

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

UNIVERSITE ABOU BEKR BELKAID –TLEMCEM–

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



Département de Biologie

Laboratoire :

Laboratoire Physiologie, Physiopathologie et
Biochimie de Nutrition



Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de master en biologie

Option : Toxicologie industrielle et environnementale

Thème :

**Étude de la toxicité hémolytique de l'extrait
éthanolique de la parche sèche du café**

Présenté par :

BENHAMOU Amina

BOUADJAIB Asma

Soutenu le : 25/06/2020

devant le jury :

Présidente : Mr Azzi.R

M.C.A. Université de Tlemcen

Examinatrice : Mme Medjdoub Amel

M.A.A. Université de Tlemcen

Promotrice : Pr HADDAM. N

M.C.A. Université de Tlemcen

Année Universitaire : 2019/2020

دعاء

الحمد هلال كما يليق بجالل وجهك و عظيم و سلطانك. يا مجيب الدعوات و قاضي الحاجات و يا مفرج الكربات. اللهم اني أسألك أن تجعل يومي هذا جميال. يوما طيبا مباركا فيه يوما سعيدا يوما فيه نجاح و صالح و فالح يوما بال أزمات و ال نكبات و ال مشكالت. يوما رزقه رغد و خيره وافر و ستره عميم يوما ال كدر فيه و ال هم و ال غم فمن عندك نسألك السرور و نطلب الخير إجعل يومي هذا أنفع به و أنتفع منه و إجعله نافع مبارك. اللهم بك أستعين و عليك أتوكل اللهم ذلل لي صعوبة أمري و سهل لي مشقته اللهم إشرح لي صدري و يسر لي أمري و أحل عقدة من لساني يفقهوا قولي و صلي اللهم و بارك على حبيبك محمد. اللهم اني سألتك تذلالي فأعطني تفضال.

Remerciements

A partir de début, je tiens à remercier Allah de m'avoir prêté vie, santé et volonté pour achever ce modeste travail

Je remercie Allah pour tout.

*J'exprime ma profonde gratitude et mes sincères remerciements à ma promoteur Docteur Mme **Haddam Nahida** pour son aide et de m'avoir suivi avec beaucoup de rigueur durant la réalisation de ce travail, pour sa constante disponibilité et pour ses judicieux conseils.*

Merci à ceux qui prennent le temps d'évaluer notre travail. Le président et les membres de jury

Enfin, J'adresse mes vifs remerciements à tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin, que ce soit par leur amitié, leur conseils ou leurs soutien moral; pour la réalisation de ce travail.

Amina ❤️



Je dédie ce travail



A...

A mes très chers parents, leur amour, leur tendresse, leur sacrifice, leur compréhension et leur patience envers moi.

Je ne saurais jamais comment exprimer mes sentiments pour avoir veillé sur mon éducation, jamais je ne peux les remercier assez de m'avoir donné le meilleur d'eux. Même, que Dieu les protège. Ma chère maman je t'aime ♥

A...

Ma grande mère, elle porte encore sa place dans mon cœur. Dieu ait son âme ♥

A...

Tous mes proches qui ont toujours été là pour moi, à mes chers frères et sœurs, que dieu vous garde et vous protège ♥

A...

Celles qui ont su m'apprendre l'amitié, le sourire et l'amour, mes uniques et mes chers amis, Hamza, Wissam, Anissa, et Soumia, que Dieu vous garde toujours à mes côtés et vous protège dans votre vie ♥

A...

Mes petites nièces Haffsa, Khadidja. Mon neveu Djaber je vous souhaite du bonheur et beaucoup de réussite dans votre long chemin, que Dieu vous protège mes anges ♥

A...

Toute ma famille...

Toute personne qui m'a encouragé...

Toute personne qui m'a aidé...



Anissa





Dédicace

*« Je commence ma dédicace au nom du dieu et le salut sur Mohamed
le messenger de dieu*

*C'est avec un très grand honneur que je dédie ce travail aux personnes
les plus chères au monde :*

*« Ma très chère mère pour tout son amour et son dévouement, à mon
meilleur père qui a toujours été là pour moi et qui m'a donné un
magnifique modèle de labeur et de persévérance.*

*A mes sœurs et mes frères
pour leurs aides et leurs soutiens qui m'ont permis de surmonter mes
difficultés et de m'encourager afin d'arriver.*

*Mes meilleurs amis
Toula , Mustapha, Hanane, Sihem , Sarah, pour les liens d'effort
d'amitié qui nous unissent et pour le plaisir dont j'ai joies avec vous et
à tous mes amis qui se tenaient à mes côtés.*

*Sans oublier mon oncle et mon prof belhacene Miloud pour ces
encouragements indéfectibles.*

Et ma plus belle Adoumi »

Asma

Résumé

La Parche est la couche la plus interne du péricarpe et constitue la coque qui enveloppe le grain de café.

L'objectif visé par notre étude, consiste de déterminer in vitro la cytotoxicité des extraits éthanoliques de la parche sèche de café, et plus précisément leur toxicité hémolytique, pour le but de la valorisation des matières résiduelles du café.

Ce parche subit à une extraction par macération (éthanol) pour obtenir l'extrait éthanolique. Le rendement d'extraction de la parche sèche de café était d'environ 5%.

L'étude de la toxicité vis-à-vis les érythrocytes a montré un taux d'hémolyse élevé d'ordre de 62 %, en présence de l'éthanol préparée par macération à une concentration de 500ug/ml. Alors que, pour des concentrations plus faibles de l'ordre de 30,14ug/ml, nous avons enregistré des taux d'hémolyse qui ne dépassent pas les 7%.

Mots clés : parche sèche de café, toxicité hémolytique, les érythrocytes .

Abstract

The Parchment is the innermost layer of the pericarp and constitutes the shell which envelops the coffee bean.

The objective of our study is to determine in vitro the cytotoxicity of ethanolic extracts from coffee parchment, and more precisely their hemolytic toxicity, for the purpose of recovering residual coffee matter.

This parchment undergoes a maceration extraction (ethanol) to obtain the ethanolic extract. The extraction yield of the dry coffee parchment is approximately 5%.

The study of the toxicity with respect to erythrocytes has shown a high hemolysis rate of around 62%, in the presence of ethanol prepared by maceration at a concentration of 500 $\mu\text{g} / \text{ml}$. Whereas, for lower concentrations of the order of 30.14 $\mu\text{g} / \text{ml}$, we have recorded hemolysis rates which do not exceed 7%.

Key words: dry coffee parchment, hemolytic toxicity, erythrocytes.

الملخص

الرق هو الطبقة العمق للغطاء ويشكل القشرة التي تغلف حبة البن

الهدف من دراستنا هو تحديد السمية الخلوية لمستخلصات الإيثانول من رق القهوة الجاف ، وبشكل أدق سمية انحلالها الدموي، بغرض استعادة بقايا القهوة.

خضع هذا الرق إلى الاستخراج عن طريق النقع (الإيثانول) للحصول على مستخلص الإيثانول. العائد

الاستخراجي لرقاقة القهوة الجاف حوالي 5٪.

أظهرت دراسة السمية فيما يتعلق بالكريات الحمراء ارتفاع معدل انحلال الدم بنحو 62 ٪ ، في وجود

الإيثانول الذي تم تحضيره بواسطة النقع بتركيز 500 ميكروغرام / مل. في حين ، بالنسبة للتركيزات المنخفضة 14,30

مغ/مل ، سجلنا معدلات انحلال الدم لم تتجاوز 7٪.

الكلمات المفتاحية: رق القهوة الجاف³ سمية الإنحلال الدموي³ كريات الدم الحمراء.

Sommaire

Sommaire

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste d'abréviation

Introduction générale 1

Synthèse bibliographique

Chapitre I : Généralités sur la parche de café

I.1. Présentation de caféier.....	3
I. 2.1 Étymologie	4
2.2. Historique.....	4
I. 2.2. Historique.....	4
I.3. Le café en Algérie ...	6
I.3.1. Fabrication de café à Tlemcen.....	6
I.4. Compositions du café	7
I.4.1. La Caféine	7
I.4.2. Les protéines, les glucides et les lipides	7
I.4.3. Les vitamines	8
I.4.4. Les minéraux	8
I.4.5. Les polyphenols.....	8
I.4.5.1 les flavonoids.....	9
I.4.5.2. Alcaloïdes	10
I.4.6. Autres composants	10
I.5. Les déchets ou sous-produits de l'industrie du café.....	10

I.5.1. Présentation de la parche	10
I.5.2. Compositions de parche.....	11
I.5.3. Valorisation de parche.....	12

Chapitre II : Généralités sur la toxicité et l'hémolyse

II.1. Notions de toxicité.....	13
II.2. Les types de toxicité.....	13
II.2.1. Toxicité aiguë	14
II.2.1.1. La dose létale (DL50)	15
II.2.2. Toxicité subaiguë	16
II.2.3. Toxicité subchronique	16
II.2.4. Toxicité chronique.....	16
II.2.5. Comparaison entre la toxicité aiguë et chronique.....	17
II.3. Dose effet / dose réponse	17
II.3.1. La relation dose-effet.....	18
II.3.2. La relation dose-réponse	18
II.3.3. la relation entre la dose effet et la dose réponse	18
II.4. Devenir d'un toxique dans l'organisme.....	18
II.4.1. La toxicocinétique.....	19
II.4.2. La toxicodynamie.....	19
II.5. Les organes cibles.....	20
II.6. Généralité sur les globules rouges.....	21
II.6.1. Membrane de globule rouge.....	21
II.6.2. Squelette membranaire du globule rouge.....	21
II.7. Notion De L'hémolyse.....	22
II.7.1. Définition.....	22
II.7.2. Les type de l'hémolyse.....	22
II.7.2.1. l'hémolyse intratissulaire.....	22
II.7.2.2. l'hémolyse intravasculaire	23
II.7.3. les mécanismes d'hémolyse	23

Partie expérimentale

Chapitre III : Matériels et Méthodes

III. Matériels et methodes.....	25
III.1. Matériels végétal	25
III.1.1. Extraction Des Composés Phénoliques De La Parche De Café.....	26
III.1.2. Calcul Du Rendement	28
III.2. Analyse Biologiques.....	28
III.2.1. Préparation Du Phosphate Buffer Saline (PBS).....	28
III.2.2. Préparation De La Suspension Erythrocytaire.....	29
III.2.3. Préparation D'extraits	29
III.3. Test D'hémolyse.....	30
III.4. Analyse statistiques.....	31
III.4.1.1. La Moyenne.....	31
III.4.1.2. L'écart type	31

Chapitre IV : Résultats et interprétations

IV.1. Rendement D'extraction.....	32
IV.2. Résultats des tests des effets biologiques.....	32
IV.1.2.1 L'évolution De L'effet Hémolytique En Fonction Du Temps.....	32
IV.3. Taux d'hémolyse	36
Discussion.....	41
Conclusions	45

References bibliographies

Liste des tableaux

Tableaux 1 : composition de la parche du café	(11)
Tableau 2 : Formes d'intoxication	(14)
Tableau 3 : Classification des produits chimiques selon leurs toxicités	(15)
Tableau 4 : Rendement de la macération de la parche de café sèche dans le solvant éthanol.....	(32)
Tableau 5 : Regroupement d'informations à l'aide du test de Tukey.....	(35)
Tableau 6 : Regroupement d'informations à l'aide de la méthode Tukey.....	(40)

Liste des Figures

- Figure 1:** la structure de fruit de la graine du caféier.....(3)
- Figure 2:** Exemple d'une culture de caféier.....(4)
- Figure 3 :** Devenu d'un produit dans l'organisme.....(19)
- Figure 4 :** Schéma de la membrane érythrocytaire.....(22)
- Figure 5 :** La parche de café.....(25)
- Figure 6 :** Photographie du Rotavapor utilisé.....(26)
- Figure 7:** Agitation du mélange : parche broyé + Eau distillée (moins de 24h). (Photo de laboratoire).....(27)
- Figure n8:** Filtration des extraits obtenus(27)
- Figure 9 :** Les solutions préparées(29)
- Figure10 :** Préparation des solutions à base de la suspension d'érythrocytaire, PBS, eau distillée..... (30)
- Figure11 :** L'évolution de l'effet hémolytique (par absorbance) dans les tubes contenant une Suspension érythrocytaire en fonction des différentes concentrations d'extraitéthanolique de la parche de café sèche préparées par macération, incubé à 37°C durant 60 min, à 548nm....(33)
- Figure 12 :** boîte à moustache comparant les moyennes des absorbances des différentes concentrations d'extrait éthanolique de la parche de café sèche préparées par macération, incubé à 37°C durant 60 min, à 548nm par rapport au blanc (témoin) (34)
- Figure 13 :** L'évolution des taux d'hémolyse (%) des différentes concentrations d'extraits éthanoliques de la parche de café préparé par macération après 60 minutes d'incubation...(36)
- Figure 14 :** Taux d'hémolyse en pourcentage des différentes concentrations d'extraits éthanoliques de la parche de café sèche préparés par macération après 60 minutes d'incubation.....(37)
- Figure 15 :** L'évolution de taux d'hémolyse (%) des différentes concentrations d'extraits Éthanolique de la parche de café préparé par macération après (0min, 15min, 30min, 45min, 60min) d'incubation. (38)

Figure 16 : Boite à moustache comparant les moyennes des taux d'hémolyse des différentes concentrations d'extrait éthanolique de la parche de café préparé par macération, incubé à 37°C durant 60 min, à 548nm par rapport au blanc (témoin).....(39)

La liste des abréviations :

DL50 : dose létale

EPA : Environmental Protection Agency.

Ex : Exemple.

Km : kilomètre

O₂ : oxygène

CO₂ : dioxyde de carbone

GR : globules rouges.

LDH : lactate deshydrogénase.

G6PD : glucose-6-phosphate déshydrogénase.

ATP : Association de Tennis Professionnel.

NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate.

GSH : glutathion.

H₂O₂ : peroxyde d'hydrogène.

NAOEL: No Observable Adverse EffectLevel.

APOCE : Association de Protection et d'Orientation du Consommateur et de son Environnement.

C/N : rapport carbone et azote.

R(%) : Rendement exprimé en pourcentage %.

M: poids après évaporation

M₀ : poids avant évaporation (Ballon vide)

Min : minute

pH :potentiel d'hydrogène.

G: gramme

°C : degré Celsius.

% : pourcentage

Mg: milligramme.

µg : microgramme.

Ml: millilitres

Mg/ml: milligramme par millilitre

PBS :Phosphate Buffer Saline

µl/ml : microlitre par millilitre

µl : microlitre

Nm : nanomètres

NaCl : chlorure de sodium

UV : ultras violets

DO : densité optique

INTRODUCTION

GENERALE

Depuis des siècles, le café est l'une des principales denrées alimentaires d'origine agricole échangée sur les marchés internationaux, et le deuxième bien de consommation échangé dans le monde, derrière le pétrole et avant le charbon, la viande, le blé et même le sucre (**Khalid. K ; 2010**). Le mot « café » désigne le grain et la cerise du caféier, qu'il s'agisse de café en parche, de café vert ou de café torréfié, et comprend le café moulu, le café décaféiné, le café liquide et le café soluble (**Journal officiel de l'Union européenne, 2008**).

Lors de la préparation du café, il y'a des déchets ou bien des sous-produits de café qui restent non exploités. Ces déchets ou sous-produits sont une grande source de pollution et peuvent causer un problème écologique important. Depuis la moitié du dernier siècle, des études et des efforts ont été entrepris pour la recherche de méthodes en vue d'utiliser les déchets du café comme matière première pour la production d'aliments, caféine, vinaigre, boissons, biogaz, enzymes pectiques, pectine et compost.

La parche de café constitue la coque qui enveloppe le grain de café. Elle est considérée comme un déchet après la récupération des grains de café. Cependant, certaines études montrent que la parche de café contient des composés fonctionnels tels que des fibres alimentaires, des polyphénols et d'autres antioxydants (**Esquivel et Jiménez, 2012 ; Murthy et Naidu, 2012**). Pour la valorisation de ce déchet, il est essentiel d'identifier non seulement les composés chimiques présents dans la parche de café mais aussi d'évaluer leur toxicité et de déterminer la NAOEL afin d'éviter toute altération fonctionnelle humaine ou animale). A l'origine, il n'existe pas de définition pour la notion de toxique puisque le degré de toxicité d'une plante dépend de la dose « c'est la dose qui fait le poison (Paracelse 1493 1551) » (**Richel, 2004**).

Dans cette optique, notre travail de Master a pour objectif de déterminer in vitro la cytotoxicité des extraits éthanoliques de la parche sèche de café, et plus précisément leur toxicité hémolytique. Le modèle des globules rouges a été choisi car ces dernières sont parmi les cellules les plus utilisées dans l'évaluation de la toxicité à cause de leur disponibilité, et la facilité de leur surveillance au cours de la lyse cellulaire grâce à la libération de l'hémoglobine (**Situ et Bobek, 2000**). Ainsi, notre étude entre dans le cadre de la recherche de composés naturels à activité biologique.

Nous nous sommes intéressés à la parche de café dans le but de valoriser les matières résiduelles du café.

CHAPITRE I

Généralité sur la parche de café

« Les aliments sombres comme le café, le chocolat, sont souvent associés à des notions comme le luxe. Ces substances doivent être très anciennes et chargées de sens »

Margareth Visser



I -1 Présentation de caféier

Le caféier est un arbuste tropical cultivé pour ses drupes contenant les graines de café. Il appartient au genre *Coffea* et à la famille des Rubiacées, possède des feuilles blanches simples de petite taille, tubuleuses et régulières portant par une courte tige. La floraison des caféiers de la même zone se produisent au même moment. Généralement, il pousse dans les zones inter tropicales. Il prend un aspect boissonnant, d'une hauteur de 5 à 12 mètres selon l'espèce ; il est taillé à environ 3 mètres. Sa durée de vie est généralement de 20 à 50 ans. Leurs fruits changent de couleurs parfois rouge ou violet jusqu'à devenir jaune et brun à maturité, contiennent deux noyaux minces ayant une face aplatie, semblables à des cerises (d'où leur appellation cerises de café) (Justin koffi, 2007). La figure 01 représente la structure du fruit de la graine de caféier.

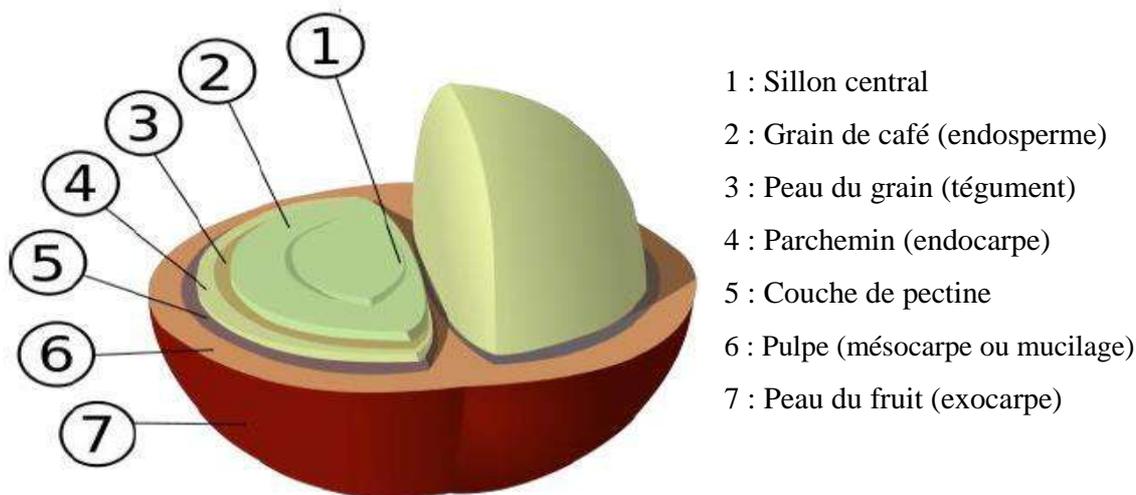


Figure 01 : Structure du fruit de la graine du caféier
(Droling, 2005)

Parmi les 80 espèces de variétés de caféier, seules deux espèces principales sont généralement utilisées et commercialisées, il s'agit de *Coffea arabica* (Arabica) et *Coffea canéphora* (Robusta).

Généralement, l'Arabica est cultivé dans les zones inter tropicales alors que, Robusta préfère les régions chaudes et humides (Farah et al., 2006).



Figure 02 : Exemple d'une culture de caféier (*Coffea arabica*. Dorling, 2005)

I -2 Historique et origine du caféier

I -2-1 Étymologie

Le café tire son nom du mot arabe 'Qahwah' qui signifie vin (dénomination d'une boisson fermentée réalisée à partir de feuilles de café, de miel et d'eau), ensuite en turc nominalisé en 'qahve' puis 'cavée' en italien. En France, le caféier est apparu sous le nom de 'café' en 1600 (Khalid K .,2010).

I -2-2 Historique

Le caféier est d'origine d'Éthiopie, nombre de légendes circulent concernant la découverte des effets du fruit du caféier sur les chèvres d'un berger kaldi, qui, un jour remarqua une excitation particulière de ses chèvres après l'ingestion de baies. Étonné, il goûta à son tour de ces fruits et devenu, lui aussi agité que son troupeau. Ramenant ces baies au village, il les fit tester aux habitants et l'effet stimulant de ces fruits leur permit à tous de rester éveillés pendant de longues heures (Vantal, 1999).

La diffusion de la culture et les plantations du café commencent vers XII ème siècle du Yémen, il est appelé Khawah (Michelle et al., 2013).

En 1685, Philippe Dufour¹⁶, un marchand d'épices, écrivait dans tous les endroits du monde, je ne crois qu'il y en ait d'autre qui fabrique le Café que l'Yémen... Il croît dans des vastes Campagnes tirant vers le Midi, sans culture, et point du tout ailleurs. Étant cueilli, on l'apporte à Moka, à Louyaya, et autres ports de mer, qui sont le long de la mer Rouge, où on le charge sur de petites barques pour Djeddah...là on l'embarque, sur des Vaisseaux et sur des Galères, qui sont ordinairement destinées pour ce transport, jusqu'à Sués (Suez), port de mer à la tête de la mer Rouge, éloigné du Caire d'environ vingt & deux lieues, où l'on en transporte toutes les années sur des chameaux. Outre cela, il en vient... par la Caravane qui retourne de Médine avec les Pèlerins du Prophète, qui en chargent aussi quatre ou cinq mille sur des Chameaux pour porter à Damas et à Alep (Chantel, 2015).

A partir du 16ème siècle, sa consommation s'est apparue dans le monde musulman, se répand d'abord dans l'Arabie Saoudite (la Mecque) puis s'introduit en perse puis en Égypte, en Afrique du Nord, en Syrie et en Turquie. A cette époque, le café restait encore inconnu en Europe. Ensuite, le café fit son apparition à partir de 1600 en Europe où s'ouvrent de nombreuses maisons de café, à partir de cette époque le café est devenu une boisson courante en Europe et sa popularité n'a fait que croître par la suite.

Le premier appareil domestique pour la préparation du café a été inventé en 1691 à Naples- Italie : il s'agit de la célèbre cafetière napolitaine. Dès 1615, il était consommé à Venise (où est le Café Florian, fondé en 1720, le plus ancien d'Italie encore en activité) en provenance d'Égypte (Jean Costentin., 2010). L'implantation du caféier dans la zone Amériques/Caraiïbes remonte au début du XVIIIème siècle où il fut planté pour la première fois sur l'île de la Martinique par l'officier français de Clieu. Dans le même temps, un spécimen de caféier issu de plantes préalablement introduites à Java (Indonésie) fut amené en Guyane néerlandaise. De là, sa culture se répandit à travers toute la zone tropicale et subtropicale de l'Amérique latine (Costa Rica - 1779, Colombie - 1794, Mexique - 1796) qui finit par devenir le fournisseur,

presque exclusif de café à l'exportation durant les XVIIIème et XIXème siècles. (INFOCOMM, 2016).

Aujourd'hui, presque toute la production de café provient d'Amérique Centrale, du Brésil et des zones tropicales d'Amérique du sud et de façon très confidentielle.

Il se consomme sous des formes très variées, que ce soit le café filtre classique, l'expresso, le café au lait ou des variétés plus exotiques, est devenu donc le plus consommé après l'eau et le thé (FAO, 2008).

I -3 Le café en Algérie

L'Algérie, comme de nombreux pays consomme une importante quantité de café par an, avec une enveloppe avoisinant les 180 millions de dollars/an.

Cette somme permet à l'Algérie d'importer environ 120 000 tonnes de café et la place à la tête du peloton des pays importateurs et consommateurs du café en Afrique. Cette situation particulièrement liée à nos traditions de consommation et au fait que notre pays n'est pas producteur de cette culture industrielle (**Samir, 2006**).

Sur le plan pratique, l'Algérie a importé 74 120 tonnes de café d'une valeur totale de 132, 48 millions de Dollars en 2018 du Vietnam, le café Arabica et Robusta représentaient plus de 85% de la valeur totale des importations.

Outre le Vietnam, la Côte d'Ivoire, l'Indonésie, le Brésil et l'Italie sont également les principaux fournisseurs de café à l'Algérie (**Arezki Benali, 2019**).

Il existe en Algérie 20 usines de traitement de café instantanées, d'une capacité totale de 75 280 tonnes par an, sans oublier des centaines de petites installations de traitement d'une capacité totale d'environ 70 000 tonnes par an. Il y a lieu de noter que l'Association de protection et d'orientation du consommateur et de son environnement (APOCE), envisage de faire des analyses du café moulu vendu en Algérie pour s'assurer du respect des normes de santé fixées par les pouvoirs publics (**Younes, 2019**).

I -3-1 Fabrication de café à Tlemcen

L'histoire des Cafés GAOUAR a commencé depuis 1860, en Algérie et plus précisément à Tlemcen. Outre son activité de torréfacteur, la famille Gaouar,

à travers le fils Mounir, s'investit dans la recherche scientifique sur la culture et la production du café. Mounir prit la direction en 1912.

Celui-ci avec l'aide d'un ami, Arslan, mit au point la combinaison d'arômes qui allait assurer le succès de la marque Gaouar, un essai qu'allait transformer son fils Mustapha qui décida d'implanter la marque au Maroc, en 1956. D'Oujda à Casablanca - Maroc, le café Gaouar devient une marque de renommée mondiale, d'où l'idée de fonder « l'Institut Mustapha GAOUAR » (Mounir, 2009).

I -4 Compositions du café

Le café est une boisson très riche en substances biologiquement actives. Sa composition dépend de l'espèce, de la variété, des conditions climatiques, des méthodes de culture, du degré de maturation, des baies, des procédés de préparation (dépulpage, départage) et de traitement industriel (torréfaction) des grains de café (Michelle et al., 2003). Parmi ces substances :

I -4-1 La Caféine

La caféine est une base purique des méthylxanthines. On le trouve également dans de nombreuses espèces végétales telles que : le cacao, le cola, les feuilles de thé, gagna. Elle est présente naturellement dans les grains de café et plus exactement dans la pulpe de café à une concentration d'environ 1,3% de poids sec (Pandey et al., 2000).

Est un alcaloïde ayant des propriétés pharmacologiques grâce à son effet stimulant et leur activités antibactériennes et antifongiques (Kumar et al., 1995 ; Almeida et al., (2012).

La caféine possède un goût amer mais ne représente que 10% de l'amertume totale du café (Chabaud, 2010).

La teneur en caféine dans une tasse varie selon l'origine et la composition du mélange, les méthodes de préparation et la dose de mouture (Mccusker et al., 2006).

I-4-2 Les protéines, les glucides et les lipides

Les glucides représentant environ 50% de la matière sèche du café, ils sont devisés en deux groupes : les glucides solubles, on trouve parmi eux, les

monosaccharides sous forme de mannose 45% suivi de galactose, 25% et en dernier lieu le glucose, 17% ainsi que les oligosaccharides et les polysaccharides du type lignine en 2%. S'ajoute les glucides insolubles des parois végétales et sont représentés principalement par : l'hémicellulose et le holocellulose.

Lors de la torréfaction les glucides généralement participant à la réaction de Milliard (**Oostervald et al., 2003**).

Les protéines sont estimées entre 8% à 13 % de la composition de la matière sèche des grains de café vert.

Histologiquement, les lipides sont localisés dans deux compartiments différents du grain de café à l'intérieur de l'endosperme (huile de café) et sur la face externe où ils rentrent dans la composition de cire (**Debry, 1993**).

I -4-3 Les vitamines

Selon l'estimation de certains auteurs, (**Scalbert et al., 2009**), une tasse de café de 250 ml peut contenir de nombreux éléments nutritifs dont les vitamines, certains sont dégradées lors de la torréfaction comme les vitamines B1 et C, le reste est exprimé en mg /ml : 400 à 1200 mg de vitamine B3, 2 mg de vitamine B2, 80 mg de B5 et 0,6 mg de B6.

I -4-4 Les minéraux

Les grains de café vert contiennent plusieurs minéraux. Ces derniers sont exprimés en pourcentages de la matière sèche, dont le principal est le potassium (1,63 - 2%), suivi du magnésium (0,16 - 0,31%), des sulfates (0,13%), du calcium (0,07 - 0,035%) et du phosphate (0,13 - 0,22%). Les graines renferment aussi le fer, le zinc, le silicium, l'aluminium et le cuivre sous forme de traces. La majorité des minéraux sont hydrosolubles et qui peuvent passer en boisson lors de la préparation (**Bastian,2006**).

I -4-5 Les polyphénols

Le terme polyphénol ou composés phénoliques remplace l'ancien terme de tanin végétal (**Sarni-M et al., 2006**). Les composés phénoliques sont des métabolites secondaires. Ils jouent un rôle important dans la structure et de protection des plantes contre les bio- agresseurs extérieurs tels que les agents pathogènes

(Scalbert et al., 2005). Ils possèdent un ou plusieurs cycles benzéniques portant une ou plusieurs fonctions hydroxyles (Sarni-M et al., 2006).

Généralement, les polyphénols sont présents dans le thé, le raisin, l'huile d'olive, le café, le chocolat, les arachides et autres fruits et légumes (Parisi et al., 2014). Le café est la première source en polyphénols (36,9 %), avant le thé (33,6 %), le chocolat (10,4 %) et les fruits et légumes (7,4 %). D'ailleurs, une tasse de café renferme 200 à 550 mg de polyphénols : acides chlorogénique, caféique et quinique, les lignanes, les tanins, les flavonoïdes et les coumarines (Natella et Scaccini, 2001).

Les poly phénols ont une multitude d'activités biologiques grâce à leurs structures chimiques. Ils possèdent des propriétés antiprolifératives, antivirales et immunostimulantes. Ils sont aussi considérés comme des antioxydants qui protègent les cellules de l'organisme contre le stress oxydatif. Ils sont impliqués dans la prévention de nombreuses maladies telles que : les maladies chroniques et neurodégénératives, l'athérosclérose, les maladies vasculaires, le diabète type II, le cancer, l'Alzheimer, le Parkinson. De même, les polyphénols jouent un rôle de modulateur sur certaines enzymes et leurs activités. (Li ., 2014).

De plus, ils ont une activité sur le système sanguin en empêchant la formation de plaques d'athérome au niveau artériel, et inhibent l'agrégation plaquettaire impliquée dans les thromboses, améliorent le fonctionnement de l'endothélium artériel (Michel., 2008). Le café possède aussi certaines caractéristiques organoleptiques dont l'amertume, l'acidité et la couleur dus aux polyphénols formés lors de la torréfaction. (Bastian., 2006).

I -4-5-1 les flavonoïdes : L'ensemble des flavonoïdes, qui possèdent une origine biosynthétique commune, ont un élément structural de base en C₁₅ (C₆-C₃-C₆). Selon le degré d'oxydation du noyau central, qui peut être ouvert ou fermé, les flavonoïdes peuvent-être regroupés en neuf classes distinctes : chalcones, aurones, flavones, isoflavones, flavonols, flavanones, flavane-3-ols flavane-3,4-diols et anthocyanes. Dans la plante, ils sont très souvent liés avec des sucres, on parle alors d'hétérosides constitués d'une partie phénolique aglycone ou génine associée à un sucre. La liaison glycosidique pouvant être de type C-O-C ou de type C-C. D'autres types de liaisons se retrouvent fréquemment chez les flavonoïdes comme des sulfatations ou des prénylations (Bruneton, 2008 ; Macheix et al., 2005).

I -4-5-2 Alcaloïdes : Le terme alcaloïdes provient de « Alkaly-like » ; alcaly signifiant : soude, like signifiant apparence (**Bruneton, 1987**). Les alcaloïdes sont des substances naturelles et organiques provenant essentiellement des plantes et qui contiennent au moins un atome d'azote dans leur structure chimique, avec un degré variable de caractère basique (**Harborne et Herbert ; 1995**).

I -4-6 Autres composants

Le caféier renferme aussi d'autres composés actifs tels que : les mélanoidines, les alcools, les diterpènes et les polyphénols (l'acide chlorogénique, caféique quinique, connus pour leurs effets anti oxydants qui peuvent lutter contre le stress oxydatif (**Nordqvist, 2016**).

I -5-Les déchets ou sous-produits de l'industrie du café

Chaque année, la consommation et la production du café augmente et par conséquent, la production de résidus du café augmente (**Kondamudi et al., 2008**). Les déchets de l'industrie de l'agriculture et de production du café engendre plusieurs résidus : la parche, la pellicule argenté et le marc de café en derrière lieu (**Bressani, 1978**).

Les cerises de café sont traitées par deux voies, soit par voie sèche ou par voie humide. Dans le cas de traitement par voie humide, les déchets restants sont la pulpe, le mucilage et la parche (**perchemin**) (**Houessou, 2007**)

I -5-1 Présentation de la parche

Parchemin ou endocarpe, c'est la partie qui sort de coquille et enveloppe les fèves de café (grains de café qui sont présentés dans les cerises) à l'intérieur du fruit. Elle est dure, mince et possède une texture scléreuse, généralement elle est enrobée par une partie très visqueuse appelée le mucilage ou pulpe (**Justin Koffi, 2007**).

La parche du café est considéré comme un déchet solide généré par le traitement du café. Le procédé humide comporte plusieurs étapes : déparchage, dépulpage et décorticage. La première étape sert à séparer les enveloppes (parche, pulpe, coque) de grains de café et de donner la parche comme un principal produit et la pulpe en tant que sous-produit suivie d'une étape de fermentation, le mucilage est éliminé puis lavé, ensuite la parche est séchée au soleil. Après le séchage, la peu de parche mécaniquement décortiqué se détache facilement (**Nadim et Célia,2004**).

I -5-2 Compositions de parche

Selon (Pietinenet al., 1990 ; Viani 1993), la parche de café est riche essentiellement en hémicellulose et en lignine, mais il existe aussi d'autres composés tels que : le potassium, le magnésium et d'autres minéraux qui ont fait l'objet de nombreuses études sur leur utilisation en tant qu'élément fertilisant en agriculture ou dans divers domaines.

Le tableau -01 présente ces éléments :

Tableau -01 : Composition de la parche du café (Pietinenet al., 1990 ; Viani 1993)

Composé chimiques	Quantité (g/100g de matière sèche)
Hémicellulose	53.96
protéine	1.25
lignine	32.96
Phosphore	0.1
Potassium	2.75
Azote	2.74
Calcium	1.14
Magnésium	0.30
pH	7.49
C/N	18.50

*C/N (rapport carbone et azote)

I -5-3 Valorisation de parche

La production du café permet de générer des quantités assez importantes de déchets ou sous-produits qui peuvent être exploités dans de nombreux domaines **(ICO, 2007)**.

La parche de café considéré comme un engrais présente un effet bénéfique sur les éléments fertilisants du sol ainsi que sur les rendements en fruits et légumes **(Pino et Godefroy, 1973)**.

Ce composant peut enrichir les caractéristiques chimiques du sol et améliorer les niveaux des composés minéraux de sol **(Pino et Godefroy, 1973)**.

Ainsi, les composants résiduels de parche constituent des éléments fertilisants en matière organique tel que l'azote minéral, le potassium, le magnésium, le phosphore qui peuvent être augmente le taux des composants minérales du sol **(Debry,1995)**.

Certaines études ont été réalisés pour avoir le teneur en éthanol qui existe dans la parche du café, À cet égard **(Gouvea et al., 2008)** indique par ces résultats que la parche de café possède un excellent potentiel de production d'éthanol.

Il a été possible aussi de noter une amélioration des niveaux de production d'éthanol par l'utilisation des micro-organismes et les nutriments et par l'hydrolyse enzymatique **(Gouvea et al., 2008)**. **(Olivera et al., 2009)** ont rapporté que l'ajout de glucose à 20% et 35% permet de développer et de sentir un arôme d'ananas puissant, ces mêmes auteurs ont détecté une faible odeur de banane.

Une étude a été réalisée pour déterminer l'action de l'apport de parche du café sur la nutrition et les rendements d'un bananier. Les résultats de cette étude ont démontré que l'utilisation de parche du café pour la culture du bananier devrait être considérée davantage pour le rendement agronomique **(Pino et Godefroy, 1973)**.

(Olivera et al., 2008) ont utilisé des enveloppes de café non traitées en tant que biosorbants potentiels pour le traitement des eaux contaminées, le bleu de méthylène était le modèle coloré dans une étude d'adsorption en discontinu.

De plus, en raison de ses avantages pour l'environnement, les parches du café peuvent être brûler dans un générateur de gaz et à partir de ce dernier il est possible de produire de la chaleur et de l'électricité **(Belitz et al., 2009)**

CHAPITRE II

Généralités Sur La Toxicité Et L'hémolyse



«Tout est poison, rien n'est
poison, c'est la dose qui fait le
poison » (Paracelse)

II -1 Notion de toxicité

La toxicologie est l'étude des substances toxiques et, plus précisément, l'identification et l'évaluation quantitative des conséquences néfastes liées à l'exposition à des agents physiques, chimiques ou de toute autre nature.

Elle fait appel, tant pour ses connaissances que pour sa démarche de recherche ou ses méthodes, à la plupart des sciences biologiques fondamentales, aux disciplines médicales, à l'épidémiologie et à divers domaines de la chimie et de la physique. Elle s'étend de la recherche fondamentale sur le mécanisme d'action des agents toxiques à la mise au point et à l'interprétation de tests normalisés permettant de caractériser les propriétés toxiques de ces agents.

Elle fournit à la médecine et à l'épidémiologie des informations indispensables pour comprendre l'étiologie et établir le lien entre les expositions, y compris professionnelles, et les pathologies observées.

La toxicologie peut être scindée en spécialités : toxicologie clinique, toxicologie médico-légale, toxicologie fondamentale et toxicologie réglementaire, être présentée selon les organes cibles (par exemple, immunotoxicologie, toxicogénétique) ou encore selon ses objectifs (recherche, expérimentation et évaluation du risque) (**Ellen K. Silbergeld, 2000**).

II -2 Les types de toxicité

L'homme est constamment exposé à une toxicité soit aiguë soit subaiguë ou encore chronique (**Bismuth et al., 1987**). La toxicité est classée en trois formes essentielles : la toxicité aiguë, la toxicité à court terme (subaiguë ou sub-chronique) et la toxicité chronique. (**Viala et Botta, 2005**). Le tableau 1 résume les différentes formes d'intoxication.

Tableau n°2 : Formes d'intoxication (commission de la santé et sécurité de travail, Québec .2004)

FORME D'INTOXICATION	FRÉQUENCE D'ADMINISTRATION	DURÉE DE L'EXPOSITION
AIGUË	Unique	< 24 heures
SUBAIGUË	Répétée	≤ 1 mois
SUBCHRONIQUE	Répétée	de 1 à 3 mois
CHRONIQUE	Répétée	> 3 mois

II -2-1 Toxicité aiguë

Elle se manifeste rapidement, voire immédiatement, après une prise unique ou à court terme après plusieurs prises rapprochées. C'est l'étude qualitative et quantitative des phénomènes toxiques qu'il est possible de rencontrer après administration unique de la ou des substances actives contenues dans le médicament **(Ruckebusch, 1981)**.

La toxicité aiguë désigne tous les effets nocifs et les signes adverses qui se manifestent juste après l'exposition de l'organisme à une prise unique ou plusieurs prises très rapprochées d'un agent chimique. Les effets toxiques aigus surviennent généralement immédiatement ou dans les premiers jours après l'exposition **(Le Blanc, 2010)**.

Le terme toxicité orale aiguë est plus souvent utilisé en liaison avec les déterminations de la létalité et de la DL50.

La DL50 est définie comme la dose déterminée statistiquement qui, lorsqu'elle est administrée dans un test de toxicité aiguë, est susceptible de causer la mort de 50% des animaux traités sur une période donnée **(Oliver, 1986)**.

II -2-1-1 La dose létale (DL50)

Bien que la DL50 soit un outil utile pour classer les substances en fonction de leur degré de toxicité, elle présente certaines limites. Il ne peut pas être considéré comme une constante biologique en raison de sa variabilité. Il fournit moins d'informations sauf les fonctions physiologiques : examens biochimiques et histopathologiques sont incorporés à l'essai. Pour l'évaluation du comportement pharmacocinétique et de la biodisponibilité, le test DL50 ne donne que des résultats semi-quantitatifs et souvent ambigus (**Zbinden et Flury-Roversi, 1981**).

Cependant, l'estimation de la valeur DL50 pourrait encore fournir des informations précieuses sur la toxicité d'un composé et actuellement l'Environmental Protection Agency (EPA) des États-Unis et d'autres organisations internationales recommande l'utilisation d'un test pour estimer la DL50 (**OECD, 2001**). Le tableau 2 représente la classification des produits chimiques selon leurs toxicités.

Tableau n°3 : Classification des produits chimiques selon leurs toxicités (Hodge et Sterner, 1943)

<i>Classes de toxicité : Échelle de Hodge et Sterner</i>	
<i>DL₅₀ orale (rat)</i>	<i>Indice de toxicité</i>
Jusqu'à 1 mg/kg	1 = extrêmement toxique
De 1 à 50 mg/kg	2 = hautement toxique
De 50 à 500 mg/kg	3 = modérément toxique
De 500 à 5 000 mg/kg	4 = légèrement toxique
De 5 000 à 15 000 mg/kg	5 = presque pas toxique
Plus de 15 000 mg/kg	6 = relativement inoffensif

II -2-2-Toxicité subaiguë

La toxicité subaiguë concerne les effets nocifs dus à la répétition de doses qui ne produisent pas d'effets toxiques immédiats. Des effets tardifs peuvent survenir à cause de l'accumulation du produit dans les tissus ou à cause d'autres mécanismes **(OCDE, 1979)**.

La substance à tester est administrée quotidiennement à différents niveaux de dose à plusieurs groupes d'animaux. De manière générale, au moins trois groupes d'essai et un groupe témoin doivent être utilisés **(OCDE, 2008)**.

Diffère de la toxicité aiguë par le fait qu'une proportion significative de la population peut survivre à l'intoxication, bien que tous les individus aient présente des signes cliniques à court terme sur des organes cibles, parfois réversibles et découlant de l'absorption répétée du toxique, mais à des doses plus faibles que celle de la toxicité aiguë **(Ramade, 1979)**.

II -2-3- Toxicité subchronique

Certains produits chimiques ont un mécanisme de toxicité différent selon qu'ils sont administrés à dose unitaire élevée ou de manière répétée à dose plus faible quoique toxique.

Lorsqu'on donne une forte dose unitaire, le sujet peut ne plus être en mesure de détoxifier et d'excréter le produit chimique et réagir différemment que si on lui administrait des doses répétées plus faibles **(Philip G. Watanabe, 2000)**.

- Toxicité réitérée pendant plus de 28 jours et moins de 90 jours **(Lauwerys et al., 2007)**.
- Elle résulte de l'administration d'une substance pendant une période allant de 14 jours à 3mois (exposition répétées pendant un temps limité) **(commission de la santé et sécurité de travail, Québec, 2004)**.

II -2-4- Toxicité chronique

Le but d'une étude de toxicité chronique est de déterminer les effets d'une substance d'essai, chez une espèce de mammifère donnée, à la suite d'une exposition prolongée et répétée **(OCDE, 1979)**.

La substance d'essai est administrée quotidiennement à plusieurs groupes d'animaux d'expérience à des doses progressives, en général pendant une période de 12 mois. Cette durée est assez longue pour permettre aux effets de toxicité cumulée de se manifester, tout en évitant les effets perturbateurs des changements liés au vieillissement (OCDE, 2009).

II- 2-5 Comparaison entre la toxicité aiguë et chronique

Les mots « **aiguë** » et « **chronique** » peuvent être accolés à exposition, intoxication, toxicité et effets. Classiquement, on considère qu'il y a intoxication aiguë lorsque des effets biologiques surviennent après une période d'exposition à un contaminant ne dépassant pas 24 heures.

L'intoxication chronique concernera une exposition répétée de l'animal pendant une période de six mois ou plus. L'exposition de durée intermédiaire, généralement 13 semaines, déterminera l'intoxication sub-chronique (Viau et Tardif ; 2003).

II -3-Dose effet / dose réponse

L'évaluation de la toxicité, de même que la classification de la toxicité peuvent être utilisées dans un but réglementaire.

Il s'agit d'une classification arbitraire des doses ou des niveaux d'exposition («très toxique», «extrêmement toxique», «modérément toxique», etc.) à l'origine d'effets toxiques qui permet de répertorier les produits exerçant une toxicité aiguë. La classification de la toxicité permet de regrouper les produits chimiques dans des catégories générales selon leur effet toxique essentiel, par exemple les allergènes, les neurotoxiques, les cancérogènes, etc.

Elle peut avoir une valeur administrative d'avertissement et d'information. (Ellen K. Silbergeld, 2000).

II -3-1 La relation dose-effet

C'est la relation entre la dose et l'effet à l'échelle de l'individu. L'augmentation de la dose peut accroître l'intensité ou la sévérité d'un effet. Une courbe dose-effet peut être tracée pour l'ensemble de l'organisme, la cellule ou la molécule cible. Certains effets toxiques, comme la mort ou le développement d'un cancer n'ont pas un caractère progressif, ils représentent des effets «tout ou rien» **(Ellen, Silbergeld, 2000).**

II -3-2 La relation dose-réponse

Elle désigne la relation entre la dose et le pourcentage d'individus présentant un effet spécifique. Lorsque la dose augmente, un plus grand nombre d'individus sont affectés dans la population exposée **(Ellen K. Silbergeld, 2000).**

II -3-3 la relation entre la dose effet et la dose réponse

Il est essentiel pour la toxicologie d'établir les relations dose-effet et dose-réponse. En médecine (épidémiologie), le critère de relation causale souvent employé entre un agent et une pathologie repose sur la proportionnalité entre la dose et les effets ou réponses observés **(Ellen K. Silbergeld, 2000).**

II -4 Devenir d'un toxique dans l'organisme

C'est le métabolisme qui détermine le devenir d'une substance dans l'organisme ; parce qu'il est le résultat des processus d'absorption, de distribution et d'élimination (biotransformation et excrétion) qui gouvernent son cheminement dans les divers compartiments du corps humain.

Par conséquent, le métabolisme joue un rôle clé dans la détermination de la concentration et de la toxicité des espèces toxiques aux endroits cibles **(Viau C, Tardif R, 2003).**

II -4-1- La toxicocinétique

Elle peut être définie comme l'étude des mouvements dynamiques des xénobiotiques durant leur passage dans le corps humain. En d'autres mots, la toxicocinétique renseigne sur la façon avec laquelle l'organisme agit sur une substance par l'intermédiaire des processus d'absorption, de distribution, de biotransformation et d'excrétion. (Viau C, Tardif R, 2003).

II -4.2- La toxicodynamie

La toxicodynamie s'intéresse à l'influence qu'exerce un toxique sur l'organisme et aux facteurs qui interviennent dans la réponse toxique. (Gilles Lapointes, PH. D, 2004).

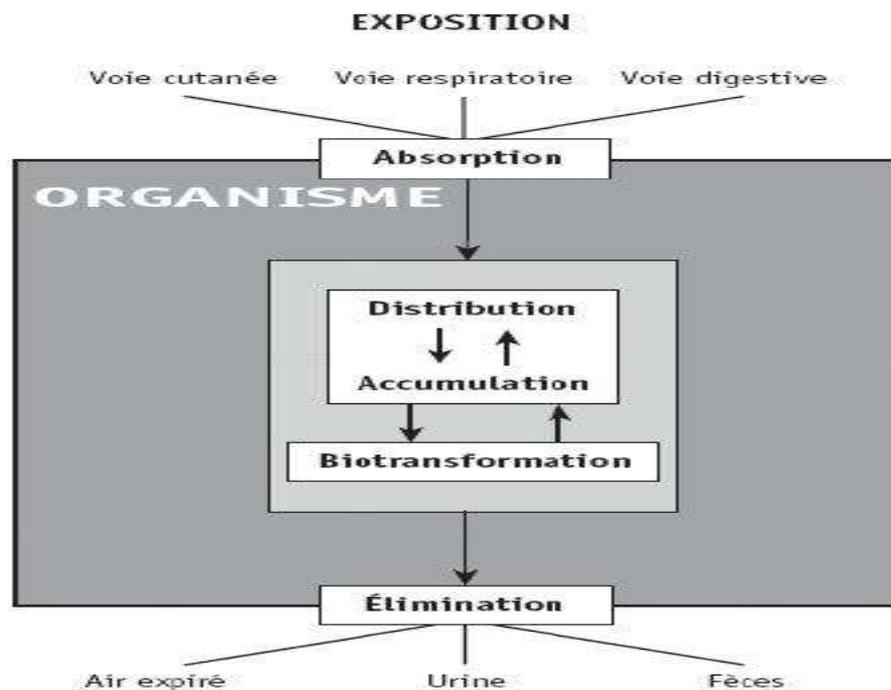


Figure n°3 : Devenu d'un produit dans l'organisme. (Gilles Lapointes, PH. D, 2004).

II -5 Les organes cibles

Les études de toxicologie au niveau des organes cibles sont entreprises au vu des informations sur les effets toxiques spécifiques d'une substance, obtenues à partir de données épidémiologiques ou d'études générales de toxicité aiguë ou chronique, ou dans le but de protéger certaines fonctions, par exemple la reproduction ou le développement fœtal. Dans certains cas, les autorités compétentes exigent que des tests spécifiques de toxicité sur des organes cibles soient effectués. (**Ellen K. Silbergeld, 2000**).

Les toxiques ne produisent pas des effets de même intensité sur tous les organes (ex. : le rein) ou les tissus (ex. : le sang). Ils s'attaquent à des organes en particulier, les organes cibles, pour des raisons qui ne sont pas toujours comprises. Il peut y avoir plusieurs raisons, dont une sensibilité plus grande de ces organes, une concentration plus élevée du toxique et/ou de ses métabolites, etc. (**Gilles Lapointes, PH. D, 2004**).

En général, les études de toxicité au niveau des organes cibles comportent toutes les étapes suivantes: examen histopathologique détaillé de l'organe cible, y compris post mortem, poids tissulaire, examen des tissus après fixation : études biochimiques de voies critiques dans l'organe cible, telles que les systèmes enzymatiques importants, études fonctionnelles de l'aptitude de l'organe et des constituants cellulaires à assumer des fonctions spécifiques métaboliques ou autres, étude des indicateurs biologiques d'exposition et des effets précoces dans les cellules de l'organe cible.

L'étude des organes cibles peut aussi avoir pour finalité de chercher à mieux connaître leur physiologie, leur biochimie et leur biologie moléculaire. Or, comme la synthèse et la sécrétion de protéines de faible poids moléculaire sont des aspects importants de la fonction rénale, les études de néphrotoxicité s'y intéressent souvent (**PISSC, 1991**).

De même, étant donné que les communications intercellulaires constituent un processus fondamental du fonctionnement du système nerveux.

Les études des organes cibles en neurotoxicité comportent des mesures neurochimiques et biophysiques détaillées de la synthèse, de la captation, du stockage, de la libération et de la liaison au récepteur des neurotransmetteurs ainsi que des mesures électrophysiologiques des modifications des potentiels de membrane qui leur sont associées (**Ellen K. Silbergeld, 2000**).

II -6 Généralité sur les globules rouges

Les érythrocytes sont les cellules les plus abondantes de la circulation sanguine. La production quotidienne est de 200×10^9 par jour, et leur durée de vie est de 120 jours, au cours desquels ils effectuent un déplacement de près de 500 km dans la microcirculation. Ils ont pour fonction de transporter l'oxygène (O₂) des poumons vers les tissus, et d'évacuer le dioxyde de carbone (CO₂) en sens inverse. Au terme de l'érythropoïèse, les érythroblastes perdent leur noyau (énucléation) et deviennent des érythrocytes de forme biconcave, avec une grande capacité de déformation, pour circuler dans les capillaires (**Norbert Ifrah, Marc Maynadié ;et al.,2018**).

II -6-1- Membrane de globule rouge

Sa structure est celle d'une membrane cellulaire classique, elle est constituée d'une bicouche lipidique où s'intercalent des protéines. Certaines protéines sont des transporteurs d'ions, d'autres sont des récepteurs membranaires. Une partie de ces protéines est porteuse des fonctions antigéniques du globule rouge et des groupes sanguins érythrocytaires (ABO, Rhésus, etc...) (**Sébahoun, 2005**).

II- 6-2- Squelette membranaire du globule rouge

Responsable de propriétés mécaniques du globule rouge, il est formé d'un réseau de protéines qui tapissent la face interne de la membrane cytoplasmique de GR. Le principal constituant protéique de ce réseau est la spectrine (**Haest, 1982**).

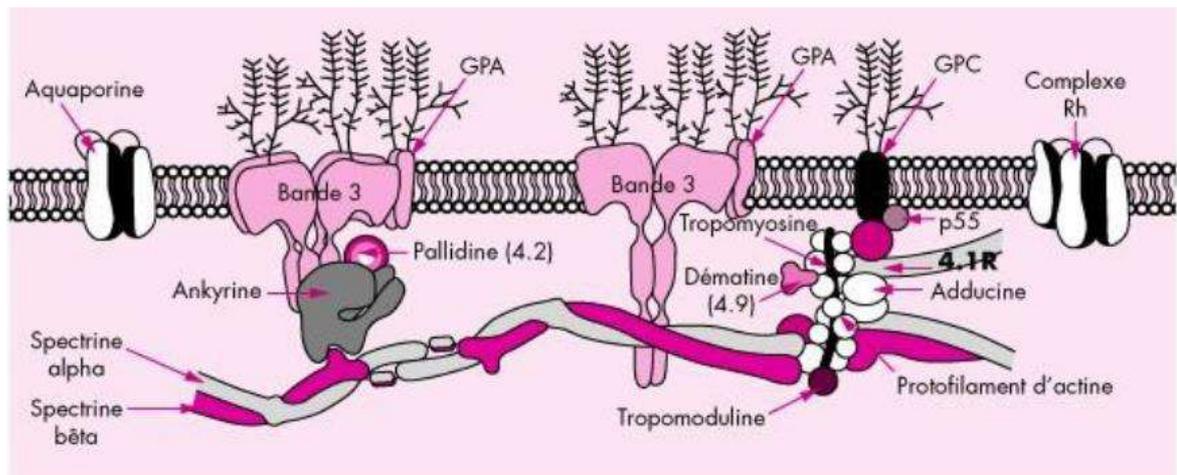


Figure 4 : Schéma de la membrane érythrocytaire (Delaunay, 2007).

II -7 Notion De L'hémolyse

II- 7.1- Définition

Le processus d'hémolyse est un phénomène irréversible au cours duquel les hématies sont détruites et libèrent leur contenu.

Des facteurs proprement corpusculaires, comme l'état de la membrane, le métabolisme énergétique intracellulaire, la structure de l'hémoglobine, règlent le degré de l'hémolyse. Des facteurs extra-corpusculaires sont également importants dans le processus d'hémolyse citant, le plasma, l'état anatomique de l'appareil circulatoire et l'état fonctionnel du système mononuclé phagocytaire **Aguilar (2007)**.

L'hémolyse est la destruction des GR avec raccourcissement de leur durée de vie (normalement de 120 jours). (**Norbert Ifrah, Marc Maynadié ;et al.,2018**).

II -7.2- Les type de l'hémolyse

On distingue deux grands tableaux cliniques dont la physiopathologie est différente :

II -7-2-1 l'hémolyse intratissulaire

L'hémolyse intratissulaire correspondant à une exacerbation de l'hémolyse physiologique; elle a lieu le plus souvent mais pas exclusivement dans les macrophages spléniques. Cliniquement, elle associe une triade caractéristique (pâleur, ictère, splénomégalie). Elle est le plus souvent chronique ou subaiguë, l'exemple typique est la sphérocytose héréditaire ou maladie de Minkowski-Chauffard. Sur le plan biologique, l'anémie est régénérative, on note une

augmentation de la bilirubine libre, traduisant le catabolisme de l'hémoglobine, et une haptoglobine basse (parfois effondrée mais moins souvent que dans l'hémolyse intravasculaire) et une augmentation des LDH (**Norbert Ifrah, Marc Maynadié ;et al.,2018**).

II -7-2-2 l'hémolyse intravasculaire

Le plus souvent aiguë est secondaire à une destruction directe des hématies dans la circulation sanguine avec libération d'hémoglobine libre plasmatique (hémoglobinémie), éliminée dans les urines lorsque les capacités de réabsorption tubulaire sont dépassées (hémoglobinurie, responsable d'urines dites « porto »). L'exemple prototypique est la crise hémolytique aiguë chez un patient déficitaire en G6PD : suite à une prise médicamenteuse ou l'ingestion de fèves, tableau de douleur lombaire ou abdominale atypique, allant jusqu'au choc oligo-anurique, anémie parfois profonde avec hémoglobinurie. Dans ces formes aiguës, l'ictère à bilirubine libre est retardé, tout comme la réticulocytose puisque la moelle osseuse met quelques jours à produire de nouveaux réticulocytes. L'hémoglobine étant captée par l'haptoglobine afin d'être éliminée dans le foie, l'haptoglobine est endossable dans ces formes d'hémolyse car totalement consommée. (**Norbert Ifrah, Marc Maynadié ;et al.,2018**).

II -7-3- les mécanismes d'hémolyse :

Il existe plusieurs mécanismes qui provoquent l'hémolyse, on peut citer :

✓ Une altération de la déformabilité de la cellule qui l'empêche de traverser les capillaires et surtout la traversée splénique. Elle peut être liée à un déficit en ATP qui indique des altérations de la membrane et la formation des sphérocytes, ou à un déséquilibre du rapport surface/volume provoquant des déformations graves (**Najman et al., 1994 ; Lévy et al., 2008**).

✓ Un déficit enzymatique conduisant à l'oxydation des érythrocytes, comme le cas d'un déficit de la glucose-6-phosphate déshydrogénase qui entraîne un raccourcissement du NADPH accompagné d'une diminution de GSH (glutathion réduit) ce qui influence sur la réduction normale du H₂O₂ ou autres oxydants qui vont attaquer les constituants de la membrane érythrocytaire (protéines et lipides) et

l'hémoglobine conduisant ainsi à une hémolyse (**Fournier, 2001 ; Gurbuz et al., 2004 ; Dalal et Kollmannsberger, 2005**).

CHAPITRE III

Matériels Et Méthodes

III - Matériels Et Méthodes

Cette étude expérimentale a été réalisée au sein du laboratoire scientifique de l'Université de Tlemcen en deux parties :

- Préparation des extraits aqueux de la parche de café : réalisée au sein du laboratoire de recherche « PPABIONUT » Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, des Sciences de la Terre et de l'Univers, Université Abou Bakr Belkaid (Tlemcen).
- Etude biologique *in vitro*, basée sur la recherche de l'effet hémolytique de différentes concentrations d'extraits aqueux de la parche de café : réalisée au sein du laboratoire de biochimie n°03, Département de Biologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, des Sciences de la Terre et de l'Univers, Université Abou Bakr Belkaid (Tlemcen).

III -1 Matériel Végétal

La parche de café a été récupérée à partir de l'unité de production de café « Africafé » qui se situe à la zone industrielle Chetouane, Tlemcen. Elle a été séchée à l'ombre et à température ambiante. Une fois totalement séchée, la parche est moulue en poudre fine.



Figure 5 : La parche de café (photo de laboratoire)

III -1-1 Extraction des Composés phénoliques de La parche de café

Les polyphénols sont extraits par macération selon un protocole standardisé (Mahmoudi et al., 2013). Pour la macération, un solvant est utilisé, à savoir l'éthanol. Pour cela, 10g de parche sèche est mise dans un bécher. Ensuite, 30 ml d'eau distillée et 70 ml du solvant éthanol sont ajoutés. Après agitation, la préparation est recouverte avec du papier aluminium et laissée pendant 48h à température ambiante et à l'abri de la lumière pour macérer. Elles sont ensuite filtrées avec du papier filtre standard.

Les filtrats obtenus sont récupérés dans des flacons sombres et sont conservés au réfrigérateur à température de 5°C jusqu'à utilisation.

La solution qui correspond aux extraits de la parche sèche dans le solvant éthanol est mise dans un ballon. Ce dernier est fixé au Rotavapor à 220 rpm et à température de 45°C pendant 2 h. Ainsi, le solvant est récupéré par évaporation et condensation et les extraits sont transvasés dans une boîte de Pétri. Cette dernière est mise dans une étuve à la température de 30°C pendant 48 h jusqu'à séchage complet.



Figure 6 : Photographie du Rotavapor utilisé (photo de laboratoire)



Figure 7: Agitation du mélange : parche broyé + Eau distillée (moins de 24h). (Photo de laboratoire)



Figure 8 : Filtration des extraits obtenus (photo de laboratoire)

III -1-2 Calcul Du Rendement

Le pourcentage de rendement de l'extrait a été calculé par la formule suivante :

$$R(\%) = \frac{M - M_0}{M_{pc}} \times 100$$

- (%) : Rendement exprimé en %.
- M : poids après évaporation
- M₀ : poids avant évaporation (Ballon vide)

III -2 Analyse Biologiques :

Le but de cette partie est la recherche de l'effet hémolytique des extraits aqueux de la parche broyée dans une suspension érythrocytaire du sang humain dans le PBS.

III -2-1 Préparation Du Phosphate Buffer Saline (PBS) :

Afin de préparer une solution tampon de PBS à pH=7.4 ± 0,2, nous avons utilisé les composés suivant avec les concentrations qui correspondent :

Na₂HPO₄ (8Mm) ; KH₂PO₄ (2Mm); KCl (2.7mM); NaCl (137mM) (Mohan, 2006).

La préparation de cette solution comprend les étapes suivantes :

- Effectuer la pesée de KH₂PO₄ 0,272 g solubilisé dans 300 ml du sérum salé NaCl à 9 % (9,09 de NaCl dilué dans 1ml d'eau filtrée).
- Prendre ensuite 0,426 g de Na₂HPO₄ solubilisé dans 300 ml du sérum salé pour 9% NaCl.
- Ajuster à pH 7,4.

III -2-2 Préparation de la suspension erythrocytaire

Le sang utilisé est prélevé sur tube hépariné à partir d'un donneur unique sain puis centrifugé à 4000t/min pendant 5 min. Après élimination du surnageant, le culot est lavé 2 fois par PBS puis, solubilisé à nouveau par du PBS.

III -2-3 Préparation D'extraits

Prendre 0.05g de l'extraits préparés dans 10ml d'eau distillée ; Puis dilué à partir cette solution ont été pesés et dissous dans du PBS dans le but de réaliser une gamme de quatre concentrations finales (500ug/ml, 250ug/ml, 125ug/ml et 6,5ug/ml).

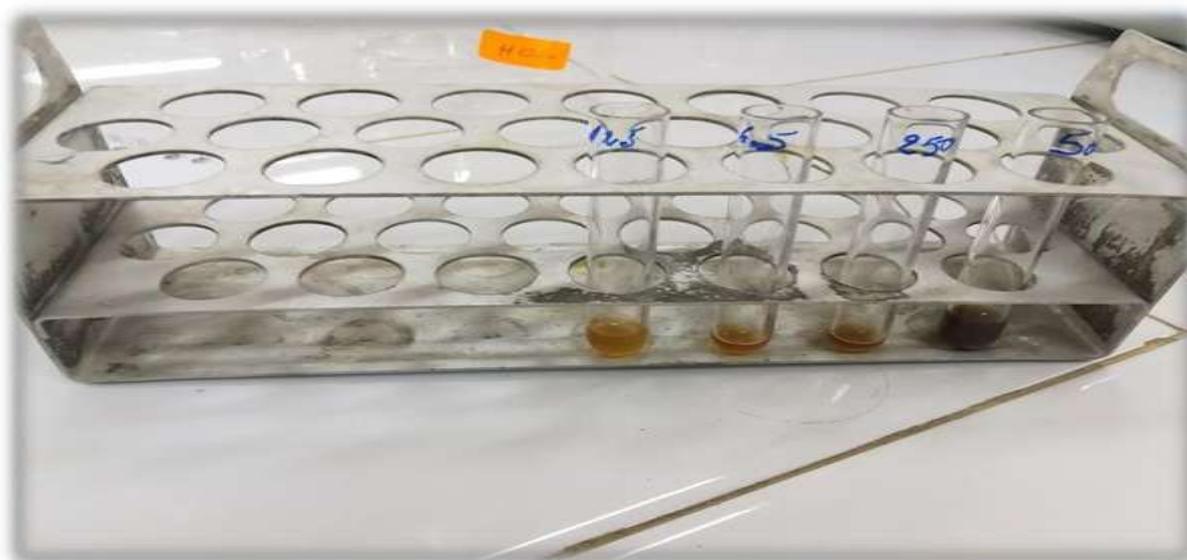


Figure 9 : Les solutions préparées (photo de laboratoire)

III -3 Test d'hémolyse

Le test de l'effet hémolytique de la plante étudiée est réalisé selon la méthode de **Guo- Xiang Li et Zai-Qun Lui (2007) et OMS (2011)**.

Le principe de cette méthode consiste à :

- Mélanger dans des tubes à hémolyse 3550 μ l de la suspension érythrocytaire préparée (diluée 20 fois) avec 50 μ l de l'extrait à différentes concentrations (500ug/ml, 250ug/ml, 125ug/ml et 6,5ug/ml).
- Incuber les tubes dans un incubateur agitateur à 37°C durant 60 min ;
- Prélever 500 μ l chaque 15 min durant 60 min (0, 15, 30, 45 et 60 min) ;
- Ajouter 1,5 ml de PBS ;
- Mélanger les tubes délicatement ;
- Arrêter la réaction avec un bain glaçon ;
- Centrifuger les tubes à 4000 tours/minute durant 5 min ;
- Lire l'absorbance (la fuite d'hémoglobine) de chaque tube à 548 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV- Visible double faisceau (SPECTROD® 200 PLUS, Analytique Jena), contre un blanc contenant du PBS.



Figure10 : Préparation des solutions à base de la suspension d'érythrocytaire, PBS, eau distillée (photo de laboratoire)

Un tube témoin négatif est préparé avec 3350 µl de la suspension érythrocytaire ; diluée 20 fois, et 90 µl de PBS, en absence d'extrait.

Un tube d'hémolyse totale est préparé par 250 µl de la suspension érythrocytaire non diluée et 4750 µl d'eau distillé, en absence d'extrait.

Le taux d'hémolyse des différents extraits est calculé en pourcentage (%) par rapport à l'hémolyse totale après 60 min d'incubation, selon la formule suivante :

$$\text{taux d'hémolyse (\%)} = \frac{\text{DO}_{\text{extrait}} - \text{DO}_{\text{témoin négatif}}}{\text{DO}_{\text{hémolyse totale}} - \text{DO}_{\text{témoin négatif}}} \times 100$$

III -4 Analyses statistiques

Les analyses statistiques permettent l'évaluation de la précision et l'exactitude d'analyse.

III-4-1 La moyenne :

$$\bar{X} = \frac{1}{n} \sum_{i} x_i$$

III -4-2 L'écart type :

$$\sigma_x = \sqrt{V_x}$$

Les résultats obtenus ont été réalisés à l'aide du logiciel SPSS (version 21) par analyse ANOVA. La comparaison des paramètres a été réalisée à l'aide du test Tukey, test de Student, test de Manu Whitney, les différences sont considérées significatives à $p \leq 0,05$:

- Peu significative : $p < 0.0001$ (****).
- Significative : $p < 0.0001$ (****).
- Très significative : $p < 0.0001$ (****).
- Hautement significative : $p < 0.0001$ (****).

CHAPITRE IV

Résultats Et Interprétations

IV -1 Rendement de l'extraction :

La préparation des extraits éthanoliques à partir de la parche de café sèche été effectuée à température ambiante en utilisant deux solvants « l'éthanol 70% et l'eau distillée 30% ».

Le calcul de rendement est récapitulé dans le **Tableau 4**.

Tableau 4 : Rendement de la macération de la parche de café sèche dans le solvant éthanol

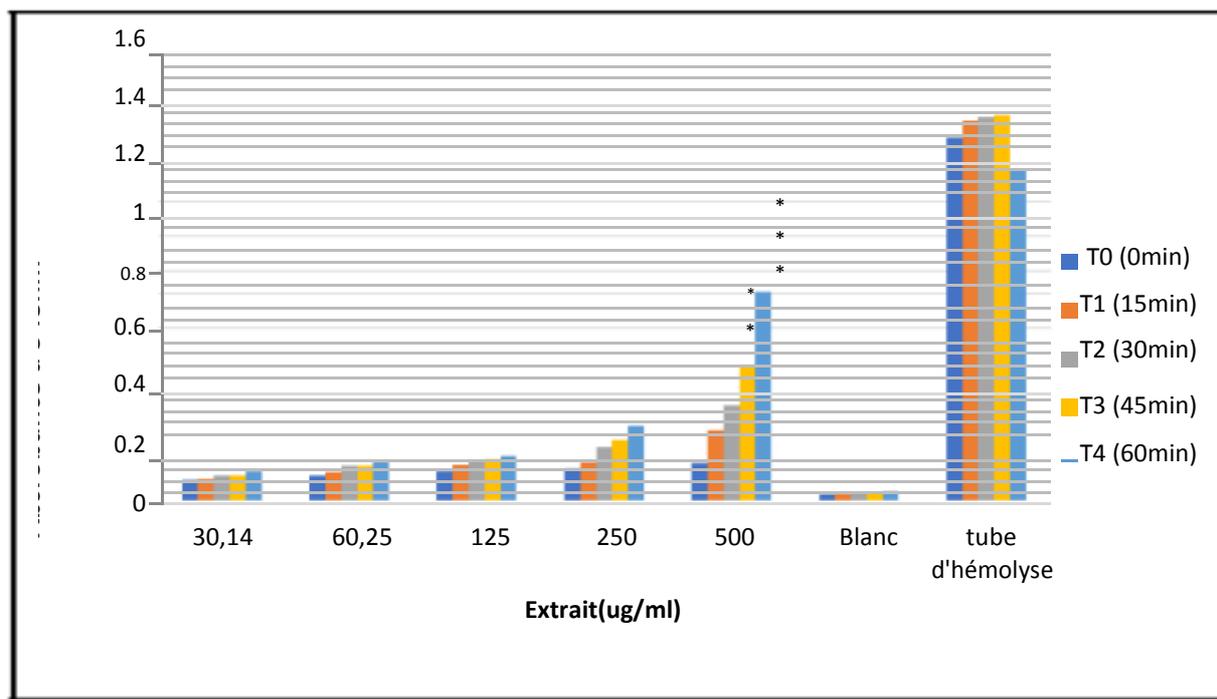
Macération	Parche sèche éthanol
Rendement (%)	5

Selon les résultats présentés ci-dessus, nous avons remarqués que l'extraction par macération à froid sous agitation présente un rendement moyen d'ordre de 5%.

IV -2 Résultats des tests des effets biologiques :

IV -2-1 L'évolution De L'effet Hémolytique En Fonction Du Temps :

Les tests d'effet hémolytique sont réalisés sur les extraits éthanoliques de la parche de café sèche .La figure 16 présente l'évolution de l'effet hémolytique, par Absorbance, durant 60 min, dans un milieu tampon PBS (pH=7,4 ±0,2) contenant une suspension érythrocytaire, incubée à 37°C, et en présence des différentes concentrations de l'extrait éthanolique de la parche de café sèche (500µg/ml, 250µg/ml , 125µg/ml , 60,25µg/ml, 30,14µg/ml), comparées à un témoin négatif (tube Contenant que de PBS et la suspension érythrocytaire).



Peu significative : $P < 0.05$ (*) ; significative : $P < 0.01$ (**) ; très significative : $P < 0.001$ (***) ; hautement significative : $P < 0.0001$ (****) : significativité par rapport à

t0. T0 = 0min ; T1 = 15min ; T2 = 30min ; T3 = 45min ; T4 = 60min

Figure 11 : L'évolution de l'effet hémolytique (par absorbance) dans les tubes contenant une Suspension érythrocytaire en fonction des différentes concentrations d'extrait éthanolique de la parche de café sèche préparées par macération, incubé à 37°C durant 60 min, à 548nm.

D'après les résultats obtenus dans les figures 11, nous avons enregistré que les absorbances représentant le taux d'hémolyse, en présence des différentes concentrations d'extraits éthanoliques de la parche de café sèche, augmentent significativement à partir de 45min puis 60 minutes pour la concentration de 500µg/ml.

La figure 12, représente une comparaison entre les moyennes des absorbances, en pourcentage (%) durant 60 minutes d'incubation dans un milieu tampon PBS (pH 7.4) contenant une suspension érythrocytaire, incubée à 37°C, en présence des différentes concentrations des extraits éthanoliques de la parche de café sèche préparé par macération (500µg/ml, 250µg/ml, 125µg/ml, 60,25µg/ml, 30,14µg/ml).

La figure 12, présente la comparaison des moyennes d'absorbances par le test d'ANOVA1 entre les différentes concentrations d'extrait éthanolique de la parche de café sèche.

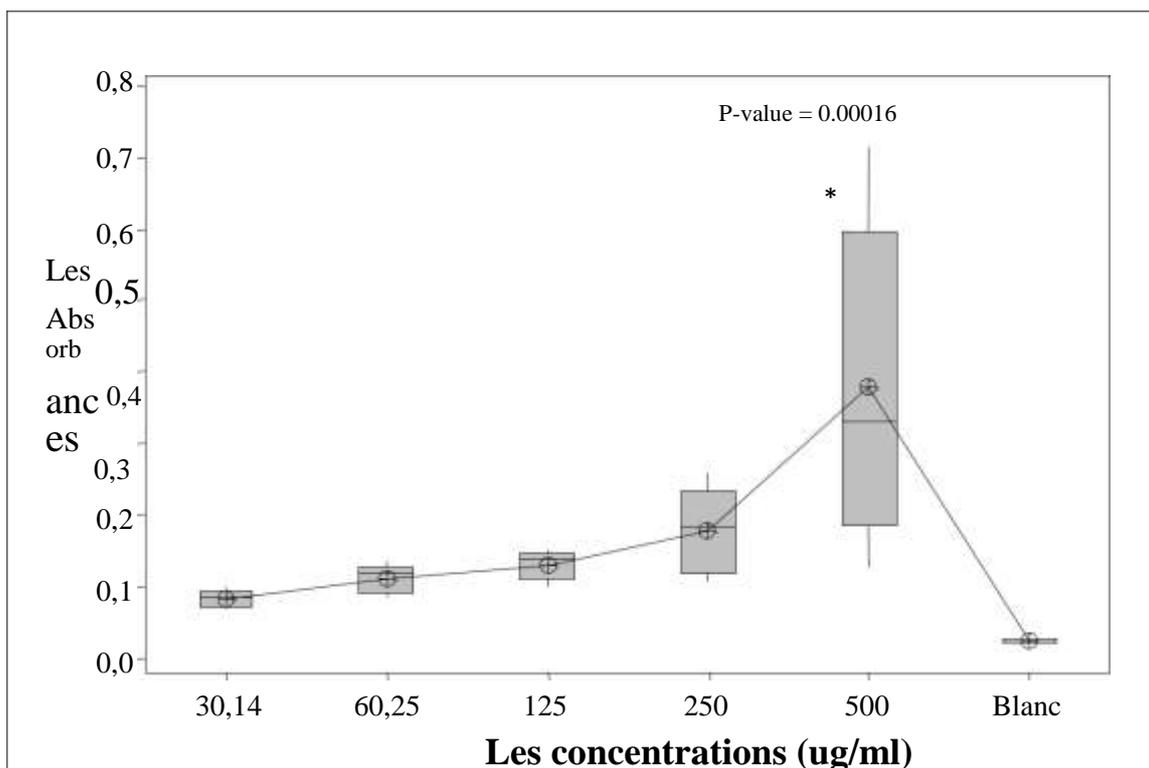


Figure 12 : boîte à moustache comparant les moyennes des absorbances des différentes concentrations d'extrait éthanolique de la parche de café sèche préparées par macération, incubé à 37°C durant 60 min, à 548nm par rapport au blanc (témoin)

D'après les résultats obtenus dans la figure12, la comparaison des moyennes d'absorbances par le test d'ANOVA1 entre les différentes concentrations d'extrait éthanolique de la parche de café sèche nous montre qu'il y a une différence significative entre ces derniers avec une P-value inférieur a 0.05(P-value = 0.00016).

Le test de Tukey appliqué à ces résultats différencie deux groupes (voir tableau 5) :

Le groupe A formé par la concentration 500µg/ml présente l'absorbance la plus élevée avec une moyenne de 0.37 qui est significativement différente du groupe B composé par le reste des concentrations (250, 125, 60.25 et 30.14) ainsi que le blanc qui présente la moyenne d'absorbance la plus faible (0.026).

Tableau 5 : Regroupement d'informations à l'aide du test de Tukey

	N	Moyenne	groupes
500	5	0,37980	A
250	5	0,17940	B
125	5	0,13240	B
60,25	5	0,11260	B
30,14	5	0,08380	B
Blanc	5	0,02660	B

IV -3 Taux d'hémolyse :

La figures ci-dessous, présente l'évolution des taux d'hémolyse, en pourcentage (%) après 60 minutes d'incubation dans un milieu tampon PBS (pH 7.4) contenant une suspension érythrocytaire, incubée à 37°C, en présence des différentes concentrations des extraits éthanoliques de la parche de café sèche préparé par macération (500ug/ml, 250ug/ml, 125ug/ml, 60,25ug/ml, 30,14ug/ml).

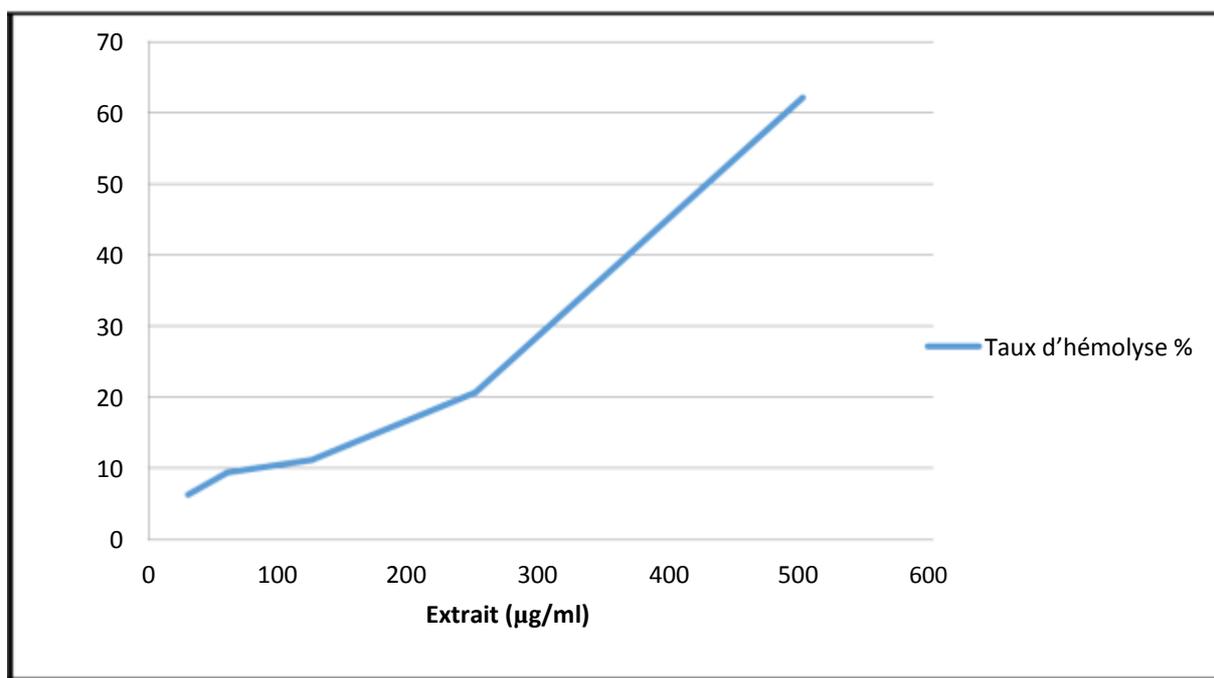


Figure 13 : L'évolution des taux d'hémolyse (%) des différentes concentrations d'extraits éthanoliques de la parche sèche de café préparé par macération après 60 minutes d'incubation.

Les résultats présentés dans la figure 13 montrent que l'extrait éthanolique de la parche de café sèche à 500 µg/ml présente les taux d'hémolyse les plus élevés durant 60min. En effet, dans un premier temps, ces taux augmentent de manière graduelle (pour les concentrations 30.14 µg/ml, 60.25 µg/ml et 125 µg/ml) puis cette augmentation devient plus importante pour la concentration 250 µg/ml et très importante pour la concentration de 500 µg/ml.

La figure 14, montre les taux d'hémolyse, en pourcentage (%) après 60 minutes d'incubation dans un milieu tampon PBS (pH 7.4) contenant une suspension érythrocytaire, incubée à 37°C, en présence des différentes concentrations des extraits éthanoliques de la parche de café sèche préparé par macération (500ug/ml, 250ug/ml, 125ug/ml, 60,25ug/ml, 30,14ug/ml).

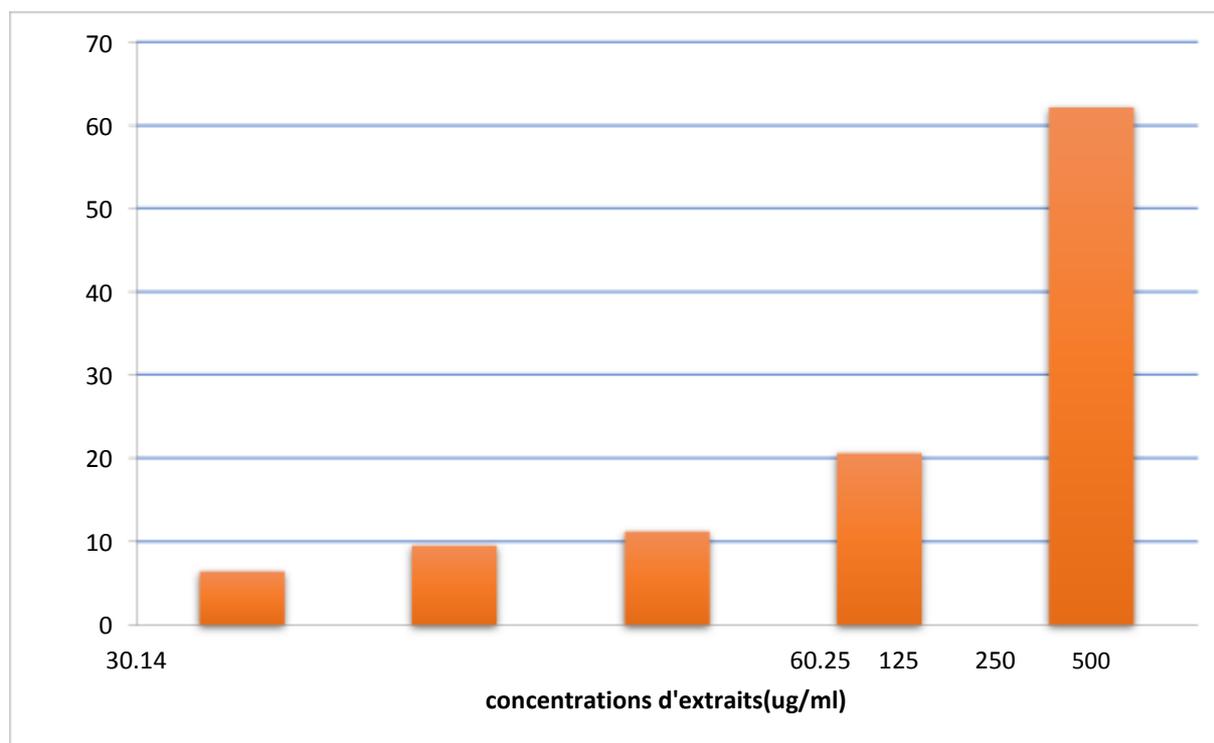
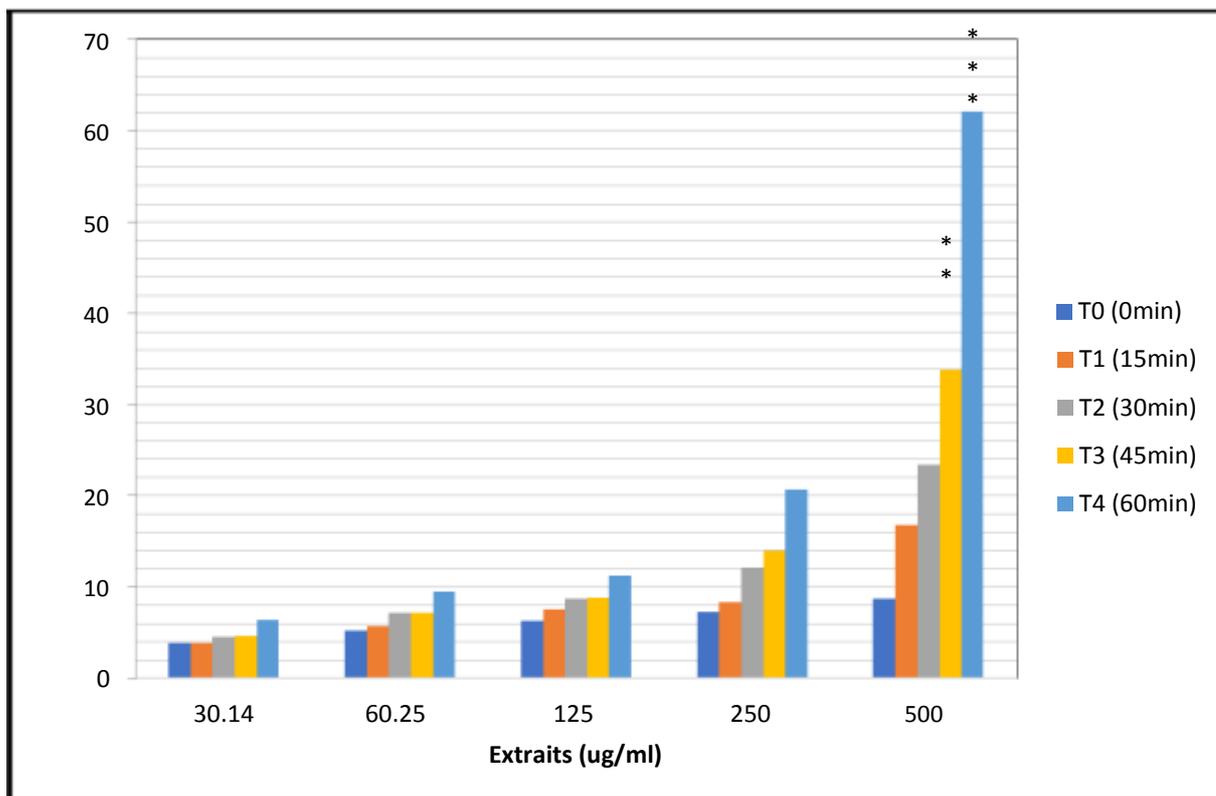


Figure 14 : Taux d'hémolyse en pourcentage des différentes concentrations d'extraits éthanoliques de la parche de café sèche préparés par macération après 60 minutes d'incubation.

L'évolution de taux d'hémolyse en pourcentage des différentes concentrations d'extraits éthanoliques de la parche sèche de café après 60 minutes d'incubation montre bien que le taux d'hémolyse pour la concentration de 500 $\mu\text{g} / \text{ml}$ est trois fois plus élevé que celui pour la concentration de 250 $\mu\text{g} / \text{ml}$.

La figure 15, présente les taux d'hémolyse, en pourcentage (%) durant 60 minutes d'incubation dans un milieu tampon PBS (pH 7.4) contenant une suspension érythrocytaire, incubée à 37°C, en présence des différentes concentrations des extraits éthanoliques de la

parche de café sèche préparé par macération (500 μ g/ml, 250 μ g/ml, 125 μ g/ml, 60,25 μ g/ml, 30,14 μ g/ml).



Peu significative : $P < 0.05$ (*) ; significative : $P < 0.01$ (**) ; très significative : $P < 0.001$ (***) ; hautement significative : $P < 0.0001$ (****) : significativité par rapport à t0.

T0 = 0min ; T1 = 15min ; T2 = 30min ; T3 = 45min ; T4 = 60min

Figure 15 : L'évolution de taux d'hémolyse (%) des différentes concentrations d'extraits éthanoliques de la parche sèche de café préparé par macération après (0min, 15min, 30min, 45min, 60min) d'incubation.

D'après les résultats obtenus dans les figures 13, 14, 15 nous remarquons que le taux d'hémolyse augmente en fonction du temps et en fonction des concentrations de l'extrait étudié.

A une concentration de 30,14 μ g/ml, nous enregistrons un taux d'hémolyse faible qui ne dépasse pas 7% pour les extraits éthanoliques préparés. A la

concentration de 250ug/ml nous avons noté une augmentation remarquable des taux d'hémolyses atteignant 20,7%. Ce taux est trois fois plus importantes (62,08 %) à la concentration de 500ug/ml.

La figure 16, présente la comparaison des moyennes des taux d'hémolyse par le test d'ANOVA1 entre les différentes concentrations d'extrait éthanolique de la parche de café sèche.

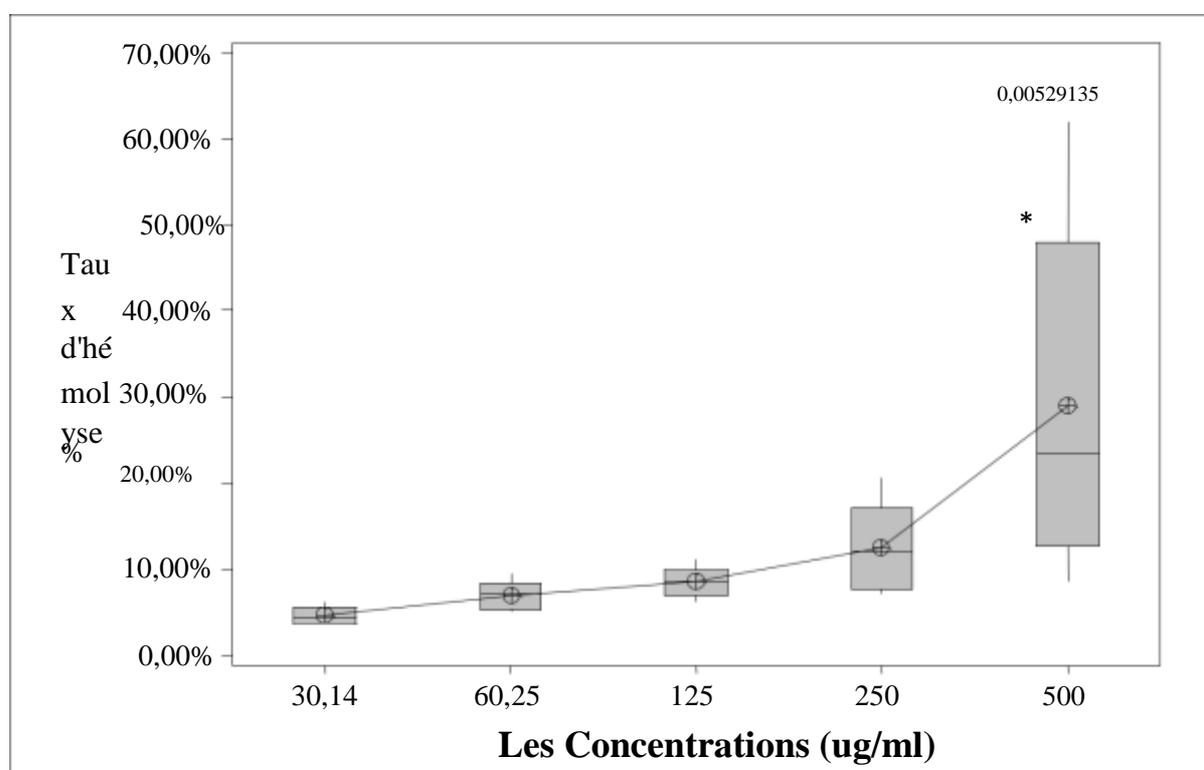


Figure 16 : Boîte à moustache comparant les moyennes des taux d'hémolyse des différentes concentrations d'extrait éthanolique de la parche de café préparé par macération, incubé à 37°C durant 60 min, à 548nm par rapport au blanc (témoin)

D'après les résultats obtenus dans la figure 16, nous enregistrons que les moyennes des taux d'hémolyse présentaient une différence significative ($P=0,00529135$) par rapport au blanc à la concentration de 500 μ g/ml.

Le tableau 6, représente les groupes des moyennes des taux d'hémolyse des concentrations des extraits éthanoliques de la parche de café sèche préparés par macération (500µg/ml, 250µg/ml, 125µg/ml, 60,25µg/ml, 30,14µg/ml).

Tableau 6 : Regroupement d'informations à l'aide de la méthode Tukey

Concentration (ug/ml)	N	Moyenne	Groupes
500	5	28.93%	A
250	5	12.4%	A B
125	5	8.49%	B
60,25	5	6.91%	B
30,14	5	4.62%	B

La comparaison du taux d'hémolyse entre les différentes concentrations avec le test de Tukey montre une dissimilitude entre deux groupe A et B

Le Groupe A est formé par la concentration 500 µg/ml avec un pourcentage du taux d'hémolyse le plus élevé (28.93%) tandis que le groupe B différent de ce dernier est composé par les concentrations 12 µg/ml, 60.25 µg/ml, et 30.14 µg/ml.

La concentration 250 µg/ml prend une position intermédiaire au groupe A et au groupe B, ce qui signifie qu'elle est indifférente à ces deux groupes.

La discussion

Le café occupe une place importante dans la société humaine depuis au moins 1200 années, (**Muriel et Arauz, 2010**). La production mondiale du café engendre des déchets qui sont généralement largués dans l'environnement. Parmi ces déchets, la parche de café est rejetée dans la nature. (**Pujola et al., 2013**).

Notre étude entre dans le cadre de la recherche des activités toxicologiques in vitro. Nous nous sommes intéressés à des extraits éthanoliques de la parche sèche de café afin de contribuer à la valorisation de ces déchets.

Le rendement d'extraction est le rapport de la quantité de substances naturelles extraites par l'action extractive d'un solvant à la quantité de ces substances contenues dans la matière végétale. Il dépend de plusieurs paramètres tels que : le solvant, le pH, la température, le temps d'extraction, la composition de l'échantillon (**Do et al., 2014**), la durée du stockage et de la période de la récolte (**Haddouchi et al., 2016**). Ces facteurs, peuvent conduire à une réduction très significative de certaines molécules (**Ouédraogo et al., 2018**). Les rendements varient d'une méthode d'extraction à une autre et d'une partie de la plante à une autre. Cette différence est expliquée par la diffusion du solvant dans la poudre des plantes dans l'étape de macération et probablement à la nature et la polarité des solvants utilisés pour l'extraction (**Naczk et Shahidi, 2004 ; Barroso et al, 2014**). La macération, consiste à la mise en contact du matériel végétal avec le solvant sans ou avec agitation. Cette procédure, malgré les temps longs d'extraction et l'utilisation d'une quantité considérable de solvants, est relativement peu coûteuse. En plus, elle se déroule à température ambiante ce qui est très positif pour conserver l'intégrité des molécules polyphénoliques (**Spigno et De faveri, 2007; Budic-letoc et al., 2005**).

En général, les rendements les plus élevés sont obtenus avec les solvants polaires tels que l'eau, le méthanol et l'éthanol (**Markom et al., 2007 ; Iloki-Assanga et al., 2015**).

Dans notre étude, nous avons déterminés le rendement d'extraction à partir de la parche de café sèche par la méthode de macération avec le solvant utilisé qui est l'éthanol. Le calcul du rendement d'extraction des polyphénols à partir des extraits éthanoliques de la parche de café sèche nous a permis d'enregistrer un pourcentage de 5%. Cette valeur est en accord avec le travail de (**Mussatto et al., 2011**) sur l'extraction de composés phénoliques antioxydants du marc de café épuisé.

Selon **meliani et al 2019**, Le rendement d'extraction éthanoliques pour la parche fraîche par macération est plus élevé que la parche sèche car au niveau de cette dernière il ya surtout la présence des tanins condensés et les lignanes. Ainsi, le séchage de la parche pourrait provoquer une perte de polyphénols. (5% pour la parche sèche contre 8,8% pour la parche fraîche).

Nos résultats concernant le rendement peuvent être expliquer par l'utilisation combinée de l'eau et du solvant organique qui faciliterait l'extraction des substances chimiques qui sont solubles dans l'eau et / ou dans le solvant organique (**Do et al., 2014**). A cet effet, rappelons que les solvants alcooliques sont capables d'augmenter la perméabilité des parois cellulaires (**Seidel, 2005**).

Le processus d'hémolyse est un phénomène irréversible au cours duquel les hématies sont détruites et libèrent leur contenu. Des facteurs proprement corpusculaires, comme l'état de la membrane, le métabolisme énergétique intracellulaire, la structure de l'hémoglobine, règlent le degré de l'hémolyse (**Aguilar, 2007**). Les globules rouges sont parmi les cellules les plus utilisées dans l'évaluation de la toxicité à cause de leur disponibilité, et la facilité de leur surveillance au cours de la lyse cellulaire grâce à la libération de l'hémoglobine (**Situ et Bobek, 2000**). Les globules rouges sont aussi choisis comme modèle en biologie cellulaire et moléculaire pour l'étude de la cytotoxicité in vitro à cause de leur facilité d'isolement et leurs simplicités. Ils sont un outil précieux pour l'étude des transports ioniques transmembranaires via la membrane érythrocytaire (**Wajemanet al, 1992**). Il existe plusieurs mécanismes de toxicité qui peuvent être liés à l'usage des plantes. Parmi ces derniers, nous distinguons ceux qui provoque l'hémolyse et qui est un état irréversible (**Aguilar-Martinez, 2007**). L'activité hémolytique des extraits à partir des plantes est liée à leur composition chimique et aussi à leurs concentrations (**Costa-Lotufu et al., 2005**).

A travers notre étude nous avons voulu tester la capacité de notre extrait éthanolique de la parche sèche à provoquer la lyse des globules rouges humaines. Selon les résultats obtenus, on constate que l'effet cytotoxique est concentration dépendante.

Ainsi, Nous avons enregistré dans les faibles concentrations de l'ordre de 30,14ug/ml, une activité hémolytique pas très élevés≈ 7%, Cette concentration de **30,14ug/ml µg/mL** semble être la concentration faiblement toxique. C'est

justement dans la faible concentration de l'ordre de 10 µg/ml que l'extrait éthanolique de la parche de café semble avoir la meilleure activité anti-oxydante. En effet, selon (**Cherif Farah et Rahou Sarrah 2019**), les résultats obtenus avec les extraits de la parche de café indiquent une augmentation rapide du pourcentage d'inhibition du DPPH avec les concentrations faibles, puis une stabilisation à une concentration de 0,01mg/ml (soit 10 µg/ml) pour l'extrait éthanolique par macération à froid. Le maximum d'inhibition a été d'ailleurs atteint à 93% avec 10 µg/ml de l'extrait.

Dans notre travail, à la concentration de 250 µg /ml nous avons noté une augmentation remarquable des taux d'hémolyses atteignant 20,7%. Ce taux était trois fois plus important (62,08%) à la concentration de 500 µg /ml. Nos résultats sont équivalents à ceux de (**meliani et al 2019**) qui ont exploré la toxicité hémolytique de l'extrait éthanolique de la parche sèche de café et ont donc enregistré un taux d'hémolyse des GR de 22 % à la concentration de 250 µg/mL et de 70 % à la concentration de 500 µg/ml.

Nos résultats sont aussi plus bas que ceux retrouvés par **Abbassi latifa et al 2019**, qui ont montré dans les faibles concentrations (0.1mg/ml) un taux d'hémolyse s'élevant à 49% pour les extraits éthanoliques de *Pergularia tomentosa* récoltées dans la Wilaya d'El-Oued et préparés par macération. Ainsi dans notre travail, la concentration de **30,14µg/ml µg/mL** semble être la concentration faiblement toxique.

Effectivement, la toxicité des extraits dépend de la concentration et aussi des constituants de ces derniers. D'ailleurs, La parche de café est cytotoxique à la concentration de 1 mg/mL puisqu'elle provoque 100 % d'hémolyse et ne doit donc pas être utilisée à cette concentration (**meliani et al 2019**).

Les travaux antérieurs ont montré que l'extrait éthanolique de la parche de café par macération à froid est riche en flavonoïdes soit soit 0,45 mg EC/g (**Cherif Farah et Rahou Sarrah 2019**).

À forte concentration, parmi les constituants de plantes, les flavonoïdes sont impliqués dans l'oxydation de l'hémoglobine, la perturbation de la structure membranaire et l'augmentation de la conductimétrie et donc l'hémolyse des érythrocytes, en raison d'effets pro-oxydants qu'ils peuvent exercer (**Galati et al., 2002**). Aussi, les érythrocytes sont considérés comme une cible majeure pour les

radicaux libres en raison de la présence à la fois d'une forte concentration membranaire d'acides gras polyinsaturés et du transport d'oxygène associé aux molécules d'hémoglobines actives, qui sont des promoteurs puissants d'espèces réactives de l'oxygène (**Ebrahinzadeh et al., 2009**).

Toujours pour comparer nos résultats par rapport à la littérature, Nous n'avons pas trouvé des recherches sur l'effet hémolytique des extraits de la parche de café mis à part celui de **Meliani et al 2019**. Cependant, les résultats obtenus dans ce présent travail, sont inférieures par rapport à ceux obtenue par **Remanas.2016** qui a marqué un taux d'hémolyse de 6% à la concentration de 500ug/ml de l'extrait d'acétate d'éthyle d'une plante endémique (*Cistanchetinctoria*) récoltées de la wilaya de Bechar.

Dans notre travail, la toxicité hémolytique de l'extraits éthanoliques de la parche sèche de café semble dépendre des constituants de cet extrait, de la dose (la concentration) utilisée et de la durée d'exposition.

CONCLUSION

GENERALE

Conclusion générale :

L'objectif principal de ce travail consiste à l'évaluation de l'activité hémolytique des extraits éthanolique de la parche de café sèche.

Les résultats de ce présent travail démontrent que les extraits éthanoliques de la parche de café sèche ont un rendement de 5%.

Les résultats de l'activité hémolytique montrent que les extraits de la parche sèche possèdent une activité hémolytique importante dans les concentrations élevées 500 µg/ml avec un pourcentage de 62,08%.

Par contre, dans les faibles concentrations 30,14ug/ml, les extraits de la parche possèdent une activité hémolytique pas très élevée avec un pourcentage de 6,36%. Rappelons que la parche de café présente une activité antioxydante importante dans les faibles concentrations .D'ailleurs , elle ne doit pas être considérée comme des déchets mais être utilisée pour l'extraction des molécules bioactives qui peuvent servir comme antioxydants dans le domaine agro-alimentaire, ou cosmétique ou en parapharmacie.

Ce travail reste préliminaire et pas indicatif sur le mécanisme réel par lequel agit cette plante sur les érythrocytes isolés du sang humains. Ces résultats nécessitent d'être amélioré et approfondis, en utilisant d'autres techniques et en réalisant d'autre travaux complémentaires :

- ✚ Evaluer l'effet de la plante sur d'autre modèle cellulaire ;
- ✚ L'identification des principes actifs responsables de la toxicité de la plante ;
- ✚ L'étude de la pompe Na^+/K^+ de la membrane érythrocytaire pour bien identifier et mieux comprendre la cytotoxicité de la plante.
- ✚ Evaluer la toxicité de cette plante, *in vivo*, sur un modèle animal, afin de déterminer les doses létales aigüe et chronique.

LES REFERENCES

A

Abbassi latifa, TOUIL Hadjer(2019). Contribution à l'étude phytochimique de feuilles de *Pergulariatomentosa* L. dans la région d'El-Oued

AguilarM., 2007 : H2- Erythrocytes-MB7 : Hématologie H2 – Faculté de Médecine Montpellier-Nîmes

Almeida, AAP, Naghetini CC, Santos VR, Antonio AG, Fahra A, Glória MBA (2012). Influence of natural coffee compounds, coffee extracts and increased levels of caffeine on the inhibition of *Streptococcus mutans*. *Food Research International*. 49 : 459-461.

Arezki Benali(2015). Café non-conforme aux normes : Quatre producteurs devant la justice, *algerie-eco.com* est un journal d'information indépendant

B

Barrosoa, M.R., Barros, L., Dueñas, M., Carvalho, A.M., Santos-Buelga, C., Fernandes, I.P., Barreiro, M.F. & Ferreira, I.C.F.R., (2014). Exploring the antioxidant potential of *Helichrysum stoechas* (L.) Moench phenolic compounds for cosmetic applications : Chemical characterization, microencapsulation and incorporation into a moisturizer. *IndCrops Prod* 53 :330–336.

Belitz HD, Grosch W, Schieberle P (2009). *Food Chemistry* 4th revised and extended edition. Ger Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 53 : 377-385.

Bismuth, C., Baud, F., Fréjaville, P.P., Garnier, R. (1987). *Toxicologie clinique*. Paris : Flammarion Médecine Sciences. 956p.

Bressani Ricard (1978). Subproductos del Fruto de café, in *Pulpa de café : composición, tecnología, y utilización*, Braham J.E & Bressani R (Eds) INZAP, 9-17.

Bruneton, J. (1987). *Éléments de phytochimie et de pharmacognosie*. Paris : Technique et Documentaire Lavoisier. 345p.

Bruneton, J. (2008) *Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales*. Lavoisier technique & Documentation, 3^{ème} éd., Paris, pp. 1120.

C

Chantel (2015). La production céréalière en Algérie : les principales caractéristiques. Revue.Nature et technologie. 1. pp 45-53.

Cherif Farah et RahouSarrah 2019. Screening phytochimique et valorisation de l'activité antioxydante de l'extrait éthanolique de la parche de café.

Costa-Lotufo L. V., Khan M. T. H., AtherA., Wilke D. V., Jimenez P. C., Pessoa C, Moraes M.O. (2005). Studies of the anticancer potential of plants used in Bangladeshi folk medicine. Journal of Ethnopharmacology. 99(1) : 21-30.

Commission de la santé et sécurité de travail, Québec, 2004). 2eme edition revue et augmentée Depot légal-Bibliothèque nationale du Québec,ISBN 2-551-22538-8.

D

Dalal B. I,Kollmannsberger C. (2005). Drug-induced hemolysis and methaemoglobinaemia in glucose 6-phosphate dehydrogenase deficiency. Br J Haematol; 129-291.

Debry G (1993). Le café et la santé. Paris : John LibbeyEurotext, 560 p

Debry G (1995). Le café. Sa composition, sa consommation, ses incidences sur la santé. Centre de Nutrition Humaine. P 20.

Delaunay, J. (2007). The molecular basis of hereditary red cell membrane disorders. Blood reviews, 21(1), 1-20.

Do, Q. D., Angkawijaya, A.E., LanTran-Nguyen,P., Huynh, L.H., SuryadiIsmadji, F.E., Yi-HsuJu. (2014). Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of Limnophilaaromatic. Journal of Food and Drug Analysis, 22, 296- 302

DrolingKindersley (2005). Les spécialistes des arbres. Ed ; Grund : David Mabberley, p113

E

Ebrahimzadeh M. A., Ehsanifar S., Eslami B. (2009). Sambucusebuluselburensisfruits : A good source for antioxidants. Pharmacognosy magazine, 5(19) :213.

F

Farah A (2006). Donangelo CM. Phenolic compounds in coffee. *Braz J Plant Physiol* ;18 :23–36

FAO (2008). Food and agriculture organization of United Nations

G

Galati G., Sabzevari O., Wilson J. X., O'Brien P. J. (2002). Prooxidant activity and cellular effects of the phenoxyradicals of dietary flavonoids and other polyphenolics. *Toxicology*. 177 (1): 91-104.

Gilles, G. (2004). *Notions de Toxicologie*. Québec : Commission de la Santé et de la Sécurité du Travail du Québec. 67 p.

Gouvea, B.M, Torres, C., Franca, A.S., Oliveira, L.S. and Oliveira, E.S. (2008). Feasibility of ethanol production from coffee husks, *Journal of Biotechnology*, 136, S269.

Guo- Xiang Li et Zai-Qun Lui (2007). The "Double-Faced" Effect of VC-12 on Free-Radical-Induced Haemolysis of Human Erythrocytes :Antioxidant and Prooxidant

Gurbuz N., Yalcin O., Aksu TA., Baskurt O.K. (2004). The relationship between the enzyme activity, lipid peroxidation and red blood cells deformability in hemizygous and heterozygous glucose-6-phosphate dehydrogenase deficient individuals. *Clin Hemorheol Microcirc*; 31: 235-42.

H

Haddouchi, F., Chaouche, T.M. &Halla, N. (2016). Screening phytochimique, activités antioxydantes et pouvoir hémolytique de quatre plantes sahariennes d'Algérie. *Phytothérapie*. pp. 1-9.

Haest, C. W. M. (1982). Interactions between membrane skeleton proteins and the intrinsic domain of the erythrocyte membrane. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Biomembranes*, 694(4), 331-352.

Harborne, J.B., Herbert, B. (1995), Phytochemical Dictionary, A Handbook of bioactive Compounds from plants, Bristol, Taylor & Francis.

Hodge, H.C and Sterner, J.H. 1943. Tabulation of Toxicity Class. American Industrial Hygien Association Quarterly, 10(4) :93-96.

Houessou JK (2007). Les hydrocarbures aromatiques polycycliques dans le café mise au point de méthodes analytiques et étude de l'étape de torréfaction, Thèse de Doctorat, I.S.I.V.E, Paris. 2 :5-11.

I

ICO (2007). International coffee organization. Letter from executive director. Coffee market report.

INFOCOMM(2016). Café. Un profil de produit de base par INFOCOMM Fonds de la CNUCED pour l'information sur les marchés des produits de base agricoles.P3

J

Jean Costentin (2010). Studies of the anticancer potential of plants used in Bangladeshi folk medicine. Journal of Ethnopharmacology. 99(1): 21-30.

Journal officiel de l'Union européenne ; 2008. ACCORD INTERNATIONAL DE 2007 SUR LE CAFÉ

Justin koffi ;2007. Les Hydrocarbures aromatiques polycycliques dans le café: mise en point de méthodes analytiques et étude de l'étape de torréfaction. Thèse de doctorat. Ecole Doctorale ABIES, Laboratoire De Chimie Analytique. Paris

K

Khalid K (2010). Le Café: Marché et tendances. Revue de la filière agroalimentaire. Food magazine. 19: 24-55.

Kumar NS, Hewavitharanage P, Adikaram NKB (1995). Attack on tea by *Xyleborus fornicatus*: Inhibition of the symbiote, *Monacrosporium ambrosium*, by caffeine. Phytochemistry. 40: 1113 -1116.

Kondamodi N., Mohapatra S.K., Misra M. (2008). spent coffee grounds as a versatile source of green energy, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 56 (24), 11757-11760.

L

Lauwerys et al., 2007. Toxicologie industrielle et intoxications professionnelles ;5^{eme} édition.

Leblanc GA., (2010). Acute toxicity: A Textbook of Modern Toxicology. Hoboken, New Jersey. (4) :125-236.

Li (2014). Le Rôle des Polyphénols dans le Vin, le Thé, le Café et le Chocolat. P1

M

MARGARETH VISSER, citation café chocolat, Le journal de FIGARO, 2019

Mahmoudi, S., Khali, M. & Mahmoudi, N. (2013). Etude de l'extraction des composés phénoliques de différentes parties de la fleur d'artichaut (*Cynarascolymus L.*). Revue « Nature & Technologie ». B- Sciences Agronomiques et Biologiques, 35-40.

Marian Chabaud ; 2010. La caffeine. Antenne Médicale de Prevention du Dopage. AMPD LR, pp 1-3

Markom, M., Hasan, M., Daud, W., Singh, H. & Jahim, J. (2007). Extraction of hydrolysable tannins from *Phyllanthus niruri Linn.* : Effects of solvents and extraction methods. Separation Purif. Technol., 52 : 487-496.

Iloki-Assangaet al., 2015. Solvent effects on phytochemical constituent profiles and antioxidant activities, using four different extraction formulations for analysis of *Bucidabuceras L.* and *Phoradendron californicum*

meliani et al 2019 : Etude in vitro des activités biologiques, anti-hémolytiques des extraits de laparche de café.

Michelle J, Martine S.G, Daniel D (2003). Terres De Café, France :Édition Quae. ED1, p120.

Mohan C., 2006: A guide for the preparation and use of buffers in biological systems. EMD, San Diego, California, Calbiochem: 22.

Mounir (2009). Institut Mustapha Gouar, L'excellence du café.

Mussatto et al., 2011 : l'extraction de composés phénoliques antioxydants du marc de café épuisé.

N

Nazck, M., Shahidi, F. (2004). Extraction and analysis of phenolics in food. *J Chromatogram A*. 1054(1-2): 95-111.

Nadim El Ghezal, Celia Sanchez ; 2004. Le Commerce du café. Recherche réalisée dans le cadre du cours de Commerce International. Inidite. Ecole des mines de Nancy.

Natella F, Scaccini C (2001). Coffee drinking influence plasma antioxydant capacity. Reports. 345 : 124-131.

Nordqvist J (2016). Coffee: healthbenefits. Nutritional information. 4: 1-3.

O

OCDE. (1979). Résumé des considérations du rapport des groupes d'experts de l'OCDE sur la Toxicologie à court et à long terme. In : Lignes directrice de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. Paris :OCDE.P. 1-15.

OECD, 2001,Lignes directrice de l'OCDE pour les essais de produits chimiques.

OCDE. (2008). Étude de toxicité orale à dose répétée pendant 28 jours sur les rongeurs. In : Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. Paris : OCDE. P. 1-14.

OCDE. (2009). Études de toxicité chronique. In : Lignes directrice de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. Paris : OCDE.P.1-16.

Ouédraogo et al.,2018,Polygala rarifolia DC., plante faux hôte du *Striga hermonthica* (Del.) Benth

Oliver J. A. (1986).Opportunities for using fewer animals in acute toxicity studies. In *Chemicals Testing and Animal Welfare(The National Chemicals Inspectorate)*. Sweden : Solna.P. 119-142.

Oliveira L.S., Franca A.S., Alves T.M.and Rocha S.D(2008). Evaluation of untreated coffee husks as potential biosorbents for treatment of dye contaminated waters, *Journal of Hazardous Materials*,155,507-512.

Oliveira AL, Cabral FA, Eberlin MN, Cordello HMAB (2009).Sensory evaluation of black instant coffee beverage with some volatile compounds present in aromatic oil from roasted coffee. *Ciência Tecnologia de Alimentos*. 29: 76–80. **OMS (2011)**, (Organisation mondiale de la santé)

Oosterveld A, Harmsen JS, Voragen AGJ, Schol HA (2003).Extraction and characterization of polysaccharides from green and roasted *Coffea arabica* beans. Carbohydrate polymers. 52: 285-269.

P

Pandey, A., Soccol, C.R., Nigan, P. and Soccol, V.T (2000). Biotechnological potential of agro-industrial residues. I : sugarcane bagasse, *Bioresource Technology*, 74 69-80

Parisi F, Stefanatos RK, Strathdee K, Yu Y, Vidal M (2014). Transformed Epithelia Trigger Non-Tissue-Autonomous Tumor Suppressor Response by Adipocytes via Activation of Toll and Eiger/TNF Signaling. *Cell Rep.* 6(5): 855-867.

Philip G. Watanabe, 2000,*Toxicological Sciences*, Volume 53, Issue 1, January 2000, Page 156.

Pietinen P, Aro T, Uusitalo U et Korhonen H (1990). Consumption of boiled coffee is correlated with serum cholesterol in Finland. *International Journal of Epidemiology*, 19(3), pp 586-590

Pino A, Godefroy J (1973). Utilisation des parches de café et coques de cacao en bananeraie. *Fruits.* 28 : 263-269.

PISSC, 1991. Encyclopédie de sécurité et de santé au travail.

R

Ramade, F., 1979. Ecotoxicologie, Ed Masson, Paris, pp. 5.380p

Reichel J., Benecke N., Eckert K. G., Erber B., Golly I. C., Kreppel H., Liebel B., Mukte H., Szinicz L., Zilker T. (2004). Guide pratique de toxicologie. Ed : De Boeck : 04.

Remanas.2016, étude sur l'effet hémolytique de l'extrait d'acétate d'éthyle d'une plante endémique (*Cistanche tinctoria*) récoltées de la wilaya de Bechar.

Ruckebusch, Y. (1981). Physiologie, pharmacologie, thérapeutiques animaux. Paris : Maloine

S

Samir Fadel (2016). Marché du café en Algérie Quand la régulation fait défaut.

Sarni-Manchado&Cheynier (2006).Le Rôle des Polyphénols dans le Vin, le Thé, le Café et le Chocolat. P1

(Scalbert A, Johnson IT, Saltmarsh M. (2005). The American Journal of Clinical Nutrition.

Scalbert A, Johnson IT, Saltmarsh M (2009).Polyphenols:antioxidants and beyond.
American J Clinical Nutrition. 81 : 215-217

Schwartz D., 1992 : Méthodes statistiques à l'usage des médecins et des biologistes.3ème Ed. Paris ; Flammarion medecine-Sciences

Sébahoun, G. (2005). Hématologie clinique et biologique. France :Arnett. 2emEdition.78

Seidel. (2005). Initial and Bulk Extraction. In :Sarker S D, Latif Z and Gray A I.
Naturalproducts isolation. HumanaPress (Totowa), 27-37.

Silabdi S (2010). Extraction, purification et caractérisation d'antioxydants naturels en vue d'une valorisation nutritionnelle. Thèse de Magistère. Université Saad Dahlab –Blida. p64

Situ H., Bobek L. A. (2000).*In vitro* assessment of antifungal therapeutic potential of salivary histatin-5, two variants of histatin-5, and salivary mucin (MUC7) domain 1. Antimicrobial agents and chemotherapy; 44(6) :1485-1493.

Spigno, G., Tramelli, L. et De Faveri, D.M. (2007). Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. Journal of Food Engineering, 81 : 200-208.

V

Vantal. A (1999). Le café précieux. France : Robert Laffont, 1, pp 36- 68.

Viani.R(1993). The composition of coffee. In : S. Garattini Ed. Caffeine, Coffee and Health.RavenPress. 1, pp 17-41.

Viala A et Botta A. 2005.Notions sur la toxicologie. In :Toxicologie. 2nd ed.Lavoisier(Paris) ,1026-1037.

Viau, C.andTardif,R.(2003). Toxicologie. In : Environnement et sante publique-fondements et pratiques. Paris.119-143.

W

Wajeman h., Lantz B., Girot R. (1992). - les maladies du globule rouge. - 2e edition ; Paris
:Inserm

Y

Younes (2019). Café non-conforme aux normes : Quatre producteurs devant la justice,algerie-eco.com est un journal d'information indépendant

Z

Zbinden, G et Flury-Roversi, M. 1981. Significance of the LD50-test for the toxicological evaluation of chemical substances. Arch Toxicol, 47:7799.