

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
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

Préparé par : **BOUKLI-HACENE Kawther**

Thème

Etude des activités antimicrobienne et antioxydante des
extraits aqueux et hydrométhanolique des graines de
coffea canephora

Soutenu le : 02/07/2019

Président:	Pr. LAHFA F.B.	Professeur	Univ. Abou Bekr Belkaid Tlemcen
Examineur :	Dr. MEZOUAR D.	MCB	Univ. Abou Bekr Belkaid Tlemcen
Encadrant :	Dr. RAHMOUN M.N.	MCA	Univ. Abou Bekr Belkaid Tlemcen
Invité:	Mr. AISSAOUI M.	Doctorant	Univ. Abou Bekr Belkaid Tlemcen

Année universitaire : 2018 – 2019

Remerciements

Je remercie tout d'abord notre créateur Allah, le Tout Puissant de m'avoir accordé paix, santé, sérénité et surtout abnégation et courage pour pouvoir poursuivre mes études et espérer un avenir meilleur.

*Je tiens tout d'abord à remercier très sincèrement mon encadrant **M'Rahmoun Mohammed Nadjib** maître de conférences A au département de Biologie, faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, des Sciences de la Terre et de l'Univers, Université Aboubekr-Belkaïd Tlemcen, d'avoir accepté la direction de ce travail. Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance pour sa disponibilité, sa patience, ses conseils et sa compréhension qui nous ont été précieux afin de mener notre travail à bon port. Je tiens vivement à lui adresser mon gratitude.*

Je remercie les membres de jury d'avoir bien voulu accepter de juger ce travail, je vous en suis très reconnaissants et j'espère être à la hauteur de votre confiance,

*Je remercie **M'Lahfa Farid Boucif**, professeur au département de Biologie, faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, des Sciences de la Terre et de l'Univers, Université Aboubekr Belkaïd Tlemcen, de m'avoir fait l'honneur de présider ce jury.*

*J'exprime également mes sincères remerciements à **M^{elle} Mezouar D** Maître de conférences B au département de Biologie, faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, des Sciences de la Terre et de l'Univers, Université Aboubekr Belkaïd Tlemcen, d'avoir accepté d'examiner et discuter ce travail,*

*J'exprime aussi mes sincères remerciements à **M' Aissaoui Mohammed et M'Barek Saïd**, doctorants en Biochimie appliquée à l'université Aboubekr Belkaïd Tlemcen, pour leur énorme aide et leur disponibilité au cours de ma partie expérimentale au laboratoire. Un grand merci pour leur dynamisme pour la recherche et le partage de leurs expériences.*

*Mes vifs remerciements s'adressent également à tous les enseignants de mon cursus universitaire et le personnel du laboratoire particulièrement **M^{elle} Beledghem Rachida**.*

*Ainsi, j'adresse mes remerciements les plus chaleureux à toutes les personnes qui m'ont aidé de près ou de loin par le fruit de leur connaissance pendant toute la durée de notre parcours éducatif **Asma, Soumia, Farah**.*

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail

A mes parents que dieu protège

A l'homme de ma vie, mon exemple éternel, mon soutien moral et source de joie et de bonheur, celui qui s'est toujours sacrifié pour me voir réussir, à toi mon père

Aucun hommage ne pourrait être à la hauteur de l'amour Dont ils ne cessent de me combler.

A la lumière de mes jours, la source de mes efforts, la flamme de mon cœur, ma vie et mon bonheur, maman que j'adore,

Que dieu vous procure bonne santé et longue vie.

A mes Sœurs Meryem, Assia, Leyneb , qui n'ont cessé d'être pour moi des exemples de persévérance, de courage et de générosité.

A mon cher frère Mohammed , pour leur soutien infinis et leur aide incessante à qui je souhaite un meilleur avenir.

A ma chère cousine Mamia M Benosman, ma sœur de l'âme, le symbole de tendresse et de confiance ; et la source de mes efforts.

A mes adorables nièces et neveux.

A mes beaux-frères, pour leurs présences, et leurs encouragements.

A tous les membres de ma famille, petits et grands, Aux personnes qui m'ont toujours aidé et encouragé, qui étaient toujours à mes côtés, et qui m'ont accompagnaient durant mon chemin d'études supérieures, mes aimables amis et collègues d'étude.



Table de matières

ملخص

Résumé	
Abstract	
Liste des Abréviations	
Liste des Figures	
Liste des Tableaux	
Introduction.....	01
Première partie : Synthèse bibliographique.....	04
I. Historique.....	05
II. Taxonomie de la plante du café.....	05
III. Utilisation du café en médecine traditionnelle.....	06
IV. L'espèce <i>Coffea canephora</i> (Pierre).....	06
V. Description botanique de <i>C. canephora</i>	07
VI. Composition des graines de <i>C. canephora</i> et effet biologique.....	09
VI. 1. Les alcaloïdes.....	10
VI. 1. 1. La caféine.....	11
VI. 1. 2. La trigonelline.....	12
VI. 2. Les polyphénols.....	12
VI. 2.1. l'acide chlorogénique	13
VI. 3. Les diterpènes : Cafestol et kahweol.....	13
Deuxième partie : Matériel et méthode.....	15
I. Matériel.....	16
I.1. Matériel végétal.....	16
I.2. Matériel biologique.....	16
II. Méthodes.....	17
II.1. Préparation des extraits.....	17
II.2. Etude phytochimique	17
II.2.1. Les alcaloïdes.....	18
II.2.2. Les polyphénols.....	18
II.3. Dosage des métabolites secondaires	19
II.3.1. Dosage des polyphénols totaux.....	19
II.3.2. Dosage des flavonoïdes totaux.....	19
II.3.3. Dosage des tanins condensés	20
II.4. Etude de l'activité biologique	20
II.4.1. Evaluation de l'activité antiradicalaire.....	20
II.4.1.1. Effet piégeage du radical libre DPPH	20
II.4.1.2. Pouvoir réducteur du fer FRAP.....	22
II.4.2. Evaluation de l'activité antimicrobienne	22
II.4.2.1. Evaluation de l'activité antibactérienne	22
II.4.2.1.1. Méthode de diffusion des disques sur milieu solide.....	22
II.4.2.1.2. Méthode des dilutions sur milieu liquide.....	23
II.4.2.2. Evaluation de l'activité antifongique vis-a-vis des levures	23

Troisième partie : Résultats et discussion	25
I. Etude phytochimique.....	26
I.1. Rendement des extraits.....	26
I.2. Test phytochimiques	28
I.3. Taux des composés phénoliques	29
II. Etude des activité biologique.....	31
II.1. Evaluation de l'activité antioxydante	31
II.1.1. Piégeage du radical libre 2,2-diphényle-1-picrylhydrazyl (DPPH)	31
II.2.2. Réduction du fer : FRAP (<i>FerricReducing Antioxydant Power</i>)	34
II.2. Evaluation de l'activité antimicrobienne	37
II.2.1. Evaluation de l'activité antibactérienne.....	37
II.2.1.1. La technique de diffusion sur gélose Mueller Hinton (méthode des disques).....	37
II.2.1.2. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI).....	40
II.2.2. Evaluation de l'activité antifongique	43
II.2.2.1. La technique de diffusion sur gélose (méthode des disques).....	43
II.2.2.2. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI).....	44
Quatrième partie : Conclusion générale	46
Références bibliographiques	48
Annexe	59

ملخص

الهدف من عملنا هو دراسة التركيب الكيميائي وتقييم الأنشطة المضادة للأكسدة المضادة للميكروبات من مستخلصات مختلفة من البذور الخضراء للنبات. *Coffea canephora (robusta)*

مكننا الاختبارات الكيموونباتية التي أجريت على مقتطفات البذور الخضراء من تسليط الضوء على وجود قلويدات وعفص وفلافونويد وكينونات حرة وتيربينويدات في جميع المستخلصات . أظهر مستخلص n- بيوتانول من مستخلص الهيدروميثانول أعلى نسبة من البوليفينول والفلافونويد (7.87 ± 291.57 EAG / mg ميكروغرام و 14.25 ± 263.5 ميكروغرام / EC ملغ من استخراج على التوالي). يحتوي جزء أسيتات الإيثيل في مستخلص الهيدروميثانول على أعلى محتوى من التانين بقيمة حوالي 149.5 ± 19.5 ميكروغرام من / EC ملغ من المستخلص.

تم إجراء تقييم لنشاط مضادات الأكسدة بواسطة طريقة تثبيط الجذر الحر DPPH وطريقة إرجاع الحديد. تم الحصول على أقل قيم (IC_{50} 0.30 ملغم / مل و 0.32 ملغ / مل) بواسطة جزء n- بيوتانول من المستخلص المائي والهيدروميثاني على التوالي. قدرة إرجاع الحديد الأكثر إثارة للاهتمام تم العثور عليها بواسطة جزء n- بيوتانول من مستخلص الهيدروميثانول (EC_{50} يساوي 0.27 ملغ / مل)

أوضحت دراسة تركيزات الحد الأدنى من التثبيط أن أصغر تركيز تم الكشف عنها بواسطة مستخلص الخام المائي بقيمة 0.125 ملغم / مل ضد البكتيريا و 2.5 ملغم / مل ضد الخمائر *Candida albicans*

بفضل ثرائها بالمركبات الفينولية ، تمتلك البذور الخضراء لـ *Coffea canephora (robusta)* القدرة على ممارسة العديد من الأنشطة البيولوجية التي تفسر استخدامها في الطب التقليدي.

الكلمات المفتاحية: كوفي كانيفورا ، مركبات الفينول ، نشاط مضاد للجراثيم ، نشاط مضاد للميكروبات

Résumé

L'objectif de notre travail est d'étudier la composition chimique et d'évaluer les activités antioxydante et antimicrobienne de différents extraits des graines vertes de la plante *Coffea canephora* (robusta).

Les tests phytochimiques effectués sur les extraits des graines vertes ont permis de mettre en évidence la présence des alcaloïdes, tanins, flavonoïdes, quinones libres et terpénoïdes dans tous les extraits et fractions testés. La fraction n-butanolique de l'extrait hydrométhanolique a montré le taux le plus élevé en polyphénols et flavonoïdes ($291,57 \pm 7,87$ μg EAG/mg d'extrait et $263,5 \pm 14,25$ μg EC/mg d'extrait respectivement). La fraction acétate d'éthyle de l'extrait hydrométhanolique renferme le taux le plus élevé en tanins avec une valeur de l'ordre de $149,5 \pm 19,5$ μg EC/mg d'extrait.

L'évaluation de l'activité antioxydante a été effectuée par la méthode de piégeage du radical libre DPPH et par méthode de réduction du Fer. Les plus basses CI_{50} ($0,30$ mg/mL et $0,32$ mg/mL) ont été obtenues par la fraction n-butanolique de l'extrait aqueux et hydrométhanolique respectivement. La capacité de réduction de fer la plus intéressante a été montrée par la fraction n-butanolique de l'extrait hydrométhanolique (des CE_{50} égale à $0,27$ mg/mL).

L'étude des concentrations minimales inhibitrices a montré que la CMI la plus basse a été divulguée par l'extrait brut aqueux avec une valeur de $0,125$ mg/mL vis-à-vis des bactéries et de $2,5$ mg/mL vis-à-vis des levures à *Candida albicans*.

Grace à leurs richesses en composées phénoliques, les graines vertes de *Coffea canephora* (robusta) ont la capacité d'exercer de nombreuses activités biologiques ce qui explique leur usage en médecine traditionnel.

Mots clés : *Coffea canephora*, composés phénoliques, activité antiradicalaire, activité antimicrobienne.

Abstract

The aim of our work is to study the chemical composition and to evaluate the antioxidant and antimicrobial activities of different extracts of the green seeds of the *Coffea canephora* (robusta) plant.

The phytochemical tests carried out on the extracts of the green seeds made it possible to highlight the presence of alkaloids, tannins, flavonoids, free quinones and terpenoids in all the extracts and fractions tested. The n-butanol fraction of the hydromethanol extract showed the highest polyphenol and flavonoid content ($291.57 \pm 7.87 \mu\text{g AGE} / \text{mg extract}$ and $263.5 \pm 14.25 \mu\text{g CE} / \text{mg of extracted}$ respectively). The ethyl acetate fraction of the hydromethanol extract contains the highest tannin content with a value of about $149.5 \pm 19.5 \mu\text{g CE} / \text{mg of extract}$.

The evaluation of the antioxidant activity was carried out by the method of free radical DPPH scavenging and by iron reduction method. The lowest IC_{50} values ($0.30 \text{ mg} / \text{mL}$ and $0.32 \text{ mg} / \text{mL}$) were obtained by the n-butanol fraction of the aqueous and hydromethanic extracts respectively. The most interesting iron reducing capacity was shown by the n-butanol fraction of the hydromethanol extract (EC_{50} equal to $0.27 \text{ mg} / \text{mL}$).

The study of minimal inhibitory concentrations showed that the lowest MIC was showed by the aqueous crude extract with a value of $0.125 \text{ mg} / \text{ml}$ against bacteria and $2.5 \text{ mg} / \text{mL}$ against *Candida albicans* yeasts

By their richness in phenolic compounds, the green seeds of *Coffea canephora* (robusta) have the capacity to exert many biological activities which explains their use in traditional medicine.

Key words: *Coffea canephora*, phenolic compounds, antiradical activity, antimicrobial activity.

Liste des abréviations

ATCC	: American Type Culture Collection
APG III	: Angiosperm Phylogeny Group classification phylogénétique
BHA	: Butylated hydroxyanisol
CE₅₀	: Concentration efficace médiane
CI₅₀	: Concentration inhibitrice à 50%
CLSI	: Clinincal and Laboratory Standard Institute
CMI	: Concentration Minimal Inhibitrice
DO	: Densité optique
DPPH	: 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl
Fe²⁺	: Fer ferreux
Fe³⁺	: Fer ferrique
FRAP	: Ferric reducing antioxydant power
Gent	: Gentamicine
IP	: Institut de Pasteur

Liste des figures

Figure n°01 :	Le caféier robusta.....	08
Figure n°02 :	Les fleurs et feuilles de l'espèce robusta.....	08
Figure n°03 :	Les Baies du caféier robusta.....	09
Figure n°04 :	Structure chimique de la caféine.....	11
Figure n°05 :	Structure chimique de la trigonelline et l'acide nicotinique.....	12
Figure n°06 :	Structure chimique des acides chlorogéniques.....	13
Figure n°07 :	Structure chimique de Cafestol et kahweol.....	14
Figure n°08 :	Réduction du radical DPPH par un oxydant.....	21
Figure n°09 :	Rendement des différents extraits des graines vertes de café Robusta...	27
Figure n°10 :	Evolution des pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des concentrations de l'extrait aqueux et ses fractions.....	32
Figure n°11 :	Evolution des pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des concentrations de l'extrait hydrométhanol et ses fractions	32
Figure n°12 :	Evolution des pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des concentrations de BHA.....	33
Figure n°13 :	Evolution des absorbance du fer réduit par l'extrait aqueux et ses fractions	35
Figure n°14 :	Evolution des absorbance du fer réduit par l'extrait hydrométhanol et ses fractions.....	35
Figure n°15 :	Evolution des absorbance du fer réduit par acide ascorbique et BHA.....	36
Figure n°16 :	Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux.....	59
Figure n°17 :	Courbe d'étalonnage du catéchine pour le dosage des flavonoïdes totaux.....	59
Figure n°18 :	Courbe d'étalonnage du catéchine pour le dosage des tanins condensés.	60

Liste des tableaux

Tableau n°01 :	Composition chimique des graines de <i>Coffea Canephora</i>	10
Tableau n°02 :	Caractéristique des différents extraits des graines vertes de Robusta.....	27
Tableau n°03 :	Test phytochimiques des extraits des gaines de café verts Robusta.....	28
Tableau n°04 :	Teneurs en composés phénoliques dans les deux extraits avec les différentes fractions.....	30
Tableau n°05 :	CI ₅₀ de différents extraits de <i>C. canephora</i>	33
Tableau n°06 :	Résultats des valeurs des CE ₅₀ de différents extraits de <i>C. canephora</i>	36
Tableau n°07 :	Diamètres des zones d'inhibition (mm) des extraits des graines vertes de Robusta	39
Tableau n°08 :	Concentrations minimales inhibitrice des graines vertes de Robusta.....	42
Tableau n°09	Diamètres des zones d'inhibition (mm) des extraits des graines vertes de Robusta.....	43
Tableau n°10	Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) des graines vertes de robusta...	44

Introduction

Depuis des lustres, nos ancêtres ont compté sur la nature pour satisfaire leurs besoins fondamentaux. Ils ont eu recours aux plantes médicinales traditionnelles comme une source essentielle de médicaments car elles sont culturellement acceptables et facilement disponibles **(Kaliyaperumal et al., 2013)**.

Les plantes médicinales offrent un régime de soins de santé accessible et abordable constituent ainsi un élément important et une base essentielle dans les systèmes de médecine traditionnelle et malgré le progrès réalisé en pharmacologie moderne, les populations du monde entier dépendent toujours de l'usage thérapeutique des plantes médicinales, par rapport au système médical moderne **(Tabuti et al., 2003)**.

Ces derniers temps, les plantes médicinales attirent beaucoup d'intentions en raison de la découverte de composés impliqués dans la prévention des pathologies liées aux cancers, vieillissement, maladies infectieuses etc ... **(Hsieh et al., 2006 ; Pawel et al., 2015)**. Ces propriétés sont dues principalement aux substances bioactives qui peuvent être utilisées à des fins thérapeutiques en tant que tel ou comme des précurseurs de produits pharmaceutiques **(Meziti, 2008)**.

L'effet de l'usage des plantes médicinales sur l'organisme varie selon la composition chimique en métabolites secondaires tels que les composés phénoliques (principalement les flavonoïdes), les vitamines E et C, les caroténoïdes d'une part, et d'autre part selon la concentration des principes actifs **(Normile, 2003 ; Adida et al., 2016)**.

Le café est la boisson non alcoolisée la plus vendue et la plus consommée dans le monde entier. Le caféier (famille des rubiacées) est la plante dont les graines sont utilisées pour préparer le café **(Pawel et al., 2015)**. Les grains verts de café, font partie des principaux produits commerciaux qui ont représentés 8,8 millions de tonnes de la production mondiale en 2012 **(Nayeem et al., 2011 ; Pawel et al., 2015)**.

Coffea canephora et *Coffea arabica* sont les deux espèces les plus importantes du caféier qui ont été utilisées traditionnellement dans le traitement de l'asthme, l'intoxication à l'atropine, fièvre, maux de tête, jaunisse, paludisme, migraine, narcose, plaies et vertiges. Les lavements au café (un puissant processus de détoxination) ont été utilisés pour traiter le cancer **(Jalil et al., 2007 ; Górnas et al., 2014 ; Pawel et al., 2015)**. De même, un certain nombre de propriétés biologiques ont été attribuées au café, parmi lesquelles les activités diurétiques, antimicrobiennes et antioxydantes **(Nayeem et al., 2011 ; Pawel et al., 2015)**.

Dans la littérature, plusieurs travaux ont été effectués sur les graines de café torréfiées **(Liu et Kitts, 2011 ; Budryn et al., 2015)**, mais très peu de recherches se sont intéressés aux graines vertes.

Le présent travail porte sur une étude phytochimique ainsi que l'évaluation des activités antioxydante, antibactérienne et antifongique *in vitro* d'extraits des graines vertes de la plante *coffea canephora*.

Première partie

Synthèse
bibliographique

I. Historique

La plante de café a été découverte à l'état sauvage il y a plus de 1 000 ans dans la région de Kaffa en Ethiopie d'où le mot « café », puis elle s'est répandue peu à peu dans monde arabe (**Badoud et Bauer, 2001**). Et malgré les interdictions et les mises en garde de la médecine, le café s'est répandu rapidement dans toute l'Europe au milieu du 16^{ème} siècle grâce aux Ottomans et aux commerçants vénitiens (**Badoud et Bauer, 2001**). Au milieu du 17^{ème} siècle, il a été ramené à New Amsterdam (appelé aujourd'hui New York). Un siècle plus tard le Brésil devient le premier producteur de café au monde. A la fin du 18^{ème} siècle, le caféier a été implanté tout autour du globe et devient la plante agricole la plus profitable à l'exportation au monde (**Taunay, 1939**).

II. Taxonomie de la plante du café

La plante de café est issue d'un arbuste tropical et subtropical qui pousse dans des climats chaud et humide avec des températures pas en dessous de 15°C (**Adepoju et al., 2017**). Elle appartient à la famille des Rubiacées avec 450 genres et plus de 6500 espèces (**Adepoju et al., 2017**).

Parmi les différentes espèces du genre *Coffea*, seuls *Coffea arabica* (Linné) appelée arabica et de *Coffea canephora* (Pierre) nommée robusta sont les plus commercialisées et qui rendent le café la deuxième marchandise la plus échangée dans le monde après le pétrole (**Pawel et al., 2015 ; Adepoju et al., 2017**).

Selon classification phylogénétique (APGIII), la classification botanique de la plante de café est comme suit (**Thorn, 2002**):

Règne: *Plantae*

Division: *Angiospermae*

Classe: *Dicotyledonae*

Sous-classe: *EuasteridsI*

Ordre: *Gentianales*

Famille: *Rubiaceae*

Sous-famille: *Ixoroideae*

Genre: *Coffea*

III. Utilisation du café en médecine traditionnelle

Il existe plusieurs recherches relatives à l'application du caféier en médecine traditionnelle. Différentes parties de cette plante ont été utilisées comme médicaments à la fois humain et vétérinaire pour traiter diverses maladies (**Belayneh et Bussa, 2014**).

Ross, (2005) dans son étude ethnopharmacologique a trouvé que le café était utilisé comme traitement pour un large éventail de maladies ou de symptômes, tels que la diarrhée, douleurs intestinales, grippe, anémie, maladies du foie, migraine, douleurs à l'estomac, fièvre.

En médecine traditionnelle, le charbon de café était utilisé pour traiter les maladies inflammatoires de la bouche et du pharynx, et les plaies infectées (**Gruenwald et al., 2000**). Au Népal, les fleurs de *Coffea benghalensis* ont été utilisées pour traiter les saignements excessifs pendant la menstruation (**Patay et al., 2016**). L'espèce *Coffea canephora* ont a été utilisées pour traiter le mal de dos, la rougeole, la toux et la jaunisse (**Tabuti et al., 2003**).

Dans certaines régions d'Indonésie et d'Éthiopie, une préparations appelée «copidaon» ou «café à feuilles » est préparée à partir des feuilles de *Coffea arabica* ou de *Coffea canephora*, pour soulager la migraine (**Schmid et al., 2012**).

Au Libéria, l'infusion des feuilles de café est utilisée par voie orale pour baisser la fièvre et les graines pour traiter les maux de tête et d'estomac.

IV. L'espèce *Coffea canephora* (Pierre)

L'espèce *C. canephora* est connue sous le nom Robusta, c'est la variété la plus cultivée dans le monde puisqu'elle constitue au moins 95 % des plantations et qui représente environ 30% de la production du marché mondial (**Pohlan et al., 2010 ; Vanida et Kittiya, 2017**).

Elle se croit dans des altitudes comprises entre 200 et 900 mètres et elle résiste aux conditions climatiques chaudes et humides avec des pics supérieurs à 30 °C.

Robusta, avec ces 50 variétés, est originaire d'Afrique sub-saharienne centrale et occidentale et elle est cultivée dans plus de 70 pays tels que l'Indonésie, l'Inde, l'Ouganda, le Vietnam, le Brésil et la Thaïlande (**Damatta et al., 2007 ; Vanida et Kittiya, 2017**).

Cette espèce est plutôt un « café de plaine », qui présente des feuilles persistantes et produisent des fleurs blanches à l'arôme prononcé après la première pluie de la saison d'hiver (**Dagoon et al., 2005 ; Vanida et Kittiya, 2017**).

V. Description botanique de *C. canephora*

C. canephora est un petit arbuste robuste qui possède plusieurs troncs qui s'élèvent verticalement et des branches (ramifications primaires) horizontales d'où partent les ramifications secondaires et tertiaires (**Figure n° 01**) (**Adepoju et al., 2017**).

Cette plante ligneuse à feuillage persistant avec un système racinaire du caféier peut atteindre une longueur totale de 2 à 5 m (**Vanida et Kittiya, 2017 ; Adepoju et al., 2017**).

Les feuilles ovales sont de couleur vert sombre, brillantes, cireuses au toucher et qui poussent en paires avec un pétiole court et sont opposées deux à deux le long de la tige. Leurs taille varie entre de 20 à 35 cm de long et 8 à 15 cm de large (**Figure n° 02**) (**Lim, 2013**).

La première floraison a lieu au bout de la troisième année qui fleurit plusieurs fois par an. La floraison est déclenchée par une période sèche suivie d'une pluie. Les fleurs du robusta fleurissent de façon irrégulière avec une couleur blanche à rose claire et naissent en grappes, odorantes (**Figure n° 02**). Son fruit mûrit au bout de 10 à 11 mois avec un changement de couleur vert clair vers le rouge (**Vanida et Kittiya, 2017**).

Les cerises sont les fruits crus du caféier qui se composent de deux grains ovales, aplatis sur la face ventrale tournée vers le milieu du cerise et creusée par un profond sillon longitudinal recouverts d'une fine parchemin comme la coque et entouré de pulpe. Le caféier robusta donne des grains jaunes à brunes avec des dimensions assez variables (**Figure n° 03**) (**Lim, 2013**).

Très rarement on peut également trouver des drupes à trois graines dans une seule graine. Si elle est à graine unique on l'appelle « caracoli » en raison de la forme sphérique de cette graine unique ou « peaberry » de l'anglais pea, vu que la graine a l'allure d'un petit pois (**Solange et al., 2011**).

La drupe est constituée d'un épiderme (exocarpe) en dessous duquel on trouve la pulpe (mesocarpe) sucrée, de couleur blanche. Elle est plus ou moins abondante en fonction de la taille des graines. Ces dernières sont entourées par la parche (endocarpe), noyau qui est mucilagineux à l'extérieur. Ensuite directement contre les graines vient la pellicule argentée (spermoderme) (**Figure n° 03**) (**Solange et al., 2011 ; Adepoju et al., 2017 ; Mohd-Zain et al., 2017**).

Ces cerises sont généralement récoltées après 5 ans de plantation de caféiers et lorsque le fruit devient rouge (**Arya et Rao, 2007 ; Solange et al., 2011**).



Figure n° 01 : Le caféier robusta (Solange *et al.*, 2011).



Figure n°02 : Les fleurs et feuilles de l'espèce robusta (Lim, 2013).

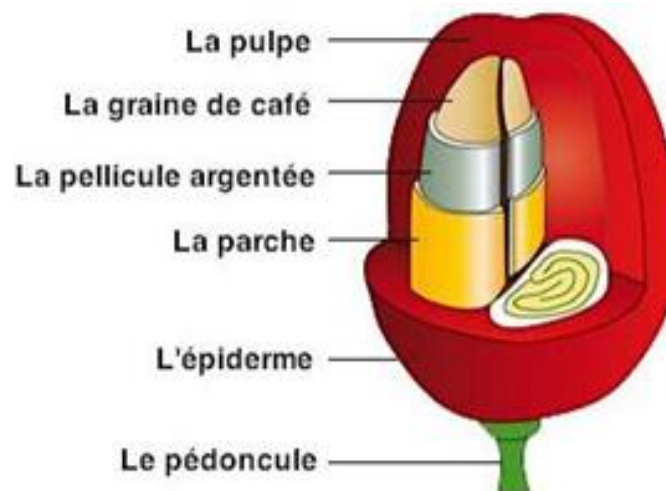


Figure n°03 : Les Baies du caféier robusta (Acharaporn *et al.*, 2016, Lim, 2013).

VI. Composition des graines de *C. canephora* et effet biologique

Ces derniers temps, les chercheurs ont découvert que la partie la plus intéressante dans l'espèce robusta est la graine en raison de sa grande variété en substances naturelles qui présentent un réel potentiel à effets biologiques (Tantin, 2016). Le **Tableau n°01** regroupe les principaux constituants des graines de l'espèce robusta (*C. canephora*).

Tableau n° 01 : Composition chimique des graines de *C. canephora* (Tantin, 2016 ; Adepoju *et al.*, 2017 ; Mohd-Zain *et al.*, 2017)

Composés	[c] en g/100g de MS	Constituants
Glucides solubles	6-11,5	/
Monosaccharides	0,2-0,5	Fructose, glucose, galactose, arabinose (traces)
Oligosaccharides	3-7	Sucrose (>90%), raffinose (0-0,9%), stachyose (0-0,13%)
Polysaccharides	3-4	Polymère de galactose (55-65%), mannose (10-20%), arabinose (20-35%), glucose (0-2%)
Polysaccharides insoluble	34-44	/
Hémicelluloses	3-4	galactose (65-75%), arabinose (25-30%), mannose (0-10%)
Cellulose B (1,4) mannane	32-40	/
Acides volatiles	0,1	/
Ac aliphatiques non volatiles	1,3-2,2	Ac citrique, Ac malique, Ac quinique
Acide chlorogénique	7,1-12,1	Mono-, dicaffoyl-, Ac feruloylquinique
Lignine	1-3	/
Lipides	8-12	/
La cire (Wax)	0,2-0,3	/
Huiles	7,7-17,7	Acides Gras 16 :0 et 18 :2 ^{9,12}
Composés azotés	11-15	/
Acides aminés libres	0,2-0,8	Glu, Asp, Asp -NH ₂
Protéines	8,5-12	/
Caféines	1,7-4	Traces de theobromine et theophylline
Trigonelline	0,3-0,9	/
Minéraux	3-5,4	/

VI.1. Les alcaloïdes

Les graines vertes de café robusta sont très riches en métabolites secondaires. De nombreuses publications décrivant les teneurs en composants majoritaires tels que les alcaloïdes, parmi lesquels, la caféine, la trigonelline, l'acide nicotinique, la théophylline et la théobromine. Ses derniers ont un effet biologique intéressants (Chu, 2012).

VI.1.1. La caféine

La caféine ($C_8H_{10}N_4O_2$) est le principe actif le plus connu et le plus étudié du café à cause de ses effets physiologiques (Mccusker *et al.*, 2006 ; Ribeiro et Sebastiao, 2010). Il s'agit de la 1,3,7-triméthylxanthine avec une masse moléculaire de 194,19 g/ mol qui est responsable de 10% de l'amertume du café (Figure 04) (Mohd-Zain *et al.*, 2017).

La teneur la plus élevée en caféine se passe pendant le développement des graines à la fin lors de l'expansion de l'endosperme (Koshiro *et al.*, 2006).

Parmi les métabolites de la caféine, la 1-méthylxantine et le 1-méthylurate qui sont dotés de l'activité antioxydante et du pouvoir de réduction du fer (Vanida et Kittiya, 2017). La caféine avec sa structure et son noyau purique qui est très proche de l'adénosine est capable d'agir en tant qu'antagoniste des récepteurs à adénosine A1, A2A, A2B et A3 (Ribeiro et Sebastiao, 2010).

Elle inhibe également certaines phosphodiésterases ce qui augmente la concentration en AMPc intracellulaire qui active la protéine kinase A et diminue la réaction inflammatoire (Ribeiro et Sebastiao, 2010).

Elle favorise aussi le relargage de Ca^{2+} intracellulaire et interfère avec les récepteurs à l'acide gamma---amino---butyrique (GABA), ce qui explique l'effet psychostimulant (Mattes, 2007 ; Somogyi, 2010).

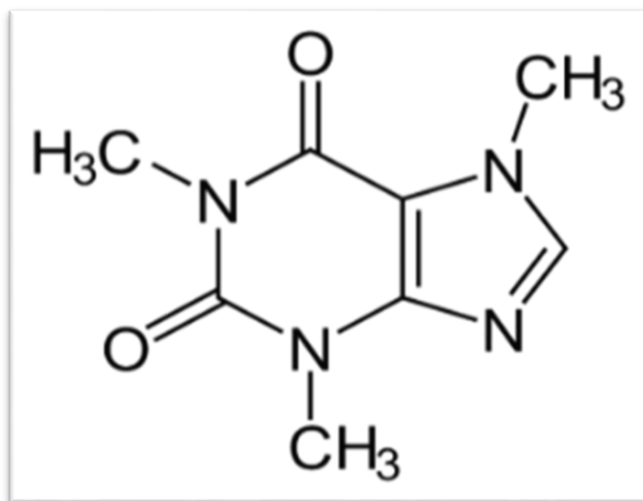


Figure n° 04 :

chimique de la caféine (Mohd-Zain *et al.*, 2017).

Structure

VI.1.2. La trigonelline

La trigonelline (acide N-méthylnicotique) est un composé azoté avec un noyau pyridinique. Sa formule brute est $C_7H_7NO_2$ et sa masse moléculaire est de 137,14 g/mol (**Figure 05**) (**Garrett et al., 2014**).

Une grande partie de la trigonelline est transformée en produits volatils tels que les pyrroles et les pyridines qui contribuent au développement des arômes produits lors de la torréfaction du café (**Ribeiro et Sebastiao, 2010**).

Au delà de 160 °C, la trigonelline est transformée par une déméthylation en acide nicotinique appelée aussi vitamine B3 ou PP ou niacine qui possède un effet anticancéreux, hypocholestérolémiant et régénérateur des neurites. Cela peut avoir des effets bénéfiques sur la mémoire (**Garrett et al., 2014**).

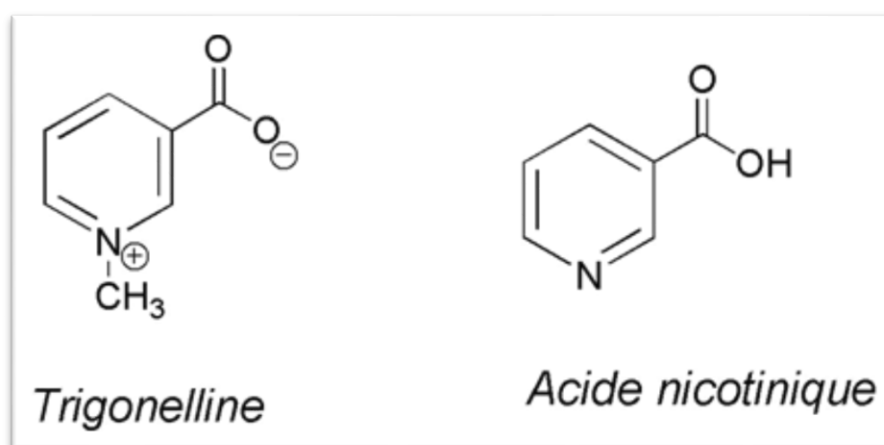


Figure n°05 : Structure chimique de la trigonelline et l'acide nicotinique (**Ribeiro et Sebastiao, 2010**)

VI.2. Les polyphénols

Se sont des métabolites secondaires trouvés chez la plupart des plantes qui sont déterminées par leur nature de squelette carboné. Cette large famille de polyphénols représente environ 8 000 structures phénoliques, 30 structures sont représentés par robusta connus par leurs puissance activité antioxydante (**Clifford et al., 2006 ; Oszmianskiet al., 2007**). Chez robusta, ces composés phénoliques représentent en moyenne 4,1% à 11,3% de sa masse sèche (**Ky et al., 2013**).

Les composés phénoliques sont utilisés largement dans les domaines d'intérêt pharmaceutiques et thérapeutiques tels que la prévention contre les maladies cardiovasculaires, gastroprotectrice (**Ruggiero et al., 2006 ; Lainé et al., 2007**), comme anti-inflammatoire, et comme antimicrobiens (**Fortune et al., 2006**).

VI.2.1 L'acide chlorogénique

Les acides chlorogéniques (ACGs) sont des esters composés d'un acide hydroxycinnamique (l'acide caféique, férulique et p-coumarique) et de l'acide quinique (**Figure n°06**) (**Del-Rio et al., 2010**).

Ces acides ont un rôle important pour la formation des pigments, et interviennent également dans le développement du goût et de l'arôme de la boisson de café (**Cromer et al., 2014 ; Raseetha et al., 2016 ; Mohd-Zain et al., 2017**).

Grace à leurs structures phénoliques, ils sont considérés comme étant des puissants antioxydants. Ils influent de façon positive sur les maladies neurodégénératives tels que la maladie d'Alzheimer et la maladie de Parkinson ainsi que sur le cancer du foie et le diabète de type II (**Del-Rio et al., 2010**). Les acides caféylquiniques et dicaféylquiniques, ont été démontrés à posséder un effet antiviral et immunostimulant (**Del-Rio et al., 2010**).

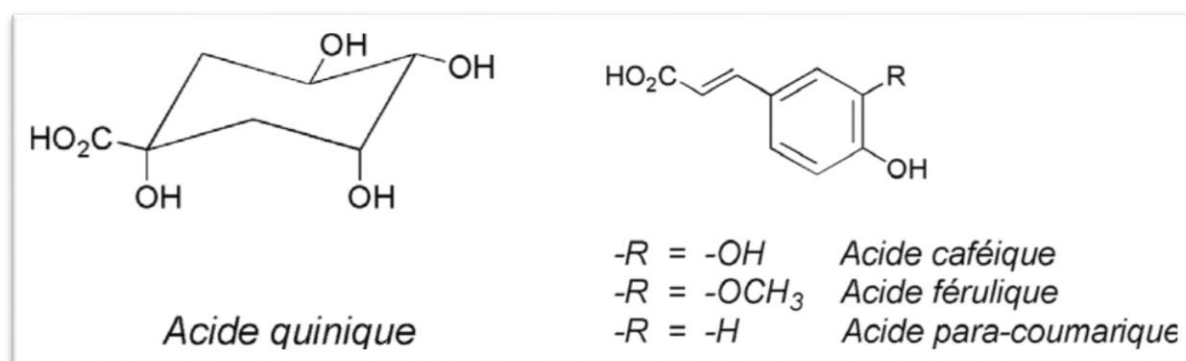


Figure n°06 : Structures chimiques des acides chlorogéniques (**Romero et Verpoorte, 2009 ; Cromer et al., 2014**)

VI.3. Les diterpènes: Cafestol et kahweol

Les diterpènes représentent environ 20% de la fraction lipidique du café. Il s'agit de deux alcools diterpéniques et pentacycliques qui sont le Cafestol et Kahweol (**Figure n°07**) (**Rafael-Carlos et al., 2010 ; Sridevi et Giridhar, 2016 ; Fábio et al., 2018**).

Le cafestol a la formule brute suivante C₂₀H₂₈O₃ et un poids moléculaire de 316,44 g/mol. Il est moins sensible face à la lumière, à la chaleur, à l'oxygène et aux acides et il est plus abondant que le kahweol (**George et al., 2008 ; Veronica et al., 2016**).

Ce dernier, possède une formule brute de C₂₀H₂₆O₃ et un poids moléculaire de 314,42 g/mol, et il est plus sensible à la chaleur, à l'oxygène, à la lumière et aux acides (**George et al., 2008 ; Cardenas et al., 2011**).

Le Cafestol et kahweol ont une action anti-inflammatoire, anticancéreuse et hépatoprotectrice (Cardenas *et al.*, 2011 ; Yong *et al.*, 2017). Cependant une consommation excessive peut augmenter le risque d'une atteinte cardiovasculaire (Rickettset *al.*, 2007 ; Yong *et al.*, 2017).

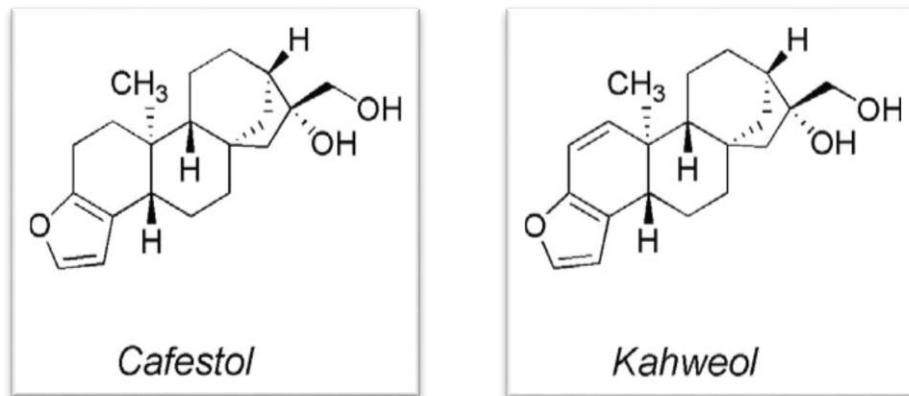


Figure n° 7 : Structures chimiques du Cafestol et kahweol (Fábio *et al.*, 2018).

Deuxième partie

Matériel et méthode

Cette étude a été réalisée au sein du laboratoire Antibiotique Antifongique : physico-chimie, synthèse et activités biologiques (LapSab), Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Sciences de la Terre et de l'Univers, Université Abou Bekr Belkaid – Tlemcen.

Ce chapitre comporte trois volets :

- Extraction et analyses phytochimiques qualitatives et quantitatives des polyphénols totaux, flavonoïdes totaux et tanins à partir des différents extraits des graines vertes de la plante *Coffea canephora*,
- Evaluation de l'activité antioxydante de deux extraits et ses fractions par la méthode de DPPH et la réduction du fer.
- Détermination du pouvoir antimicrobien des mêmes extraits vis-à-vis de 14 souches bactériennes et 3 levures par la méthode de diffusion des disques sur milieu solide et la méthode des dilutions sur milieu liquide.

I. Matériel

I.1. Matériel végétal

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés aux graines vertes de l'espèce *Coffea canephora*. Ces graines ont été importées à partir de l'Ethiopie puis conservées à la température ambiante et à l'abri de la lumière.

I.2. Matériel biologique

L'évaluation de l'activité antimicrobienne des différents extraits des graines vertes de *C. canephora* a été effectuée vis-à-vis de 8 bactéries à Gram négatif, 6 bactéries à Gram positif et trois levures de l'espèce *Candida albicans* de références suivantes :

➤ **Souches à Gram négatif**

Citrobacter freundii ATCC 8090

Klebsiella pneumoniae ATCC 700603

Escherichia coli ATCC 8739

Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853

Salmonella typhimurium ATCC 13311

Proteus mirabilis ATCC 3565

Acinetobacter baumannii ATCC 19606

Enterobacter cloacae ATCC 13047

➤ **Souches à Gram positif**

Staphylococcus aureus ATCC 6538

Enterococcus faecalis ATCC 49452

Bacillus cereus ATCC 10876

Bacillus subtilis ATCC 6633

Micrococcus luteus ATCC 9341

Listeria monocytogenes ATCC 15313

➤ **Levures**

Candida albicans ATCC 10231

Candida albicans ATCC 26970

Candida albicans IP 444.

Ces souches sont disponibles au sein de notre laboratoire LapSab. Elles ont été entretenues par des repiquages successifs puis conservées à 4°C sur gélose inclinée.

II. Méthodes

II.1. Préparation des extraits

Une infusion pendant une heure a été effectuée par la mise en contact de 10g des graines broyées avec 100 ml du solvant (l'hydrométhanol (70/30) ou l'eau). Les extraits ont été filtrés par la suite puis concentrés à l'aide d'un rotavapeur à 60°C.

Une extraction liquide/liquide a été effectuée ensuite en utilisant deux solvants : l'acétate d'éthyle et le n-butanol. Les extraits obtenus, les fractions et la phase résiduelle ont été concentrés à l'aide d'un du rotavapeur à 60°C.

Le calcul des rendements a été réalisé selon la formule suivante :

$$\text{Rendement \%} = (M_0/M_1) \times 100$$

M₀ : Masse en gamme de l'extrait brut/ fraction évaporée

M₁ : Masse en gamme de la matière végétale initiale

II.2. Étude phytochimique

Il s'agit d'une étude qualitative qui permet de détecter la présence ou l'absence des différents métabolites secondaires dans les graines par des réactions de coloration, de précipitation et des observations sous la lumière ultra-violette (**Bruneton, 1999**).

II.2.1. Les alcaloïdes

Dans un tube, un volume de 0,5 mL du réactif de Mayer a été mis en contact avec 0,5 mL de l'extrait acidifié par HCl. Un deuxième tube a été préparé en mélangeant 0,5 mL de l'extrait acidifié avec 0,5 mL du réactif de Wagner. La formation d'un précipité blanc ou brun respectivement dans les deux tubes révèle la présence des alcaloïdes.

II.2.2. Les polyphénols

❖ Les tanins

La détection des tanins a été réalisée par l'ajout de 0,5 mL de FeCl_3 à 1% avec 2 mL de chaque extrait. Après 15 min d'incubation à température ambiante, l'apparition de la couleur verte indique la présence des tanins catéchiques et l'apparition de la couleur bleu-noirâtre révèle la présence des tanins galliques.

❖ Flavonoïdes

Pour mettre en évidence la présence des flavonoïdes nous avons mélangé 1 mL de chaque extrait avec 1 mL d'acide chlorhydrique concentré et quelques copeaux de magnésium. Leur présence est indiquée par l'apparition de couleur rouge, orange ou rose.

❖ Quinones libres

La détection des quinones a été réalisée par la mise en contact de 1 mL de l'extrait avec 0,1 mL de soude (NaOH 1%). Leurs présences sont indiquées par l'apparition de couleur qui vire au jaune rouge.

❖ Coumarines

Un volume de 1 mL de l'extrait à tester a été mis en contact avec 0,5 mL de NH_4OH (10%). Ensuite, une goutte de l'extrait a été déposée sur un papier-filtre. L'apparition d'une fluorescence intense sous la lumière UV (366nm), révèle la présence des coumarines.

❖ Anthraquinones

Dans un tube à essai, nous avons introduit 1 mL de chaque extrait avec 0,5 mL de NH_4OH à 10%. L'apparition d'une couleur violette, après agitation, indique la présence des anthraquinones.

❖ Terpénoïdes

Nous avons utilisé deux tests:

✓ *Test de Libermann-Burchard*: 5 mL de l'extrait ont été mélangés avec 0,5 mL d'anhydride acétique et 0,5 mL d'acide sulfurique. L'apparition d'une couleur mauve, verte ou violette, après incubation, indique la présence des terpénoïdes.

✓ *Test de Slakowski* : à 5 mL d'extrait nous avons ajouté 2 mL de chloroforme et 3 mL d'acide sulfurique concentré. La formation de deux phases et une couleur marron à l'interphase indique la présence des terpénoïdes.

❖ Composés réducteurs

La présence des composés réducteurs a été révélée par l'utilisation de la liqueur de Fehling. Un volume de 1 mL d'extrait a été mélangé avec 2 mL de la solution de Fehling (A+B). Après chauffage à 100°C pendant 8 min, l'apparition d'un précipité rouge brique indique la présence des composés réducteurs.

II.3. Dosage des métabolites secondaires

Les analyses quantitatives des polyphénols totaux, des flavonoïdes et des tanins condensés ont été réalisées à partir des équations de régression linéaire des courbes d'étalonnages tracées.

II. 3.1. Dosage des polyphénols totaux

Le dosage des polyphénols a été réalisé selon la méthode décrite par **Vermerris et Nicholson, (2006)**. Un volume de 0,1 mL de l'échantillon, a été mélangé avec 2 mL d'une solution de carbonate de sodium à 2% fraîchement préparée. Ensuite, 0,1 ml du réactif Folin-Ciocalteu 1N a été ajouté à la suspension. Ce réactif est constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMO_{12}O_{40}$). L'oxydation des phénols réduit le Folin-Ciocalteu en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène. Après 30 min d'incubation à température ambiante, la mesure de l'absorbance été réalisée contre un blanc à l'aide d'un spectrophotomètre à 700 nm.

La courbe d'étalonnage a été réalisée dans les mêmes conditions opératoires en utilisant les concentrations allant de 0 à 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de l'acide gallique.

La concentration des polyphénols est exprimée en microGram me équivalent d'acide gallique par milligramme d'extrait ($\mu\text{g EAG}/\text{mg E}$).

II.3.2. Dosage des flavonoïdes totaux

Le dosage des flavonoïdes totaux a été réalisé par la méthode colorimétrique au trichlorure d'aluminium ($AlCl_3$) et la soude ($NaOH$) comme décrite par **Zhishen et al., (1999)**.

Une quantité de 500 μL de chaque extrait a été mélangé avec 2 mL d'eau distillée et 150 μL d'une solution de nitrite de sodium ($NaNO_2$) à 15%. Ensuite, 150 μL de chlorure d'aluminium ($AlCl_3$) à 10% ont été ajoutés au mélange, le tout a été incubé à température

ambiante pendant 6 min. Ensuite 2 mL d'hydroxyde de sodium (NaOH) à 4% ont été ajoutés puis complété à 5 mL avec de l'eau distillée. Le trichlorure d'aluminium forme un complexe jaune avec les flavonoïdes et la soude forme un complexe de couleur rose. L'intensité de la couleur rose a été mesurée à 510 nm après 15 min d'incubation.

La gamme du contrôle positif a été préparée dans les mêmes conditions opératoires par la catéchine aux concentrations allant de 0 à 1000 µg/ mL.

Le taux en flavonoïdes est exprimé en microGram me équivalent cathéchine par milligramme d'extrait (µg EC/ mg E).

II.3.3 Dosage des tanins condensés

Le dosage des tanins condensés a été réalisé selon la méthode décrite par **Price et al., (1978)** et **Julkunen-Titto, (1985)**. Une prise de 50 µL de chaque extrait a été ajoutée à 3 mL de la vanilline à 4% et 750 µL d'acide chlorhydrique concentré (HCl). Les tanins condensés se dépolymérisent en présence d'acide concentré et par réaction avec la vanilline et se transforment en anthocyanidols de couleur rouge. La mesure de l'absorbance a été réalisée à 500 nm après 20 min. La courbe d'étalonnage (contrôle positif) a été réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant la catéchine à des concentrations qui varient entre 0 à 1000 µg/ mL. Le taux des tanins condensés est exprimé en microGram me équivalent de catéchine par milligramme d'extrait (µg EC/ mg E).

II.4. Etude de l'activité biologique

II.4.1. Evaluation de l'activité antiradicalaire

L'activité antioxydante des extraits des graines vertes du café a été réalisée par la technique de piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) et la technique du pouvoir réducteur du fer FRAP (Ferric Reducing Antioxydant Power)

II.4.1.1. Effet piégeage du radical DPPH

En présence de DPPH, les antioxydants transfèrent un électron ou un atome d'hydrogène au radical DPPH, neutralisant ainsi son caractère instable. Ceci induit une réduction de la couleur violet-foncé en couleur jaune relative à l' α,α -diphénylique- β -picrylhydrazine (**figure n° 08**) (**Somporn et al., 2011 ; Upadhyay et al., 2012**).

La capacité de réduction du DPPH a été déterminée par la diminution de son absorbance à 517 nm, induite par les antioxydants présent dans les extraits, à température ambiante (**Mansouri et al., 2005**).

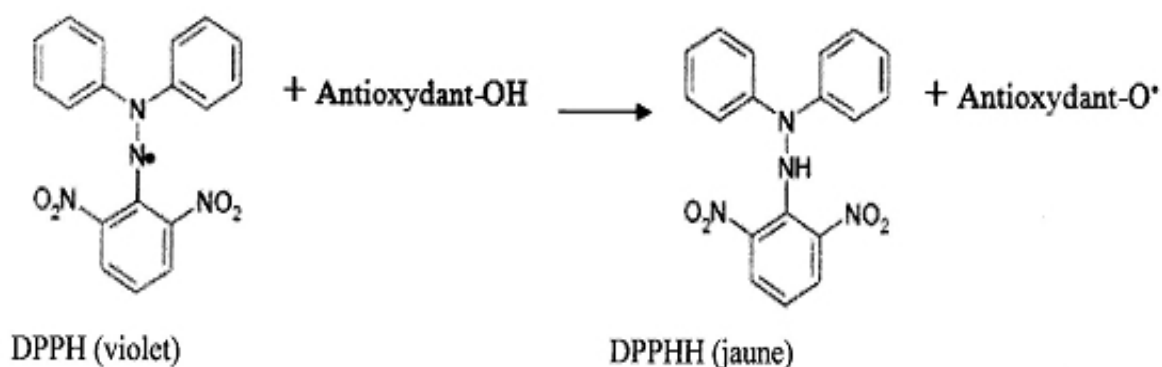


Figure n°08 : Réduction du radical DPPH par un antioxydant (Mansouri *et al.*, 2005).

Pour ce faire, nous avons suivi le protocole décrit par Sanchez-Moreno *et al.*, (1998). Un volume de 50 μ L pour différentes concentrations des extraits a été ajouté à 1950 μ L de la solution méthanolique du DPPH (25 μ g/ mL) fraîchement préparée. En parallèle, le contrôle négatif a été réalisé, en mélangeant 50 μ L du méthanol avec 1950 μ L d'une solution métabolique DPPH. Après 30 min d'incubation à l'obscurité et à température ambiante, la lecture a été effectuée à 517 nm contre un blanc pour chaque concentration.

Pour le control positif nous avons utilisé l'acide ascorbique et le BHA aux concentrations allant de 0,02 à 0,2 mg/ml. Le test a été répété 3 fois.

Le pourcentage de réduction du DPPH est calculé selon la formule suivante :

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

- DPPH (%) : Pourcentage de réduction du DPPH ;
- $A_{\text{contrôle}}$: Absorbance du tube contrôle négatif ;
- $A_{\text{échantillon}}$: Absorbance de l'échantillon.

- Calcul des CI_{50}

La concentration inhibitrice de 50% ou CI_{50} est la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour réduire 50% de radical DPPH. Les CI_{50} sont calculées graphiquement pour chaque extrait à partir d'une courbe logarithmique du pourcentage d'inhibition en fonction des différents concentration des extraits testés (Samarth *et al.*, 2008).

II.4.1.2. Pouvoir réducteur du fer FRAP (Ferric Reducing Antioxydant Power)

Cette méthode a été développée afin de mesurer la capacité des extraits testés à réduire le fer ferrique (Fe^{3+}) en fer ferreux (Fe^{2+}). L'absorbance est mesurable à 700 nm du milieu réactionnel (Oyaizu, 1986).

Nous avons utilisés la méthode décrite par karagozler *et al.*, (2008). A partir d'une série de dilutions des différents extraits, un volume de 0,1 mL a été mélangé avec 0,25 mL d'une solution du tampon phosphate (0,2 M ; pH = 6,6) et 0,25 mL d'une solution de ferricyanure de potassium $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ à 1% (m/v). Ensuite les tubes ont été incubés à 50°C pendant 20 min. Après refroidissement, 0,25 mL d'acide trichloracétique (TCA) à 10% a été ajouté. Après une centrifugation à 3000 rpm pendant 10 min, 0,5 mL de chaque tube a été introduite dans un nouveau tube à essai, auquel 0,5 mL de l'eau distillée et 0,1 mL de solution de FeCl_3 (0,01%) ont été additionnés. L'absorbance de chaque solution a été mesurée à 700 nm contre un blanc. En parallèle le BHA et l'acide ascorbique à différentes concentrations (0 à 0,02 mg/mL) ont été utilisés comme contrôles positifs dans les mêmes conditions opératoires.

La concentration effective (EC_{50}) de chaque extrait a été déterminée graphiquement à l'aide des courbes de régression linéaire représentant l'absorbance en fonction de la concentration. Les antioxydants standards utilisés sont l'acide ascorbique et le BHA.

II.4.2. Evaluation de l'activité antimicrobienne

II.4.2.1. Evaluation de l'activité antibactérienne

L'activité antimicrobienne a été évaluée vis-à-vis de 14 souches bactériennes par la méthode de diffusion sur milieu solide et la méthode des dilutions sur milieu liquide selon les recommandations de l'institut des Standards Clinique et des Laboratoires CLSI, (2009).

II.4.2.1.1. Méthode de diffusion des disques sur milieu solide

L'inoculum a été préparé à partir d'une culture de 18-24 h sur milieu gélosé non sélectif. 4 ou 5 colonies d'une culture pure ont été suspendues dans l'eau physiologique (0,9% NaCl), ensuite la suspension a été ajustée au standard 0,5 McFarland à l'aide d'un spectrophotomètre, ce qui correspond à une absorbance entre 0,08 à 0,12 lue à 625nm. Le 0,5 McFarland est équivalent à 10^8 UFC/mL.

Des disques stériles de 6 mm de diamètres ont été imprégnés par 10 μL des extraits pour une dose finale de 512 μg / disque. Les disques ont été transférés sur une boîte préalablement ensemencée. Après 24 h d'incubation à 37°C, la mesure des diamètres des zones d'inhibition a été effectuée en prenant la moyenne de trois mesures différentes.

L'activité antimicrobienne est considérée comme positive à partir d'un diamètre supérieur à 6 mm. Elle est évaluée dans ce travail comme suit (Nath *et al.*, 2008):

- Très forte activité : diamètre ≥ 30 mm
- Forte activité : diamètre entre 21-29 mm
- Moyenne activité : diamètre entre 16-20mm
- Faible activité : diamètre entre 11-15mm
- Petite ou pas d'activité : diamètre ≤ 10 mm

II.4.2.1.2.Méthode des dilutions sur milieu liquide

Cette technique a pour but de déterminer la plus faible concentration de nos extraits capable de provoquer une inhibition de la croissance des bactéries.

Afin de déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI) des extraits par la méthode des microdilutions en milieu liquide, une gamme de concentrations décroissantes allant de 10 à 0,019 mg/mL a été préparée. Ensuite, 100 μ L de chaque concentration de l'extrait ont été transférés sur les puits d'une microplaque préalablement ensemencés par 100 μ L d'un inoculum contenant $5 \cdot 10^5$ UFC/ mL.

Le premier puits correspond au contrôle négatif, remplis uniquement par le milieu de culture. Le dernier puits correspond au contrôle positif, contenant que la suspension bactérienne. Après 24h d'incubation à 37°C, la lecture est réalisée à l'œil nu, et la CMI correspond à la plus faible concentration de l'extrait testé pour laquelle aucun trouble n'est observé.

II.4.2.2.L'évaluation de l'activité antifongique vis-à-vis des levures

L'évaluation de l'effet antifongique des différents extraits vis-à-vis des levures a été réalisée par la méthode de diffusion sur milieu solide inspirée à partir des recommandations du CLSI, (2009).

La même technique décrite pour les bactéries a été suivie sauf que le milieu utilisé dans cette étude est le Mueller Hinton supplémenté par 2% de glucose et de 0,5 μ g/mL de bleu de méthylène et l'inoculum équivalent à 0,5 McFarland a été préparé de la même manière que les bactéries sauf que l'absorbance est de l'ordre de 0,12-0,15 lue à 530 nm. Après 24 heures d'incubation à 35°C, la lecture a été effectuée de la même façon que celle décrite pour les bactéries.

La détermination de la CMI des levures a été effectuée de la même manière que celles décrite pour les bactéries, sauf que le milieu utilisé était le Roswell Park Memorial Institute 1640 et

L'inoculum a été ajusté à 530 nm (ce qui donne une concentration de 10^6 UFC/ mL) (CLSI, 2009).

1-5

Troisième partie

Résultats et discussion

I. Etude phytochimique

I.1. Rendements des extractions

Dans cette étude, les graines vertes de café ont été soumises à une extraction en utilisant deux solvants de polarité croissantes : aqueux et hydrométhanol (70/30, V/V).

Les résultats des rendements sont représentés dans la figure n° 9. Nous constatons que les rendements diffèrent d'un extrait à un autre en fonction du solvant utilisé. En effet, les rendements les plus élevés ont été obtenus avec l'extrait brut aqueux (4,62 %), ensuite l'extrait brut hydrométhanol (3,88%) et la fraction n-butanol de l'extrait aqueux (3,76%) et en fin la fraction n-butanol de l'extrait hydrométhanol (3,15%).

De plus, les fractions d'acétate d'éthyle des deux extraits présentent un pourcentage de rendement presque similaire. Les phases résiduelles montrent un pourcentage de rendement le plus faible (0,67%) avec l'extrait aqueux et l'extrait hydrométhanol (0,33%).

Dans l'étude de **Kanokwan *et al.*, (2016)**, les extraits d'hexane des grains vertes de la même espèce présentaient les rendements les plus élevés par rapport aux extraits éthanol.

Les résultats obtenues peuvent être expliqués par les travaux de **Ncube *et al.*, (2008)** et **Qian *et al.*, (2013)** qui ont montré que la différence de la polarité des solvants organiques utilisés, le mode d'extraction adopté et la température jouent un rôle essentiel dans la détermination de la qualité et la quantité d'un extrait ainsi qu'à sa composition chimique.

Le **tableau n°02** regroupe les caractéristiques des différents extraits des graines vertes de Robusta. Nous constatons que les extraits et les fractions obtenus sous forme de poudre sont solubles dans le DMSO alors que ceux obtenus sous forme de pâte sont solubles dans l'eau distillée.

Nos résultats ont confirmé ceux de **Benikhelef, (2017)** qui a obtenu les mêmes caractéristiques les nôtres.

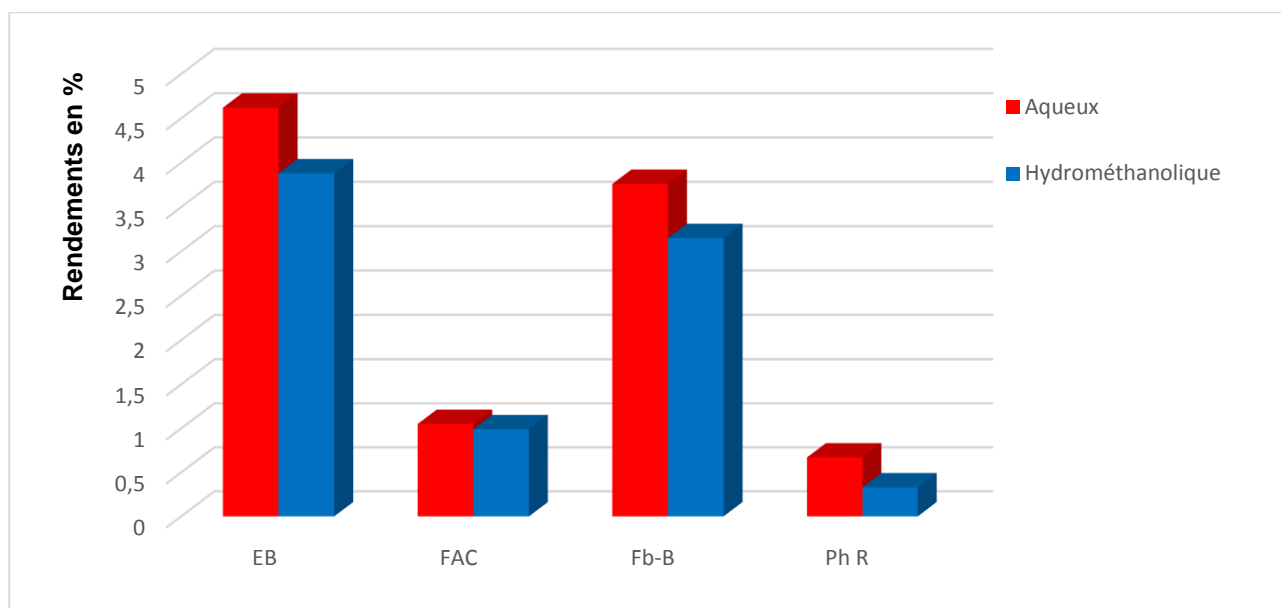


Figure n° 9: Rendements des différents extraits des graines vertes de Robusta
EB : extrait brut ; **FAC :** fraction d'acétate d'éthyle ; **Fb-B :** fraction n-butanol ;
PhR : phase résiduelle

Tableau n°02 : Caractéristiques des différents extraits des graines vertes de Robusta.

Solvants		Aspect	Couleur	Solubilité
Aqueux	Extrait brut	Poudre	moutarde foncé	DMSO
	Fraction d'acétate d'éthyle	Poudre	marron clair	DMSO
	Fraction n-butanol	Patte	vert clair	DMSO
	Phase résiduelle	Poudre	marron foncé	Eau distillée
Hydrométhanolique	Extrait brut	patte	marron	DMSO
	Fraction d'acétate d'éthyle	Poudre	jaune-vert	DMSO
	Fraction n-butanol	Poudre	jaune	DMSO

	Phase résiduelle	Patte	moutarde	Eau distillée
--	------------------	-------	----------	---------------

I.2. Tests phytochimiques

Dans le but de détecter la présence des métabolites, l'analyse phytochimique a été réalisée sur les différents extraits. Ces tests sont basés sur des réactions de caractérisation fondées sur des phénomènes de coloration ou de précipitation et d'observations. Les résultats du screening phytochimique sont représentés dans le **Tableau n° 03**.

Nous observons la présence des tanins, des flavonoïdes, alcaloïdes, quinones libres et des terpénoïdes dans les différents extraits. En revanche, nous remarquerons l'absence des anthraquinones, coumarines, composés réducteurs, les stérols et les triterpènes.

La présence de ces différents phyto-constituants peut être responsable des propriétés thérapeutiques des graines vertes de café reportées dans la bibliographie.

Les analyses phytochimiques sur les extraits végétaux représente une étape préparatoire d'une grande importance puisqu'elle donne information sur les constituants responsables des activités biologiques (Sofowora, 1993).

Tableau n° 03 : Test phytochimiques des extraits des gaines de café verts Robusta.

		Extrait aqueux				Extrait hydrométhanolique			
Métabolites secondaires		EB	FAC	Fn-B	PhR	EB	FAC	Fn-B	PhR
Tanins		+	+	+	+	+	+	+	+
Flavonoïdes		+	+	+	+	+	+	+	+
Alcaloïdes	<i>Slakowski</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Libermann-Burchard</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
Quinones libres		+	+	+	+	+	+	+	+
Coumarines		-	-	-	-	-	-	-	-
Anthraquinones		-	-	-	-	-	-	-	-

I.3. Taux des composés phénoliques

Stérols et triterpènes	-	-	-	-	-	-	-	-
Terpénoïdes	+	+	+	-	+	+	+	-
Composés réducteurs	-	-	-	-	-	-	-	-
(+) : Test positif (présence) ; (-) : Test négatif (absence). EB : extrait brut ; FAC : fraction d'acétate d'éthyle ; Fn-B : fraction n-butanol ; PhR : phase résiduelle								

L'estimation des teneurs en polyphénols totaux, flavonoïdes totaux et des tanins condensés a été réalisée en utilisant des méthodes utilisant le Folin-Ciocalteu, le trichlorure d'aluminium (AlCl₃) en milieu basique et la vanilline respectivement (**Li et al., 2007 ; Haddoudi et al., 2014 ; Raseetha et al., 2016**).

Les résultats sont calculés en utilisant l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage des standards (**voir annexe, Figure n°16-18**) et sont exprimés en microGram mes équivalent standard (acide gallique/ catéchine) par milliGram me d'extrait. L'analyse quantitative des deux extraits a montré que les fractions de l'extrait hydrométhanol renferment des teneurs plus élevées en composés phénoliques par rapport à l'extrait aqueux (**Tableau n° 04**).

Nous remarquons que les teneurs en composés phénoliques varient considérablement entre les deux extraits leurs fractions. La fraction n-butanol de l'extrait hydrométhanol et de l'extrait brut aqueux montrent les meilleurs teneurs.

Nous observons aussi que les deux fractions n-butanol de l'extrait aqueux et l'extrait hydrométhanol sont les plus riches en flavonoïdes, par rapport à l'extrait aqueux. Ce dernier renferme à son tour un taux de tannins plus élevé que celui de l'extrait hydrométhanol

D'après **Lee et al., (2003)**, le mode d'extraction et la technique de quantification peuvent également agir sur la teneur des polyphénols totaux. De plus, le choix du solvant est important car l'activité des extraits alcooliques est plus élevée par rapport aux extraits aqueux ce qui due à la présence des quantités élevées en polyphénols comparés aux extraits aqueux (**Tiwari et al., 2011**).

Tableau n°04 : Teneurs en composés phénoliques dans les deux extraits avec les différentes fractions.

	Aqueux				Hydrométhanol			
	EB	FAC	Fn-B	PhR	EB	FAC	Fn-B	PhR
Polyphénols totaux (µg EAG/mg d'extrait)	268,94 ±3,68	159,47 ±7,36	243,68 ±10	141,05 ±2,63	284,21 ±13,15	269,41 ±7,36	291,57 ±7,87	104,21 ±5,78
Flavonoïdes totaux (µg EC/mg d'extrait)	212,00 ±4	148,01 ±8	271,5 ±20,5	132,01 ± 22,5	252,5 ±13,5	260,05 ±13,5	263,5 ±14,25	72, 88 ±14,5
Tanins condensés (µg EC/mg d'extrait)	78,02 ±70	73,5 ± 46,5	115,5 ± 111	5, 08 ± 3	120 ± 30	149,5 ± 19,5	67,5 ± 42,5	60,5 ± 7,5

EB : extrait brut ; **FAC** : fraction d'acétate d'éthyle ; **Fn-B** : fraction n-butanol ;
PhR : phase résiduelle

Les résultats obtenus par de l'extrait hydrométhanol sont supérieurs à ceux obtenus avec le même extrait par **Raseetha et al., (2016)** qui ont obtenus les valeurs suivantes 16,26 ± 0,59 µg EAG /mg d'extrait. Ainsi, nos valeurs sont proches de celles de **Gonçalves et al., (2012)** qui ont obtenus les concentrations : 221,5 µg EAG/mg pour l'extrait de dichlorométhane et 264,1 µg EAG /mg d'extrait d'hexane.

Cependant les résultats des polyphénol et flavonoides (des fraction n-butanol et les extraits bruts aqueux et hydrométhanol) sont plus élevées par rapport à celle trouvés par **Gonçalves et al., (2012)** qui sont successivement 2,1 et 3,2 mg EC/mg E pour l'extrait aqueux.

Par contre, **Benikhelef, (2017)** a trouvé des teneurs en tannins inférieures aux nôtres. En effet, cette concentration est de 199,4 µg EC/mg E pour l'extrait aqueux et 148 µg EC/mg E pour l'extrait hydrométhanol.

Il est admis que tous les végétaux contiennent des composés phénoliques avec une répartition qualitative et quantitative qui varie selon les espèces, les organes, les tissus et les stades physiologiques. Il a été rapporté que plusieurs facteurs peuvent aussi influencer cette variation :

le patrimoine génétique, la période de la récolte, le stade de maturation de la plante et même le solvant utilisé (**Sarni-Manchado et al., 2006 ; Dif et al., 2015**).

Ces substances jouent un rôle important dans l'interaction de la plante avec son environnement biologique et physique. Les fonctions principales attribuées à ces composés sont la protection contre les agressions extérieures, les herbivores ainsi que la limitation des dommages dus aux radiations UV (**Dif et al., 2015**).

Parmi l'ensemble des métabolites secondaires, les composés phénoliques représentés majoritairement par les flavonoides et les tanins suscitent un grand intérêt scientifique, parce qu'ils sont considérés comme de puissants antioxydants, antibactériens et antifongiques (**Coskun et al., 2005 ; Oliver et Blumberg, 2008**).

II. Etude des activités biologiques

II.1. Evaluation de l'activité antioxydante

L'activité antioxydante des extraits des graines de Robusta a été évaluée par deux méthodes spectrophotométriques: le piégeage du radical libre DPPH et la réduction du fer.

II.1.1. Piégeage du radical libre 2,2-diphényle-1-picrylhydrazyl (DPPH)

La technique DPPH utilisée est basée sur l'utilisation du radical instable DPPH qui fut l'un des premiers radicaux libres utilisés dans l'étude de l'activité antioxydante des composés phénoliques (**Pincemail et al., 2007 ; Raseetha et al., 2016**).

Les résultats obtenus sont exprimés en pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des concentrations des extraits. Les résultats présentés dans les **figures n°10-12** représentent les profils des activités antiradicalaires tracés sous formes de courbes logarithmiques.

Nous constatons une augmentation proportionnelle des pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des concentrations du BHA, acide ascorbique, les extraits et les fractions testés.

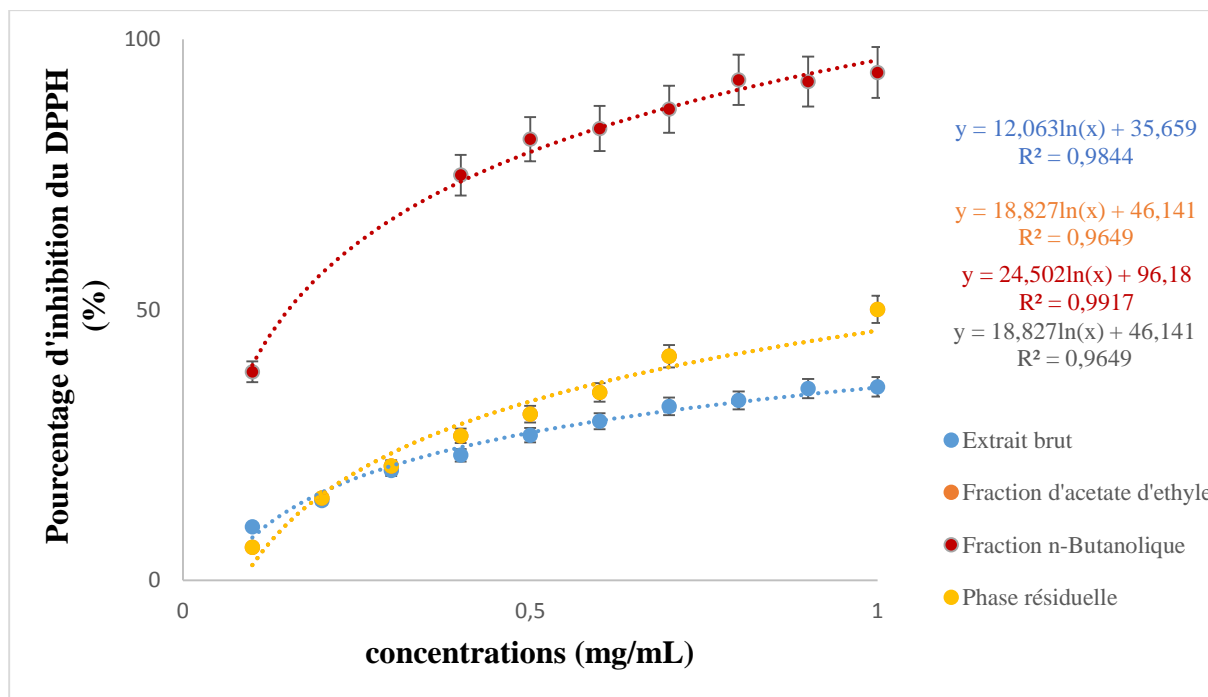


Figure n° 10 : Evolution des pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des concentrations de l'extrait aqueux et ses fractions.

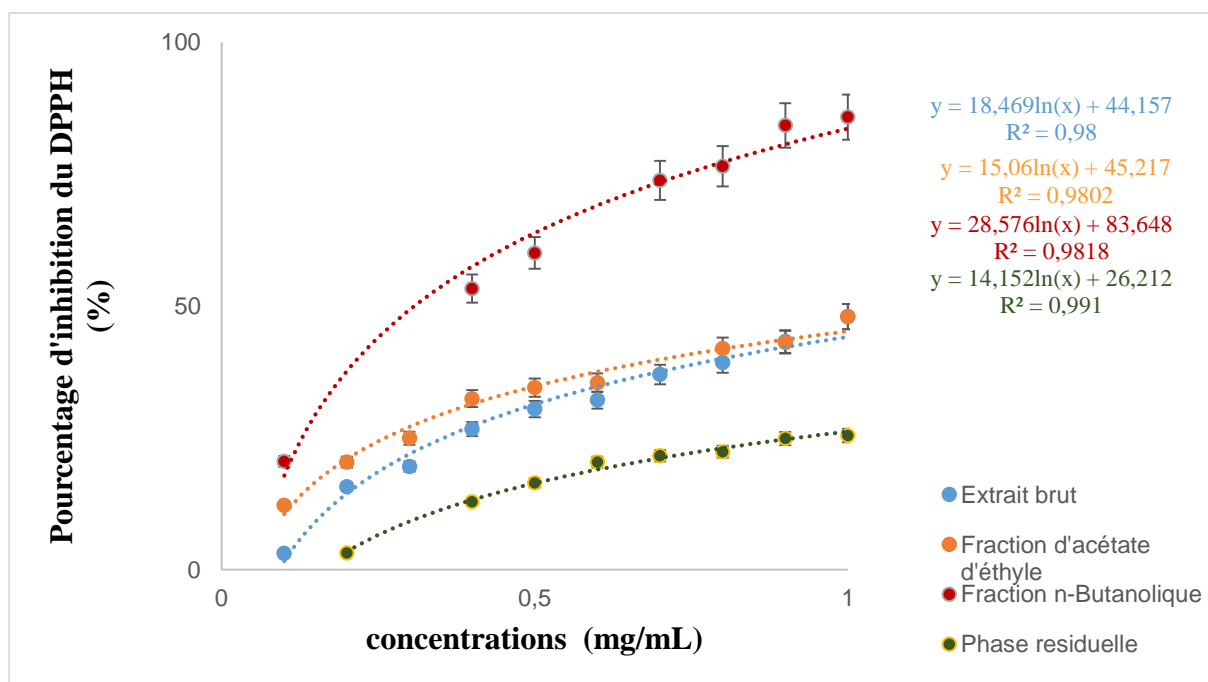


Figure n° 11 : Evolution des pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des concentrations de l'extrait hydrométhanol et ses fractions.

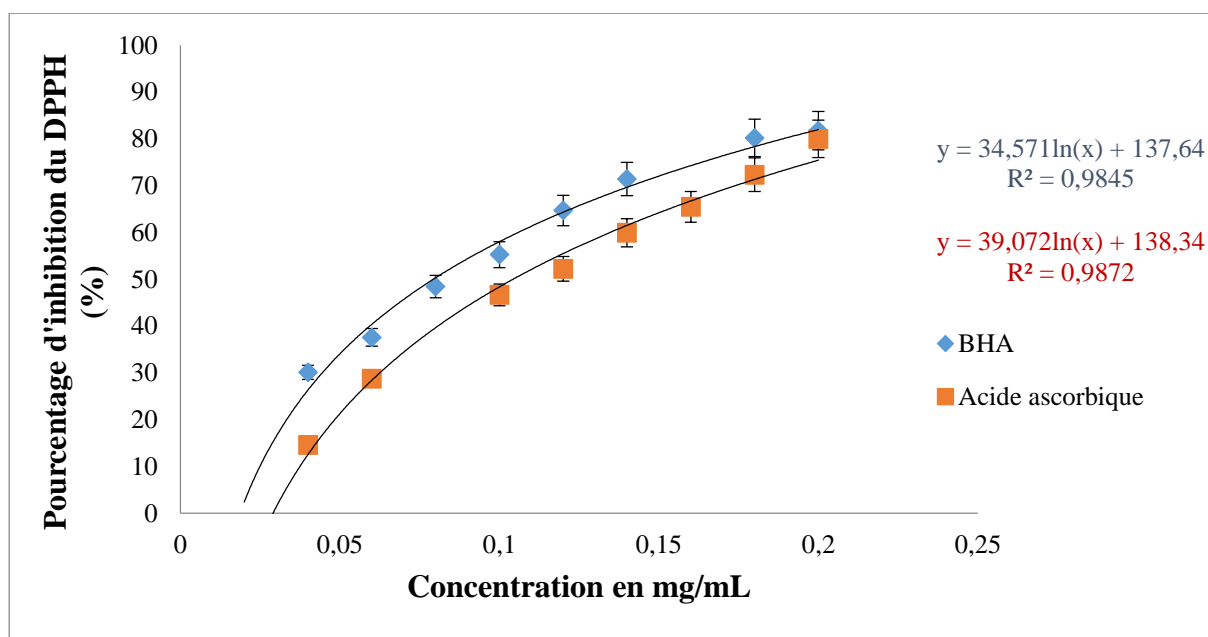


Figure n° 12 : Evolution des pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des concentrations de BHA.

Les valeurs des CI_{50} nécessaires pour réduire 50% du taux des radicaux libres ont été déterminées à partir des équations des régressions linéaires des graphes tracés. Les résultats des CI_{50} sont illustrés dans le **Tableau n°05**. Nous constatons une activité antioxydante élevée pour la fraction n-butanol de l'extrait aqueux ($CI_{50}= 0,30$ mg/ml) (figure n°11) et de la fraction n-butanol de l'extrait hydrométhanolique (**figure n°13**) ($CI_{50}=0,32$ mg/ml).

Cependant la fraction acétate d'éthyle de l'extrait aqueux et l'extrait hydrométhanol ont montré des activités de piégeage du radical DPPH relativement faible ($CI_{50}=1,22$ et 1,36 mg /ml respectivement).

Tableau n° 05 : CI_{50} des différents extraits de *C. canephora*.

Extraits	Aqueux				Hydrométhanol				Acide ascorbique	BHA
	EB	FAC	Fn-B	PhR	EB	FAC	Fn-B	PhR		
CI_{50} (mg/mL)	3,25	1,22	0,30	1,22	1,37	1,36	0,32	5,36	0.10	0.037

EB : extrait brut ; **FAC :** fraction d'acétate d'éthyle ; **Fn-B :** fraction n-butanol ;

PhR : phase résiduelle

D'après les valeurs enregistrées, l'extrait aqueux présente une CI_{50} inférieure à celle de l'extrait hydrométhanol, et donc une meilleure activité. De plus, la fraction n-butanolique présente la plus faible CI_{50} qui peut être expliquée par le test du dosage des flavonoïdes. Ce dernier a montré une concentration élevée en flavonoïdes dans la fraction n-butanolique des deux extraits. Les travaux de **Friedman et al., (2006)** ; **Cushnie et al., (2007)** et **Batovska et al., (2009)**, ont montrés que les flavonoides possèdent des propriétés biologiques très importantes : antitumorales, anticarcinogènes, antiparasitaires, antivirales, antioxydantes, antiinflammatoires, anti-allergique, antithrombotique, antiatherogéniques, hypotenseurs, analgésiques, ostéogène, diurétiques. De plus, les flavonoides tels que l'acide p-coumarique et acide caféique possèdent des propriétés antioxydantes très importantes. Les flavonoïdes à travers leurs groupements hydroxyles (C3-OH) constituent des produits qui possèdent une activité antioxydante et une capacité à piéger les radicaux libres en particulier O_2^- , OH, NO (**Ghedira, 2005**).

Dans l'étude de **Ritu et Nisha, (2018)**, l'extrait hydrométhanol a montré une forte capacité à piéger le radical DPPH (89,502 $\mu\text{g/mL}$) par rapport à l'extrait aqueux (241,665 $\mu\text{g/mL}$). Ce résultat est en accord avec celui que nous avons obtenu pour l'extrait brut. Cependant, les CI_{50} enregistrées sont inférieures à celle que nous avons trouvées. L'extrait brut aqueux ainsi que la phase résiduelle de l'extrait hydrométhanol présentent une très faible activité antioxydante par rapport aux autres extraits. **Kanokwan et ses collaborateurs**, ont trouvé une valeur de CI_{50} nettement supérieure à nos résultats (10,340 mg/mL) dans l'extrait hexane préparé par une macération. Par contre la valeur de la CI_{50} était inférieure (0,070 mg/mL) dans l'extrait éthanolique par rapport à celle trouvée dans notre travail (**Kanokwan et al., 2016**).

II.1.2. Réduction du fer : FRAP (*Ferric Reducing Antioxydant Power*)

La présence des composés réducteurs dans les extraits des plantes provoque la réduction de Fe^{3+} en Fe^{2+} mesurable à 700 nm (**Sung-Yoon et al., 2002**). Les résultats de réduction du fer par les extraits de la plante Robusta et des standards sont représentés dans les figures n°13-15. Les valeurs obtenues nous ont permis de tracer des courbes linéaires en fonction des concentrations. Nous remarquons que la capacité de réduction du fer est proportionnelle à l'augmentation des concentrations des extraits. L'extrait hydrométhanol et les fractions acétate d'éthyle et n-butanol possèdent les meilleures capacités à réduire le fer par rapport à l'extrait aqueux. A l'inverse, la phase résiduelle de l'extrait aqueux était la plus active.

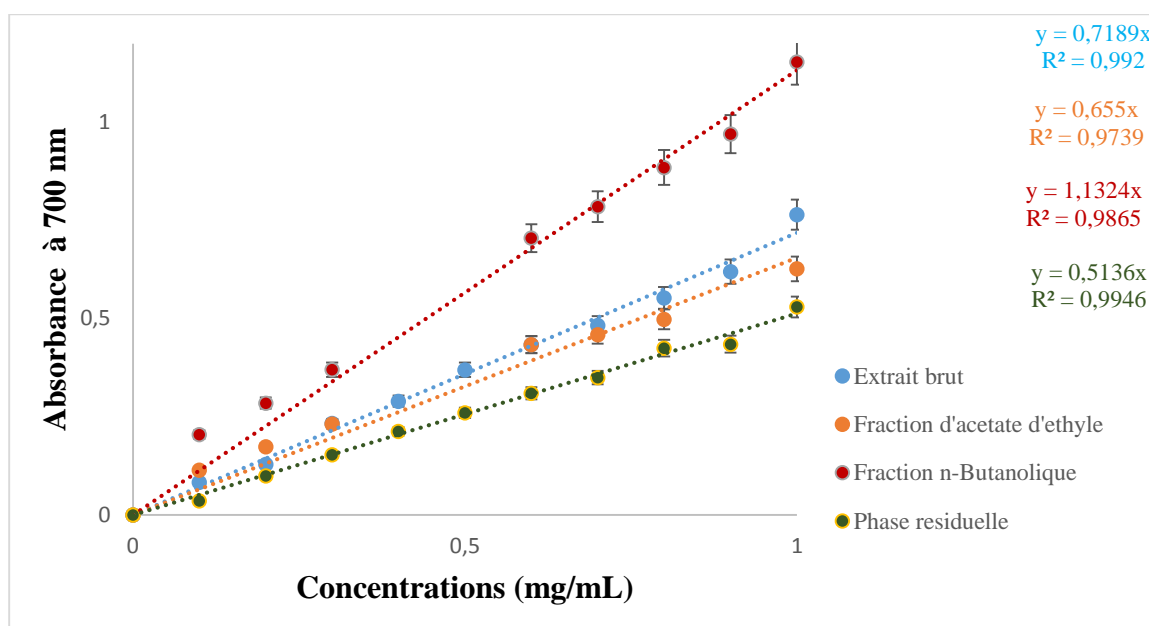


Figure n° 13 : Evolution des absorbances du fer réduit par l'extrait aqueux et ses fractions.

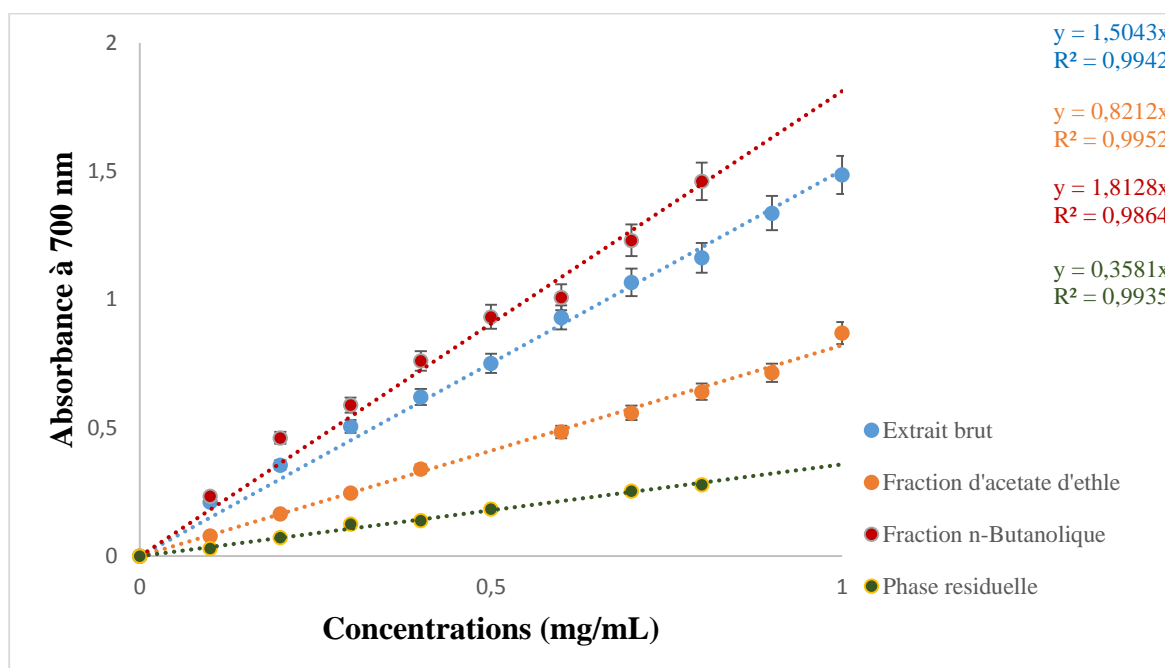


Figure n° 14 : Evolution des absorbances du fer réduit par l'extrait hydrométhanol et ses fractions.

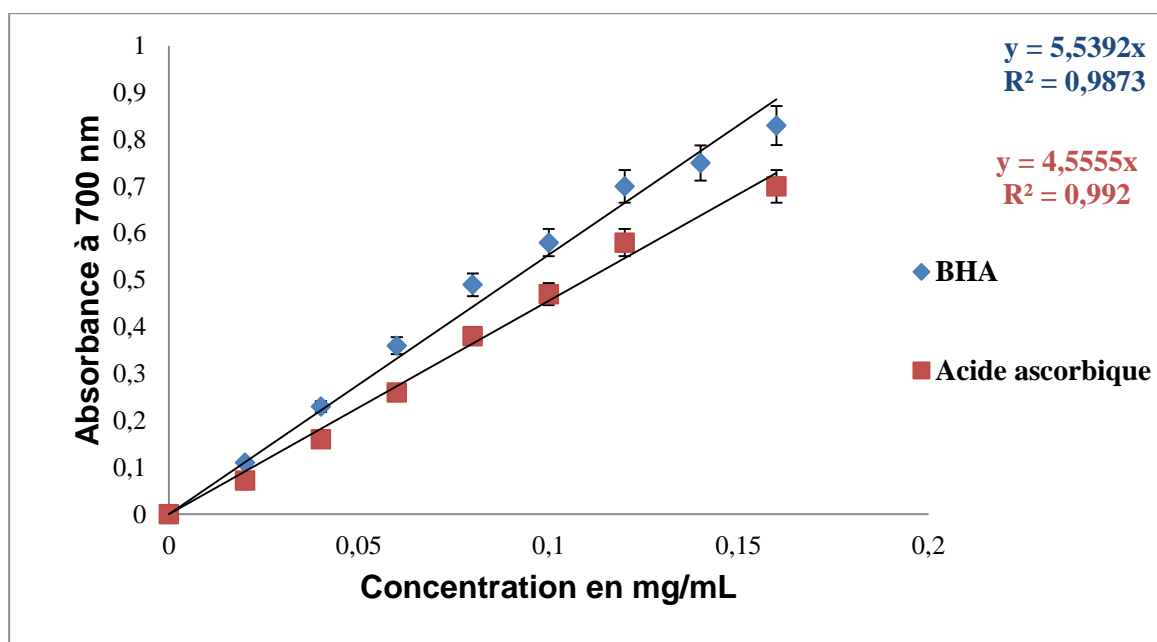


Figure n° 15 : Evolution des absorbance du fer réduit par acide ascorbique.

Le calcul des CE_{50} (tableau n°06), confirme les résultats obtenus au paravant. L'extrait hydrométhanol et les fractions acétate d'éthyle et n-butanol ont exhibé les plus basses valeurs de CE_{50} par rapport à l'extrait aqueux. Alors que, la phase résiduelle de l'extrait aqueux avait une valeur plus basse que la phase résiduelle de l'extrait hydrométhanol. L' CE_{50} la plus basse a été obtenue par la fraction n-butanol de l'extrait hydrométhanol. Cette valeur est plus élevée que celle du standard acide ascorbique et le BHA.

Tableau n°06 : résultats des valeurs des CE_{50} de différents extraits de *C. canephora*.

Extraits	Aqueux				Hydrométhanol				Acide ascorbique	BHA
	EB	FAC	Fn-B	PhR	EB	FAC	Fn-B	PhR		
CE_{50}	0,69±	0,51±	0,506±	0,502±	0,33±	0,608±	0,27±	1,39±	0,109±	0,09±
(mg/mL)	0,006	0,67	0,018	0,054	0,006	0,029	0,027	0,036	0,06	0,058

EB: extrait brut ; FAC: fraction d'acétate d'éthyle; Fn-B: fraction n-butanol; PhR : phase résiduelle

Nos résultats concordent avec ceux Vanida et Kittiya, (2017) qui ont trouvés que les CE_{50} de la fraction n-butanol de l'extrait hydrométhanol ($CE_{50}= 0,27\text{mg/mL}$) était inférieures à celle de l'extrait di-chlorométhane ($CE_{50}= 0,31\text{mg/mL}$) et à celle de l'extrait d'hexane ($CE_{50}=0,46\text{ mg/ mL}$). Dans la même étude, la valeur de la CE_{50} est égale à 0,19 mg/mL de l'extrait hydrométhanol.

Cependant, nos résultats ne sont pas en accord avec ceux de **Ritu et Nisha, (2018)**. Ces auteurs ont rapporté que l'extrait méthanol a montré la capacité la plus basse à réduire le fer alors que les extraits chloroforme et aqueux montraient une capacité médiocre.

De façon générale, la capacité antioxydante des flavonoïdes réside dans leur faculté à complexer les chaînes radicalaires par des mécanismes de transfert d'électrons et de protons, et par chélation des métaux de transition. Ils sont aussi capables de catalyser la peroxydation lipidique (**Schroeter et al., 2002; Leopoldini et al., 2011**). De façon générale, l'activité biologique des flavonoïdes est fortement dépendante de la nature et de la position des substituants, en particulier du nombre de groupements hydroxyles (**Schroeter et al., 2002**).

II.2. Évaluation de l'activité antimicrobienne

II.2.1. Évaluation de l'activité antibactérienne

II.2.1.1. La technique de diffusion sur gélose Mueller Hinton (méthode des disques)

L'étude de l'activité antibactérienne a été réalisée tout d'abord par la technique de diffusion des disques sur la gélose Mueller-Hinton. Les résultats des diamètres des zones d'inhibitions des différents extraits vis-à-vis des souches bactériennes (à Gram négatif et à Gram positif) sont illustrés dans le **Tableau n° 07**.

Nous constatons que l'activité varie entre les bactéries à Gram négatif et à Gram positif. Les résultats les plus intéressants ont été obtenus par les fractions acétate d'éthyle et n-butanol de l'extrait hydrométhanol. Les phases résiduelles des deux extraits sont les moins actifs.

Les bactéries à Gram négatif *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Salmonella typhimurium*, *Enterobacter cloacae* sont sensibles à la fraction acétate d'éthyle et n-butanol de l'extrait aqueux avec des diamètres allant de 8 à 13 mm. Par contre *Klebsiella pneumonia* et *Citrobacter freundii* ne sont sensibles qu'à l'extrait brut aqueux avec les zones d'inhibitions 9 et 12,5 mm. Les souches à Gram négatif les plus sensibles à tous les extraits sont *Acinetobacter baumannii*, *Citrobacter freundii*, *Pseudomonas aeruginosa*, et *Klebsiella pneumonia* avec des diamètres compris entre 11 et 16 mm.

Pour les bactéries à Gram positif, nous remarquons aussi une activité variable entre les deux extraits aqueux et hydrométhanol. *Staphylococcus aureus* est sensible à l'extrait brut, la fraction d'acétate d'éthyle, la fraction n-butanol et la phase résiduelle de l'extrait hydrométhanol. Cette même souche est aussi sensible à l'extrait brut et la fraction d'acétate d'éthyle de l'extrait

aqueux avec des zones d'inhibitions varient entre 7,5 à 12,5 mm. *Bacillus cereus* est sensible aux fractions acétate d'éthyle, n-butanol et la phase résiduelle des deux extraits aqueux et hydrométhanol. *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes* et *Micrococcus luteus* ne sont sensibles qu'à l'extrait aqueux, la fraction d'acétate d'éthyle et la fraction n-butanol.

Micrococcus luteus, *Staphylococcus aureus*, sont les souches à Gram positif les plus sensibles. Dans leurs travaux de recherche, Acharaporn et ses collaborateurs, (2016) ont montré que l'extrait aqueux des graines vertes de café présente une activité antibactérienne vis-à-vis de plusieurs souches en l'occurrence *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli* avec les zones inhibitions 12, 10 et 10 mm respectivement.

Une autre étude effectuée par **Ritu et Nisha, (2018)** qui avait pour objectif l'évaluation de l'activité antibactérienne de trois extraits des graines vertes de robusta a montré que les trois extraits : aqueux, chloroforme et méthanol n'avait aucune activité antibactérienne vis-à-vis de *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus* et *Klebsiella pneumoniae*.

Tableau n° 07 : Diamètres des zones d'inhibition (mm) des extraits des graines vertes de Robusta

		Aqueux				Hydrométhanol				Genta
		EB	FAC	Fn-B	PhR	EB	FAC	Fn-B	PhR	
Bactéries Gram négatif	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	6	9 ±1,41	9±2,82	7	6	7,5±0,70	8±1,41	6	22
	<i>Klebsiella pneumonia</i> ATCC 700603	9 ±1,41	6	6	6	14,5±0,70	12,5±3,53	9,5±2,12	8,5±0,70	19
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	6	13±1,41	10±4,24	6	8±1,41	6	6	6	12
	<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 19606	6	9±2,82	8±2,82	10±1,41	10±1,41	16±1,41	7	6	35
	<i>Citrobacter freundii</i> ATCC 8090	12,5±3,53	6	6	6	9±2,82	6	6	6	18
	<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 3565	7	9	6	6	7,5±0,70	6	6	6	25
	<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 13311	10,5±0,70	9	9±2,82	8±1,41	10±2,82	10±1,41	7	6	22
	<i>Enterobacter cloacae</i> ATCC 13047	8±2,82	8	9±1,41	10±4,24	6	12,5±3,53	6	6	21
Bactéries à Gram	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	9,5±2,12	10±1,41	6	6	11±0,70	11,5±0,70	12,5±0,70	7,5±0,70	32
	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876	6	11±0,70	10±2,82	10±4,24	6	9±2,82	10±4,24	8	20
	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	6	6	6	6	6	7	8±1,41	6	22
	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 49452	8	10±1,41	10±1,41	8	7,5±0,70	6	6	6	21
	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 15313	6	9±1,41	11±0,70	10±2,82	9±2,82	6	6	6	22

	<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341	13±1,41	9±1,41	16±1,41	10±1,41	15,5±0,70	6	6	6	22
--	-------------------------------------	---------	--------	---------	---------	-----------	---	---	---	----

EB : extrait brut ; **FAC** : fraction d'acétate d'éthyle ; **Fn-B** : fraction n-butanol ; **PhR** : phase résiduelle

II.2.1.2. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI)

Les résultats relatifs à l'étude des concentrations minimales inhibitrices (CMI) des extraits brutes aqueux et hydrométhanolique et des différentes fractions sont regroupés dans le **Tableau n° 08**.

Les plus basses CMI ont été obtenues par l'extrait brut de l'extrait aqueux et la fraction acétate d'éthyle de l'extrait aqueux vis-à-vis de *Enterococcus faecalis* et *Micrococcus luteus* et sont de l'ordre de 0,128 mg/ mL.

Concernant les bactéries à Gram négatif, les souches *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumonia*, *Acinetobacter baumannii*, *Citrobacter freundii* et *Salmonella typhimurium* ont montré des CMI égales à 0,5 mg/ mL pour l'extrait aqueux et ses fractions. Cependant cette valeur de CMI a été obtenue par une seule bactérie à Gram positif (*Listeria monocytogenes*) par l'extrait brut hydrométhanolique

Les CMI obtenues sont relativement basses (de 0,125 à 2 mg/ mL) à celles trouvées par **Acharaporn et al., (2016)** qui ont rapportés que l'extrait aqueux était efficace contre *S. epidermidis* avec une CMI= 4,69 mg/ mL. De manière notable, la concentration de l'extrait aqueux inhibant la croissance des bactéries à Gram positif était inférieure à la concentration qui inhibait les bactéries à Gram négatif.

Selon **Nayeem et al., (2011)**, les graines vertes de robusta ont montré une activité contre *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* et *Klebsiella pneumoniae* à une concentration égale à 0,200 mg/ mL.

Les polyphénols sont doués d'activités antimicrobiennes importantes et diverses dues à leurs diversités structurales. Les sites et le nombre des groupes hydroxyles sur les groupes phénoliques sont supposés être reliés à leur relative toxicité envers les microorganismes et il est évident que le taux d'hydroxylation est directement proportionnel à la toxicité (**Cowan, 1999**).

Les flavane-3-ols, les flavonols et les tannins sont des composés connus par leur forte activité antimicrobienne par rapport aux autres polyphénols car ils permettent la neutralisation des toxines bactériennes (**Daglia, 2011**). La quercétine et la naringénine ont été rapportés à être des inhibiteurs de *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* et *Saccharomyces cerevisiae* (**Sandhar et al., 2011**).

En outre, les flavonones condensés à un sucre ont aussi montré une activité antimicrobienne, tandis que certaines flavonolignanes n'ont montré aucune activité inhibitrice envers les bactéries (**Sandhar et al., 2011**).

L'hydrophobicité des polyphénols tels que les flavonoles est aussi un critère de toxicité qui leur permet de s'infiltrer dans les phospholipides membranaires et exercer leurs effets antibactériens à l'intérieur de la cellule (**Daglia, 2011**).

Les mécanismes adaptés par les proanthocyanidines dans l'inhibition des bactéries sont : la déstabilisation de la membrane cytoplasmique et la rendant perméable, l'inhibition des enzymes bactériennes extracellulaires, l'action directe sur le métabolisme bactérien et la privation des substrats requis pour la croissance bactérienne (spécialement les micronutriments minéraux essentiels comme le fer et le zinc via la propriété de chélation des métaux) (**Daglia, 2011**).

Tableau n° 08 : Concentrations minimales inhibitrice des graines vertes de Robusta

Bactéries	Extrait	Infusion								
		Aqueux mg/mL				Hydrométhanol mg/mL				
		EB	FAC	Fn-B	PhR	EB	FAC	Fn-B	PhR	Gen
Bactéries à Gram négatif	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	-	0,5	0,5	0,5	-	1	1	-	0,5
	<i>Klebsiella pneumonia</i> ATCC 700603	0,5	-	-	-	1	2	2	-	8
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	-	-	2		0,5	1	-	-	0,78
	<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 19606	-	1	2	0,5	1	2	-	-	0,65
	<i>Citrobacter freundii</i> ATCC 8090	0,5	-	-	-	0,5	-	-	-	0,19
	<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 3565	2	-	-	-	1	-	-	-	0,5
	<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 13311	0,5	1	0,5	0,5	1	1	-	-	0,65
	<i>Enterobacter cloacae</i> ATCC 13047	2	2	2	2	-	2	-	-	2,6
Bactéries à Gram positif	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	2	-	-	-	1	1	1	-	0,19
	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876	-	2	1	2	-	1	2	-	0,19
	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	-	-	-	-	-	-	2	-	0,65
	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 49452	0,125	1	2	1	-	-	-	-	2,6
	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 15313	-	2	1	1	0,5	-	-	-	0,19
	<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341	0,125	0,25	0,5	2	1	-	-	-	0,12

II.2.2. Évaluation de l'activité antifongique

II.2.2.1. La technique de diffusion sur gélose (méthode des disques)

L'activité antifongique a été déterminée en utilisant la technique de diffusion des disques sur gélose Mueller Hinton. Les résultats des diamètres des zones d'inhibitions vis-à-vis des levures sont illustrés dans le **Tableau n° 09**.

Nous avons remarqué que *C. albicans* ATCC 2690 et *C. albicans* ATCC 10231 ne sont sensibles qu'à l'extrait brut et la fraction d'acétate d'éthyle de l'extrait aqueux avec des zones d'inhibitions qui varient de 7 mm à 10,5 mm.

Les résultats de l'activité antifongique rapportés par **Ritu et Nisha, (2018)** pour les extraits méthanoliques et aqueux à différentes concentrations ont montré des zones d'inhibition de 9,5 mm et 9 mm respectivement. Ces valeurs sont proches de celles que nous avons obtenues.

Selon **Nayeem et al., (2011)**, l'extrait hydrométhanolique ne montre aucune activité vis-à-vis de *C.albicans* ce qui confirme notre résultats.

Tableau n° 09 : Diamètres des zones d'inhibition (mm) des extraits des graines vertes de Robusta.

Extrait Levures	Infusion								Amphotéricine B
	Aqueux				Hydrométhanol				
	EB	FAC	Fn-B	PhR	EB	FAC	Fn-B	PhR	
<i>C. albicans</i> ATCC 26790	10,5± 2,12	7	6	6	6	6	6	6	21,5
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	10± 4,25	8,5± 0,70	7	6	6	6	6	6	15
<i>C. albicans</i> 444 IP	6	6	6	6	6	6	6	6	20

EB : extrait brut ; **FAC** : fraction d'acétate d'éthyle ; **Fn-B** : fraction n-butanol ;

PhR : phase résiduelle.

II.2.2.2. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI)

Les résultats des concentrations minimales inhibitrices (CMI) des extraits aqueux et hydrométhanoliques avec leur fractions de sont montrés dans le **Tableau n°10**.

Nous constatons que la seule CMI (2,5 mg/mL) a été obtenue vis-à-vis de *C. albicans* ATCC 10231 et *C. albicans* ATCC 26790 par l'extrait brute et les fractions acétate d'éthyle et n-butanol de l'extrait aqueux. Cependant l'extrait hydrométhanol et les autres fractions n'ont montré aucune CMI.

L'activité antifongique de l'extrait aqueux peut être expliquée par l'effet synergique entre les différents composés de l'extrait. En effet, les composés majoritaires sont souvent responsables de l'activité antifongique de cette extrait (**Giordani et al., 2008**).

Tableau n° 10 : Concentrations minimales inhibitrices (CMI) des graines vertes de robusta.

Levures	Infusion								Amphotéricine B µg/mL
	Aqueux mg/mL				Hydrométhanol mg/mL				
	EB	FAC	Fn-B	PhR	EB	FAC	Fn-B	PhR	
<i>Candida albicans</i> ATCC 26790	2,5	2,5	-	-	-	-	-	-	8
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	2,5	2,5	2,5	-	-	-	-	-	4
<i>Candida albicans</i> IP 444	-	-	-	-	-	-	-	-	2

EB : extrait brut ; **FAC** : fraction d'acétate d'éthyle ; **Fn-B** : fraction n-butanol ;

PhR : phase résiduelle.

Quatrième Partie

Conclusion générale

Le présent travail a pour objectif, l'étude phytochimique et l'évaluation des activités antiradicalaire et antimicrobienne de deux extraits bruts et leurs fractions des graines vertes de robusta.

L'analyse phytochimique qualitative nous a permis de mettre en évidence la richesse de nos extraits par les métabolites secondaires : alcaloïdes, tanins, flavonoïdes, quinones libres et terpénoïde. L'extrait hydrométhanolique était celui qui a montré le taux le plus élevé en polyphénols totaux, flavonoïdes et tanins condensés.

Les fractions n-butanolique ont révélé le taux le plus élevé en polyphénols et flavonoïdes ($291,57 \pm 7,87$ et $263,5 \pm 14,25$ $\mu\text{g EAG/mg}$ d'extrait respectivement). La fraction n-butanolique de l'extrait aqueux renferme le taux le plus élevé en tanins avec une valeur 705 ± 945 $\mu\text{g EC/mg}$ d'extrait.

L'étude de l'activité antioxydante a montré une capacité antiradicalaire très intéressante ($\text{CI}_{50} = 0,30$ et $0,32$ mg/mL) pour la fraction n-butanolique des extraits aqueux et hydrométhanolique, et une EC_{50} égale à $0,27$ mg/mL pour la fraction n-butanolique de l'extrait hydrométhanolique.

L'évaluation de l'activité antimicrobienne nous a permis de conclure que l'extrait aqueux des graines vertes de robusta montre la meilleure activité par rapport à l'extrait hydrométhanolique. L'extrait aqueux s'est révélé plus actif vis-vis des bactéries à Gram positif avec des CMI comprises entre $0,125$ mg/mL et 2 mg/mL .

L'ensemble des résultats obtenus *in vitro* montrent que les graines vertes de robusta représentent une source de substances naturelles très intéressantes pour un usage biologique et thérapeutique importants.

Cette étude préliminaire nécessite d'autres études complémentaires, approfondies incluant :

- L'identification et l'isolement des métabolites secondaires responsables de l'activité antiradicalaire et antimicrobienne, à partir des extraits les plus actifs.
- L'étude d'autres activités biologique (antidiabétique, anti-tyrosinase, anti-hémolytique ...).
- L'évaluation de l'effet toxique *in vitro* et *in vivo* des principes actifs.

Références

Bibliographiques

- Acharaporn D., Nungruthai S., Jukkrit W., Atcharaporn O., Nitra N., Atchariya Y., 2016.** Comparison of antioxidant, antimicrobial activities and chemical profiles of three coffee (*Coffea arabica* L.) pulp aqueous extracts. *Integrative Medicine Research*, 5: 324-331.
- Adepoju A.F., Adenuga O.O., Mapayi E.F., Olaniyi O.O., 2017.** Coffee: Botany, Distribution, Diversity, Chemical Composition and Its Management. *IOSR Journal of Agriculture and Veterinary Science (IOSR-JAVS)*, 10: 57-62.
- Adida H., Benariba N., Bechiri A., Chekroun E., & Djaziri, R., 2016.** Étude phytochimique et évaluation du pouvoir antiradicalaire des extraits de *Pituranthos scoparius*. *Phytothérapie*, 14: 207-212.
- Arya M., Rao J. M., 2007.** An impression of coffee carbohydrates. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 47: 51–67.
- Badoud R., Bauer J., 2001.** Science et technologie des aliments: principes de chimie des constituants et de technologie des procédés. Germany. 337p.
- Batovska D., Parushev S., Stamboliyska B., Tsvetkova I., Ninova M., Najdenski H., 2009.** Examination of growth inhibitory properties of synthetic chalcones for which antibacterial activity was predicted. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 44: 2211 -2218.
- 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: 18.
- Belitz H.D., Grosch W., Schieberle P., 2009.** Coffee, Tea, Cocoa. *Food Chemistry*, 300: 938-970.
- Bruneton J., 1999.** Les tanins. Edition médicales internationales. Paris : 369-404p.
- Budryn G., Palecz B., Rachwał-Rosiak D., Oracz J., Zaczyn-ska D., Belica S., Navarro-González I., Meseguer J.M.V., Pérez-Sánchez H., 2015.** Effect of inclusion of hydroxycinnamic and chlorogenic acids from green coffee bean in β -cyclodextrin on their interactions with whey, egg white and soy protein isolates. *Food Chemistry*, 168: 276–287.
- Cardenas C., Quesada A.R., Medina M.A., 2011.** Anti-angiogenic and anti-inflammatory properties of kahweol, a coffee diterpene. *La Public Library of Science one*, 6: 23-07.
- CHU Y.F., 2012.** Coffee: Emerging Health Effects and Disease Prevention. Ames, Iowa : Wiley-Blackwell. 352 p.

- Clifford M.N., Knight S., Surucu B., Kuhnert N., 2006.** Characterization by LC-MS n of four new classes of chlorogenic acids in green coffee beans: dimethoxycinnamoylquinic acids, diferuloylquinic acids, caffeoyl dimethoxycinnamoylquinic acids, and feruloyl-dimethoxycinnamoylquinic acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54: 1957-1969.
- Clinical Laboratory Standards Institute-CLSI, 2009.** Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically ; Approved standard. CLSI document. M07-A8. Clinical Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa.
- Coskun O., Mehmet K., Ahmet K., Sukru O., 2005.** Quercetin, a flavonoid antioxidant, prevents and protects streptozotocin-induced oxidative stress and β -cell damage in rat pancre. *Pharmacological Research*, 51: 117-123
- Cowan M. M., 1999.** Plant Products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12 : 564-582.
- Cromer M.R., Mai H., Richards K.M., Smith R.E., Tran L.K., 2014.** Determination of Chlorogenic Acid in Green Coffee Beans and Dietary Supplements Labeled Green Coffee Bean Extract Using LC-MS/MS. *Laboratory Information Bulletin, U. S. Food and Drug Administration*, 4566 : 1-9.
- Cushnie T.P.T., Hamilton V.E.S., Chapman D.G., Taylor P.W., Agneau A.J., 2007.** Aggregation of *Staphylococcus aureus* following treatment with the antibacterial flavonol galangin. *Journal of Applied Microbiology*, 103: 1562-1567.
- Daglia M., 2011.** Polyphenols as antimicrobial agents. *Current Opinion in Biotechnology*, 23: 1-8.
- Dagoon J., 2005.** Agriculture and Fishery Technology IV. Manila: Rex Bookstore.
- Damatta F.M., Ronchi C.P., Maestri M., Barros R.S., 2007.** Ecophysiology of coffee growth and production. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 19: 485-510.
- Del-Rio D., Stalmach A., Calani L., 2010.** Bioavailability of Coffee Chlorogenic Acids and Green Tea Flavonoides. *Nutrients*, 2: 820-833.
- Dif M. M., Benchiha H., Mehdadi Z., Benali-Toumi F., Benyahia M., Bouterfas K., 2015.** Étude quantitative des polyphénols dans les différents organes de l'espèce *Papaver rhoeas* L. *Phytothérapie*, 13:314-319.

- Fábio J.M.N., Ivaldo I.J., Felipe K.S., Philip J.M., Humberto R.B., Francisco R.A.N., Rodrigo O.M.A., Claudia M.R., 2018.** Lipase-catalysed esters synthesis of cafestol and kahweol. *Food Chemistry*, 259: 226-233.
- Fortune D.R., Suyemoto M., Altier C., 2006.** Identification of CsrC and characterization of its role in epithelial cell invasion in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Infection and immunity*, 74: 331-339.
- Friedman M., Henika P.R., Levin C.E., Mandrell R.E., Kozukue N., 2006.** Antimicrobial activities of tea catechins and the aflavins and tea extracts against *Bacillus cereus*. *Journal of Food Protection*, 69: 354-361.
- Garrett R., Schwab N. V., Cabral E. C., Henrique B. V. M., Ifa D. R., Eberlin M. N., Rezende C. M., 2014.** Ambient mass spectrometry employed for direct analysis of intact Arabica coffee beans. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 25: 1172 – 1177.
- George S.E., Ramalakshmi K., Mohan R.L.J., 2008.** A perception on health benefits of coffee. *Critical reviews in food science and nutrition*, 48: 464–486.
- Ghedira K., 2005.** Les flavonoïdes: structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytotherapy*, 3: 162-169.
- Gonçalves A., Patricia M., François B., Valérie S., 2012.** Tests diagnostiques et thérapies ciblées en cancérologie. *Génomique et recherche clinique en oncologie : approches de sciences humaines, économiques et sociales (SHES)*, 28 : 19-20.
- Górnas´ P., Siger A., Polewski K., Pugajeva I., Was´kiewicz A., 2014.** Factors affecting tocopherol contents in coffee brews: NPHPLC/FLD, RP-UPLC-ESI/MSn and spectroscopic study. *European Food Research and Technology*, 238: 259–264.
- Gruenwald J, Brendler T, Jaenicke C., 2000.** PDR for Herbal Medicines. *Montvale: Medical Economics Company*, 202–204p.
- Gul R., Jan S.U., Faridullah S., Sherani S., Jahan N., 2017.** Preliminary Phytochemical Screening, Quantitative Analysis of Alkaloids, and Antioxidant Activity of Crude Plant Extracts from *Ephedra Intermedia* Indigenous to Balochistan. *The Scientific World Journal*, 17 :7-10.
- Gurib-Fakim A., 2006.** Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine*, 27: 1-93.

- Haddoudi M., Mellouk H., Bejjany B., Dani A., Digua K., 2014.** Valorisation du marc du café : extraction de l'huile et évaluation de son activité antioxydante Valorization of spent coffee grounds: oil extraction and evaluation of antioxidant activity. *Les technologies de laboratoire*, 8: 29-37.
- Hsieh S.C., Lai J.N., Chen P.C., Chen H.G., Wang J.D., 2006.** Development of active safety surveillance system for traditional Chinese medicine: an empirical study in treating climacteric women. *Pharmacoepidemiology Drug Safety*, 15:889-899.
- Jalil A.M.M., Azlan A., Ismail A., 2007.** Assessment of antioxidant capacity and phenolic content of selected commercial beverages. *Malaysian Journal of Nutrition*, 13: 149–15.
- Julkunen-Tiitto R., 1985.** Phenolic constituents in the leaves of northern willows: methods for the analysis of certain phenolics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 33: 213-217.
- Kaliyaperumal K., Kaliyaperumal J., Jegajeevanram V., Embialle M., 2013.** Traditional Medicinal Plants: A Source of Phytotherapeutic Modality in Resource-Constrained Health Care Settings. *Journal of Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 18: 67-74.
- Kanokwan N., James G.G., Piyasan P., 2016.** A green sulfonated carbon-based catalyst derived from coffee residue for esterification. *Renewable Energy*, 86: 262-269.
- 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: 400-407.
- Karunamoorthi K., Tsehaye E., 2012.** Ethnomedicinal knowledge, belief and self-reported practice of local inhabitants on traditional antimalarial plants and phytotherapy. *Journal of Ethnopharmacol*, 141: 143-150.
- Koshiro Y., Jackson M., Katahira R., Wang M., Nagai C., Ashihara H., 2006.** Biosynthesis of chlorogenic acids in growing and ripening fruits of *Coffea arabica* and *Coffea canephora* plants. *Journal of Biosciences*, 62: 31–42.
- Kumar, U., Kumar, B., Bhandari, A., Kumar, Y., 2010.** Phytochemical investigation and comparison of antimicrobial screening of clove and cardamom. *International journal of pharmaceutical science and research*, 2: 138-147.
- Ky C., Barre P., Noirot M., 2013.** Genetic investigations on the caffeine and chlorogenic acid relationship in an interspecific cross between *Coffea liberica dewevrei* and *C. pseudozanguebariae*. *Tree Genetics and Genomes*, 9:1043–1049.

- Lainé E., Hano C., Lamblin F., 2007.** Les lignanes phytoestrogènes du lin sont-ils des bienfaiteurs méconnus. *Phytotherapy research*, 5 : 121-128.
- Lamorde M, Tabuti J.R.S., Obua C., Collins K.B., Lanyero H., Pauline B.K., Bbosa G.S., Lubega A., Okeng J.O., Ryan M., Waako P.J., Concepta M., 2010.** Medicinal plants used by traditional medicine practitioners for the treatment of HIV/AIDS and related conditions in Uganda. *Journal of Ethnopharmacology*, 130: 43–53.
- Lee J.Y., Cho P.Y., Kim T.Y., Kang S.Y, Song K.Y., Hong S.J., 2003.** Hemolytic activity and developmental expression of pore-forming peptide, clonorin. *Biochemical Biophysical Research Communications*, 296: 1238-1244.
- Leopoldini M., Russo N., Toscano M., 2011.** The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. *Food Chemistry*, 125: 288-306.
- Li M., Cha D.J., Lai Y., Villaruz A. E., Sturdevant D. E., Otto M., 2007.** The antimicrobial peptide-sensing aps of *Staphylococcus aureus*. *Molecular microbiology*, 5: 1136-1147.
- Lim T. K., 2013.** *Coffea canephora*. In *Edible Medicinal And Non-Medicinal Plants*. Springer Netherlands. 680-709p.
- Liu Y., Kitts D.D., 2011.** Confirmation that the Maillard reaction is the principle contributor to the antioxidant capacity of coffee brews. *Food Research International*, 44: 2418–2424.
- Lucija M., Mojca Š., Željko K., 2007.** Antioxidant and antimicrobial activity of guarana seed extracts. *Food Chemistry*, 104: 1258-1268.
- Madhava N.M., Sulochanamma G., Sampathu S.R., Srinivas P., 2008.** Studies on extraction and antioxidant potential of green coffee. *Food chemistry*, 107: 377-384.
- Manilal K.S., 1989.** Linkage of ethnobotany with other sciences and disciplines. *Ethnobotany*, 1: 15-24.
- Mansouri A., Embarek G., Kokkalou E., Kefalas P., 2005.** Phenolic profile and antioxidant activity of the Algerian ripe date palm fruit (*Phoenix dactylifera*). *Food Chemistry*, 89: 411-420.
- Mattes R.D., 2007.** Effects of linoleic acid on sweet, sour, salty, and bitter taste thresholds and intensity ratings of adults. *The American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 292: 1243-1248.
- Mccusker R.R., Goldberger B.A., Cone E. J., 2006.** Caffeine content of energy drinks, carbonated sodas, and other beverages. *Journal of analytical toxicology*, 30: 112-114.

- Meziti A., Kormas K. A., Dählmann, A., De Lange, G. J., Lykousis, V., 2008.** Characterization of methanogenic and prokaryotic assemblages based on *mcrA* and 16S rRNA gene diversity in sediments of the Kazan mud volcano (Mediterranean Sea). *Geobiology*, 6: 450-460.
- Mohd-Zain M.Z., Amal B.S., A.S.B., 2017.** Composition and Health Properties of Coffee Bean. *European Journal of Clinical and Biomedical Sciences*, 3: 97-100.
- Nath M., Song X., Eng G., Kumar A., 2008.** Synthesis and spectral studies of organotin(IV) 4-amino-3-alkyl-1,2,4-triazole-5-thionates: In vitro antimicrobial activity. *Spectrochimica Acta Part A*, 70 : 766–774.
- Nayeem N., Gladsy D., Shalini K.M., 2011.** Comparative phytochemical analysis, antimicrobial and anti oxidant activity of the methanolic extracts of the leaves of *Coffea Arabica* and *Coffea Robusta*. *Der Pharmacia Lettre*, 3: 292-297.
- Ncube N.S., Afolayan A.J., Okoh A.I., 2008.** Assessment techniques of antimicrobial properties of natural compounds of plant origin: current methods and future trends. *African Journal of Biotechnology*, 7: 1797-1806.
- Normile D., 2003.** The new face of traditional Chinese medicine. *Science*, 299: 188-190.
- Nowak B., Schulz B.A., 2002.** Trópusok Gyümölcsei. Budapest: *Magyar Könyvklub*. 165–166p.
- Oliver C.Y., blumberg J.B., 2008.** Are there age-related changes in flavonoid bioavailability. *Phytochemicals ageing and health*. New york : taylor francic group, 19-31p.
- Oszmianski J., Wojdylo A., Lamer-Zarawska E., Swiader K., 2007.** Antioxidant tanin from *Rosaceae* plant roots. *Food chemistry*, 100: 579-83.
- Oyaizu M., 1986.** Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. *Japanese Journal of Nutrition*, 44: 307-315.
- Parras P., Martinezome M., Jimenez M. A., Murcia Y., 2007.** Antioxidant capacity of coffees of several origins brewed following three different procedures. *Food Chemistry*. 102 : 582-592.
- Patay É.B., Bencsik T., Papp N., 2016.** Phytochemical overview and medicinal importance of *Coffea* species from the past until now. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 9: 1127–1135.
- Pawel G., Krzysztof D., Aleksander S., Jolanta T., Michal M., Krzysztof P., 2015.** Contribution of phenolic acids isolated from green and roasted boiled-type coffee brews to total coffee antioxidant capacity. *European Food Research and Technology*, 233: 258–264.

- Pincemail J., Degrunne F., Voussure S., Malherbe C., Paquot, N., Defraigne J. O., 2007.** Effet d'une alimentation riche en fruits et légumes sur les taux plasmatiques en antioxydants et des marqueurs des dommages oxydatifs. *Nutrition clinique et métabolisme*, 21: 66-75.
- Pohlan H.A.J., Janssen M.J.J., 2010.** Growth and production of coffee in soils, plant growth and crop production. Oxford: EOLSS Publishers. 33p.
- Price M.L., Van S.S., Butler L.G., 1978.** A critical evaluation of the vanillin reaction as an assay for tannin in sorghum grain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 26: 1214-1218.
- Qian Y., Jin Q., Hai-Xiang Y., Lin-Lin C., Jun-Ping K., Bo-Yang Y., 2013.** Qualitative and Quantitative Analysis of Phenolic Compounds in the Leaves of *Aquilaria sinensis* Using Liquid Chromatography–Mass Spectrometry. *Phytochemical Analysis*, 24: 289-422.
- Rafael-Carlos E.D., Fernanda G.C., Luiz G.E.V., Lucia P.F., David P., Pierre M., Marta T.B., 2010.** Evaluation of Kahweol and Cafestol in Coffee Tissues and Roasted Coffee by a New High-Performance Liquid Chromatography Methodology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58: 88-93.
- Raseetha S., Noratikah R., Zaibunnisa A.H., Wan I.W.I., 2016.** Assessment of antioxidant activity and total phenolic content from green coffee *robusta sp.* beans. *Malaysian Journal of Analytical Sciences*, 20: 1059 – 1065.
- Ribeiro J. A., Sebastiao A. M., 2010.** Caffeine and adenosine. *Journal of Alzheimer's Disease*, 20: 3–15.
- Ribeiro J. A., Sebastiao A. M., 2010.** Caffeine and adenosine. *Journal of Alzheimer's Disease*, 20 : 3–15.
- Ricketts M.L., Boekschoten M.V., Kreeft A.J., Hooiveld G.J., Moen C.J., Muller M., Frants R.R., Kasanmoentalib S., Post S.M., Princen H.M., Porter J.G., Katan M.B., Hofker M.H., 2007.** The cholesterol-raising factor from coffee beans, cafestol, as an agonist ligand for the farnesoid and pregnane X receptors. *Molecular Endocrinology*, 21: 1603–1616.
- Ritu M., Nisha K., 2018.** Phytochemical Analysis And Antimicrobial Activity Of Roasted Beans Of *Coffea Robusta*. *International Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, 8: 89-95.
- Romero-González R.R., Verpoorte R., 2009.** Salting-out gradients in centrifugal partition chromatography for the isolation of chlorogenic acids from green coffee beans. *Journal of Chromatography A*, 1216: 4245-4251.

- Ross I.A., 2005.** Medicinal Plants of the World. 3rd ed. New Jersey: Humana Press Inc, 155–184p.
- Ruggiero S., Gralow J., Marx R. E., Hoff A. O., Schubert M. M., Huryn J. M., Valero V., 2006.** Practical guidelines for the prevention, diagnosis, and treatment of osteonecrosis of the jaw in patients with cancer. *Journal of Oncology Practice*, 2: 7-14.
- Samarth R.M., Panwar M., Soni A., Kumar M., Kumar A., 2008.** Evaluation of antioxidant and radical-scavenging activities of certain radioprotective plant extract. *Food Chemistry*, 106: 868-873.
- Sanchez-Moreno C., 1998.** A procedure to measure the antiradical efficiency polyphenols. *Journal Science of Food and Agriculture*, 76 : 270-276.
- Sandhar H. K, Kumar B., Prasher S., Tiwari P., Salhan M., Sharma P., 2011.** A Review of Phytochemistry and Pharmacology of Flavonoids. *Internationale Pharmaceutica Scientia*, 1: 25-41.
- Sarni-Manchado P., Cheynier V., 2006.** Les polyphénols en agroalimentaire, Editions Lavoisier, Paris. 398 p.
- Schmid K., Ivemeyer S., Vogl C., Klarer F., Meier B., Hamburger M., Walkenhorst M., 2012.** Traditional use of herbal remedies in livestock by farmers in 3 swiss cantons (Aargau, Zurich, Schaffhausen). *Forsch Komplement Medicine*, 19: 125–136.
- Schroeter H., Boyd C., Spencer J.P., Williams R.J., Cadenas E., Rice-Evans C., 2002.** MAPK signaling in neurodegeneration: influences of flavonoids and of nitric acid. *Neurobiology of Aging*, 23:861–80.
- Sofowora A., 1993.** Recent trends in research into African medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 38: 197-208.
- Solange I.M., Ercília M. S. M., Silvia M., José A.T., 2011.** Production, Composition, and Application of Coffee and Its Industrial Residues. *Food and Bioprocess Technology*, 4 :661.
- Somogyi L., 2010.** Caffeine intake by the US population. *Prepared for The Food and Drug Administration and Oakridge National Laboratory*, 222 : 59-64.
- Somporn C., Annouy K., Piyada T., Sirithon S., 2011.** Effects of roasting degree on radical scavenging activity, phenolics and volatile compounds of Arabica coffee beans (*Coffea arabica L. cv. Catimor*). *International Journal of Food Science and Technology*, 46: 2287-2296.

- Sridevi V., Giridhar P., 2016.** Variations in Diterpenes-Cafestol and Kahweol Content in Beans of Robusta Coffee Grown at Different Altitudes. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*, 8: 291-297.
- Sung-Yoon C., Jason T.B., Yet-Ming C., 2002.** Electronically conductive phospho-olivines as lithium storage electrodes. *Nature Materials*, 1: 123–12
- Tabuti J.R.S., Lye K.A., Dhillion S.S., 2003.** Traditional herbal drugs of Bulamogi, Uganda : plants, use and administration. *Ethnopharmacology*, 88 :19-44.
- Tabuti J.R.S., Lye K.A., Dhillion S.S., 2003.** Traditional herbal drugs of Bulamogi, Uganda: Plants, use and administration. *Journal of Ethnopharmacology*, 88: 19–44.
- Tantin E., 2016.** Effects of robusta coffee bean extract (coffea robusta) on the viability of neutrophils exposed by porphyromonas gingivalis. *International Conference on Medical and Health Science*, 37:169-172.
- Taunay A.E., 1939.** A estória do café: Instituto Brasileiro do Café. Rio de Janeiro. 1822–1872p.
- Tiwari P., Kumar B., Kaur M., Kaur G., Kaur H., 2011.** Phytochemical screening and Extraction: A Review. *Internationale Pharmaceutica Scientia*, 1: 98-106.
- Upadhyay R. K., 2012.** Insecticidal and oviposition inhibition efficacy of Capparis decidua to Sitophilus oryzae Linn. (Coleoptera: Curculionidae). *International Journal of Chemical and Biochemical Sciences*, 2: 14-23.
- Vanida C., Kittiya K., 2017.** Preliminary Phytochemical Screening and Antioxidant Activity of Robusta Coffee Blossom. *Thammasat International Journal of Science and Technology*, 22 :12-22.
- Vermerris W., Nicholson R., 2006.** Phenolic Compound Biochemistry. Springer. 267p.
- Veronica B., Paola M., Aparecida O., Agnes C., José A.R., Alessandra L.O., Stephane B., 2016.** Pressurized-fluid extraction of cafestol and kahweol diterpenes from green coffee. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 37 : 145-152.
- Yong G., Jiang W., Shengchao Z., Liqing L., Shiyi C., Naomie M., Kun J., Chulani H., Chao G., Hong X., Yanfeng Z., Xingyue S., Shanquan C., Yawen C., Tingting Y., Jing L., Yan Q., Sai H., Xiaoxv Y., Zuxun L., 2017.** Association of coffee consumption with risk of colorectal cancer : a meta-analysis of prospective cohort studies. *Open Access Impact Journal*, 8: 18699–18711.

Zhishen J., Mengcheng T., Jianming W., 1999. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*, 64: 555-559.

Annexe

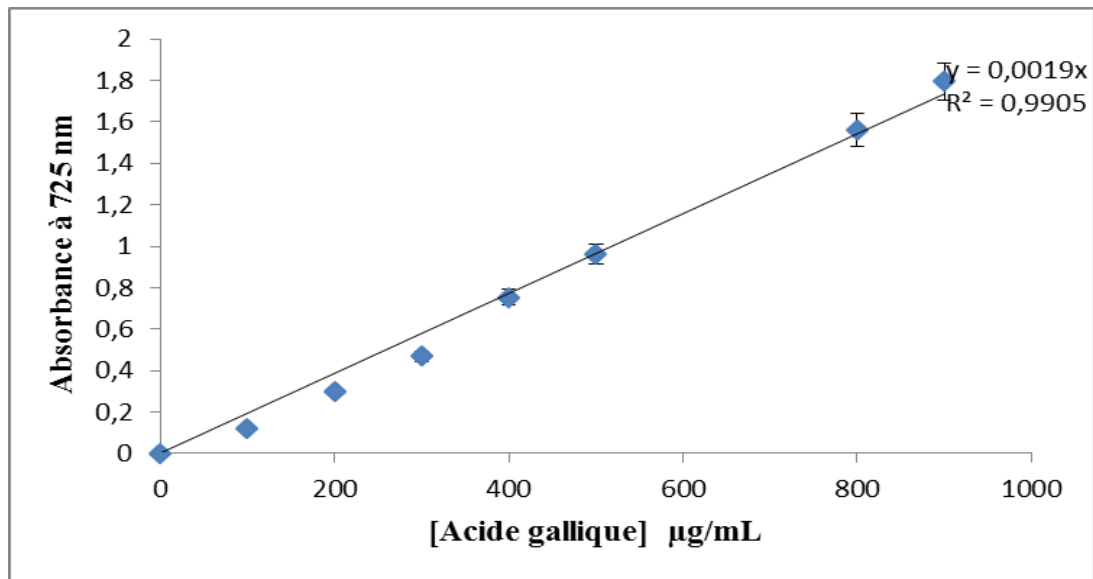


Figure n° 16 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols.

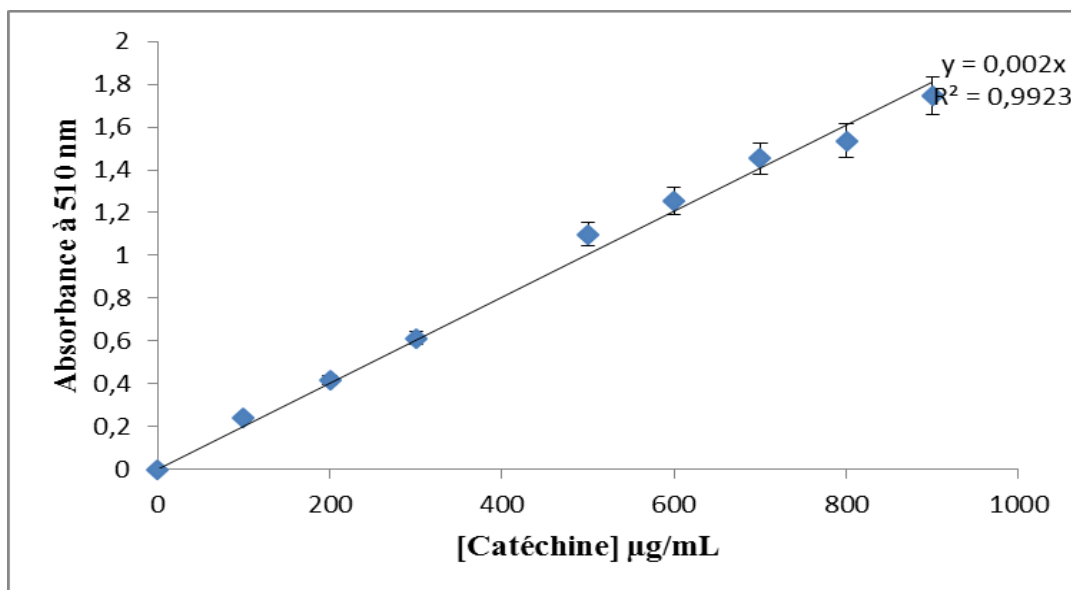


Figure n° 17: Courbe d'étalonnage du catéchine pour le dosage des flavonoïdes totaux.

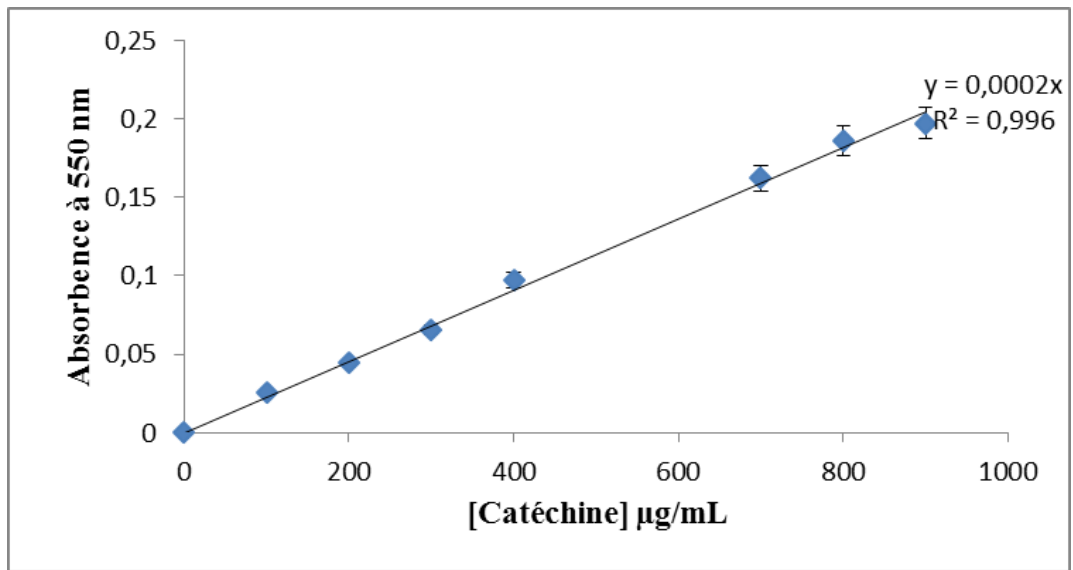


Figure n° 18: Courbe d'étalonnage du catéchine pour le dosage des tanins condensés.