activity, MIC, acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase.

Liste des abréviations

µg EAG/mg E	: Microgramme équivalent d'acide gallique par milligramme d'extrait sec
µg EC/mg E	: Microgramme équivalent de Catéchine par milligramme d'extrait sec
A_{0.5}	: Concentration à une absorbance de 0,5
ABTS	: 2,2'-azinobis- (3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonate)
AC	: Extrait d'acétate d'éthyle
AChE	: Acétylcholinestérase
AlCl₃	: Trichlorure d'aluminium
AmB	: Amphotéricine B
ATCC	: American Type Culture Collection
BChE	: Butyrylcholinestérase
BHA	: Hydroxyanisole Butylé
BHT	: Hydroxytoluène Butylé
CCM	: Chromatographie sur couche mince
CI₅₀	: Concentration inhibitrice à 50%
CLSI	: Clinincal and Laboratory Standard Institute
CMI	: Concentration Minimal Inhibitrice
CUPRAC	: Capacité antioxydante par réduction du cuivre
DPPH	: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
DTNB	: 5,5-dithio-bis (2-nitrobenzoïque)
FAO	: Food and drug Organisation
Fe²⁺	: Ion ferreux
Fe³⁺	: Ion ferrique
FeCl₃	: Trichlorure de fer
FRAP	: Ferric reducing antioxydant power
FTIR	: Infrarouge à transformée de Fourier
Gent	: Gentamicine
IP	: Institut Pasteur
MET	: Extrait méthanolique
n-B	: Extrait n-butanolique
OMS	: Organisation mondiale de la santé
p/v	: Poids/ Volume

PBS	:	Phosphate Buffered Saline
PR	:	Phase résiduelle
RMN	:	Résonance Magnétique Nucléaire
RP-HPLC-PDA	:	Reverse Phase- High Performance Liquid Chromatography- Photo Diode Array
RPMI	:	Roswell Park Memorial Institute
UFC	:	Unité Formant Colonie
v/v	:	Volume/Volume

Liste des figures

Figure 1	: Systèmes de protection contre les EOA	08
Figure 2	: Structure de deux composés phénoliques (A: phénol, B: polyphénol)	11
Figure 3	: Structure des acides phénoliques (A: Les acides benzoïques, B: Les acides cinnamiques)	12
Figure 4	: Squelette de base d'un flavonoïde	12
Figure 5	: Squelette de base des flavones (R=H) et flavanols (R=OH)	13
Figure 6	: Squelette de base des flavanones (R=H) et des dihydroflavanols (R=OH)	14
Figure 7	: Squelette de base des flavanols	14
Figure 8	: Structure générale des anthocyanes	15
Figure 9	: Squelette de base d'un isoflavone	15
Figure 10	: Structure des tanins hydrolysables et des tanins condensés	16
Figure 11	: Structure de base des coumarines	17
Figure 12	: Structure d'un alcaloïde : la caféine	17
Figure 13	: Structure de l'isoprène	18
Figure 14	: Les différentes parties du caféier (A : Feuilles, B : Fleurs, C : Fruits)	22
Figure 15	: Structure chimique de la trigonelline	25
Figure 16	: Structure chimique de la caféine	26
Figure 17	: Structure chimique de l'acide chlorogénique	27
Figure 18	: Structure chimique du kahweol (A) et cafestol (B)	28
Figure 19	: Rendements des différents extraits des graines vertes de <i>C. canephora</i> et <i>C. arabica</i>	46
Figure 20	: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux.....	47
Figure 21	: Courbe d'étalonnage du catéchine pour le dosage des flavonoïdes totaux	48
Figure 22	: Courbe d'étalonnage du catéchine pour le dosage des tanins condensés	50
Figure 23	: Chromatogramme RP-HPLC-PDA des extraits des graines vertes de <i>C. canephora</i> à 280 nm (A : extrait d'acétate d'éthyle, B : extrait n-butanol, C : phase résiduelle).....	52

Figure 24	: Chromatogramme RP-HPLC-PDA des extraits des graines vertes de <i>C. arabica</i> à 280 nm (A : extrait d'acétate d'éthyle, B : extrait n-butanol, C : phase résiduelle).....	53
Figure 25	: Spectres RMN ¹ H de la fraction Fn-Br3 (extrait n-butanolique de <i>C. canephora</i>).....	56
Figure 26	: Spectres RMN ¹³ C de la fraction Fn-Br3 (extrait n-butanolique de <i>C. canephora</i>).....	56
Figure 27	: Spectres RMN HMBC 2D de kahweol acétate caractérisés à partir de la fraction Fn-Br3 d'extrait de n-butanol de <i>C. canephora</i>	57
Figure 28	: Corrélations HMBC observées dans les spectres de Kahweol acétate	57
Figure 29	: Spectres RMN ¹ H de la fraction Fn-BA (extrait n-butanolique de <i>C. arabica</i>).....	58
Figure 30	: Spectres RMN ¹³ C de la fraction Fn-BA (extrait n-butanolique de <i>C. arabica</i>).....	58
Figure 31	: Spectre infrarouge du kahweol acétate caractérisé à partir de la fraction Fn-Br3 d'extrait n-butanol de <i>C. canephora</i>	59
Figure 32	: Spectre infrarouge de la caféine caractérisé à partir de la fraction Fn-BA d'extrait n-butanol de <i>C. arabica</i>	60
Figure 33	: Evolution des pourcentages d'inhibitions du radical libre DPPH en fonction des concentrations des extraits des graines vertes et standards. A : <i>C. canephora</i> , B : <i>C. arabica</i> , C : les standards	62
Figure 34	: Evolution des pourcentages d'inhibition du radical ABTS en fonction des concentrations des extraits des graines vertes et standards. A: <i>C. canephora</i> , B: <i>C. arabica</i> , C: les standards	64
Figure 35	: Evolution des pourcentages d'inhibition du β- carotène en fonction des concentrations des extraits des graines vertes et standards A: <i>C. canephora</i> , B: <i>C. arabica</i> , C: les standards	66
Figure 36	: Evolution des absorbances du milieu réactionnel en fonction des concentrations des extraits des graines vertes et standards. A: <i>C. canephora</i> , B: <i>C. arabica</i> , C: les standards	68

Figure 37	: Evolution des absorbances du milieu réactionnel en fonction des concentrations des extraits des graines vertes et standards. A: <i>C. canephora</i> , B: <i>C. arabica</i> , C: les standards	70
Figure 38	: Evolution des absorbances du milieu réactionnel en fonction des concentrations des extraits des graines vertes et standards. A: <i>C. canephora</i> , B: <i>C. arabica</i> , C: les standards	72
Figure 39	: Capacité antioxydante totale de l'acide ascorbique	74
Figure 40	: Pourcentage d'inhibition de l'acétylcholinestérase en fonction des concentrations des extraits des graines vertes et du standard. A: <i>C. canephora</i> , B: <i>C. arabica</i> , C: Galantamine.....	75
Figure 41	: Pourcentage d'inhibition de la butyrylcholinestérase en fonction des concentrations des extraits des graines vertes et du standard. A: <i>C. canephora</i> , B: <i>C. arabica</i> , C: Galantamine	76
Figure 42	: Taux d'inhibition d'adhésion en présence d'extraits des graines vertes de café et des standards à CMI/8 (A : <i>C. canephora</i> , B : <i>C. arabica</i>).....	85
Figure 43	: Taux d'inhibition d'adhésion après un prétraitement du polystyrène par les extraits de graines vertes de café et les standards à CMI/8 (A : <i>C. canephora</i> , B : <i>C. arabica</i>).....	87
Figure 44	: Evolution des taux d'hémolyse en fonction des concentrations des différents extraits des graines vertes de <i>C. canephora</i>	91
Figure 45	: Evolution des taux d'hémolyse en fonction des concentrations des différents extraits des graines vertes de <i>C. arabica</i>	92

Liste des tableaux

Tableau 1	: Les différentes classes des terpénoïdes.....	18
Tableau 2	: Composition biochimique des graines vertes de café	24
Tableau 3	: Souches utilisées dans les tests antimicrobiens	31
Tableau 4	: Les teneurs en polyphénols totaux en $\mu\text{g GAE/ mg d'extract}$	47
Tableau 5	: Les teneurs en flavonoïdes totaux en $\mu\text{g EC/ mg d'extract}$	49
Tableau 6	: Les teneurs en tanins condensés en $\mu\text{g EC/ mg d'extract}$	50
Tableau 7	: Les CI_{50} ($\mu\text{g/ mL}$) des différents extraits des graines vertes de <i>C. canephora</i> et de <i>C. arabica</i> par la méthode du Piégeage du radicale libre DPPH	63
Tableau 8	: Les CI_{50} ($\mu\text{g/ mL}$) des différents extraits graines vertes de <i>C. canephora</i> et de <i>C. arabica</i> par la méthode du Piégeage du radicale du l'ABTS	65
Tableau 9	: Les CI_{50} ($\mu\text{g/ mL}$) des différents extraits graines vertes de <i>C. canephora</i> et de <i>C. arabica</i> par la méthode du blanchissement du β -carotène	67
Tableau 10	: Les $\text{A}_{0,5}$ ($\mu\text{g/ mL}$) des différents extraits des graines vertes de <i>C. canephora</i> et de <i>C. arabica</i> par la méthode de FRAP	69
Tableau 11	: Les $\text{A}_{0,5}$ ($\mu\text{g/ mL}$) des différents extraits des graines vertes de <i>C. canephora</i> et de <i>C. arabica</i> par la méthode de phénanthroline	71
Tableau 12	: Les $\text{A}_{0,5}$ ($\mu\text{g/ mL}$) des différents extraits des graines vertes de <i>C. canephora</i> et de <i>C. arabica</i> par la méthode de CUPRAC	73
Tableau 13	: La capacité antioxydante totale ($\mu\text{g EAA/mg d'extract}$) des différents extraits des graines vertes de <i>C. canephora</i> et de <i>C. arabica</i>	74
Tableau 14	: Diamètres des zones d'inhibition (mm) des différents extraits des graines vertes de <i>C. canephora</i> et <i>C. arabica</i> vis-à-vis des bactéries à Gram positif	78
Tableau 15	: Diamètres des zones d'inhibition (mm) des différents extraits des graines vertes de <i>C. canephora</i> et <i>C. arabica</i> vis-à-vis des bactéries à Gram négatif	79
Tableau 16	: Concentrations minimales inhibitrices des différents extraits de graines vertes de <i>C. canephora</i> et <i>C. arabica</i> vis-à-vis des bactéries à Gram positif	81
Tableau 17	: Concentrations minimales inhibitrices des différents extraits des graines vertes de <i>C. canephora</i> et <i>C. arabica</i> vis-à-vis des bactéries à Gram négatif	82
Tableau 18	: Diamètres des zones d'inhibition en mm des différents extraits de grain de café vert de <i>C. canephora</i> et <i>C. arabica</i> vis-à-vis des levures de <i>Candida albicans</i>	83

Tableau 19	: Concentrations minimales inhibitrices des différents extraits des graines vertes de <i>C. canephora</i> et <i>C. arabica</i> vis-à-vis des levures de <i>Candida albicans</i>	84
Tableau 20	: Angles de contact de l'eau (θ_w), du formamide (θ_f) et du diiodométhane (θ_d), Lifshitz-van der Waals (γ^{lw}), le donneur-accepteur d'électrons (γ^-, γ^+) des différents extraits des graines vertes de <i>C. canephora</i> et <i>C. arabica</i>	89

Table des matières

Introduction	2
Première partie : Partie bibliographique	5
Chapitre 1 : Les maladies infectieuses et stress oxydatif	6
Chapitre 2 : Plantes médicinales et métabolites secondaires	10
1. Les composés phénoliques	11
1.1. Les acides phénoliques	12
1.2. Les flavonoïdes	12
1.2.1. Chalcone et les aurones	13
1.2.2. Flavones et flavonols	13
1.2.3. Les flavanones et flavanonols	13
1.2.4. Flavanols	14
1.2.5. Anthocyanes	14
1.2.6. Isoflavonoïdes	15
1.3. Tanins	15
1.3.1. Tanins hydrolysables	16
1.3.2. Tanins condensés (proanthocyanidine)	16
1.4. Les coumarines	16
2. Les alcaloïdes	17
3. Les terpènes	18
Chapitre 3 : Le caféier	19
1. Généralité	19
2. Taxonomie de la plante du café	20
3. Morphologie	20
4. Composition chimiques du caféier	23
a. La trigonelline (acide 1-N-méthylnicotinique)	25
b. La caféine	26
c. L'acide chlorogénique	27
d. Kahweol et cafestol	27
5. Utilisation thérapeutique du caféier	28

Deuxième partie : Matériel et méthodes.....	29
I. Matériel biologique	30
1. Matériel végétal	30
2. Les microorganismes	30
3. Globules rouges	32
II. Méthodes	32
1. Préparation des extraits	32
2. Dosage des métabolites secondaires	32
2.1. Dosage des polyphénols totaux	32
2.2. Dosage des flavonoïdes totaux	33
2.3. Dosage des tanins condensés	33
3. Chromatographie Liquide Haute Performance (en mode inversé)	34
4. La chromatographie sur colonne	34
5. Spectroscopie de Résonance Magnétique Nucléaire	35
6. Analyse par spectroscopie infrarouge	35
7. L'activité antioxydante	36
7.1. Piégeage du radical libre DPPH	36
7.2. Piégeage de l'ABTS	36
7.3. Blanchissement du β -carotène	37
7.4. Pouvoir réducteur du fer	38
7.5. Phénanthroline	38
7.6. Capacité antioxydante par réduction du cuivre (CUPRAC)	39
7.7. Capacité antioxydante totale	39
8. Etude de l'activité cholinestérase	39
9. Evaluation de l'activité antibactérienne	40
9.1. Méthode de diffusion sur gélose	40
9.2. Détermination de la concentration minimale inhibitrice	40
10. Evaluation de l'activité antifongique	41
11. Evaluation du test d'adhésion	41
11.1. Préparation de l'inoculum	41
11.2. Expérience d'adhésion à temps zéro	42
11.3. Prétraitement du support par les extraits	42

12. Angle de contact	42
13. Détermination de l'activité hémolytique des extraits vis-à-vis des globules rouges	43
Troisième partie : Résultats et interprétation.....	45
1. Rendements des extraits	46
2. Dosage des métabolites secondaires	46
2.1. Dosage des polyphénols totaux	46
2.2. Dosage des flavonoïdes totaux	48
2.3. Dosage des tanins condensés	49
3. Chromatographie Liquide Haute Performance (en mode inversé)	50
4. Spectroscopie de Résonance Magnétique Nucléaire	54
5. Analyse par spectroscopie infrarouge	59
6. Etude de l'activité antioxydante	60
6.1. Piégeage du radical libre DPPH	60
6.2. Piégeage de l'ABTS	63
6.3. Blanchissement du β -carotène	65
6.4. Pouvoir réducteur du fer	67
6.5. Phénanthroline	69
6.6. La capacité antioxydante par réduction du cuivre (CUPRAC)	71
6.7. Capacité antioxydante totale	73
7. Etude de l'activité cholinestérase	74
8. Evaluation de l'activité antibactérienne	77
9. Evaluation de l'activité antifongique	83
10. Evaluation du test d'adhésion	84
10.1. Expérience d'adhésion à temps zéro	84
10.2. Prétraitement du support par les extraits	86
11. Angle de contact	87
12. Détermination de l'activité hémolytique des extraits vis-à-vis des globules rouges	90
Discussion générale.....	93
Quatrième partie : Conclusion générale	102
Cinquième partie : Références bibliographiques.....	105

Introduction générale

Introduction générale

Depuis des années, les sciences biologiques et médicales ont été envahies par le concept du stress oxydant où la cellule ne contrôle plus la présence excessive des radicaux oxygénés toxiques. Le stress oxydant est un bon indicateur du réel état de santé de tout individu (**Favier, 2003**).

De nombreuses affections humaines ou animales incluent donc un stress oxydant dans leur pathogenèse au même titre que l'inflammation à laquelle il est souvent associé. Dans plusieurs maladies graves, notamment celles liées au vieillissement, le stress oxydant est le facteur déclenchant originel. C'est le cas des cancers, des pathologies oculaires, des maladies neurodégénératives (sclérose latérale, maladie d'Alzheimer). Dans de nombreuses autres maladies, le stress oxydant est secondaire à l'établissement de la pathologie, mais participe à ses complications immunitaires ou vasculaires (**Favier, 2006**). C'est le cas du diabète, de la maladie de Parkinson, de l'insuffisance rénale et des maladies infectieuses (**Favier, 2006 ; Giral et al., 2008**).

Les maladies infectieuses sont les principales causes de mortalité et de morbidité dans le monde, représentant environ 50% de tous les décès dans les pays tropicaux (**OMS, 2003**). Les infections d'origine bactérienne sont parmi les infections les plus courantes dans le domaine médical et sont dues à l'émergence de la résistance aux antibiotiques constituant ainsi un réel problème de santé publique (**Spellberg et al., 2008**).

La contamination bactérienne consiste des fois en l'adhésion de bactéries pathogènes ou opportunistes sur une surface menant à la formation de biofilms. Certains facteurs de la formation de biofilms sont liés aux propriétés physiques et chimiques des matériaux, à la surface cellulaire et aux paramètres environnementaux (température, composition environnementale, pH et force ionique) qui permettent une adhérence bactérienne à la surface du matériau de manière réversible et / ou irréversible, favorisant ainsi la contamination microbienne et résistance aux antibiotiques (**Elfazazi et al., 2018**).

C'est pour cette raison qu'il semble donc important de tester de nouvelles molécules thérapeutiques naturelles ou synthétique et il est évident que l'isolement et / ou la synthèse de nouvelles molécules bioactives antibactériennes et / ou antioxydante à partir des plantes médicinales s'avère être une stratégie efficace.

Les plantes médicinales sont considérées comme une source essentielle de métabolites secondaires potentiellement utilisés pour le développement de plusieurs médicaments contre les pathologies liées aux cancers, vieillissement et aux maladies infectieuses. Leurs utilisations à des fins thérapeutiques ont été rapportées dans les littératures antiques arabe, chinoise, égyptienne, hindou, grecque et romaine (**Khan, 2014 ; Yuan et al., 2016**).

Introduction générale

L'une des principales originalités des plantes est leur capacité à produire des composés diversifiés tels que les alcaloïdes, les terpénoïdes et les composants phénoliques (**Bruneton, 1993 ; Guignard, 1996**). Ces derniers sont largement présents dans toutes les parties des plantes et qui comportent les tanins, les flavonoïdes et les acides phénoliques, connus pour leurs activités biologiques dont l'activité antimicrobienne, antioxydante, anti-inflammatoire et anticancéreuse (**Boros et al., 2010 ; Basli et al., 2012 ; Taviano et al., 2013 ; Akl et al., 2020**).

Le caféier est parmi les plantes les plus consommées dans le monde. Ses graines sont destinées à la fabrication du café qui représentent le deuxième produit agricole le plus commercialisé dans le monde (**Parras et al., 2007 ; Pawel et al., 2015**).

Le caféier regroupe plusieurs espèces dont les plus connues sont : *Coffea arabica* et *Coffea canephora* (**Patay et al., 2016c**). Ces deux espèces représentent 60 % et 40 % de la production mondiale respectivement (**Jeszka-Skowron et al., 2016**).

Plusieurs travaux ont montré que la consommation du café est bénéfique pour la santé en raison de sa richesse en composés phénoliques, alcaloïdes, vitamines, composés volatils et minéraux (**Cano-Marquina et al., 2013 ; Dong et al., 2015**). Ces composés exercent également des propriétés antioxydantes qui réduisent l'incidence du cancer, du diabète et des maladies du foie (**Bhupathiraju et al., 2012 ; Cano-Marquina et al., 2013**) et aussi des propriétés antibactériennes et antifongiques (**Wijaya et al., 2016 ; Rakatama et al., 2018**).

De nombreux travaux ont été réalisés sur les graines torréfiées de café contrairement aux graines vertes. Pour cela, cette étude s'intéresse à évaluer le potentiel biologique *in-vitro* des extraits obtenus à partir des graines vertes de *Coffea canephora* et *Coffea arabica* en effectuant :

- La détermination de la composition chimique des différents extraits via la chromatographie liquide à haute performance RP-HPLC-PDA et la caractérisation par la RMN et l'infrarouge.
- L'évaluation de l'activité antioxydante par des méthodes basées sur le transfert d'atome d'hydrogène et le transfert d'électron singulier
- Le criblage des activités antibactériennes et antifongiques des différents extraits d'une part, et des activités d'antiadhésion bactérienne d'autre part.
- La détermination de la physico-chimie du polystyrène avant et après son prétraitement par les différents extraits.

Introduction générale

- L'évaluation de la cytotoxicité des différents extraits vis-à-vis des globules rouges humain.

Première partie

Partie bibliographique

Chapitre 1 : Les maladies infectieuses et stress oxydatif

Les maladies infectieuses sont des maladies provoquées par la transmission des microorganismes pathogènes à savoir les bactéries, les virus, les champignons ou les parasites. C'est des maladies qui entravent la santé de base des êtres humains, représentent la majeure cause de mortalité et de ce fait un vrai problème de santé publique (**Guéry, 2008**).

Au cours des dernières années, l'incidence des maladies infectieuses d'origine bactérienne a nettement augmenté en dépit de l'utilisation intensive des antibiotiques. Ce qui a favorisé l'émergence de la résistance aux antibiotiques (**Tremolieres, 2010 ; Da Re et Ploy, 2012**).

En effet, l'utilisation massive des antibiotiques, a fait que les bactéries pathogènes ont pu développer des mécanismes de résistance contre plusieurs familles d'antibiotiques. Cette évolution a été particulièrement spectaculaire depuis une vingtaine d'années (**Guéry, 2008 ; Da Re et Ploy, 2012**).

Cette résistante peut être naturelle ou acquise. Cette dernière est due probablement aux mutations génétiques ou à l'acquisition du matériel génétique par transfert horizontal de gènes *via* des éléments génétiques mobiles (**Da Re et Ploy, 2012**).

L'adhésion de bactéries pathogènes ou opportunistes sur une surface mène à la formation du biofilm. Ce dernier est un mode de vie bactérien connu pour sa grande résistance aux traitements antibiotiques. Le biofilm est considéré comme une structure complexe de nature polysaccharidique dont la formation est influencée d'une part par les propriétés physico-chimiques de la surface cellulaire, et d'autre part par des facteurs environnementaux tels que la température, la composition du milieu, le pH et la force ionique (**El Ghmari et al., 2002 ; Elfazazi et al., 2018**). Ces facteurs jouent un rôle important dans le phénomène d'adhésion et la formation de biofilms sur les surfaces de matériaux inertes ou de composés organiques solides (**Elfazazi et al., 2018**).

De nombreuses bactéries utilisent les composés oxygénés pour survivre dans un environnement donné. Il est admis que l'activité antioxydante consiste à réduire ou à éliminer les radicaux libres et l'oxygène naissant d'un environnement donné. Ce qui fait que l'élimination des radicaux libres ou des oxydants est liée à l'activité antimicrobienne. En plus, les travaux de Kohanski et ses collaborateurs en 2010, ont montré que certains antibiotiques produisent des dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) qui induisent chez la bactérie un stress oxydatif par l'induction des dommages à l'ADN ce qui favorise l'acquisition de résistances (**Kohanski et al., 2010**).

Les espèces oxygénées activées (EOA) sont produites en présence d'oxygène présent chez les organismes, ce qui entraîne la formation des radicaux libres. La production de ces derniers est un processus régulé par divers processus chimiques ou enzymatiques de détoxification (**Sivanandham, 2011**). Leur formation peut être d'une part endogène (Les cellules phagocytaires, la xanthine oxydase, la respiration mitochondriale) ou exogène (radiation X ou gamma, UV, produits chimiques, cigarette, réaction photochimique...) (**Migdal et Serres, 2011**).

Une augmentation excessive de ces radicaux induit le stress oxydatif, qui est un déséquilibre entre la production des oxydants et les antioxydants (anti/ pro-oxydant) à l'origine de l'apparition de différentes pathologies (**Koechlin–Ramonatxo, 2006**).

En effet, le stress oxydatif conduit à une modification au niveau de l'ADN génomique (**Koechlin–Ramonatxo, 2006**) et cause l'apparition de plusieurs maladies comme le diabète, les maladies cardiovasculaires, neuro-dégénératives et le cancer (**Pincemail et al., 2007**).

La réactivité des radicaux libres est liée aux électrons non appariés qui attaquent la structure de certaines enzymes cellulaires et protéines de transport porteuses d'un groupement sulfhydryle entraînant ainsi la dénaturation ou la fragmentation de la protéine (**Lacolley et al., 2007**).

La tâche des antioxydants est d'éliminer, réduire, prévenir, ou réparer les dommages causés par les ERO (**Figure 1**) (**Koechlin–Ramonatxo, 2006**).

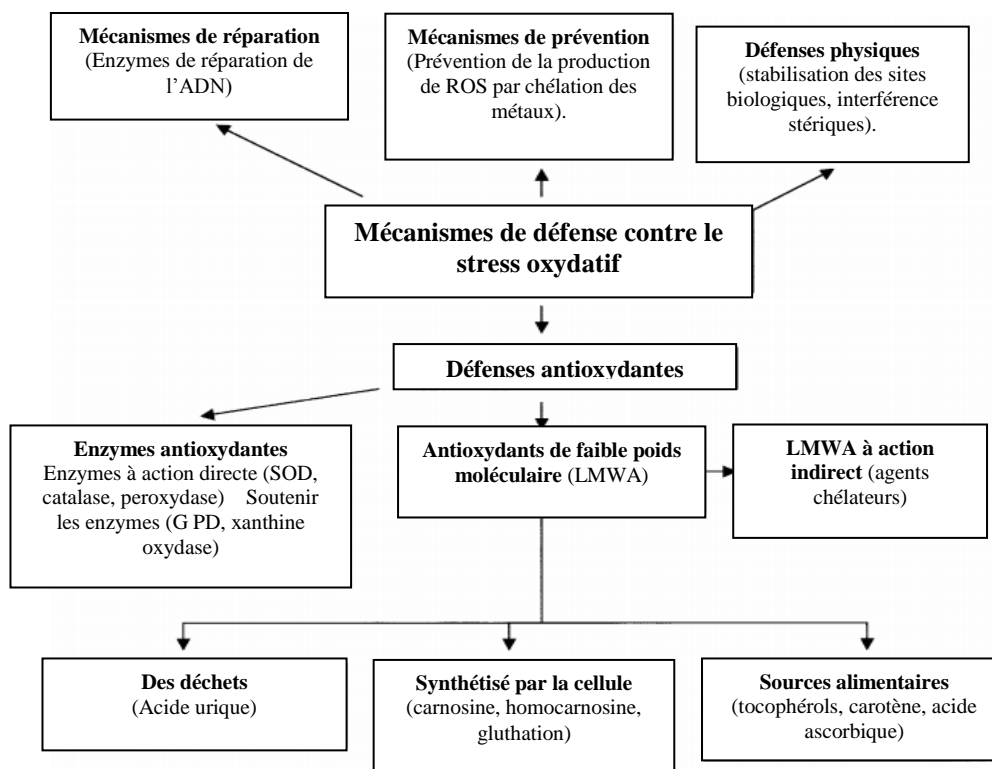


Figure 1: Systèmes de protection contre les EOA (Kohen et Nyska, 2002).

La nature des systèmes antioxydants diffère selon les tissus, les types cellulaires et le milieu intracellulaire ou extracellulaire. Les défenses antioxydantes peuvent être divisées en :

- Système enzymatique, capable de défendre de façon permanente telle que la superoxyde dismutase, la catalase et la glutathion peroxydase (Favier, 2003).
- Système non enzymatique qui renferme de nombreuses substances endogènes parmi lesquelles on peut citer le glutathion, les thioredoxines, les glutaredoxines, les métallothionéines, les polyamines, l'acide lipoïque (Favier, 2003). D'autres composés dits exogènes peuvent agir comme antioxydants à savoir la vitamine E (tocophérol), la vitamine C (acide ascorbique), la vitamine Q (ubiquinone), les polyphénols et/ou encore les caroténoïdes (Favier, 2003 ; Koehlin–Ramonatxo, 2006).

Les antioxydants peuvent agir contre la lipopéroxydation en protégeant les lipides cibles (les acides gras polyinsaturés ou AGPI) contre les effets délétères des espèces réactives de l'oxygène (ERO), donc ils fonctionnent comme des piègeurs des ERO (caroténoïdes, vitamine C, polyphénols). Ils peuvent agir en empêchant la propagation de la lipopéroxydation une fois

qu'un peroxyde d'acide gras (le radical acylperoxy) est apparu, en interrompant directement la chaîne de lipopéroxydation [α -tocophérol (vitamine E)] (**Léger, 2006**).

L'action de ces antioxydants naturels suscite de plus en plus d'intérêt pour la prévention et le traitement de plusieurs infections et maladies ainsi pour leurs usage comme additifs en industrie agroalimentaire, pharmaceutique et cosmétique (**Desmier, 2016**).

En effet, il a été démontré que les molécules antioxydantes telles que l'acide ascorbique, tocophérol, flavonoïdes et les tanins réduisent les radicaux libres en raison de leur capacité à céder l'hydrogène (**Siddhuraju et Becker, 2007**).

Par conséquent, les antioxydants sont considérés comme des réducteurs et inactivateurs des oxydants (**Siddhuraju et Becker, 2007**).

Pour cela, la recherche d'antioxydants à partir des plantes médicinales représente une voie très prometteuse vu que ces dernières peuvent être employées comme remèdes traditionnels (**Sarr et al., 2015 ; Dieng et al., 2017**).

Cependant, la complexité chimique des plantes ne peut être sans risque. Toute substance biologiquement active est susceptible de produire des effets indésirables. C'est le cas général des produits végétaux riches en saponosides (**Ouedraogo et al., 2001**).

Chapitre 2 : Plantes médicinales et métabolites secondaires

L'être humain a pu depuis l'antiquité de développer des connaissances dans l'utilisation des plantes médicinales. Ces dernières sont une source importante et essentielle de composés bioactifs très utilisés pour prévenir, guérir et soigner la santé humaine (**Barka, 2010**).

La médecine traditionnelle basées sur l'usage des plantes a été intégrée comme médecine alternative en raison du développement de la résistance du corps de l'être vivant suite à la consommation excessive des médicaments de convention d'une part, et d'autre part à l'apparition des effets secondaires qui peuvent se développer en effets toxiques (**Nostro et al., 2000 ; Rambhade et al., 2012**). Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), plus de 80% de la populations du monde ont eu recours à la pharmacopée traditionnelle en tant que soins de santé primaire afin de minimiser les effets négatifs (**Farnsworth et al., 1986 ; OMS, 2012**).

Les plantes sont de plus en plus utilisées par l'industrie pharmaceutique. Il est difficile d'imaginer le monde sans la quinine (dérivée du genre *Cinchona*), qui est employée contre la malaria, sans la digoxine (du genre *Digitalis*), qui soigne le cœur, ou encore l'éphédrine (du genre *Ephedra*), que l'on retrouve dans de nombreuses prescriptions contre les rhumes (**Iserin, 2001**). L'activité antimicrobienne des plantes médicinales est exploitée dans la thérapies naturelle, la pharmaceutique et dans la conservation des aliments (**Sagdiç et al., 2002**).

Les plantes médicinales ont moins d'effets secondaires par rapport aux médicaments de synthèse et de ce fait sont utilisées dans différents secteurs autre que le secteur pharmaceutique en l'occurrence l'industrie alimentaire et cosmétique (**Ang et al., 2019 ; Chandran et al., 2020**).

Ces plantes médicinales aux multiples vertus thérapeutiques représentent une immense source de composés chimiques de structures complexes (**Basli et al., 2012**). A côté des métabolites primaires, les plantes biosynthétisent des métabolites dits secondaires. Ces derniers sont produits en très faible quantité en réponse à des situations particulières telle que la défense (contre les herbivores et les pathogènes) et pour faciliter le processus de reproduction (**Alzand et Mohamed, 2012**). Ils sont aussi très exploités par l'homme dans différents domaines comme l'agroalimentaire (antioxydant), médical (antimicrobien, anti hémolytique, ...etc), pharmacologique, cosmétique...etc (**Bruneton, 1993**).

Les métabolites secondaires sont classés en trois grandes familles : les composés phénoliques, les alcaloïdes et les terpènes (Pasdeloup, 2018).

1. Les composés phénoliques

Les composés phénoliques possèdent au moins un noyau benzénique à 6 carbones associés à des groupements hydroxyles libres ou engagés dans une autre fonction (Figure 2) (Balasundram *et al.*, 2006 ; Pasdeloup, 2018).

Ces métabolites sont très répandus dans le règne végétal et englobent les acides phénoliques, les flavonoïdes, les coumarines et les tanins (Boros *et al.*, 2010 ; Pasdeloup, 2018). La différence entre eux réside au niveau de leur squelette de base, leur degré de modification et les liaisons possibles entre les molécules (D'Archivio *et al.*, 2007).

Les composés phénoliques possèdent une activité antioxydante très importante, ce qui les met en premier rang pour pallier au problème du stress oxydant (Haleng *et al.*, 2007). Ils neutralisent les radicaux libres soit par transfert d'atome d'hydrogène du groupement (OH) à un radical libre produisant ainsi la forme réduite (RH) du radical moins réactif et le radical $ArO\cdot$, soit par transfert d'électrons au radical libre $R\cdot$ donnant généralement des entités stables, ou par la chélation des métaux, ce qui sert à empêcher la réaction de Fenton dans les milieux biologiques (Leopoldini *et al.*, 2011).

Ces composés ont de nombreuses activités biologiques, y compris l'activité réductrice des lipides, cardioprotectrice, hépatoprotectrice, anti-inflammatoires, analgésiques et antinéoplasiques (Boros *et al.*, 2010). De plus, plusieurs études ont mis en évidence le pouvoir antibactérien des polyphénols issus des plantes médicinales contre de nombreuses souches bactériennes pathogènes (Nostro *et al.*, 2000 ; Cushnie et Lamb, 2005 ; Jimoh *et al.*, 2010).

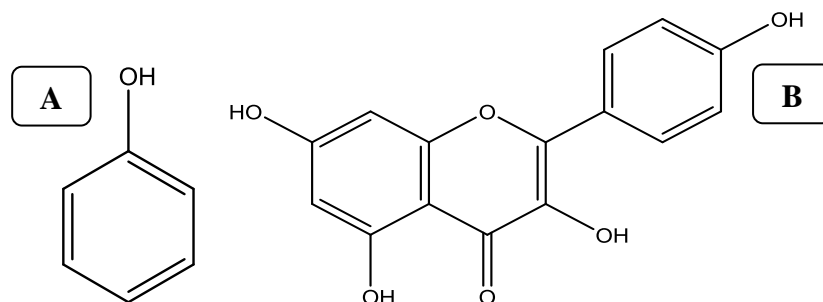


Figure 2: Structure de deux composés phénoliques (A: phénol, B: polyphénol) (Vermerris et Nicholson, 2006).

1.1. Les acides phénoliques

Ils représentent le tiers des composés phénoliques et sont sous forme d'un noyau aromatique substitué de groupement hydroxyles, une fonction acide et parfois d'un groupement méthyles (Zadernowski *et al.*, 2009 ; Padeloup, 2018).

Ils se divisent en deux groupes : les acides hydroxybenzoïques qui regroupent l'acide salicylique, l'acide ρ -hydroxy-benzoïque, l'acide protocatéchique, l'acide gallique et l'acide vanillique. Le deuxième groupe concerne les acides hydroxycinnamiques qui englobent l'acide cinnamique, l'acide ρ -coumarique, l'acide caféique et l'acide férulique (Vermerris et Nicholson, 2006) (Figure 3).

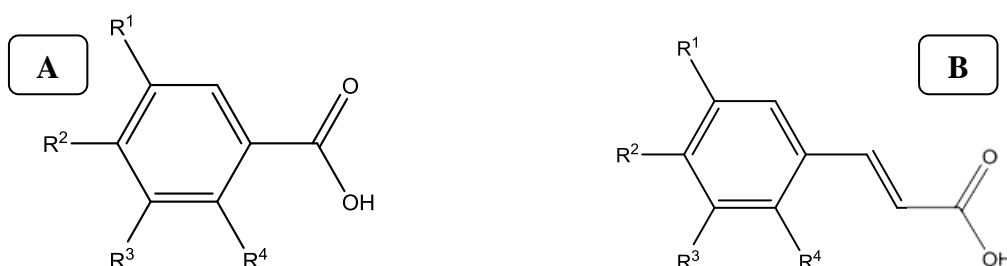


Figure 3: Structures des acides phénoliques (A: Les acides benzoïques, B: Les acides cinnamiques) (Chira *et al.*, 2008).

1.2. Les flavonoïdes

Ce sont des dérivés du diphenylpropane avec un squelette de base de type flavone ou 2-phényl chromons formés par deux cycles en C6 (A et B) reliés entre eux par une chaîne en C3 qui donne un hétérocycle C (Figure 4) (Vermerris et Nicholson, 2006). Ils renferment les flavonols, les flavones, les flavonones, les chalcones, flavanes, les isoflavones et les anthocyanes (Fraga et Oteiza, 2011). Ils sont responsables de la pigmentation et qui exercent plusieurs propriétés biologiques dont l'activité antimicrobienne (Ulanowska *et al.*, 2006), anti-inflammatoire et anti-tumorale (Harborne et Williams, 2000).

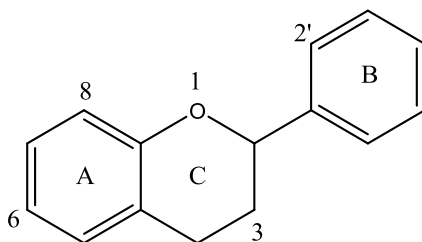


Figure 4: Squelette de base d'un flavonoïde (Chira *et al.*, 2008).

1.2.1. Chalcone et les aurones

Les chalcones sont des composés phénoliques ayant un noyau A avec des substitutions identiques à celles des autres flavonoïdes, alors que le cycle B reste peu ou pas substitué. Les aurones dérivent du chalcone avec une structure de 2- benzylidène-coumaranone. Ces composés sont responsables de la pigmentation jaune à orange au niveau des fleurs (Andersen et Markham, 2006).

1.2.2. Flavones et flavonols

Les flavones (R = H) et les flavonols (R = OH) (Figure 5) représentent la plus grande classe des flavonoïdes connues. Les flavonols se distinguent des flavones par la présence d'un groupement OH au niveau du carbone 3 et peuvent exister sous forme d'aglycones ou d'hétérosides (Figure 5) (Andersen et Markham, 2006 ; Chira *et al.*, 2008).

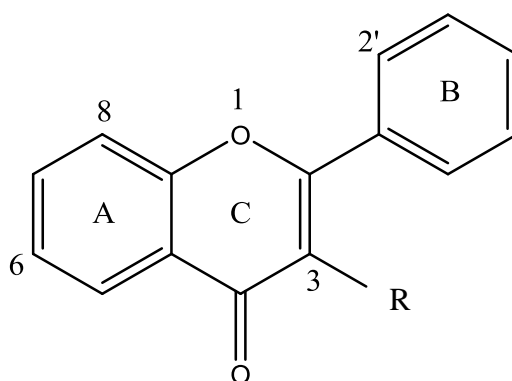


Figure 5: Squelette de base des flavones (R=H) et flavonols (R=OH) (Andersen et Markham, 2006).

1.2.3. Les flavanones et flavanonols

Les flavanones et les flavanonols (dihydroflavonols) sont caractérisés par l'absence de la double liaison au niveau du carbone 2 et 3 avec un centre chirale en position 2 (Chira *et al.*, 2008). La différence entre ces deux molécules se résume par la présence d'un groupement hydroxyle en position 3 des flavanonols (Figure 6).

Les variations structurales de ces composés sont les mêmes que celles décrites pour les flavones et flavonols (Andersen et Markham, 2006).

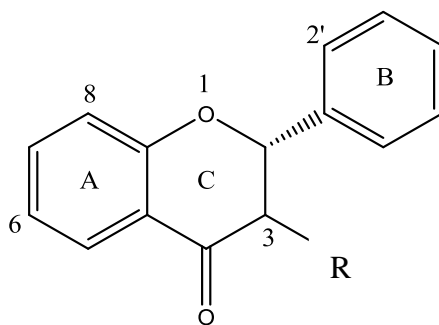


Figure 6: Squelette de base des flavanones (R=H) et des dihydroflavonols (R=OH)
(Andersen et Markham, 2006).

1.2.4. Flavanols

Ils se caractérisent par l'absence du groupe carbonyle en C4 possédant ainsi deux centres asymétriques en C2 et C3 (**Figure 7**). Les deux centres chiraux de ces derniers produisent quatre stéréoisomères: (+)-catéchine, (+)-épicatéchine, (-)-catéchine, (-)-épicatéchine. La (+)-catéchine et (-)-épicatéchine sont les très répandues (**Farga et Oteiza, 2011**).

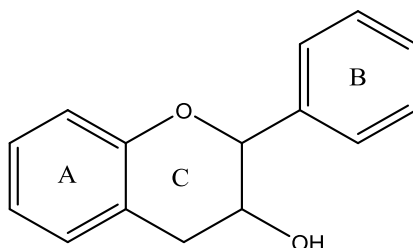


Figure 7: Squelette de base des flavanols (**Andersen et Markham, 2006**).

1.2.5. Anthocyanes

Les anthocyanes sont localisés au niveau des tissus des fruits et fleurs et sont responsables de la coloration allant du rose saumon au rouge et du violet au bleu foncé (**Andersen et Markham, 2006**). Ces anthocyanes sont des métabolites composés de 15 atomes de carbones formant deux cycles A et B, et un hétérocycle C (**Figure 8**) (**Khoo et al., 2017**).

Ces composés sont souvent liés avec des sucres, avec l'hydroxycinnamates et les acides organiques tels que l'acide malique et l'acide acétique. Les plus connus sont la pélagonidine, cyanidine, péonidine, délphinidine et la malvedine. Ils sont impliqués dans la protection des plantes contre les excès de lumière (**Chira et al., 2008**).

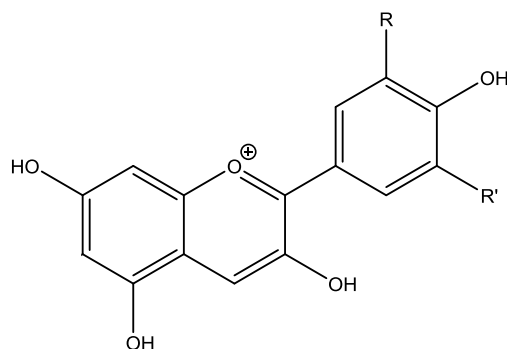


Figure 8: Structure générale des anthocyanes (Andersen et Markham, 2006).

1.2.6. Isoflavonoïdes

En fonction du degré d'oxydation ainsi qu'à la présence ou l'absence d'hétérocycles supplémentaires, ils peuvent être classés en: 3-arylcoumarines, coumaronochromones, coumestanes, isoflavanes, isoflavènes, isoflavones, roténoïdes, ptérocarpanes (**Figure 9**) (Andersen et Markham, 2006 ; Niaz et Khan, 2020).

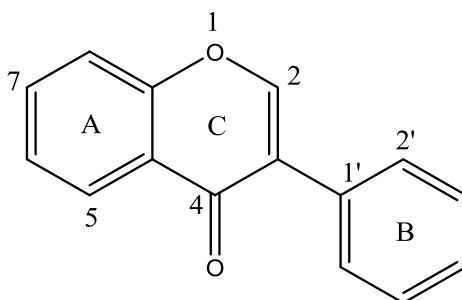


Figure 9: Squelette de base d'un isoflavone (Andersen et Markham, 2006).

1.3. Tanins

Les tanins sont des composés phénoliques macromoléculaires et hétérogènes (500 et 3000 Da) ayant la capacité de fixer des protéines (Brunet *et al.*, 2008 ; Padeloup, 2018). Certains d'entre eux sont toxiques alors que d'autres sont très bénéfiques du point de vue santé (Mueller-Harvey, 2006). Ils sont fortement hydroxylés et qui se divisent en :

1.3.1. Tanins hydrolysables

Ils sont sous forme d'oligo- ou polyesters d'un sucre (généralement le glucose) associés d'un nombre variable de molécules d'acide phénolique. Selon la nature de ce dernier, ils sont classés en tanins galliques et les tanins éllagiques (**Figure 10**) (**Bruneton, 1999 ; Cowan, 1999**).

1.3.2. Tanins condensés (proanthocyanidine)

Les tanins condensés représentent le groupe le plus important dont les structures sont proches de celle des flavonoïdes. Ils existent sous forme de polymères ou oligomères de flavanes, flavan-3-ols (catéchines) et flavan- 3,4-diols (leucoanthocyanidines) et qui ne contiennent pas de sucres (**Figure 10**) (**Cowan, 1999 ; Khanbabaee et van Ree, 2001 ; Vermerris et Nicholson, 2006**).

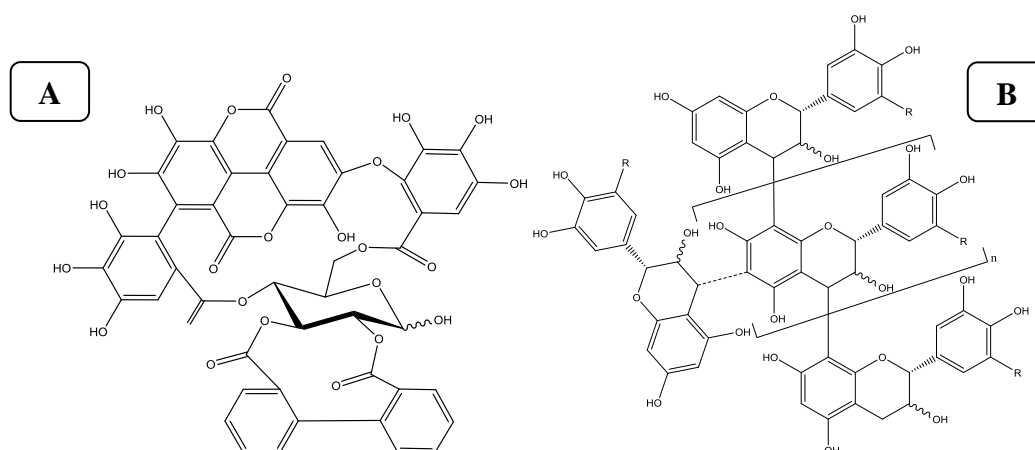


Figure 10: Structure des tanins hydrolysables (A) et des tanins condensés (B).

1.4. Les coumarines

Les coumarines sont des composés organiques aromatiques hétérosidiques oxygénés, avec un noyau de type benzo (2 H)-1 pyran-2-one (**Yamashita *et al.*, 2005 ; Vermerris et Nicholson, 2006**) (**Figure 11**). Elles sont très répandues dans le règne végétal et qui contribue à l'odeur de foin. Les coumarines sont appliquées dans des différents secteurs à savoir pharmaceutique, cosmétique et agricole (**Yamashita *et al.*, 2005**). Elles exercent une activité antimicrobienne, anti-inflammatoire, anti-thrombique et vasodilatatrice (**Cowan, 1999**).

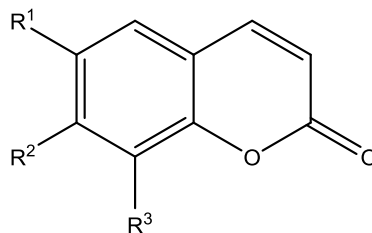


Figure 11: Structure de base des coumarines (Matos *et al.*, 2015).

2. Les alcaloïdes

Les alcaloïdes sont des métabolites secondaires organiques azotés, hétérocycliques et alcalins (Figure 12) (Cowan, 1999). Ils se divisent généralement en alcaloïdes vrais qui présentent au moins un hétérocycle, les proto-alcaloïdes dont l'azote est en dehors des structures cycliques et les pseudo-alcaloïdes (Rakotonanahary, 2012).

Mise à part les pseudo-alcaloïdes, les alcaloïdes dérivent des acides aminés insolubles dans l'eau et sont doués de propriétés biologiques importantes comme les mécanismes de défense des plantes contre les herbivores (Yinyang *et al.*, 2014 ; Padeloup, 2018). De plus, ils exercent au niveau du système nerveux central un effet stimulant (strychnine, caféine) ou dépresseur (morphine, scopolamine) (Padeloup, 2018).

Plusieurs études ont montré que les alcaloïdes sont employés dans le domaine pharmacologique car ils présentent une activité antiplasmodiale, antispasmodique et des effets laxatif, antirhumatismal, antalgique et analgésique (N'Guessan *et al.*, 2009 ; Bla *et al.*, 2015).

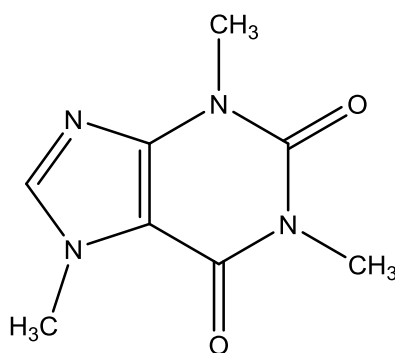


Figure 12: Structure d'un alcaloïde : la caféine (Farah, 2012).

3. Les terpènes

Les terpènes sont des hydrocarbures pentacycliques ramifiées du 2-méthyl-1,3-butadiène appelés isoprènes (**Figure 13**). Selon le nombre de répétitions de l'unité de base isoprénique, on distingue: les hémiterpènes, les monoterpènes, les sesquiterpènes, les diterpènes, les sesterterpènes, les triterpènes, les tétraterpènes et polyterpènes (**Tableau 1**) (**Pasdeloup, 2018**).

Ils possèdent de nombreuses propriétés pharmacologiques : anti-inflammatoires, antimicrobiennes, antiparasitaires, antiseptiques, spasmolytiques et sédatives, cytotoxiques, édulcorantes... (**Pasdeloup, 2018**).

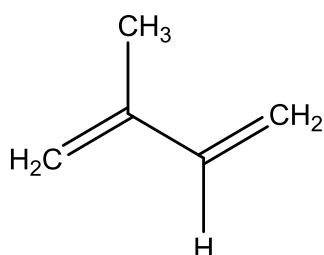


Figure 13: Structure de l'isoprène.

Tableau 1: Les différentes classes des terpénoïdes (**Williams et al., 1985 ; Sawai et al., 2006 ; Silva et al., 2014 ; Alquézar et al., 2017 ; Pasdeloup, 2018 ; Maoka, 2020**).

N	Squelette carboné	Type de terpénoïde	Exemple
1	C5	Hémiterpène	Isoprène
2	C10	Monoterpène	Nérol
3	C15	Sesquiterpène	β -cadinène
4	C20	Diterpène	Phytol
6	C30	Triterpène	Lanostérol
8	C40	Tétraterpène	Caroténoïde
>8	>C40	Polyterpène	Caoutchouc

Chapitre 3 : Le caféier

1. Généralité

La famille des *Rubiaceae* est parmi les familles les plus vastes des Angiospermes (**Robbrecht, 1988**). Les *Rubiaceae*, à répartition cosmopolite, sont surtout retrouvées dans les régions tropicales. Elles sont composées essentiellement d'arbustes ou d'arbres avec 13 000-14 000 espèces pour environ 670 genres. Cette famille regroupe trois groupes majeurs qui sont les *Cinchonoideae*, les *Rubioideae* et les *Ixoroideae*. Cette dernière renferme les genres *Coffea* et *Gardenia*. Ils sont caractérisés par la présence des feuilles opposées ou verticillées et munies de stipules, des fleurs à corolle gamopétale, des étamines en nombre égal à celui des pétales, et un ovaire généralement infère (**Mouly, 2008**). A l'échelle mondiale, les *Rubiaceae* sont caractérisées par leurs ordres économiques importants. Parmi les plantes les plus commercialisées nous citons le caféier.

Le caféier est une plante qui appartient au genre *Coffea*, qui est très connue par ses propriétés pharmacologiques intéressantes (**Patay et al., 2016a**). Il a été découvert en Éthiopie dans la région de Kaffa, puis il s'est propagé au début du 15^{ème} siècle au Yemen, Moyen-Orient et l'Afrique du nord. Les premiers commerçants vendirent le café en Europe sous plusieurs appellations Kahweh, Caffè, Kaffee, Koffie (**Clifford et Willson, 1985 ; Jeszka-Skowron et al., 2015**). Dernièrement il est cultivé dans des zones tropicales et subtropicales en particulier dans la région équatoriale (**Patay et al., 2016c**).

Le caféier est un arbre ou arbuste endémique qui exige des conditions environnementales très spécifiques telle que la température et l'humidité (**Patay et al., 2016a**). Parmi les différentes espèces de cette plante, *Coffea arabica* (Linné), *Coffea canephora* (Pierre) et *Coffea liberica* (Hiern) sont les plus commercialisées et représentent la deuxième marchandise la plus commercialisée dans le monde après le pétrole (**Patay et al., 2016c ; Adepoju et al., 2017**).

L'espèce *Coffea arabica* connue sous le nom arabica provient d'Éthiopie. Elle pousse à des altitudes élevées (entre 1000 et 2000 mètre d'altitude) à une température constante aux environs des 20°C. Ses graines représentent plus de 60% de la production mondiale de café. Elle est souvent cultivée en Afrique, en Asie et surtout en Amérique. Ses principales variétés sont le bourbon, le typica, le maragogype et le moka (**Clifford et Willson, 1985 ; Lambard, 2003 ; Jeszka-Skowron et al., 2016**).

Cependant, *Coffea canephora* appelée robusta est originaire du bassin du Congo et croit à une altitude de 700 mètres dans des climats plus chauds et secs. Elle ne tolère pas des températures inférieures à 15°C. Ce qui lui permet une plus grande résistance aux maladies et une valeur de marché inférieure par rapport à arabica. Ses graines représentent moins de 40% de la production mondiale de café. Elle est aussi cultivée dans les mêmes endroits que l'espèce arabica (Clifford et Willson, 1985 ; Gomez *et al.*, 2009 ; Jeszka-Skowron *et al.*, 2016).

Le café est la boisson la plus consommée au monde et de ce fait représente l'un des produits les plus importants sur le marché mondial des produits agroalimentaires avec une consommation qui avoisine 7 millions de tonnes par an (Baeza *et al.*, 2014).

2. Taxonomie de la plante du café

Le caféier avec ses 450 genres et 6500 espèces appartient à la famille des Rubiacées (Patay *et al.*, 2016b).

Selon Anthony *et al.*, 2010, la classification botanique du café est comme suit :

Domaine : *Eukaryota*

Règne : *Plantae*

Sous règne : *Tracheobionta*

Division : *Magnoliophyta*

Classe : *Magnoliopsysda*

Sous classe : *Asteridae*

Ordre : *Rubiales*

Famille : *Rubiaceae*

Genre : *Coffea*

3. Morphologie

A l'état naturel, le caféier croit de 3 à 6,5 mètres pour l'espèce Robusta et peut atteindre jusqu'à 5 mètres de hauteur pour l'espèce Arabica avec un tronc droit, des branches grêles et disposées par paires (FAO, 2005 ; Lim, 2013).

Les branches primaires poussent horizontalement, opposées les unes aux autres le long du tronc, portant des branches secondaires, les fleurs et les fruits. Ces branches primaires ne sont pas renouvelables (FAO, 2005).

Cet arbuste présente des feuilles vertes foncées brillantes et persistantes, des fleurs blanches pures et parfumées. Ses fruits sont verts, rouges ou jaunes selon le degré de maturité et la variété rencontrée.

Les feuilles s'opposent deux à deux tout au long de la tige dont la face supérieure est luisante, allongée et terminée en pointes avec une taille qui varie entre 20 à 35 cm de long et de 6 à 15 cm de large chez *Coffea canephora* alors qu'elle est de 7 à 20 cm de long et 2,5 à 6,5 cm de large chez *Coffea arabica* (**Figure 14**) (Coltro *et al.*, 2006 ; Murthy et Naidu, 2012 ; Lim, 2013).

Les fleurs sont disposées en cymes à axe très court ; elles sont regroupées en glomérules plus ou moins fournis. L'éclosion n'a lieu que durant quelques heures. Chaque année, on compte plusieurs floraisons (**Figure 14**) (Haler, 2013).

Après 6 à 12 mois, le fruit du caféier donne naissance à une cerise qui présente à maturité une baie de forme ovoïde de couleur verte, jaune et rouge, elle est classée comme «drupe» (**Figure 14**) (Haler, 2013 ; Lim, 2013).

Les premiers boutons floraux apparaissent au bout de trois ans. Ils restent en attente avant de s'ouvrir. Leur ultime développement dépend des conditions météorologiques. Ainsi, il faut une pluie succédant à une longue période de sécheresse. Ensuite, le caféier peut fleurir quasiment toute l'année (FAO, 2005 ; Murthy et Naidu, 2012).



C. arabica



C. canephora



Figure 14: Les différentes parties du caféier (A : Feuilles, B : Fleurs, C : Fruits) (Lim, 2013).

4. Compositions chimiques du caféier

Au cours de ces dernières années, plusieurs chercheurs se sont intéressés à étudier la composition chimique des extraits du caféier (**Tantin, 2016**). Certains rapports indiquent que les feuilles de café peuvent contenir tous les principaux métabolites présents dans les graines (**Acidri et al., 2020**).

Selon la littérature, les graines vertes de café sont très riches en métabolites secondaires tels que: les alcaloïdes parmi lesquels figurent la caféine, la trigonelline et la théophylline (**Ribeiro et Sebastiao, 2010 ; Chu, 2012**), les acides aliphatiques et les acides phénoliques (acide quinique (AQ), acide caféique (AC) et acide chlorogénique (ACG) qui présente les caractères des tanins (**Farah, 2012 ; Zain et al., 2017**), les sucres simples comme le glucose, les oligosaccharides (le fructose), polysaccharides tels que la cellulose, les lignines, les pectines et les arabinogalactannes (**Clifford et Willson, 1985 ; Adepoju et al., 2017**).

Les graines de café renferment également les diterpènes (cafestol et kahweol), les lipides, tocophérol, la vitamine (vitamines B3 et PP), les acides aminés (l'alanine, l'arginine, l'asparagine, la cystéine, l'acide glutamique), les protéines et quelques minéraux (le potassium, le magnésium, le calcium, le sodium, le fer) (**Speer et Kölling-Spper, 2006 ; Farah, 2012 ; Affonso et al., 2016 ; Tantin, 2016 ; Adepoju et al., 2017 ; Zain et al., 2017**) (**Tableau 2**).

Cette composition peut varier qualitativement et quantitativement selon les conditions climatiques de culture, la composition du sol, les conditions du stockage, les aspects génétiques et physiologiques (**Farah, 2012**).

Tableau 2: Composition biochimique des graines vertes de café (Belitz *et al.*, 2009 ; Solange *et al.*, 2011).

	Concentration en g/100 g de matière sèche		Constituants
	<i>C. canephora</i>	<i>C. arabica</i>	
Monosaccharides	0,2-0,5	0,2-0,5	Fructose, glucose, galactose, arabinose (traces)
Oligosaccharides	3-7	6-9	Sucrose (>90%), raffinose (0-0,9%), stachyose (0-0,13%)
Polysaccharides	3-4		Polymère de galactose (55-65%), mannose (10-20%), arabinose (20-35%), glucose (0-2%)
Hémicelluloses	3-4	5-10	galactose (65-75%), arabinose (25-30%), mannose (0-10%)
Acides aliphatiques non volatiles	1,3-2,2	2-2,9	Acide citrique, acide malique, acide quinique
Acides Phénoliques	7,1-12,1	6.7-9.2	Acide chlorogénique (Mono-, dicaffoyl-, et acide feruloylquinique)
Lipides	8-12	15-18	ND
La cire (Wax)	0,2-0,3		ND
Huiles	7,7-17,7		Acides Gras 16 :0 et 18 :2 ^{9,12}
Composés azotés	11-15		ND
Acides aminés libres	0,2-0,8		Glu, Asp, Asp -NH ₂
Protéines	8,5-12		ND
Alcaloïdes	1,7-4	0,8-1,4	Caféines
	0,3-0,9	0,6-1,2	Trigonelline
Minéraux	3-5,4		K, P, Na, Mg
ND : non identifiés			

La boisson issue du café se distingue par rapport aux autres boissons par son potentiel antioxydant, anti carcinogène et anti-inflammatoire puissant (Patay *et al.*, 2016a). Cela est dû à leurs richesses en métabolites secondaires qui exercent un effet bénéfique du café sur la santé humaine. Parmi eux :

a. La trigonelline (acide 1-N-méthylnicotinique)

Cette molécule est un alcaloïde à noyau pyridinique ($C_7H_7NO_2$, 137,14 g/ mol). Elle est formée à partir de l'acide nicotinique et qui est considéré comme un composant majeur dans les grains de café et représente de 0,6 à 2% du poids sec (Figure 15) (Clifford et Willson, 1985 ; Mazzafera, 1991 ; Hirakawa *et al.*, 2005 ; Farah, 2012). La trigonelline est thermiquement instable (au-delà de 160°C) et qui dérive de la méthylation enzymatique de l'acide nicotinique appelé aussi vitamine B3. Elle est responsable du goût amer de l'infusion de café (Farah, 2012).

La trigonelline est l'un des composés qui possèdent des propriétés curatives vis-à-vis des différentes pathologies. En effet, elle exerce un effet inhibiteur sur la croissance de *Streptococcus mutans* (Daglia *et al.*, 2002). Elle possède aussi d'autres propriétés telle que l'effet anticancéreux, régénérateur des dendrites et axones dans les neurones corticaux (Hirakawa *et al.*, 2005 ; Allred *et al.*, 2009 ; Farah, 2012).

Allred *et al.*, (2009) ont révélé que la trigonelline agit comme un phytoestrogène; elle stimule la croissance des cellules MCF-7 et cet effet est médié par le réticulum endoplasmique.

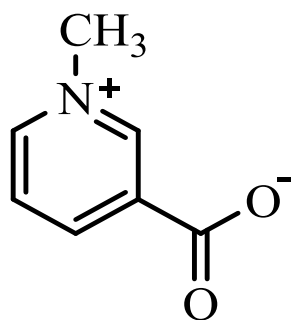


Figure 15: Structure chimique de la trigonelline (Farah, 2012).

b. La caféine

La caféine est une base purique de la famille des méthylxanthines (**Figure 16**). Il s'agit de la 1,3,7-triméthylxanthine ($C_8H_{10}N_4O_2$) avec la masse moléculaire de 194,19 g/mol (**Haler, 2013**). Elle constitue l'alcaloïde majoritaire des espèces du café dont la consommation permet d'augmenter la dépense énergétique, la vigilance et la concentration, et améliore les performances physiques (**Farah, 2012 ; Haler, 2013**).

Elle permet l'augmentation de l'effet stimulant et psychostimulant provoquant ainsi une bronchodilatation (**Farah, 2012 ; Haler, 2013 ; Patay et al., 2016a**). Parmi les métabolites de la caféine, la 1-méthylxanthine et le 1-méthylurate sont responsables de l'activité antioxydante et le pouvoir de réduction du fer (**Farah, 2012**).

Cet alcaloïde est thermostable, responsable de 10% de l'amertume du café et inhibe l'antagoniste des récepteurs de l'adénosine A1, A2A, A2B et A3 et de ce fait stimule le système nerveux central (**Ribeiro et Sebastiao, 2010 ; Farah, 2012 ; Marx et al., 2016**). Il est considéré également comme un inhibiteur des produits de peroxydation lipidique induit par le peroxyde d'hydrogène dans les fibroblastes de la peau humaine (**Jeszka-Skowron et al., 2016**).

La caféine inhibe également certaines phosphodiesterases ce qui augmente l'AMPc intracellulaire et active la protéine kinase A (lipolyse, production de glucose entre autres). Elle diminue aussi la réaction inflammatoire (**Ribeiro et Sebastiao, 2010 ; Haler, 2013 ; Marx et al., 2016**).

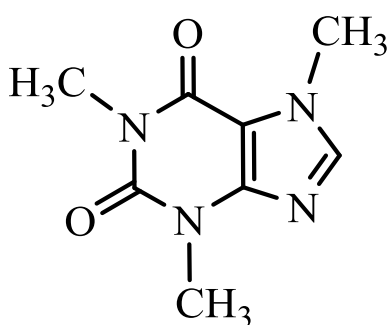


Figure 16: Structure chimique de la caféine (**Farah, 2012**).

c. L'acide chlorogénique

Il dérive de l'estérification des acides hydroxycinnamique et des acides quiniques (**Figure 17**) (**Zain et al., 2017**). Il présente un effet dans le traitement des maladies neurologiques comme la maladie d'Alzheimer et la maladie de Parkinson, le diabète de type II ainsi que le cancer (**Kwon et al., 2010 ; Farah, 2012 ; Kato et al., 2018**).

Ces acides ont un rôle important dans la formation des pigments, et sont également responsables du développement de l'arôme de la boisson de café (**Farah, 2012 ; Iacomino et al., 2017**).

Au niveau artériel, elle réduit la pression artérielle chez les sujets hypertendus et améliore la vasoréactivité chez l'homme ce qui lui permet de jouer un rôle préventif dans les maladies vasculaires. Elle améliore également le fonctionnement de l'endothélium artériel (**Suzuki et al., 2002 ; Suzuki et al., 2006**). D'autre part, dans les cas du cancer, ces molécules peuvent agir : au stade de l'initiation (inhibe la croissance des cellules cancéreuses) et au stade de la promotion et de la progression (apoptose des cellules tumorales) (**Lukitasari, 2018 ; Tan et al., 2019**).

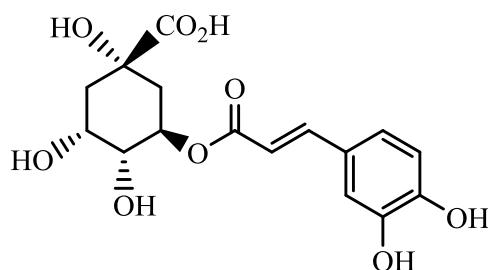


Figure 17: Structure chimique de l'acide chlorogénique (**Farah, 2012**).

d. Kahweol et cafestol

Les graines vertes des espèces *Coffea arabica* et *Coffea canephora* présentent des marqueurs spécifiques qui représentent environ 20% de la fraction lipidique du café (**Rafael-Carlos et al., 2010 ; Farah, 2012 ; Fábio et al., 2018**). Ces marqueurs sont les diterpènes pentacycliques : le Kahweol (C₂₀H₂₆O₃, 314,42 g/mol) et le Cafestol (C₂₀H₂₈O₃, 316,44 g/mol) (**Farah, 2012**). La seule différence entre ces deux molécules réside dans la présence d'une double liaison entre les carbones 4 et 5 du noyau A au niveau du kahweol (**Novaes, 2018**), ce qui le rend plus sensible à la chaleur, l'oxygène, la lumière et les acides, et donc moins abondant (**Figure 18**) (**Farah, 2012**).

Ces deux composés exercent des propriétés anti-cancérigènes, anti-oxydantes, anti inflammatoires et hépato-protectives (Cavin *et al.*, 2002 ; Lee *et al.*, 2007 ; Cardenas *et al.*, 2011 ; Yong *et al.*, 2017).

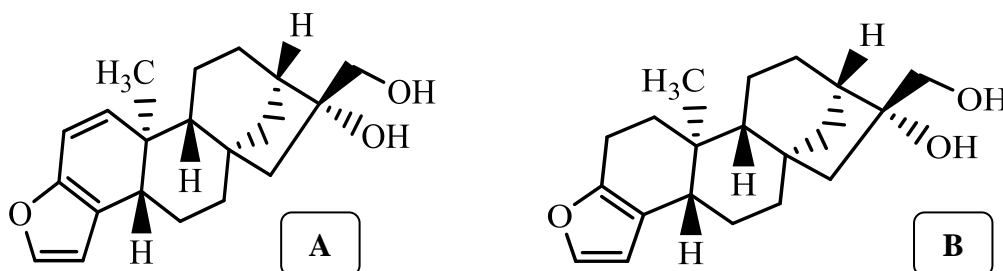


Figure 18: Structures chimiques du kahweol (A) et cafestol (B) (Farah, 2012).

5. Utilisation thérapeutique du caféier

A ce jours, les graines de café, et récemment les feuilles, sont les principales parties utilisées du caféier (Acidri *et al.*, 2020). La richesse ainsi que la diversité structurale des graines de café en métabolites secondaires confèrent au café la propriété d'être exploité dans différents secteurs tels que le secteur industriel et alimentaire (Acidri *et al.*, 2020).

Les différentes parties du caféier ont été utilisées en médecine traditionnelle vis-à-vis de différentes maladies (Patay *et al.*, 2016a). En effet, le charbon de café a été destiné pour le traitement des maladies inflammatoires à savoir les plaies purulentes, la pharyngite et la stomatite (Patay *et al.*, 2016a). Alors qu'une application direct des feuilles fraîches du café sont efficaces contre les maux de tête et la fièvre dans la stimulation de la production de prolactine (Ross, 2005 ; Patay *et al.*, 2016a). De plus, les feuilles sont utilisées comme médicament laxatif ainsi que pour traiter les douleurs d'estomac (Patay *et al.*, 2016a).

En 2014, dans une étude ethnopharmacologique réalisée par Belayneh et Bussa, il a été cité que le café a été utilisé comme traitement contre plusieurs maladies telles que les douleurs abdominales, diarrhée, vomissements, perte de conscience et d'évanouissement du patient.

Par décoction, l'extrait aqueux de graines de café était utilisé contre la fatigue, la fièvre, l'asthme, comme médicament cardiotonique et neurotonique (Patay *et al.*, 2016a).

Deuxième partie

Matériel et méthodes

Ce travail a été réalisé au niveau du laboratoire de recherche «Antibiotiques Antifongiques : physico-chimie, synthèse et activité biologique» (Lapsab), Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Sciences de la Terre et de l'Univers, Université Abou bekr Belkaïd-Tlemcen en collaboration avec:

- Laboratoire de Catalyse et Synthèse en Chimie Organique, Faculté des Sciences, Université de Tlemcen, B.P. 119, 13000 Tlemcen,
- Laboratoire des Bioprocédés et Biointerfaces, faculté des sciences et techniques, Université de Sultane Moulay Slimane, Maroc,
- Laboratoire de Produits Naturels, Département de Biologie, Faculté SNV-STU, Université Aboubekr Belkaïd-Tlemcen, B.P. 119 Imama 13000,
- Centre de Recherche scientifique et technique en Analyses Physico-Chimiques (CRAPC), BP 384, Bou-Ismaïl 42004, Tipaza,
- Centre de Recherche en Biotechnologie Ali Mendjli Nouvelle Ville UV 03 BP E73 Constantine.

I. Matériel biologique

1. Matériel végétal

Les graines vertes des deux plantes *Coffea canephora* et *Coffea arabica* ont été fournies par une société privée au cours du mois de Décembre 2016. Elles sont originaires de Côte D'ivoire et de l'Ethiopie respectivement. Elles ont été conservées dans le laboratoire à la température ambiante et à l'abri de la lumière.

2. Microorganismes

Le pouvoir antimicrobien des différents extraits des graines vertes des deux plantes de café a été déterminé vis-à-vis de 6 bactéries de références à Gram positif, 9 bactéries de références à Gram négatif et 3 levures de références de l'espèce *Candida albicans* (**Tableau 3**).

Les souches étaient disponibles dans le laboratoire Antibiotiques, Antifongiques: physico-chimie, synthèse et activité biologique. Elles ont été entretenues par des repiquages réguliers puis conservées à 4°C sur gélose nutritive inclinées pour les bactéries et sur Sabouraud pour les levures.

Tableau 3: Souches utilisées dans les tests antimicrobiens.

	Bactéries	Références
Bactéries	Bactéries à Gram positif	
	<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 10876
	<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633
	<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 15313
	<i>Micrococcus luteus</i>	ATCC 9341
	<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 49452
	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923
	Bactéries à Gram négatif	
	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 8739
	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 700603
	<i>Acinetobacter baumannii</i>	ATCC 19606
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853
	<i>Citrobacter freundii</i>	ATCC 8090
	<i>Salmonella typhimurium</i>	ATCC 13311
<i>Proteus mirabilis</i>	ATCC 35659	
<i>Enterobacter cloacae</i>	ATCC13047	
Levures	<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231
	<i>Candida albicans</i>	ATCC 26790
	<i>Candida albicans</i>	IP444
ATCC: American Type Culture Collection.		
IP: Institut Pasteur		

3. Globules rouges

Pour l'étude de la cytotoxicité des extraits, nous avons utilisé un modèle universel de cellules, le globule rouge humain provenant d'un donneur unique sain.

II. Méthodes

1. Préparation des extraits

Une quantité de 10 g des graines vertes (*C. canephora* et *C. arabica*) broyée a été infusée dans 200 mL de méthanol pendant une heure. Après filtration, l'extrait méthanolique obtenu a été évaporé à sec à 55°C grâce à un rotavapor type HEIDOLPH.

Ensuite, 100 ml d'eau distillée bouillante ont été ajoutées à l'extrait brut. Une extraction liquide-liquide a été effectuée en utilisant l'acétate d'éthyle et le n-butanol. L'extrait méthanolique brut, les phases organiques d'acétate d'éthyle, le n-butanol ainsi que la phase résiduelle ont été évaporées à sec à 55 ° C par un rotavapor (**Upson et al., 2000**).

Le rendement pour l'ensemble des fractions a été calculé selon la formule suivante:

$$\text{rendement}\% = \frac{m_0}{m_1} \times 100$$

m_0 : Masse en gramme de l'extrait brut évaporé ;

m_1 : Masse en gramme de la matière végétale initiale.

2. Dosage des métabolites secondaires

2.1. Dosage des polyphénols totaux

L'estimation de la teneur des composés phénoliques a été effectuée en utilisant la méthode de Folin-Ciocalteu selon la méthode décrite par **Vermerris et Nicholson, (2006)**. C'est une méthode basée sur la capacité des phénols oxydés présent dans les extraits à réduire le Folin-Ciocalteu en un mélange d'oxydes bleu de tungstène et de molybdène. L'intensité de la couleur est proportionnelle aux taux des composés phénoliques oxydés et son absorbance est mesurée entre 725 et 760 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

Une quantité de 0,1 mL de chaque extrait a été mise en contact avec 2 mL d'une solution de carbonate de sodium (Na_2CO_3) à 2 %. Après 5 min, 0,1 mL du réactif Folin-Ciocalteu (1 N) fraîchement préparé a été additionné au mélange. L'ensemble a été incubé à l'obscurité pendant 30 min, puis la lecture contre un blanc a été réalisée à 725 nm.

La courbe d'étalonnage a été réalisée dans les mêmes conditions par l'acide gallique aux concentrations allant de 100 à 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Les résultats obtenus ont été exprimés en microgramme équivalent d'acide gallique par milligramme d'extrait ($\mu\text{g EAG}/\text{mg E}$).

2.2. Dosage des flavonoïdes totaux

L'évaluation des flavonoïdes totaux a été réalisée en utilisant la méthode spectrophotométrique au Trichlorure d'aluminium et la soude. Cette technique est basée sur l'oxydation des flavonoïdes par formation d'un complexe de couleur rose qui absorbe dans le visible à 510 nm (**Yazdanparast et Ardestani, 2007**).

Dans un tube à hémolyse, 500 μL de chaque extrait ont été mélangés avec 2 mL d'eau distillée et 150 μL d'une solution de nitrite de sodium (NaNO_2) à 15%. Après 6 min, 150 μL de chlorure d'aluminium (AlCl_3) à 10% ont été ajoutés. Après 6 min, 2 mL d'hydroxyde de sodium (NaOH) à 4% ont été additionnés et le mélange a été ajusté avec l'eau distillée à 5 mL. Après 15 min, la lecture a été effectuée à 510 nm contre un blanc à l'aide d'un spectrophotomètre.

La courbe d'étalonnage a été effectuée dans les mêmes conditions opératoires en utilisant la catéchine à différentes concentrations allant de 100 à 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Les taux en flavonoïdes ont été exprimés en microgramme équivalent catéchine par milligramme d'extrait ($\mu\text{g EC}/\text{mg E}$).

2.3. Dosage des tanins condensés

En présence d'acide (sulfurique ou chloridrique) concentré, les tannins se dépolymérisent puis se transforment en contact avec la vanilline en anthocyanidols de couleur rouge mesurable par spectrophotométrie à 550 nm.

En se basant sur ce principe, 50 μ L de chaque extrait ont été mélangés avec 3 mL de vanilline à 4% et 750 μ L d'acide chlorhydrique concentré (HCl). L'absorbance du mélange a été mesurée contre un blanc à 550 nm après 20 min (**Julkunen-Titto, 1985**).

La courbe d'étalonnage a été réalisée dans les mêmes conditions opératoires en utilisant la catéchine comme standard avec les concentrations comprises entre 100 à 1000 μ g/ mL. Le taux des tanins condensés a été exprimé en microgramme équivalent catéchine par milligramme d'extrait (μ g EC/ mg E).

3. Chromatographie Liquide Haute Performance (en mode inversé)

L'analyse qualitative des composés phénoliques a été réalisée par chromatographie en phase liquide à haute performance à système Perkin Elmar Flexar couplée à un détecteur UV-Vis à longueurs d'onde multiples (RP-HPLC). Les données analytiques ont été évaluées à l'aide d'un système de traitement de données Chromera. Une quantité de 20 μ L de l'extrait a été séparée sur une colonne Eclipse ODS Hypersil C18 (150 mm 4.6 4,6 μ m) à température ambiante avec un débit de 1 mL/ min.

Les composés phénoliques ont été élués en utilisant un gradient d'élution à l'aide d'une première étape : solvant B à 10% pendant 5 min, puis solvant B à 90% pendant 25 min et enfin un gradient linéaire de 90% à 100% de solvant B pendant 15 min. Les aires des pics des extraits ont été mesurées à la longueur d'onde de 280 nm. L'identification de chaque composé était basée sur une combinaison de temps de rétention et d'appariement spectral.

4. La chromatographie sur colonne

Pour la préparation des différentes fractions, nous avons utilisé la chromatographie sur colonne de gel de silice. C'est est une technique préparative qui permet un fractionnement grossier des constituants des extraits selon leur polarité. Cette technique précède les étapes de séparation les plus avancées HPLC, RMN utilisée ultérieurement.

Pour ce faire, 1g de l'extrait n-butanol a été fractionné en utilisant un mélange de solvant Dichlorométhane/ Méthanol avec un gradient décroissant jusqu'à l'épuisement de l'extrait n-butanol. 26 fractions de 15 mL ont été obtenues.

Chaque fraction récupérée en chromatographie sur colonne a été analysée par CCM. Cette technique a été utilisée afin de détecter des fractions pures. Elle a été réalisée en utilisant des

plaques de silice (phase normale, silicycle Ultra pure silicagel, 10- 12 μm), sur support en aluminium.

Le développement des molécules dans ces plaques a été effectué dans des cuves en verre, saturées avec l'éluant approprié, constitué d'un mélange du méthanol/dichlorométhane (80/20, V/V). Les taches obtenues ont été visualisées sous lumière UV (254-365 nm). Les fractions qui présentaient des taches aux mêmes R_F ont été regroupées puis évaporées à sec.

Les fractions qui présentaient une seule tache ont été analysées par la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN) et par la spectroscopie infrarouge (FTIR).

5. Spectroscopie de Résonance Magnétique Nucléaire

Les analyses spectrales par résonance Magnétique Nucléaire à unidimensionnel (^1H et ^{13}C) et bidimensionnel 2D ont été réalisées à l'aide d'un spectromètre Brüker AC 400.

La RMN 2D proton ^1H et carbone ^{13}C a été utilisée pour l'analyse et l'élucidation spectroscopiques des molécules organiques pures de nos fractions.

Le spectre RMN ^1H a été enregistré à 400 et 60 MHz. Les fractions Fn-Br3 et Fn-BA obtenues respectivement à partir de l'extrait n-Butanolique de *C. canephora* et *C. arabica* ont été solubilisées dans le DMSO et le chloroforme et ont été analysée en utilisant le TMS comme étalon interne. Les déplacements chimiques sont exprimés en unités (ppm) et indiqués par rapport au TMS. Les multiplicités sont rapportées comme suit : s, singulet; d, doublet; t, triplet; q, quadruplet; m, multiplet.

Les études des analyses spectroscopique RMN 2D sont utilisées pour révéler la description exacte des structures, et les RMN ^1H et ^{13}C expliquent très bien nos résultats.

6. Analyse par spectroscopie infrarouge

La spectrométrie infrarouge couvre plusieurs méthodes d'identification et de dosage non destructifs basées sur l'absorption (ou la réflexion) par l'échantillon d'un rayonnement électromagnétique de longueur d'onde comprise entre 600 et 3800 cm^{-1} . Le rayonnement électromagnétique interagit avec les niveaux d'énergie des molécules. Il induit, à la résonance, des transitions entre les niveaux de vibration. Il est utilisé comme méthode d'identification des groupements fonctionnels (**Rouessac et al., 2004**).

L'appareil utilisé est un spectromètre Agilent Technologies Cary 600FTIR. Pour cette analyse, les fractions Fn-Br3 et Fn-BA sous forme déshydratés obtenues à partir de l'extrait n-

butanolique de *Coffea arabica* et *Coffea arabica* ont été déposées et bien étalées sur la surface centrale du diamant à l'aide d'une spatule ensuite les mesures ont été effectuées automatiquement.

7. L'activité antioxydante

7.1. Piégeage du radical libre DPPH

L'activité de piégeage des radicaux libres des différents extraits des graines vertes de *C. canephora* et *C. arabica* a été mesurée par DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle) en utilisant le procédé décrit par **Blois, (1958)**. Cette technique est basée sur la réduction du DPPH en présence des antioxydants présents dans les extraits. Ce qui permet le virage de la couleur violette à la couleur jaunâtre lue à 517 nm.

Pour cela, 40 µL de chaque extrait à différentes concentrations ont été introduits dans une microplaque contenant 160 µL d'une solution de DPPH (0,1 mM) fraîchement préparée dans du méthanol.

En parallèle, un contrôle négatif a été préparé en mélangeant 40 µL de méthanol à 160 µL de la solution de DPPH. Au bout de 30 minutes, l'absorbance a été mesurée à 517 nm en utilisant un lecteur de microplaques (Enspire Perkin Elmer).

Les antioxydants de synthèse BHA et BHT ont été utilisés comme standards aux concentrations allant de 0,002 à 0,1 mg/ mL. Le pourcentage de réduction de DPPH a été calculé en utilisant la formule:

$$\text{Pourcentage d'inhibition du DPPH (\%)} = \frac{A_{\text{control}} - A_{\text{d'extrait}}}{A_{\text{control}}} \times 100$$

Les CI_{50} ont été calculées graphiquement pour chaque extrait à partir d'une courbe logarithmique du pourcentage d'inhibition en fonction des différentes concentrations des extraits testés. Elle correspond à la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour réduire 50% de radical DPPH.

7.2. Piégeage de l'ABTS

L'activité de piégeage du radical 2,2'-azinobis- (3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonate) ($ABTS^{+}$) a été évaluée selon la méthode décrite par **Re et al., (1999)**. L' $ABTS^{+}$ a été préparée en mélangeant l'ABTS (7 mM) en solution aqueuse avec le persulfate de potassium

(K₂S₂O₈) (2,45 mM). La solution mère d'ABTS a été conservée à l'abri de la lumière pendant 12 à 16 h avant son utilisation.

160 µL de cette solution ont été ajoutés à 40 µL des extraits à différentes concentrations. Après 10 minutes d'incubation à température ambiante, l'absorbance a été mesurée à 734 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques (Enspire Perkin Elmer). Le BHA et le BHT ont été utilisés comme standards antioxydants aux concentrations allant de 0,0016 à 0,1 mg/ mL.

Le pourcentage de réduction a été calculé à l'aide de l'équation suivante:

$$\text{Pourcentage d'inhibition de l'ABTS (\%)} = \frac{A_{\text{control}} - A_{\text{d'extract}}}{A_{\text{control}}} \times 100$$

Les CI₅₀ ont été calculées graphiquement pour chaque extrait à partir d'une courbe logarithmique du pourcentage d'inhibition en fonction des différentes concentrations des extraits testés. Elle correspond à la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour réduire 50% de radical ABTS.

7.3. Blanchissement du β-carotène

Ce test est basé sur la neutralisation des radicaux libres dérivés de l'acide linoléique en présence d'un antioxydant, ce qui empêche le blanchissement du β-carotène.

Pour cela, 0,5 mg de β-carotène a été solubilisée dans 1 mL de chloroforme puis additionné à 25 µL de l'acide linoléique et 200 mg de Tween 40. Après évaporation, 100 mL d'eau distillée saturée en oxygène ont été ajoutés (**Marco, 1968**).

Ensuite, 160 µL de cette solution ont été mélangés avec 40 µL des différentes concentrations des extraits déposés préalablement dans les microplaques. Les microplaques ont été placées dans une étuve à 50°C pendant 120 min. L'absorbance a été mesurée à 470 nm à l'aide d'un lecteur de microplaque (Enspire Perkin Elmer). Le BHA et l'α-tocophérol ont été utilisés comme antioxydants de références. Le pourcentage d'inhibition a été calculé selon la formule suivante :

$$\text{Pourcentage d'inhibition (\%)} = [1 - (A_{\text{d'extractT0}} - A_{\text{ContrôleT0}}) / (A_{\text{d'extractT120}} - A_{\text{ContrôleT120}})] \times 100$$

Les CI₅₀ ont été calculées graphiquement pour chaque extrait à partir d'une courbe logarithmique du pourcentage d'inhibition en fonction des différentes concentrations des extraits testés. Elle correspond à la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour réduire 50% du β-carotène.

7.4. Pouvoir réducteur du fer

Le pouvoir réducteur du fer a été réalisé afin d'évaluer la capacité des extraits à réduire le Fe^{3+} présent dans le complexe $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ en Fe^{2+} . La lecture est effectuée à 700 nm (Oyaizu, 1986).

Dans une microplaque, 10 μL de chaque extrait à différentes concentrations ont été mélangés avec 40 μL du tampon phosphate (0,2 M, pH 6,6) et 50 μL de solution de ferricyanure de potassium $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ (1%). Après 20 min d'incubation à 50°C, 50 μL d'acide trichloroacétique (TCA, 10%), 40 μL d'eau distillée et 10 μL de solution de FeCl_3 (0,01%) ont été ajoutés.

L' α -tocophérol et l'acide ascorbique ont été utilisés comme contrôles positifs à différentes concentrations. L'absorbance contre le blanc a été lue à 700 nm en utilisant un lecteur de microplaques (Enspire Perkin Elmer). L'augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des extraits. Les résultats ont été exprimés sous forme d' $A_{0,50}$.

$A_{0,50}$ ont été calculées graphiquement pour chaque extrait à partir de l'équation d'une courbe linéaire. Elle correspond à la concentration de l'échantillon testée à une absorbance de 0,5.

7.5. Phénanthroline

L'activité de la phénanthroline a été évaluée selon la méthode décrite par **Szydlowska-Czerniaka et al., (2008)**. Cette activité est basée sur la capacité d'un antioxydant à réduire le fer ferrique en fer ferreux qui forme par la suite un complexe de couleur rouge-orangé avec la 1,10-phénanthroline.

Pour cela, un volume de 10 μL des extraits à différentes concentrations a été mis en contact avec 50 μL de FeCl_3 (0,2%), 30 μL de phénanthroline (0,5%) et 110 μL de méthanol. Le mélange a été incubé pendant 20 min à 30 °C et la mesure des absorbances a été effectuée à 510 nm en utilisant un lecteur de microplaques (Enspire Perkin Elmer). Le BHT et BHA ont été utilisés comme standards. Les résultats ont été exprimés sous forme d' $A_{0,50}$.

$A_{0,50}$ ont été calculées graphiquement pour chaque extrait à partir de l'équation d'une courbe linéaire. Elle correspond à la concentration de l'échantillon testée à une absorbance de 0,5.

7.6. Capacité antioxydante par réduction du cuivre (CUPRAC)

La réduction du cuivre a été déterminée par la méthode CUPRAC décrite par **Apak et al., (2004)**.

40 µL des différents extraits ont été mélangés avec 50 µL du CuCl_2 (10 mM), 50 µL du néocuproïne (7,5 mM) et 60 µL de la solution tampon NH_4Ac (1 M, pH = 7,0). Après une incubation d'une heure à l'abri de la lumière, l'absorbance a été mesurée à 450 nm.

La capacité de réduction des extraits a été comparée à celles de l' α -tocophérol et le BHT. Les résultats ont été calculés à titre de $A_{0,5}$ (µg/ mL) correspondant à la concentration indiquant 0,50 d'absorbance.

7.7. Capacité antioxydante totale

Ce test est basé sur la réduction du molybdène par les extraits des plantes. A pH acide, Cette réduction induit la formation du complexe phosphate/ Mo^{5+} de couleur verte (**Prieto et al., 1999**).

Pour cela, 0,2 mL de l'extrait a été additionné à 2 mL de la solution composée d'acide sulfurique (0.6 N), de phosphate de sodium (Na_3PO_4 , 28 mM) et de molybdate d'ammonium ($(\text{NH}_4)_6 \text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 4 mM). Après incubation à 95°C pendant 90 min, l'absorbance a été mesurée à 695 nm contre un blanc.

L'activité antioxydante totale a été exprimée en mg équivalent acide ascorbique par gramme d'extrait (mg EAA/g E).

8. Etude de l'activité Cholinesterase

Les activités inhibitrices de l'acétylcholinestérase (AChE) et butyrylcholinestérase (BChE) ont été mesurées selon la méthode de **Rhee et al., (2001)** avec une légère modification.

AChE de l'anguille électrique et BChE du sérum de cheval ont été utilisés, tandis que l'iodure d'acétylthiocholine et le chlorure de butyrylthiocholine ont été employés comme substrats de la réaction. Le 5,5-dithio-bis (2-nitrobenzoïque) (DTNB) a été utilisé pour la mesure de l'activité enzymatique détectée à 412 nm.

Pour cela, 150 µL de tampon phosphate de sodium (100Mm, pH 8,0) ont été mélangés avec 10 µL des extraits à différentes concentrations et 20 µL d'AChE ($5,32 \times 10^{-3}$ U) ou BChE ($6,85 \times 10^{-3}$ U). Après 15 min d'incubation à 25°C, 10 µL de DTNB (0,5 mM) ont été ajoutés.

La réaction a été initiée par l'addition de 10 µL l'iodure d'acétylthiocholine (0,71 mM) ou le chlorure de butyrylthiocholine (0,2 mM).

L'hydrolyse de ces substrats a été contrôlée par spectrophotométrie par la formation d'anion jaune 5-thio-2-nitrobenzoate à la suite de la réaction de DNTB avec la thiocholine, libérée par l'hydrolyse enzymatique de l'iodure d'acétylthiocholine ou du chlorure de butyrylthiocholine. Le pourcentage d'inhibition de l'AChE ou BChE a été calculé en utilisant la formule:

$$\text{Pourcentage d'inhibition (\%)} = \frac{A_{\text{control}} - A_{\text{d'extrait}}}{A_{\text{control}}} \times 100$$

La CI_{50} a été calculée à partir du tracé graphique du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration des extraits. La galantamine a été utilisée comme référence.

9. Evaluation de l'activité antibactérienne

L'activité antibactérienne a été étudiée vis-à-vis de 15 souches bactériennes en utilisant la technique de diffusion des disques sur milieu gélosé et la technique de dilution sur milieu liquide selon les recommandations de l'institut des Standards Clinique et des Laboratoires.

9.1.Méthode de diffusion sur gélose

A partir d'une culture bactérienne jeune de 18-24 heures, une suspension bactérienne a été préparée dans l'eau physiologique stérile (9‰). L'absorbance doit être comprise entre 0,08 à 0,1 lue à 625 nm et elle équivaut à 10^8 UFC/ mL.

Des disques stériles de 6 mm de diamètre ont été imprégnés par les différents extraits avec une dose finale de 512 µg/ disque puis transférés dans une boîte de Pétri préalablementensemencée sur la gélose Muller Hinton. La Gentamycine a été utilisée comme témoin positif. Les tests ont été réalisés en triplicata.

La lecture a été réalisée par la mesure des diamètres des zones d'inhibition après incubation de 24 h à 37°C (NCCLS, 2006).

9.2.Détermination de la concentration minimale inhibitrice

Pour ce test, des microplaques stériles à 96 puits ont été utilisées afin de déterminer la plus faible concentration des extraits capables d'inhiber la croissance des bactéries en milieu liquide selon la recommandation de CLSI, (2009).

A partir d'une culture de 18- 24 heures, une suspension bactérienne de 10^6 cellules/ mL dans le bouillon Mueller Hinton a été préparée. En parallèle, une gamme de dilution pour les différents extraits (10 à 0,019 mg/ mL) a été réalisée. Par la suite, 100 µL de chaque dilution

ont été transférées sur les différents puits de la microplaque préalablementensemencés par 100 µL de la suspension bactérienne.

Les premiers puits de la microplaque contiennent uniquement le Mueller Hinton stérile qui sert comme contrôles négatifs. Tandis que le dernier puits représente le contrôle positif, rempli uniquement par la suspension bactérienne.

Les microplaques ont été ensuite scellées puis incubées à 37°C pendant 24h. La CMI correspond à la plus faible concentration de l'extrait testé pour laquelle aucun trouble n'a été observé.

10. Evaluation de l'activité antifongique

L'évaluation de l'activité antifongique des différents extraits a été effectuée vis-à-vis de trois levures de *Candida albicans* selon les mêmes étapes que celles décrites pour les bactéries sauf que le milieu utilisé est le Mueller Hinton supplémenté par 2% de glucose et de 0,5 µg/ mL de bleu de méthylène et l'inoculum a été fixé à 530 nm dans un intervalle compris entre 0,12 à 0,15. Après 24 heures d'incubation à 35°C, la lecture a été effectuée de la même façon que celle décrite pour les bactéries.

Pour la détermination de la CMI, le milieu utilisé a été le Roswell Park Memorial Institute 1640. L'inoculum a été ajusté à 530 nm avec une concentration de $1-5 \cdot 10^6$ UFC/ mL (Espinel-Ingroff, 2007).

11. Evaluation du test d'adhésion

Cette étude a été évaluée dans un premier temps par le test d'adhésion au temps zéro et après le traitement du polystyrène en milieu liquide en présence et en absence de différents extraits de graines vertes de *C. canephora* et *C. arabica*.

Pour cela trois bactéries de références ont été testées: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 et *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

11.1. Préparation de l'inoculum

A partir de souches bactériennes conservées sur glycérol, une préculture dans le milieu lysogeny gélosé a été effectuée. Après incubation à 37 °C pendant 16 à 18 heures, une suspension bactérienne a été préparée puis centrifugée à 5000 tours/ min pendant 15 min à température ambiante. Le culot a été lavé deux fois avec du l'eau physiologie (9‰). La

concentration cellulaire de départ a été à fixée 10^8 UFC/ mL à l'aide d'un spectrophotomètre à 620 nm.

11.2. Expérience d'adhésion à temps zéro

Dans le test d'adhésion à temps zéro, les puits de la microplaque ont été remplis par 100 μ L des différents extraits à des concentrations sub-inhibitrices (CMI/8) additionnés de 100 μ L d'inoculum bactérien. La microplaque ainsi préparée a été scellée puis incubées à 37°C pendant 3 heures. Par la suite, le contenu a été aspiré et les puits ont été lavés 3 fois avec de l'eau distillée stérile afin d'écarter les cellules non adhérentes.

Les cellules ainsi adhérentes ont été fixées pendant 30 min à 80 °C, puis 200 μ l de cristal violet (0,5%) ont été introduit. Après 1 minute d'incubation à température ambiante, le crystal violet a été éliminé puis 200 μ L d'éthanol / acétone (80: 20%) ont été additionnés (**Agarwal et al., 2011**). Après une incubation de 15 min à une température ambiante, l'absorbance a été ensuite lue à 595 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques.

11.3. Prétraitement du support par les extraits

Dans une microplaque contenant 100 μ L des différents extraits à concentrations sub-inhibitrices (CMI/8) ont été incubés pendant 3 heures à 37°C. Après incubation, le milieu a été aspiré et 100 μ L de la suspension bactérienne contenant 10^8 UFC/mL ont été additionnées. Après incubation pendant 3 heures à 37°C, les mêmes étapes que celles du test d'adhérence à temps zéro ont été effectuées.

12. Angle de contact

Cette approche a été réalisée à l'aide d'un goniomètre (GBX instruments, France) en utilisant la méthode des gouttes sessiles. Trois gouttes de chaque liquide (eau, formamide et diiodométhane) ont été déposées sur un support en polystyrène en présence et en absence des différents extraits et de la gentamicine.

Six mesures d'angle de contact ont été effectuées à la surface du support. Les angles de contact (θ) ont été exprimés comme suit:

$$\text{Cos } \theta = -1 + 2 [(\gamma_s^{\text{LW}} \gamma_L^{\text{LW}})^{1/2} / \gamma_L] + 2 [(\gamma_s^+ \gamma_L^-)^{1/2} / \gamma_L] + 2 [(\gamma_s^- \gamma_L^+)^{1/2} / \gamma_L]$$

Le composant de tension superficielle acide-base de Lewis est défini par la formule suivante :

$$\gamma_s^{AB} = 2 (\gamma_s^+ \gamma_s^-)^{1/2}$$

L'évaluation de l'hydrophobicité de surface a été réalisée par des mesures d'angle de contact et par l'approche de **Van Oss, (1993)**. Le degré a été exprimé par l'énergie libre d'interaction entre deux ce matériau immergé dans l'eau (w): ΔG_{iwi} .

Le matériau est considéré comme hydrophobe si $\Delta G_{iwi} < 0$. Inversement, pour un matériau hydrophile le $\Delta G_{iwi} > 0$.

ΔG_{iwi} a été calculée à travers les composants de tension superficielle des entités en interaction, selon la formule suivante:

$$\Delta G_{iwi} = -2\gamma_{iw}$$

$$\Delta G_{iwi} = -2 [((\gamma_i^{LW})^{1/2} - (\gamma_w^{LW})^{1/2})^2 + 2((\gamma_i^+ \gamma_i^-)^{1/2} + (\gamma_w^- \gamma_w^+)^{1/2} - (\gamma_i^+ \gamma_w^-)^{1/2} - (\gamma_w^+ \gamma_i^-)^{1/2})]$$

Où θ est l'angle de contact mesuré, γ^{LW} est le composant d'énergie libre de van der Waals, γ^+ est le composant accepteur d'électrons, γ^- est le composant donneur d'électrons et les indices (S) et (L) désignent respectivement la surface solide et les phases liquides, γ_s^{AB} est la composante d'énergie libre acide-base de surface, ΔG_{iwi} est l'énergie libre d'interaction entre les molécules de surface (i) immergé dans l'eau (w), avec γ_{iw} étant la tension interfaciale entre la surface (i) et l'eau (w).

13. Détermination de l'activité hémolytique des extraits vis-à-vis des globules rouges

A partir d'un patient sain, un prélèvement du sang sur tube hépariné a été effectué puis centrifugé à 4000 tours/ minutes à 4°C pendant 5 minutes. Le culot a été lavé 2 fois avec une solution de NaCl (150 mM), puis centrifugé à 4000 tours/ minutes à 4°C pendant 5 minutes. Par la suite, le culot a été dilué à 2% dans le tampon phosphate salé (PBS) 10 mM, pH 7,4.

Dans un tube à hémolyse, 2970 μ L de la suspension érythrocytaire à 2% a été mise en contact avec 30 μ L d'extraits à différents concentrations puis incubé dans un incubateur de paillasse (Orbital Shaker Thermo Forma) à 37°C pendant 60 min. Un volume de 500 μ L a été prélevé chaque 15 min pour être resuspendus dans 1500 μ L de PBS.

Les tubes ont été ensuite centrifugés à 4000 tours/ minutes pendant 5 min. La fuite de l'hémoglobine intracellulaire a été mesurée par la lecture de l'absorbance à 548 nm.

L'hémolyse totale a été obtenue par la mise en suspension des globules rouges avec le triton X-100. Le tampon seul a été utilisé comme contrôle négatif.

Le taux d'hémolyse a été déterminé en pourcentage par l'équation suivante (**Lee et al., 2002**):

$$\text{Taux d'hémolyse (\%)} = [(A_{\text{échantillon}} - A_{\text{hémolyse spontanée}}) / (A_{\text{triton X-100}} - A_{\text{hémolyse spontanée}})] \times 100$$

Troisième partie

Résultats et interprétation

1. Rendements des extraits

Les graines vertes de *Coffea canephora* et *Coffea arabica* ont été infusées en présence de méthanol. Par la suite, une extraction liquide/liquide a été effectuée en utilisant l'acétate d'éthyle et le n-Butanol. Après une évaporation à sec à l'aide d'un rotavapor à 55°C, les différents rendements d'extraction ont été calculés à partir de la matière végétale sèche des graines vertes des deux espèces. Les résultats obtenus sont représentés dans la figure 19.

Nous constatons que les extraits méthanoliques renferment des rendements plus élevés par rapport aux autres extraits. En effet le rendement des extraits brut est l'ordre de 10,6% pour *C. canephora* et 11,2% pour *C. arabica*, suivi par l'extrait d'acétate d'éthyle (7% et 8% respectivement), suivi par l'extrait n-butanolique qui est de 6%.

Il est à noter que le plus faible rendement a été obtenu par la phase résiduelle (5% pour *C. canephora* et 2% pour *C. arabica*).

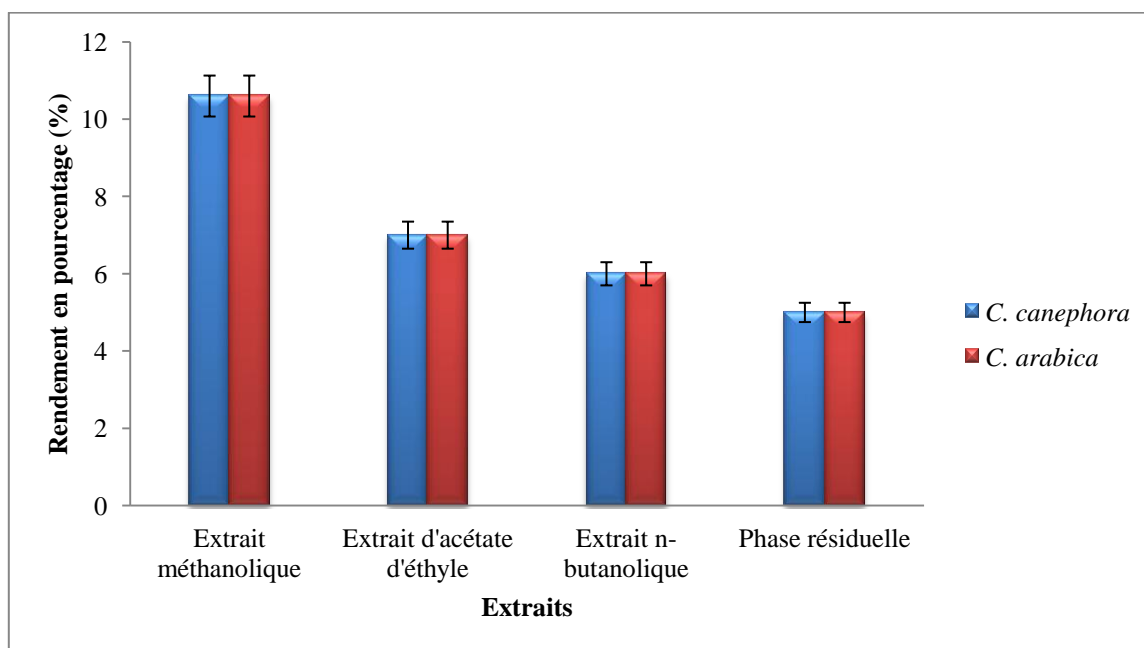


Figure 19 : Rendements des différents extraits des graines vertes de *C. canephora* et *C. arabica*.

2. Dosage des métabolites secondaires

2.1. Dosage des polyphénols totaux

Les teneurs en polyphénols totaux sont obtenues en utilisant l'équation de régression linéaire $y=0,0019x$ (**Figure 20**). Les valeurs obtenues sont exprimées en microgramme équivalent acide gallique par microgramme d'extrait. Les résultats sont regroupés dans le tableau 4.

Nous constatons une légère différence entre les composés phénoliques des extraits de *C. canephora* et *C. arabica*. En effet, les extraits brut méthanolique et n-butanol de

C. canephora ont une teneur totale en polyphénol supérieure à celle de la phase résiduelle et d'acétate d'éthyle ($35,88 \pm 0,72 \mu\text{g GAE} / \text{mg d'extract}$, $21,86 \pm 0,72 \mu\text{g GAE} / \text{mg d'extract}$ et $8,68 \pm 0,49 \mu\text{g GAE} / \text{mg d'extract}$, $7,20 \pm 0,22 \mu\text{g GAE} / \text{mg d'extract}$ respectivement).

Alors que pour *C. arabica*, nous constatons que l'extract brut méthanolique et la phase résiduelle présentent une forte teneur en polyphénols totaux par rapport à celle des extraits n-butanol et acétate d'éthyle ($32,47 \pm 3,28 \mu\text{g GAE} / \text{mg d'extract}$, $20,88 \pm 1,38 \mu\text{g GAE} / \text{mg d'extract}$, $10,08 \pm 2,02 \mu\text{g GAE} / \text{mg d'extract}$, $6,45 \pm 0,4 \mu\text{g GAE} / \text{mg d'extract}$ respectivement).

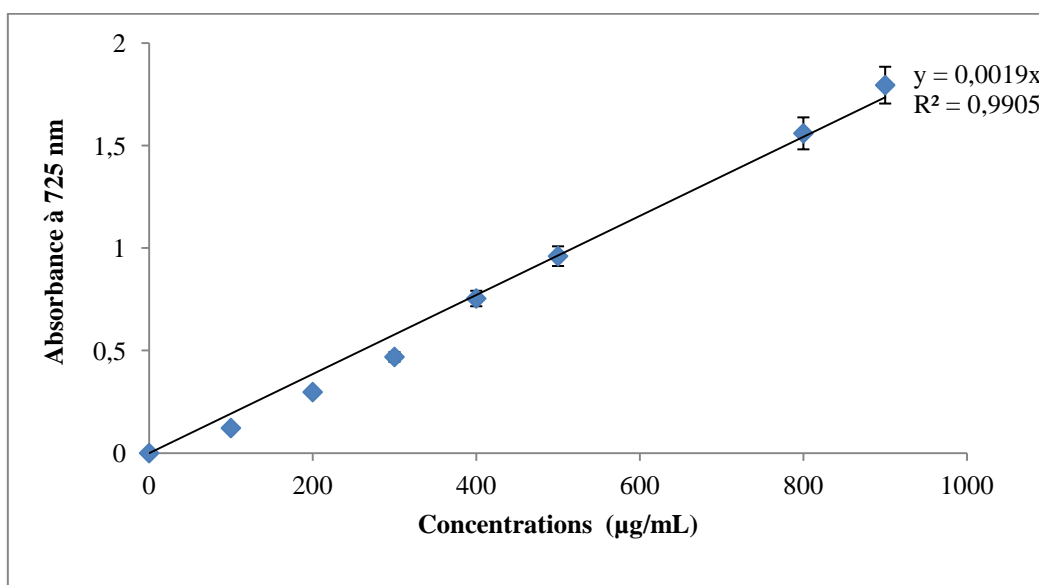


Figure 20: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux.

Tableau 4: Les teneurs en polyphénols totaux en $\mu\text{g GAE} / \text{mg d'extract}$.

Extraits	Extrait méthanolique	Extrait d'acétate d'éthyle	Extrait n-butanol	Phase résiduelle
<i>C. canephora</i>	$35,88 \pm 0,72$	$7,20 \pm 0,22$	$21,86 \pm 0,72$	$8,68 \pm 0,49$
<i>C. arabica</i>	$32,47 \pm 3,28$	$6,45 \pm 0,4$	$10,08 \pm 2,02$	$20,88 \pm 1,38$

2.2. Dosage des flavonoïdes totaux

Les teneurs en flavonoïdes totaux des différents extraits des graines vertes de *C. canephora* et *C. arabica* sont obtenues en utilisant l'équation de régression linéaire $y = 0,002x$ (**Figure 21**). Les valeurs obtenues sont exprimées en microgramme équivalent catéchine par milligramme d'extrait ($\mu\text{g EC/ mg E}$). Les résultats sont regroupés dans le tableau 5.

Nous observons que *C. arabica* présente une forte teneur en flavonoïdes totaux par rapport à *C. canephora*. En effet, l'extrait brut méthanolique renferme le taux le plus élevée ($66,096 \pm 1,70 \mu\text{g EC/ mg E}$ pour *C. canephora* et $57,18 \pm 4,48 \mu\text{g EC/ mg E}$ pour *C. arabica*), suivie par phase résiduelle de *C. arabica* et l'extrait n-butanol de *C. canephora* avec les teneurs de $47,71 \pm 2,09$ et $27,83 \pm 1,30 \mu\text{g EC/ mg E}$ respectivement.

La plus basse teneur en flavonoïdes est obtenue avec l'extrait acétate d'éthyle de *C. canephora* et de *C. arabica* ($10,09 \pm 2,00 \mu\text{g EC/ mg E}$ et $19,69 \pm 2,22 \mu\text{g EC/ mg E}$ respectivement).

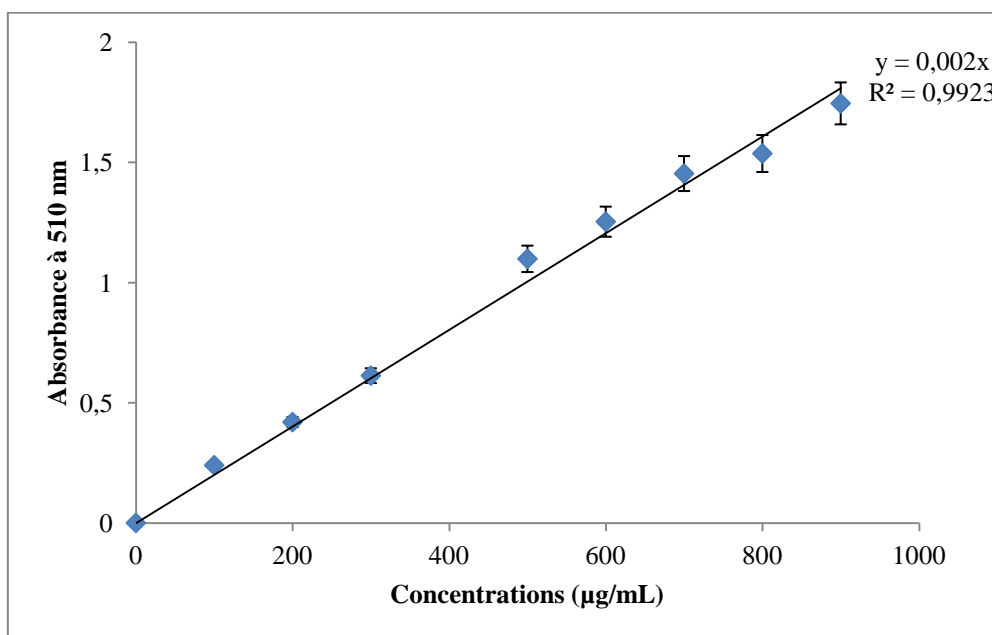


Figure 21 : Courbe d'étalonnage de la catéchine pour le dosage des flavonoïdes totaux.

Tableau 5: Les teneurs en flavonoïdes totaux en $\mu\text{g EC/ mg}$ d'extrait.

Extraits	Extrait méthanolique	Extrait d'acétate d'éthyle	Extrait n- butanol	Phase résiduelle
<i>C. canephora</i>	66,096 \pm 1,70	10,09 \pm 2,00	27,83 \pm 1,30	16,21 \pm 2,00
<i>C. arabica</i>	57,18 \pm 4,48	19,69 \pm 2,22	36,11 \pm 1,12	47,71 \pm 2,09

2.3. Dosage des tanins condensés

Les teneurs des tanins condensés dans les différents extraits des graines vertes de *C. canephora* et *C. arabica* sont également obtenues en utilisant l'équation de régression linéaire $y = 0,002 x$ (**Figure 22**). Les valeurs obtenues sont exprimées en microgramme équivalent de Catéchine par milligramme d'extrait ($\mu\text{g EC/ mg E}$) et sont représentées dans le tableau 6.

A partir des résultats de ce dosage, nous constatons que les teneurs en tanins condensés dans les différents extraits des gaines vertes de *C. arabica* sont légèrement supérieures à celles des extraits de *C. canephora*. De plus les résultats révèlent que les extraits méthanoliques des deux espèces renferment un faible taux en tanins condensés, avec une valeur de $1,17 \pm 0,001 \mu\text{g EC/ mg E}$ pour *C. canephora* et $1,32 \pm 0,08 \mu\text{g EC/ mg E}$ pour *C. arabica*, suivi par les extraits d'acétates d'éthyles et les phases résiduelles qui varient entre $0,40 \pm 0,00 \mu\text{g EC/ mg E}$ et $0,70 \pm 0,02 \mu\text{g EC/ mg E}$, suivi par les extraits n-butanolique avec des valeurs de $0,36 \pm 0,005 \mu\text{g EC/ mg E}$ pour *C. canephora* et $0,44 \pm 0,01 \mu\text{g EC/ mg E}$ pour *C. arabica*.

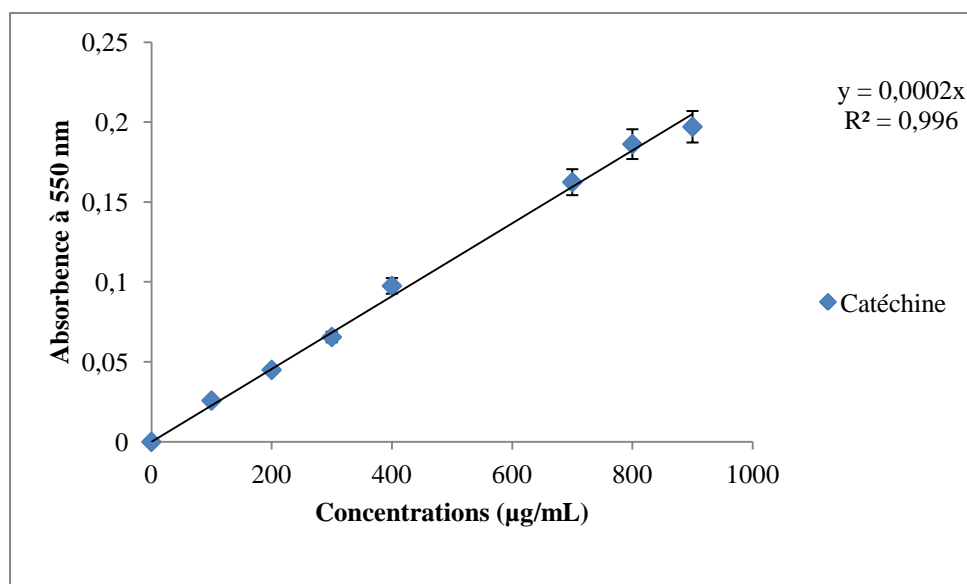


Figure 22 : Courbe d'étalonnage de la catéchine pour le dosage des tanins condensés.

Tableau 6: Les teneurs en tanins condensés en µg EC/ mg d'extrait.

Extraits	Extrait méthanolique	Extrait d'acétate d'éthyle	Extrait n-butanol	Phase résiduelle
<i>C. canephora</i>	1,17 ± 0,001	0,40 ± 0,00	0,36 ± 0,005	0,46 ± 0,01
<i>C. arabica</i>	1,32 ± 0,08	0,70 ± 0,02	0,44 ± 0,01	0,50 ± 0,03

3. Chromatographie Liquide Haute Performance (mode inversé)

Dans cette partie nous avons réalisé l'analyse des composants chimiques des deux plantes par le biais d'une RP-HPLC-PDA enregistrée à 280 nm.

Les chromatogrammes des graines vertes de *Coffea canephora* sont illustrés dans la figure 23. Nous observons la présence de la quercétine dans l'ensemble des extraits, alors que l'acide gallique n'est présent que dans l'extrait acétate d'éthyle et n-butanol. En revanche, l'acide chlorogénique et l'acide P-coumarique sont présents dans la phase résiduelle alors que la vanilline n'est détectée que dans l'extrait n-butanol.

Les chromatogrammes des graines vertes de *Coffea arabica* sont représentés dans la figure 24. Nous remarquons la présence de la quercétine dans tous les extraits. Nous constatons

également la présence de l'acide gallique, catéchine, l'acide P-coumarique, rutine dans l'extrait d'acétate d'éthyle ainsi que dans l'extrait n-butanol.

En revanche, le résorcinol et l'acide ferulique sont présents uniquement dans l'extrait n-butanol, alors que l'acide chlorogénique et l'acide caféique sont détectés dans la phase résiduelle.

Les résultats confirment qu'il y a une différence en composés phénoliques entre les différents extraits des deux espèces.

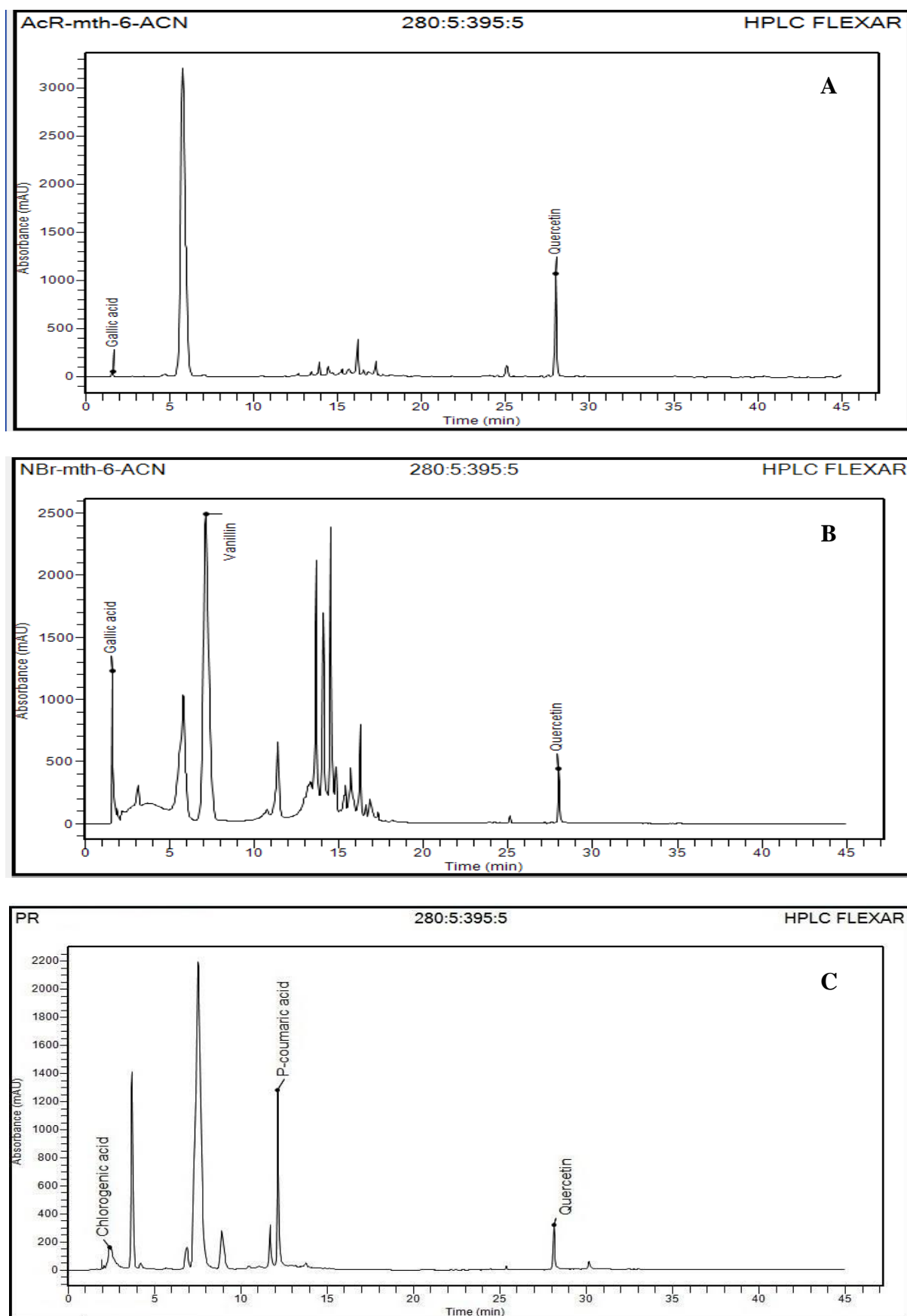


Figure 23: Chromatogramme RP-HPLC-PDA des extraits des graines vertes de *C. canephora* à 280 nm (A : extrait d'acétate d'éthyle, B : extrait n-butanol, C : phase résiduelle).

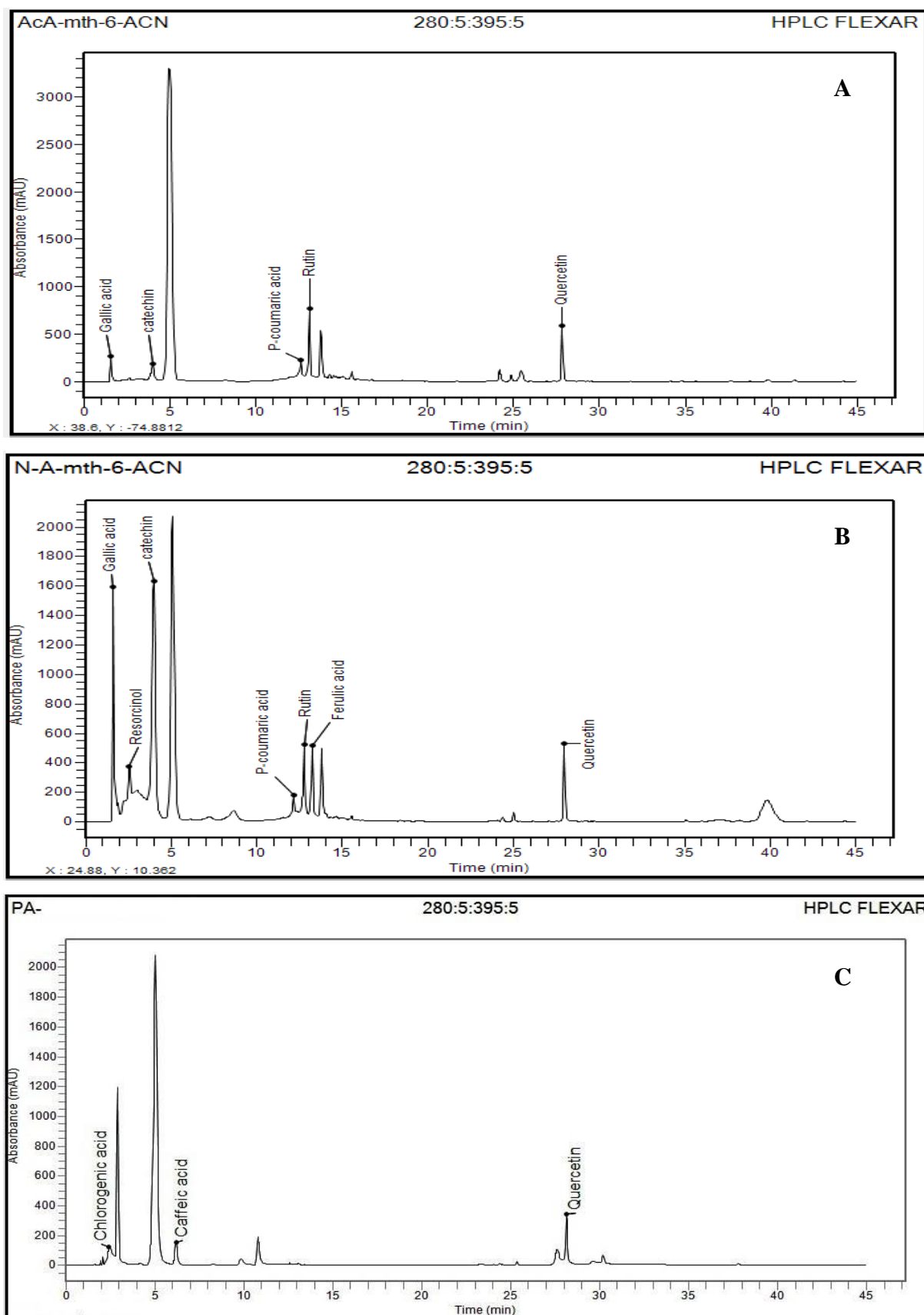


Figure 24: Chromatogramme RP-HPLC-PDA des extraits des graines vertes de *C. arabica* à 280 nm (A : extrait d'acétate d'éthyle, B : extrait n-butanol, C : phase résiduelle).

4. Spectroscopie de Résonance Magnétique Nucléaire

L'analyse du spectre RMN ^1H a été réalisée par spectromètre Brüker AC 400 à 400 MHz. La fraction Fn-Br3 a été analysée dans un solvant DMSO deutéré en utilisant le TMS comme étalon interne. Les déplacements chimiques sont exprimés en unités (ppm) et indiqués par rapport au TMS. Les multiplicités enregistrées sont: s, singulet; d, doublet; t, triplet; q, quadruplet; m, multiplet.

Les signaux protoniques de la fraction Fn-Br3 sont illustrés dans la figure 25. Le résultat montre que cette fraction correspond au Kahweol acétate.

^1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6) : δ (ppm) 8,00 (s, 1H, 7-OH), 7,07-6,86 (m, 1H, H-2), 6,82-6,65 (m, 1H, H-3), 5,34-5,30 (m, 2H, H-11, H-12), 3,88 (s, 3H, 7a- $\text{CH}_3\text{C}=\text{O}$), 3,56 (s, 1H, H-7a), 3,42 (s, 1H, H-8), 3,39 (m, 1H, H-7a'), 3,36 (m, 1H, H-9), 3,31 (m, 1H, H-9'), 3,22 (s, 3H, 10b- CH_3), 2,73 (t, 1H, H-13), 2,30-2,26 (m, 2H, H-4), 2,14-2,07 (m, 2H, H-5), 2,02-1,99 (m, 2H, H-10), 1,51 (m, 1H, H-13), 1,26 (m, 1H, H-3b), 1,22 (m, 1H, H-10a), 0,86-0,84 (m, 2H, H-6).

^{13}C RMN (101 MHz, DMSO- d_6) : δ (ppm) 176,82 (C-3a), 173,18 (C-12a), 155,08 (C-10b), 151,57 (C-5a), 148,64 (C-7), 130,20 (C-12), 128,22 (C-11), 116,35 (C-2) 115,83 (C-3), 107,14 (C=O), 63,57 (C-9), 62,59 (C-7a), 33,59 (C-5), 31,74 (C-4), 31,35 (C-10c), 29,48 (C-8), 29,18 (C-3b), 27,95 (CH_3 10b), 27,07 (C-10), 25,68 (C-13), 22,54 (C-10a), 14,36 (C-6) **(Figure 26)**.

Plusieurs protons ont été détectés par cette technique (6,95-6,73 de H-2 et H-3; 5, 3,56 et 3,39 pour 2H, H-7a; 3,36 et 3,31 pour 2H, H-9). C'est la seule technique qui fait la différence entre des protons similaires (3,88 de CH_3 ester et 3,22 de CH_3 en position 10b ; 1,26 de H-3b et 1,22 de H-10a ; 3,42 de H-8).

En utilisant les connectivités HMBC, tous les atomes de carbone secondaires (C-10a, C-3b, C-8) et tertiaires (C-3a, C-12a, C-5a, C-7) ont été attribués sans équivoque **(Figure 27)**. Les signaux protoniques pourraient également être différenciés de leurs corrélations spatiales HMBC, comme le montre la figure 28.

Le spectre RMN ^1H a été enregistré à 60 MHz. La fraction Fn-BA obtenu a partir de l'extrait n-butanolique de *C. arabica* a été solubilisée dans le chloroforme deutéré. Le résultat montre que cette fraction correspond à la caféine.

^1H NMR (62 MHz, CDCl_3) : δ (ppm) 7,29 (m, 1H, H-6), 3,98 (s, 1H, 7- CH_3), 3,57 (s, 1H, 3- CH_3), 3,39 (s, 1H, 1- CH_3) **(Figure 29)**.

^{13}C NMR (60 MHz, CDCl_3) : δ (ppm) 155,32 (C-9), 151,32 (C-4), 148,67 (C-2), 107,51 (C-8), 141,49 (C-6), 33,66 (CH_3 -7), 30,15 (CH_3 -3), 29,43 (CH_3 -1) (**Figure 30**).

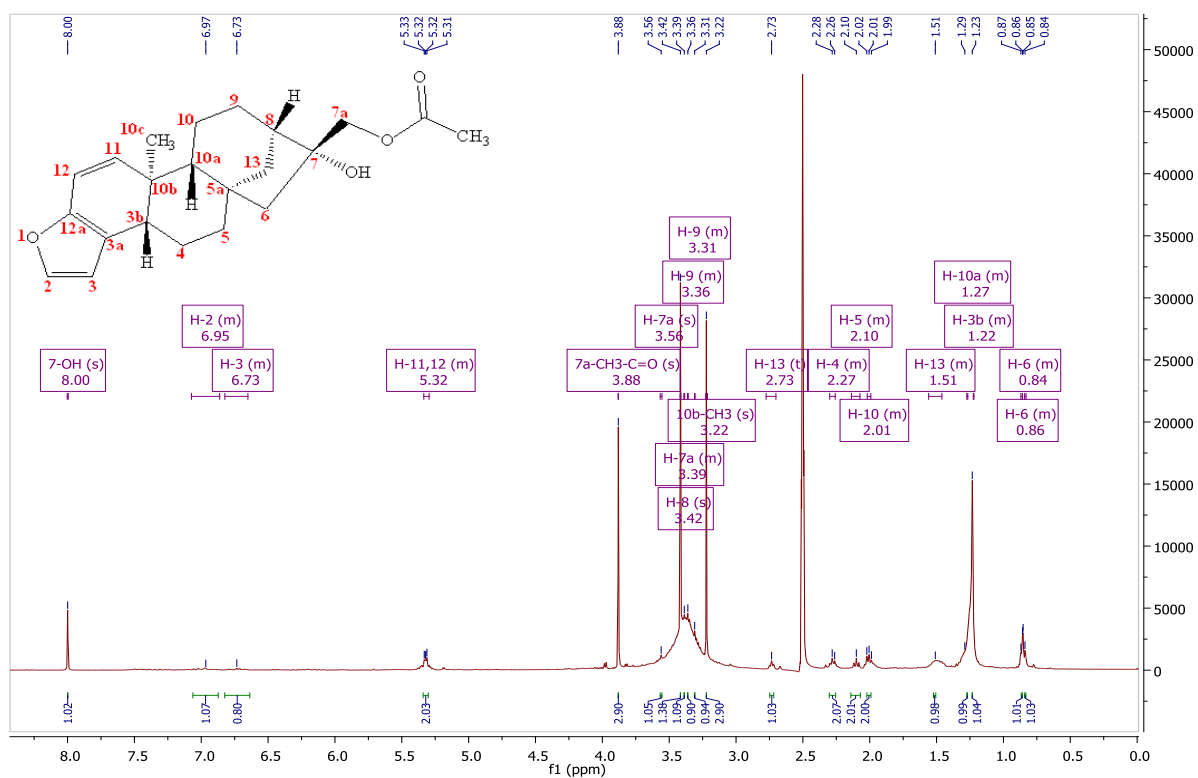


Figure 25: Spectres RMN ^1H de la fraction Fn-Br3 (extrait n-butanolique de *C. canephora*).

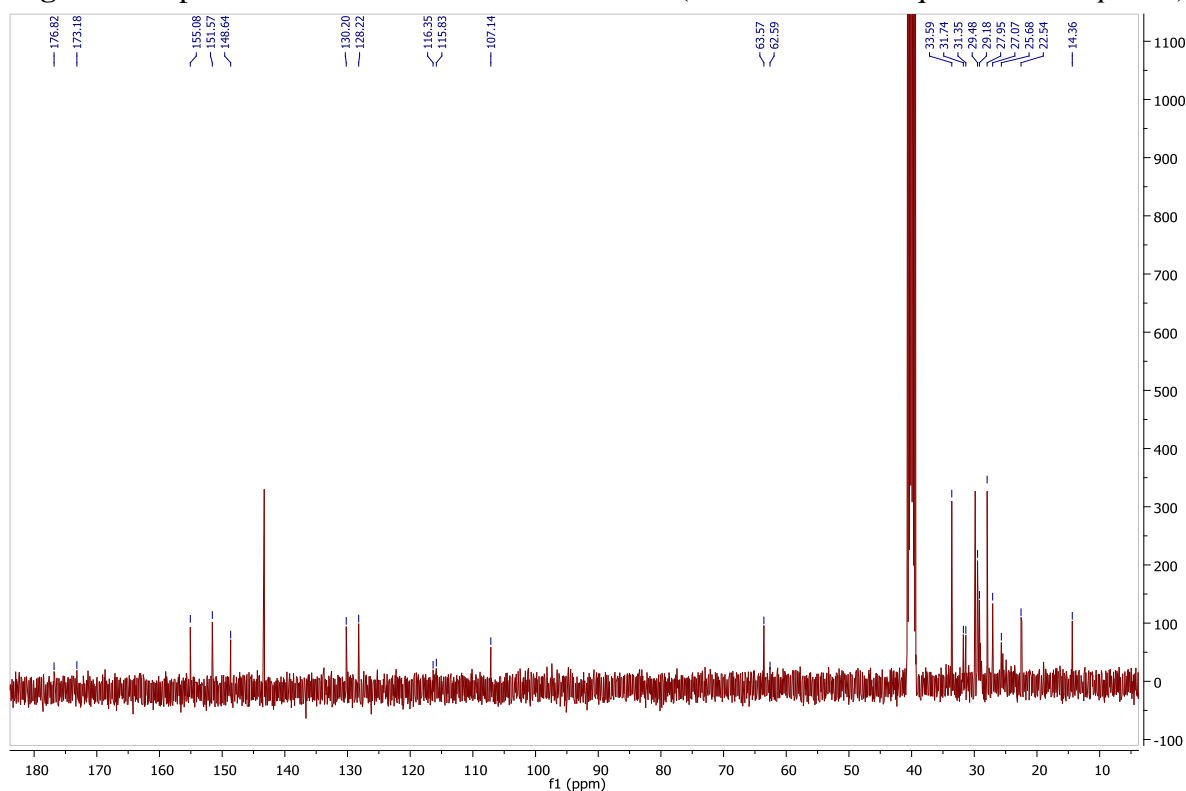


Figure 26: Spectres RMN ^{13}C de la fraction Fn-Br3 (extrait n-butanolique de *C. canephora*).

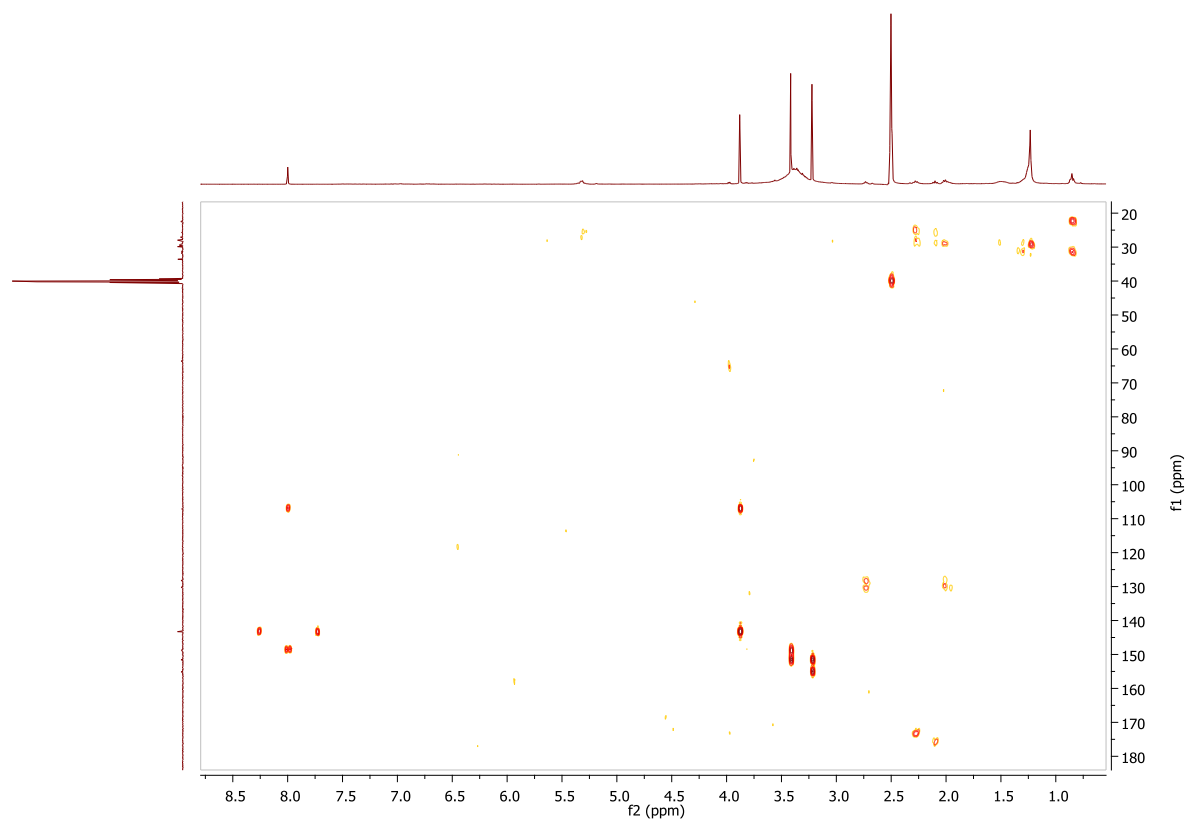


Figure 27: Spectres RMN HMBC 2D de kahweol acétate caractérisés à partir de la fraction Fn-Br3 d'extrait de n-butanol de *C. canephora*.

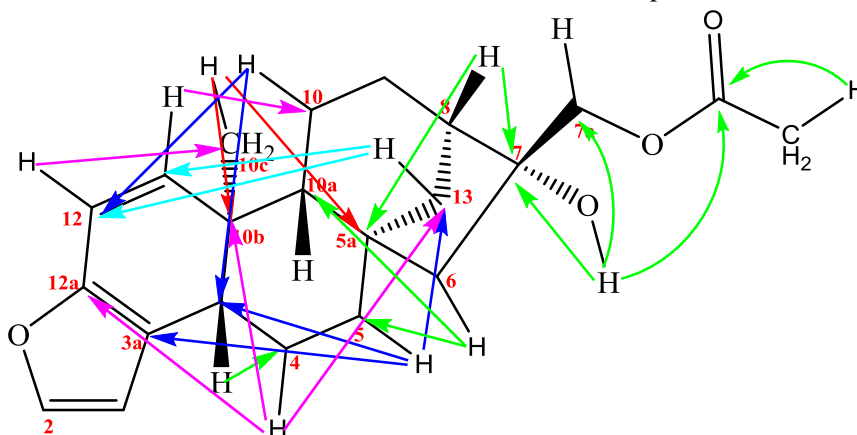


Figure 28: Corrélations HMBC observées dans les spectres de Kahweol acétate.

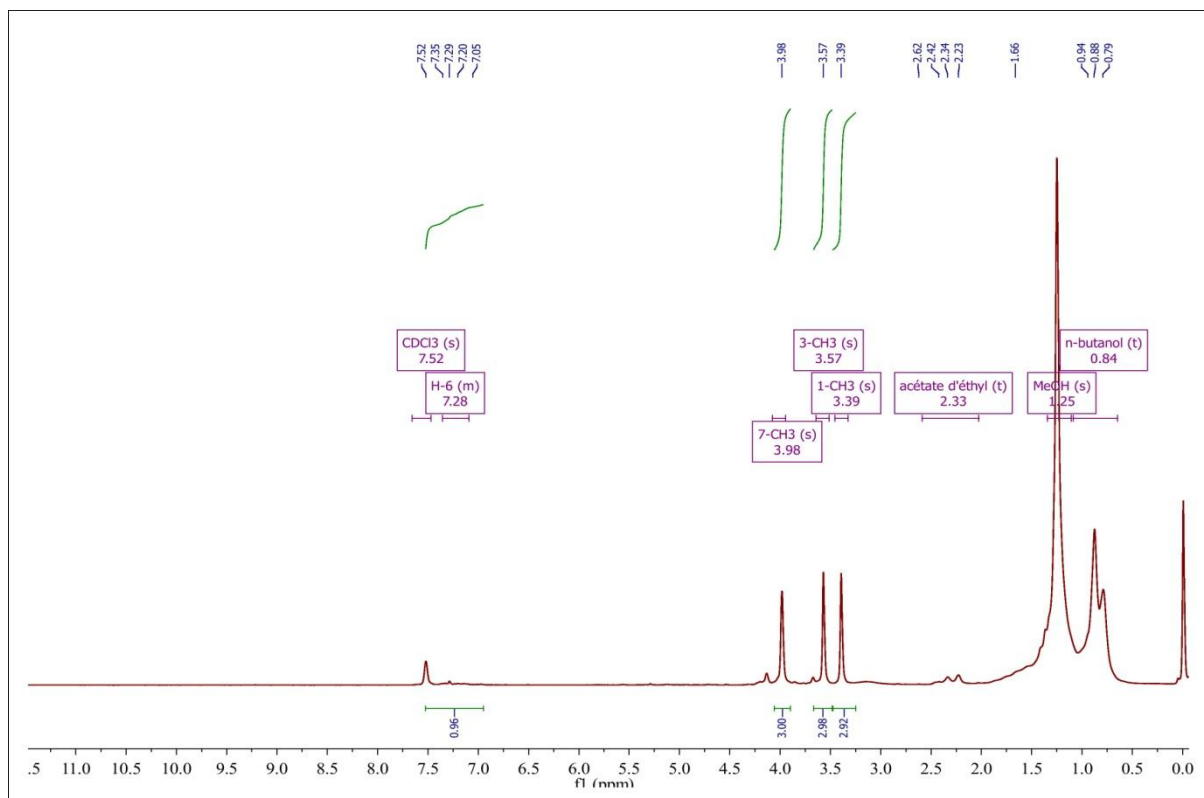


Figure 29: Spectres RMN ^1H de la fraction Fn-BA (extrait n-butanolique de *C. arabica*).

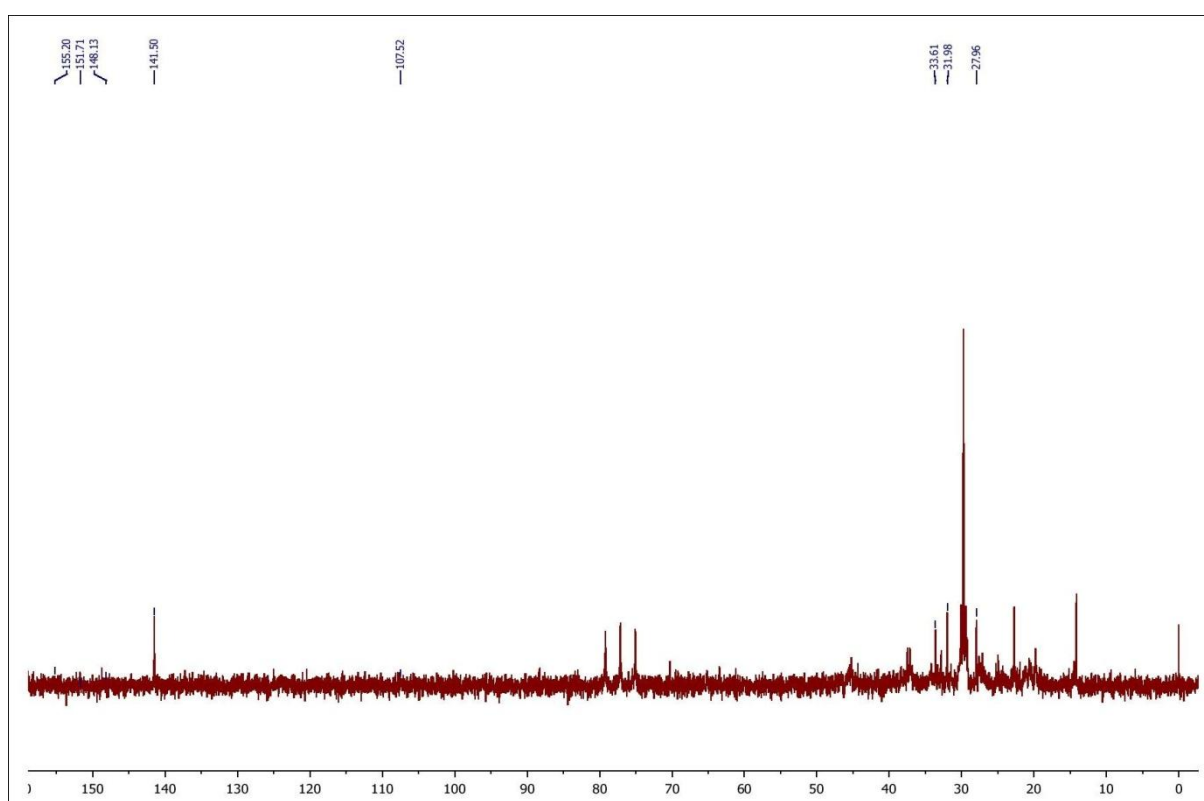


Figure 30: Spectres RMN ^{13}C de la fraction Fn-BA (extrait n-butanolique de *C. arabica*).

5. Analyse par spectroscopie infrarouge

L'analyse du spectre infrarouge a été réalisée par le spectromètre Agilent Technologies Cary 600FTIR. Les fractions Fn-Br3 et Fn-BA sous forme déshydraté obtenue à partir de l'extrait n-butanolique de *Coffea canephora* et *Coffea arabica* ont été déposées et bien étalées sur la surface centrale du diamant à l'aide d'une spatule. Le spectre obtenu de ces fractions est illustré dans les figures 31 et 32. Le résultat montre que la fraction Fn-Br3 correspond au kahweol acétate alors que la fraction Fn-BA correspond à la caféine.

Fn-Br3 FTIR (KBr, ν cm^{-1}): 3365.061 cm^{-1} déformation -OH alcool non lié ; 2917.123 et 2849.516 cm^{-1} vibration d'élongation -CH₃, -CH₂ (liaison -CH alcane) ; 1743.687 cm^{-1} déformation C=O ester ; 1654.026 cm^{-1} élongation des liaisons C=C alcène et aromatique ; 1497.142 et 1466.135 cm^{-1} vibration de déformation -CH₂ alcane (zone d'empreinte) ; 1172.550 et 1114.654 cm^{-1} élongation C-O-C ester.

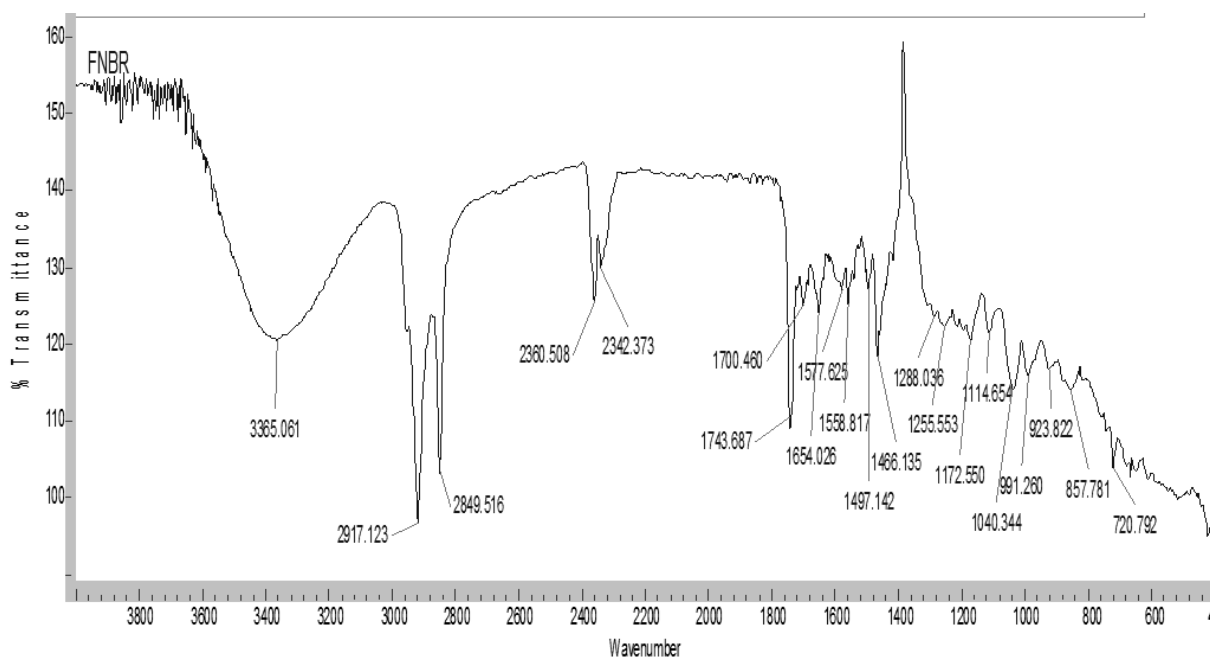


Figure 31 : Spectre infrarouge du kahweol acétate caractérisé à partir de la fraction Fn-Br3 d'extrait n-butanol de *C. canephora*.

Fn-BA FTIR (KBr, ν cm^{-1}): 3450.182 déformation (-OH MeOH solvant) ; 2918.923 et 2853.094 cm^{-1} vibration d'élongation -CH₃ (liaison -CH alcane) ; 1703.220 élongation C=O (carbonyle amide) ; 1665.980 et 1593.315 élongation des doubles liaisons C=C et C=N; 1458.155 déformation -CH₃ (zone d'empreinte) ; 1378.454 élongation C-N (amine aromatique tertiaire).

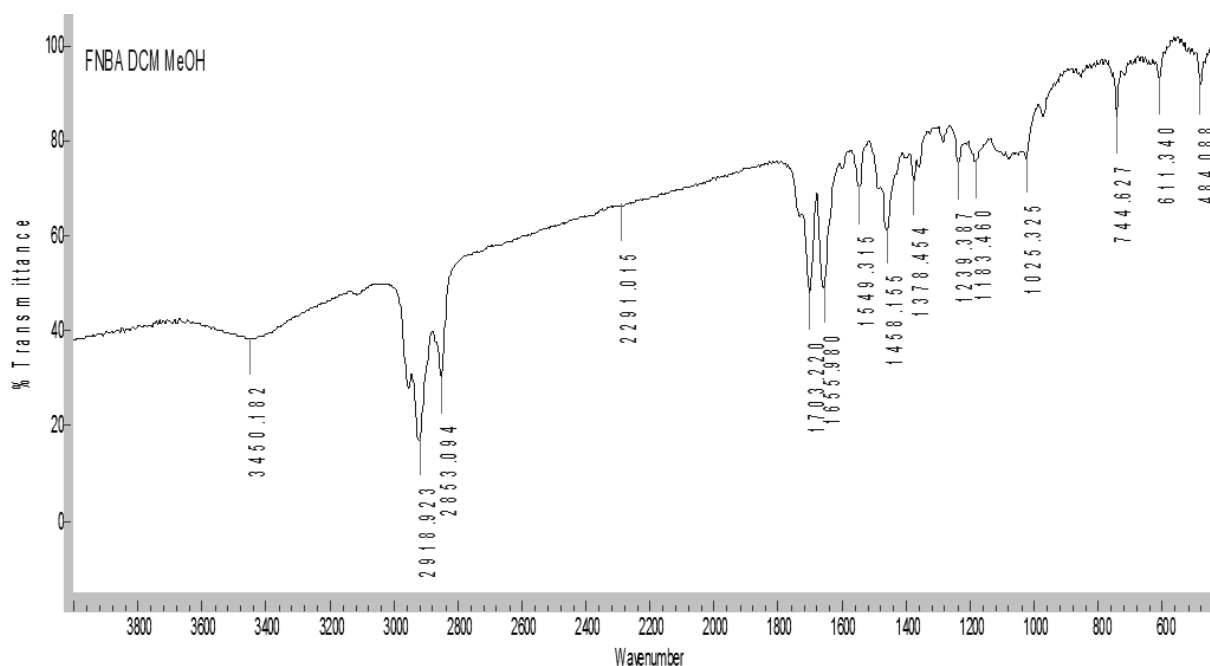


Figure 32 : Spectre infrarouge de la caféine caractérisé à partir de la fraction Fn-BA d'extrait n-butanol de *C. arabica*.

6. Etude de l'activité antioxydante

Les activités antioxydantes des extraits de *C. canephora* et *C. arabica* ont été évaluées par 7 méthodes différentes en l'occurrence le DPPH, ABTS, blanchissement du B-carotène, pouvoir réducteur du fer (FRAP), phénanthroline, capacité antioxydante par réduction du cuivre (CUPRAC) et de la capacité antioxydante totale (CAT).

Les résultats de tous les tests sont exprimés en termes de CI_{50} et $A_{0.5}$. L'efficacité de l'activité antioxydante est inversement proportionnelle aux valeurs de CI_{50} et $A_{0.5}$.

6.1. Piégeage du radical libre DPPH

L'évaluation de l'activité antiradicalaire a été effectuée par l'utilisation de la méthode du piégeage du radical libre DPPH des extraits des plantes, une technique caractérisée par la stabilité de la forme radicalaire et la simplicité d'analyse (**Murugan et Parimelazhagan, 2014**).

A partir des résultats obtenus, nous constatons une augmentation proportionnelle des pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des concentrations des extraits ainsi que des contrôles positifs: BHA et BHT (**Figure 33**). Nous avons obtenu des courbes logarithmiques par lesquelles nous avons calculé les valeurs des concentrations

nécessaires pour réduire 50 du radical libre DPPH (CI_{50}). Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 7.

Nous constatons que l'extrait n-butanol de *C. canephora* présente une capacité à réduire le radical libre la plus importante avec une CI_{50} de $11,32 \pm 0,35 \mu\text{g/ mL}$, suivi de la phase résiduelle avec une $CI_{50} = 17,81 \pm 0,97 \mu\text{g/ mL}$, suivi par l'extrait brut méthanolique ($25,36 \pm 0,36 \mu\text{g/ mL}$).

Pour les extraits de *C. arabica*, nous remarquons que les CI_{50} sont plus élevées par rapport à celle de *C. canephora*. En effet, la meilleure CI_{50} est obtenue par l'extrait n-butanolique avec la valeur $20,09 \pm 0,40 \mu\text{g/ mL}$, suivie par la phase résiduelle ($25,34 \pm 0,31 \mu\text{g/ mL}$), ensuite l'extrait brut méthanolique ($33,71 \pm 1,02 \mu\text{g/ mL}$).

Les CI_{50} de *C. canephora* sont très proches de celles obtenues avec BHA et BHT ($CI_{50} = 6,82 \pm 0,49 \mu\text{g/ mL}$, $12,99 \pm 0,49 \mu\text{g/ mL}$) respectivement, contrairement à *C. arabica* qui présente des valeurs éloignées de celle des standards.

Il est à noter que l'extrait d'acétate d'éthyle des deux espèces a une faible capacité à piéger la DPPH à radicaux libres avec des CI_{50} supérieures à $100 \mu\text{g/ mL}$.

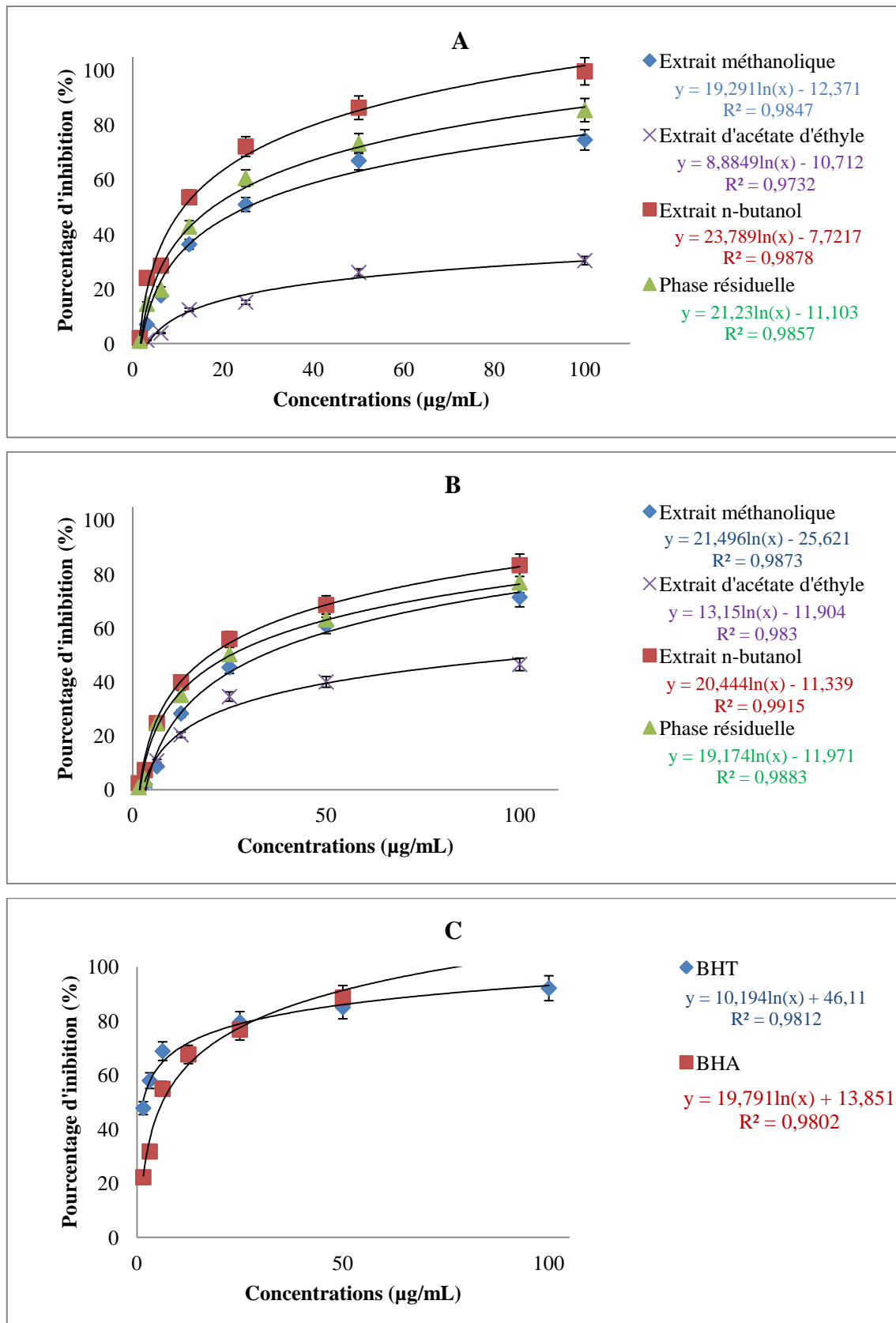


Figure 33 : Evolution des pourcentages d'inhibitions du radical libre DPPH en fonction des concentrations des extraits des graines vertes et standards. A : *C. canephora*, B : *C. arabica*, C : les standards.

Tableau 7: Les CI_{50} ($\mu\text{g}/\text{mL}$) des différents extraits des graines vertes de *C. canephora* et de *C. arabica* par la méthode du Piégeage du radicale libre DPPH.

	<i>Coffea canephora</i>	<i>Coffea arabica</i>
Extrait méthanolique	25,36 \pm 0,36	33,71 \pm 1,02
Extrait d'acétate d'éthyle	>100	>100
Extrait n-Butanol	11,32 \pm 0,35	20,09 \pm 0,40
Phase résiduelle	17,78 \pm 0,97	25,34 \pm 0,31
BHT	12,99 \pm 0,49	12,99 \pm 0,49
BHA	6,82 \pm 0,49	6,82 \pm 0,49

6.2. Piégeage de l'ABTS

L'ABTS est un radical plus réactif que le DPPH qui implique un transfert d'électrons. Il est plus polyvalent que le DPPH en raison de sa solubilité dans l'eau et dans les solvants organiques ce qui permet l'évaluation de l'activité de piégeage pour les extraits hydrophiles et lipophiles.

La figure 34 montre l'évolution des pourcentages d'inhibition du radical ABTS des extraits des graines vertes de *C. canephora*, *C. arabica*, et des standards en fonction des concentrations. Nous remarquons une augmentation proportionnelle des pourcentages d'inhibition du radical ABTS en fonction des concentrations des extraits et des contrôles positifs. A partir de ces résultats, nous avons calculé les valeurs des concentrations nécessaires pour diminuer 50% du taux du radical libre ABTS (CI_{50}). Les résultats de la CI_{50} sont indiqués dans le tableau 8.

Pour *C. canephora*, nous constatons que les CI_{50} sont classés dans l'ordre suivant : extrait de n-butanol < extrait brut méthanolique < phase résiduelle. Les valeurs de CI_{50} étaient respectivement de 3,96 \pm 0,08 ; 4,43 \pm 0,07 ; 6,48 \pm 0,6 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Pour *C. arabica*, nous observons que la concentration en ABTS évolue dans le même ordre avec les CI_{50} : 5,28 \pm 0,19 ; 6,74 \pm 0,05 ; 9,10 \pm 0,09 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Il est à noter que les extraits acétate d'éthyle étaient de loin les moins intéressants (CI_{50} = 55,34 \pm 0,11 $\mu\text{g}/\text{mL}$ pour *C. canephora* et CI_{50} = 26,45 \pm 0,09 $\mu\text{g}/\text{mL}$ pour *C. arabica*).

Nos résultats montrent aussi que les extraits de *C. canephora* présentent des CI_{50} les plus basses par rapport à celles de *C. arabica*.

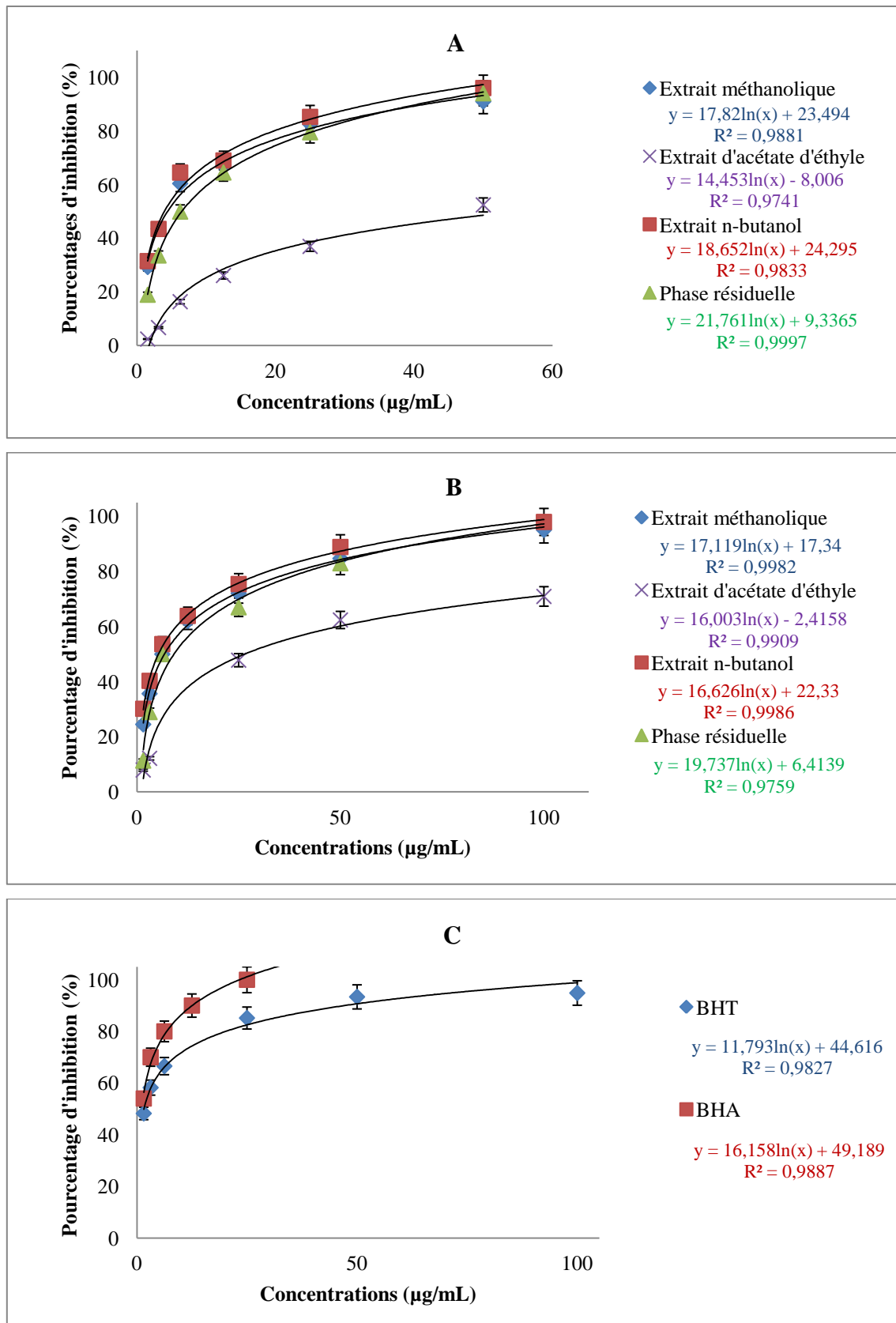


Figure 34: Evolution des pourcentages d'inhibition du radical ABTS en fonction des concentrations des extraits des graines vertes et standards. A: *C. canephora*, B: *C. arabica*, C: les standards.

Tableau 8: Les CI_{50} ($\mu\text{g}/\text{mL}$) des différents extraits des graines vertes de *C. canephora* et de *C. arabica* par la méthode du Piégeage du radical de l'ABTS.

	<i>Coffea canephora</i>	<i>Coffea arabica</i>
Extrait méthanolique	4,43±0,07	6,74±0,05
Extrait d'acétate d'éthyle	55,34± 0,11	26,45 ± 0,01
Extrait n-Butanol	3,96±0,08	5,28±0,19
Phase résiduelle	6,48±0,6	9,10±0,09
BHT	1,57±0,03	1,57±0,03
BHA	1,05±0,00	1,05±0,00

6.3. Blanchissement du β -carotène

Dans ce test, l'oxydation de l'acide linoléique produit des radicaux peroxydes qui vont oxyder le β -carotène ce qui se traduit par la disparition de sa couleur. La présence d'un antioxydant permet la neutralisation de ces radicaux libres empêchant ainsi l'oxydation du β -carotène.

La figure 35 montre l'évolution des pourcentages d'inhibition du β - carotène des extraits et des standards en fonction des concentrations. Les résultats obtenus montrent que les phases résiduelles de *C. canephora* et *C. arabica* présentent les CI_{50} les plus faibles ($18,66 \pm 0,53 \mu\text{g}/\text{mL}$ et $33,05 \pm 2,45 \mu\text{g}/\text{mL}$ respectivement), suivie par l'extrait méthanolique ($28,48 \pm 0,92 \mu\text{g}/\text{mL}$ pour *C. canephora* et $52,94 \pm 1,74 \mu\text{g}/\text{mL}$ pour *C. arabica*). Nous constatons également que les extraits acétate d'éthyle et n-butanol présentent les plus faibles activités antioxydantes (**Tableau 9**).

Nous remarquons aussi que les CI_{50} de *C. arabica* sont nettement supérieures à celle de *C. canephora*.

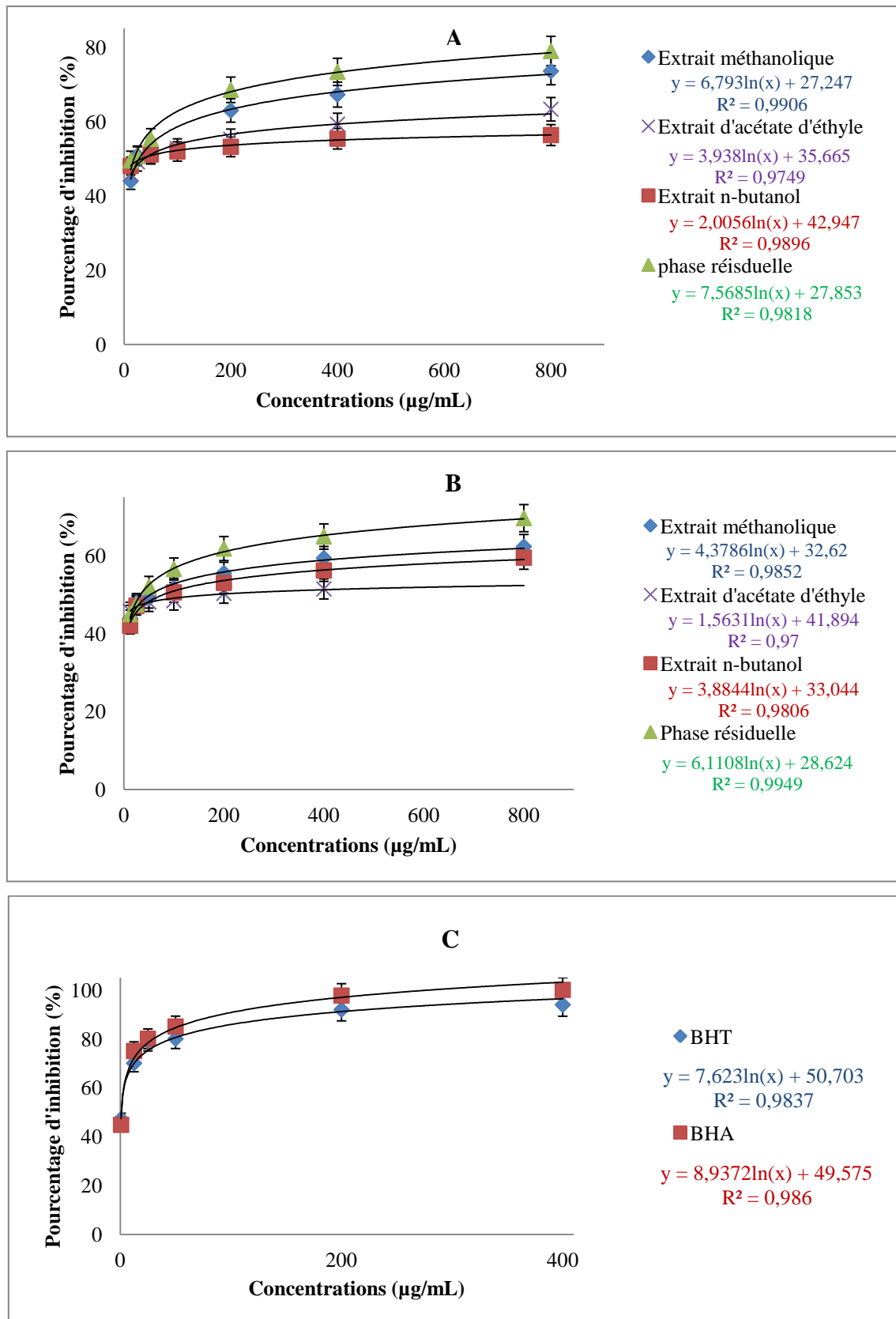


Figure 35: Evolution des pourcentages d'inhibition du β - carotène en fonction des concentrations des extraits des graines vertes et standards A: *C. canephora*, B: *C. arabica*, C: les standards.

Tableau 9: Les CI_{50} ($\mu\text{g}/\text{mL}$) des différents extraits des graines vertes de *C. canephora* et de *C. arabica* par la méthode du blanchissement du β -carotène.

	<i>Coffea canephora</i>	<i>Coffea arabica</i>
Extrait méthanolique	28,48±0,92	52,94±1,74
Extrait d'acétate d'éthyle	38,09 ±2,41	178,73±2,09
Extrait n-Butanol	33,70±0,53	78,7±3,79
Phase résiduelle	18,66±0,53	33,05±2,45
BHT	0,91±0,01	0,91±0,01
BHA	1,05±0,03	1,05±0,03

6.4. Pouvoir réducteur du fer

L'évaluation de l'activité réductrice du fer est basée sur le pouvoir des extraits à réduire le fer ferrique Fe^{3+} en fer ferreux Fe^{2+} . Par conséquent, cette réduction est proportionnelle à l'augmentation de la concentration de nos extraits et elle est mesurable à 700 nm (**Oyaizu, 1986**). Les valeurs obtenues nous ont permis de tracer des courbes linéaires (**Figure 36**).

Selon les valeurs de l' $A_{0,5}$ (**Tableau 10**), nous remarquons que l'extrait n-butanol et méthanolique de *C. canephora* présentent les plus faibles $A_{0,5}$ ($5,67 \pm 0,10 \mu\text{g}/\text{mL}$, $8,36 \pm 0,02 \mu\text{g}/\text{mL}$ respectivement). Ces valeurs sont inférieures à celles de l'acide ascorbique et à l'acide tannique. Nous observons également que les $A_{0,5}$ de la phase résiduelle de *C. canephora* est proche à celle des standards.

Pour *C. arabica*, nous constatons que l'extrait méthanolique présente une $A_{0,5}$ plus proche de celle des standards ($8,17 \pm 0,63 \mu\text{g}/\text{mL}$), alors que les $A_{0,5}$ de l'extrait n-butanol ainsi que la phase résiduelle de *C. arabica* sont largement supérieures par aux autres extraits ainsi qu'aux standards ($16,33 \pm 1,61 \mu\text{g}/\text{mL}$ et $14,94 \pm 0,08 \mu\text{g}/\text{mL}$ respectivement).

Il est à noter que les extraits acétate d'éthyle des deux plantes ont montré les $A_{0,5}$ les plus élevées et mes meilleurs $A_{0,5}$ sont obtenus par l'espèce *C. canephora*.

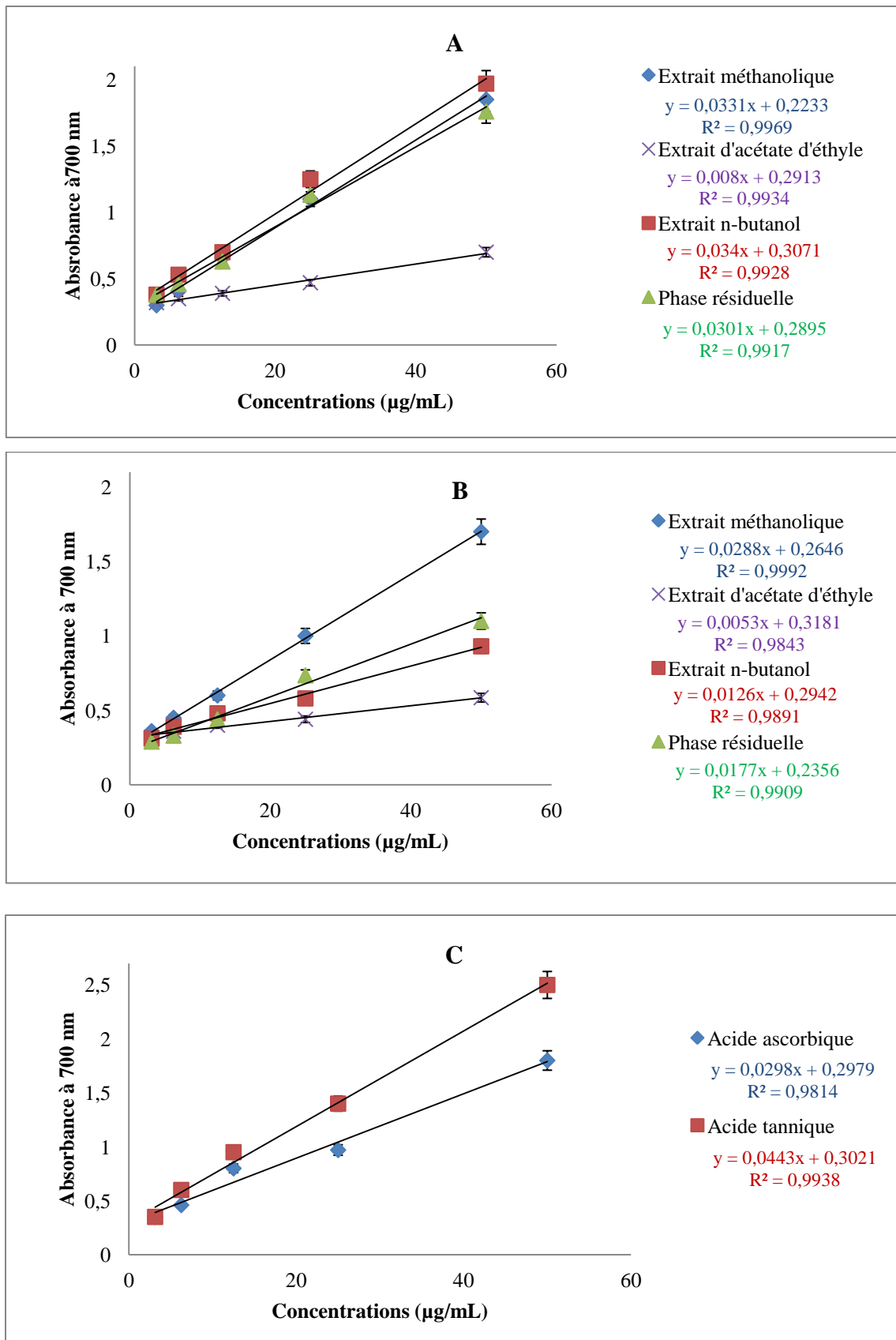


Figure 36: Evolution des absorbances du milieu réactionnel en fonction des concentrations des extraits des graines vertes et standards. A: *C. canephora*, B: *C. arabica*, C: les standards.

Tableau 10: Les $A_{0,5}$ ($\mu\text{g}/\text{mL}$) des différents extraits des graines vertes de *C. canephora* et de *C. arabica* par la méthode de FRAP.

	<i>Coffea canephora</i>	<i>Coffea arabica</i>
Extrait méthanolique	8,36±0,02	8,17±0,63
Extrait d'acétate d'éthyle	26,087 ± 5,37	34,32±0,09
Extrait n-Butanol	5,67±0,10	16,33±1,61
Phase résiduelle	6,99±1,00	14,94±0,08
Acide ascorbique	6,78±1,15	6,78±1,15
Acide tannique	4,47±0,91	4,47±0,91

6.5. Phénanthroline

L'évaluation de l'activité de la phénanthroline est basée sur la capacité d'un antioxydant à réduire le fer ferrique en fer ferreux qui forme par la suite un complexe de couleur rouge-orangé avec la 1,10-phénanthroline. Cette intensité a été mesurée à l'aide d'un lecteur de microplaque à 510 nm. Les valeurs obtenues nous ont permis de tracer des courbes linéaires (**Figure 37**). Les $A_{0,5}$ sont représentées dans le tableau 11.

Nous constatons que l'extrait n-butanol de *C. canephora* et l'extrait méthanolique de *C. arabica* présentent une meilleure $A_{0,5}$ par rapport aux autres extraits. Ces valeurs sont très proches de celles du BHA et BHT.

La comparaison entre les deux espèces montre que les $A_{0,5}$ sont très rapprochés mis à part l'extrait l'acétate d'éthyle.

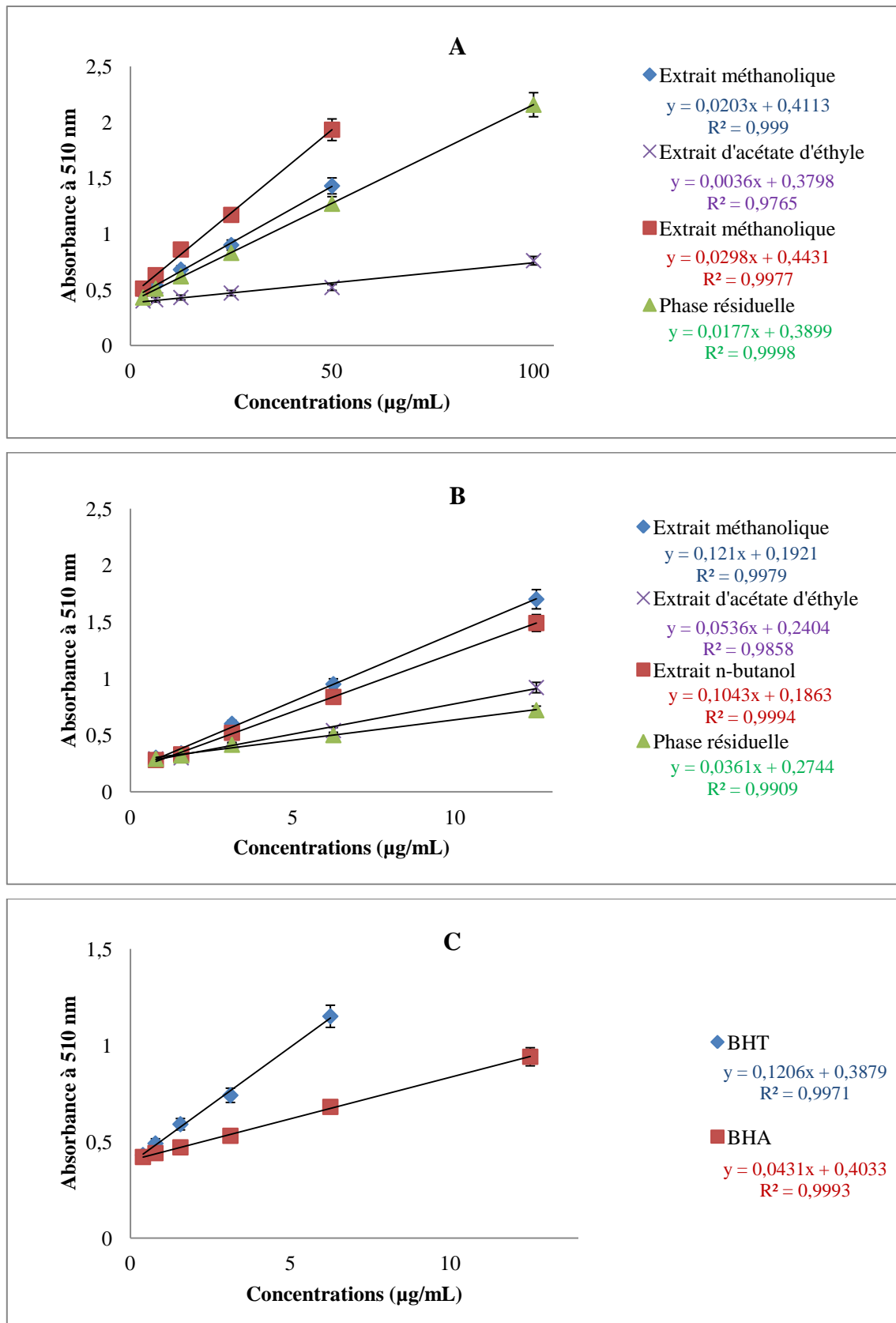


Figure 37: Evolution des absorbances du milieu réactionnel en fonction des concentrations des extraits des graines vertes et standards. A: *C. canephora*, B: *C. arabica*, C: les standards.

Tableau 11: Les $A_{0,5}$ ($\mu\text{g}/\text{mL}$) des différents extraits des graines vertes de *C. canephora* et de *C. arabica* par la méthode de phénanthroline.

	<i>Coffea canephora</i>	<i>Coffea arabica</i>
Extrait méthanolique	4,36±0,15	2,54±0,06
Extrait d'acétate d'éthyle	33,39 ± 2,00	4,85±0,23
Extrait n-Butanol	1,90±0,05	3,00±0,05
Phase résiduelle	6,22±0,18	6,25±0,01
BHT	0,93±0,07	0,93±0,07
BHA	2,24±0,17	2,24±0,17

6.6. Test de la capacité antioxydante par réduction du cuivre (CUPRAC)

L'évaluation de cette activité est basée sur le suivie de la diminution de l'absorbance du complexe Néocuproéne-cuivre. En effet, un agent antioxydant réduit le complexe cuivre-neocuproéne en produisant ainsi un complexe chromogène de Cu^{+2} -Nc de couleur jaune-orangé mesurable a 450 nm. Les valeurs obtenues ont permis de tracer des courbes linéaires. La figure 38 montre l'évolution des absorbances du milieu réactionnel en fonction des concentrations des extraits des graines vertes de café. D'après les résultats, nous observons que les extraits de *C. canephora* (l'extrait méthanolique, l'extrait n-butanolique et la phase résiduelle) présentent des $A_{0,5}$ très proches ($4,24 \pm 0,13 \mu\text{g}/\text{mL}$; $4,09 \pm 0,36 \mu\text{g}/\text{mL}$; $5,34 \pm 0,78 \mu\text{g}/\text{mL}$ respectivement). Ces valeurs sont inférieures à celle du BHT mais sont proches de BHA (**Tableau 12**).

Pour *C. arabica*, nous remarquons que l'extrait méthanolique, l'extrait n-butanolique ainsi que la phase résiduelle présentent des $A_{0,5}$ aussi très proches ($0,82 \pm 0,42 \mu\text{g}/\text{mL}$; $1,17 \pm 0,49 \mu\text{g}/\text{mL}$ et $1,39 \pm 0,23 \mu\text{g}/\text{mL}$ respectivement). Ces valeurs sont nettement inférieures à celles de BHT ($9,62 \pm 0,87 \mu\text{g}/\text{mL}$) et BHA ($3,64 \pm 0,19 \mu\text{g}/\text{mL}$).

Il est à noter que les extraits d'acétate d'éthyle des deux espèces présentent des $A_{0,5}$ les plus élevées par rapport aux autres extraits ($7,07 \pm 0,59 \mu\text{g}/\text{mL}$ pour *C. canephora* et $3,32 \pm 0,5 \mu\text{g}/\text{mL}$ pour *C. arabica*).

Nous constatons que les extraits de *C. arabica* ont une bonne capacité à réduire le complexe cuivre-neocuproéne par rapport aux extraits de *C. canephora*.

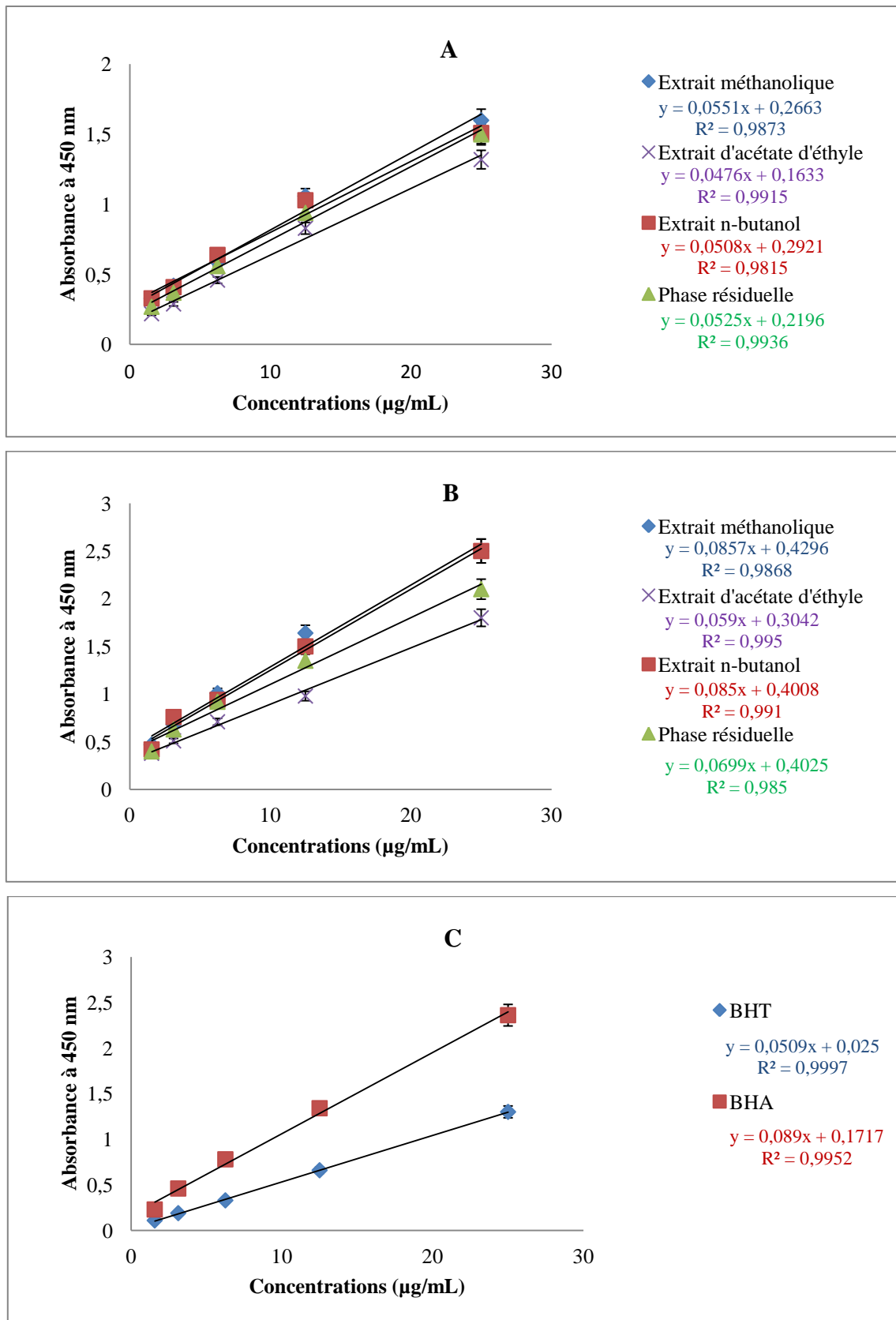


Figure 38: Evolution des absorbances du milieu réactionnel en fonction des concentrations des extraits des graines vertes et standards. A: *C. canephora*, B: *C. arabica*, C: les standards.

Tableau 12: Les $A_{0,5}$ ($\mu\text{g}/\text{mL}$) des différents extraits des graines vertes de *C. canephora* et de *C. arabica* par la méthode de CUPRAC.

	<i>Coffea canephora</i>	<i>Coffea arabica</i>
Extrait méthanolique	4,24±0,13	0,82±0,42
Extrait d'acétate d'éthyle	7,07±0,59	3,32±0,5
Extrait n-Butanol	4,09±0,36	1,17±0,49
Phase résiduelle	5,34±0,78	1,39±0,23
BHT	9,33±0,87	9,33±0,87
BHA	3,69±0,19	3,69±0,19

6.7. Capacité antioxydante totale

La capacité antioxydante totale de nos extraits est exprimée en μg équivalent acide ascorbique par mg d'extrait. Cette méthode est basée sur la réduction du (Mo^{6+}) au (Mo^{5+}) par les composés antioxydants et la formation d'un complexe vert phosphate/ (Mo^{5+}) à pH acide. Les résultats de la capacité antioxydante totale des l'ensemble des extraits sont représentés dans le tableau 13.

Pour l'espèce *C. canephora* nous constatons que l'extrait méthanolique présente la capacité la plus élevée à réduire le molybdène suivie par l'extrait n-Butanol et la phase résiduelle ($29,46 \pm 0,05 \mu\text{g EAA}/\text{mg}$ d'extrait, $27,18 \pm 0,02 \mu\text{g EAA}/\text{mg}$ d'extrait, $26,23 \pm 0,05 \mu\text{g EAA}/\text{mg}$ d'extrait respectivement).

Concernant l'espèce *C. arabica*, l'extrait méthanolique exerce la capacité antioxydante totale la plus élevée ($27,43 \pm 0,03 \mu\text{g EAA}/\text{mg}$ d'extrait), suivie par la phase résiduelle ($25,78 \pm 0,02 \mu\text{g EAA}/\text{mg}$ d'extrait), ensuite l'extrait n-butanol ($24,66 \pm 0,07 \mu\text{g EAA}/\text{mg}$ d'extrait).

Il est à noter que les extraits acétate d'éthyle des deux espèces présentent les plus faibles capacités antioxydante totale.

D'après les résultats obtenus, nous remarquons que les extraits de *C. canephora* montrent une meilleure capacité antioxydante totale par rapport *C. arabica*.

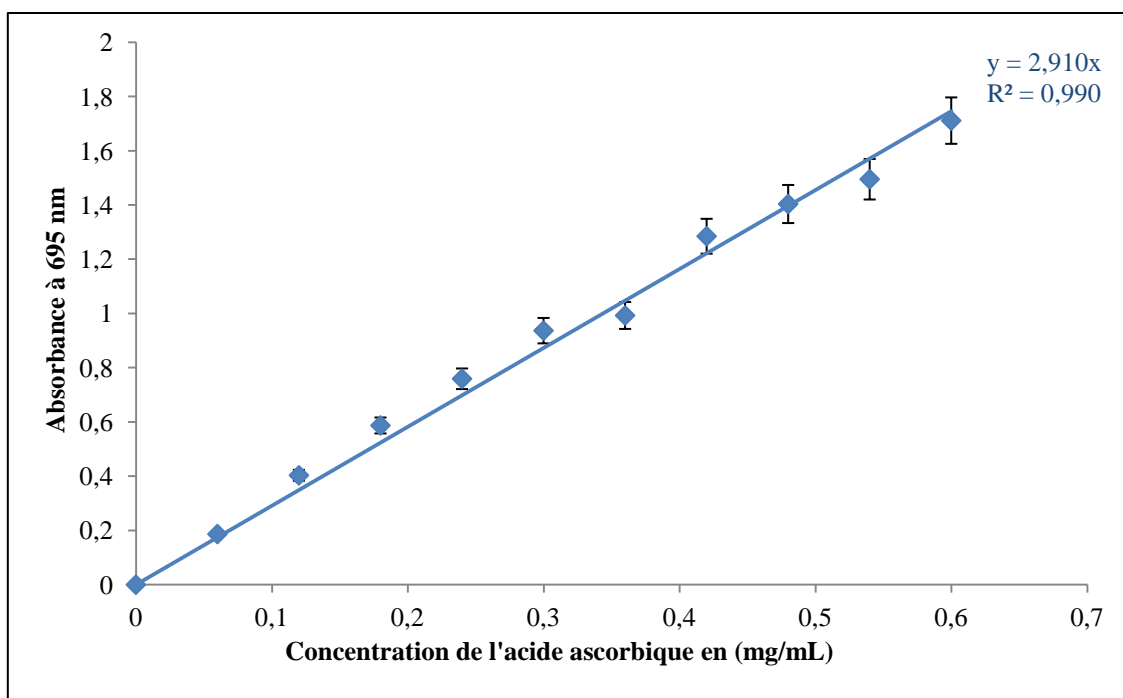


Figure 39: Capacité antioxydante totale de l'acide ascorbique.

Tableau 13: La capacité antioxydante totale (μg EAA/mg d'extrait) des différents extraits des graines vertes de *C. canephora* et de *C. arabica*.

Extraits	Extrait méthanolique	Extrait d'acétate d'éthyle	Extrait n-butanol	Phase résiduelle
<i>C. canephora</i>	29,46 \pm 0,05	24,21 \pm 0,05	27,18 \pm 0,02	26,23 \pm 0,05
<i>C. arabica</i>	27,43 \pm 0,03	24,25 \pm 0,26	24,66 \pm 0,07	25,78 \pm 0,02

7. Etude de l'activité Cholinesterase

Les résultats des activités inhibitrices de l'acétylcholinestérase (AChE) et de la butyrylcholinestérase (BChE) des différents extraits des graines vertes de *C. canephora* et *C. arabica* sont représentés dans les graphes 40 et 41.

Nous constatons que tous les extraits de *C. arabica* et *C. canephora* présentent un effet inhibiteur vis-à-vis de la BChE qui peut atteindre 40% et 13% respectivement. En revanche seul l'extrait d'acétate d'éthyle de *C. arabica* présente un effet inhibiteur de l'AChE (35% environ). La CI_{50} de ces extraits est supérieure à 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ vis-à-vis des deux enzymes.

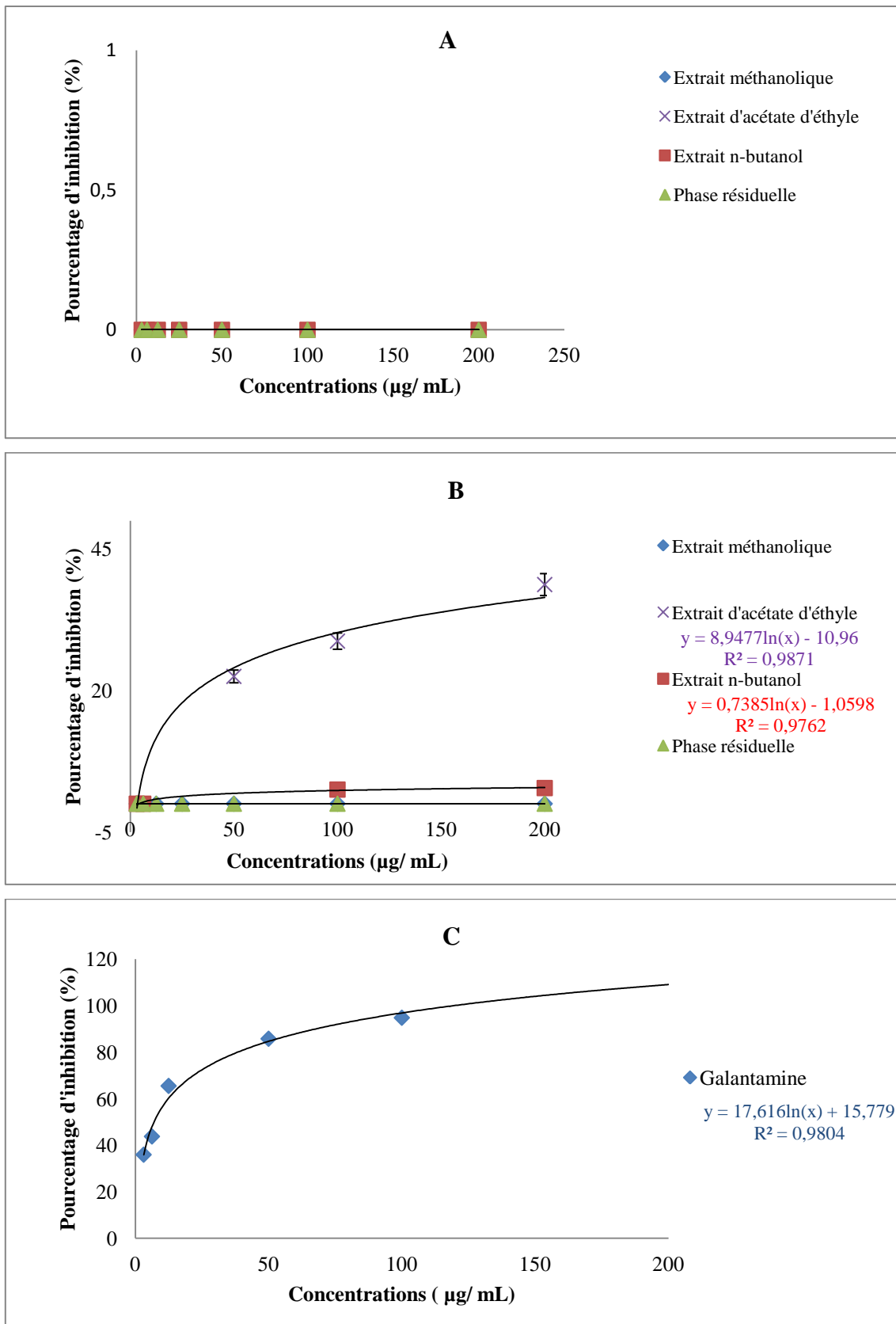


Figure 40: Pourcentage d'inhibition de l'acétylcholinesterase en fonction des concentrations des extraits des graines vertes et du standard. A: *C. canephora*, B: *C. arabica*, C: Galantamine.

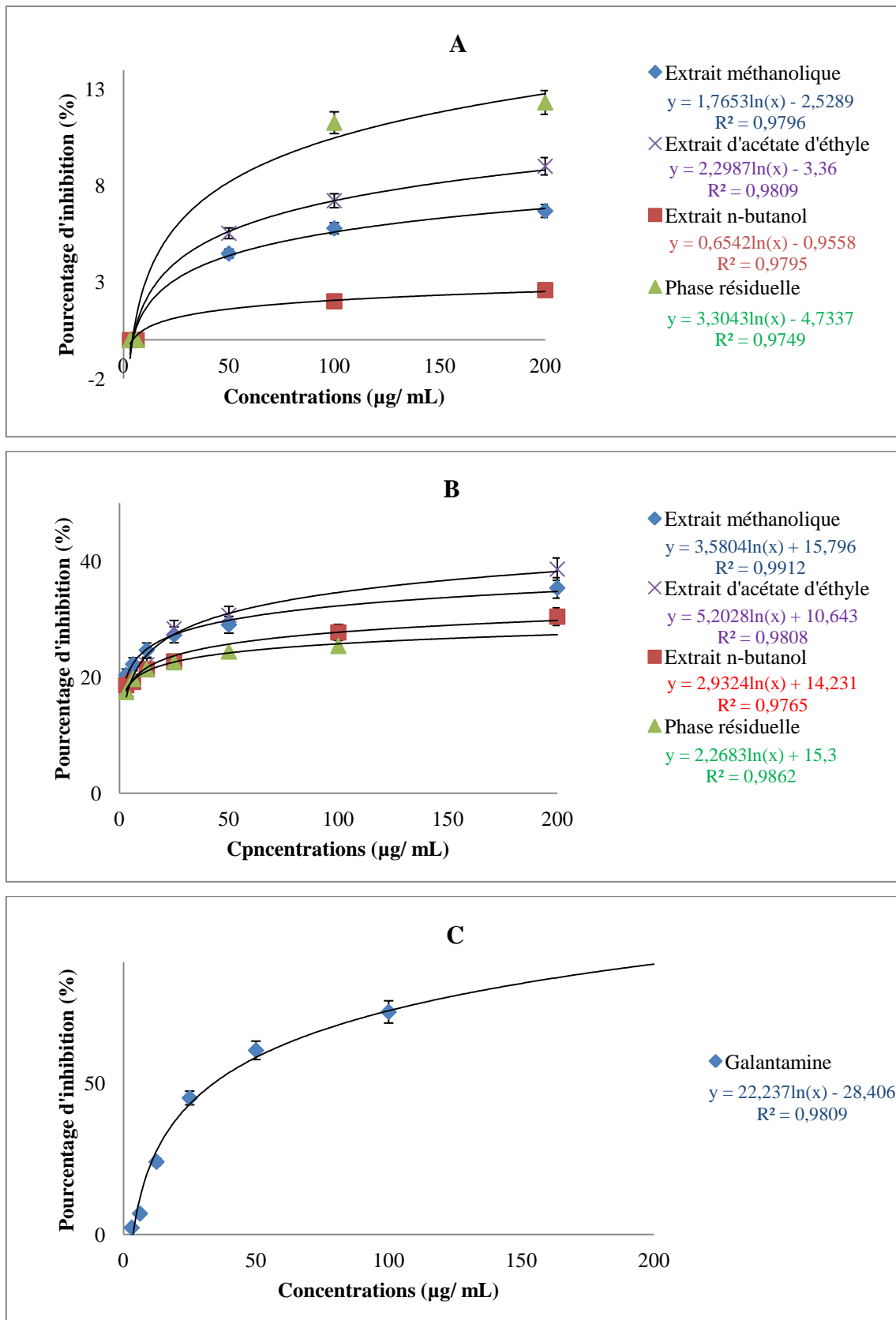


Figure 41: Pourcentage d'inhibition de la butyrylcholinesterase en fonction des concentrations des extraits des graines vertes et du standard. A: *C. canephora*, B: *C. arabica*, C: Galantamine.

8. Evaluation de l'activité antibactérienne

L'activité antibactérienne des différents extraits des graines vertes de *C. canephora* et *C. arabica* a été évaluée dans un premier temps par la technique de diffusion sur milieu gélosé (méthode des disques). Les diamètres des zones d'inhibition sont représentés dans les tableaux 14 et 15.

Nous remarquons que l'extrait méthanolique, acétate d'éthyle et n-butanol de *C. canephora*, exercent une activité antibactérienne vis-à-vis des souches *Escherichia coli* ATCC 8739, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606, *Enterobacter cloacae* ATCC 13047, *Bacillus cereus* ATCC 10876, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et *Micrococcus luteus* ATCC 9341 avec des zones d'inhibition comprises entre 7 et 12 mm. Nous remarquons également que *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Citrobacter freundii* ATCC 8090 et *Proteus mirabilis* ATCC 35659 ne sont sensibles que vis-à-vis de les extraits méthanolique et acétate d'éthyle, alors que *Enterococcus faecalis* ATCC 49452 et *Bacillus subtilis* ATCC 6633 sont sensibles aux extraits acétate d'éthyle et n-butanolique. En revanche, la phase résiduelle n'exerce qu'une faible activité antibactérienne vis-à-vis d'*Enterobacter cloacae* ATCC 13047, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922 et *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Il est à noter que la zone d'inhibition la plus élevée a été obtenue par l'extrait n-butanolique et l'extrait méthanolique vis-à-vis de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (12,5 mm) et *Micrococcus luteus* ATCC 9341 (12 mm) respectivement.

Concernant *C. arabica*, nous constatons qu'*Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Citrobacter freundii* ATCC 8090, *Enterobacter cloacae* ATCC 13047, *Proteus mirabilis* ATCC 35659 et *Micrococcus luteus* ATCC 9341 sont sensibles vis-à-vis de tous les extraits avec des zones d'inhibition allant de 7 à 13 mm. La souche *Salmonella typhimurium* ATCC 13311 est sensible aux extraits méthanolique, acétate d'éthyle et la phase résiduelle. Par contre *Enterococcus faecalis* ATCC 49452 est sensible à l'extrait n-butanol et la phase résiduelle.

De plus, nous observons que seul l'extrait d'acétate d'éthyle et la phase résiduelle exercent une activité antibactérienne vis-à-vis d'*Acinetobacter baumannii* ATCC 19606 et *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 avec une zone d'inhibition qui peut atteindre 9,5 mm. Alors qu'*Escherichia coli* ATCC 8739 est sensible seulement à l'extrait méthanolique.

Tableau 14: Diamètres des zones d'inhibition (mm) des différents extraits des graines vertes de *C. canephora* et *C. arabica* vis-à-vis des bactéries à Gram positif.

Bactéries	Extraits	<i>Coffea canephora</i>				<i>Coffea arabica</i>				Gent
		MET	AC	n-B	PR	MET	AC	n-B	PR	
	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876	7 ± 0	8 ± 0	9 ± 0	6 ± 0	6 ± 0	6 ± 0	6 ± 0	6 ± 0	20
	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	6 ± 0	9 ± 1,4	10 ± 1,4	6 ± 0	6 ± 0	6 ± 0	6 ± 0	6 ± 0	22
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	8 ± 0	9 ± 0	9 ± 1,4	7 ± 0	7 ± 0	8 ± 0	8 ± 1,4	10 ± 1,4	32
	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 49452	6 ± 0	7 ± 1,4	7 ± 0	6 ± 0	6 ± 0	6 ± 0	8 ± 0	8 ± 0	21
	<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341	12 ± 1,4	9 ± 0	9 ± 1,4	6 ± 0	9,5 ± 0,7	12,5 ± 0,7	9 ± 0	13 ± 1,4	22
	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 15313	6 ± 0	6 ± 0	6 ± 0	6 ± 0	6 ± 0	6 ± 0	6 ± 0	6 ± 0	22
MET : extrait méhanolique, AC : extrait d'acétate d'éthyle, n-B : extrait n-butanolique, PR : phase résiduelle, Gent : gentamicine										

Tableau 15: Diamètres des zones d'inhibition (mm) des différents extraits des graines vertes de *C. canephora* et *C. arabica* vis-à-vis des bactéries à Gram négatif.

Bactéries	Extraits	<i>Coffea canephora</i>				<i>Coffea arabica</i>				Gent
		MET	AC	n-B	PR	MET	AC	n-B	PR	
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	8 ± 0	7 ± 0	12,5 ± 0,7	7 ± 0	8 ± 0	10 ± 1,4	7,5 ± 0,7	9 ± 0	22
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	8 ± 0	7 ± 0	7,5 ± 0,7	7 ± 0	7 ± 0	12 ± 0	10 ± 0	7 ± 1	21
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	8 ± 0	8 ± 0	8 ± 1,4	6 ± 0	8 ± 0	6 ± 0	6 ± 0	6 ± 0	22
	<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 19606	9 ± 1,4	10 ± 0	9 ± 0	6 ± 0	6 ± 0	9 ± 1,4	6 ± 0	8,5 ± 0	35
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	8 ± 0	7,5 ± 0,7	6 ± 0	6 ± 0	6 ± 0	9,5 ± 0,7	6 ± 0	8,5 ± 0,7	19
	<i>Citrobacter freundii</i> ATCC 8090	9 ± 1,4	11 ± 0	6 ± 0	6 ± 0	7 ± 0	11,5 ± 0	7 ± 0	11 ± 0	18
	<i>Enterobacter cloacae</i> ATCC 13047	8 ± 1,4	8 ± 0	11 ± 0	8 ± 1,4	8,5 ± 0,7	9,5 ± 0	8 ± 0	12 ± 0	21
	<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 35659	8 ± 0	8 ± 0	6 ± 0	6 ± 0	8,5 ± 0,7	9 ± 1,4	8 ± 0	9,5 ± 0,7	25
	<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 13311	6 ± 0	6 ± 0	9 ± 1,4	6 ± 0	9,5 ± 0	8,5 ± 0,7	6 ± 0	9 ± 0	22
MET : extrait méhanolique, AC : extrait d'acétate d'éthyle, n-B : extrait n-butanolique, PR : phase résiduelle, Gent : gentamicine										

Afin de confirmer les résultats de la technique de diffusion des disques, nous avons déterminé la concentration minimale inhibitrice pour les extraits qui ont montré des diamètres des zones d'inhibition supérieures à 6 mm de diamètre. Les résultats sont présentés dans les tableaux 16 et 17.

Concernant *C. canephora*, nous constatons que l'extrait méthanolique et n-butanol présentent une puissante activité antibactérienne contre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 avec une CMI qui est d'ordre de 40 µg/ mL. Alors que l'extrait d'acétate d'éthyle présente une excellente activité antibactérienne vis-à-vis de *Citrobacter freundii* ATCC 8090 et *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606 avec une CMI qui est de 78 µg/ mL et 156 µg/ mL respectivement.

Il est à noter que l'ensemble des extraits exercent un faible effet antibactérien vis-à-vis du reste des souches avec des CMI considérées comme non pertinentes.

Concernant *C. arabica*, nous remarquons que l'extrait méthanolique présente une bonne CMI vis-à-vis de *Citrobacter freundii* ATCC 8090 et de *Micrococcus luteus* ATCC 9341 avec des valeurs qui sont de 26,04 µg/ mL et 52,08 µg/ mL respectivement.

Nous constatons également que l'extrait n-butanol présente une bonne CMI vis-à-vis de *Citrobacter freundii* ATCC 8090 et de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (13,02 µg/ mL).

Il est à noter que tout les extraits présentent un faibles effet antibactérien vis-à-vis le reste des souches.

Tableau 16: Concentrations minimales inhibitrices ($\mu\text{g}/\text{mL}$) des différents extraits des graines vertes de *C. canephora* et *C. arabica* vis-à-vis des bactéries à Gram positif.

Bactéries	Extraits	<i>Coffea canephora</i>				<i>Coffea arabica</i>				Gent
		MET	AC	n-B	PR	MET	AC	n-B	PR	
	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876	$1,25 \cdot 10^3$	$1,25 \cdot 10^3$	$2,5 \cdot 10^3$	-	-	-	-	-	0,19
	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	-	$1,25 \cdot 10^3$	625	-	-	-	-	-	0,65
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	40	$2,5 \cdot 10^3$	40	312	$12,5 \cdot 10^3$	$12,5 \cdot 10^3$	13,02	$2,5 \cdot 10^3$	0,19
	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 49452	-	-	$2,5 \cdot 10^3$	-	-	-	625	$5 \cdot 10^3$	2,6
	<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341	$2,5 \cdot 10^3$	$2,5 \cdot 10^3$	$5 \cdot 10^3$	-	52,08	$2,5 \cdot 10^3$	$2,5 \cdot 10^3$	625	0,12
	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 15313	-	-	-	-	-	-	-	-	0,19
MET : extrait méhanolique, AC : extrait d'acétate d'éthyle, n-B : extrait n-butanolique, PR : phase résiduelle, Gent : gentamicine										

Tableau 17: Concentrations minimales inhibitrices ($\mu\text{g}/\text{mL}$) des différents extraits des graines vertes de *C. canephora* et *C. arabica* vis-à-vis des bactéries à Gram négatif.

Bactéries \ Extraits	<i>Coffea canephora</i>				<i>Coffea arabica</i>				Gent
	MET	AC	n-B	PR	MET	AC	n-B	PR	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	$2,5 \cdot 10^3$	$12,5 \cdot 10^3$	$2,5 \cdot 10^3$	$5 \cdot 10^3$	$12,5 \cdot 10^3$	$12,5 \cdot 10^3$	$12,5 \cdot 10^3$	$12,5 \cdot 10^3$	0,78
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	$2,5 \cdot 10^3$	$12,5 \cdot 10^3$	$2,5 \cdot 10^3$	$5 \cdot 10^3$	$2,5 \cdot 10^3$	$5 \cdot 10^3$	$5 \cdot 10^3$	$5 \cdot 10^3$	
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	$5 \cdot 10^3$	10^4	$5 \cdot 10^3$	-	625	-	-	-	0,5
<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 19606	313	156	625	-	-	625	-	$2,5 \cdot 10^3$	0,65
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	-	$2,5 \cdot 10^3$	$5 \cdot 10^3$	-	-	$1,25 \cdot 10^3$	-	$5 \cdot 10^3$	8
<i>Citrobacter freundii</i> ATCC 8090	-	78	$2,5 \cdot 10^3$	-	26,04	313	13,02	$1,25 \cdot 10^3$	0,19
<i>Enterobacter cloacae</i> ATCC 13047	$5 \cdot 10^3$	$1,25 \cdot 10^3$	$1,25 \cdot 10^3$	$5 \cdot 10^3$	$5 \cdot 10^3$	$2,5 \cdot 10^3$	$2,5 \cdot 10^3$	$5 \cdot 10^3$	2,6
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 35659	-	313	10^4	-	$1,25 \cdot 10^3$	$1,25 \cdot 10^3$	$1,25 \cdot 10^3$	$2,5 \cdot 10^3$	0,5
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 13311	-	-	-	-	$5 \cdot 10^3$	-	-	$5 \cdot 10^3$	0,65
MET : extrait méhanolique, AC : extrait d'acétate d'éthyle, n-B : extrait n-butanolique, PR : phase résiduelle, Gent : gentamicine									

9. Evaluation de l'activité antifongique

L'évaluation de l'activité antifongique des différents extraits a été recherchée par la méthode de diffusion des disques sur gélose Muller-Hinton supplémenté. Le tableau 18 regroupe les résultats des diamètres des zones d'inhibition en mm des différents extraits de *C. canephora* et *C. arabica* vis-à-vis des 3 levures de *Candida albicans*.

L'extrait n-butanolique de *C. canephora* présente la meilleure activité antifongique vis-à-vis de *Candida albicans* ATCC 10231 et avec un diamètre de la zone d'inhibition de l'ordre de 15 mm. Nous observons que la plus part de nos extraits exercent une moyenne activité antifongique vis-à-vis de *Candida albicans* ATCC 10231 et *Candida albicans* IP444. Les diamètres d'inhibition sont compris entre 7 et 12 mm pour *C. canephora* et entre 7 et 9 mm pour *C. arabica*. Cependant *Candida albicans* ATCC 26790 est l'espèce est qui a résisté le plus à nos extraits.

Tableau 18: Diamètres des zones d'inhibition en mm des différents extraits de grain de café vert de *C. canephora* et *C. arabica* vis-à-vis des levures de *Candida albicans*.

Extraits Levures	<i>Coffea canephora</i>				<i>Coffea arabica</i>				AmB
	MET	AC	n-B	PR	Met	AC	n-B	PR	
<i>C. albicans</i> ATCC 26790	7 ± 0	7 ± 0	6 ± 0	9 ± 0	8 ± 0	8 ± 1,4	8 ± 0	6 ± 0	21,5
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	12 ± 1,4	12 ± 1,4	15 ± 0	9 ± 0	9 ± 0	8 ± 1,4	7 ± 0	7 ± 0	15
<i>C. albicans</i> IP444	10 ± 0	7 ± 1,4	7 ± 0	8 ± 0	9 ± 1,4	7 ± 1,4	7 ± 0	6 ± 0	20
MET : extrait méhanolique, AC : extrait d'acétate d'éthyle, n-B : extrait n-butanolique, PR : phase résiduelle, AmB : amphotéricine B									

Les résultats des CMI vis-à-vis des levures sont représentés dans le tableau 19. Nous observons que les différents extraits exercent une faible activité antifongique avec une CMI allant de $1,25 \cdot 10^3$ à 10^4 µg/ mL.

Tableau 19: Concentrations minimales inhibitrices des différents extraits des graines vertes de *C. canephora* et *C. arabica* vis-à-vis des levures de *Candida albicans*.

Extractions Levures	<i>Coffea canephora</i> 10 ³ µg/ mL				<i>Coffea arabica</i> 10 ³ µg/ mL				AmB µg/mL
	Met	AC	n-B	PR	Met	AC	n-B	PR	
<i>C. albicans</i> ATCC 26790	1,25	1,25	-	5	2,5	2,5	1,25	-	0,8
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	1,25	1,25	1,25	5	2,5	2,5	1,25	1,25	0,4
<i>C. albicans</i> IP444	5	2,5	2,5	10	5	2,5	1,25	-	2

MET : extrait méthanolique, AC : extrait d'acétate d'éthyle, n-B : extrait n-butanolique, PR : phase résiduelle, AmB : amphotéricine B

10. Evaluation du test d'adhésion

10.1. Expérience d'adhésion à temps zéro

Les résultats relatifs à l'effet des différents extraits des graines vertes de *C. canephora* et *C. arabica* sur les trois souches bactériennes de référence sont représentés dans la figure 42. Ces extraits sont ajoutés en même temps que les souches bactériennes avec une concentration finale égale à CMI/8. La quantification de la biomasse dans l'adhésion est réalisée par la technique au cristal violet après 3 heures d'incubation à 37°C.

Pour *C. canephora*, nous constatons que la phase résiduelle a un effet antiadhésif élevé contre *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 avec les taux d'inhibition 55%, 74% et 58% respectivement.

De plus, l'extrait méthanolique et l'extrait n-butanol ont un effet inhibiteur contre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (environ 67% et 63% respectivement).

Il est à noter que l'extrait d'acétate d'éthyle ne présente pas un effet antiadhésif vis-à-vis des trois souches bactériennes.

Pour *C. arabica*, nous observons que l'ensemble des extraits présentent un effet antiadhésif vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 avec un pourcentage d'inhibition qui atteint 57%. Nous observons également que l'extrait méthanolique présente un faible effet

antiadhésif contre *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (24%), alors que phase résiduelle exerce un effet inhibiteur vis-à-vis d'*Escherichia coli* ATCC 25922 avec un pourcentage inhibition de 41%.

La quercétine a montré l'effet antiadhésif le plus élevé vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et *Escherichia coli* ATCC 25922 avec un pourcentage inhibition de 74% et 63% respectivement.

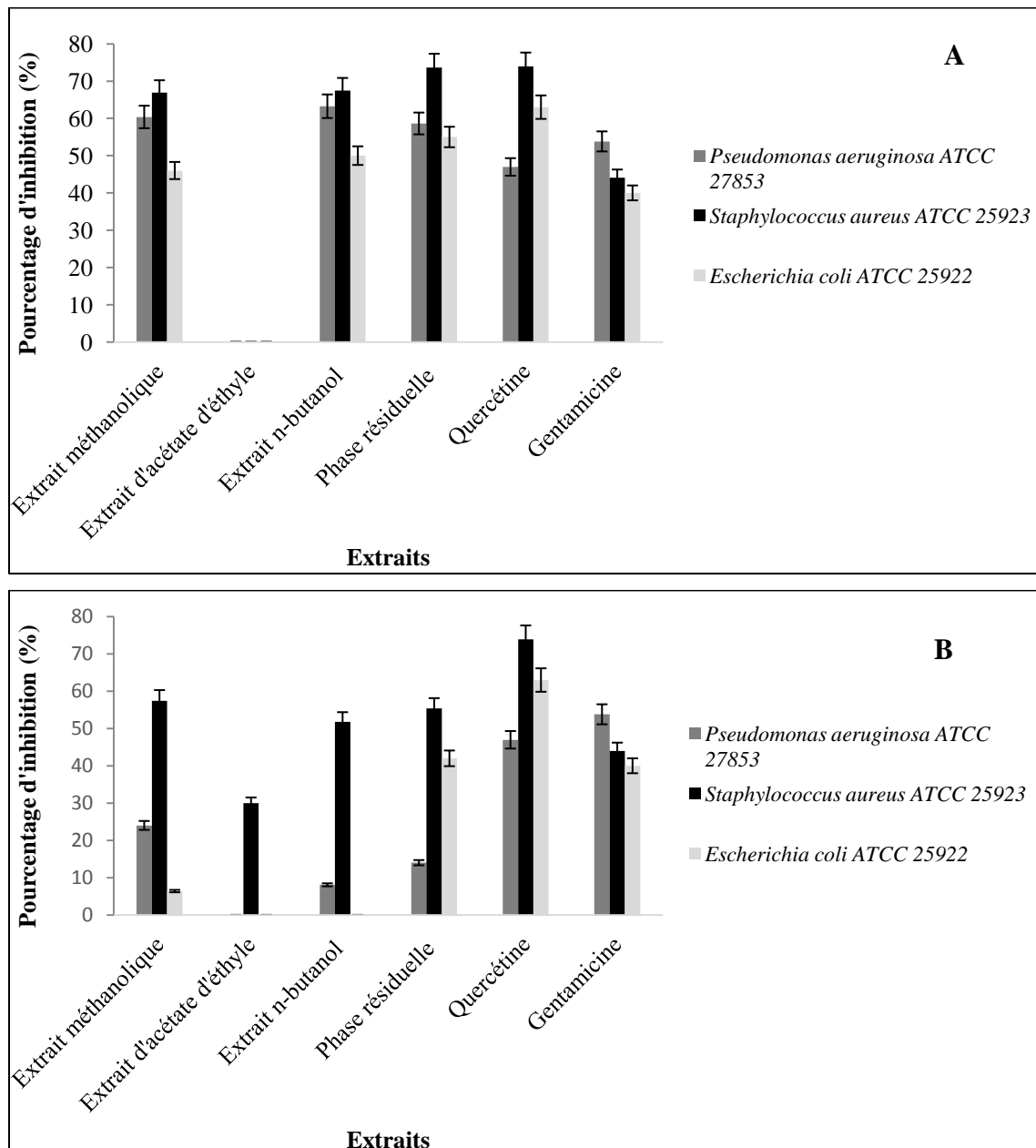


Figure 42: Taux d'inhibition d'adhésion en présence d'extraits des graines vertes de café et des standards à CMI/8 (A : *C. canephora*, B : *C. arabica*).

10.2. Prétraitement du support par les extraits

La figure 43 regroupe les résultats de l'effet des différents extraits des graines vertes de *C. canephora* et *C. arabica* sur l'adhésion des trois bactéries de référence. Les souches bactériennes sont additionnées après un prétraitement du support pendant 3 heures par les différents extraits.

Pour *C. canephora*, nous constatons que *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 s'est avérée être la souche la plus sensible aux différents extraits mis à part l'extrait d'acétate d'éthyle. En effet, à la CMI/8, l'extrait n-butanolique a un effet antiadhésif le plus élevé contre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 avec un pourcentage d'inhibition de 56,5% et 32,37 % respectivement. Néanmoins, la phase résiduelle a un effet antiadhésif contre *Escherichia coli* ATCC 25922 avec un pourcentage d'inhibition de l'ordre de 39,4%. Ces pourcentages d'inhibition sont supérieurs à ceux de la quercétine et de la gentamicine.

Il est à noter que l'extrait d'acétate d'éthyle ne présente aucun effet inhibiteur vis-à-vis des trois souches bactériennes.

Pour *C. arabica*, nous constatons que la phase résiduelle présente un effet antiadhésif vis-à-vis des trois souches bactériennes avec un taux d'inhibition qui est de 33,54% pour *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, 40% pour *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 et 26,56% pour *Escherichia coli* ATCC 25922. De plus, l'extrait méthanolique présente un effet inhibiteur simplement vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (43,75%) et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (40%), alors que l'extrait n-butanol présente un effet inhibiteur seulement contre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (33,76%). En revanche, l'extrait d'acétate d'éthyle ne présente aucun effet inhibiteur contre les trois souches bactériennes.

Il est à noter que la phase résiduelle présente un taux d'inhibition contre *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 et *Escherichia coli* ATCC 25922 supérieur à celui de la gentamicine et la quercétine.

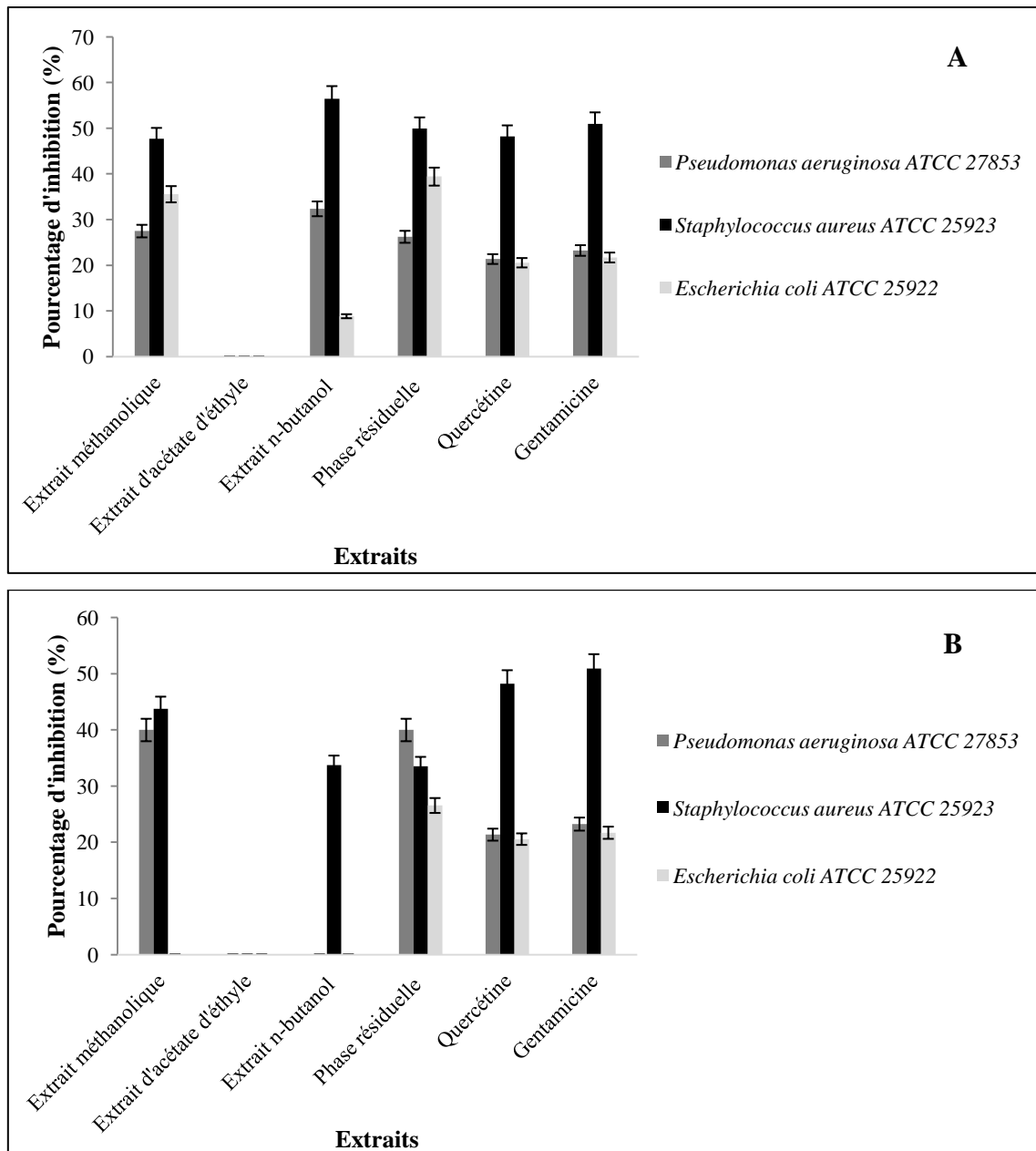


Figure 43: Taux d'inhibition d'adhésion après un prétraitement du polystyrène par les extraits de graines vertes de café et les standards à CMI/8 (A : *C. canephora*, B : *C. arabica*).

11. Angle de contact

Un support est dit hydrophile lorsque la valeur de l'angle de contact avec l'eau atteint au maximum 65° (Van Oss, 1995). Pour cette raison, le polystyrène seul était considéré comme hydrophobe.

L'hydrophobicité du support traité ou non par la gentamicine et les différents extraits a été évaluée par la mesure de l'angle de contact en utilisant les équations de Young-van Oss. Les résultats sont mentionnés dans le tableau 20.

Nous constatons que le caractère hydrophobe diminue après le prétraitement du support par les différents extraits de *C. canephora* où il devient complètement hydrophile après un prétraitement par l'extrait n-butanol.

Après le prétraitement du polystyrène par les différents extraits de *C. arabica*, nous remarquons que le support est hydrophobe avec une légère diminution de la valeur θ_w .

D'après les résultats obtenus de l'approche thermodynamique, nous constatons que le support seul ou bien après son prétraitement par les différents extraits de *C. canephora* et *C. arabica* est considéré comme hydrophobe.

En outre, le tableau 20 montre aussi les résultats des composantes de tension superficielle de Lifshitz-van der Waals (γ^{lw}) ainsi que les paramètres donneur / accepteur de l'électron (γ^- , γ^+). Nous constatons que le polystyrène présente un faible caractère accepteur d'électron (0,47 mJm⁻²).

Après le prétraitement avec des différents extraits de *C. canephora*, nous constatons une augmentation très significative de l'effet donneur d'électrons du support traité par le n-butanol (23,80 mJm⁻²). Tandis qu'une augmentation du caractère accepteur d'électrons a été observée avec tous les extraits avec une valeur qui est entre 0,69 et 1,10 mJm⁻². Il est à noter que l'usage de l'extrait n-butanol montre que cette valeur diminue et elle est estimée à 0,41 mJm⁻².

Après le prétraitement du polystyrène avec des différents extraits de *C. arabica*, nous remarquons une diminution très significative de l'effet donneur d'électrons du support traité par l'extrait méthanolique, l'extrait d'acétate d'éthyle et l'extrait n-butanol (4,53 mJm⁻², 6,84 mJm⁻² et 2,52 mJm⁻² respectivement). En revanche, cette valeur augmente en utilisant la phase résiduelle avec une valeur qui est de 14,67 mJm⁻².

En parallèle, une diminution du caractère d'accepteur d'électron a été observée en utilisant tous les extraits avec une valeur comprise entre 0,00 et 0,38 mJm⁻², mais lorsque nous utilisons l'extrait d'acétate d'éthyle, cette valeur avait augmenté et était estimée à 1,07 mJm⁻².

On peut conclure que le polystyrène sans ou après un prétraitement par les différents extraits des graines verts de *C. canephora* et *C. arabica* présente un fort effet donneur d'électron.

Tableau 20: Angles de contact de l'eau (θ_w), du formamide (θ_f) et du diiodométhane (θ_d), Lifshitz-van der Waals (γ^{lw}), le donneur-accepteur d'électrons (γ^-, γ^+) des différents extraits des graines vertes de *C. canephora* et *C. arabica*.

	Angle de contact (°)			Tension de surface: coposants et paramètres (mJ/m ²)				Hydrophobicité (mJ/m ²)
	θ_d	θ_f	θ_w	γ^{LW}	γ^+	γ^-	g^{AB}	ΔG_{iwi}
<i>C. canephora</i>								
Polystyrène seul	46,60	72,73	84,77	36,07	0,47	9,23	4,17	-38,68
Polystyrène+ Extrait Met	40,50	42,83	67,79	39,28	1,09	9,86	6,56	-35,71
Polystyrène+ Extrait AC	38,20	42,49	69,76	40,42	1,10	7,96	5,92	-41,38
Polystyrène+ Extrait n-B	38,06	40,89	54,91	40,49	0,41	23,80	6,25	-8,76
Polystyrène+ Extrait PR	35,37	43,87	69,50	41,77	0,69	8,82	4,93	-41,51
<i>C. arabica</i>								
Polystyrène seul	46,60	72,73	84,77	36,07	0,47	9,23	4,17	-38,68
Polystyrène+ Extrait Met	41,15	54,31	79,87	38,95	0,38	4,53	2,62	-56,69
Polystyrène+ Extrait AC	43,13	44,99	70,08	38,44	1,07	8,64	6,08	-38,57
Polystyrène+ Extrait n-B	36,92	56,01	84,16	41,04	0,22	2,52	1,49	-69,41
Polystyrène+ Extrait PR	46,66	60,21	72,16	36,04	0,00	14,67	0,00	-27,23

12. Détermination de l'activité hémolytique des extraits vis-à-vis des globules rouges

Les résultats de l'évolution des pourcentages d'hémolyse des globules rouges humains sont représentés dans les figures 44 et 45.

Concernant les extraits de *C. canephora*, à la concentration 500 µg/ mL les taux d'hémolyse passent de 0 à 1,9 % pour l'extrait méthanolique, de 0 à 8% pour l'extrait d'acétate d'éthyle et n-butanol et de 0 à 7,8 % pour la phase résiduelle. A la concentration 62 µg/ mL tous les extraits n'ont pas révélé de toxicité vis-à-vis des globules rouges humains.

Pour les extraits de *C. arabica*, nous remarquons que le pourcentage d'hémolyse de tous les extraits est inférieur à 4 % à durant 60 min d'incubation mis à part celui d'acétate d'éthyle. A la concentration 500 µg/ mL les taux d'hémolyses les plus importants pour l'espèce *C. arabica* ne dépassent pas 3,5 %.

Il est à noter que l'extrait d'acétate d'éthyle a montré une forte toxicité à partir de 30 min d'incubation à la concentration 500 µg/ mL. Le taux d'hémolyse a atteint 31%.

Nous pouvons dire que l'ensemble de tous les extraits ne sont pas toxiques vis-à-vis des globules rouges, à l'exception de l'hémolyse maximale qui est obtenue avec l'extrait d'acétate d'éthyle et la phase résiduelle de *C. canephora* (environ 8%), et celui d'acétate d'éthyle de *C. arabica* avec un taux de 31% à 500 µg/ mL.

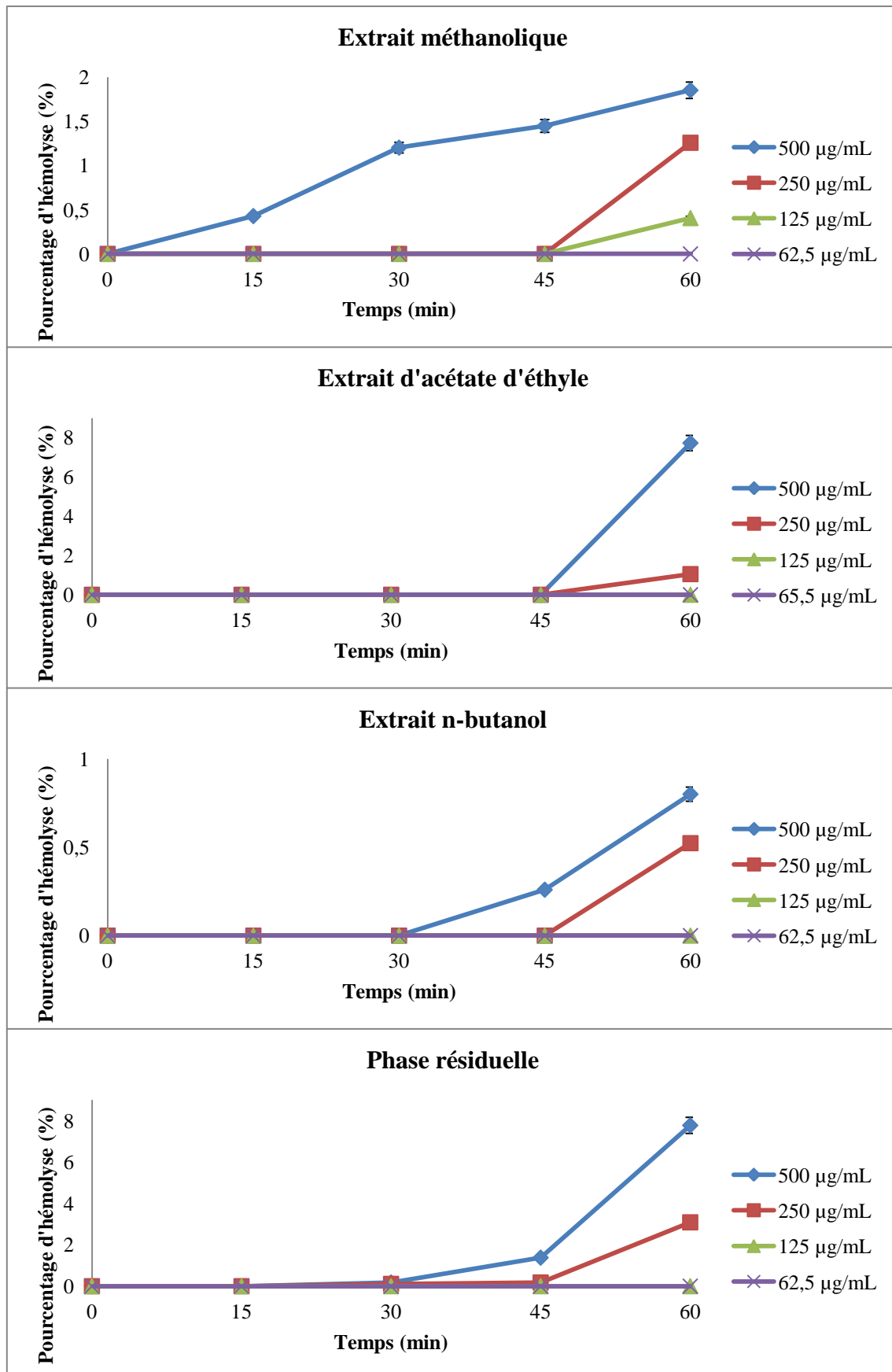


Figure 44: Evolution des taux d'hémolyse en fonction des concentrations des différents extraits des graines vertes de *C. canephora*.

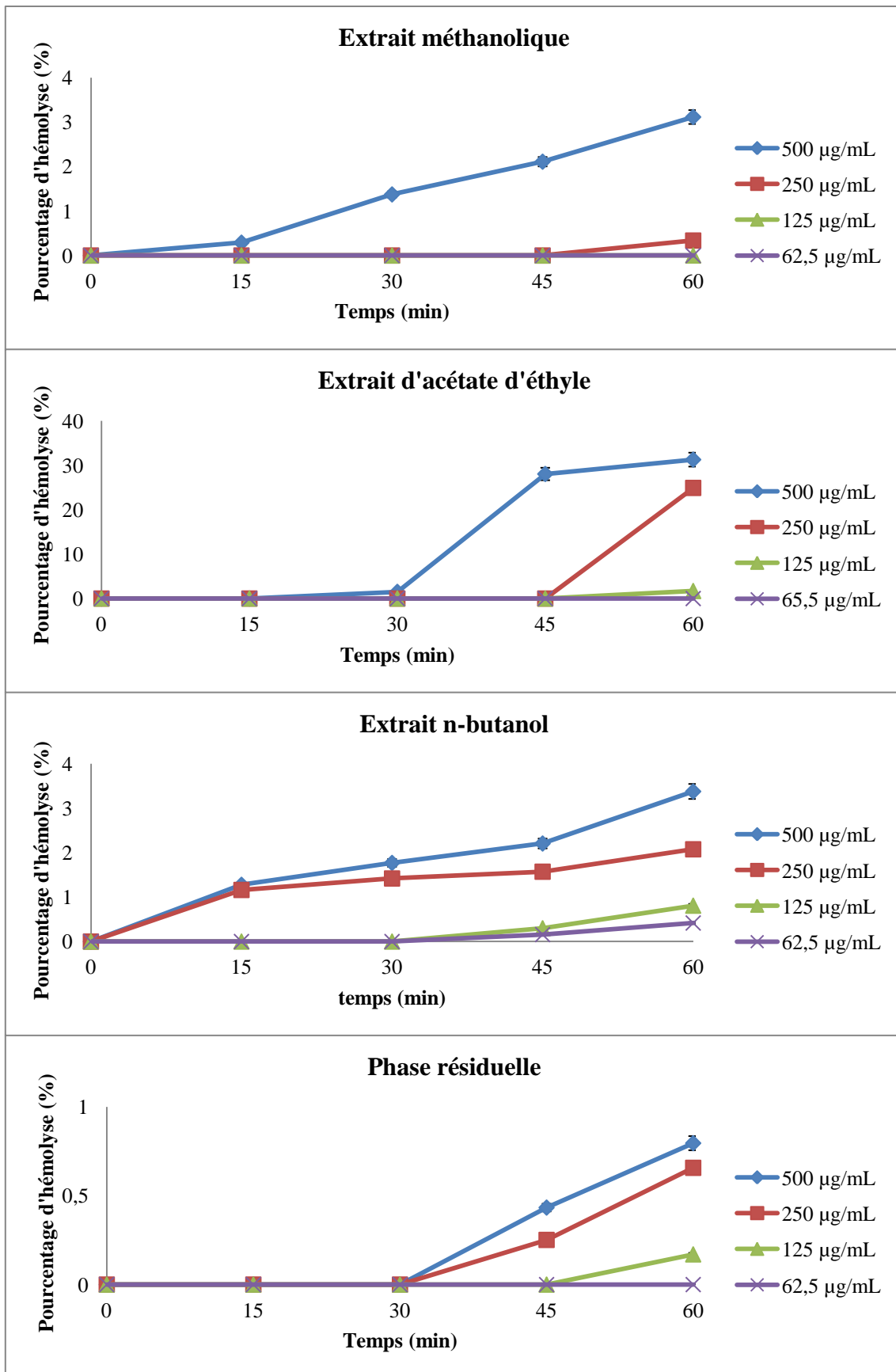


Figure 45: Evolution des taux d'hémolyse en fonction des concentrations des différents extraits des graines vertes de *C. arabica*.

Quatrième partie

Discussion générale

Les plantes médicinales représentent une source importante de composés bioactifs bien connus dans divers domaines tels que l'industrie alimentaire, cosmétique, thérapeutique et pharmaceutique. Dans le secteur de la fabrication des médicaments, les plantes médicinales, si bien utilisées, peuvent avoir moins d'effets secondaires que les médicaments synthétiques (**Ang et al., 2019 ; Chandran et al., 2020**).

Le café est une des plantes les plus consommées dans le monde. Les espèces *C. canephora* et *C. arabica* sont parmi les variétés les plus cultivées dans beaucoup de pays. Leurs graines vertes sont très riches en substances bioactives et représentent de ce fait un bon potentiel pour le secteur médical et alimentaire. Les graines de café restent l'organe le plus important dans le commerce du café en raison de leur utilisation intensive dans la transformation des boissons à base de café.

L'objectif de cette thèse est la caractérisation et l'étude des substances bioactives issues des graines de *C. canephora* et *C. arabica* valorisables dans les domaines de la médecine humaine, vétérinaire et en agronomie. Les travaux sous-jacents visent à la recherche d'activités biologiques de type antioxydante (afin de stimuler des défenses contre le stress oxydant des organismes et permettre ainsi une nouvelle approche dans la lutte contre les pathologies), antibactérienne (alternative aux antibiotiques), antifongique (activité fongicide, fongistatique et inhibitrice de formation des biofilms). Ces infections représentent toujours un problème de santé publique majeur malgré les progrès de la médecine, et ce en particulier dans les pays en voie de développement, du fait de la faible disponibilité des traitements et du développement des phénomènes de résistance (**Tremolieres, 2010**).

La préparation des extraits a été réalisée en utilisant le méthanol comme solvant d'extraction. Cet extrait a subi ensuite une extraction liquide-liquide en utilisant deux solvants de polarité croissante : l'acétate d'éthyle et le n-butanol. Au total, nous avons obtenu 4 extraits pour chaque espèce qui sont : extrait méthanol, extrait d'acétate d'éthyle, extrait n-butanol et la phase résiduelle.

Tous les extraits ont fait l'objet du dosage des teneurs en polyphénols totaux, en flavonoïdes et en tannins condensés. Les extraits méthanoliques des deux espèces ont montré des teneurs très élevées en polyphénols totaux et en flavonoïdes. Ce résultat est en accord avec les travaux de **Falleh et al., (2008)**, qui montrent que le méthanol est le meilleur solvant pour l'extraction des polyphénols.

Les résultats obtenus peuvent être liés à plusieurs facteurs tels que les facteurs climatiques et environnementaux, la polarité du solvant utilisé, la période de récolte, la variété, l'organe utilisé et le stade de développement de la plante, la méthode et la durée d'extraction

(Miliauskas *et al.*, 2004 ; Ebrahimi *et al.*, 2008 ; Haddoudi *et al.*, 2014 ; Zlotek *et al.*, 2016).

Le profil HPLC obtenu montre très bien la richesse des extraits des graines vertes de *C. canephora* et *C. arabica* en composés phénoliques et confirme les résultats obtenus dans les dosages. En effet, ces deux espèces contiennent les composés phénoliques : l'acide chlorogénique, la quercétine, et l'acide P-coumarique. De plus, l'espèce *C. arabica* contient également la rutine, l'acide férulique et la catéchine. Le résultat du spectre infrarouge et de la RMN de la fraction Fn-BA de l'extrait n-butanol de *C. arabica* à montré que cette fraction correspond à la caféine. Aucune étude n'a montré la présence de ces molécules mis a part la caféine dans les graines vertes du café.

En revanche, la présence de ces composés a été rapportée par plusieurs travaux qui ont montré que les feuilles de café contiennent ces métabolites secondaires (Campa *et al.*, 2012 ; Almeida *et al.*, 2014 ; Souard *et al.*, 2018 ; Ngamsuk *et al.*, 2019).

De grandes quantités de composés phénoliques ont été signalées dans les fruits et les graines du café. Les acides chlorogéniques sont les principaux composés phénoliques qui s'accumulent dans les graines pendant la maturation des fruits et des graines de café (Acidri *et al.*, 2020).

Les résultats de la RMN et l'infrarouge de la fraction Fn-BR3 de *C. canephora* nous ont permis la caractérisation pour la première fois du composé kahweol acétate. Nos résultats sont confirmés par Finotello *et al.*, (2017) lequel a montré que le kahweol était détecté chez *Coffea canephora*, ce qui implique qu'il ne devrait plus être considéré comme un marqueur spécifique de *C. arabica*, puisque plusieurs expériences ont montré que le kahweol était absent chez *C. canephora* (Rubayiza et Meurens, 2005 ; Keidel *et al.*, 2010 ; Wermelinger *et al.*, 2011 ; Souza et Benassi, 2012). Les travaux de Lam *et al.*, (1985) ont montré que le kahweol peut être soit estérifié par un groupe acétate soit par un acide gras.

Les composés phénoliques sont à l'origine d'un large spectre d'activités biologiques à savoir l'activité antibactérienne, anti-cancérogène, anti-inflammatoire, antioxydante. Les plantes de café sont une source importante d'antioxydants alimentaires. La capacité antioxydante des plantes, serait due à l'accumulation de polyphénols (Alvarez-Jubete *et al.*, 2010). Ce qui nous a poussés à étudier la capacité antioxydante de nos extraits en utilisant sept méthodes qui sont fortement liées à leur caractère réducteur.

Nous avons observé que tous les extraits à l'exception de l'extrait d'acétate d'éthyle exerçaient un pouvoir inhibiteur du radical libre DPPH. L'extrait n-butanol a présenté la CI₅₀ la plus basse (20,09±0,40 µg/ mL pour *C. arabica* et 11,32 ± 0,35 µg/ mL pour *C. canphora*).

Acidri et al., (2020) ont obtenu des résultats moins intéressants avec l'extrait aqueux des graines vertes de *C. arabica* issue d'Indonésie ($CI_{50}=146,8 \pm 12,0 \mu\text{g/ mL}$).

Plusieurs études ont relié le potentiel antioxydant des extraits à leur teneurs en composés phénoliques (**Alvarez-Jubete et al., 2010 ; Stagos et al., 2012; Amri et al., 2015 ; Guettaf et al., 2016**). Les composés phénoliques, en particulier les flavonoïdes et les acides phénoliques, exercent l'activité antioxydante par le piégeage des espèces radicalaires et les formes réactives de l'oxygène (**Kelly et al., 2002 ; Albano et Miguel, 2010 ; Treml et Šmejkal 2016**).

Le profil HPLC a démontré que les flavonoïdes et les acides phénoliques sont présents dans les graines vertes de *C. canephora* et *C. arabica*. Ces composés agissent comme antioxydants contre les radicaux libres. Selon **Alvarez-Jubete et al., (2010)**, les polyphénols à l'origine de l'activité antioxydante sont la mangiférine et l'acide 5-caffeoylquinic (l'une des principales classes d'acide chlorogénique).

Certaines études ont montré que la relation entre la structure chimique des composés phénoliques et leur capacité à piéger les radicaux libres dépendent du nombre, la polarité, la position, le degré de polymérisation et la nature des substituants sur les cycles (**Karamac et al., 2005 ; Tabart et al., 2009 ; Berek et al., 2020**). De plus, l'activité de piégeage du flavonoïde contre le radical hydroxyle augmente avec le nombre de groupes hydroxyles substitués sur le cycle B (**Robards et al., 1999**). Cependant, la disponibilité du site de déprotonation joue un rôle primordial dans le transfert des atomes d'hydrogène (4-OH pour la quercétine par exemple) (**Martins et al., 2004**). De plus, l'enthalpie de dissociation de la liaison -OH est inversement proportionnelle à la capacité de transfert de l'atome d'hydrogène (**Laguerre et al., 2007**) et elle est largement utilisée comme indice d'activité de piégeage contre ce radical (**Cheng et al., 2002**).

Dans un second temps nous avons évalué l'activité antioxydante en utilisant la technique du piégeage de l'ABTS. Les radicaux $ABTS^+$ sont plus réactifs que les radicaux DPPH et contrairement à la réaction du radical DPPH qui implique un transfert de protons, la réaction radicalaire $ABTS^+$ implique le transfert des électrons. Les résultats obtenus ont montré que l'extrait n-butanol présente la plus basse CI_{50} par rapport aux autres extraits. Cette CI_{50} est inférieure à celle de l'extrait aqueux rapportée par **Acidri et al., (2020)**.

Nos résultats peuvent être expliqués par la présence des groupements hydroxyles présents dans les différentes molécules détectées par la HPLC. En effet, la présence de groupes hydroxyles libres dans les composés phénoliques peuvent servir de donneurs d'électrons. Par

conséquent, les antioxydants sont considérés comme réducteurs et inactivateurs des oxydants (**Siddhuraju et Becker 2007**).

Concernant le test du blanchissement du β -carotène, nous avons remarqué que la phase résiduelle des deux espèces présente la plus faible CI_{50} . La structure et la lipophilie des antioxydants sont les facteurs déterminants de l'inhibition la peroxydation lipidique en raison de leur capacité d'interagir et de s'incorporer dans les bicouches lipidiques (**Antonella et al., 1995 ; Djeridane et al., 2010**).

De plus les travaux de **Maggi et ses collaborateurs (2009)** ont montré que les composés oxygénés (alcools) inhibent la peroxydation lipidique.

Les résultats du test FRAP avaient montré que les extraits méthanoliques des deux espèces ainsi que l'extrait n-butanol de *C. canephora* présentent les plus basses $A_{0.5}$.

Dans l'espèce indonésienne de *C. arabica*, **Acidri et al., (2020)** l'extrait aqueux n'a pas montré une activité intéressante au test antioxydant via le test FRAP.

En ce qui concerne le test du phénanthroline, nous avons remarqué que les extraits méthanol et n-butanol des deux espèces exercent une bonne activité antioxydante. Les travaux de **Ritu et Nisha, (2018)** ont montré que l'extrait méthanolique présente une forte capacité à réduire le fer. De plus, **Daniel et Workneh, (2017)** ont rapporté qu'il y a une forte corrélation entre la teneur en composés phénoliques totaux et le dosage du pouvoir réducteur ferrique, ce qui explique le pouvoir réducteur important observé dans les extraits alcooliques puisqu'ils sont très riches en composés phénoliques.

Concernant la méthode CUPRAC, les résultats obtenus ont montré que les extraits des graines vertes de *C. canephora* et *C. arabica* réduisent fortement les ions cuivriques (Cu^{2+}). Cela est dû à la présence des composés phénoliques qui sont capables d'interagir avec les métaux de transition à savoir le fer et le cuivre (**Pietta, 2000 ; Heim et al., 2002**). De plus, le profil HPLC a démontré que la richesse en flavonoïdes dans les extraits des graines vertes de *C. canephora* et *C. arabica*. Ces flavonoïdes agissent comme des antioxydants primaires contre les radicaux libres (**Ksouri et al., 2008**). En effet, les flavonoïdes forment un complexe avec les chaînes radicalaires par les biais de transfert d'électrons, de protons, et par chélation des métaux de transition (**Schroeter et al., 2002 ; Leopoldini et al., 2011**).

De nombreuses études ont rapportée l'activité antioxydante ou antimicrobienne de ces composés phénoliques, mais peu comparent cette double activité sur une même série d'extraits, pourtant intéressante pour rationaliser l'utilisation des additifs par exemple.

De ce fait, nous avons démontré que les extraits n-butanol de graines vertes de *C. canephora* et *C. arabica* ont une activité antibactérienne très intéressante vis-à-vis de

Staphylococcus aureus ATCC 25923. Cette inhibition s'explique par l'influence du cycle B des flavonoïdes présents dans *C. canephora* et de *C. arabica* ce qui entraîne une inhibition de la synthèse de l'ADN et de l'ARN des microorganismes (Wu *et al.*, 2013). De plus, les flavonoïdes peuvent interférer avec les protéines extracellulaires conduisant à former un complexe avec la paroi bactérienne (Basile *et al.*, 1999 ; Ghedira, 2005 ; Al-Momani *et al.*, 2007 ; González-Segovia *et al.*, 2008).

Les graines vertes de café contiennent également de l'acide gallique qui est aussi doté d'une activité antibactérienne. En effet, les travaux d'Alam *et al.*, (2017) ont montré que l'acide gallique possède de nombreuses propriétés thérapeutiques potentielles, y compris des effets anticancéreux, anti-inflammatoires et antimicrobiens. De nombreux groupes de flavonoïdes ont été isolés, identifiés et se sont avérés avoir des activités antifongiques, antivirales et antibactériennes (Cushnie et Lamb, 2005).

Les résultats HPLC ont montré la présence de quercétine dans l'extrait n-butanolique. Rauha *et al.*, (2000), ont rapporté que la quercétine et la naringénine sont actives contre *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*. Alors que l'acide P-coumarique, l'acide caféique agissent comme des facteurs empêchant la croissance de *Staphylococcus aureus* (Stojković *et al.*, 2013).

De plus, les études de Rakatama et ses collaborateurs (2018) ont montré une augmentation proportionnelle du pouvoir inhibiteur de la croissance *C. albicans* ATCC 90028 et des *C. albicans* isolées à partir des patients ayant une candidose Vulvovaginite en fonction de la concentration de l'extrait éthanolique des graines de *Coffea arabica*. Malheureusement, les résultats de notre étude n'ont pas montré d'effet antifongique notable.

Certains micro-organismes ont développé des stratégies pour survivre en communauté dans la barrière muqueuse ou la contourner pour établir une infection. L'adhésion des bactéries à une surface est une première étape dans le développement du biofilm. Il a été démontré que divers facteurs tels que la structure chimique, la rugosité de surface et l'énergie de surface libre affectent les interactions entre les cellules bactériennes et la surface (Malhotra *et al.*, 2019). En effet, la phase résiduelle et l'extrait n-butanol des graines vertes de *C. canephora* et *C. arabica* ont montré un effet antiadhésif élevé vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Cet effet peut être expliqué par les travaux de Borges *et al.*, (2012), qui ont montré que l'acide gallique et l'acide férulique influencent les caractéristiques physico-chimiques des bactéries, telles que l'énergie libre d'adhésion entre les cellules bactériennes et le polystyrène. Cela rend

l'attachement à la surface défavorable. De plus, plusieurs études ont prouvé la capacité de la quercétine à réduire l'attachement bactérien à la surface en bloquant l'expression de gènes impliqués dans l'adhésion bactérienne (**Lee et al., 2013 ; Hasan et al, 2014 ; Vazquez-Armenta et al., 2018**).

Les effets inhibiteurs de la quercétine étaient à une concentration inférieure à celle de la plupart des extraits (**Tan et al., 2013**). En effet, la quercétine à sa concentration sub-inhibitrice (0,2 mM) inhibe l'adhésion initiale et la formation de microcolonies en diminuant 41% la production de protéines extracellulaires dans les biofilms (**Vazquez-Armenta et al., 2018**). En 2007, O'Gara a montré que la quercétine supprime l'expression des gènes *icaA* et *icaD* liés à l'adhésion qui sont impliqués dans la formation du biofilm de *S. aureus* (**O'Gara, 2007**). La quercétine inhibe également l'expression des gènes d'adhésion intercellulaire des polysaccharides chez *S. aureus* (**Lee et al., 2013**). **Yu et al., (2018)** ont montré que l'ajout de la quercétine permet de diminuer les taux de transcription de plusieurs gènes liés au biofilm, dont *bcsA*, *csgA*, *fiC*, *fmA*, *motA* et *wcaF* chez *E. coli*. À la concentration de 16 µg /mL, la quercétine a montré une meilleure efficacité que l'azithromycine pour prévenir l'adhésion de la souche de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 à la surface en inhibant les niveaux d'expression des gènes associés à quorum-sensing *lasI* (34%), *lasR* (68%), *rhlI* (57%), *rhlR* (50%) et régule l'expression de plusieurs protéines sidérophores de fer limitant la quantité de Fe³⁺ nécessaire à la formation du biofilm de *Pseudomonas aeruginosa* (**Ouyang et al., 2016**).

Les résultats de la mesure d'angle de contact du traitement de polystyrène en présence ou en absence des différents extraits de *C. canephore* et *C. arabica* ont montré que le caractère hydrophobe du polystyrène a diminué en présence de l'ensemble des extraits ou il est devenu hydrophile en présence de l'extrait n-butanol de *C. canephora*. L'approche thermodynamique de **Van Oss (1995, 1997)** montre que le support est hydrophile lorsque la valeur de l'énergie libre est positive. Si cette valeur devient négative le support est hydrophobe. Cette énergie permet une évaluation quantitative de l'hydrophobicité de la surface du substrat, alors que l'angle de contact avec l'eau donne une indication qualitative de l'hydrophobie (**Hamadi et Latrache, 2008**).

Les résultats obtenus peuvent être expliqués par la variation des groupements fonctionnels présents dans les différentes molécules de nos extraits donnant le caractère hydrophile ou hydrophobe au support. Selon les résultats obtenus par la HPLC, nous pouvons suspecter l'effet des groupements hydroxyles dans la variation de l'hydrophobicité. De plus, selon les résultats obtenus, il a été constaté qu'en présence de nos extraits, le caractère donneur des électrons augmente. Ceci confirme les résultats obtenus précédemment par l'activité

antioxydante de nos extraits et que les groupements hydroxyles peuvent être à l'origine du transfert des électrons.

Le caractère hydrophobe du polystyrène peut être masqué par la présence d'une couche hydrophile à sa surface. L'obtention d'une couche hydrophile peut être réalisée par fixation covalente d'un polymère hydrophile, adsorption physique d'un monomère (ou oligomère) suivie d'une polymérisation in situ ou adsorption d'un polymère hydrophobe/hydrophile.

Ces dernières modifications apportées aux particules de polystyrène donnent naissance à des matériaux dits composites.

L'obtention de fonctions hydroxyles permet d'envisager la fixation de groupes ou polymères hydrophiles afin d'augmenter le caractère hydrophile de ces nouveaux matériaux.

Le polystyrène-divinylbenzène peut être modifié par introduction de groupes hydrophiles non chargés, tels que des groupes hydroxyméthyles ou acétyles. Par exemple, la fixation chimique de groupes acétyles est réalisée par réaction de Friedel et Crafts (**Sun et Fritz, 1990**) avec le chlorure d'acétyle.

Ellingsen et ses collaborateurs, ont fixé chimiquement un polymère hydrophile (non précisé) sur le PS-DVB après une hydroxyméthylation préalable du matériau (**Ellingsen et al., 1993**). La surface résultante présente une couche hydrophile, laquelle est aisément fonctionnalisée par introduction de groupes ioniques (sulfate ou ammonium).

La dernière activité biologique ciblée dans notre travail est l'inhibition de l'acétylcholinestérase (AChE) et butyrylcholinestérase (BChE). L'inhibition de ces derniers est utilisée dans le traitement de la maladie d'Alzheimer (MA) (**Howes et al., 2003**). Les résultats obtenus ont montré que tous les extraits de *C. arabica* et *C. canephora* présentent un effet inhibiteur vis-à-vis de la butyrylcholinestérase (BChE) (40% et 13% respectivement). Alors que, seul l'extrait d'acétate d'éthyle de *C. arabica* présente un effet inhibiteur de l'acétylcholinestérase (AChE) (35%). Selon les travaux de **Vinutha et al., (2007)**, le taux d'inhibition de l'AChE par les différents extraits sont classés comme suit: puissante (> 50% d'inhibition), modérée (30-50% d'inhibition), faible (<30% d'inhibition) et nulle (<5% d'inhibition). Cette efficacité peut être expliquée par la présence de plusieurs molécules bioactives responsables de cette activité, ce qui pourrait être bénéfique pour la guérison de troubles neurodégénératifs tels que la MA (**Dasmalchi et al., 2007**). Le café a un effet stimulant bien connu sur le système nerveux. Il peut augmenter l'effet des analgésiques ou réduire la fatigue. Les chercheurs américains ont montré que la consommation régulière de café et de cola peut réduire l'incidence de la maladie de Parkinson (**Patay et al., 2016**). En

effet, les graines vertes de café contiennent de la caféine. Cette dernière présente un effet dans le traitement des maladies neurologiques comme la maladie d'Alzheimer et la maladie de Parkinson, le diabète de type II et le cancer du foie (**Gómez-Ruiz et al., 2007**).

L'activité anti-hémolytique, en présence d'une substance inconnue est la première étape dans la recherche d'une activité pharmacologique par l'étude de la toxicité. L'hémolyse, définie comme la destruction des hématies et la libération d'hémoglobine et du contenu intracellulaire dans le plasma, peut avoir un effet très nocif sur les soins donnés au malade. Donc l'étude de la toxicité d'une plante vis-à-vis des globules rouges humains est un bon indicateur de sa toxicité.

Les résultats obtenus avaient montré que l'ensemble des extraits n'est pas toxique vis-à-vis des globules rouges, à l'exception de l'hémolyse maximale 7,8% qui est obtenue avec la phase résiduelle et l'acétate d'éthyle de *C. canephora* et celui d'acétate d'éthyle de *C. arabica* avec un taux de 31% à 500 µg/ mL. Ces résultats peuvent être expliqués par la richesse de ces deux espèces en molécules bioactives de nature non phénolique à savoir les saponines qui présentent une activité hémolytique par le biais de la formation des pores, des perméabilités cellulaires ainsi qu'à des altérations dans les portions de glucides chargées négativement sur la surface de la cellule (**Abe et al., 1981 ; Melzig et al., 2001 ; Gauthier et al., 2009**).

Cinquième partie

Conclusion générale et Perspective

Les plantes médicinales sont actuellement entreprises par plusieurs recherches dans différents domaines en raison de leurs richesses en substances bioactives avec moins d'effets secondaires. Pour cela, le présent travail de recherche a porté sur la recherche des composés à activité biologique à partir des graines vertes de café de *C. canephora* et *C. arabica*.

Il ressort de ce travail que:

- L'analyse quantitative nous a permis de mettre en évidence la richesse des extraits bruts méthanoliques des deux espèces présentant une teneur importante en polyphénols et en flavonoïdes totaux.
- Le profil de la HPLC nous a montré que les extraits de graines vertes de café sont très riches en composés phénoliques à savoir la quercétine, l'acide gallique, l'acide chlorogénique, l'acide P-coumarique et la vanilline chez *C. canephora* et de la quercétine, l'acide gallique, catéchine, l'acide P-coumarique, rutine, le résorcinol, l'acide ferulique, l'acide chlorogénique et l'acide caféique chez *C. arabica*. Tandis que la caractérisation de la fraction Fn-Br3 par la RMN montre que *C. canephora* renferme la Kahweol acétate.
- Les activités antioxydantes des extraits de *C. canephora* et *C. arabica* ont révélé que l'extrait n-butanol des deux espèces présente la CI_{50} la plus basse par la méthode de DPPH et l'ABTS, alors la phase résiduelle présente la CI_{50} la plus basse par la technique du blanchissement du β -carotène. Alors que pour le pouvoir réducteur du fer (FRAP), phénanthroline, capacité antioxydante par réduction du cuivre (CUPRAC), nous pouvons dire que l'extrait n-butanol de *C. canephora* et l'extrait méthanolique de *C. arabica* présentent les plus basses $A_{0.5}$. En revanche, l'extrait méthanolique des deux espèces présente une meilleure capacité antioxydante totale. Nous pouvons dire que *C. canephora* présente une meilleure activité antioxydante par rapport à *C. arabica* en utilisant les différentes techniques mis à part celle de CUPRAC.
- L'évaluation de l'activité antimicrobienne nous a permis de conclure que l'extrait méthanolique et n-butanol des graines vertes de *C. canephora* présentent une puissante activité antibactérienne vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 avec une CMI de 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Cette CMI est supérieure à celle de l'extrait n-butanol des graines vertes de *C. arabica* vis-à-vis de *Citrobacter freundii* ATCC 8090, *Staphylococcus aureus* ATCC 2592 (13,02 $\mu\text{g}/\text{mL}$). En revanche, les graines vertes de *C. canephora* et *C. arabica* possèdent une faible activité antifongique vis-à-vis des levures de référence de *Candida albicans*.
- En présence des différents extraits des graines vertes de café à une concentration finale de CMI/8, ont montré que l'extrait n-butanol et la phase résiduelle de *C. canephora* ainsi que

l'extrait méthanolique de *C. arabica* présente un excellent effet anti-adhésif vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* ATCC 2592 avec un taux d'inhibition qui peut atteindre 74% et 57% respectivement.

- Après un prétraitement du polystyrène par les différents extraits de *C. canephora* et *C. arabica* à une concentration finale de CMI/8, nous constatons que l'extrait n-butanolique de *C. canephora* présente un effet antiadhésif le plus élevé contre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 avec un pourcentage d'inhibition de 56,5% et 32,37 % respectivement. Tandis que l'extrait méthanolique de *C. arabica* présente un bon effet inhibiteur vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923(43,75%) et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (40%).
- La mesure de l'angle de contact a montré que la physico-chimie du polystyrène traité ou non par la gentamycine et les différents extraits des graines vertes de café qu'il est hydrophobe mis à part avec celui traité par l'extrait n-butanol de *C. canephora*. De plus, ce support sans ou avec prétraitement par les différents extraits des graines vertes de *C. canephora* et *C. arabica* présente un fort effet donneur d'électron.
- Le test de la toxicité effectué vis-à-vis des cellules érythrocytaires d'un humain sain a montré que l'ensemble des extraits ne sont pas toxiques vis-à-vis des globules rouges, à l'exception de l'extrait d'acétate d'éthyle et la phase résiduelle de *C. canephora* (8%, 7,8% respectivement) et celui d'acétate d'éthyle de *C. arabica* avec un taux de 31% à 500 µg/ mL.

Pour compléter ce travail, il serait intéressant d'étudier :

- L'effet de ces extraits sur des souches hospitalières.
- Purification et caractérisation d'autres molécules bioactives non identifiées par la HPLC.
- L'effet d'association entre les molécules pures sur les activités biologiques.
- Déterminer l'efficacité de ces extraits sur des modèles *in vivo*.
- Démontrer le mode de son usage thérapeutique.
- Réaliser des héli-synthèse des principes actifs responsables de ces activités biologiques.

Sixième partie

Références bibliographiques

- Abe H., Konishi H., Komiya H. (1981).** Effects of saikosaponins on biological membranes. *Planta Med.*; 42: 356-363.
- Acidri R., Sawai Y., Sugimoto Y., Handa T., Sasagawa D., Masunaga T., Yamamoto S., Nishihara E. (2020).** Phytochemical Profile and Antioxidant Capacity of Coffee Plant Organs Compared to Green and Roasted Coffee Beans. *Antioxidants (Basel)*; 9: 93.
- Adepoju A.F., Adenuga O.O., Mapayi E.F., Olaniyi O.O. (2017).** Coffee: Botany, Distribution, Diversity, Chemical Composition and Its Management. *IOSR-JAVS.*; 10: 57-62.
- Affonso R.C.L., Voytena A.P.L., Fanan S., Pitz H., Coelho D.S., Horstmann A.L., Pereira A., Uarrota V.G., Hillmann M.C., Calbusch L.A.V., Ribeiro-do-Valle R.M., Maraschin M. (2016).** Phytochemical Composition, Antioxidant Activity, and the Effect of the Aqueous Extract of Coffee (*Coffea arabica* L.) Bean Residual Press Cake on the Skin Wound Healing. *Oxid Med. Cell. Longev.*; 2016: 1923754.
- Agarwal R.K., Singh S., Bhilegaonkar K.N., Singh V.P. (2011).** Optimization of microtitre plate assay for the testing of biofilm formation ability in different Salmonella serotypes. *Int. Food Res. J.*; 18: 1493-1498.
- Akl E.M., Mohamed S.S., Hashem A.I., Taha F.S. (2020).** Biological activities of phenolic compounds extracted from flaxseed meal. *Bull. Natl. Res. Cent.*; 44: 27.
- Alam P., Parvez M.K., Arbab A.H., Al-Dosari M.S. (2017).** Quantitative Analysis of Rutin, Quercetin, Naringenin, and Gallic Acid by Validated RP- and NP-HPTLC Methods for Quality Control of anti-HBV Active Extract of *Guiera Senegalensis*. *Pharm. Biol.*; 55: 1317-1323.
- Albano S.M., Miguel M.G. (2010).** Biological activities of extracts of plants grown in Portugal. *Ind. Crop. Prod.*; 1-6.
- Allred K.F., Yackley K.M., Vanamala J., Allred C.D. (2009).** Trigonelline is a novel phytoestrogen in coffee beans. *J. Nutr.*, 139: 1833-1838.
- Almeida R.F., Ulrich C.M., Owen R.W., Trevisan M.T.S. (2014).** Content and solvent extraction in coffee leaves from Brazil. *Assoc. Sci. Inf. Coffee Conf.*; 42-45.
- Al-Momani W., Abu-Basha E., Janakat S., Nicholas R.A.J., Ayling R.D. (2007).** In vitro antimycoplasmal activity of six Jordanian medicinal plants against three Mycoplasma species. *Trop. Anim. Health Prod.*; 39: 515-519.

Alquézar B., Rodríguez A., de la Peña M., Peña L. (2017). Genomic Analysis of Terpene Synthase Family and Functional Characterization of Seven Sesquiterpene Synthases from *Citrus sinensis*. *Front Plant Sci.*; 8. doi: 10.3389/fpls.2017.01481.

Alvarez-Jubete L., Wijngaard H., Arendt E.K., Gallagher E. (2010). Polyphenol composition and in vitro antioxidant activity of amaranth, quinoa buckwheat and wheat as affected by sprouting and baking. *Food Chem.*; 119: 770-778.

Alzand K.I., Mohamed M.A. (2012). Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Antioxidant activity. *J. Pharm. Res.*; 5: 4013-4020.

Amri O., Elguiche R., Tahrouch S., Zekhnini A., Hatimi A. (2015). Antifungal and antioxidant activities of some aromatic and medicinal plants from the southwest of Morocco. *J. Chem. Pharm. Res.*; 7: 672-678.

Andersen M.Ø., Markham K.R. (2006). FLAVONOIDS, Chemistry, Biochemistry and Applications. Natural Products from Plants. Edition Taylor & Francis Group, LLC.

Ang A.M.G., Enot M.M., Baltazar G.J.D., Alinapon C.V., Buncales E.O., Barbosa G.B. (2019). Antioxidant and Cytotoxic Activity of the Leaf Ethanolic Extracts of *Tithonia diversifolia* and *Gliricidia sepium* from Bukidnon, Philippines. *AJBLS.*; 8: 8-15.

Anthony F., Diniz E.L.C., Combes M.C., Lashermes P. (2010). *Plant Syst. Evol.*; 285:51.

Antonella S., Mario S., Maria L., Daniela M., Francesco B., Francesco C. (1995). Flavonoids as antioxidant agents: importance of their interaction with biomembrane. *Free Radic. Biol. Med.*; 19: 481-486.

Apak R., Guclu K., Ozyurek M., Karademir S.E. (2004). Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, Using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC Method. *J. Agric. Food Chem.*; 52: 7970-7981.

Baeza G., Benavent M.A., Sarrià B., Goya L., Mateos R., Bravo L. (2014). Green coffee hydroxycinnamic acids but not caffeine protects human HepG2 cells against oxidative stress. *Food Res. Int.*; 62: 1038-1046.

Balasundram N., Sundram K., Samman S. (2006). Phenolic compounds in plants and agriindustrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chem.*; 99: 191-203.

- Barek S., Rahmoun N.M., Aissaoui M., El Haci I.A., Bensouici C., Choukchou-Braham N. (2020).** Phenolic Contents, Antioxidant, and Antibacterial Activities of the Algerian *Genista saharae* Solvent Extracts. *J. Herbs Spices Med. Plants*; 26: 1-13.
- Barka S., Ben Attallah S. (2010).** L'effet de deux plantes médicinales sur quelques Bactéries pathogènes. Mémoire de fin d'étude d'ingénieur, université de Ouargla, pp 3- 13.
- Basile A., Giordano S., López-Sáez J.A., Cobianchi R.C. (1999).** Antibacterial activity of pure flavonoids isolated from mosses. *Phytochemistry*; 52: 1479-1482.
- Basli A., Chibane M., Madani K., Oukil N. (2012).** Activité antibactérienne des polyphénols extraits d'une plante médicinale de la flore d'Algérie: *Origanum gl andulosum* Desf. *Phytothérapie*; 10: 2-9.
- Belayneh A., Bussa N.F. (2014).** Ethnomedicinal plants used to treat human ailments in the prehistoric place of Harla and Dengego valleys, eastern Ethiopia. *J. ethnobiol. Ethnomed.*; 10: 18.
- Belitz H.D., Grosch W., Schieberle P. (2009).** Coffee, tea, cocoa. In: *Food chemistry*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, pp 938-970.
- Bhupathiraju S.N., Pan A., Malik V.S., Manson J.E., Willett W.C., Van Dam R.M., Hu F.B. (2012).** Caffeinated and caffeine-free beverages and risk of type 2 diabetes. *Am. J. Clin. Nutr.*; 97:155-66.
- Bla K.B., Trebissou J.N.D., Bidie A.P., Assi Y.J., Zirih-Guede N., Djaman A.J. (2015).** Étude ethnopharmacologique des plantes antipaludiques utilisées chez les Baoulé- N'Gban de Toumodi dans le Centre de la Côte d'Ivoire. *J. Appl. Biosci.*; 85: 7775– 7783.
- Blois M.S. (1958).** Antioxidant determinations by the use of a stable Free Radical. *Nature*; 181: 1119-1200.
- Borges A., Saavedra M.J., Simões M. (2012).** The activity of ferulic and gallic acids in biofilm prevention and control of pathogenic bacteria. *Biofouling*; 28: 755-767.
- Boros B., Jakabová S., Dörnyei Á., Horváth G., Pluhár Z., Kilár F., Felinger A. (2010).** Determination of polyphenolic compounds by liquid chromatography–mass spectrometry in *Thymus* species. *J. Chromatogr. A*; 1217: 7972-7980.
- Brunet S., Jackson F., Hoste H. (2008).** Effects of sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) extract and monomers of condensed tannins on the association of abomasal nematode larvae with fundic explants. *International J. Parasitol.*; 38: 783-790.

- Bruneton J. (1993).** Plantes Médicinales: Phytochimie, Pharmacognosie. 2 ème Ed. Lavoisier, New York, pp 914-915.
- Bruneton J., (1999).** Les tanins. Ed. Edition médicales internationales. Paris, 369-404.
- Campa C., Mondolot L., Rakotondravao A., Bidet L.P., Gargadennec A., Couturon E., La Fisca P., Rakotomalala J.J., Jay-Allemand C., Davis A.P. (2012).** A survey if mangiferin and hydroxycinnamic acid ester accumulation in coffee (coffea) leaves biological implications and uses. *Ann. Bot.*; 110: 595-613.
- Cano-Marquina A., Tarín J. J., Cano A. (2013).** The impact of coffee on health. *Maturitas*; 75:7-21.
- Cardenas C., Quesada A.R., Medina M.A. (2011).** Anti-angiogenic and anti-inflammatory properties of kahweol, a coffee diterpene. *Plos one*; 6: 23-07.
- Cavin C., Holzhaeuser D., Scharf G., Constable A., Huber W.W., Schilter B. (2002).** Cafestol and kahweol, two coffee specific diterpenes with anticarcinogenic activity. *Food Chem. Toxicol.*; 40: 1155-1163.
- Chandran H., Meena M., Barupal T., Sharma K. (2020).** Plant tissue culture as a perpetual source for production of industrially important bioactive compounds. *Biotechnol. Rep.*; 26:e00450.
- Cheng Z., Ren J., Li Y., Chang W., Chen Z. (2002).** Study on the multiple mechanisms underlying the reaction between hydroxyl radical and phenolic compounds by qualitative structure and activity relationship. *Bioorg. Med. Chem.*; 10: 4067-4073.
- Chira K., Suh J., Saucier C., Teissedre P.L. (2008).** Les polyphénols du raisin. *Phytothérapie*; 6: 75-82.
- Chu Y.F. (2012).** Coffee: emerging health effects and disease prevention. John Wiley & Sons, Inc and Institute of Food Technologists, USA, pp 59.
- Clifford M.N., Willson K.C. (1985).** Coffee: Botany, Biochemistry and Production of Beans and Beverage, Croom Helm, London, pp 305–374.
- Clinical Laboratory Standards Institute-CLSI. (2009).** Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically; Approved standard. CLSI document. M07-A8. Clinical and Laboratory Standards Institute: Wayne, PA.
- Coltro L., Mourad A., Oliveira P., Baddini J., Kletecke R. (2006).** Environmental Profile of Brazilian Green Coffee (6 pp). *Int. J. Life. Cycle. Assess.*; 11: 16-21.

- Cowan M.M. (1999).** Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clin. Microbiol. Rev.*; 12: 564-582.
- Cushnie T.P., Lamb A.J. (2005).** Antimicrobial activity of flavonoids. *Int. J. Antimicrob. Agents.*; 26: 343-356.
- D'Archivio M., Filesì C., Di Benedetto R., Gargiulo R., Giovannini C., Masella R. (2007).** Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Ann. Ist. Super. Sanità*; 43: 348-361.
- Da Re S., Ploy M.C. (2012).** Antibiotiques et réponse SOS bactérienne. *Med. Sci. (Paris)*; 28: 179-184.
- Daglia M., Tarsi R., Papetti A., Grisoli P., Dacarro C., Pruzzo C., Gazzani G. (2002).** Antiadhesive effect of green and roasted coffee on *Streptococcus mutans* adhesive properties on saliva-coated hydroxyapatite beads. *J. Agric. Food Chem.*; 50: 1225-9.
- Daniel A., Workneh M. (2017).** Determination of total phenolic content and antioxidant activities of five different brands of Ethiopian coffee. *Int. J. Food Nutr. Res.*; 1:2.
- Dasmalchi K., Dorman H.J.D., Vuorela H., Hilttunen R. (2007).** Plants as potential sources for drug development against Alzheimer's disease. *Int. J. Biomed. Pharm. Sci.*; 1: 83-104.
- Desmier T. (2016).** Les Antioxydants De Nos Jours : Définition Et Applications. Thèse Présentée en vue de l'obtention pour le diplôme d'état de docteur en pharmacie. Université de Limoges, pp 36.
- Dieng S.I.M., Fall A.D., Diatta-Badji K., Sarr A., Sene M., Sene M., Mbaye A., Diatta W., Bassene E. (2017).** Evaluation de l'activité antioxydante des extraits hydro-ethanoliques des feuilles et écorces de *Piliostigma thonningii* Schumach. *Int. J. Biol. Chem. Sci.*; 11: 768-776.
- Djeridane A., Yousfi M., Brunel J.M., Stocker P. (2010).** Isolation and characterization of a new steroid derivative as a powerful antioxidant from *Cleome arabica* in screening the in vitro antioxidant capacity of 18 Algerian medicinal plants. *Food Chem. Toxicol.*; 48: 2599-2606.
- Dong W., Tan L., Zhao J., Hu R., Lu M. (2015).** Characterization of Fatty Acid, Amino Acid and Volatile Compound Compositions and Bioactive Components of Seven Coffee (*Coffea robusta*) Cultivars Grown in Hainan Province, China. *Molecules*; 20: 16687-708.
- Ebrahimi N.S., Hadian J., Mirjalili M.H., Sonboli A., Yousefzadi M. (2008).** Essential oil composition and antimicrobial activity of *Thymus caramanicus* at different phenological stages. *Food Chem.*; 110: 927- 931.

- El Ghmari A., Latrache H., Hamadi F., El Louali M., El Bouadili A., Hakkou Bourlioux A. (2002).** Influence of surface cell structures on physicochemical properties of *Escherichia coli*. *New Microbiol.*; 25:173-178.
- Elfazazi K., Zahir H., Tankiouine S., Zanane C., Ellouali M., Latrache H. (2018).** Microbial Adhesion of Salmonella Muenster, Salmonella Kentucky, Salmonella Newport and Salmonella Kiel: Effect of Ionic Strength on Physicochemical Surface Properties. *Annu. Res. Rev. Biol.*; 27: 1-10.
- Ellingsen T., Aune O., Berge A., Kilaas L., Schmid R., Stenstad P., Ugelstad J., Hagen S., Weng E., Johansen L. (1993).** Monosized polymer particles in biochemical and biomedical separations. *Makromol. Chem. Macromol. Symp.*; 70/71: 315-326.
- Espinel-Ingroff A. (2007).** Standardized disk diffusion for yeasts. *Clin. Microbiol. Newsl.*; 29: 97-100.
- F.A.O. (2005).** Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO corporate document repository. Arabica coffee manual for Lao PDR. Available from: <http://www.fao.org/docrep/008/ae939e/ae939e00.htm>.
- Fábio J.M.N., Ivaldo I.J., Felipe K.S., Philip J.M., Humberto R.B., Francisco R.A.N., Rodrigo O.M.A., Claudia M.R. (2018).** Lipase-catalysed esters synthesis of cafestol and kahweol. *Food Chem.*; 259: 226-233.
- Falleh H., Ksouri R., Chaieb K., Karray-Bouraoui N., Trabelsi N., Boulaaba M., Abdelly C. (2008).** Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. *C. R. Biol.*; 331: 372-379.
- Farah A. (2012).** Coffee constituents. In: *Coffee: Emerging Health Effects and Disease Prevention*. 1st ed. Edited by Yi-Fang Chu. John Wiley and Sons; New Jersey, pp 21-58.
- Farnsworth N.R., Akerele O., Bingel A.S., Soejarto D.D., Guo Z. (1986).** Place des plantes médicinales dans la thérapeutique. *Bull. World Health Organ.*; 64: 159.
- Favier A. (2003).** Le stress oxydant Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *Actual. Chim.*; 108-115.
- Favier A. (2006).** Stress oxydant et pathologies humaines Oxidative stress in human diseases. *Ann. Pharm. Fr.*; 64: 390-396.

- Finotello C., Forzato C., Gasparini A., Mammi S., Navarini L., Schievano E. (2017).** NMR quantification of 16-O-methylcafestol and kahweol in *Coffea canephora* var. *robusta* beans from different geographical origins. *Food Control.*; 75: 62-69.
- Fraga C.G., Oteiza P.I. (2011).** Dietary flavonoids: Role of (-)-epicatechin and related procyanidins in cell signaling. *Free Radic. Biol. Med.*; 51: 813–823.
- Gauthier C., Legault J., Girard-Lalancette K. (2009).** Haemolytic activity, cytotoxicity and membrane cell permeabilization of semi-synthetic and natural lupane- and oleanane-type saponins. *Bioorg. Med. Chem.*; 17: 2002-2008.
- Ghedira K. (2005).** Les flavonoïdes: structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie*; 4: 162-169.
- Giral P., Jacob N., Dourmap C., Hansel B., Carrié A., Bruckert E., Girerd X., Chapman M.J. (2008).** Elevated gamma- glutamyltransferase activity and perturbed thiol profile are associated with features of metabolic syndrome. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*; 28: 587-593.
- Gomez C., Dussert S., Hamon P., Hamon S., de Kochko A., Poncet V. (2009).** Current genetic differentiation of *Coffea canephora* Pierre ex A. Froehn in the Guineo- Congolian African zone: cumulative impact of ancient climatic changes and recent human activities. *BMC Evol. Biol.*; 9:167.
- Gómez-Ruiz J.A., Lake D.S., Ames J.M. (2007).** In vitro antioxidant activity of coffee compounds and their metabolites. *J. Agric. Food Chem.*; 55: 6962-6969.
- González-Segovia R., Quintanar J.L., Salinas E., Ceballos-Salazar R., Aviles-Jiménez F., Torres-López J. (2008).** Effect of the flavonoid quercetin on inflammation and lipid peroxidation induced by *Helicobacter pylori* in gastric mucosa of guinea pig. *J. Gastroenterol.*; 43: 441-447.
- Guéry B., Grandbastien B., Rabaud C. (2008).** Computerized list and multiresistant bacteria epidemic. *Med. Mal. Infect.*; 38: 564-565.
- Guettaf S., Abidli N., Kariche S., Bellebcir L., Bouriche H. (2016).** Phytochemical screening and antioxidant activity of aqueous extract of *Genista Saharæ* (Coss. & Dur.). *Pharm. Lett.*; 8: 50-60.
- Guignard J.L., (1996).** Abrégé de biochimie végétale, Ed. Masson, Paris, pp 160.

- Haddoudi M., Mellouk H., Bejjany B., Dani A., Digua K. (2014).** Valorisation du marc du café: extraction de l'huile et évaluation de son activité antioxydante. *Les technologies de laboratoire*, 8: 29-37.
- Haleng J., Pincemail J., Defraigne J.O., Chapelle J.P. (2007).** Le stress oxydant. *Rev. Med. Liege*; 62: 628-38.
- Haler P.N.G. (2013).** Le café : les effets bénéfiques et néfastes sur la santé. Thèse de Doctorat en Pharmacie. Université de Lorraine- Luxembourg, pp. 42-48.
- Hamadi F., Latrache H. (2008).** Comparison of contact angle measurement and microbial adhesion to solvents for assaying electron donor-electron acceptor (Acid-Base) properties of bacterial surface. *Colloids Surf. B. Biointerfaces*; 65: 134-139.
- Harborne J.B., Williams C.A. (2000).** Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*; 55: 481-504.
- Hasan S., Singh K., Danisuddin M., Verma P.K., Khan A.U. (2014).** Inhibition of major virulence pathways of *Streptococcus mutans* by quercitrin and deoxynojirimycin: a synergistic approach of infection control. *PLoS ONE*; 9: e91736.
- Heim K.E., Tagliaferro A.R., Bobilya D.J. (2002).** Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J. Nutr. Biochem.*; 13: 572-584.
- Hirakawa N., Okauchi R., Miura Y., Yagasaki K. (2005).** Anti-Invasive Activity of Niacin and Trigonelline against Cancer Cells. *Biosci Biotechnol. Biochem.*; 69: 653-658.
- Howes M.J.R., Perry N.S.L., Houghton P.J. (2003).** Plants with traditional uses and activities, relevant to the management of Alzheimer's disease and other cognitive disorders. *Phytother. Res.*; 17: 1-18.
- Iacomino M., Weber F., Gleichenhagen M., Pistorio V., Panzella L., Pizzo E., Schieber A., d'Ischia M., Napolitano A. (2017).** Stable Benzacridine Pigments by Oxidative Coupling of Chlorogenic Acid with Amino Acids and Proteins: Toward Natural Product-Based Green Food Coloring. *J. Agric. Food Chem.*; 65: 6519-6528.
- Iserin P. (2001).** Larousse encyclopédie des plantes médicinales. Identification, préparation, soins. Dorling Kindersley Limited 2nd Edition (Londres), pp 11.
- Jeszka-Skowron M., Sentkowska A., Pyrzyńska K., De Peña M.P. (2016).** Chlorogenic acids, caffeine content and antioxidant properties of green coffee extracts: influence of green coffee bean preparation. *Eur. Food Res. Technol.*; 242: 1403-1409.

- Jeszka-Skowron M., Zgola-Grześkowiak K., Grześkowiak T. (2015).** Analytical methods applied for the characterization and the determination of bioactive compounds in coffee. *Eur. Food Res. Technol.*; 240: 19-31.
- Jimoh F.O., Adedapo A.A., Afolayan A.J. (2010).** Comparison of the nutritional value and biological activities of the acetone, methanol and water extracts of the leaves of *Solanum nigrum* and *Leonotis leonorus*. *Food Chem. Toxicol.*; 48: 964–971.
- Julkunen-Titto R., (1985).** Phenolic constituents in the levels of northern willows: Methods for precursors of clarified apple juice sediment. *J. Food Sci.*; 33: 254-257.
- Karamac M., Kosicska A., Pegg R.B. (2005).** Comparison of radical-scavenging activities for selected phenolic acids. *Pol. J. Food Nutr. Sci.*; 55:165-170.
- Kato M., Ochiai R. Kozuma K., Sato H. and Katsuragi Y. (2018).** Effect of Chlorogenic Acid Intake on Cognitive Function in the Elderly: A Pilot Study. *Evid. Based Complementary Altern. Med.*; 2018: 1-8.
- Keidel A., von Stetten D., Rodrigues C., Máguas C., Hildebrandt P. (2010).** Discrimination of green arabica and Robusta coffee beans by Raman spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.*; 58: 11187–92.
- Kelly E.H., Anthony R.T., Dennis J.B. (2002).** Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J. Nutr. Biochem.*; 13: 572-584.
- Khan H. (2014).** Medicinal Plants in Light of History: Recognized Therapeutic Modality. *J. Evid. Based Complementary Altern. Med.*; 19: 216-219.
- Khanbabaee K., van Ree T. (2001).** Tannins: classification and definition. *Nat. Prod. Rep.*; 18: 641–649.
- Khoo H.E., Azlan A., Tang S.T., Lim S.M. (2017).** Anthocyanidins and anthocyanins: colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits. *Food Nutr. Res.*; 61:1361779.
- Koehlin-Ramonatxo C. (2006).** Oxygène, stress oxydant et suppléments antioxydantes ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires. *Nutr. Clin. Metabol.*; 20: 165-177.
- Kohanski M.A., DePristo M.A., Collins J.J. (2010).** Sublethal antibiotic treatment leads to multidrug resistance via radical-induced mutagenesis. *Mol. Cell.*; 37: 311–320.

- Kohen R., Nyska A. (2002).** Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol. Pathol.*; 30: 620–650.
- Ksouri R., Megdiche W., Falleh H., Trabelsi N., Boulaaba M., Smaoui A., Abdelly C. (2008).** Influence of biological, environmental and technical factors on phenolic content and antioxidant activities of Tunisian halophytes. *C. R. Biol.*; 331: 865-873.
- Kwon S.H., Lee H.K., Kim J.A., Hong S.I., Kim H.C., Jo T.H., Park Y.I., Lee C.K., Kim Y.B., Lee S.Y. (2010).** Neuroprotective effects of chlorogenic acid on scopolamine-induced amnesia via anti-acetylcholinesterase and anti-oxidative activities in mice. *Eur. J. Pharmacol.*; 649: 210-217.
- Lacolley P., Babuty D., Boulanger C., Ghaleh B., Loirand G., Pinet F., Samuel J.L. (2007).** Biologie et pathologie du cœur et des vaisseaux. Edition John Libbey Eurotext, Paris, pp 312 , 316 , 317.
- Laguerre M., López-Giraldo L.J., Lecomte J., Pina M., Villeneuve P. (2007).** Outils d'évaluation in vitro de la capacité antioxydante. *OCL.*; 14: 278-292.
- Lam L.k., Yee C., Chung A., Wattenberg L.W. (1985).** Use of silver nitrate impregnated silica cartridges in the separation of kahweol and cafestol esters by preparative liquid chromatography. *J. Chromatogr.*; 328: 422-424.
- Lambard Ch. (2003).** Le café de la terre à la tasse». Centre de Caféologie, Bordeaux, 2003.
- Lee J.H., Park J.H., Cho H.S., Joo S.W., Cho M.H., Lee J. (2013).** Antibiofilm activities of quercetin and tannic acid against *Staphylococcus aureus*. *Biofouling*; 29: 491-499.
- Lee J.Y., Cho P.Y., Kim T.Y., Kang S.Y, Song K.Y., Hong S.J. (2002).** Hemolytic activity and developmental expression of pore-forming peptide, clonorin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*; 296: 1238-1244.
- Lee K.J., Choi J.H., Jeong H.G. (2007).** Hepatoprotective and antioxidant effects of the coffee diterpènes kahweol and Cafestol on carbon tetrachloride induced liver damage in mice. *Food Chem. Toxicol.*; 45: 2118-2125.
- Léger C.L. (2006).** Anti-oxydants d'origine alimentaire: diversité, modes d'action antioxydante, interactions. *OCL.*; 13: 59-69.

- Leopoldini M., Russo N., Toscano M. (2011).** The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. *Food Chem.*; 125: 288–306.
- Lim T.K. (2013).** *Coffea canephora*. In *Edible Medicinal And Non-Medicinal Plants*. Springer, Netherlands, pp 680-709.
- Lukitasari M., Nugroho D. A., Widodo N. (2018).** Chlorogenic Acid: The Conceivable Chemosensitizer Leading to Cancer Growth Suppression. *J. Evid. Based Integr. Med.*; 23: 2515690X18789628.
- Maggi F., Bramucci M., Cecchini C., Coman M.M., Cresci A., Cristalli G., Lupidi G., Papa F., Quassinti L., Sagratini G., Vittori S. (2009).** Composition and biological activity of essential oil of *Achillea ligustica* All. (Asteraceae) naturalized in central Italy: Ideal candidate for anticariogenic formulations. *Fitoterapia*; 80: 313-319.
- Malhotra R., Dhawan B., Garg B., Shankar V., Nag T.C. (2019).** A comparison of bacterial adhesion and biofilm formation on commonly used orthopaedic metal implant materials: an in vitro study. *Indian J. Orthop.*; 53: 148-153.
- Maoka T. (2020).** Carotenoids as natural functional pigments. *J. Nat. Med.*; 74: 1-16.
- Marco G.J. (1968).** A rapid method for evaluation of antioxidants. *J. Am. Oil Chem. Soc.*; 45: 594-598.
- Martins H.F.P., Leal J.P., Fernandez M.T. (2004).** Toward the Prediction of the Activity of Antioxidants: Experimental and Theoretical Study of the Gas-Phase Acidities of Flavonoids. *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.*; 15: 848-861.
- Marx B., Scuvée É., Scuvée-Moreau J., Seutin V., Jouret F. (2016).** Mécanismes de l'effet diurétique de la caféine. *Med. Sci.*; 32: 485-490.
- Matos M., Santana L., Uriarte E., Abreu O., Molina Pérez E., Yordi E. (2015).** Coumarins — An Important Class of Phytochemicals, pp 113-140.
- Mazzafera P. (1991).** Trigonelline in coffee. *Phytochemistry*; 30: 2309– 2310.
- Melzig M.F., Bader G., Loose R. (2001).** Investigations of the mechanism of membrane activity of selected triterpenoid saponins. *Planta. Med.*; 67:43-48.
- Migdal C., Serres M. (2011).** Espèces réactives de l'oxygène et stress oxydant. *Med. Sci. (Paris)*; 27: 405-412.
- Miliauskas G., Venskutoni P.R., Van Beek T.A. (2004).** Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food chem.*; 85: 231-237.

- Mouly A. (2008).** Systématique de la tribu des Ixoreae A. Gray (Rubiaceae): phylogénie, biogéographie et taxinomie. *Acta Bot. Gall.*; 155: 457-464.
- Mueller-Harvey I. (2006).** Unravelling the conundrum of tannins in animal nutrition and health. *J. Sci. Food Agric.*; 86: 2010-2037.
- Murthy P.S., Naidu M.M. (2012).** Sustainable management of coffee industry by-products and value addition—a review. *Resour. Conserv. Recycl.*; 66: 45–58.
- Murugan R., Parimelazhagan T. (2014).** Comparative evaluation of different extraction methods for antioxidant and anti-inflammatory properties from *Osbeckia parvifolia* Arn.—An *in vitro* approach. *J. King Saud Univ. Sci.*; 26: 267-275.
- N’Guessan K., Kadja B., Zirihi G.N., Traoré D., Aké-Assi L. (2009).** Screening phytochimique de quelques plantes médicinales ivoiriennes utilisées en pays Kroubo (Agboville, Côte-d’Ivoire). *Sci. Nat.*; 6 : 1-15.
- National Clinical Committee Laboratory Standards-NCCLS. (2006).** Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; Approved Standard Ninth Edition; 26-M2-A9.
- Ngamsuk S., Huang T.C., Hsu J.L. (2019).** Determination of Phenolic Compounds, Procyanidins, and Antioxidant Activity in Processed *Coffea arabica* L. Leaves. *Foods*; 8. doi: 10.3390/foods8090389.
- Niaz K., Khan F. (2020).** Chapter 3 - Analysis of polyphenolics. In Sanches Silva A., Nabavi S.F., Saeedi M., Nabavi S.M. (Eds.), *Recent Advances in Natural Products Analysis*: Elsevier, pp. 39-197.
- Nostro A., Germano M.P., D’angelo V., Marino A., Cannatelli M.A. (2000).** Extraction methods and bioautography for evaluation of medicinal plant antimicrobial activity. *Lett. Appl. Microbiol.*; 30: 379-384.
- Novaes F.J.M. (2018).** Coffee Diterpenes: before Harvesting the Bean to your Cup. *Nutri. Food Sci. Int. J.*; 7: doi: 10.19080/nfsij.2018.07.555706.
- O.M.S. (2003).** Rapport sur la Santé dans le Monde. https://www.who.int/whr/2003/en/whr03_fr.pdf?ua=1.
- O.M.S. (2012).** World health statistics. www.who.int.

- O’Gara J.P. (2007).** ica and beyond: bioflm mechanisms and regulation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol. Lett.*; 270: 179-188.
- Ouedraogo Y., Nacouima O., Guisson I.P., Guede guina F.J. (2001).** Evaluation in vivo et in vitro de la toxicité des extraits aqueux d'écorces de tiges et de racines de *Mitragyna inermis* (wilid).o.(rubiaceae). *Pharm.med.tra.Alr.*; 1: 3-29.
- Ouyang J., Sun F., Feng W., Sun Y., Qiu X., Xiong L., Liu Y., Chen Y. (2016).** Quercetin is an effective inhibitor of quorum sensing, bioflm formation and virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Appl. Microbiol.*; 120: 966-974.
- Oyaizu M. (1986).** Study on products of browning reactions: Antioxidative activities of browning reaction prepared from glucosamine. *JPN. J. Nutr.*; 44: 307-315.
- Parras P., Martinez-Tomé M., Jiménez A. M., Murcia M. A. (2007).** Antioxidant capacity of coffees of several origins brewed following three different procedures. *Food Chem.*; 102: 582–592.
- Pasdeloup Grenez E. (2018).** Phytothérapie - exemples de pathologies courantes à l’officine : Fatigue, Insomnie, Stress, Constipation, Rhume, Douleur et Inflammation. thèse pour le diplôme d'état de docteur en pharmacie. Université de Lille, pp 38, 45, 46.
- Patay E.B., Bencsik T., Papp N. (2016a).** Phytochemical overview and medicinal importance of *Coffea* species from the past until now. *Asian Pac. J. Trop. Med.*; 9: 1127-1135.
- Patay E.B., Németh T., Németh T.S., Filep R., Vlase L., Papp N. (2016b).** Histological and phytochemical studies of *Coffea benghalensis* B. Heyne ex Schult, compared study with *Coffea arabica* L. *Farmacia*; 64: 125-130.
- Patay E.B., Sali N., Koszegi T., Csepregi R., Balázs V.L., Németh T.S., Németh T., Papp N. (2016c).** Antioxidant potential, tannin and polyphenol contents of seed and pericarp of three *Coffea* species. *Asian Pac. J. Trop. Med.*; 9: 366-371.
- Pawel G., Krzysztof D., Aleksander S., Jolanta T., Michał M., Krzysztof P. (2015).** Contribution of phenolic acids isolated from green and roasted boiled-type coffee brews to total coffee antioxidant capacity. *Eur. Food Res. Technol.*; 233: 258–264.
- Pietta P.G. (2000).** Flavonoids as antioxidants. *J. Nat. Prod.*; 63: 1035-1042.

- Pincemail J., Degrune F., Voussure S., Malherbec C., Paquotd N., Defraigne J.O. (2007).** Effet d'une alimentation riche en fruits et légumes sur les taux plasmatiques en antioxydants et des marqueurs des dommages oxydatifs. *Nutr. Clin. Metab.*; 21: 66-75.
- Prieto P., Pineda M., Aguilar M. (1999).** Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Anal. Biochem.*; 269: 337-341.
- Rafael-Carlos E.D., Fernanda G.C., Luiz G.E.V., Lucia P.F., David P., Pierre M., Marta T.B. (2010).** Evaluation of Kahweol and Cafestol in Coffee Tissues and Roasted Coffee by a New High-Performance Liquid Chromatography Methodology. *J. Agric. Food Chem.*; 58: 88-93.
- Rakatama A. S., Pramono A., Yulianti R. (2018).** The Antifungal Inhibitory Concentration Effectiveness Test from Ethanol Seed Arabica Coffee (*Coffea arabica*) Extract Against the Growth of *Candida albicans* Patient Isolate With In Vitro Method. *J. Phys. Conf.*; 970.
- Rakotonanahary M. (2012).** Thèse présentée pour l'obtention du titre de docteur en pharmacie diplôme d'état. Université Joseph Fourier, pp 16, 19, 27, 28.
- Rambhade S., Chakarborty A., Shrivastava A., Patil U.K., Rambhade A. (2012).** A survey on polypharmacy and use of inappropriate medications. *Toxicol. Int.*; 19: 68-73.
- Rauha J.P., Remes S., Heinonen M., Hopia A., Kähkönen M., Kujala T., Pihlaja K., Vuorela H., Vuorela P. (2000).** Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. *Int. J. Food Microbiol.*; 56: 3-12.
- Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C. (1999).** Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Bio. Med.*; 26: 1231-1237.
- Rhee K., Van de Meent M., Ingkaninan K., Verpoorte R. (2001).** Screening for Acetylcholinesterase Inhibitors Using Silica Gel Chromatography in Combination with Bioactive Staining. *J. Chromatogr. A.*; 915: 217-223.
- Ribeiro D.E., Borem F.M., Cirillo M.A., Prado M.V.B., Ferraz V.P., Alves H.M.R., Taveira J.H.S. (2016).** Interaction of genotype, environment and processing in the chemical composition expression and sensorial quality of Arabica coffee. *Afr. J. Agric. Res.*; 11: 2412 - 2422.
- Ribeiro J.A., Sebastiao A.M. (2010).** Caffeine and adenosine. *J. Alzheimers dis.*; 20: 3-15.

- Ritu M., Nisha K. (2018).** Phytochemical Analysis And Antimicrobial Activity Of Roasted Beans Of Coffea Robusta. *Int. J. Pharm. Biol. Sci.*; 8: 89-95.
- Robards K., Prenzler P.D., Tucker G., Swatsitang P., Glover W. (1999).** Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chem.*; 66: 401-436.
- Robbrecht E. (1988).** Tropical woody Rubiaceae: characteristic features and progressions. Contribution to a new subfamilial classification. *Opera Bot. Belg.*; 1:1-271.
- Ross I.A. (2005).** *Coffea arabica* L. In: Medicinal plants of the world, New Jersey, *Humana Press Inc.*; 3: 155-195.
- Rouessac F., Rouessac A., Cruché D. (2004).** Analyse Chimique, Méthodes et techniques instrumentales modernes, 6ème édition. Dunod, Paris, France, pp 175- 197.
- Rubayiza A.B., Meurens M. (2005).** Chemical discrimination of arabica and robusta coffees by Fourier transform Raman spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.*; 53: 4654-9.
- Sagdiç O., Kuscu A., Ozcan M., Ozcelik S. (2002).** Effects of Turkish spice extracts at various concentrations on the growth of Escherichia coli O157: H7. *Food Microbiol.*; 19: 473-480.
- Sarr S.O., Fall A.D., Gueye R., Diop A., Diatta K., Diop N., NDiaye B., Diop Y.M. (2015).** Etude de l'activité antioxydante des extraits des feuilles de Vitex doniana (Verbenaceae). *Int. J. Biol. Chem. Sci.*; 9: 1263-1269.
- Sawai S., Akashi T., Sakurai N., Suzuki H., Shibata D., Ayabe S.i., Aoki T. (2006).** Plant Lanosterol Synthase: Divergence of the Sterol and Triterpene Biosynthetic Pathways in Eukaryotes. *Plant Cell Physiol.*; 47: 673-677.
- Schroeter H., Boyd C., Spencer J.P., Williams R.J., Cadenas E., Rice-Evans C. (2002).** MAPK signaling in neurodegeneration: influences of flavonoids and of nitric acid. *Neurobiol. Aging*; 23:861–80.
- Siddhuraju P., Becker K. (2007).** The antioxidant and free radical scavenging activities of processed cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) seed extracts. *Food Chem.*; 101: 10-19.
- Silva R.O., Sousa F.B.M., Damasceno S.R.B., Carvalho N.S., Silva V.G., Oliveira F.R. M.A., Souza D.P., Aragão K.S., Barbosa A.L.R., Freitas R.M., Medeiros J.V.R. (2014).** Phytol, a diterpene alcohol, inhibits the inflammatory response by reducing cytokine production and oxidative stress. *Fund. Clin. Pharmacol.*; 28: 455-464.

- Sivanandham V. (2011).** Free radicals in health and diseases-a mini review. *Pharmacol. Onl.*; 1: 1062-1077.
- Solange I.M., Ercília M.S.M., Silvia M., José A.T. (2011).** Production, Composition, and Application of Coffee and Its Industrial Residues. *Food Bioprocess Tech.*; 4: 661- 672.
- Souard F., Delporte C., Stoffelen P., Thévenot E.A., Noret N., Dauvergne B., Kauffmann J.M., Van Antwerpen P., Stévigny C. (2018).** Metabolomics fingerprint of coffee species determined by untargeted-profiling study using LC-HRMS. *Food Chem.*; 245: 603–612.
- Souza R.M.N., Benassi M.T. (2012).** Discrimination of commercial roasted and ground coffees according to chemical composition. *J. Braz. Chem. Soc.*; 23: 1347-1354.
- Speer K., Kölling-Speer I. (2006).** The lipid fraction of the coffee bean. *Braz. J. Plant Physiol.*; 18: 201-216.
- Spellberg B., Guidos R., Gilbert D., Bradley J., Boucher H.W., Scheld W.M., Bartlett J.G., Edwards J.Jr., American t. I. D. S. o. (2008).** The Epidemic of Antibiotic-Resistant Infections: A Call to Action for the Medical Community from the Infectious Diseases Society of America. *Clin. Infect. Dis.*; 46: 155-164.
- Stagos D., Portesis N., Spanou C., Mossialos D., Aligiannis N., Chaita E., Panagoulis C., Reri E., Skaltsounis L., Tsatsakis A.M., Kouretas D. (2012).** Correlation of total polyphenolic content with antioxidant and antibacterial activity of 24 extracts from Greek domestic *Lamiaceae* species. *Food Chem. Toxicol.*; 50: 4115-4124.
- Stojković D., Petrović J., Soković M., Glamočlija J., Kukić-Marković J., Petrović S. (2013).** In situ antioxidant and antimicrobial activities of naturally occurring caffeic acid, p -coumaric acid and rutin, using food systems. *J. Sci. Food Agric.*; 93: 3205-3208.
- Sun J.J., Fritz J.S. (1990).** Chemically modified resins for solid-phase extraction. *J. Chromatogr.*; 590: 95-99.
- Suzuki A., Fujii A., Yamamoto N., Yamamoto M., Ohminami H., Kameyama A., Shibuya Y., Nishizawa Y., Tokimitsu I., Saito I. (2006).** Improvement of hypertension and vascular dysfunction by hydroxyhydroquinone-free coffee in a genetic model of hypertension. *FEBS Lett.*; 580: 2317–2322.
- Suzuki A., Kagawa D., Ochiai R., Tokimitsu I., Saito I. (2002).** Green coffee bean extract and its metabolites have a hypotensive effect in spontaneously hypertensive rats. *Hypertens Res.*; 25: 99–107.

- Szydłowska-Czerniaka A., Dianoczki C., Recseg K., Karlovits G., Szlyk E. (2008).** Determination of antioxidant capacities of vegetable oils by ferric-ion spectrophotometric methods. *Talanta*; 76: 899-905.
- Tabart J., Kevers C., Pincemail J., Defraigne J., Dommes J. (2009).** Comparative antioxidant capacities of phenolic compounds measured by various tests. *Food Chem.*; 113: 1226-1233.
- Tan S., Dong X., Liu D.D., Hao S., He F. (2019).** Anti-tumor activity of chlorogenic acid by regulating the mTORC 2 signaling pathway and disrupting F-actin organization. *Int. J. Clin. Exp. Med.*; 12: 4818-4828
- Tan S.Y., Chua S.L., Chen Y., Rice S.A., Kjelleberg S., Nielsen T.E., Yang L., Givskov M. (2013).** Identification of five structurally unrelated quorum sensing inhibitors of *Pseudomonas aeruginosa* from a natural-derivative database. *Antimicrob. Agents Chemother.*; 57: 5629-5641.
- Tantin E. (2016).** Effects of robusta coffee bean extract (*coffea robusta*) on the viability of neutrophils exposed by *porphyromonas gingivalis*. *ICMHS.*; 37:169-172.
- Taviano M.F., Marino A., Trovato A., Bellinghieri V., Melchini A., Dugo, P., Cacciola F., Donato P., Mondello L., Güvenç A., De Pasquale R., Miceli, N. (2013).** *Juniperus oxycedrus* L. subsp. *oxycedrus* and *Juniperus oxycedrus* L. subsp. *macrocarpa* (Sibth. & Sm.) Ball. “berries” from Turkey: Comparative evaluation of phenolic profile, antioxidant, cytotoxic and antimicrobial activities. *Food Chem. Toxicol.*; 58: 22-29.
- Treml J., Šmejkal K. (2016).** Flavonoids as Potent Scavengers of Hydroxyl Radicals. *Compr. Rev. Food Sci. F*; 15: 720-738.
- Tremolieres F. (2010).** Quand le miracle antibiotique vire au cauchemar. *Med. Sci.*; 26: 925–929.
- Ulanowska K., Tkaczyk A., Konopa G., Węgrzyn G. (2006).** Differential antibacterial activity of genistein arising from global inhibition of DNA, RNA and protein synthesis in some bacterial strains. *Arch. Microbiol.*; 184: 271-278.
- Upton T.M., Grayer R.J., Greenham J.R., Williams C.A., Al-Ghamdi F., Chen F. (2000).** Leaf flavonoids as systematic characters in the *Genera lavandula* and *Sabaudia*. *Biochem. Syst. Ecol.*; 28: 991–1007.

- Van Oss C.J. (1997).** Hydrophobicity and hydrophilicity of biosurfaces. *Curr. Opin in Colloid Int. Sci.*; 2:503-512.
- Van Oss C.J. (1993).** Acid-base interfacial interactions in aqueous media. *Colloid. Surface. A*; 78:1-49.
- Van Oss C.J. (1995).** Hydrophobicity of biosurfaces-origin, quantitative determination and interaction energies. *Colloids Surf. B. Biointerfaces*; 5: 91-110.
- Vazquez-Armenta F.J., Bernal-Mercado A.T., Tapia-Rodriguez M.R., Gonzalez-Aguilar G.A., Lopez-Zavala A.A., Martinez-Tellez M.A., Hernandez-Onate M.A., Ayala-Zavala J.F. (2018).** Quercetin reduces adhesion and inhibits biofilm development by *Listeria monocytogenes* by reducing the amount of extracellular proteins. *Food Control*; 90: 266-273.
- Vermerris W., Nicholson R. (2006).** Isolation and identification of phenolic compounds biochemistry, published by Springer, Dordrecht, pp 35-62-151-191.
- Vinutha B., Prashanth D., Salma K., Sreeja S.L., Pratiti D., Padmaja R., Radhika S., Amit A., Venkateshwarlu K., Deepak M. (2007).** Screening of selected Indian medicinal plants for acetylcholinesterase inhibitory activity. *J. Ethnopharmacol.*; 109: 359-363.
- Wermelinger T., D'Ambrosio L., Klopprogge B., Yeretziyan C. (2011).** Quantification of the Robusta fraction in a coffee blend via Raman spectroscopy: proof of principle. *J. Agric. Food Chem.*; 59: 9074-9.
- Wijaya W., Ridwan R. D., Budi H. S. (2016).** Antibacterial ability of arabica (*Coffea arabica*) and robusta (*Coffea canephora*) coffee extract on *Lactobacillus acidophilus*. *Dent. J.*; 49: 99-103.
- Williams P.J., Strauss C.R., Wilson B., Massy-Westropp R.A. (1982).** Novel monoterpene disaccharide glycosides of *Vitis vinifera* grapes and wines. *Phytochemistry*; 21 : 2013-2020.
- Wu T., Zang X., He M., Pan S., Xu X. (2013).** Structure-activity relationship of flavonoids on their anti-*Escherichia coli* activity and inhibition of DNA gyrase. *Food chem.*; 61: 8185-8190.
- Yamashita K., Tanaka T., Hayashi M. (2005).** Use of isopropyl alcohol as a solvent in Ti(O-i-Pr)₄-catalyzed Knöevenagel reactions. *Tetrahedron*; 61: 7981-7985.
- Yazdanparast R., Ardestani A. (2007).** In vitro antioxidant and free radical scavenging activity of *Cyperus rotundus*. *J. Med. Food*; 10: 667-674.

- Yinyang J., Mpondo Mpondo E., Tchatat M., Ndjib R.C., Mvogo Ottou P.B., Dibong S.D. (2014).** Les plantes à alcaloïdes utilisées par les populations de la ville Douala (Cameroun). *J. Appl. Biosci.*; 78: 6600–6619.
- Yong G., Jiang W., Shengchao Z., Liqing L., Shiyi C., Naomie M., Kun J., Chulani H., Chao G., Hong X., Yanfeng Z., Xingyue S., Shanquan C., Yawen C., Tingting Y., Jing L., Yan Q., Sai H., Xiaoxv Y., Zuxun L. (2017).** Association of coffee consumption with risk of colorectal cancer: a meta-analysis of prospective cohort studies. *Oncotarget*; 8: 18699–18711.
- Yu L., Shang F., Chen X., Ni J., Yu L., Zhang M., Sun D., Xue T. (2018).** The anti-biofilm effect of silver-nanoparticle-decorated quercetin nanoparticles on a multi-drug resistant *Escherichia coli* strain isolated from a dairy cow with mastitis. *Peer J.*; 6: e5711.
- Yuan H., Ma Q., Ye L., Piao G. (2016).** The traditional medicine and modern medicine from natural products. *Molecules*; 21: 559.
- Zadernowski R., Czaplicki S., Naczka M. (2009).** Phenolic acid profiles of mangosteen fruits (*Garcinia mangostana*). *Food Chem.*; 112: 685-689.
- Zain M.Z.M., Shori A.B., Baba A.S. (2017).** Composition and Health Properties of Coffee Bean. *EJCBS.*; 3: 97-100.
- Złotek U., Karaś M., Gawlik-Dziki U., Szymanowska U., Baraniak B., Jakubczyk A. (2016).** Antioxidant activity of the aqueous and methanolic extracts of coffee beans (*Coffea arabica* L.). *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment.*; 15: 281-288.

ملخص

يركز هذا العمل على دراسة المكونات الكيميائية والأنشطة البيولوجية للمستخلصات المختلفة المستخرجة من البذور الخضراء لـ *Coffea arabica* و *Coffea canephora*. تم إجراء تحليل التركيب الكيميائي لمستخلصات البذور الخضراء لنبته *C. arabica* و *C. canephora* باستخدام الفصل الكروماتوجرافي عالي الاستبانة مع رسم البنية الكيميائية بأسلوب التصوير بالرنين المغناطيسي بالأشعة تحت الحمراء. تم تقييم نشاط مضادات الأكسدة بطرق تعتمد على نقل ذرة الهيدروجين و/أو نقل الإلكترون الفردي. كما تم تقدير النشاط المثبط لإنزيم الكولين استيراز بواسطة إنزيم أسيتيل كولين استيراز (AChE) وبيبتيريل كولي استيراز (BChE). تم تقييم النشاط المضاد للميكروبات للمستخلصات ضد السلالات البكتيرية والفطرية المختلفة من خلال تحديد الحد الأدنى للتركيز المثبط. كما تم اختبار تأثير عدم الالتصاق في الوقت صفر وبعد المعالجة المسبقة لليوليسترين مع جميع المستخلصات ضد ثلاث سلالات بكتيرية مرجعية. في الوقت نفسه، تم تحديد اختبار انحلال الدم للمستخلصات المختلفة ضد خلايا الدم الحمراء. أظهر التحليل الكروماتوجرافي عن وجود أحماض الفينول وحمض الهيدروكسيناميك والفلافونويد. كما سمح لنا التوصيف بواسطة الرنين المغناطيسي النووي والأشعة تحت الحمراء بتوضيح بنية Kahweol acétate و Caféine. تبين أن قدرة مضادات الأكسدة لمستخلص n-بيوتانول من البذور الخضراء لـ *C. arabica* و *C. canephora* عالية جدًا مع $IC_{50ABTS} = 3,96 \pm 0,08$ ميكروغرام / مل و $5,28 \pm 0,19$ ميكروغرام / مل على التوالي ومع $A_{0,5CUPRAC} = 4,09 \pm 0,36$ و $1,17 \pm 0,49$ ميكروغرام / مل. بالإضافة إلى ذلك، أظهرت جميع مستخلصات *C. arabica* و *C. canephora* تأثيرًا مثبطًا تجاه BChE والذي وصل إلى 40% و 13% على التوالي. أظهرت نتائج النشاط المضاد للميكروبات أن المستخلص الميثانولي و n-بيوتانول من *C. canephora* أظهرًا قوة كبيرة مضادة للجراثيم ضد *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 بتركيز يساوي 40 ميكروغرام / مل. بينما أظهر مستخلص n-بيوتانول من *C. arabica* نجاعته بتركيز أدنى مثبط يساوي 13,02 ميكروغرام / مل ضد *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 و *Citrobacter freundii* ATCC 8090. أظهر اختبار مقاومة الالتصاق أن جميع المستخلصات، باستثناء مستخلص أسيتات الإيثيل من *C. canephora*، تظهر تأثيرًا جيدًا مضادًا للالتصاق ضد *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 مع نسبة تثبيط التي تصل إلى 74% و 57% على التوالي. أخيرًا، أظهرت اختبارات انحلال الدم أن جميع المستخلصات ليست سامة ضد خلايا الدم الحمراء البشرية، باستثناء المستخلص الميثانولي من *C. canephora* و مستخلص أسيتات الإيثيل من *C. arabica*. **الكلمات المفتاحية:** *C. arabica*، *C. canephora*، الفصل الكروماتوجرافي عالي الاستبانة، التصوير بالرنين المغناطيسي، الأشعة تحت الحمراء، النشاط المضاد للأكسدة، التركيز الأدنى المثبط، البيبتيريل كولين استيراز، أسيتيل كولين استيراز.

Résumé

Ce travail se focalise sur l'étude *in-vitro* des activités biologiques de différents extraits à partir des graines vertes de *Coffea canephora* et *Coffea arabica*.

L'analyse de la composition chimique des extraits des graines vertes de *C. canephora* et *C. arabica* a été effectuée à l'aide d'une chromatographie liquide à haute performance RP-HPLC-PDA, RMN 1H , ^{13}C , 2D et l'infrarouge. L'activité antioxydante a été évaluée par des méthodes basées sur le transfert d'atome d'hydrogène et le transfert d'électron singulier. Alors que, l'inhibition du cholinestérase a été estimée par deux enzymes l'acétylcholinestérase (AChE) et la butyrylcholinestérase (BChE). L'évaluation de l'activité antimicrobienne des extraits vis-à-vis des différentes souches bactériennes et fongiques a été effectuée par la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI). L'effet antiadhésif au temps zéro et après prétraitement du polystyrène par de l'ensemble des extraits a été testé contre trois souches bactériennes de références. En parallèle, le test d'hémolyse des différents extraits a été déterminé vis-à-vis des globules rouges.

L'analyse chromatographique a mis en évidence la présence des acides phénoliques, des acides hydroxycinnamiques et des flavonoïdes. Ce pendant, la caractérisation par RMN et l'infrarouge nous ont permis d'élucider la structure de la Kahweol acétate et de la Caféine. Le potentiel antioxydant de l'extrait n-butanolique des graines vertes de *C. canephora* et *C. arabica* s'est montré très important avec des $IC_{50ABTS} = 3,96 \pm 0,08$ $\mu g/mL$ et $5,28 \pm 0,19$ $\mu g/mL$ respectivement et avec une $A_{0,5CUPRAC} = 4,09 \pm 0,36$ et $1,17 \pm 0,49$ $\mu g/mL$. De plus, tous les extraits de *C. arabica* et *C. canephora* ont révélé un effet inhibiteur vis-à-vis de la BChE qui atteint 40% et 13% respectivement. Les résultats de l'activité antimicrobienne a montré que l'extrait méthanolique et n-butanol de *C. canephora* présentent un pouvoir antibactérien important contre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 avec une CMI de 40 $\mu g/mL$. Alors que l'extrait n-butanol de *C. arabica* présente une bonne CMI vis-à-vis de *Citrobacter freundii* ATCC 8090, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (13,02 $\mu g/mL$). Le test d'antiadhésion a montré que l'ensemble des extraits mis à part l'extrait d'acétate d'éthyle de *C. canephora* présentent un bon effet antiadhésif vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 avec un pourcentage d'inhibition qui atteint 74% et 57% respectivement. Enfin les tests d'hémolyse ont montré que l'ensemble des extraits ne sont pas toxique vis-à-vis des globules rouges humains, à l'exception de la phase résiduelle de *C. canephora* et celui d'acétate d'éthyle de *C. arabica*.

Mots clés: *C. canephora*, *C. arabica*, RP-HPLC-PDA, RMN, Infrarouge, activité antioxydante, CMI, acétylcholinestérase, butyrylcholinestérase.

Abstract

This work is focused on the *in-vitro* study of the biological activities of various extracts from the green seeds of *Coffea canephora* and *Coffea arabica*.

The chemical compositions analysis of *C. canephora* and *C. arabica* green seeds extracts were carried out using the high performance liquid chromatography RP-HPLC-PDA, 1H , ^{13}C NMR, 2D and by infrared. Antioxidant activity was assessed using hydrogen atom and single electron transfer. Whereas, the cholinesterase inhibition was estimated by acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BChE) enzymes. The evaluation of the antimicrobial activity of the extracts against different bacterial and fungal strains was performed using the determination of the minimum inhibitory concentration (MIC). The anti-adhesion effect before and after pretreatment of polystyrene by the extracts was tested against three bacterial strains. The hemolysis test of the different extracts was determined against human blood cells. The chemical analysis showed the presence of phenolic acids, hydroxycinnamic acids and flavonoids. However, The NMR and FTIR spectroscopy allowed the characterization of Kahweol acetate and Caffeine.

The antioxidant potential of the n-butanol extract of *C. canephora* and *C. arabica* green seeds showed to be very high with $IC_{50ABTS} = 3,96 \pm 0,08$ $\mu g/mL$ and $5,28 \pm 0,19$ $\mu g/mL$ respectively and with an $A_{0,5CUPRAC} = 4,09 \pm 0,36$ and $1,17 \pm 0,49$ $\mu g/mL$. In addition, the all extracts of *C. canephora* and *C. arabica* showed a BChE inhibitory activity which can reach 13% and 40% respectively.

The results of the antimicrobial activity showed that the methanolic and n-butanol extract of *C. canephora* exhibited the effective antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 with MIC = 40 $\mu g/mL$. While the n-butanol extract of *C. arabica* exhibited a low MIC against *Citrobacter freundii* ATCC 8090 and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (13.02 $\mu g/mL$). The anti-adhesion activity showed that all of the extracts with the exception of the ethyl acetate extract of *C. canephora* exhibited a higher anti-adhesion effect against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. When, the hemolysis tests showed that all the extracts didn't have any toxic effect against human blood cells, with the exception of the residual phase of *C. canephora* and that of ethyl acetate extract of *C. arabica*.

Keywords: *C. canephora*, *C. arabica*, RP-HPLC-PDA, NMR, FTIR, antioxidant activity, MIC, acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase.