

**République Algérienne Démocratique et Populaire**



Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche  
Scientifique

Université Abou Bekr Belkaid Tlemcen

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la Terre et de  
l'Univers

Laboratoire Antibiotiques Antifongiques : physicochimie, synthèse et activité  
biologique

Département de Biologie

## **Mémoire**

Présenté en vue de l'obtention du Diplôme de

## **Master**

En Sciences Biologiques

Option : Biochimie Appliquée

## **Thème**

---

**Etude de l'activité antioxydante d'extraits des graines de café**

---

**Préparé par : Kara Zaitri Nihel et Nedjari Sihem**

<b>Président :</b>	<b>AZZI R.</b>	<b>MCA</b>	<b>Univ. Abou Bekr Belkaid Tlemcen</b>
<b>Examineur :</b>	<b>MEZOUAR D.</b>	<b>MCB</b>	<b>Univ. Abou Bekr Belkaid Tlemcen</b>
<b>Encadreur :</b>	<b>RAHMOUN M.N.</b>	<b>MCA</b>	<b>Univ. Abou Bekr Belkaid Tlemcen</b>

**Année universitaire : 2019 – 2020**

# Remerciements

La réalisation de ce mémoire a été possible grâce à **DIEU** Qui nous a donné la force et le courage de pouvoir réaliser ce travail.

Nous voudrions dans un premier temps remercier notre encadreur **Mr. RAHMOUN M.N.** Maitre de conférences classe 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 Abou Bakr Belkaid de Tlemcen, Vous nous avez toujours manifesté une amicale sollicitude votre disponibilité et surtout vos judicieux conseils. Qui nous soit permis de vous exprimer notre gratitude.

Nous remercions également **MrAZZI Rachid**, Maitre de conférences A à l'université Abou Bakr Belkaid de Tlemcen. Vous nous faites l'honneur de juger notre travail et de présider notre jury, soyez assuré de notre reconnaissance.

Nous désirons aussi remercier **Melle Mezouar Dounia**, Maitre de conférences B, à l'université Abou Bakr Belkaid de Tlemcen pour avoir acceptée d'être membre de ce jury et examiner ce modeste travail.

Nous tenons à remercier spécialement **Mr. AISSAOUI** doctorant en Biochimie à l'université Aboubekr Belkaïd Tlemcen, de nous avoir toujours accueillis avec bienveillance et de nous avoir aidés dans ce travail au cours de nos manipulations. Nous vous en remercions et vous prions d'accepter notre profonde estime.

Nous tenons à remercier toutes les personnes qui ont contribuées au succès de notre mémoire et qui nous ont aidés lors de sa rédaction.

Un grand merci à tous ceux qui ont contribués de près ou de loin à accomplir ce modeste travail.

# Dédicaces

Marcel Proust disait « Soyons reconnaissants aux personnes qui nous donnent du bonheur ; elles sont les charmants jardiniers par qui nos âmes sont fleuries »

Je dédie cette thèse A **mes parents** Aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices que vous avez consentis pour mon instruction et mon bien être. Je vous remercie pour tout le soutien et l'amour que vous me portez et j'espère que votre bénédiction m'accompagne toujours.

A **mes frères Reda et Abdelkarim** en témoignage de ma profonde affection et de ma reconnaissance pour tous les sacrifices qu'ils ont consentis pour moi. A **ma sœur Hiba** au cœur si grand en témoignage de mon affection, de ma profonde tendresse et reconnaissance, A **mon époux Riyadh** à qui je dois beaucoup la réalisation de ce travail Quand je t'ai connu, j'ai trouvé l'homme de ma vie, mon âme sœur et la lumière de mon chemin. Ma vie à tes cotés est remplie de belles surprises. Tes sacrifices, ton soutien moral, ta gentillesse sans égal, ton profond attachement m'ont permis de réussir mes études. **Ames beaux-parents** Autant de phrases et d'expressions aussi éloquents soient-elles ne sauraient exprimer ma gratitude et ma reconnaissance. A **mes belles sœurs Nesrine et Nassima et leurs maris** pour leurs encouragements permanents, et leur soutien moral. A **toutes mes chers nièces et neveux Younes, Ghizlaine, Inès, Rania Benali et mon petit bout de choux Lina** en témoignage de mon amour et ma profonde admiration. A **mes cousins Adel et Kouame** d'avoir été présent pour moi tout au long de ce mémoire. A **La mémoire de mes grands-parents** Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, L'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours eu pour eux. Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être. A **MES TANTES** en témoignage de l'attachement, de l'amour et de l'affection que je porte pour vous. En témoignage de toute mon amitié, je dédie ce travail à mon binôme **Sihem**.

**Nihel**

# Dédicaces

Merci **Allah** de m'avoir donné la capacité d'écrire et de réfléchir, la force d'y croire, la patience d'aller jusqu'au bout du rêve.

Du profond de mon cœur, je dédie ce modeste travail à tous ceux qui me sont chers :

**A l'homme**, mon précieux cadeau de dieu, à qui je dois la vie, ma réussite et tout mon respect : Mon cher père **Saïd**.

**A la femme** qui a souffert sans me laisser souffrir, la lumière de mes jours, la source de mes efforts, qui n'a jamais dit non à mes exigences et qui n'a épargné aucun effort pour me rendre heureuse. Quoi que je fasse ou que je dise, je ne saurai point te remercier comme il se doit : Mon adorable mère **Zoulikha**.

Que ce modeste travail soit l'exaucement de vos vœux tant formulés, le fruit de vos innombrables sacrifices, Puisse Dieu, le Très Haut, vous accorder santé, bonheur et longue vie.

A mon deuxième père **Mohamed** et sa femme tata **Nebia** qui n'ont pas cessés de me conseiller et encourager, aucune dédicace ne saurait exprimer mes sentiments, que dieu vous préserve et vous procure santé et longue vie.

A mes très chers frères : **Younes, Youcef, Ayoub** et mes belles sœurs **Fatiha, Ismahane, Nardjes** sans oublier mes petits neveux **Aicha et Bahae edine**, Puisse dieu vous donne santé, bonheur, courage et surtout réussite.

A ma grande sœur et ma deuxième mère **Imène** qui m'a toujours soutenu moralement et encouragée.

A tous les membres de ma famille : tante, oncle, cousin maternelle et paternelle. Que dieu leur donne une longue et joyeuse vie.

A mon cher binôme **Nihel** qui a partagé avec moi tout le travail et qui a supporté mon humeur au moment de stress ainsi que sa famille.

A tous ceux que j'aime et ceux qui m'aiment. A tous ceux qui ont contribués de près ou de loin pour que ce projet soit possible, je vous dis merci.

**Sihem**

# Table des Matières

<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>1</b>
<b>CHAPITRE 1 : La phytothérapie</b> .....	<b>4</b>
I. Les composés phénoliques .....	6
II. Les alcaloïdes .....	7
III. Les terpénoïdes .....	8
<b>CHAPITRE 2 : Stress oxydatif et dommages cellulaires</b> .....	<b>9</b>
I. Les radicaux libres .....	10
II. Le stress oxydant .....	11
II.1. Conséquences du stress oxydant .....	11
II.1.1. Oxydation de l'ADN .....	11
II.1.2. Oxydation des protéines .....	12
II.1.3. Peroxydation des lipides .....	12
III. Les antioxydants .....	12
IV. Exemples des plantes riches en antioxydants naturels .....	13
<b>CHAPITRE 3 : La plante <i>Coffea arabica</i></b> .....	<b>15</b>
I. Généralités .....	16
II. Classification botanique de l'espèce <i>Coffea arabica</i> .....	17
III. Description Botanique .....	18
IV. Composition des graines de <i>Coffea arabica</i> et intérêt thérapeutique .....	19
IV.1. Les alcaloïdes .....	20
IV.1.1. La caféine .....	20
IV.1.2. La trigonelline .....	21
IV.2. Les polyphénols .....	22
IV.2.1. Les acides chlorogéniques .....	22
IV.3. Les diterpènes .....	23
V. Utilisation du caféier en médecine traditionnelle .....	24
<b>Matériel et Méthodes</b> .....	<b>26</b>
I. Matériel végétal .....	27
II. Méthodes .....	27
II.1. Préparation des extraits .....	27
II.2. Rendements de l'extraction .....	27
III. Etude phytochimique .....	28
III.1. Dosage des polyphénols totaux .....	28

III.1.1. Principe .....	28
III.1.2. Mode opératoire .....	28
III.2. Dosage des tanins .....	28
III.2.1. Principe .....	28
III.2.2. Mode opératoire .....	29
III.3. Dosage des flavonoïdes .....	29
III.3.1. Principe .....	29
III.3.2. Mode opératoire .....	29
IV. Evaluation de l'activité antioxydant.....	30
IV.1. La méthode de FRAP (Potassium Ferricyanide Antioxydant Power).....	30
IV.1.1. Principe .....	30
IV.1.2. Mode opératoire .....	30
IV.2. La méthode de Piégeage du radical ABTS• <sup>+</sup> .....	30
IV.2.1. Principe .....	30
IV.2.2. Mode opératoire .....	30
IV.3. Evaluation de l'activité antioxydante par la méthode DPPH .....	32
IV.3.1. Principe .....	32
IV.3.2. Mode opératoire .....	32
IV.4. Capacité antioxydante totale (CAT) : test de phosphomolybdate.....	33
IV.4.1. Principe .....	33
IV.4.2. Mode opératoire .....	33
<b>CHAPITRE 4 : Resultants et interpretations.....</b>	<b>34</b>
I. Rendements des extraits .....	35
II. Dosage des métabolites secondaires.....	36
II.1. Les polyphénols .....	36
II.2. Les tanins.....	37
II.3. Les flavonoïdes .....	38
III. Evaluation de l'activité antioxydante .....	39
III.1. Piégeage du radical libre 2,2-diphényle-1-picrylhydrazyl (DPPH) .....	39
III.2. Capacité antioxydante totale (CAT) .....	41
III.3. Le pouvoir réducteur du Fer (FRAP).....	42
III.4. Piégeage du radical ABTS .....	44
<b>Discussion générale.....</b>	<b>47</b>
<b>Conclusion et perspectives .....</b>	<b>52</b>
<b>Références Bibliographiques.....</b>	<b>54</b>

## ملخص

في إطار البحث عن مضادات الأكسدة الجديدة من المصادر الطبيعية، اهتمنا في هذا العمل بدراسة كيمونباتية و تقييم النشاط المضاد للأكسدة للمستخلص المائي و الكلوروميثان للنبور *Coffea arabica*. تم تحضير مستخلصين بجليان مذييين، الماء و ثائيكلوروميثان ، وتم اختبارهم المركبات الفينول والفلافونويد و العفص. تم اختبار المستخلصات نفسها لنشاطها المضاد للأكسدة بأربع طرق مختلفة: DPPH و ABST و FRAP و CAT. أظهرت النتائج أن المستخلص المائي كان له أعلى مردود (6%). أظهر التحليل الكيمونباتي أن المستخلص المائي له أعلى قيمة بوليفينول (152.11 ميكروغرام ما يعادل مادة جافة/) بينما يحتوي مستخلص ثنائيكلوروميثان على أعلى مستوى من مركبات الفلافونويد و العفص (229.65 و 5.16 ميكروغرام ما يعادل مادة جافة / على التوالي). فيما يتعلق بالنشاط المضاد للأكسدة، أظهر المستخلص المائي أفضل نشاط إرجاع جذر (DPPH IC<sub>50</sub> يساوي 0.79 مجم / مل)؛ إرجاع الحديد (EC<sub>50</sub> يساوي 0.74 ملغم / مل) إرجاع جذر ABTS 19.6 ميكروغرام / مل). بينما بالنسبة لتقدير إجمال بقدرة مضادات الأكسدة CAT، سجل مستخلص ثنائيكلور و ميثان أعلى قدرة 6.692 ميكروغرام ما يعادل مادة جافة). يبدو أن المستخلص المائي واعد كمادة حافظة

**الكلمات المفتاحية:** كوفيارابيك، بذور خضراء، نشاط مضاد للجذور، بوليفينولكلي

## Résumé

Dans le cadre de la recherche de nouveaux antioxydants à partir des sources naturelles, nous nous sommes intéressés dans ce travail à l'étude phytochimique et à l'évaluation de l'activité antioxydante de l'extrait aqueux et dichlorométhane des graines vertes de *Coffea arabica*.

Deux extraits ont été préparés par décoction à l'aide de deux solvants l'eau et le dichlorométhane et ont fait l'objet du dosage des composés phénoliques, flavonoïdes et tanins. Ces mêmes extraits ont été testés pour leur activité antioxydante par quatre méthodes différentes : DPPH, ABST, FRAP et la CAT.

Les résultats obtenus ont montré que l'extrait aqueux présente le rendement le plus élevé (6%). L'analyse phytochimique a montré que l'extrait aqueux présente la valeur la plus élevée en polyphénols (152,11µg EAG/ mg E) tandis que l'extrait dichlorométhane renferme le taux le plus élevé en flavonoïdes et en tanins condensés (229,65 EC/mg E et 5,16 µgEAG/mg E respectivement). En ce qui concerne l'activité antioxydante, l'extrait aqueux a montré la meilleure activité de piégeage du radical DPPH (CI<sub>50</sub> égale à 0,79 mg/ml) ; de réduction du fer (EC<sub>50</sub> égal à 0,74 mg/ ml) et de piégeage du radical ABTS (CI<sub>50</sub> égale à 19,6 µg/ ml). Alors que pour l'estimation de la capacité antioxydante totale CAT, l'extrait dichlorométhane a enregistré la capacité la plus élevée (6,692 µg EAA/ mg E). L'extrait aqueux semble être prometteur comme produit de conservation

**Mots clés:** *Coffea arabica*, Graines vertes, activité antioxydante, polyphénols totaux

# **Abstract**

In the context of the research of new antioxidants from natural sources, we are interested in this work in the phytochemical study and the evaluation of the antioxidant activity of the aqueous extract and dichloromethane of the green *Coffea arabica* seeds.

Two extracts were prepared by decoction using two solvents, water and dichloromethane that were quantified for their phenolic, flavonoid and tannin compounds. These same extracts have been tested for their antioxidant activity by four different methods: DPPH, ABST, FRAP and CAT.

The results obtained showed that the aqueous extract had the highest yield (6%). The phytochemical analysis has shown that the aqueous extract has the highest polyphenol value (152.11  $\mu\text{g}$  GAE / mgE) while the dichloromethane extract contains the highest level of flavonoids and condensed tannins (229.65 and 5.16  $\mu\text{g}$  GAE / mgE respectively). Regarding antioxidant activity, the aqueous extract showed the best trapping activity of the DPPH radical ( $\text{IC}_{50}$  equal to 0.79 mg / ml); reduction of iron ( $\text{EC}_{50}$  equal to 0.74 mg / ml) and trapping of the ABTS radical ( $\text{IC}_{50}$  equal to 19.6  $\mu\text{g}$  / ml). While for the estimation of the total antioxidant capacity CAT, the dichloromethane extract recorded the highest capacity (6.692 $\mu\text{g}$  EAA / mgE). The aqueous extract appears to be promising as a preservative

**Keywords:** *Coffea arabica*, Green seeds, anti-free radical activity, total polyphenols

# Liste des abréviations

<b>ABTS</b>	: 2,2'-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique).
<b>ACG</b>	: acide chlorogénique.
<b>ADN</b>	: acide désoxyribonucléique.
<b>AGPI</b>	: acide gras polyinsaturé.
<b>BHA</b>	: butylhydroxyanisole.
<b>BHT</b>	: Butylhydroxytoluène.
<b>CAT</b>	: capacity antioxydant total.
<b>CE50</b>	: concentration efficace.
<b>CFQA</b>	: acide caféylfêrulylquiniques.
<b>CI50</b>	: concentration inhibitrice a 50%.
<b>CQAs</b>	: acide caféoylquiniques.
<b>diCQAs</b>	: acide dicaféoylquiniques.
<b>DMSO</b>	: diméthylsulfoxyde.
<b>DPPH</b>	: 2,2-dipheyl-1-picrylhrazyl.
<b>ERO ou ROS</b>	: espèce réactive oxygénée (reactive oxygen species).
<b>Fe<sup>2+</sup></b>	: fer ferreux.
<b>Fe<sup>3+</sup></b>	: fer ferrique.
<b>FQAs</b>	: acide féruloylquinique.
<b>FRAP</b>	: ferric reducing antioxydant power.
<b>GPX</b>	: glutathion peroxydase.
<b>GR</b>	: glutathion réductase.
<b>GST</b>	: glutathion -S -transférase.
<b>LDL</b>	: lipoprotéines de faible densité.
<b>NDGA</b>	: l'acide nordihydroguaiaretique.
<b>NMP</b>	: N-méthylpyridinium.
<b>OG</b>	: gallate d'octyle.
<b>pCoQA</b>	: acide para-coumarylquinique.
<b>PG</b>	: gallate de propyle.
<b>PP</b>	: pellagra preventive.
<b>PPM</b>	: phosphomolybdate.
<b>SOD</b>	: superoxyde dismutase.

**TBHQ** : tertiarybutylhydroquinone

**THBP** : 2, 4,5-trihydroxybutyrophenone.

# Liste des Figures

<b>Figure 1:</b> exemple d'une structure d'un phénol et un polyphénol.....	7
<b>Figure 2:</b> structure de l'atropine (à gauche) et celle de la cocaïne (à droite) .....	7
<b>Figure 3:</b> structure de l'unité isoprène .....	8
<b>Figure 4:</b> Graines Arabica – Robusta .....	17
<b>Figure 5:</b> la plante de café.....	17
<b>Figure 6:</b> Cerises vertes de coffea arabica (Bertrand, 2009).....	18
<b>Figure 7:</b> la structure de la caféine (Adler, 2014) .....	20
<b>Figure 8:</b> Structures chimiques de quelques alcaloïdes des grains de Coffea arabica A : La trigonelline, B : l'acide nicotinique, C : la théophylline (Haler, 2013, Sfetcu et al, 2014).....	21
<b>Figure 9:</b> l'acide 5-caféylquinique (Adler, 2014) .....	22
<b>Figure 10:</b> les acides chlorogéniques (Haler, 2013) .....	23
<b>Figure 11:</b> les structures chimiques de cafestol et de kahweol (Clarke, 1988).....	24
<b>Figure 12:</b> Rendements d'extraction des graines vertes de Coffea arabica.....	35
<b>Figure 13:</b> La courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols. ....	36
<b>Figure 14:</b> La courbe d'étalonnage de la catéchine pour le dosage des tanins condensés .....	37
<b>Figure 15:</b> La courbe d'étalonnage de la Catéchine pour le dosage des flavonoïdes.....	38
<b>Figure 16:</b> évolution des pourcentages d'inhibition du DPPH en fonction des extraits de la plante .....	39
<b>Figure 17:</b> Evolution des pourcentages d'inhibition du DPPH en fonction des concentrations de BHA et de l'acide ascorbique.....	40
<b>Figure 18:</b> Courbe d'étalonnage de la capacité antioxydant total de l'acide ascorbique. ....	42
<b>Figure 19:</b> Evolution du pouvoir réducteur du fer des antioxydants BHA et l'acide ascorbique .....	43
<b>Figure 20:</b> Evolution des absorbances du fer réduit en fonction des concentrations des extraits .....	43
<b>Figure 21:</b> Pourcentage d'inhibition du radical cationique ABTS en fonction des concentrations de des extraits de la plante.....	45
<b>Figure 22:</b> Evolution des pourcentages d'inhibition de l'ABTS en fonction des concentrations de BHA et BHT.....	45

# Liste des Tableaux

<b>Tableau 1:</b> l'activité antiradicalaire de quelques plantes médicinales .....	14
<b>Tableau 2:</b> Composition des grains de Coffea arabica (Chu et al., 2012).....	19
<b>Tableau 3:</b> Caractéristiques des extraits des graines vertes de Coffea arabica .....	35
<b>Tableau 4:</b> Teneurs en polyphénols totaux dans les deux extraits .....	36
<b>Tableau 5:</b> Teneurs en tanins dans les deux extraits .....	37
<b>Tableau 6:</b> Teneurs en flavonoïdes dans les deux extraits .....	38
<b>Tableau 7:</b> CI <sub>50</sub> des différents extraits de Coffea arabica et des standards .....	40
<b>Tableau 8:</b> CE <sub>50</sub> des deux extraits de Coffea arabica et des standards (BHA et Acide ascorbique) .....	44
<b>Tableau 9:</b> Résultats des valeurs d'IC <sub>50</sub> des différents extraits de Coffea arabica et des standards (BHT, BHA) .....	46

# **INTRODUCTION**

Le stress oxydatif se définit comme étant un déséquilibre profond de la balance entre les prooxydants et les antioxydants, en faveur des premiers. Et impliquant la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) (**Pincemail et al., 1999**). La formation incontrôlée ERO comme l'anion superoxyde ( $O_2^-$ ), le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) ou le radical hydroxyle ( $OH^\circ$ ) aura la conséquence souvent lourde pour l'organisme. Les radicaux libres étant impliqués dans la genèse de plusieurs maladies (parmi lesquelles :l'athérosclérose, le diabète, les arthroses, l'asthme, les maladies cardiaques...) (**Pelletier et al., 2004**).

Dans le domaine médical, le challenge est de rechercher des composés à la fois efficaces et pas toxiques. Pour cela la recherche d'antioxydants à partir des plantes médicinales est une voie qui peut être très prometteuse étant donné que l'être humain a longtemps employé des remèdes traditionnels à base de plantes (**Sarr et al.2015 ; Dieng et al., 2017**).

La particularité des plantes médicinales est la capacité de leur métabolisme à biosynthétiser des composés appelés métabolites secondaires. Ces derniers sont produits en très faible quantité, et il existe plus de 200 000 métabolites secondaires classés selon leurs structures chimiques, en l'occurrence, les composés phénoliques, les alcaloïdes et terpènes (**Vermeris, 2006**).

Les caféiers sont un ensemble d'arbustes du genre *Coffea*, qui compte près de 80 espèces. *Coffea arabica* et *C. canephora*, sont les deux espèces les plus populaires du genre *Coffea*. Elles sont originaires d'Afrique et sont cultivées pour leurs graines qui, après torréfaction donnent le café (**Gomez-Ruiz et al, 2008 ; Muriel et Arauz, 2010**). Le café occupe une place importante dans la société humaine et il est considéré comme l'une des boissons les plus populaires au monde et le deuxième produit agricole le plus commercialisé(**Parras et al, 2007**). Plusieurs études ont révélé les effets bénéfiques du café sur la santé à court et à long terme grâce à l'ensemble des constituants bioactifs qu'il renferme (composés phénoliques, alcaloïdes, vitamines...). Il a également été rapporté que la consommation de café est associée avec la réduction de risques des maladies coronaires, diabète type 2, Parkinson, Alzheimer et cancer (**Preedy, 2014**).

Dans ce travail nous nous intéressons au dosage des composés phénoliques et l'étude de l'activité antioxydante in vitro des extraits aqueux et dichlorométhane des graines vertes de l'espèce *Coffea arabica*.



# **CHAPITRE 1 : La phytothérapie**

## Introduction

Depuis plusieurs siècles, l'homme a eu recours aux plantes pour se nourrir et pour se soigner. Au fil des années, les connaissances sur les plantes médicinales se sont transmises de génération en génération et ont donné naissance à la phytothérapie.

La phytothérapie est l'art d'utiliser les plantes médicinales pour se soigner. Du grec « phyton » qui signifie plante et « therapein » qui signifie soigner, il s'agit donc d'une thérapeutique allopathique destinée à prévenir et traiter des troubles fonctionnels et des états pathologiques bénins par des plantes médicinales préférentiellement dénuées de toxicité dans les conditions normales d'utilisation (**Bonneval, 2006 ; Pasdeloup, 2018**).

Donc une plante médicinale est toute plante qui renferme un ou plusieurs principes actifs capables de prévenir, soulager ou guérir des maladies (**Schauenberg et Paris, 2006**). Des chercheurs ont estimé qu'il existe environ 400 000 espèces de plantes dans le monde, dont environ le quart ou le tiers ont été utilisées par les sociétés à des fins médicinales (**Benayad, 2008**).

Aujourd'hui les plantes médicinales sont de plus en plus utilisées par l'industrie pharmaceutique, il est impossible d'imaginer le monde sans la quinine qui est employée contre la malaria ou sans la digoxine qui soigne le cœur, ou encore l'éphédrine que l'on retrouve dans de nombreuses prescriptions contre les rhumes (**Isern, 2001**).

Les plantes médicinales peuvent être sous différentes formes galéniques : solide (comprimé, capsule), semi-solide (pommade, crème), liquide (solution, sirop, suspension) (**Pasdeloup, 2018**). Elles sont parfois récoltées à l'état sauvage mais beaucoup d'entre elles sont cultivées à grande échelle (Digitale, Pavot, Chanvre, etc.) pour répondre à la consommation. Certaines familles sont particulièrement riches en principes actifs (Papavéracées, Apocynacées, Liliacées, Rubiacées, Solanacées, Lamiacées). Certaines plantes sont inoffensives telles que le Tilleul, la Camomille, la Menthe, etc. D'autres, très nombreuses, sont toxiques et ne doivent être utilisées que sous forme pharmaceutique, telle que la Digitale, la Belladone, le Colchique, etc (**Maroufet Reynaud, 2007**).

La plante possède une composition chimique très complexe, elle est constituée de centaines de substances. A côté des métabolites primaires, les plantes biosynthétisent des métabolites secondaires de structure plus complexes. Ils sont classés en trois grandes familles : les polyphénols, les terpénoïdes et les alcaloïdes. Ces métabolites sont d'un intérêt thérapeutique considérable (**Pasdeloup, 2018**). Chacune de ces classes a des propriétés biologiques diverses:

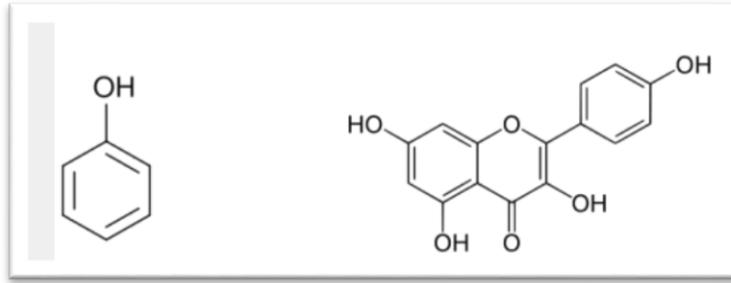
antioxydants, antimicrobiennes, anti-inflammatoires, anticancéreuses etc... (**Epifano et al., 2007**). Elles sont importantes à la survie et à la propagation de l'espèce, et ont différents rôles, comme l'attraction des pollinisateurs, protection de l'attaque des pathogènes ou des herbivores, des phéromones ou des signaux chimiques permettant à la plante de s'adapter à l'environnement (**Beta et al., 2005**). Malgré de nombreuses recherches, une infime partie des substances présentes dans les plantes a pu être identifiée. Mais on sait que c'est grâce à l'action combinée de toutes ces substances que les plantes doivent leurs vertus thérapeutiques (**Pasdeloup, 2018**).

### **I. Les composés phénoliques**

Les composés phénoliques sont des dérivés non azotés où le cycle aromatique est issu principalement de deux voies majeures : la voie shikimate et la voie acétate ou leur combinaison. Elles forment un très vaste ensemble de substances chimiques. L'élément structural fondamental qui les caractérise est la présence d'au moins un noyau benzénique auquel est lié directement au moins un groupe hydroxyle libre ou engagé dans une autre fonction (éther, ester, hétéroside...etc.). Le phénol est le composé de base de ce groupe. Les dérivés portant plus de deux noyaux benzéniques sont appelés les polyphénols (**Elkolli, 2016**). Ces composés forment le principe actif de nombreuses plantes médicinales. Ils sont présents dans toutes les parties des végétaux (**Figure 01**) (**Psotova, 2003**).

Il existe de très nombreux composés phénoliques présents dans les plantes (phénols simples, acides phénols, coumarines, flavonoïdes, anthocyanes, tanins...) qui se différencient entre eux par la complexité du squelette de base (allant d'un simple C6 à des formes très polymérisées), ainsi que par le degré de modification de ce squelette (degré d'oxydation, d'hydroxylation et de méthylation, etc.), et enfin par les liaisons possibles de ces molécules de base avec d'autres molécules (glucides, lipides, protéines, etc.) (**Macheix et al., 2005 ; Beta et al., 2005 ; Pasdeloup, 2018**).

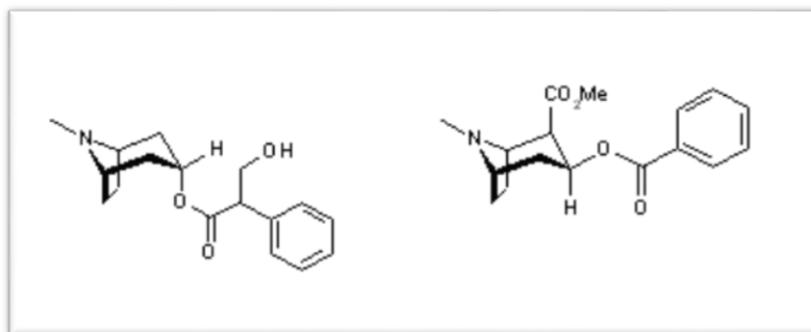
Ces composés phénoliques ont comme particularité d'être d'excellents antioxydants et inhibiteurs de l'inflammation. Ils renforcent aussi la paroi vasculaire et ils ont également des propriétés antibactériennes, antivirales et/ou antifongique (**Pasdeloup grenez, 2018**).



**Figure 1:** exemple d'une structure d'un phénol (Gaiacol) et un polyphénol(Resvératrol)

## II. Les alcaloïdes

Les alcaloïdes sont des substances organiques azotées d'origine végétale, à caractère alcalin et présentant une structure complexe (**Hostettamnn et al, 1955**). Ils ont la propriété de former des sels et d'être amers (**Elkolly, 2016**). Ils sont en général insolubles dans l'eau et solubles dans les solvants organiques apolaires. Ils cristallisent souvent à l'état solide (**Pasdeloup, 2018**). Les alcaloïdes dérivent en général des acides aminés (tryptophane, tyrosine, phénylalanine, lysine, arginine...) qui sont d'abord décarboxylés (**Elkolly, 2016**). Les alcaloïdes ont des activités pharmacologiques qui s'exercent au niveau du système nerveux autonome : anticholinergiques (atropine), sympathomimétiques (éphédrine) ou sympatholytiques (alcaloïdes de l'ergot de seigle), au niveau du système nerveux central qu'ils soient stimulants (strychnine, caféine) ou dépresseurs (morphine, scopolamine). Il existe également des anesthésiques locaux (cocaïne), des curarisants (tubocurarine), des antitumoraux (vinblastine, camptothécine), des antipaludiques (quinine)...(**Figure02**) (**Pasdeloup, 2018**).

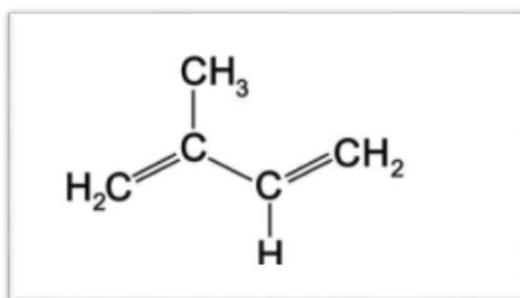


**Figure 2:**Structure de l'atropine (à gauche) et celle de la cocaïne (à droite)

### III. Les terpénoïdes

Les terpènes sont des hydrocarbures naturels, de structure cyclique (monocyclique, bicyclique ou tricyclique), ou non (acyclique), avec des groupes fonctionnels supplémentaires. Ils représentent un très vaste groupe de substances naturelles (plus de 30 000 représentants connus, présents principalement dans le règne végétal) (Elkolly, 2016 ; Padeloup, 2018). On distingue différents groupes de terpénoïdes grâce à la présence dans leur squelette d'unités isoprénique (2-méthyl-1,3-butadiène) à cinq atomes : les monoterpènes en C10, les sesquiterpènes en C15, les diterpènes en C20, les sesterterpènes en C25, les triterpènes en C30 et les tétraterpènes en C40 (Kabouche, 2005 ; Padeloup, 2018).

Ils ont de nombreuses propriétés pharmacologiques : anti-inflammatoires, antibactériennes, antifongiques, antiparasitaires, antiseptiques, spasmolytiques et sédatives, cytotoxiques, édulcorantes... (Figure 03) (Padeloup, 2018).



**Figure 3:** Structure de l'unité isoprène

## **CHAPITRE 2 : Stress oxydatif et dommages cellulaires**

### I. Les radicaux libres :

Un radical libre est une espèce chimique, molécule, partie d'une molécule ou simple atome qui possède un ou plusieurs électrons non appariés sur l'orbitale externe. Cet électron le rend réactif et instable avec une durée de vie très courte (**Goudableetal,1997 ;Koechlin-Ramonatxo,2006**). Ce radical libre a tendance à remplir son orbitale en captant un électron, il va donc se réduire en oxydant un autre composé (lipide, protéine, ADN...)(**Alexandra et al, 2017**).

Dans les systèmes biologiques, l'oxygène est normalement transformé en molécule d'eau au niveau de la chaîne respiratoire. La transformation n'est toutefois pas complète car une faible fraction de l'oxygène est convertie en espèces réactives de l'oxygène (ERO ou ROS) (**Belkhiri, 2009**).

Les sources des espèces réactives de l'oxygène sont soit exogènes (radiation X ou gamma, UV, radiolyse de l'eau, réaction photochimique...) (**Belkheiri, 2010**) ou endogènes (les systèmes enzymatiques dans les cellules ont la capacité de générer les oxydants à savoir les NAD(P)H oxydases, la xanthine oxydase/déshydrogénase, les enzymes mitochondriales) (**Salvayre, 2003 ; Belkheiri, 2010 ; Haioun, 2015**).

Les espèces réactives de l'oxygène regroupent les radicaux primaires, qui ont un rôle physiologique particulier tels que : les dérivés non radicalaires (ne possédant pas d'électron célibataire) dont la toxicité est importante [anion peroxyde  $O_2^{\bullet}$  peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), peroxydinitrite ( $ONOO^{\bullet}$ )] et les radicaux libres oxygénés [anion superoxyde ( $O_2^{\bullet-}$ ), radical hydroxyle ( $HO^{\bullet}$ ), monoxyde d'azote ( $NO^{\bullet}$ ) ...]. Ils regroupent aussi les radicaux secondaires, issus de la réaction des radicaux primaires avec des entités biochimiques cellulaires (lipides, protéines, glucides...) (**Belkheiri, 2010 ; Novelli, 1997**).

## II. Le stress oxydant

Le stress oxydatif se définit comme étant une circonstance anormale qui traverse parfois nos corps lorsqu'ils sont attachés à une production anormale endogène ou exogène de radicaux libres oxygénés qui dépasse leurs pouvoirs antioxydants (**Sies, 1991**). C'est un déséquilibre de la balance entre les prooxydants et les antioxydants (**Boyd, 2003**).

### II.1. Conséquences du stress oxydant

Dans une situation de stress oxydatif, la toxicité des ERO s'exprime par de nombreux aspects et en particulier par la perturbation de nombreux processus physiologiques comme la photosynthèse (**Sies et al, 1997**). Cette toxicité s'explique par la réactivité des ERO, en particulier celle de l'OH, envers les macromolécules biologiques.

Des lésions directes des molécules biologiques (oxydation de l'ADN, des protéines, des lipides, des glucides) sont provoquées par la production excessive de radicaux libres, qui engendrent aussi des lésions secondaires dues au caractère cytotoxique et mutagène des métabolites libérés notamment lors de l'oxydation des lipides (**Harris, 2002**). De nombreuses recherches ont montré que le stress oxydant est impliqué dans le développement de plus de 200 pathologies physiologique allant de l'athérosclérose au cancer en passant par le diabète, le SIDA ou toutes les maladies à caractère inflammatoire (arthrite rhumatoïde, endotoxémie...) (**Pincemail, 2003**)

#### II.1.1. Oxydation de l'ADN

La molécule de l'ADN constitue une cible cellulaire importante pour les attaques radicalaires. On observe plusieurs modifications après l'action du radical HO• : conversion des résidus thymine en thymine glycol et 5-hydroxy méthyluracile, de la guanine en 8-hydroxy guanine, oxydation du désoxyribose entraînant une coupure des brins de la double hélice. Ces dénaturations peuvent avoir de graves conséquences sur la réplication du génome (**Leverse et al. 2001**) et conduisant ainsi à la mutagénèse, la carcinogénèse et la mort cellulaire (**Pasquier, 1995**).

### II.1.2. Oxydation des protéines

Il est possible que l'électron non apparié des radicaux libres s'attaque à la structure de certaines protéines, en particulier les protéines porteuses d'un groupement sulfhydryle (-SH). C'est le cas de nombreuses enzymes cellulaires et protéines de transport qui vont ainsi être oxydées et entraîner la formation de ponts entre protéines, une dénaturation ou une fragmentation de la protéine (**Lacolley et al. 2007**).

Les protéines sont sensibles à l'action du radical HO•, celui-ci peut en effet réagir avec différents acides aminés des chaînes de protéines. Les plus sensibles à son action sont les acides aminés aromatiques comme le tryptophane, la tyrosine, ou celui ayant un noyau imidazole comme l'histidine sur lesquels le radical HO• s'additionne et provoque un changement de conformation de la molécule de protéine (**Pasquier, 1995**).

### II.1.3. Peroxydation des lipides

Alors que l'oxydation des lipides représente l'utilisation du substrat énergétique, la peroxydation lipidique est la dégradation du contenu lipidique membranaire, c'est ainsi qu'une altération de leur fonctionnalité aura lieu (modification de leur perméabilité, de leur fluidité, perte d'activité d'enzymes, de récepteurs...). Les lipoprotéines telles que les LDL (lipoprotéine de faible densité), riche en cholestérol et en phospholipides sont également des cibles privilégiées de la peroxydation lipidique. Les hydrogènes bis-allyliques oxydables contenus dans les acides gras polyinsaturés (AGPI) en font la cible privilégiée des ERO. Comme ces derniers sont les lipides majeurs des membranes cellulaires et les lipoprotéines, on comprend leurs vulnérabilités particulières.

## III. Les antioxydants

Pour éliminer les dommages causés par les ERO, l'organisme développe des systèmes de défenses antioxydants qui visent à contrôler, prévenir, ou réparer les dommages oxydatifs. Un antioxydant est défini comme toute substance endogène ou exogène capable, à concentration relativement faible, d'entrer en compétition avec d'autres substrats oxydables et ainsi retarder ou empêcher l'oxydation de ces substrats (**Tang et al, 2010**).

Selon leurs modes d'action les antioxydants se divisent en deux groupes : les antioxydants enzymatiques et les antioxydants non-enzymatiques (piégeurs) (**Muzykantov, 2001**). Les principales enzymes antioxydantes sont la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT), la glutathion peroxydase (GPX), la glutathion réductase (GR) et la glutathion S-transférase (GST) (**Wassmann, et al 2004 ; Fernandez-Checa, et al 2005 ; Gallogly, 2007**).

Les principaux antioxydants non-enzymatiques sont le glutathion, les vitamines A, C et E, les caroténoïdes et les antioxydants de synthèse. Ces molécules vont interrompre la chaîne de réaction radicalaire (Lu, 1999 ; Stahl, et al., 2003 ; Vincent et al ;2006).En plus plusieurs antioxydants de synthèse chimique sont utilisés dans les aliments comme additifs dans le but de prévenir la rancidité. Le BHA, le TBHQ, le THBP, le DTHMP, le PG, l'OG et l'NDGA, sont très utilisés dans l'industrie cosmétiques et agroalimentaire (Guo et al., 2006, Xiang et al., 2007).

#### IV. Exemples de plantes riches en antioxydants naturels

Cependant, malgré leur efficacité, ces antioxydants peuvent être toxiques et responsable de mutagenicités, ce qui peut même présenter un danger pour la santé humaine (Williams, 1993). Désormais, de nouvelles sources végétales d'antioxydants naturels sont exploitées (Suhaj, 2006).

Les épices en générale, sont très riches en métabolites antioxydants. Une revue scientifique reconnue a classé le *Curcuma* au quatrième rang parmi les 50 aliments renfermant le plus d'antioxydants (Halvorsen et al., 2006). Parmi les plantes qui confèrent des effets antioxydants, on trouve : le giroflier (*Syzygium aromaticum*) et l'amandier.D'après Adda et Ais, 2018, l'activité anti radicalaire du noyau d'amande amère est très élevée (67,9%).

Le clou de girofle est l'épice la plus utilisée dans le monde. D'après Madfouni, 2018, elle est riche en substances bioactives, qui ont montré une forte activité anti radicalaire (Max et Robert, 2003).

Le **Tableau 1** regroupe les résultats de certaines recherches scientifiques sur l'activité antiradicalaire des différents extraits de quelques plantes qui confèrent des effets antioxydants.

**Tableau 1:** l'activité antiradicalaire de quelques plantes médicinales

Plantes	Partie utilisée	Extrait préparé	Activité antiradicalaire IC <sub>50</sub> (µg/ml)	Références
<i>Mitragyna ciliata</i>	Ecorces	méthanolique	10,5 ± 0,28	(Alain dit Philippe et al, 2011)
L'amande amère	Graines	méthanolique	Réduction de 67,9%	(Adda et Ais, 2018)
<i>Artemisia campestris</i>	Partie aérienne	Éthanolique	68,10 µg/mL	(Boudjouref, 2011)
<i>Trichilia prieuriana</i>	Ecorces	méthanolique	7,5 ± 0,28	(Alain dit Philippe et al, 2011)
<i>Aloe vera L. Burm. F</i>	Feuilles	Eau-acétone	15,80 ± 0,9	(El Sayed et al., 2016)
<i>Disthemonantus benthamianus</i>	Feuilles	méthanolique	4,50 ± 0,28	(Alain dit Philippe et al, 2011)
<i>Pinus halpensis</i>	Cônes découpés	Eau-acétone fraction n-butanol	5,01 – 6,65	(NIGRO, 2016)
<i>Curcuma longa L</i>	Parties aériennes	Acétate d'éthyle Ethanol	28.06 ± 2.87 46.98 ± 4.49	(Brahimi et Terrai, 2018)
<i>Chrysophyllum perpulchrum</i>	Ecorces	méthanolique	4,00 ± 0,288	(Alain dit Philippe et al, 2011)

## **CHAPITRE 3 : La plante *Coffea arabica***

## I. Généralités

Depuis le début du XIX<sup>ème</sup> siècle, la production du café était en constante augmentation. C'est un produit de première importance sur le marché mondial des produits agroalimentaires et représente la deuxième boisson la plus consommées au monde après l'eau (**Justin Koffi, 2007**).

Le mot café vient du mot arabe "Cahouah" qui désignait cette boisson. Ce terme est né en Afrique dans la région d'Ethiopie. Il s'est ensuite popularisé au Yemen, Arabie saoudite et en Egypte.

On entend par le café les fèves qui existent dans la cerise du caféier et plus précisément les graines(**Figure04**). Cependant de nos jours le mot café peut désigner aussi bien les différentes formes et types de café à savoir : café en parche, de café vert ou de café torréfié, et comprend le café moulu, le café décaféiné, le café liquide et le café soluble mais aussi le lieu où on se rassemble pour consommer cette boisson (**Journal officiel de l'Union européenne, 2008**).

C'est une boisson dite psycho-active dont les populations ne peuvent plus se passer dans leur vie quotidienne (**Michelle et al., 2003**).

Sur les 80 espèces de caféiers connues seules deux d'entre elles sont très exploitées dans le monde : *Coffea arabica* L. et *Coffea canephora* (**Campa et al. (2005)**). Le café robusta (*Coffea canephora*) est la variété la plus utilisée : ses graines sont généralement rondes, irrégulières et assez petites, avec un goût corsé et amer (**Lidah, 2011**).

L'espèce arabica (*Coffea arabica*) possède des graines plutôt ovales et longues. Elles présentent un goût plus fin et un arôme plus fruité que les graines de robusta. Le café qui en résulte est le plus consommé au monde.

L'espèce *Coffea arabica*, est une plante hermaphrodite à autopolinisation et originaire d'Afrique de l'Est, plus précisément de la région forestière du sud-ouest de l'Éthiopie « Kaffa » (**Bertrand, 2009**). Cette plante se développe à des altitudes comprises entre 950 et 2500 m, le plus souvent entre 1250 et 2500 m. Elle nécessite une température comprise entre 17°C et 29°C (**Davis et al, 2012**) et un sol perméable légèrement argileux ou sablonneux (**Lapparent, 2013**).

Le caféier de l'arabica est cultivé dans les climats relativement froids dans la région entre les tropiques du Cancer et du Capricorne. Sa culture demande une certaine quantité de précipitations, idéalement 1500 à 2500 mm par an (**Davis et al. 2012**) permettent un développement optimal de la plante et du fruit et peut supporter tout de même de courtes périodes de sécheresse (environ 2 à 4 mois) (**Lapparent, 2013**). Cette espèce est responsable de près de 75 % de la production mondiale(**Figure05**) (**Barsalobres-Cavallari et al, 2009**).



**Figure 5:** la plante de café



**Figure 4:** Graines Arabica – Robusta

## II. Classification botanique de l'espèce *Coffea arabica*

Selon la classification phylogénétique APGIII (2014), la classification botanique du café arabica est comme suit :

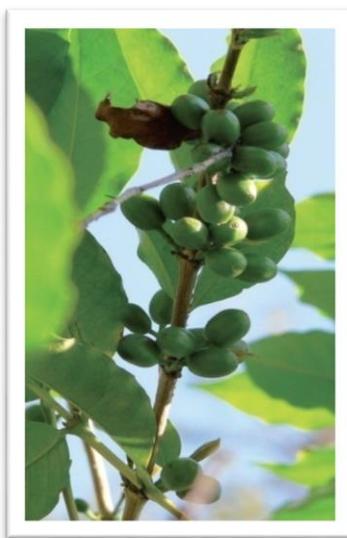
<b>Règne</b>	Plantae
<b>Division</b>	Angiospermae
<b>Classe</b>	Dicotyledonae
<b>Sous classe</b>	EuasteridsI
<b>Ordre</b>	Gentianales
<b>Famille</b>	Rubiaceae
<b>Sous famille</b>	Ixoroideae
<b>Genre</b>	<i>Coffea</i>
<b>Espèce</b>	<i>Coffea arabica</i>

### III. Description Botanique

L'espèce est une plante ligneuse vivace dicotylédone, de la famille des *Rubiaceae* qui peut vivre jusqu'à 50 ans. Elle est de la taille d'un arbrisseau, d'un arbuste voir d'un arbre (**Botineau, 2010 ; Lapparent, 2013**), souvent composée de plusieurs troncs, ce qui lui donne un aspect buissonnant.

Les feuilles du caféier Arabica sont de couleur vert foncé, persistantes, positionnées sur la branche de manière souvent opposée, mais parfois verticillée par 3 (3 feuilles sur le même nœud). Ses fleurs sous forme d'étoile, sont blanches, odorantes, rassemblées en glomérules (grappes serrées) à l'aisselle des feuilles : c'est l'inflorescence (**Botineau, 2010**). Le système racinaire est composé de 4 à 8 racines principales pivotantes (pointes vers le bas), les racines secondaires et tertiaires de 10 cm à 40 cm de long, 30 à 45cm sous la surface (**Lapparent, 2013**).

Le caféier arabica donne des fruits nommé la drupe (la cerise) rouge à maturité (pendant 8 à 9mois), contenant deux graines ou fèves (**Figure06**) (**Botineau, 2010**). C'est un fruit charnu dont le mésocarpe (pulpe) se différencie en un tissu très vacuolisé riche en sucres et en acides qui ont un rôle attractif pour les animaux qui permettent la pollinisation. La maturation de la paroi, de l'ovaire, de la drupe permet une différenciation de celui-ci en 3 tissus : épicarpe, mésocarpe et endocarpe qui protègent les deux graines. Le caféier peut porter des fruits à différents stades de maturité en même temps que des fleurs. Les graines contiennent tout d'abord l'embryon, celui-ci est contenu dans une structure de réserve qui nourrit l'embryon (albumen), le tout est à l'abri dans un tissu protecteur appelé tégument résistant (**Lapparent, 2013**).



**Figure 6:** Cerises vertes de *Coffea arabica* (Bertrand, 2009)

#### IV. Composition des graines de *Coffea arabica* et intérêt thérapeutique

Les études biochimiques actuelles sur *Coffea arabica* sont basées surtout sur la graine, cette dernière contient plusieurs constituants qui ont beaucoup d'effets bénéfiques pour la santé. Parmi leur constituants on trouve les composés phénoliques et leurs dérivés (tels que les acides chlorogéniques), les alcaloïdes (en particulier la caféine), les alcools diterpéniques (tels que le cafestol et le kahweol), les glucides (mono-, di-, oligo- et polysaccharides), les lipides (triglycérides (75%), d'esters d'alcools diterpéniques et d'acides gras (18,5%), d'esters de stérols et d'acides gras (3,2%), de stérols (2,2%), d'alcools diterpéniques – cafestol et kahweol – (0,4%), de tocophérols et d'autres produits mineurs (0,7%)), les composés volatils et hétérocycliques, les enzymes, et les minéraux (K, P, Na, Mg)(Tableau02) (Affonso, 2016 ; Haler, 2013).

**Tableau 2:** Composition des grains de *Coffea arabica* (Chu et al., 2012).

Composant	Concentration (g/100g) en MS
<b><u>Glucides / Fibres</u></b>	
Saccharose	6-9
Sucres réducteurs	0.1
Polysaccharides	34-44
Lignine	3
Pectine	2
<b><u>Composés azotés</u></b>	
Protéines / peptides	10-11
Acides aminés libres	0.5
Caféine	0.9-1.3
Trigonelline	0.6-2
<b><u>Lipides</u></b>	
Huile de café (triglycéride avec insaponifiables, stérols / tocapherols)	15-17
Diterpènes (libres et estérifiés)	0.5-1.2
<b><u>Minéraux</u></b>	
<b><u>Acides et esters</u></b>	
Aides chlorogéniques	4.1-7.9
Acides aliphatiques	1
Acide quinique	0.4

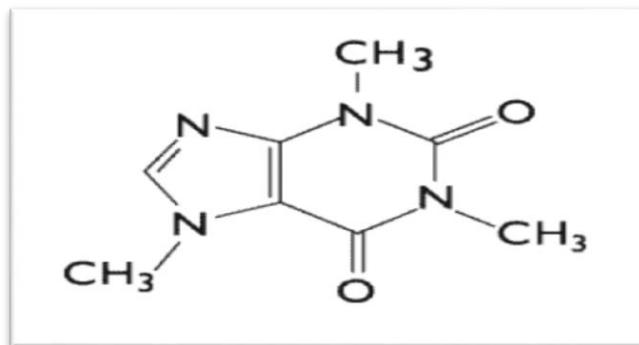
Les graines vertes de *Coffea arabica* sont très riches en métabolites secondaires, parmi elles on trouve :

#### IV.1. Les alcaloïdes

Le café contient différents alcaloïdes comme la caféine, la trigonelline, théophylline, théobromine...etc. La caféine et la trigonelline étant les plus importantes.

##### IV.1.1. La caféine

La caféine est un alcaloïde purine (1,3,7-triméthylxanthine) dérivant de la xanthosine et de la famille de méthylxanthines (**Debry, 1993**). C'est le principe actif le plus connu dans le café dont la formule brute est de  $C_8H_{10}N_4O_2$  avec une masse moléculaire de 194,19 g/mol. Elle ne compte que pour 10% de l'amertume total du café malgré que son goût soit plutôt amer(**Figure07**) (**Haler, 2013**).



**Figure 7:** la structure de la caféine (Adler, 2014)

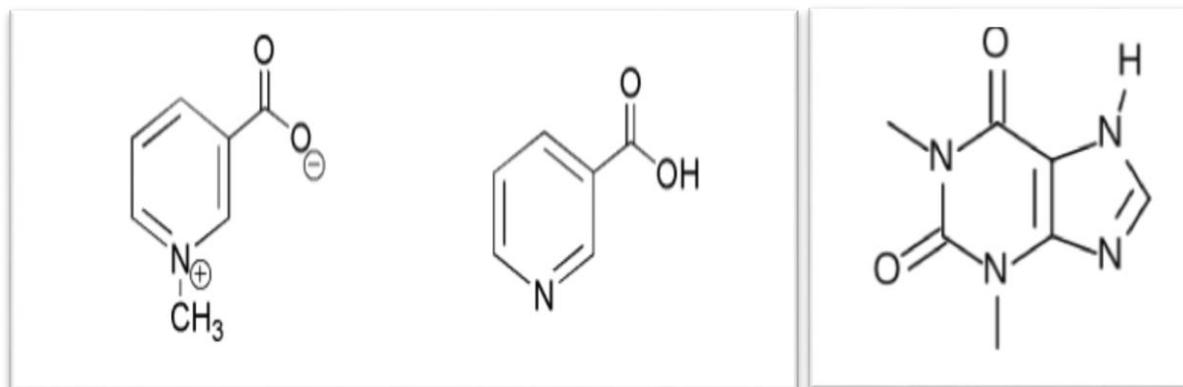
Elle peut agir comme un inhibiteur ou potentialisateur de l'effet de quelque médicament (kétoprofène, sulfonamides...) et peut protéger l'organisme contre certains de leurs effets toxiques (**Debry, 1993**). Elle est aussi connue pour ses effets diurétiques, analgésique, décongestionnant et les propriétés stimulantes. Son influence sur le système nerveux central est bien connue et en particulier ses effets sur le sommeil (insomnies). D'autre part, elle aurait un effet bénéfique sur le foie, et diminuerait les risques de développement de la maladie de Parkinson (**Adler, 2014**).

D'autre effets ont été signalés à savoir : l'effet stimulant et psychostimulant - L'augmentation du rythme cardiaque - La broncho-dilatation – inhibition de certaines phosphodiesterases - l'excrétion de calcium- diminution de la réaction inflammatoire (**Ribeiro et al, 2010**).

#### IV.1.2. La trigonelline

La trigonelline ou N-méthyl-nicotinate est un alcaloïde à noyau pyridinique dérivé biologiquement de la méthylation enzymatique de l'acide nicotinique (Chu, 2012). C'est une base azotée très soluble dans l'eau et le deuxième composé le plus retrouvé dans les grains de café crus à goût amer. Elle a une formule brute  $C_7H_7NO_2$  et une masse moléculaire de 137,14 g/mol (Haler 2013). Lors de la torréfaction la trigonelline se dégrade. Les produits obtenus sont l'acide nicotinique aussi appelé vitamine B3 ou PP ou niacine via la déméthylation et l'N-méthylpyridinium (NMP) via la décarboxylation. Il y a aussi transformation d'une grande partie en produits volatils tels que les pyrroles et pyridines (Tice, 2007).

Les produits formés lors de la torréfaction protègent contre la pellagre qui est une lésion cutanée due à un déficit en vitamine B3 et diminue les sécrétions acides de l'estomac (Haler 2013). La trigonelline possède aussi un effet hypocholestérolémiant, et régénérateur de neurites ce qui peut avoir des bienfaits sur la mémoire (Chu, 2012 ; Haler 2013). De plus, in vitro, la trigonelline est utilisée comme un agent antimicrobien qui inhibe la croissance de *Streptococcus mutan* et le caractère invasif des cellules cancéreuses (Figure 08) (Allred et al. (2009).



**Figure 8:** Structures chimiques de quelques alcaloïdes des grains de *Coffea arabica* A : La trigonelline, B : l'acide nicotinique, C : la théophylline (Haler, 2013, Sfetcu et al, 2014)

## IV.2. Les polyphénols

### IV.2.1. Les acides chlorogéniques :

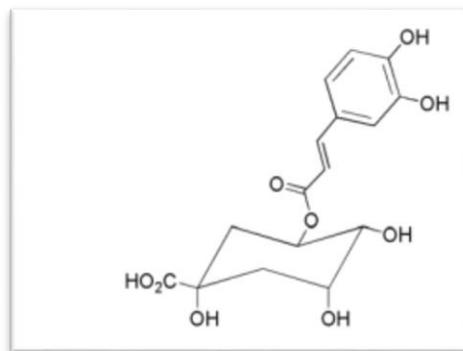
Les acides chlorogéniques (ACG) constituent une famille d'esters formés entre l'acide hydroxycinnamique (comme l'acide caféique, férulique et para-coumarique) et de l'acide quinique (**Figure10**). Les principales sous-classes de ACGs dans le café sont : les acides caféoylquiniques(CQAs) 5.2-6.5%, les acides dicaféoylquiniques(diCQAs) 0.7-1.0%, les acides féruloylquiniques (FQAs)0.3-0.5%, les acides para-coumarylquiniques(pCoQA)0.03-0.07 et les acides caféylférulylquiniques(CFQA) (**Oestreich-Janzen, 2013**). Toutes ces sous-classes sont composées d'un certain nombre d'isomères. La majeure partie des ACGs dans le café est représentée par les acides caféylquiniques ( $\pm 80\%$ ).

Quand on parle de l'acide chlorogénique, on parle d'un ester spécifique qui compte pour près de 60% des ACGs dans le café, il s'agit de l'acide 5-caféylquinique (5-CQA).

Les ACGs sont des précurseurs de phénol et de catéchols qui se forment pendant la torréfaction. Ils sont responsables de l'astringence, l'amertume et l'acidité de café ainsi qu'ils donnent un goût désagréable. Plus la torréfaction est poussée, plus les ACGs seront dégradés donnant un café moins acide, mais l'effet bénéfique des ACGs sera également moindre (**Haler 2013**).

Les ACGs ont un effet bénéfique dans les maladies neurologiques comme la maladie d'Alzheimer et la maladie de Parkinson ainsi que dans le diabète de type II et le cancer du foie.

Les acides caféylquiniques et dicaféylquiniques ont une activité antivirale et immunostimulant plus que quelque dérivé des acides dicaféylquiniques peuvent avoir une activité anti-VIH-1 (**Figure09**)(**Del Rio et al, 2010**).



**Figure 9:** l'acide 5-caféylquinique (Adler, 2014)

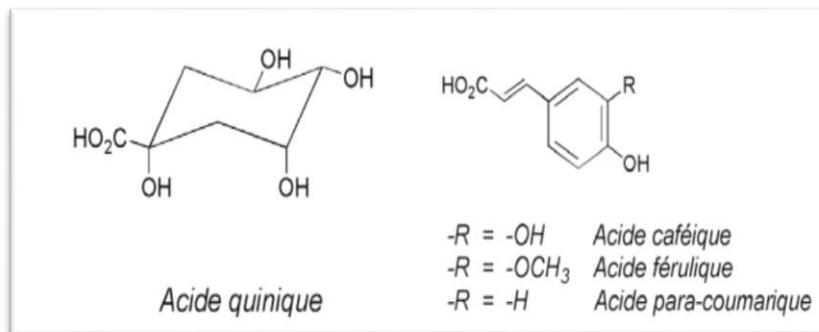
### IV.3. Les diterpènes

Les diterpènes sont représentées chez *Coffea arabica* par le Cafestol et le kahweol (**Debry, 1993**). Le cafestol est le principal composant diterpénique du café arabica et le kahweol représente jusqu'à 15% du cafestol (**McDonald, 1997**).

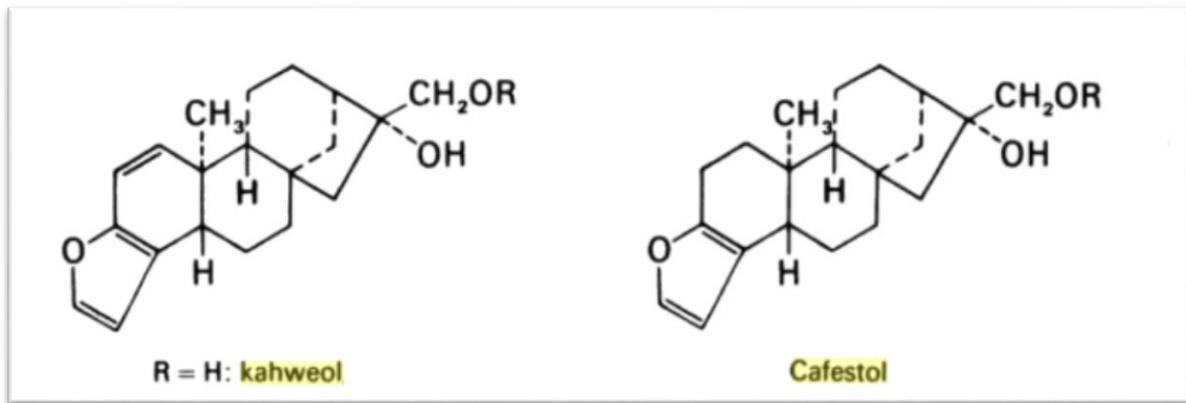
Il s'agit ici de deux alcools pentacycliques. La formule brute du cafestol est  $C_{20}H_{28}O_3$ , son poids moléculaire est de 316,44 g/mol alors que la formule brute du kahweol est  $C_{20}H_{26}O_3$  et son poids moléculaire est de 314,42 g/mol (**Haler, 2013**).

Les diterpènes du café sont d'autant plus intéressants qu'ils exercent des effets pharmacologiques et toxiques inattendu. Le kahweol et le cafestol, représentent ensemble la moitié de l'activité inhibitrice des grains de café vert et agissent évidemment en améliorant l'activité du système de détoxification (**Clarke, 1988**). Ils sont utilisés pour les règles douloureuses (présentes dans le gattilier) et peuvent être antihypertenseurs, insecticides, ainsi que cytotoxique (**Bosman, 2007**).

Les kahwéol et cafestol sont connus pour leur action anticancéreuse et protectrice hépatique, le développement de certains effets anti-inflammatoires, ainsi que pour l'accroissement des teneurs sanguines du cholestérol et des triglycérides (**Figure11**) (**Clarke, 1988 ; Costentin et al, 2010 ; Haler, 2013**).



**Figure 10:** les acides chlorogéniques (Haler, 2013)



**Figure 11:** les structures chimiques de cafestol et de kahweol (Clarke, 1988)

### V. Utilisation du caféier en médecine traditionnelle

On retrouve dans la médecine traditionnelle plusieurs recherches relatives à l'application du caféier, en effet cette plante contient différentes parties qui ont été utilisées comme médicaments humain et vétérinaire (Belayneh et Bussa, 2014).

Les chamans d'Éthiopie préconisent son utilisation à titre médicinale pour traiter les maux de tête, de ventre ou musculaires. L'écorce humidifiée était appliquée sur les plaies, mais aussi la graine bleue qu'on croquait en cas d'insomnie. (GEO, 2011)

En 2014 dans une étude ethnopharmacologique réalisée par (Belayneh et Bussa, 2014) il a été prouvé que le café a été utilisé comme traitement pour plusieurs symptômes ou maladies tels que les douleurs intestinales, la diarrhée, grippe, migraine, anémie, maladies du foie, douleurs à l'estomac et fièvre.

Pour traiter les intoxications accompagnées de diarrhée et de nausées les ethiopiens consommaient une boisson à base de lait, de miel et du péricarpe des cerises du café (Belayneh et Bussa, 2014).

L'extrait aqueux des graines séchées était utilisé pour la fatigue au Pérou et comme médicament cardiotonique et neurotoxique mais aussi comme un traitement contre l'asthme en Inde.

Les feuilles fraîches du café sont également utilisées dans le traitement des maux d'estomac par décoction et comme un antitussif en infusion. Elles sont aussi efficaces contre la fièvre et dans la stimulation de la production de prolactine. Le charbon de café était utilisé pour traiter les maladies inflammatoires de la bouche et du pharynx.

La caféine est considérée comme un puissant antioxydant et fait du café une boisson bénéfique pour la santé car elle peut améliorer la performance athlétique et augmente la capacité de travail. Plusieurs nouvelles recherches font état de nombreux avantages dont la diminution du risque de diabète, protection contre le stress oxydatif provoqué par l'aérobic, diminution d'inflammation chronique mais aussi la prévention du cancer et de l'Alzheimer et l'amélioration de l'humeur. Autres antioxydants sont présents dans le café : l'acide caféique et l'acide chlorogénique qui contribuent à neutraliser les radicaux libres qui causent le stress oxydatif. C'est ce dernier qui peut mener à l'inflammation chronique, qui est une des principales causes de maladies et de mort prématurée (**Liu et al., 2011**).

# **Matériel et Méthodes**

Cette étude a été réalisée au sein du laboratoire Antibiotiques Antifongiques: physico- chimie, synthèse et activité biologique(LAPSAB), Faculté des Sciences de la Nature et la Vie et des Sciences de la Terre et de l'Univers, Université Abou Bekr Belkaid Tlemcen.

Elle comporte deux parties :

**Première partie :** La préparation des extraits (aqueux et dichlorométhane) à partir des graines de *Coffea arabica*, un dosage du taux des polyphénols totaux ; des flavonoïdes et des tanins de ces extraits.

**Deuxième partie :** Une évaluation de l'activité antioxydant de ces mêmes extraits.

## I. Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé dans cette étude est les graines vertes du café de l'espèce *de Coffea arabica*. Ces graines ont été importées en 2018 en Ethiopie, et ont été importées par une société de torréfaction. Elles ont été ensuite conservées au laboratoire à l'abri de la lumière, et à température ambiante jusqu'à l'usage.

## II. Méthodes

### II.1. Préparation des extraits

L'extraction solide-liquide de graines vertes de *Coffea arabica* a été effectuée en mode décoction. Une quantité de 10g de graines vertes de café broyées ont été mises en contact avec 100ml de deux solvants différents : eau et dichlorométhane. Le mélange a été porté à ébullition sous reflux pendant une heure. Le mélange a été filtré à l'aide d'un papier filtre wattman, puis l'extrait obtenu a été évaporé à sec dans un rotavapor à 60°C.

### II.2. Rendements de l'extraction

Le rendement a été calculé par la formule suivante :

$$R(\%) = (m_1/m_2) * 100$$

R(%) : le rendement en %.

m<sub>1</sub> : Masse en gramme de poudre récupérée.

m<sub>2</sub> : Masse en gramme de la matière initiale sèche.

### **III. Etude phytochimique**

#### **III.1. Dosage des polyphénols totaux**

##### **III.1.1. Principe**

Cette technique repose sur une méthode colorimétrique qui utilise le réactif de Folin-ciocolten. Ce dernier est composé d'un mélange d'acide phosphomolybdique ( $H_3PMO_{12}O_{40}$ ) et phosphotungastique ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ). La réduction de ce réactif à partir de l'oxydation des composés phénoliques conduit à la formation d'un complexe bleu qui absorbe à 700 nm.

##### **III.1.2. Mode opératoire**

Le dosage des polyphénols a été effectué selon la méthode décrite par **Vermerius et Nicholson (2006)**.

Un volume de 100  $\mu$ L de chaque extrait a été mélangé avec 2 ml d'une solution de carbonate de sodium à 2%. Après 5 min nous avons ajouté 100  $\mu$ L du réactif de Folin 1N. L'ensemble a été incubé à une température ambiante et à l'abri de la lumière pendant 30 min. l'absorbance a été déterminée via un spectrophotomètre à 700 nm contre un blanc.

Une courbe d'étalonnage aux concentrations allant de 0,0039 à 2 mg/ mL a été réalisée en parallèle et dans les mêmes conditions opératoires en utilisant l'acide gallique comme contrôle positif.

Les taux en polyphénols ont été exprimés en microgramme équivalent acide gallique par milligramme d'extrait ( $\mu$ g EC/ mgE).

#### **III.2. Dosage des tanins**

##### **III.2.1. Principe**

Les tanins condensés se transforment en anthocyanidols de couleur rouge suite à une réaction avec la vanilline. Ils se dépolymérisent en présence d'acide concentré. La lecture de l'absorbance a été réalisée par un spectrophotomètre à 550 nm (**Sun et Richardo-da-Silvia, 1998**).

### III.2.2. Mode opératoire

Le dosage des tanins condensés a été réalisé selon la méthode décrite par **Julkunen-Titto, (1985)**. Une prise de 50  $\mu$ L de chaque extrait a été mélangée avec 3 ml de vanilline (4%). Ensuite, un volume de 1,5 ml de l'acide chlorhydrique (HCl) a été additionné. Le mélange obtenu est laissé réagir à température ambiante pendant 20 min. L'absorbance a été mesurée à 550 nm contre un blanc.

Différentes concentrations comprises entre 1,95 et 2000  $\mu$ g/ mL préparées à partir d'une solution mère de la catéchine, nous ont permis de tracer la courbe d'étalonnage.

Le taux des tanins condensés a été exprimé en microgramme équivalent de catéchine par milligramme d'extrait ( $\mu$ g EC/mg E).

### III.3. Dosage des flavonoïdes

#### III.3.1. Principe

La quantification des flavonoïdes a été effectuée par une méthode adaptée par **Zhishen et al, (1999)** et **Kim et al, (2003)** en utilisant le trichlorure d'aluminium ( $AlCl_3$ ) et la soude. Le trichlorure d'aluminium forme un complexe jaune avec les flavonoïdes et la soude forme un complexe de couleur rose qui absorbe dans le visible à 510 nm.

#### III.3.2. Mode opératoire

Un volume de 500  $\mu$ L de chaque extrait a été mélangé avec 2 mL d'eau distillée et 150  $\mu$ L d'une solution de nitrite de sodium ( $NaNO_2$ ). Après 6 min d'incubation à température ambiante ; 150  $\mu$ l de chlorure d'aluminium ( $AlCl_3$ ) a été ajouté au mélange. Le tout a été laissé pendant 6 min à température ambiante. Par la suite, Un volume de 2 ml de NaOH a été ajouté au milieu ; Puis nous avons ajusté le volume avec de de l'eau distillée a 5 ml. Après agitation et incubation pendant 15 min ; L'absorbance a été lue à 510 nm contre le témoin en utilisant un spectrophotomètre.

Une gamme étalon avec la catéchine a été préparée conjointement dans les mêmes conditions et à différentes concentrations allant de 1,95 à 2000  $\mu$ g/ml et nous a permis de tracer la courbe d'étalonnage. La teneur totale en flavonoïdes a été rapportée en microgrammes équivalent de catéchine, par milligramme d'extrait ( $\mu$ g EQ/mg E).

## IV. Evaluation de l'activité antioxydant

### IV.1. La méthode de FRAP (Potassium Ferricyanide Antioxydant Power)

#### IV.1.1. Principe

Cette méthode repose sur la réduction du fer ferrique ( $Fe^{+3}$ ) présent dans le complexe  $k_3Fe(CN)_6$  en fer ferreux ( $Fe^{+2}$ ). Une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés se traduit par une augmentation de l'absorbance. L'absorbance du milieu réactionnel est déterminée à 700nm.

#### IV.1.2. Mode opératoire

Ce test a été réalisé selon la méthode décrite par **(Karagozler et al, 2008)**. Une série de dilutions a été préparée. Un volume de 100 $\mu$ L de différentes concentrations de chaque extrait (0,0078 à 4mg/ml) a été mélangé avec 250  $\mu$ L de la solution tampon phosphate (0,2M ; pH=6,6) et 250  $\mu$ L de la solution de ferricyanure de potassium ( $k_3Fe(CN)_6$  à 1%). Après incubation des tubes à 50°C pendant 20min, nous avons ajouté 250 $\mu$ l de l'acide trichloracétique (TCA 1%). Ensuite, 500  $\mu$ l de chaque tube ont été mis en contact avec 500  $\mu$ L d'eau distillée et 100  $\mu$ L de  $FeCl_3$  (0,1%). L'absorbance a été déterminée à l'aide d'un spectrophotomètre à 700 nm contre un blanc.

### IV.2. La méthode de Piégeage du radical ABTS $\bullet^+$

#### IV.2.1. Principe

L'usage du piégeage du radical ABTS $\bullet^+$  est l'un des tests les plus utilisés pour déterminer la capacité d'un antioxydant à réagir avec le radical ABTS $\bullet^+$  (2,2'-azinobis-3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonate). Il repose sur la neutralisation d'un radical cation résultant de la mono électronique oxydation du chromophore synthétique (2,2'- azino-bis-3 -éthylbenzothiazoline -6- sulfonique acide). Le virage de la coloration est suivi à 734nm.

#### IV.2.2. Mode opératoire

L'activité de piégeage de radical ABTS $\bullet^+$  est réalisée selon la méthode décrite par **Karaçelik et al. (2015)**.

Le radical cation ABTS est généré en mélangeant un volume d'une solution stock d'ABTS (7 mM) avec une solution de persulfate de potassium (2,45 mM). La solution obtenue est incubée à une température ambiante et à l'abri de la lumière pendant 12 à 16 h. L'éthanol a été ajouté à la solution finale pour obtenir une absorbance finale de  $0,7 \pm 0,02$  à 734 nm. Ensuite, dans des tubes à essais, 40  $\mu$ l de différentes concentrations de chaque extrait ont été mélangées avec 160  $\mu$ L de la solution d'ABTS préparée. La lecture a été réalisée à 734 nm après 30 min d'incubation à l'obscurité à l'aide d'un spectrophotomètre et contre un blanc.

Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition selon la formule suivante :

$$\% \text{ d'inhibition} = [(A_c - A_{ech}) / A_c] \times 100$$

**$A_c$ : absorbance de contrôle.**

**$A_{ech}$ : absorbance de l'échantillon.**

### IV.3. Evaluation de l'activité antioxydante par la méthode DPPH

#### IV.3.1. Principe

Afin d'étudier l'activité anti-radicalaire des différents extraits, nous avons utilisé le DPPH (2,2 Diphenyl 1 picryl hydrazyl) comme radical libre instable. Ce radical devient stable en acceptant un radical libre hydrogène.

En présence des piègeurs de radicaux libres, le DPPH de couleur violette se réduit en 2,2 Diphenyl 1 picryl hydrazine de couleur jaune. L'évolution de l'absorbance a été suivie par spectrophotomètre à 517 nm.

#### IV.3.2. Mode opératoire

Le piégeage du DPPH a été étudié selon la méthode décrite par *Sanchez-Morino et al.(1998)*. 50 µL de chaque extrait à différentes concentrations (0,0078 à 2mg/ml) ont été mélangés avec 1950 µl de la solution du DPPH (0,025 mg/ ml) fraîchement préparée. Un contrôle négatif a été préparé parallèlement en mélangeant 50 µl de méthanol avec 1950 µl de la solution DPPH.

Après 30 min d'incubation à l'obscurité, la lecture a été réalisée à l'aide d'un spectrophotomètre à 517 nm contre un blanc pour chaque concentration. L'acide ascorbique et BHA ont été utilisés comme des contrôles positifs. Le test a été répété 3 fois.

Une gamme d'étalonnage d'acide ascorbique et BHA a été utilisée comme contrôle positif.

La formule utilisée dans le calcul du % d'inhibition est la suivante :

$$\% \text{ DPPH} = [(A \text{ contrôle} - A \text{ échantillon}) / A \text{ contrôle}] \times 100$$

Avec :

- %DPPH : Pourcentage de réduction du DPPH
- A contrôle : Absorbance du tube contrôle négatif
- A échantillon : Absorbance de l'échantillon.

#### **IV.4. Capacité antioxydante totale (CAT) : test de phosphomolybdate**

##### **IV.4.1. Principe**

Le test phosphomolybdate (PPM) est basé sur la réduction de l'ion  $\text{Mo}^{+6}$  en ion  $\text{Mo}^{+5}$  dans un milieu acide en présence des substances réductrices contenues dans l'extrait végétal qui forment avec le phosphate- $\text{Mo}^{+5}$  des complexes de couleur verdâtre (Prieto *et al.*, 1999).

Ce test est différent des autres car il nous permet de quantifier l'apport de l'activité antioxydante des polyphénols et d'autres composés antioxydants tel que les vitamines (C, E...).

##### **IV.4.2. Mode opératoire**

200  $\mu\text{L}$  de chaque extrait à différentes concentrations ont été mélangés à 2 mL du réactif déjà préparé à partir d' $\text{H}_2\text{SO}_4$  (0,6 M), de  $\text{Na}_2\text{PO}_4$  (28 mM) et du molybdate d'ammonium (4 mM). Parallèlement un tube témoin a été préparé en associant 200  $\mu\text{L}$  DMSO avec 2000  $\mu\text{L}$  du réactif.

Par la suite ; l'incubation des tubes a été effectuée à  $95^\circ$  pendant 2h ; l'absorbance a été mesurée à 695 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. Les résultats obtenus sont exprimés en mg équivalent acide ascorbique par gramme de matière sèche de L'extrait (mg EAA/g E).

##### **Analyse statistique**

L'analyse statistique les données a été réalisées à l'aide du logiciel Excel 2010. Les variables quantitatives ont été exprimées en moyennes et en écarts types. Le test de student a été réalisé grâce au logiciel MINITAB version 16.2. La comparaison des moyennes a été réalisée par la valeur de p ( $<0.05$ ).

## **CHAPITRE 4 : Resultats et interpretations**

### I. Rendements des extraits

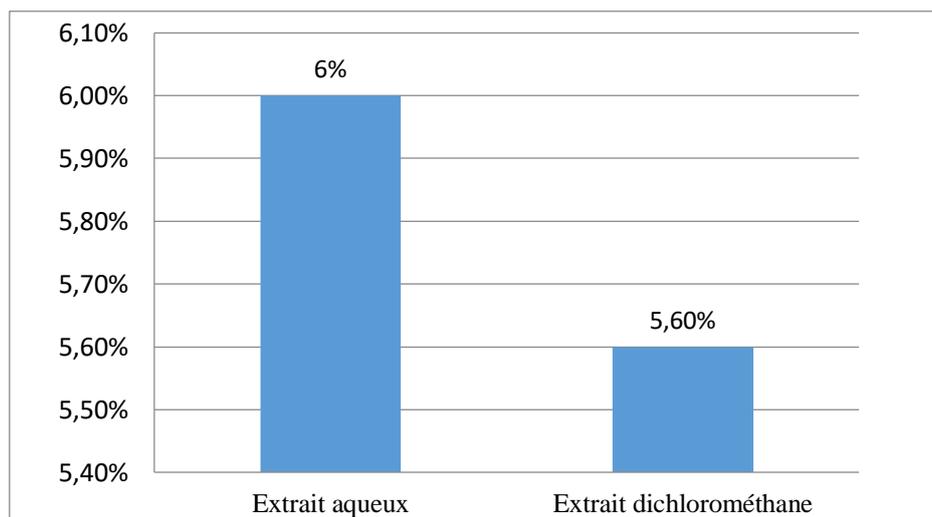
Deux extraits ont été utilisés dans cette étude : l'extrait aqueux et l'extrait dichlorométhane. Ces deux extraits ont été obtenus en utilisant deux solvants de polarités différentes. Les résultats des rendements et des caractéristiques des deux extraits sont représentés dans le **Tableau 3** et la **Figure 12**.

Le meilleur rendement était celui de l'extrait aqueux (6%) suivi par l'extrait dichlorométhane (5,6 %). Les extraits ont été obtenus sous forme de pâte de couleurs différentes en fonction du solvant utilisé. La solubilité des deux extraits est elle aussi différente selon la polarité du solvant utilisé. L'extrait aqueux est soluble dans l'eau distillée et l'extrait dichlorométhane est soluble dans le DMSO.

Il est clair que les rendements varient beaucoup en fonction de la matrice végétale, la nature du solvant d'extraction et la méthode d'extraction, aussi bien de la température et du temps de contact.

**Tableau 3:**Caractéristiques des extraits des graines vertes de *Coffea arabica*

	<b>Aspect</b>	<b>Couleur</b>	<b>Solubilité</b>
Extrait aqueux	Pâteux	Jaune	Eau distillée
Extrait dichlorométhane	Pâteux	Marron	DMSO



**Figure 12:**Rendements d'extraction des graines vertes de *Coffea arabica*

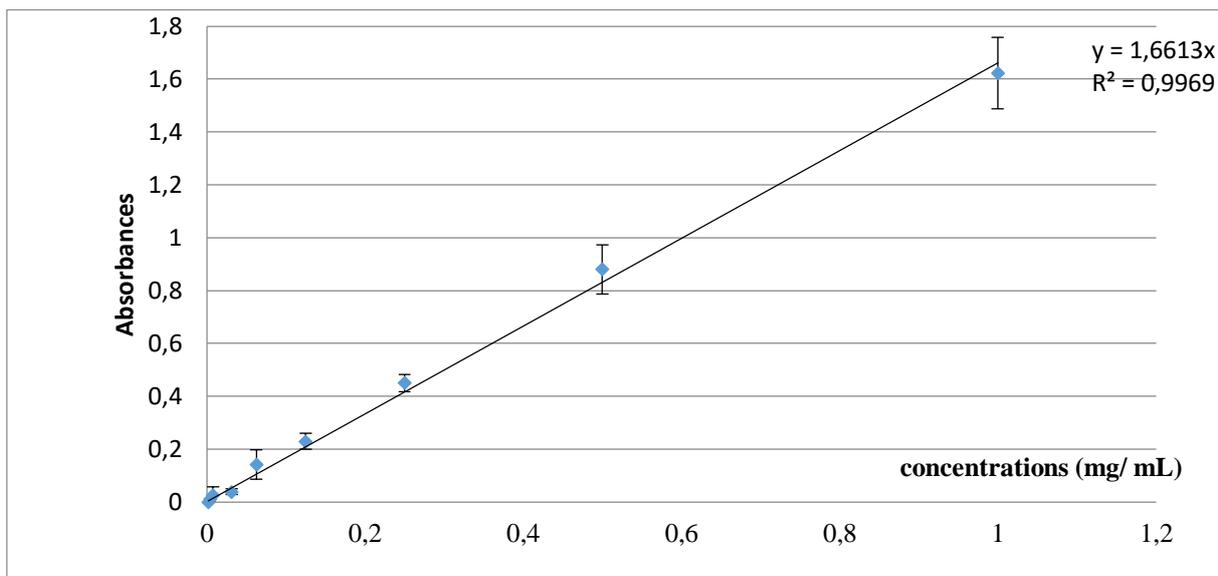
## II. Dosage des métabolites secondaires

### II.1. Les polyphénols

La teneur en polyphénols estimée par la méthode de Folin- Ciocalteu pour chaque extrait a été calculée par extrapolation des valeurs des absorbances obtenues à 725 nm en utilisant l'équation de régression linéaire  $y = 1.6613X$  obtenue à partir de la gamme d'étalonnage (Figure 13).

Les valeurs obtenues sont exprimées en microgramme équivalent acide gallique par milligramme de l'extrait ( $\mu\text{g EAG/ mg}$ )

D'après les résultats (Tableau 4), nous pouvons constater que l'extrait aqueux représente l'extrait le plus riche en polyphénols avec un taux égale à  $152,11 \pm 12,88 \mu\text{g EAG/mg E}$  contrairement à l'extrait dichlorométhane qui a faible teneur en polyphénols de l'ordre de  $21,01 \pm 2,76 \mu\text{g EAG/mg E}$ . La différence de taux entre les deux extraits est statistiquement significative, et ceci avec un p-value = 0,000066631 (\*\*\*)  $p < 0,001$ ).



**Figure 13:** La courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols.

**Tableau 4:** Teneurs en polyphénols totaux dans les deux extraits

	L'extrait dichlorométhane	L'extrait aqueux
<b>Polyphénols totaux (<math>\mu\text{g EAG/mg d'extrait}</math>)</b>	$21,01 \pm 2,76$	$152,11 \pm 12,88$

## II.2. Les tanins

Ce dosage a été réalisé selon la méthode colorimétrique utilisant le réactif vanilline comme agent de détection pour chaque extrait. Nous avons calculé les résultats à partir de l'équation de régression linéaire de la courbe d'étalonnage  $y = 0,0823 x$  (Figure 14). Les résultats sont exprimés en microgramme équivalent Catéchine par milligramme d'extrait ( $\mu\text{g EC}/\text{mg E}$ )

Ce dosage a révélé une très faible teneur en tanins dans l'extrait dichlorométhane ( $5,16 \pm 8,16 \mu\text{g EAG}/\text{mg E}$ ) et l'absence totale des tanins dans l'extrait aqueux (Tableau 5). La différence entre les deux extraits sont statistiquement pas significative et ceci avec un  $p\text{-value} = 0,334999$  ( $p > 0,05$ ).

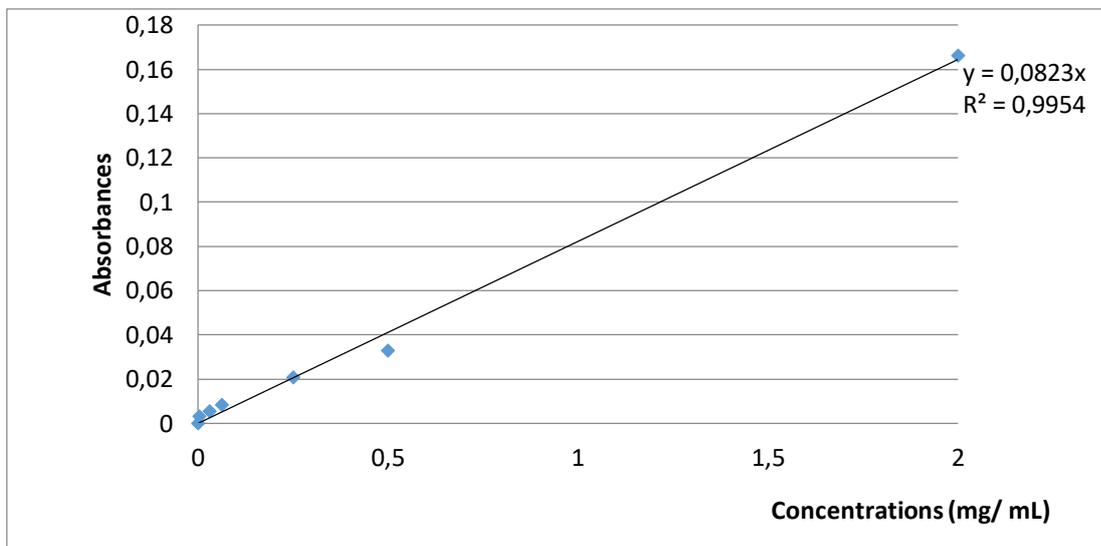


Figure 14: La courbe d'étalonnage de la catéchine pour le dosage des tanins condensés

Tableau 5: Teneurs en tanins dans les deux extraits

	L'extrait dichlorométhane	L'extrait aqueux
Tanins ( $\mu\text{g EAC}/\text{mg E}$ )	$5,16 \pm 8,16$	0

### II.3. Les flavonoïdes

Le taux des flavonoïdes a été calculé en utilisant le réactif  $\text{AlCl}_3$  et en se référant à l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage obtenu en utilisant la catéchine comme standard. L'équation utilisée est  $y = 0,6343x$  (Figure 15). Les résultats obtenus sont exprimés en  $\mu\text{g}$  équivalent catéchine par mg d'extrait ( $\mu\text{g EC/mg}$  d'extrait).

Les résultats obtenus au cours de ce dosage montrent que la teneur la plus élevée est déterminée dans l'extrait dichlorométhane qui renferme  $229,65 \pm 14,65 \mu\text{g EAG/mg E}$  suivie par l'extrait aqueux qui contient  $144,98 \pm 12,75 \mu\text{g EAG/mg E}$  (Tableau 6). La différence entre les deux taux est statistiquement significative et ceci avec un p-value =  $0,00164986$  (\*\* p < 0,01).

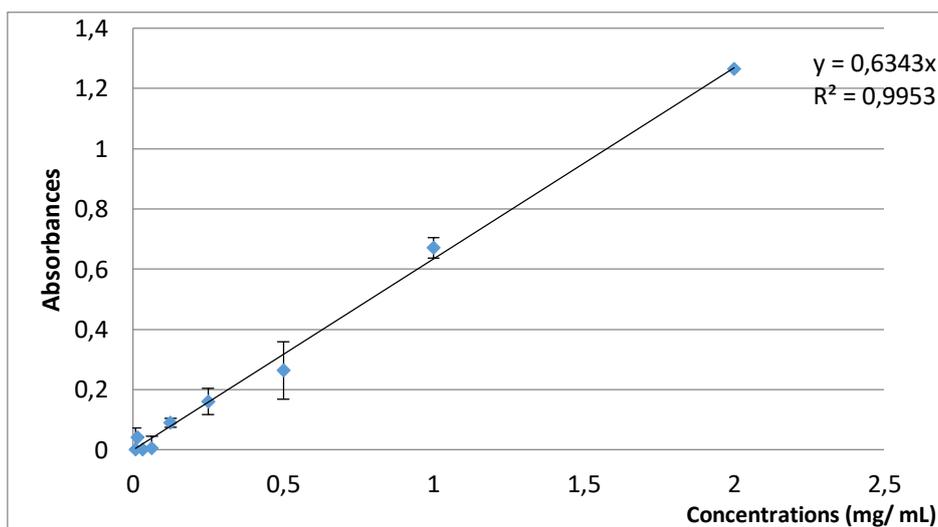


Figure 15: La courbe d'étalonnage de la catéchine pour le dosage des flavonoïdes.

Tableau 6: Teneurs en flavonoïdes dans les deux extraits

	L'extrait dichlorométhane	L'extrait aqueux
<b>Flavonoïdes</b> ( $\mu\text{g EAC/mg E}$ )	$229,65 \pm 14,65$	$144,98 \pm 12,75$

### III. Evaluation de l'activité antioxydante

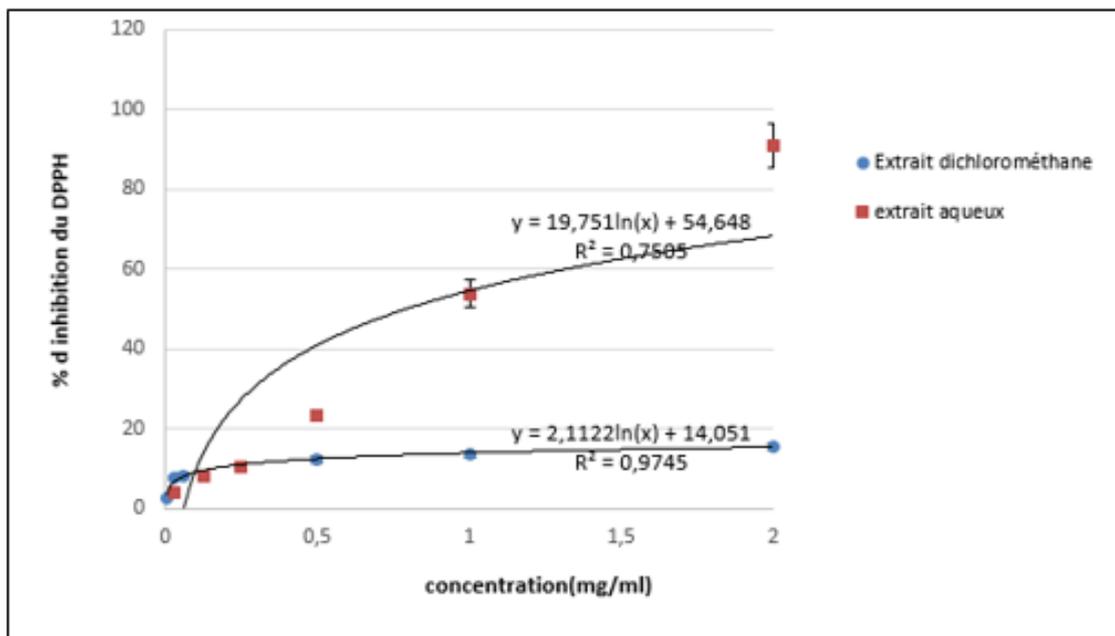
Afin d'étudier l'activité antioxydante de nos deux extraits, nous avons utilisé quatre méthodes différentes à savoir : le test de piégeage du radical DPPH<sup>+</sup>; le test de réduction du fer FRAP, le test de réduction du radical ABTS et la capacité antioxydante totale CAT.

#### III.1. Piégeage du radical libre 2,2-diphényle-1-picrylhydrazyl (DPPH)

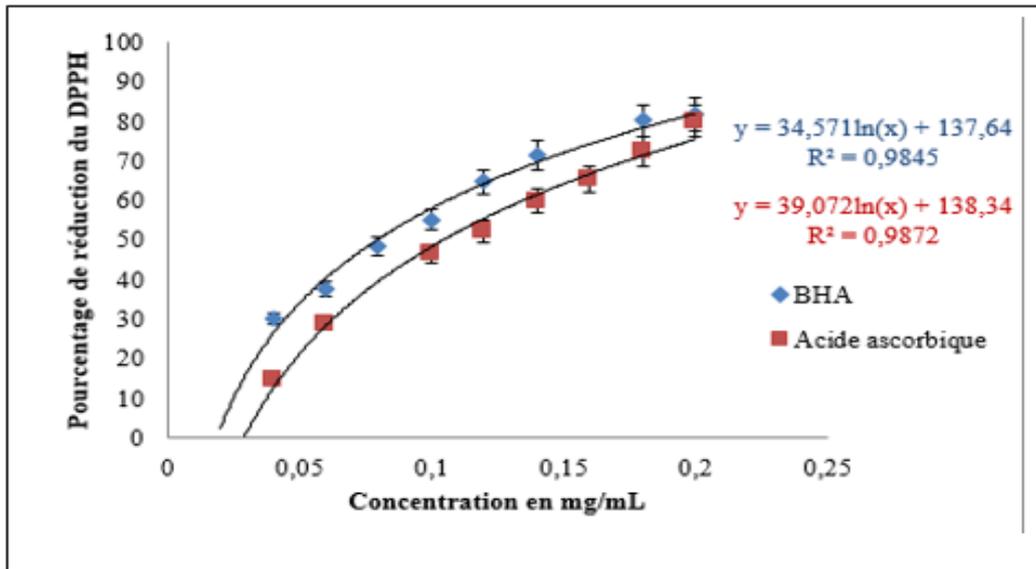
Les résultats piégeage du radical libre DPPH<sup>+</sup> sont exprimés en pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH<sup>+</sup> en fonction des concentrations des extraits ainsi que les standards. Les **Figures 16** et **17** représentent les profils de l'activité antiradicalaire tracée sous forme de courbes logarithmiques.

D'après les résultats, nous constatons que les pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH<sup>+</sup> évoluent avec les concentrations des standards (l'acide ascorbique, BHA) et des différents extraits selon une équation logarithmique.

Nous remarquons aussi que l'extrait aqueux a enregistré un pourcentage d'inhibition plus important que celui de l'extrait dichlorométhane.



**Figure 16:** Evolution des pourcentages d'inhibition du DPPH en fonction des extraits de la plante



**Figure 17:** Evolution des pourcentages d'inhibition du DPPH en fonction des concentrations de BHA et de l'acide ascorbique

L'activité antiradicalaire des différents extraits et des standards a été ensuite exprimée sous forme de  $CI_{50}$ , ce qui correspond à la concentration nécessaire pour réduire 50 % du radical DPPH. Plus la valeur d' $IC_{50}$  est basse plus l'activité antioxydante de l'extrait est grande.

Les valeurs des  $CI_{50}$  sont représentées dans le **Tableau 7**. En comparant nos résultats ; il s'avère que l'extrait aqueux présente une très bonne activité antioxydante car il enregistre la plus basse  $CI_{50}$  avec une valeur de  $0,79 \pm 0,03$  mg/ ml ; par rapport à celle de l'extrait dichlorométhane. Cependant les standards (acide ascorbique et BHA) ont révélé des  $CI_{50}$  très basses par rapport à nos extraits.

**Tableau 7:**  $CI_{50}$  des différents extraits de *Coffea arabica* et des standards

	Extrait aqueux	Extrait dichlorométhane	BHA	Acide ascorbique
$CI_{50}$ (mg/mL)	<b><math>0,79 \pm 0,03</math></b>	> 2	<b><math>0,07 \pm 0,24</math></b>	<b><math>0,1 \pm 0,32</math></b>

<b>Equation utilisée</b>	<b><math>Y=19,751\ln x+54,648</math></b>	<b><math>Y=2,11\ln x+14,051</math></b>	<b><math>Y=34,5</math> <b><math>\ln x+137,64</math></b></b>	<b><math>Y=39,072\ln x+138,34</math></b>
------------------------------	--	--	---	--

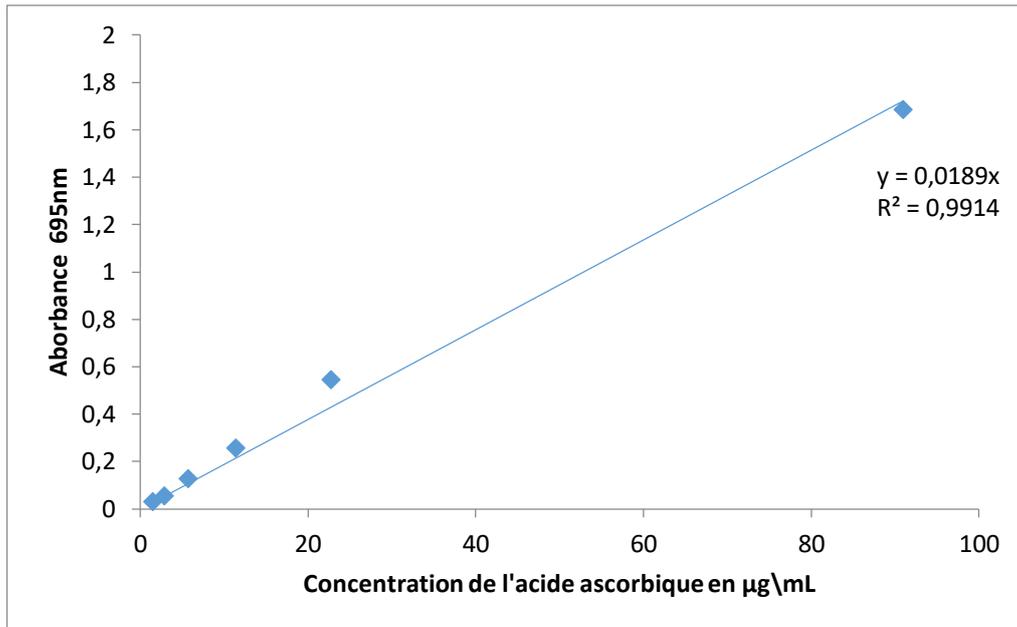
### III.2. Capacité antioxydante totale (CAT)

La capacité antioxydante totale des extraits étudiés est exprimée en nombre d'équivalents acide ascorbique à partir de la courbe d'étalonnage de la **Figure 18** ( $y = 0,0189 x$  ;  $R^2 = 0,9914$ ). Les résultats obtenus sont exprimés en  $\mu\text{g}$  équivalent d'acide ascorbique par mg de l'extrait sec ( $\mu\text{g EAA/ mg E}$ ).

D'après les résultats obtenus, l'estimation de la capacité antioxydante totale des deux extraits a montrée une variabilité en fonction de la nature du solvant utilisé pour l'extraction. L'extrait aqueux a révélé une Capacité antioxydante Total de l'ordre de  $2,094 \pm 0,52 \mu\text{g EAA/mg E}$  alors que l'extrait dichlorométhane a enregistré une valeur qui grimpe au triple et qui est de l'ordre de  $6,692 \pm 0,93 \mu\text{g EAA/mg E}$ .

Nous pouvons dire donc que l'extrait dichlorométhane possède une capacité antioxydante total plus appréciable que celle de l'extrait aqueux. Les différences entre les deux extraits sont statistiquement significatives avec un p-value = 0,00174367 (\*\* p < 0,01).

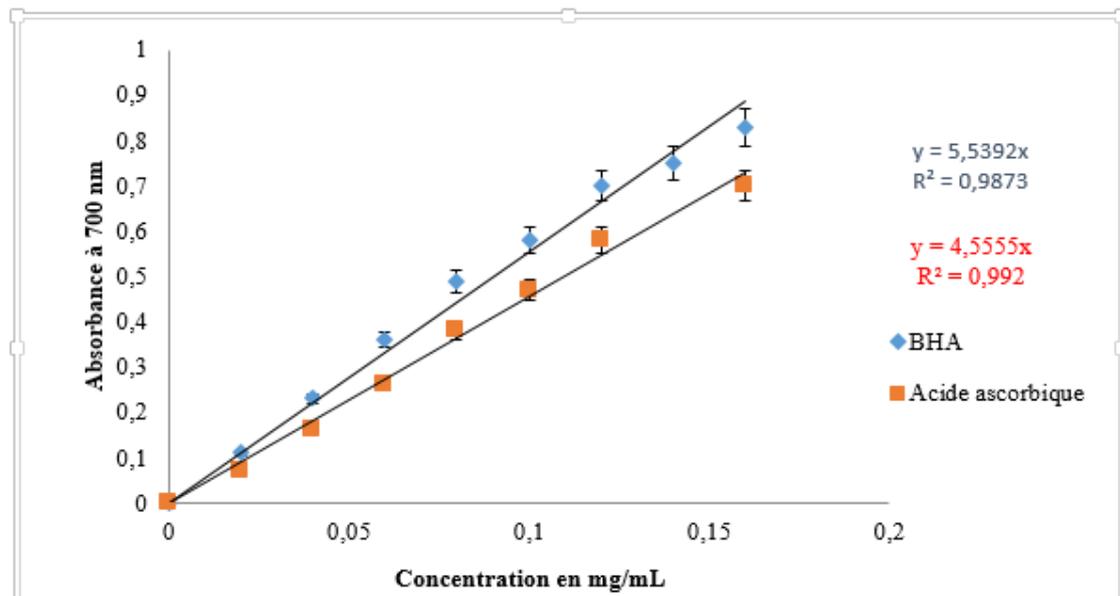
Ce pouvoir antioxydant observé dans les deux extraits peut être dû essentiellement à la richesse des extraits en polyphénols particulièrement les flavonoïdes, et aussi en fonction des structures chimiques des molécules bioactives.



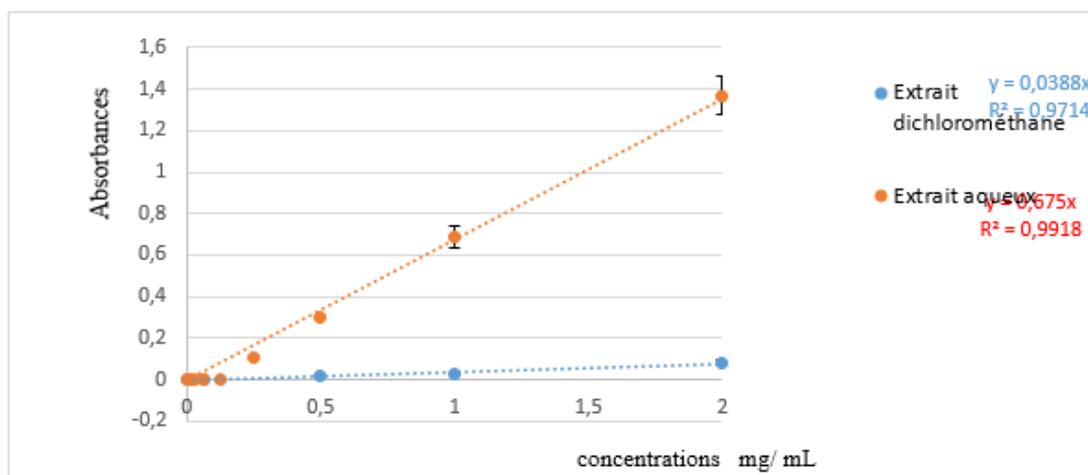
**Figure 18:** Courbe d'étalonnage de la capacité antioxydant total de l'acide ascorbique.

### III.3. Le pouvoir réducteur du Fer (FRAP)

Dans cette partie, les résultats obtenus nous ont permis de tracer des courbes linéaires. A partir de ces courbes nous avons déterminé les  $CE_{50}$  (**Figures 19 et 20**). Les résultats montrent que l'extrait aqueux présente une très bonne capacité à réduire le fer par rapport à l'extrait dichlorométhane.



**Figure 19:** Evolution du pouvoir réducteur du fer des antioxydants BHA et l'acide ascorbique



**Figure 20:** Evolution des absorbances du fer réduit en fonction des concentrations des extraits. Nous avons déterminé ensuite la concentration effective  $CE_{50}$  des deux extraits des grains de *Coffea arabica* et des standards à partir des équations de régression linéaire. Les résultats obtenus sont représentés dans le **Tableau 8**.

Nous constatons que la meilleure  $CE_{50}$  a été obtenue par l'extrait aqueux ( $CE_{50}=0,74 \pm 0,09$ ). Cette valeur reste moins importante que celles de l'acide ascorbique et BHA.

Nous pouvons dire que l'extrait aqueux possède une activité importante à réduire le fer par rapport au dichlorométhane et confirme les résultats obtenus par la technique d'analyse du

DPPH. L'analyse par le test de Student a montré qu'il existe une différence statistiquement significative entre les deux extraits avec un p-value =0,000775 (\*\*p < 0,001).

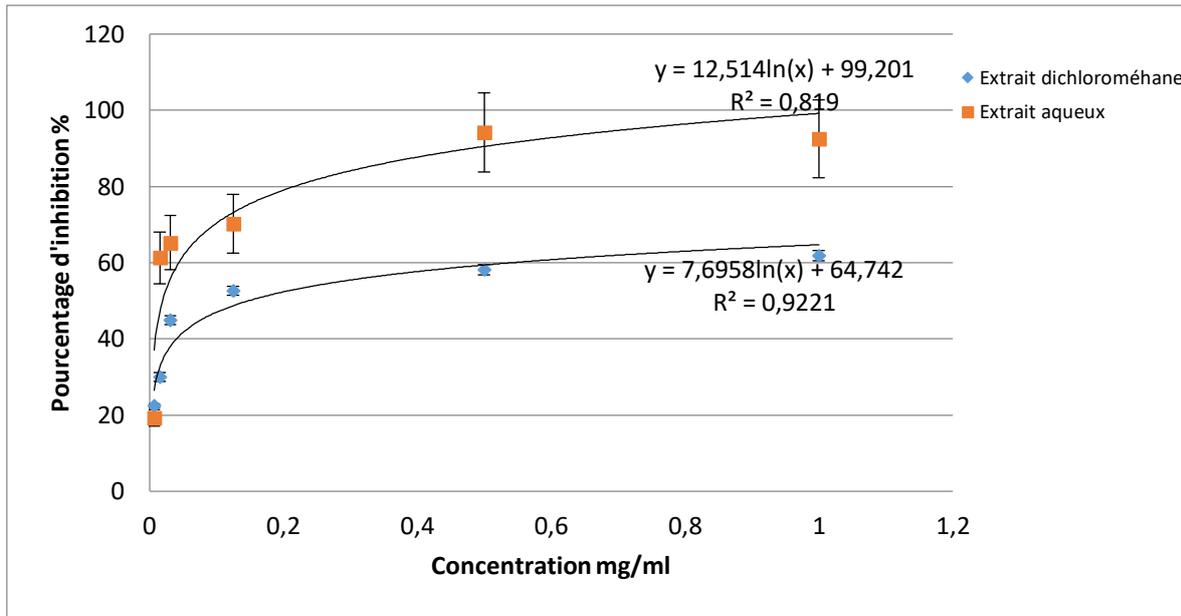
**Tableau 8:**CE<sub>50</sub> des deux extraits de *Coffea arabica* et des standards (BHA et Acide ascorbique)

	<b>Extrait aqueux</b>	<b>Extrait dichlorométhane</b>	<b>BHA</b>	<b>Acide ascorbique</b>
CE <sub>50</sub> (mg/ml)	0,74± 0,09	13,15 ± 0,01	0,09± 0,18	0,109± 0,79
Equation utilisée	Y=0,675x	Y=0,038x	Y=5,539x	Y=4,555x

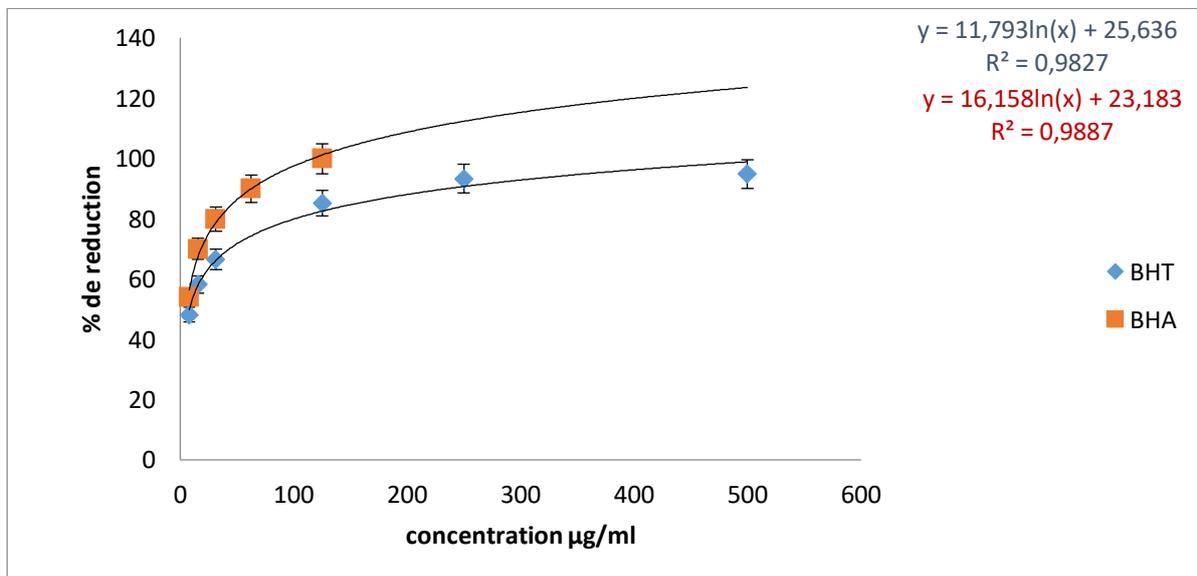
#### III.4. Piégeage du radical ABTS

Ce test est basé sur la capacité d'un antioxydant à stabiliser le radical cationique ABTS<sup>•+</sup>. A partir des valeurs de l'absorbance obtenues, nous avons calculé les pourcentages d'inhibition du radical ABTS. Ces résultats nous ont permis de tracer les différentes courbes logarithmiques (**Figures 21 et 22**). Nous remarquerons que les pourcentages augmentent proportionnellement en fonction des concentrations des standards (BHT, BHA) et des extraits de grains de *Coffea arabica*.

L'extrait aqueux a enregistré une activité inhibitrice du radical ABTS plus élevée (92,57%) que celle de l'extrait dichlorométhane (61,85%) à une concentration de 1 mg/ ml.



**Figure 21:** Pourcentage d'inhibition du radical cationique ABTS en fonction des concentrations de des extraits de la plante



**Figure 22:** Evolution des pourcentages d'inhibition de l'ABTS en fonction des concentrations de BHA et BHT.

A partir des équations des régressions linéaires des graphes, nous avons déterminé la concentration nécessaire pour réduire 50% du radical ABTS ( $IC_{50}$ ) des extraits ainsi que des standards. Les résultats sont représentés dans le **Tableau 9**.

Nous constatons que l'extrait aqueux possède la valeur de la IC<sub>50</sub> la plus basse ( $19,6 \pm 0,01$  µg/ml), ce qui nous conduit à dire que l'extrait aqueux est plus efficace que le dichlorométhane.

Les résultats pour l'extrait aqueux ne sont pas très éloignés de ceux obtenus avec les standards BHA et BHT.

**Tableau 9:** Résultats des valeurs d'IC<sub>50</sub> des différents extraits de *Coffea arabica* et des standards (BHT, BHA)

	<b>Extrait aqueux</b>	<b>Extrait dichlorométhane</b>	<b>BHT</b>	<b>BHA</b>
<b>IC50 (µg/ml)</b>	$19,6 \pm 0,01$	$147 \pm 0,6$	$7,90 \pm 0,76$	$4,93 \pm 0,98$
<b>Equation utilisée</b>	$Y=12,51\ln(x)+99,2$	$Y=7,695\ln(x)+64,74$	$Y=11,79\ln(x)+25,63$	$Y=16,15\ln(x)+23,18$

# **Discussion générale**

Les plantes médicinales représentent une importante source d'antioxydants. Les composés phénoliques sont les principaux composés végétaux ayant une activité antioxydante. Les polyphénols et les flavonoïdes sont des piègeurs très efficaces des radicaux libres et ils sont également des chélateurs des métaux agissant comme inhibiteurs des réactions de Fenton et Haber-Weiss, qui sont des sources importantes de radicaux libres d'oxygène d'après (**Malik et al, 2013**).

L'espèce retenue comme plante d'étude est *Coffea arabica* ; car elle est couramment consommée en Algérie et ses grains n'ont pas fait l'objet de plusieurs études phytochimiques et d'évaluation des activités biologiques.

Nous avons réalisé l'extraction via deux solvants de polarités différentes : l'eau et le dichlorométhane. Suite aux résultats constatés, nous avons remarqué que les rendements des deux extraits sont approximativement les mêmes (6% pour l'extrait aqueux et 5,6% pour l'extrait dichlorométhane). Nos résultats concordent avec ceux de **Kiattisin et ses collaborateurs** qui ont trouvé que l'extrait hexane obtenu par macération des graines vertes de *Coffea arabica* avait une couleur jaune et un rendement 4,82 % (**Kiattisin et al. 2016**). Le même auteur rapporte un rendement égal à 1,93% par le solvant éthanol.

Cependant nos résultats sont inférieurs à ceux de **Benramdane, (2017)**, qui a obtenu un rendement de 23,26% pour l'extrait aqueux sachant que cette étude a été réalisée dans les mêmes conditions que les nôtres.

Ces résultats nous conduisent à conclure que le rendement d'extraction n'est que relatif et il dépend de la méthode, des conditions dans lesquelles l'extraction a été effectuée, de la polarité du solvant utilisé dans l'extraction ainsi que le matériel végétal utilisé.

Nous avons ensuite déterminé les teneurs en polyphénols totaux, en flavonoïdes et en tanins condensés en utilisant des méthodes spectrophotométriques. Nous avons révélé la richesse des graines vertes de *Coffea arabica* en ces métabolites secondaires, particulièrement les polyphénols. En comparant entre les deux extraits, nous constatons que l'extrait dichlorométhane contient plus de flavonoïdes et de tanins par rapport à l'extrait aqueux.

En **2019 NAS** a réalisé une étude par macération sur la même espèce que la nôtre en utilisant l'extrait aqueux et acétate d'éthyle; elle a obtenu des teneurs un peu plus importantes surtout en polyphénols et en tanins qui ont révélés des valeurs de 363 µg EAG/mg E dans l'extrait aqueux et de 374 µg EAG/mg E dans l'extrait acétate).

En 2016 **Kiattisin et ses collaborateurs**, ont réalisé des macérations des graines vertes de *Coffea arabica* par le solvant hexane. Les teneurs obtenues en polyphénols étaient de l'ordre de 255,99 mg EAG/g. En revanche, leur contenu en composés phénoliques totaux dans les extraits d'hexane n'était pas détectable. Ce résultat a été confirmé par **Perdani et al. (2019)** sur des espèces de *Coffea arabica* et *Coffea robusta*, d'origine géographiques différentes.

L'extrait dichlorométhane a présenté une teneur très importante en flavonoïdes (229 µg/ mg d'extrait), résultat supérieur à celui de **Bravo et al. (2013)** qui ont enregistré un taux de polyphénols bas (13,6 mg EAG/g de la matière sèche de grains de *Coffea arabica*). **Silabdi (2010)** a travaillé sur l'extrait aqueux de l'espèce arabica et a trouvé des teneurs inférieures aux nôtres (81 µg EAG/ mg d'extrait).

Le profil polyphénolique des extraits des plantes peut varier sous l'influence de divers facteurs parmi lesquels la variété ; le climat ; la localisation géographique (**Ryan et al. 1999 ; Benlarbi, 2004**), les différentes maladies qui peuvent affecter la plante, la maturité de la plante (**Park et Cha, 2003**) la température et les méthodes d'extraction ainsi que les solvants utilisés. (**Sousa et al., 2008**). Ce contenu phénolique dépend également du type d'extrait, c'est à dire de la polarité du solvant utilisé dans l'extraction. La solubilité élevée des phénols dans les solvants polaires donne la concentration élevée de ces composés dans les extraits obtenus en utilisant les solvants polaires pour l'extraction. Il faut bien noter que la méthode d'extraction influence également sur le contenu total en polyphénols. (**Conde et al., 2009**).

De plus, des études antérieures ont montrés que le grain de café contenait de nombreux composés polyphénoliques tels que l'acide chlorogénique, la mangiférine et les esters d'acide hydroxycinnamique (**Campa et al. 2005; Vignoli et al. 2011; Moreira et al. 2013**). L'acide phénolique majeur dans tous les échantillons de café était l'acide chlorogénique (**Cheon et al. 2013**). De nombreux documents de recherche ont présentés que les composés phénoliques étaient de bon piègeurs de radicaux libres et possèdent un vaste nombre d'activités biologiques in vitro : antibactériennes, anti inflammatoire, anti allergique, anti cancérigène, anti oxydante etc. Par conséquent les extraits qui ont révélé une teneur totale en phénols totaux ont tendance à présenter un niveau élevé d'activité antioxydante. Cette activité antioxydante a été testée par quatre méthodes différentes.

L'extrait aqueux a révélé les activités les plus intéressantes avec trois méthodes différentes (**DPPH, ABTS et FRAP**). **Vignoli et al., (2011)** ont travaillé sur l'extrait aqueux des graines vertes de *Coffea arabica* et ont obtenu une  $IC_{50}$  (DPPH) presque proche à notre valeur ( $CI_{50}=0,02$  mg/mL). Par contre **Kiattisin et ses collaborateurs en 2006**, ont obtenus des valeurs basses avec

les extraits Hexane ( $CI_{50} = 0,790 \pm 2,29$ ) et éthanol ( $CI_{50} = 0,016 \pm 0,01$  mg/mL). Les travaux de **(Sentkowsta et al., 2016)** effectués sur l'extrait aqueux des espèces Arabica et Robusta ont révélé des pourcentages d'inhibitions nettement inférieures (**1,2 et 2,9 %**) par rapport aux nôtres.

Pour l'ABTS, en comparant nos résultats à ceux des travaux réalisés par **Duangjai et al., 2016** ; nous pouvons dire que nous avons obtenu presque la même  $IC_{50}$  (ABTS) (0,0196 mg/ml). Ces chercheurs ont obtenu une  $IC_{50}$  (ABTS) de l'ordre de 18  $\mu$ g/ml pour l'extrait aqueux. Ainsi, **Kiattisin et al., 2016** ont trouvé une  $IC_{50}$  (ABTS) égal à  $790 \pm 2,29$   $\mu$ g/ml pour l'extrait hexane. Ce résultat est nettement inférieur par rapport à celui de notre extrait dichlorométhane ( $0,147 \pm 0,006$ ). De plus, les résultats de **vignoli et al., 2011** sur *Coffea arabica* montrent que l' $IC_{50}$  est égal à 23,78g trolox/100g (le trolox a été utilisé comme contrôle négatif).

Concernant la réduction du fer, la valeur retrouvée (0,74 mg/ml) est proche à la valeur trouvée dans le travail de **Benramdane, 2017** ( $EC_{50} = 0,56$  mg/ml). Cependant l'extrait acétate d'éthyle de **Nas, (2019)** était beaucoup plus efficace ( $EC_{50} = 0,6$  mg/ml) que notre extrait dichlorométhane ( $EC_{50} = 13,15$  mg/ml).

En utilisant le coefficient de corrélation linéaire de Pearson (r), une corrélation positive modérée ( $r = +0,695$ ) entre l'activité antioxydante des infusions de café vert et leur teneur totale en composés phénoliques a été établie, indiquant une contribution importante de ce groupe composés à la neutralisation des radicaux libres de cette boisson. D'autres auteurs ont récemment signalés la même similitude (**Perez-Hernandez, Chavez Quiroz, 2012**).

La caféine (un alcaloïde) et les acides chlorogéniques (un composé phénolique) ont été appelés à avoir un pouvoir antioxydant, comme l'ont récemment démontré des expériences in vivo (**Tsoi et al., 2015**). Par conséquent, une teneur plus élevée en acides chlorogéniques et en caféine est en corrélation avec un pouvoir antioxydant plus élevé (**Tsoi et al., 2015**). En plus, selon **Lv et al. (2010)** et **Tiwi et al., (2014)**, la caféine dans le café réduit le stress oxydatif et protège le système antioxydant: dans les cellules épithéliales pulmonaires induites par l'hypoxie; c'est un inhibiteur des produits de peroxydation lipidique induits par le peroxyde d'hydrogène dans les fibroblastes de la peau humaine, et il réduit la peroxydation lipidique tissulaire et les ROS.

Les différences retrouvées avec les études antécédentes reviennent principalement à la richesse de nos extraits en polyphénols, flavonoïdes et de tanins.

Ces composants peuvent être affectés par une mauvaise conservation ou le stockage de ces graines vertes ainsi que la lenteur du procédé d'importation (**Teketay, 1999**).

En plus, dans l'étude de **Babova et al., (2016)**, plusieurs espèces *C. arabica* de différentes origines ont été testées. Les échantillons du Kenya ont montré la capacité antioxydante la plus élevée, suivi par l'une des échantillons du Pérou et de l'Honduras. La capacité antioxydante la plus faible a été observée pour les échantillons éthiopiens et Guatemala. Ce qui prouve l'influence de l'espèce sur l'activité antioxydante du café.

Enfin, d'après certains auteurs, les extraits montrent les activités antioxydantes les plus élevées par le dosage du pouvoir réducteur, car l'accessibilité stérique du radical DPPH centré sur l'azote affecte fortement la vitesse de réaction des composés antioxydants (**Prior et al., 2005**). Malheureusement, ce résultat n'a pas été confirmé par notre étude.

## **Conclusion et perspectives**

Aujourd'hui, les plantes médicinales ont de nombreuses applications dans divers domaines, notamment en médecine, en pharmacie, en alimentation, en cosmétologie et dans l'agriculture. Car elles confèrent des propriétés biologiques très importantes. Ce regain d'intérêt vient d'une part du fait que les plantes médicinales sont une source inépuisable de substances bioactives, et d'autre part les effets secondaires causés par les médicaments inquiètent les utilisateurs qui se retournent vers des soins moins agressifs pour l'organisme.

Dans le but de trouver de nouvelles sources d'antioxydants naturels, nous nous sommes intéressés à l'étude phytochimique et l'évaluation de l'activité antioxydante de deux extraits des graines vertes de *Coffea arabica*.

L'extraction des graines de la plante a montré que l'extrait aqueux avait le meilleur rendement, le taux le plus élevée en polyphénols (152,11 $\mu$ gEAG/mgE). Tandis que l'extrait dichlorométhane renferme le taux le plus élevé en flavonoides et en tanins condensés (229,65EC/mgE et 5,16  $\mu$ gEAG/mgE respectivement).

L'étude de l'activité antioxydante par les quatre méthodes a montré que l'extrait aqueux révèle la meilleure activité par rapport à l'extrait dichlorométhane (avec une EC<sub>50</sub> égal à 0,74mg/ml pour la méthode de FRAP, et une IC<sub>50</sub> égal à 19,6 $\mu$ g/ml et 0,79mg/ml pour l'ABTS et DPPH respectivement).

D'après nos résultats nous pouvons dire que *Coffea arabica* peut être considéré pour usage en tant que traitements naturels et biologique ainsi comme une source de composés bioactifs très intéressante.

A la lumière de ces résultats, Cette étude préliminaire nécessite d'autre recherches qui s'intéressent à :

- ✓ L'utilisation des autres méthodes d'extraction (macération, infusion.) sur d'autres parties de la plante (racine, feuille, fleur.) avec d'autres solvants organiques (éthanol).
- ✓ L'étude de l'activité anioxydante par d'autres méthodes in vitro : ORAC (Oxygen Radical Absorbance Activity), Test de blanchiment du  $\beta$ -carotène, Piégeage du radical peroxyde (ROO•) par la méthode de TRAP... Et in vivo en mesurant l'activité des enzymes antioxydantes (superoxyde dismutase, catalase).
- ✓ L'étude des autres activités biologiques à savoir les propriétés antimicrobienne, anti-inflammatoire et antivirale, anticancéreuse et antidiabétique...

## **Références Bibliographiques**

1. Abumweis S.S., Barake R., Jones P.J., 2008. « Plant sterols/stanols as cholesterol lowering agents: A metaanalysis of randomized controlled trials ». *Food Nutr Res*,
2. Adda K., Ais Y., 2018. Caractérisation des graines et d'huile d'amandes amères de la région Aomar (Bouira), Essai de valorisation par incorporation dans un produit Cosmétique. Mémoire de fin d'études en vue de l'obtention du diplôme master. Université akli mohand oulhadj – bouira -.
3. Adler S., 2014. Impacts histo-morphologiques et biochimiques de la mutation laurina sur les graines et les plantules de *Coffea arabica* L, *Sciences agricoles*. Université de la Réunion, p. 28-36.
4. Affonso R.C.L., Voytena A.P.L., Fanan S., Pitz H., Coelho D.S., Horstmann A.L., et al., 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. *Plant-Derived Antioxidants in Disease Prevention*.
5. Alain dit Philippe B., Banga B.N., Adou F.Y., Jean David N., & Allico Joseph D., 2011. Activités antioxydantes de dix plantes médicinales de la pharmacopée ivoirienne. Université d'Abobo-Adjamé 02 BP 801 Abidjan 02. *Sciences & Nature* Vol. 8 N°1: p. 1 – 11.
6. Ali S.S., Kasoju N., Luthr A., Singh A., Sharanabasava H., Sahu A., Bora U., 2008. Indian medicinal herbs as sources of antioxidants. *Food Res Int*, 41: p. 1–15.
7. Allain P., 2009. *Connaissance du médicament*. Pharmacorama.
8. Allred K.F., Yackley K.M., Vanamala J., Allred C.D., 2009. Trigonelline Is a Novel Phytoestrogen in Coffee Beans. *The Journal of Nutrition*, 139: p. 1833–1838.
9. Sun B., Richardo-da-Silvia J.M., Spranger I., 1998. "Critical factors of vanillin assay for catechins and proanthocyanidins" *J. of Agriculture and Food Chemistry*, Vol. (46), 4267p.
10. Bakkali F., 2008. Biological effects of essential oils- A review, *Food and Chemical Toxicology*. 46: p, 446-475.
11. Barsalobres-Cavallari C.F., Severino F., Mirian Maia I.G., 2009. Identification of suitable internal control genes for expression studies in *Coffea arabica* under different experimental conditions.
12. Belayneh A., Bussa N.F., 2014. Ethnomedicinal plants used to treat human ailments in the prehistoric place of Harla and Dengego valleys, eastern Ethiopia. *Journal of ethnobiology and ethnomedicine*, 10(1), p18 .

13. Benayad N., 2008. Les Huiles Essentielles Extraites Des Plantes Medicinales Marocaines : Moyen Efficace De Lutte Contre Les Ravageurs Des Denrees Alimentaires Stockees. Université Mohammed V – Agdal. Faculté Des Sciences De Rabat, p59.
14. Benramdane H., 2017. Contribution à l'étude phytochimique et activités biologiques des extraits des graines de coffea arabica. Mémoire Présenté en vue de l'obtention du diplôme de Master. Université Abou Bekr Belkaid Tlemcen.
15. Benzie I., Strain J.J., 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power : the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239: p 70-76.
16. Bertrand H., Bernard R., 2009. L'exceptionnelle histoire d'une plante indigène. Le rift est-africain : une singularité plurielle, p 251-258.
17. Beta T., Nam S., Dexter J.E., Sapirstein H.D., 2005. Phenolic Content and Antioxidant Activity of Pearled Wheat and Roller-Milled Fractions. *Cereal Chem.* 82(4), 390–393.
18. Blomhoff J.R., 2006. Content of redox-active compounds (antioxidants) in foods consumed in the United States *Am J Clin Nutr.* 84; p 95-135.
19. Bloor S. J., 2001. *Method Enzymol.* 335,p 3-14.
20. Bonneval P., 2006. L'herboristerie : manuel pratique de la santé par les plantes pour l'homme et l'animal (phytothérapie, aromathérapie, oligothérapie, vitaminothérapie). Méolans-Revel : Éditions DésIris.
21. Bosman A., Mendis K.N., 2007. A major transition in malaria treatment: the adoption and deployment of artemisinin-based combination therapies, *Am. J. Trop. Med. Hyg* , 77 (6),p 193-197.
22. Botineau M., 2010. Botanique systématique et appliquée des plantes à fleurs. Lavoisier. TEC et Doc.
23. Boudjouref M., 2011. Etude de l'activité antioxydant et antimicrobienne d'extraits d'Artemisia campaestris L. Mémoire pour l'obtention du diplôme de Magister. Université Farhat Abbes, Sétif.
24. Bouhadjrak., 2011. Étude de l'effet des antioxydants naturels et de synthèses sur la stabilité oxydative de l'huile d'olive vierge : thèse pour l'obtention du diplôme de magister université de Mouloud Mammeri, Tizi –ouzou .
25. Boyd B., Ford C., Koepke M.C., Gary K., Horn E., McAnalley S., McAnalley B., 2003. Etude pilote ouverte de l'effet antioxydant d'Ambrotose sur des personnes en bonne santé. *Glycoscience & Nutrition.* 4 (6):7. (cited in Mohammedi Z, 2005).

26. BRAHIMI I., TERRAI R., 2018. Evaluation de l'activité antioxydante des deux plantes *Rosmarinus officinalis* et *Curcuma longa*. Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master. Université des Frères Mentouri Constantine 1.
27. Brand-Williams W., Cuvelier M.E., Berset C., 1995. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm wiss Technology*, 28: p 25-30.
28. Bravo J., Monente C., Juárez I., Paz de Peña M., Cid C., 2013. Influence of extraction process on antioxidant capacity of spent coffee. *Food Res Int*, 50: p 610-6.
29. British Coffee Association 2009. Further scientific information for healthcare professionals about coffee and health. [www.coffeeandhealth.org](http://www.coffeeandhealth.org).
30. Campa C., Doubeau S., et al., 2005. Diversity in bean caffeine content among wild *Coffea* species : Evidence of a discontinuous distribution. *Food Chemistry* 91: p 633-637.
31. Cao G.H., Alessio H.M., Cutler R.G., 1993. Oxygen-Radical Absorbency Capacity Assay for antioxidants. *Free Radical Biol Med*, 14: 303-311.
32. Cecchini T., 2003. Avec collaboration de Ticli B. Encyclopédie des plantes médicinales (savoir, reconnaître les plantes et les utiliser préparations médicinales spécifique dictionnaire des maladies et des remèdes). Éditions de Vecchi. p-29.
33. Charfi D., 1995. Effet des eaux usées traitées sur les caractéristiques physico-chimiques du sol et sur la physiologie de quelques espèces végétales cultivées au périmètre d'ElHajeb(Sfax). Thèse en écologie végétale, Fac. Sci. De Sfax.
34. Chu Y., 2012. Coffee: Emerging Health Effects and Disease Prevention. John Wiley & Sons, p 28-34.
35. Clarke R.J., Macrae R., 1988. Coffee: Physiology. Springer Science & Business Media.
36. C.F.C., 2013. Comité Français du Café, Café, <http://www.cafes-negrita.fr/liensaut.html>.
37. Conde E., Cara C., Moure A., Ruiz E., Castro E., & Dominguez H., 2009. Antioxidant activity of the phenolic compounds released by hydrothermal treatments of olive tree pruning. *Food Chemistry*, 114 (3), p 806 – 812.
38. Costentin J., Delaveau P., Jacob O., 2010. Café, thé, chocolat Les bienfaits pour le cerveau et le corps, Pages 39-164-165.
39. Kim D., Chun O., Kim Y., Moon H., Lee C., 2003. "Quantification of phenolics and their antioxidant capacity in fresh plums" *J. Agric. Food Chem.*, Vol. (51): 6509 pages.
40. 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*.

41. Davis, A. P, Tadesse, W.G, Susana, B, Moat, J. The Impact of Climate Change on Indigenous Arabica Coffee (*Coffea arabica*): Predicting Future Trends and Identifying Priorities. Plos One, 2012, 7 (11)
42. Debry G., 1993. Le café et la santé. John Libbey Eurotext,
43. DEL RIO D., STALMACH A., CALANI L., et al., 2010. « Bioavailability of Coffee Chlorogenic Acids and Green Tea Flavan-3-ols ». Nutrients [En ligne]. 29 juillet Vol. 2, n°8, p. 820-833.
44. 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. Université Cheikh Anta DIOP, B.P. 5005, Dakar-Fann, Sénégal. Int. J. Biol. Chem. Sci. 11(2): p. 768-776.
45. Doin G., 1897. Bulletin général de thérapeutique médicale, chirurgicale, obstétricale et pharmaceutique.
46. Duangjai., Acharaporn., Suphrom., Nungruthai., Wungrath., Jukkrit., et al., 2016. Comparison of antioxidant, antimicrobial activities and chemical profiles of three coffee (*Coffea arabica* L.) pulp aqueous extracts. Integrative Medicine Research, 5(4), p. 324-331.
47. El amri J., Elbadaoui Kh., Zair T.b., chakir S., & Alaoui T., 2014. Étude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles de *Teucrium capitatum* L et l'extrait de *Silene vulgaris* sur différentes souches testées, Journal of Applied Biosciences., 82: p. 7481–7492.
48. El Sayed A.M., Ezzat S.M., Khalil M.N., & El-Hawary S.S., 2016. Chemical composition and evaluation of possible alpha glucosidase inhibitory activity of eight Aloe species. Journal of Medicinal Plants Research, 10(13), p. 167-178.
49. Elkolli M., 2016. COURS : Structure et activités des substances naturelles : principes et applications. Université Ferhat Abbas de Sétif.
50. Epifano F., Genovese S., Menghini L., Curini M., 2007. Chemistry and pharmacology of oxyprenylated secondary plant metabolites, Review. Phytochemistry. 68: p. 939-953.
51. F.A.O., 2011. Food and agriculture organization of United Nation.
52. Favier A., 2003. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. L'actualité Chimique, p. 108 – 115.
53. Favier A., 2006. Stress oxydant et pathologies humaines. 64 :p. 390-396.

54. Fernandez-Checa J.C., Kaplowitz N., 2005. Hepatic mitochondrial glutathione: transport and role in disease and toxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, p. 63-73.
55. Ford K.A., Ebisuzaki Y, Boyle P.D., 1998. Methylxanthines. II. Anhydrous Theobromine. *Acta Crystallographica Section Crystal Structure Communications*, 54(12), p. 1980–1983.
56. Gallogly M.M., Mieyal J.J., 2007. Mechanisms of reversible protein glutathionylation in redox signaling and oxidative stress. *Curr. Opin. Pharmacol.*, V.7, p. 381-391.
57. GEO no 390 d'août 2011 p. 6
58. Gomez-Ruiz J.A., Ames J.M., et Leake D.S., 2008. Antioxidant activity and protective effects of green and dark coffee components against human low density lipoprotein oxidation. *European Food Research Technologie*. 227: p. 1017–1024.
59. Guo L., Xie M.Y., Yan A.P., Wan Y.Q., Wu Y.M. 2006. Simultaneous determination of five synthetic antioxidants in edible vegetable oil by GC- MS analytical and bioanalytical and bioanalytical. *Chemistry*, 386(6), p. 1881-1887.
60. Haler P.N.G., 2013. Le café: les effets bénéfiques et néfastes sur la santé. Thèse de l'obtention de diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie. Université de Lorraine, p. 42-50.
61. Halliwell B., 1997. Antioxidant and human diseases : a general introduction –*Nut Rev* , 55 : p.44-49.
62. Halvorsen B.L., Carlsen M.H ., Philip K.M., Bohnen S.K ., Holte K ., Jacobs D R.,
63. Harris A.L., 2002. Hypoxia a key regulatory factor in tumor growth. *Nature Reviews Cancer*. Vol 2(1), p. 38-47.
64. Hebi M., & Eddouks M., 2016. Evaluation de l'activité antioxydante de Stevia rebaudiana. *Phytothérapie*, 14, p. 17 – 22.
65. Hool L.C., 2006. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 33, p.146-151.
66. Hostettmann K., Marston A., 1955. Saponins : chemistry and pharmacology of natural products. Cambridge University Press.
67. International Coffee Organisation 2001. The first International Coffee Agreement. ICA. p78.
68. International Coffee Organisation 2008. General Assembly of the Inter African Coffee Organization. IACO. p27.
69. Iserin P., 2001. Larousse des plantes médicinales : Identification, préparation, soins. Ed. Larousse: 10p.

70. Zhishen J., Mengcheng T., Jianming W., 1999. "The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals" *J Food Chem*, Vol. (64), p.555.
71. JingmeiLiPetraSeibold J., Chang-Claude D., flesch-Janys L., KamilaCzene K., 2011. *Breast Cancer Research*.13: p. 49.
72. Joackim M., 2000. Post- récolte gestion et traitement du café dans les pays africains. COFFEE. FAO. P34.
73. Journal officiel de l'Union européenne 2008. Accord International de 2007 Sur Le Café. Reports. P114.
74. Julkunen-titto R., 1985. Phenolic constituents in the leaves of northern willow methods for the analysis of certain phenolics. *J. Agric. Food Chem*, 33, p. 213-217.
75. Justin K.H., 2007. Les hydrocarbures aromatiques polycycliques dans le café : mise au point de méthodes analytiques et étude de l'étape de torréfaction. Thèse de doctorat. École Doctorale ABIES. Laboratoire De Chimie Analytique. p. 67-99.
76. KABOUCHE A., 2005. Etude phytochimique de plantes médicinales appartenant à la famille des Lamiacées.
77. Karaçelik A.A., Kuçuk M., Iskefixeli Z., Aydemir S., Smet S.D., Miserez B., Standra P., 2015. Antioxidant component of *Viburnum opulus* L. determined by on-line HPLC-UVABTS radical scavenging and LC-UV-ESI method. *Food Chemistry*. 175N.p. 106-114.
78. Karagözler A.A., Erdağ B., Emek Y.Ç., Uygun, D.A., 2008. Antioxidant activity and proline content of leaf extracts from *Dorystoechas hastata*. *Food Chemistry*, 111(2), p. 400-407.
79. Karp G., 2010. Biologie cellulaire et moléculaire : Concepts and experiments. Edition De Boeck Supérieur, p 35.
80. Keller H., Wanner H., & Baumann T., 1972. Kaffeinsynthese in friichten und gewebekuhren *Coffea arabica*. *Planta*, 108,p. 339–350.
81. Kiattisin K., Nantarat T., et Leelapornpisid P., 2016. Évaluation des activités antioxydantes et anti-tyrosinases ainsi que la stabilité du grain de café vert et torréfié extraits de *Coffea arabica* et *Coffea canephora* cultivé en Thaïlande. Université de Chiang Mai, Suthep Road, Chiang Mai, Thaïlande.
82. Knight T.R., Kurtry A., Bajt M.L., Hinson J.A., Jaeschke H., 2001. Vascular and hepato cellulaire peroxynitrite formation during acetaminophen .induced liver injury : rol of mitochondrial oxidant stress . *Toxicol sci* ,62: p. 212 – 220.

83. Kohen R., Nyska A., 2002. Oxidation of biological systems : oxidative stress phenomena,antioxydants, redox reactions and methods for their quantification. *Toxicologic Pathology*. 30: p. 620-650.
84. 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, p. 312, 316, 317.
85. Lapparent B., 2013. Dynamique des conditions écologiques de la culture du café dans la région centrale du Kenya.
86. Lehucher-Michel M.P., Lesgards J.F., Delubac O., Stocker P., Durand P., Prost M. 2001. Stress oxydant et pathologies humaines. *La Presse médicale*. 30: p. 1076-1081.
87. Letellier J., Hébert M., Morency A., 1988. *Le Livre du Café*. Editions de l'Homme. 2: p. 156-234.
88. Leverse X., Cosnes J., Erny P., & Hasselmann M., 2001. *Traité de nutrition artificielle de l'adulte*. 2ème édition. Edition Springer, p 241.
89. Li C., Oldham C.D., et May S.W.N., 1994. N-Dimethyl-1,4-phenylenediamine as an alternative reductant for peptidylglycine. Alpha-amidating mono-oxygenase catalysis. *Biochem. J*, 300:p. 31-36.
90. Lidah 2011 : Café Malongo, La culture du café, <http://www.malongo.com/fr/public/culture.html>).
91. Lu S.C., 1999. Regulation of hepatic glutathione synthesis: current concepts and controverses. *Faseb. J.*, V. 13, p. 1169-83.
92. Macheix J.J., Fleuriet A et Billot J., 1990. *Fruit phenolics*, CRC press, Boca Roton. In : les polyphenols en agroalimentaire Sarni-Manchado P, Cheynier V.2006., Tec et Doc Lavoisier-Paris.
93. MAROUF A., Reynaud J., 2007. *La Botanique A-Z*. Ed. Dunod, Paris: 233p.
94. Max W., et Robert A., 2003. *Plantes thérapeutiques* p. 119-120.
95. McDonald R.E., Mossoba M.M., 1997. *New Techniques and Applications in Lipid Analysis* .The American Oil Chemists Society, Page 359.
96. Médart J., 2009. *Manuel pratique de nutrition: L'alimentation préventive et curative*. Editions De Boeck Supérieur, p 49.
97. Medfouni R., 2018. Contribution à l'étude phytochimique et les activités biologiques d'une plante médicinale *Syzygium aromaticum*. Université larbi ben mhidi oum el bouaghi.

98. Michelle J., Martine S.G., Daniel D., 2003. Terres de café. The leading information portal on coffee science. *Chemistry*. 1: p. 120-127.
99. Mohan jain S. L P.M., Priyadarshan., 2009. breeding plantation treecrops.
100. Muzykantov V.R., 2001. Targeting of superoxide dismutase and catalase to vascular endothelium, *J. Control Release*, V. 71, n°1, p. 1-21.
101. Nadal B.S.A.L., Thetiot-Laurent S., Pin J.P., Renault D., Cressier G., Rima A., Le Roux S., Meunier A., Wagner C., 2010. Synthesis and antioxidant properties of pulvinic acids analogues. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 18, p. 7931-7939.
102. Nas A., 2019. Etude des activités antimicrobienne et antioxydante des extraits aqueux et hydrométhanolique des grains de coffea arabica. Mémoire Présenté en vue de l'obtention du diplôme de Master. Université Abou Bekr Belkaid Tlemcen.
103. Nkhili E., 2009. Polyphénols de l'Alimentation : Extraction, Interactions avec les ions du Fer et du Cuivre, Oxydation et Pouvoir antioxydant. thèse en co-tutelle. université cadi ayyad semlalia – marrakech.
104. Novelli G.P., 1997. *J. Physiol. Pharmacol.*, 48, p. 517-527.
105. Oestreich-Janzen S., (2013) *Chemistry of Coffee*. In: Reedijk, J. Elsevier Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering. Waltham, MA: Elsevier.
106. Oyaizu M., 1986. Studies on products of browning reaction: antioxidative activity of products of browning reaction. *Jpn. J. Nutr.*, 44(6).
107. Park J., Park J., Jang S., Kim S., Kong S., Choi J., & Park B., 2008. FTFD: an informatics pipeline supporting phylogenomic analysis of fungal transcription factors. *Bioinformatics*, 24(7), p. 1024-1025.
108. Parras P., Martinez-Tomé M., Jiménez A.M. et Murcia M.A., 2007. Antioxidant capacity of coffees of several origins brewed following three different procedures. *Food Chemistry*. 102: p. 582–592.
109. Padeloup 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.
110. Pasquier C., 1995. Stress oxydatif et inflammation. *Revue Française des Laboratoires*, 276, p. 87 – 92.
111. Pelletier E., Campbel P., Denizeau F., 2004. *Ecotoxicologie moléculaire*. Ed. Presses de l'universite du Quebec.canada : 182p.

112. Phenolic compound biochemistry, Springer, Dordrecht. ISBN-10 1-4020-5163-8 (HB).incomplète
113. Pincemail J ., Meurisse M., Limet R., Defraigne J.O., 1999. L'évaluation du stress oxydatif d'un individu: une réalité pour le médecin. *Vaisseaux, Coeur, Poumons*. Vol 4(5) : 133–8. 64. Rashmi Y, Rahul k, Dipeeka G. The Health Benefits Of *Trigonella Foenum-Graecum*: A Review. *Internat J Engin Res Applic* 1: p. 32-5.
114. Pincemail J., Meurisse M., Limet R., Defraigne J.O., 1999. L'évaluation du stress oxydatif d'un individu: une réalité pour le médecin. *Vaisseaux, Cœur, Poumons*. Vol 4(5): p. 133–8.
115. Pons G. J, Blic A, Clement J., 2000. Les médicaments de l'asthme chez l'enfant. *Recherche Clinique & Décision Therapeutique* . Springer Science & Business Media, Page83.
116. Popov I., Lewin G., et Baehr R., 1987. Photochemiluminescent detection of antiradical activity. I. Assay of superoxide dismutase. *Biomed Biochim Acta*, 46: p. 775–779.
117. Preedy Victor R., 2014. *Coffe in health and disease prevention*. Academic Press 68, p. 561-848.
118. 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, p. 337 – 341.
119. Psotova J., Lasovsky J., Vicar J., 2003. Metal chelating properties, electrochemical behavior, scavenging and cytoprotective activities of six natural phenolic. *Biomed. Papers* 174-153 p.
120. Re R., Pellegrini N., Protrggente A., Pannala A., Yang M., et Rice-Evans C., 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Freeradical biology and medicine*, 26, p. 1231-1237.
121. Ribeiro J.A., & Sebastiao A.M., « Caffeine and adenosine ». *Journal of Alzheimer's Disease*. 2010. Vol. 20, p. 3–15
122. Ryan M. T., Muller H., & Pfanner N., 1999. Functionalstaging of ADP/ATP carrier translocation across the outer mitochondrial membrane. *J BiolChem* , 274 (29), p. 20619 – 20627.
123. Salvayre R., Auge N., Nègre-Salvayre A., 2003. Rôle de l'oxydation dans la genèse et la progression de l'athérosclérose. *L'athérosclérose : Physiopathologie, Diagnostics, Thérapeutiques.*, J.F., Toussaint, M.P., Jacob, L., Lagrost, J., Chapman, Eds. Masson: Paris, 14, p. 269-290.

124. Sanchez M.C., 2002. Review: methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Science and Technology International*, 8 (3), p. 121-137.
125. Sanchez-Moreno C., Larrauri J.A., Saura-Calixto F., 1998. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *J. Sci Food. Agric*, 76: p. 270–276.
126. 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(3): p. 1263-1269.
127. Sawynok J., 2011., «Caffeine and pain». *PAIN* [En ligne]. Vol.152, n°4, p. 726-729.
128. Schauenberg P., & Paris F., 2006. *Guides Des Plantes Médicinales Analyse, Description Et utilisation de 400 plantes*. Edition delachaux et Niestlé, Paris, p. 33-34.
129. Scherer R., Godoy H.T., 2009. Antioxidant activity index (AAI) by 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. *Food Chemistry*, v.112, p. 654-658.
130. Sfetcu N., 2014. *Health & Drugs: Disease, Prescription & Medication*.
131. Sies H., 1991. In: *Oxidative stress, oxidants and antioxidants*. Londres: Academic Press.
132. Sies., 1997. Smirnoff, 1998; Dat et al., 2000; Inze and Montagu, 2001; Arora et al., 2002; Langebartels et al., 2002).
133. Simon B., 2010. *Biologie Moléculaire –UE1*. Edition Dunod, Paris ; p155.
134. Sousa R., Dias S., & Antunes C., 2006. Spatial subtidal macrobenthic distribution in relation to abiotic conditions in the Lima estuary, NW of Portugal. *Hydrobiologia*, p. 559, 135, 148.
135. Stahl W., Sies H., Antioxidant activity of carotenoids. *Mol Aspects Med*, V. 24,(2003), p. 345-51.
136. Suhaj M., 2006. Spice antioxidants isolation and their antiradical activity: a review. *Journal of Food Composition and Analysis* 19, p. 531–537.
137. Teketay D., 1999. History, botany and ecological requirements of coffee. *Walia*, 20, p. 28-50.
138. temperate specie, ISBN: 978-0-387-71203-1/DOI 10.1007/978-0-387-71203-1, library of congress control number: 2008937489/ springer science+business media.
139. Thorn J., 2002. *Le Café, le guide du connaisseur*. Modus Vivendi, Canada. p108.
140. Tice R., 2007. « Trigonelline Review of Toxicological Literature » [En ligne]. Disponible sur : <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=5570#x332> (consulté le 26 août 2012).

141. Traber M.G., Frei B., Beckman, L.S., 2008. Vitamin E revisited: do new data validate benefits for chronic disease prevention? *Curr Opin. Lipido.*, V. 119, p. 30-38.
142. Vantal A., 1999. Le café, *Les Carnets gourmands*, Éditions du Chêne-Hachette Livre. p127.
143. Vermerius W., Nicholson R., 2006. *Phenolic Compound Biochemistry*. Springer, p. 151-196
144. Vignoli J.A., Bassoli D.G., Benassi M.T., 2011. Antioxidant activity, polyphenols, caffeine and melanoidins in soluble coffee: The influence of processing conditions and raw material. *Food Chemistry*, 124(3), p. 863-868.
145. Villedieu-Percheron E., 2011. Etude d'une famille de diterpènes d'origine naturelle ayant une activité anti-inflammatoire. Université d'Orléans.
146. Vincent H.K., Taylor A.G., 2006. Biomarkers and potential mechanisms of obesity-induced oxidant stress in humans, *Int. J. Obes.*, (Lond), V. 30, p. 400-418.
147. Wassmann S., Wassmann K., Nickenig G., 2004. Modulation of oxidant and antioxidant enzyme expression and function in vascular cells, *Hypertension*, V. 44 n°4, p. 381-6.
148. Watson D.G., 2011. *Pharmaceutical Chemistry E-Book*. Elsevier Health Sciences, 652 pages ; p354.
149. Wayner D.D.M., Burton G.W., Ingold K.U., Locke S., 1985. Quantitative measurement of the total peroxy radical-trapping antioxidant capacity of human blood plasma by controlled peroxidation. *FEBS Letters*, 187: p. 33-37.
150. Wellman M., Pedro A., Frederick L., 1961. The Coffee; botany, cultivation, and utilization. 2(4): p. 381-894.
151. Williams D.G., 1993. *The chemistry of essential oils*. Micelle Press. England.
152. Wurtz A., 1882. *Dictionnaire de chimie pure et appliquée*.
153. Xiang Q., Gao Y., Xu Y.H., 2007. Capillary electrophoresis – amperometric determination of antioxidant propyl gallate and butylate hydroxanisole in foods. *Analytical science*, 23(6), 713 pages.
154. Yusuf Y., 2006. *Trends Food Sci. Tech*, 17, p. 64-71.