

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique

Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou



Faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques

Département de Biochimie-Microbiologie

MÉMOIRE DE FIN D'ETUDES

En vue de l'obtention du diplôme de Master en Sciences Biologiques

Spécialité : Microbiologie Appliquée

Thème

**Caractérisation physicochimique, phyto-chimique et
biologique du café vert « *Coffea canephora* »**

Soutenu le : 13 / 07 / 2023

Réalisé par :

M^{elle} INGRACHEN Baya

M^{elle} HASSAINE Sarah

Devant les membres de jury :

Président : Melle ASMANI K.

Maitre de conférences A. UMMTO.

Examineur : Mr YEZID H.

Maitre de conférences A. UMMTO.

Promoteur : Mme BENAZZOUZ K. Maitre de conférences B. UMMTO.

Année universitaire : 2022 / 2023.

(Remerciements)

Avant tout, nous tenons à adresser toute notre reconnaissance au bon Dieu le tout puissant pour nous avoir guidées, donné la force et la patience, inspirées et accompagnées dans ce périple intellectuel.

À notre promotrice, M^{me} Benazzouz Kinza Maître de conférence 'B' à l'UMMTO, nous souhaitons vous témoigner notre profonde gratitude pour votre encadrement remarquable, votre patience et votre expertise ont été d'une aide inestimable pour mener à bien ce modeste travail de recherche. Vos conseils éclairés et votre dévouement exemplaire ont grandement contribué à l'aboutissement de notre mémoire. Nous vous remercions du fond du cœur pour votre confiance en nous.

Nous tenons également à exprimer toute notre gratitude envers M^{elle} Asmani K., Maître de conférence 'A' à l'UMMTO, qui a accepté d'être présidente du jury. Nos sincères remerciements vont également à M^r Yezid H., Maître de conférence 'A' à l'UMMTO, pour avoir consacré son temps et pour avoir accepté d'examiner ce mémoire.

Un grand merci également aux ingénieurs des laboratoires de physico-chimie et de microbiologie, qui ont mis à notre disposition leur précieux savoir-faire et leur expertise technique. Leur collaboration a été d'une importance capitale pour le succès de nos expériences et la validité de nos résultats.

À M^r Houali K., notre cher professeur et à tous nos autres enseignants à l'UMMTO, votre passion et votre expertise dans votre domaine d'enseignement ont été une source d'inspiration constante pour nous, vos cours étaient toujours intéressants et captivants, et vous avez su transmettre vos connaissances avec clarté et enthousiasme.

À nos chers parents, frères et sœurs, nous ne saurons trouver les mots justes pour exprimer à quel point votre amour, vos encouragements et votre soutien moral ont été indispensables. Votre confiance en nous nous a donné l'énergie nécessaire pour persévérer et aller jusqu'au bout de ce travail.

Nous tenons à remercier tous nos amis et toutes les personnes qui ont partagé notre vie pendant ces années d'études. Votre présence chaleureuse, vos encouragements incessants et votre bienveillance ont été un souffle d'optimisme et de positivité. Chacun(e) d'entre vous, par votre amitié sincère et votre soutien constant, a largement contribué à faire de cette expérience académique un moment enrichissant et mémorable. Vous avez notre gratitude éternelle.

Notre mémoire de fin d'études témoigne non seulement de nos efforts et de notre engagement, mais aussi de l'ensemble des personnes qui nous ont entourées et soutenues. Chacun(e) d'entre vous a joué un rôle essentiel dans cette réussite, et je souhaite que ces mots sincères expriment à quel point votre aide a été précieuse.

Avec toute notre gratitude,

(**Dédicaces**)

Je dédie ce modeste travail,

À la mémoire de mon cher père Hamid, Dieu lui fasse miséricorde, ton absence me pèse chaque jour mais je suis reconnaissante pour tout ce que tu m'as apporté. Que Dieu le tout puissant t'accueille dans son vaste paradis.

À ma force, mon soutien inconditionnel, ma très chère mère Dahbia. Tu as toujours cru en moi et en mes rêves. Ta persévérance, ta bienveillance et ton dévouement sont le socle sur lequel je me suis construite. Tes sacrifices ont fait de moi l'individu que je suis aujourd'hui et tes prières m'ont poussée de l'avant.

À mes frères Rahim, Lounes et Mehdi, vous êtes mes éternels compagnons de route, mes protecteurs. Votre présence fraternelle a été un pilier solide tout au long de ma vie. Je suis fière de vous avoir comme frères.

À mes sœurs Ghenima, Neila et Sandra, vous avez été mes confidentes, mes alliées et mes inspirations. Votre courage, votre intelligence et votre amour m'ont toujours impressionnée et motivée à aller plus loin. Je vous suis éternellement reconnaissante pour votre présence dans ma vie.

À tous les membres de ma très chère famille, votre amour et votre soutien ont été inestimables. Chaque instant passé avec vous est une source d'amour et de joie infinie. Merci d'avoir touché ma vie de votre présence bienveillante et aimante.

À mes meilleures amies Helena et Célia, vous êtes plus que des amies, vous êtes comme mes sœurs. Nos rires, nos souvenirs et nos moments de complicité resteront gravés à jamais dans mon cœur. Je suis honorée de vous avoir à mes côtés.

À mon amie Baya, avec qui j'ai eu l'honneur de travailler et de partager cette belle expérience, pour ta patience, ta tolérance, ton intelligence, et pour nos moments inoubliables qu'on a affronté ensemble toute cette période.

Enfin, à toutes les personnes que j'aime, vous êtes nombreux à occuper une place spéciale dans ma vie. Pour votre présence, votre soutien moral et votre encouragement. Que vous soyez amis proches ou êtres chers, je vous exprime ma gratitude profonde.

Merci du fond du cœur à tous ceux qui ont été présents à mes côtés. Cette dédicace vous appartient autant qu'à moi.

Sarah

(**Dédicaces**)

Je dédie ce modeste travail,

À mon père Mahfoud et ma mère Fatima, je veux exprimer toute mon admiration pour l'amour et le soutien incommensurables qu'ils m'ont prodigué tout au long de mon parcours. Leur présence bienveillante et leurs encouragements sans faille ont été le moteur de ma réussite. Ils ont été les gardiens de mes rêves, m'insufflant la force nécessaire pour conquérir les sommets académiques. Puissent-ils se réjouir aujourd'hui de voir l'incroyable femme d'intelligence et de détermination que je suis devenue.

À mon frère Belaid et à mes sœurs Kahina, Sonia et Wissem, je veux témoigner de l'admiration que j'éprouve envers cette fratrie exceptionnelle, vous êtes mes piliers, une source d'inspiration les uns pour les autres, une famille soudée où le soutien et l'encouragement sont innés. Votre union a été une force motrice tout au long de mon parcours, me poussant toujours à donner le meilleur de moi-même. Puissiez-vous continuer à vous élever mutuellement vers de nouveaux sommets et à partager les joies de vos réussites.

À mes nièces Basma, Alaa, Alicia, Nada et Céline, ainsi qu'à mon petit neveu Racime, leur présence joyeuse et leur innocence ont apporté une dose de bonheur et de motivation supplémentaire à mon parcours. Puissent-ils être inspirés par mon exemple et réaliser leurs propres rêves avec passion et détermination.

À mes chères amis Lydia, Assia, Chemseddine ainsi qu'à tous mes cousins et cousines pour leur présence constante, leur soutien indéfectible et leurs encouragements inépuisables. Leur amitié précieuse m'a donné la force et la confiance nécessaires pour avancer et surmonter tous les obstacles. Que votre amitié perdure et continue à vous enrichir mutuellement au long de votre vie.

À ma binôme extraordinaire Sarah, ta passion, ton intelligence et ton engagement sans faille ont façonné notre parcours ensemble. À travers les défis que nous avons surmontés et les succès que nous avons célébrés, ta rigueur, ton optimisme et ta créativité ont été des atouts précieux.

Je veux adresser un hommage particulier à toute personne qui a contribué à cette réussite de près ou de loin.

Baya

Résumé

Le café vert appartenant à la famille des *Rubiaceae*, est d'origine africaine. Il est produit largement dans l'hémisphère sud du globe terrestre, en particulier *Coffea arabica* et *Coffea canephora* sont les deux espèces les plus consommées dans le monde. Le but de cette étude est d'explorer les caractéristiques physico-chimiques, phytochimiques et les activités biologiques des grains du café vert robusta (*Coffea canephora*).

Les grains de café vert ont une faible teneur en eau (8.50%), un pH acide (4.63), une acidité de (6.03%) et une teneur en cendres de (5.69%). De plus, des composés secondaires tels que les tannins, les tannins galliques, les glucosides et les coumarines ont été identifiés dans l'extrait étudié par le screening phytochimique.

Le résultat du dosage des sucres a donné une teneur en sucres totaux de 3.63g/mL et 0.64g/mL pour les sucres réducteurs.

L'extraction aqueuse a donné un rendement de 28.1%, qui a montré une teneur en polyphénols totaux importante, elle est de l'ordre de 64.54 ± 0.14 mg EAG/g MS.

L'évaluation de l'activité antibactérienne de l'extrait aqueux a montré un effet inhibiteur sur la croissance de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ainsi que *Escherichia coli* ATCC 25922 expliqué par l'apparition des zones d'inhibition de 20 mm et 12 mm de diamètre respectivement. En effet, *S. aureus* est avérée être plus sensible que *E. coli*.

Quant à la détermination de l'activité antibiofilm contre *S. aureus* ATCC 2592, a révélé des résultats positifs pour l'extrait aqueux (pur et dilué), traduits par l'apparition des zones d'inhibition de 18 mm (pur) et 12 mm (dilué) de diamètre, ce qui signifie le pouvoir antiadhésif des composés de la plante.

Mots clés : Café vert, métabolites secondaires, biofilms, extrait aqueux, activité antibactérienne, activité antibiofilm.

Abstract

Green coffee, a member of the Rubiaceae family, is of African origin and is widely produced in the southern hemisphere of the globe, with *Coffea arabica* and *Coffea canephora* being the two most widely consumed species worldwide. The aim of this study is to explore the physico-chemical and phytochemical characteristics and biological activities of Robusta green coffee beans (*Coffea canephora*).

Green coffee beans have a low water content (8.50%), an acid pH (4.63), an acidity of (6.03%) and an ash content of (5.69%). In addition, secondary compounds such as tannins, gall tannins, glucosides and coumarins were identified in the extract studied by phytochemical screening.

The result of the sugar assay gave a total sugar content of 3.63g/mL and 0.64g/mL for reducing sugars.

Aqueous extraction yielded 28.1%, showing a high total polyphenol content of 64.54 ± 0.14 mg EAG/g MS.

Evaluation of the antibacterial activity of the aqueous extract showed an inhibitory effect on the growth of *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *Escherichia coli* ATCC 25922, explained by the appearance of inhibition zones 20 mm and 12 mm in diameter respectively. In fact, *S. aureus* proved to be more sensitive than *E. coli*.

Determination of antibiofilm activity against *S. aureus* ATCC 2592 revealed positive results for the aqueous extract (pure and diluted), reflected by the appearance of inhibition zones 18 mm (pure) and 12 mm (diluted) in diameter, signifying the anti-adhesive power of the plant's compounds.

Keywords: Green coffee, secondary metabolites, biofilms, aqueous extract, antibacterial activity, antibiofilm activity.

Liste des Figures

Figure 01 : Arbuste du café (caféier)	4
Figure 02 : Structure de la graine du caféier	5
Figure 03 : Cartographie des pays producteurs du café	7
Figure 04 : Présentation des grains de café vert.....	11
Figure 05 : Acide benzoïque	14
Figure 06 : Acide hydroxycinnamique.....	14
Figure 07 : Étapes de la formation du biofilm bactérien.....	21
Figure 08 : Graines de café vert	25
Figure 09 : Protocole d'extraction aqueuse à 10 %.....	34
Figure 10 : Schéma récapitulatif du protocole de dosage des polyphénols totaux	36
Figure 11 : Gamme d'étalonnage de l'acide gallique	37
Figure 12 : Revivification et repiquage des souches bactériennes.....	38
Figure 13 : Repiquage des souches bactériennes	39
Figure 14 : Rouge Congo Agar	42
Figure 15 : Rendement en extrait sec	50
Figure 16 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique	51
Figure 17 : Sélection des souches formatrices des biofilms.....	56

Liste des tableaux

Tableau I : Caractéristiques du café arabica et du café robusta.....	6
Tableau II : Principales classes des composés phénoliques	12
Tableau III : Présentation des principales classes des flavonoïdes	15
Tableau IV : Composés bioactifs du café vert et leurs effets sur la santé humaine.....	19
Tableau V : Étapes de la formation du biofilm bactérien	22
Tableau VI : Maladies des différents systèmes corporels associées aux biofilms et organes affectés	23
Tableau VII : Matériel utilisés (appareillage, solvants, réactifs chimique et milieux de culture)	26
Tableau VIII : Souches bactériennes testées	27
Tableau IX : Préparation de la gamme de dilution de l'acide gallique.....	37
Tableau X : Résultats des tests physicochimiques caractérisant le café vert.....	44
Tableau XI : Résultats du screening phyto-chimique de <i>Coffea canephora</i>	46
Tableau XII : Résultats du rendement en extrait sec de la poudre de café vert robusta....	50
Tableau XIII : Caractéristiques morphologiques des bactéries testées	53
Tableau XIV : Résultats de l'activité antibactérienne de l'extrait de la plante	54
Tableau XV : Formation de biofilm sur milieu RCA	56
Tableau XVI : Résultats de l'activité antibiofilm de l'extrait aqueux de la poudre de café vert robusta	57

Liste des abréviations

ICO : Organisation Internationale du Café.

COVID-19 : Coronavirus Disease 2019.

ATCC : American Type Culture Collection.

PPT : Polyphénols Totaux.

XIX^e siècle : Dix-neuvième siècle.

ACG : Acides Chlorogéniques.

Vitamine B1 : Thiamine.

Vitamine B3 : Niacine.

3-di AQC : Acide 3-di-caféoylquinique.

AQC : Acide caféoylquiniques.

AQF : Acide féruloyquiniques.

ADN : Acide Désoxyribose Nucléique.

ROS : Espèces Réactives de l'Oxygène.

Radiations UV : Radiations ultra-violet.

EPS : Substances Polymériques Extracellulaire.

NaOH : Hydroxyde de Sodium.

N : Normal (normalité).

HCl : Acide chlorhydrique.

CH₃COONa : Acétate de Sodium.

FeCl₃ : Chlorure de fer.

H₂SO₄ : Acide sulfurique.

FCR : Folin-Ciocalteu.

BHIB : BRAIN HEART INFUSION BROTH (Bouillon cœur-cervelette).

RCA : Rouge Congo Agar.

MH : Muller Hinton.

DO : Densité Optique.

UFC : Unité formant des colonies.

EAG : Équivalent d'Acide Gallique.

Résumé

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Sommaire

Introduction..... 1

Partie I : Synthèse bibliographique

Chapitre I : Présentation du café vert

I.1. Description et classification taxonomique	3
I.1.1. Classification botanique.....	3
I.1.2. Description de la plante.....	4
I.2. Café et ses variétés.....	5
I.2.1. Arabica.....	5
I.2.2. Robusta	6
I.3. Répartition géographique et production mondiale.....	6
I.4. Composition chimique des grains de café vert	7
I.5. Microflore du café vert	9
I.6. Techniques permettant d'obtenir les grains du café vert	10

Chapitre II : Métabolites secondaire et leurs propriétés biologiques

II.1. Polyphénols	12
II.1.1. Classification des polyphénols	12
II.1.2. Acides phénoliques.....	13
II.1.2.1. Acides hydroxybenzoïques.....	13
II.1.2.2. Acides hydroxycinnamiques.....	14
II.1.2.2.1. Acides chlorogéniques.....	14
II.1.3. Flavonoïdes.....	15
II.1.4. Tannins	16
II.1.4.1. Tannins hydrolysables	16
II.1.4.2. Tannins condensés.....	16
II.2. Alcaloïdes	17
II.3. Effets bénéfiques des métabolites secondaires du café	17
II.3.1. Activité antioxydante.....	17

II.3.2. Activité anticancéreuse	18
---------------------------------------	----

Chapitre III : Généralités sur les biofilms bactériens

III.1. Description des biofilms bactériens	20
III.2. Formation des biofilms bactériens	20
III.2.1. Processus de formation des biofilms bactériens.....	20
III.3. Maladies liées aux biofilms bactériens.....	23
III.4. Impact des biofilms sur la résistance aux antibiotiques	24

Partie II : Étude expérimentale

Chapitre I : Matériel et méthodes

I.1. Matériel	25
I.1.1. Matériel végétal.....	25
I.1.2. Matériel du laboratoire.....	25
I.1.2.1. Appareillage et réactifs	25
I.1.2.2. Matériel biologique	26
I.2. Méthodes.....	27
I.2.1. Analyse physicochimique	27
I.2.1.1. Caractérisation physicochimique de la poudre du café vert robusta (<i>Coffea canephora</i>)	27
I.2.1.2. Analyse phyto-chimique de la poudre de café vert robusta (<i>Coffea canephora</i>)	30
I.2.1.3. Dosage des sucres	32
I.2.1.4. Détermination de la teneur en polyphénols totaux.....	34
I.2.2. Partie microbiologique.....	37
I.2.2.1. Évaluation de l'activité antibactérienne	37
I.2.2.2. Sélection des bactéries formatrices des biofilms	42
I.2.2.3. Évaluation de l'activité antibiofilm	43

Chapitre II : Résultats et discussion

II.1. Résultats des paramètres physicochimiques de la poudre du café vert (<i>coffea canephora</i>)	44
II.2. Résultats de l'analyse phyto-chimique de la poudre du café vert robusta (<i>Coffea canephora</i>)	45
II.3. Résultats du dosage des sucres et discussion.....	49
II.4. Résultats d'extraction et du dosage des polyphénols totaux	50
II.4.1. Rendement en extrait sec	50

II.4.2. Résultats du dosage des polyphénols totaux.....	51
II.5. Résultats de l'évaluation de l'activité antibactérienne	53
II.5.1. Résultats de la vérification de la pureté des souches.....	53
II.5.2. Résultats de l'aromatogramme	53
II.6. Sélection des souches formatrices des biofilms.....	55
II.7. Résultats de l'évaluation de l'activité antibiofilm	56
Conclusion.....	59
Références bibliographiques	61

INTRODUCTION

De nos jours, le café occupe une place prépondérante dans l'économie mondiale, étant parmi les principales denrées agricoles échangées en volume et la deuxième matière première commerciale après le pétrole. Chaque année, sa production mondiale dépasse les 8 millions de tonnes (**Obruca et al., 2014**). Les espèces les plus importantes de *Coffea* sont *Coffea arabica* et *Coffea canephora* ou *robusta* (**ICO, 2013**).

Les grains de café verts sont les graines non torréfiées des fruits du caféier (*Coffea*) et sont riches en composés bioactifs tels que l'acide chlorogénique, la caféine et la trigonelline (**Liczbiński et al., 2022**). Ils renferment des polysaccharides insolubles tels que la cellulose, les hémicelluloses, des sucres tels que le galactose, l'arabinose, le fructose, le glucose, la raffinose, etc. Ils contiennent également des acides aliphatiques non volatils tels que l'acide citrique, malique, quinique, ainsi que des acides volatils tels que l'acide acétique, propanoïque, butanoïque, hexanoïque et décanoïque. Des lipides, des protéines et des acides aminés, des minéraux ont été signalés (**Gonzalez-Rios et al., 2007 ; Naidu et al., 2008**). Leur composition chimique dépend de facteurs intrinsèques tels que l'espèce et le degré de maturation, ainsi que de facteurs extrinsèques tels que le climat et la composition du sol (**Babova et al., 2016**). Les propriétés biologiques des grains de café dépendent des caractéristiques de ces composés bioactives (**Shahidi et al., 2010**).

Des études suggèrent que la consommation du café vert a un effet bénéfique sur la résistance à l'insuline, réduisant ainsi le risque de diabète et de maladies cardiovasculaires, en plus d'avoir des effets anticarcinogènes et même une activité contre la COVID-19 (**Liczbiński et al ; 2022., Pimpley et al., 2022**) et d'autres ont révélé qu'ils possèdent une activité antibactérienne à l'égard de différentes espèces bactériennes, qu'elles soient de type Gram positif ou Gram négatif (**Nebesny et al., 2003**).

Le biofilm est le mode de croissance prédominant des bactéries dans la plupart des environnements naturels, industriels et cliniques. Les biofilms sont généralement constitués de populations de cellules multicellulaires densément emballées, de différentes espèces, enfermées dans une matrice polymérique auto-synthétisée et attachées à un tissu ou à une surface (**Rendueles et al., 2013**). Divers modèles bactériens sont utilisés afin d'étudier la formation des biofilms, tel que *Staphylococcus aureus* (**O'Gara et al., 2007**), *Bacillus subtilis* (**Stanley et al., 2005 ; Branda et al., 2006**) et *Pseudomonas aeruginosa* (**Friedman et al., 2004**) aussi *Escherichia coli* est la bactérie formant le plus de biofilms, avec une diversité génétique des souches microbiennes (**Ahmed et al., 2017 ; Céspedes et al., 2017**). Des preuves s'accroissent selon lesquelles les biofilms contribuent à la pathogenèse, en particulier dans les infections

chroniques (**Bjarnsholt, 2013**) en rendant les bactéries plus difficiles à éliminer et plus résistantes aux antibiotiques (**Cepas *et al.*, 2019**).

Ce présent travail est consacré à l'analyse physico-chimique, phyto-chimique et à l'évaluation de l'activité antibactérienne et antibiofilm de l'extrait aqueux des grains de café vert (*Coffea canephora* dit *robusta*) qui sont avérés avoir des propriétés biologiques bénéfiques.

Dans ce contexte, nous avons divisé notre travail en deux parties :

- ✓ La première partie est consacrée à une synthèse bibliographique relative à la plante étudiée, aux métabolites secondaires et aux biofilms.

- ✓ La deuxième partie est l'étude expérimentale, elle est basée sur :
 - La détermination des caractères physico-chimiques.
 - Screening phyto-chimique de ses principales substances bioactives.
 - Extraction des composés phénoliques de la plante.
 - Dosage des polyphénols totaux.
 - Étude de l'activité antibactérienne et antibiofilm de l'extrait.
 - Discussion des résultats obtenus.

Enfin, ce travail se termine par une conclusion et quelques perspectives.

PARTIE I

SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I
PRÉSENTATION DU CAFÉ VERT

Le café est l'un des produits les plus populaires consommé dans le monde, est parmi les produits alimentaires les plus importants d'un point de vue économique. Le « café » vient du mot arabe "Cahouah" ou « Qahwah » qui désignait cette boisson. Il se transforma ensuite en "qahvè" en turc puis en "caffè" en italien, d'où le terme français de "café" qui est apparu vers 1600. En France, on emploie familièrement l'argot caoua, dérivée de l'arabe d'Algérie et reprise par les militaires au XIX^e siècle. Comme tout le monde le sait le café est une boisson psychoactive obtenue à partir des graines du caféier (**Michelle *et al.*, 2003**).

I.1. Description et classification taxonomique

I.1.1. Classification botanique

Aujourd'hui, il existe environ 80 espèces différentes dans le genre *Coffea*, seulement deux espèces sont intéressantes pour la production du café, il s'agit du *Coffea arabica* et *Coffea robusta* (**Guyhaler, 2013**). Selon Bouden et Kadri (2019), la classification botanique de cette plante est comme suite :

Règne : Plantae

Division : Angiospermae

Classe : Dicotyledonae

Sous-Classe : Euasterids

Ordre : Gecianales

Famille : Rubiaceae

Sous-famille : Ixoroideae

Genre : *Coffea*

I.1.2. Description de la plante

L'arbuste tropical du café (Figure 01), appartenant à la famille botanique des Rubiaceae (**Benmedjahed, 2017**), peut atteindre une hauteur de 10 à 12 mètres (**Champéreaux, 1991**).

Le caféier se compose des éléments suivants :



Figure 01 : Arbuste du café (caféier) (Houessou, 2007)

• Partie souterraine (les racines)

Les racines du caféier comprennent un pivot court d'environ 40 à 50 cm, d'où partent des racines axiales plus profondes pouvant atteindre 1,20 mètres ou plus. Ces racines assurent l'approvisionnement en eau de l'arbuste.

• Partie aérienne

- Tronc : Les caféiers peuvent être uniques, c'est-à-dire avoir un seul tronc (« unicaule »), ou multiples (« multicaule »), selon les espèces et l'origine du caféier.
- Collet : C'est la zone intermédiaire entre les racines et le tronc, et elle est particulièrement sensible chez les jeunes caféiers.
- Branches : Elles sont longues et fines, orientées plus ou moins horizontalement et se présentent par paires opposées. Elles peuvent donner naissance à des rameaux secondaires, voire tertiaires.

- Fleurs : Les fleurs du caféier sont blanches, de petite taille, avec un parfum rappelant celui du jasmin. Elles sont regroupées par 15 à 30 fleurs formant des "glomérules" (Benmedjahed, 2017). Lorsque la fleur est fécondée, elle se transforme en un fruit appelé communément "cerise" en raison de sa forme ronde. Sa couleur évolue lentement du vert clair au rouge vif au fur et à mesure de sa maturation. Le temps nécessaire pour que le fruit se développe de la floraison à la maturation est d'environ 10 à 11 mois.
- Grains : Souvent appelés "fèves", les grains de café ont une couleur grise et sont composés d'un albumen corneux à la surface lisse. Ils présentent une face creusée par un sillon et renferment un petit embryon comprenant une radicule et deux cotylédons. Les grains de café de la variété robusta mesurent entre 8 et 16 mm de longueur et pèsent de 0,10 à 0,15 g (Figure 02) (Champéreaux, 1991).

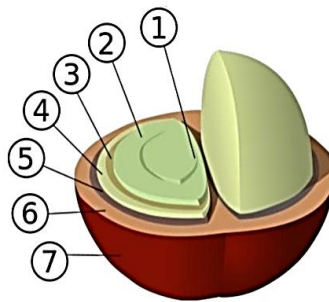


Figure 02 : Structure de la graine du caféier (Pierre Massia *et al.*, 1995)

1 : sillon central. 2 : grain de café (endosperme). 3 : peau du grain (tégument). 4 : parchemin (endocarpe). 5 : couche de pectine. 6 : pulpe (mésocarpe). 7 : peau du fruit (exocarpe).

I.2. Café vert et ses variétés

Le café vert est tout simplement le café qui ne subit pas la torréfaction (la cuisson), il est dit non torréfié, il est constitué par plusieurs espèces, dont chacune possède des variétés différentes, certaines sont commercialisables et d'autres sont sauvages non commercialisables. On distingue les deux variétés commercialisées les plus répandues dans le monde :

I.2.1. Arabica

C. arabica, qui trouve son origine en Afrique de l'Est (principalement en Éthiopie), a été introduit en Amérique latine en 1720, sur la base d'un très petit nombre de plants, ce qui a entraîné un effet fondateur substantiel (Anthony *et al.*, 2002 ; Scalabrin *et al.*, 2020). Elle comporte les variétés à croissance verticale (maximum 10m), comme l'arabica bourbon, typica, mondo novo, etc, et à croissance horizontale (maximum 3m) dont arabica caturra, catusi, cotimol, etc Le café arabica pousse à des altitudes situées entre 600 et 2000m parce qu'elle est

délicate et difficile à cultiver. On dit que cette espèce est autogame, son grain est gros, allongé et plat (**Anonyme** ⁽¹⁾).

2.2. Robusta

Est une variété de l'espèce *Coffea canephora* qui contient plusieurs autres variétés dont seulement cinq sont comestibles (**Cambrononi, 1989**). Cette plante est caractérisée par la croissance rapide et par un bon rendement. Elle résiste à la chaleur et aux parasites plus que l'arabica. Cette variété se cultive à des altitudes d'environ 700m dans les régions tropicales d'Asie et d'Afrique.

Le tableau I montre les principales différences entre le café arabica et le café robusta.

Tableau I : Caractéristiques du café arabica et du café robusta (**Franca et Oliveira, 2019 ; Hecimovic et al., 2011**).

Paramètres	Arabica	Robusta
Nom botanique	<i>Coffea arabica</i>	<i>Coffea canephora</i>
Date de description de l'espèce	1753	1895
Altitude de culture	1000 à 2000m	0 à 700m
Température	15 à 24°C	20 à 30°C
Pluviométrie	1500 à 2000mm	2000 à 3000mm
Forme	Plate	Ovale
Délai floraison-récolte	9 mois	10 à 11 mois
Teneur en caféine	0,8 à 1,4%	1,7 à 4%
Première floraison	4 à 5ans	2 à 3ans

I.3. Répartition géographique et production mondiale

Étant un végétal tropical, le caféier aime et préfère les régions chaudes et humides dont les températures se situent entre 18° et 22°C. Cet arbuste serait originellement né en Afrique.

Le café est principalement cultivé dans l'hémisphère sud du globe terrestre avec un peu plus de 70 pays africains, asiatiques, et en Amérique du sud et centrale (Figure 03).

Coffea arabica représente 60% de la production mondiale, Tandis que *Coffea canephora* 40%.

- **Alcaloïdes** : La caféine étant le principal, c'est un composant majeur du café, elle est dérivée de la purine qui est une poudre blanche caractérisée par un goût amer sans odeur et une faible solubilité dans l'eau. C'est une substance chimique, un alcaloïde de la famille des xanthines. Sa formule chimique est 1, 3, 7-triméthylxanthine. Sa teneur dans les grains dépend de la variété du café, elle est plus élevée dans le robusta (1,2 à 3,3%) que dans l'arabica qui est de 0,9 à 2,1% (**Martin et al., 1998**). Il faut savoir que le café contient aussi d'autres alcaloïdes dont la bétanine, la choline et la trigonelline (**Coste, 1989**).
- **Acides** : L'une des caractéristiques majeures du café « l'acidité », ce qui lui confère une saveur d'amertume. Le pH moyen des grains du café vert est de l'ordre de 5.5 (**Francaet al., 2005**). Différents types d'acides provoquent cette acidité, dont les principaux sont les acides chlorogéniques (ACG), qui sont des esters phénoliques de l'acide quinine et des acides transcinnamiques, notamment les acides caféoylquinines constituent la fraction des ACG la plus abondante, environ 80% dans l'arabica et 76% dans le robusta (**Xiuju et Loong-Tak, 2015**).
- **Protéines** : Sont essentiellement des protéines de stockage 11S, représentent à peu près 8,5 à 12% des grains de café vert. Elles sont constituées par une quantité soluble et une quantité non soluble dans l'eau, dont la fraction n'est pas très variée. Les protéines solubles dans l'eau incluent les globulines (85%) et les albumines (15%) (**Xiuju et Loong-Tak, 2015**). Il a été démontré que les acides aminés présents dans le café vert sont liés aux protéines, tandis que la fraction libre ne représente qu'environ 5% du total, avec une teneur plus élevée pour le robusta que pour l'arabica (**Hiramoto et al., 1998**).
- **Glucides** : Ils représentent quasiment 48 à 60% de la matière sèche du café vert. Ils sont plus abondants dans le café arabica que dans le café *canephora*. Ils sont constitués de glucides solubles cytoplasmiques, on cite les monosaccharides, les oligosaccharides et les polysaccharides et des glucides non solubles constitutifs des parois végétales qui sont l'hémicellulose et holocellulose (**Oosterveld et al., 2003 ; Carrera et al., 1998**).
- **Lipides** : Le café a une teneur élevée en lipides, elle est d'environ 16% pour l'arabica et 11% pour le robusta (**Martin et al., 1998**).
- **Vitamines** : Le café contient les vitamines B1, C et la vitamine B3 (**Silabdi, 2010**).
- **L'eau** : La proportion d'eau contenue dans le café vert est variable, elle dépend des traitements par lesquelles sont passés les fruits mûrs (**Poisson, 1979**).

- **Minéraux** : La teneur en cendres du café vert est d'environ 3 à 5,4% de la matière sèche (López-Martinez *et al.*, 2006). Cette matière minérale comprend principalement du potassium : 1.63 à 2%, du magnésium : 0,16 à 0,31%, du sulfate : 0,13%, calcium : 0,07 à 0.035% et du phosphate : 0.13 à 0.22% (Inoue *et al.*, 1998). La majorité de ces minéraux sont hydrosolubles (Debryet *et al.*, 1995).

I.5. Microflore du café vert

La présence d'humidité dans la pulpe encourage la croissance de la microflore (Roussos *et al.*, 1995), tandis que la composition biochimique de son tissu mucilagineux en fait un excellent substrat (Avallone, 2001b). La microflore se compose de bactéries saprophytes provenant du fruit, du sol, de l'eau et des équipements utilisés.

Les traitements post-récolte ont un impact sur la composition des populations microbiennes. D'après l'étude de Silva *et al.* (2000), plus de 764 souches microbiennes ont été isolées à partir de grains de café traités par voie sèche. La microflore la plus abondante lors de ce traitement était composée de bactéries, suivie de champignons et de levures.

Parmi ces isolats étudiés, 164 étaient des bactéries Gram négatif identifiées comme appartenant aux genres *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Enterobacter* ou *Serratia*. 191 isolats de bactéries Gram positif appartenant aux genres *Bacillus*, *Cellulomonas*, *Arthrobacter*, *Microbacter*, *Brochothrix*, *Dermobacter* et *Lactobacillus*. 107 levures étaient identifiées comme appartenant aux genres *Pichia*, *Candida*, *Arxula* et *Saccharomyces*. Enfin, 292 isolats de moisissures appartenant aux genres *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* et *Cladosporium*, *Aspergillus* étant le genre le plus représenté parmi les moisissures avec 43% des isolats. Un taux d'humidité de 14% correspond à une activité de l'eau permettant le développement des moisissures (> 0.65) (Silva *et al.*, 2008 a, b).

Les types de micro-organismes présents dans le processus de traitement varient légèrement entre la voie humide et la voie sèche, en raison d'étapes supplémentaires de dépulpage, de fermentation et de lavage dans la voie humide. Parmi les bactéries lactiques, les espèces les plus courantes sont *Leuconostoc mesenteroides* (Van Pee et Castalein, 1972), *Lactobacillus plantarum* et *Lactobacillus brevis* (Pederson et Breed, 1945). Pour les bactéries aérobies, la flore dominante semble être Gram négatif (Frank *et al.*, 1965), notamment les genres *Enterobacter*, *Escherichia* (Vaughn *et al.*, 1958), *Erwinia* et *Klebsiella* (Frank *et al.*, 1965). Bien que la population de levures augmente pendant la fermentation (Masoud *et al.*, 2004), elle semble avoir un rôle limité dans ce processus (Avallone, 2001a). Les genres de

levures présents sur la cerise et pendant la fermentation sont *Pichia*, *Kluyveromyces* et *Hanseniaspora*, mais ils diminuent pendant le séchage. En revanche, *Kloeckera*, *Candida* et *Cryptococcus* sont surtout présentes pendant la fermentation.

Les moisissures telles qu'*Aspergillus*, *Penicillium* et *Fusarium* sont présentes dès la première étape du traitement, lorsqu'on traite les cerises, mais ne se multiplient pas durant les étapes de dépulpage, de fermentation et de lavage. Leur développement ne survient qu'au moment du séchage. Pendant la fermentation de la voie humide, la microflore reste stable pendant les dix premières heures, avec une prédominance de bactéries aérobies, suivies de bactéries anaérobies, puis de bactéries lactiques et enfin de levures. Par la suite, la microflore est dominée par les bactéries lactiques et les levures. Vers la fin de la fermentation, les bactéries non acidophiles diminuent en raison des conditions acides du milieu. Selon **Avallone, 2001b** la microflore de la voie humide est plus abondante que celle de la voie sèche, mais la microflore de la voie sèche est 46 fois plus variée. Les moisissures prolifèrent plus facilement dans la voie sèche que dans la voie humide (**Silva et al., 2000**).

I.6. Techniques permettant d'obtenir les grains du café vert

D'après **Coste (1989)**, le traitement des fruits mûrs du caféier est effectué *in situ* sur les lieux de production. Un nombre d'opérations est réalisé sur ses fruits afin d'extraire les grains de leurs enveloppes (Figure 04).

Pour cela, on a recours à deux techniques :

- **Par voie humide** : Cette technique consiste en une cascade d'étapes, qui sont :
 - Dépulpage et démucilagination : cette étape permet d'éliminer la pulpe ainsi que la couche riche en pectine qui adhère à la parche tout en empêchant le séchage rapide des grains, et enfin le lavage.
 - Séchage du café-parche.
 - Déparchage : signifie l'élimination des enveloppes internes (parche et pellicule).
- **Par voie sèche** : elle se fait en deux étapes :
 - Séchage des fruits.
 - Décorticage : éliminer les enveloppes desséchées en une seule opération mécanique.



Figure 04 : Présentation des grains de café vert (Rabah *et al.*, 2021).

CHAPITRE II

MÉTABOLITES SECONDAIRES ET

LEURS PROPRIÉTÉS BIOLOGIQUES

II.1. Polyphénols

Les polyphénols, également connus sous le nom de composés phénoliques, sont une famille de molécules très répandue dans le règne végétal. Ils sont produits par les plantes dans le cadre de leur métabolisme secondaire, ce qui signifie qu'ils ne jouent pas de rôle direct dans les fonctions vitales de la plante, telles que la croissance ou la reproduction, mais sont plutôt présents dans toutes les parties de la plante, des racines aux fruits. Les polyphénols résultent de la condensation de molécules d'acétyl-coenzyme A et de phénylalanine, et comprennent un large éventail de substances chimiques qui ont au moins un noyau aromatique et un ou plusieurs groupes hydroxyles, ainsi que d'autres composants. Il existe au moins 9000 structures différentes de polyphénols connues. Ces composés jouent un rôle crucial car ils contribuent aux qualités sensorielles (couleur et caractéristiques organoleptiques) et nutritionnelles des plantes, telles que les légumes, les fruits, les céréales et les fruits secs (Youla et Latrous, 2017).

II.1.1. Classification des polyphénols

Les composés phénoliques peuvent être classés en différentes catégories en fonction de plusieurs critères. Tout d'abord, ils varient en termes de complexité de leur structure de base, allant d'un simple C₆ à des formes hautement polymérisées. Ensuite, ils se distinguent par le degré de modifications apportées à cette structure de base, telles que l'oxydation, l'hydroxylation, la méthylation, etc. Enfin, ces molécules de base peuvent également former des liaisons avec d'autres types de molécules, tels que des glucides, des lipides, des protéines, ainsi que d'autres métabolites secondaires, qui peuvent ou non être des composés phénoliques (Tableau II) (Macheix *et al.*, 2005).

Tableau II : Principales classes des composés phénoliques (Benhamou, 2012).

Nombre de Carbones	Classe	Squelette carboné	Exemple
7	Acides phénoliques	C ₆ -C ₁	Acide gallique
8	Acétophénones	C ₆ -C ₂	Gallacetophénone
8	Acides phénylacétique	C ₆ -C ₂	Acides p-Hydroxyphénylacétique

Tableau II : Principales classes des composés phénoliques (Benhamou, 2012) (suite).

Nombre de carbon	Classe	Squelette carboné	Exemple
9	Acides hydroxycinamiques	C ₆ -C ₃	Acide p-Coumarique
9	Coumarines	C ₆ -C ₃	Esculitine
10	Naphtoquinones	C ₆ -C ₄	Juglone
13	Xanthones	C ₆ -C ₁ -C ₆	Mangiférine
14	Stilbènes	C ₆ -C ₂ -C ₆	Resveratrol
15	Flavonoïdes	C ₆ -C ₃ -C ₆	Naringénine

II.1.2. Acides phénoliques

Selon Bruneton (2009), les composés organiques qui ont une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique sont appelés acides phénoliques. Ils sont classés en deux groupes dont les acides hydroxybenzoïques et les acides hydroxycinamiques (Manachet *al.*, 2004 ; Balasundramet *al.*, 2006 ; Lafay et Gil-Izuierdo, 2007).

II.1.2.1. Acides hydroxybenzoïques

Les acides hydroxybenzoïques sont des dérivés de l'acide benzoïque et ont une structure générale de base de type (C₆-C₁) (Figure 05). Ces molécules se trouvent souvent sous forme d'esters ou de glycosides. Les exemples les plus courants sont l'acide salicylique et l'acide gallique. L'acide gallique est l'acide hydroxybenzoïque le plus abondant dans les aliments

courants tels que le riz et le sorgho. Il est également connu pour avoir une activité antioxydante (Aref et Heded, 2014/2015).

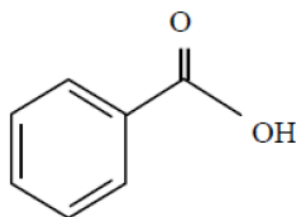


Figure 05 : Acide benzoïque (Aref et Heded, 2014/2015)

II.1.2.2. Acides hydroxycinnamiques

Les acides hydroxycinnamiques sont une classe très importante de composés, dont la structure de base (C₆-C₃), dérive de celle de l'acide cinnamique. Le degré d'hydroxylation du cycle benzénique et son éventuelle modification par des réactions secondaires sont des éléments importants de la réactivité chimique de ces molécules. De plus, l'existence d'une double liaison dans la chaîne latérale conduit à deux séries d'isomères (cis ou Z et trans ou E) dont les propriétés biologiques peuvent être différentes (Bouberki, 2014). Les acides hydroxycinnamiques sont plus courants que les acides hydroxybenzoïques et comprennent notamment l'acide caféique et l'acide férulique (Figure 06) (Aref et Heded, 2014/2015).

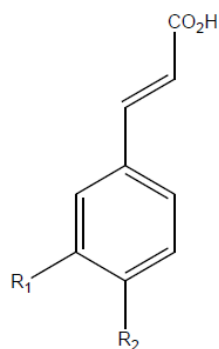


Figure 06 : Acide hydroxycinnamique (Bouberki, 2014).

II.1.2.2.1. Les acides chlorogéniques : Les grains de café vert contiennent la plus grande quantité d'acide chlorogénique, environ 6 à 12% (Farah *et al.*, 2005). Les trois principales sous classes d'acides chlorogéniques qui ont une activité biologique sont l'acide 3-di-caféoylquinique (3-di AQC), les acides caféoylquiniques (AQC) et l'acide féruloyquiniques (AQF), représentent environ 80%, 15% et 5% des acides chlorogéniques totaux dans le café Arabica et 67%, 20% et 13% dans le café Robusta, respectivement. En général, la teneur totale

en acides chlorogéniques varie en fonction de la variété de café, du degré de maturation et de l'emplacement géographique où le café est cultivé (Narita et Inouye, 2015 ; Munyendo *et al.*, 2021).

II.1.3. Flavonoïdes

Le terme flavonoïde fait référence à une grande variété de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols. Les flavonoïdes sont des pigments que l'on retrouve dans la plupart des plantes et qui sont souvent responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles. Ces composés se trouvent le plus souvent sous forme d'hétérosides et il existe plus de 6400 structures de flavonoïdes identifiées (Benhamama, 2015).

Environ 4000 composés flavoniques ont été identifiés et ont tous une structure de base à 15 atomes de carbone arrangés selon une configuration C₆-C₃-C₆ de type phényl-2-benzopyrane, également appelé structure 2-phényl chromane (Benhamou, 2011-2012).

Les flavonoïdes se répartissent en plusieurs classes de molécules, notamment les flavonols, les flavones, les flavanones, les flavan-3-ols, les isoflavones et les anthocyanes. Ces classes de molécules varient dans leurs structures en raison de la diversité fonctionnelle autour de l'oxygénation de l'hétérocycle (Tableau III).

Tableau III : Présentation des principales classes de flavonoïdes (Chira *et al.*, 2008).

Flavonoïdes	Exemples	Aliments	Caractéristiques
Flavonols	Quercétine Kæmpférol	Oignon, poireau, brocolis, pommes, chou frisé, vin rouge, thé	Le groupe le plus abondant des composés phénoliques.
Flavones	Lutéoline Apigénine	Persil, céleri	Les flavones se diffèrent des flavonols seulement par le manque d'un OH libre en C ₃
Flavanones	Naringénine Eriodictyol	Fruits du genre <i>Citrus</i>	Ils sont caractérisés par la présence de la double liaison C ₂ -C ₃ , le plus abondant est la naringénine, isolée pour la première fois à partir des écorces de <i>Citrus</i> .
Isoflavones	Genisteine Daidzeine	Graines de soja et produits qui en dérivent.	Caractérisés par leur variabilité structurale dont l'attachement du cycle B se fait en C ₃ . Ils sont présents dans les plantes sous forme libre ou glycosylée.

Flavan-3-ols	Catéchine Epicatechine Epigallocatec- hine	Vin rouge, thé noir, thé vert, cacao, chocolat.	Flavan-3-ols ainsi que flavan-3,4-diols sont tous les deux impliqués dans la biosynthèse de proanthocyanidines (tanins condensés) par des condensations enzymatiques et chimiques.
Anthocyanes	Cyanidine Delphénidine	Raisins, vin rouge, certaines variétés de céréales	Représentent le groupe le plus important des substances colorées. Ces pigments hydrosolubles contribuent à la coloration des angiospermes.

II.1.4. Tannins

Les tannins sont des polyphénols que l'on trouve dans de nombreux végétaux, comme les écorces d'arbres et des fruits (raisin, datte, café, cacao, etc). Ce sont des substances polyphénoliques qui se dissolvent dans l'eau et dont les masses molaires se situent généralement entre 500 et 3000. Les tannins possèdent des caractéristiques chimiques communes aux phénols en général. Ils ont la capacité de provoquer la précipitation des alcaloïdes, de la gélatine et d'autres protéines. La réaction des tannins avec les protéines est responsable de leurs propriétés tannantes (**Stevanovic, 2005**).

Ils ont une structure complexe, ils sont composés d'unités monomériques répétitives qui varient en fonction de leurs centres asymétriques et de leur degré d'oxydation. Les tannins peuvent être classés en deux groupes : les tannins hydrolysables et les tannins non hydrolysables (condensés), dont les structures sont différentes (**Aref et Heded, 2014/2015**).

II.1.4.1. Tannins hydrolysables : Ce sont des hétéropolymères ayant un noyau central constitué d'un polyol, souvent un D-glucose. Ils peuvent être hydrolysés facilement en milieux acides et alcalins ou sous l'action d'enzymes (comme la tannase), pour donner des glucides et des acides phénoliques. Les tannins galliques (Gallo tannins) se scindent en oses et en acide gallique et les tannins ellagiques (Ellagitanins) se scindent en oses et en acide ellagique.

II.1.4.2. Tannins condensés : Les tannins condensés, également appelés tannins flavaniques, sont des tannins non hydrolysables (appelés catéchiques et proanthocyaniques) qui sont plus complexes que les tannins galliques. Ils ont un squelette phényl-2-chromane de flavonoïdes. Ces tannins sont constitués d'un mélange de produits de polymérisation oxydative de catéchines (flavan-3-ols) et de proanthocyanes (flavan-3,4-dioles).

II.2. Alcaloïdes

Le terme "alcaloïde" a été introduit par Wilhelm Meissner, un pharmacien allemand. Les alcaloïdes sont caractérisés par leur goût amer, leur basicité, leur origine végétale et leurs actions physiologiques. Ils sont composés d'au moins un atome d'azote (**Dostál, 2000**). Les alcaloïdes ont des structures chimiques très variées, notamment des systèmes d'anneaux hétérocycliques, et il existe plus de 20 000 molécules différentes chez les organismes (**Yang et Stöckigt, 2010**). Ces composés peuvent être classés en fonction des substances de départ de leurs voies de biosynthèse, telles que les acides aminés qui fournissent les atomes d'azote et une partie de leur structure, y compris les terpénoïdes et les purines (**Aniszewski, 2015**). Ainsi, l'identification des substances de départ qui synthétisent une variété d'alcaloïdes est l'une des clés les plus importantes pour la classification des composés alcaloïdes naturels (**Roy, 2017**).

La caféine (1,3,7-triméthylxanthine) est le composant alcaloïde purinique le plus abondant dans les grains de café verts, représentant 99,78 % des méthylxanthines totales. La quantité de caféine dans les grains de café verts ne change pas avec le temps. La caféine étant thermiquement stable, elle ne peut pas être détruite ou réduite par une torréfaction excessive des grains (**Mussatto et al., 2011**). Le café Arabica a une concentration de caféine de 0,8 % à 1,4 %, tandis que le café Robusta a une teneur en caféine de 1,7 % à 4,0 % (**Belitz et al., 2009**). La caféine est un antagoniste de l'adénosine ayant des caractéristiques stimulantes (**Berlowitz et al., 2022**).

II.3. Effets bénéfiques des métabolites secondaires du café

Le café vert contient de l'acide chlorogénique et de la caféine, qui sont réputés avoir des propriétés anti-obésité, anti-tumorales, antidiabétiques, anti-hypertensives, anti-inflammatoires et antimicrobiennes. Le café vert et ses constituants actifs peuvent également offrir une option de traitement et de prévention non pharmacologique et non invasive pour certains troubles chroniques. Selon **Vats (2022)**, le café vert a des effets sur la masse corporelle, la glycémie et les taux de cholestérol, la pression artérielle et la prévention des maladies cardiovasculaires.

II.3.1. Activité antioxydante

La caféine, un composant clé du café, est un puissant antioxydant capable de prévenir les dommages oxydatifs de l'ADN, d'altérer la réponse apoptotique et de réguler la fonction de contrôle du cycle cellulaire (**Banerjee et al., 2014**). De plus, les constituants du café, le cafestol et le kahweol, sont deux diterpènes qui ont démontré un large spectre d'activités bioactives,

entraînant une réduction de la génotoxicité induite par les agents cancérigènes (**Ferk et al., 2014**).

Le café vert contient de l'acide chlorogénique, une molécule phénolique dotée de propriétés antioxydantes et ayant la capacité de piéger les anions superoxydes ou les radicaux hydroxyles. Cette substance chimique offre de nombreux avantages pour la santé, notamment la capacité à éliminer les radicaux libres in vitro et à limiter la propagation des processus oxydatifs (**Castro et al., 2018**). En outre, les acides chlorogéniques sont d'excellents éliminateurs d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) (**Priftis et al., 2018**).

II.3.2. Activité anticancéreuse

Le café est classé comme non carcinogène pour l'homme par l'Agence Internationale de Recherche sur le Cancer en 2016. Plusieurs études ont établi un lien entre la consommation de café et un risque plus faible de certains cancers. De nombreuses recherches sur les capacités anticancéreuses du café ont identifié le kahweol comme l'un des principaux composés responsables de la prévention du cancer, il protège l'ADN du stress oxydatif causé par les peroxydes d'hydrogène (**Park et al., 2016**).

L'hyperméthylation de l'ADN est une caractéristique courante des cellules tumorales et un mécanisme épigénétique essentiel pour inhiber divers gènes, y compris les protéines suppresseurs de tumeurs, les enzymes de réparation de l'ADN et les récepteurs (**Lahtz and Pfeifer, 2011**). L'acide caféique inhibe la méthylation de l'ADN dans les cellules cancéreuses humaines et est lié à l'inactivation de plusieurs voies liées aux tumeurs, notamment la régulation du cycle cellulaire, aux réponses inflammatoires, au stress et à l'apoptose (**Yu et al., 2011**).

D'après **Happonen et al. (2008)**, une tasse de café consommée quotidiennement réduit le risque de décès dû au cancer de 3%, tandis qu'une consommation modérée de café protège contre les cancers du rein (**Lee et al., 2017**), du foie (**Larsson and Wolk, 2007**), du pancréas (**Ran, Wang et Sun, 2016**), du côlon (**Schmit et al., 2016**), du sein (**Jiang, Wu et Jiang, 2013**), et de la prostate (**Tverdal, 2015**). Le tableau ci-dessous montre les composés bioactifs du café vert et leurs effets sur la santé humaine.

Tableau IV : Composés bioactifs du café vert et leurs effets sur la santé humaine (Vats, 2022)

Composés bioactifs	Fonctions	Références
Cafféine	<ul style="list-style-type: none"> • Effets ergogéniques, • Augmentation de l'attention et de la concentration, • Réduction de la fatigue, • Réduction de la perception de la douleur, • Anti-inflammatoire (inhibition du TNF-α, de la synthèse de leucotriènes, de l'IL-6 et de l'IL-8). 	Pauwels et Volterrani (2021) ; Stadheim <i>et al.</i> (2015).
Acide chlorogénique	<ul style="list-style-type: none"> • Anti-inflammatoire, • Antioxydant, Hépatoprotecteur, • Cardioprotecteur, • Chimio-préventif, • Anti-diabétique, • Anti-obésité, • Anticancéreux, • Effets neuroprotecteurs, • Effets anti-neurodégénératifs. 	Fukutomi <i>et al.</i> (2021) ; Pauwels and Volterrani (2021) ; Socala <i>et al.</i> (2020) ; Wasim <i>et al.</i> (2020).
Trigonelline	<ul style="list-style-type: none"> • Anti-inflammatoire, • Antioxydant, • Anti-obésité, • Anti-diabétique, • Neuroprotecteur. 	Farias-Pereira <i>et al.</i> (2019) ; Mohamadi <i>et al.</i> (2018) ; Sharma <i>et al.</i> (2018)
Cafestol et Kahweol	<ul style="list-style-type: none"> • Anti-inflammatoire, • Anti-angiogénique, • Réduction de la néoangiogenèse. 	Moenfard <i>et al.</i> (2016) ; Pauwels et Volterrani (2021)

CHAPITRE III
GÉNÉRALITÉS SUR LES BIOFILMS
BACTÉRIENS

III.1. Description des biofilms bactériens

Les biofilms bactériens sont des communautés complexes de bactéries attachées à une surface les unes aux autres, maintenues ensemble par une matrice polymérique auto-produite, principalement composée de substances telles que les protéines (la fibrine), les polysaccharides (l'alginate) ainsi que de l'ADN extracellulaire. En plus de la protection offerte par la matrice, les bactéries présentes dans les biofilms peuvent utiliser plusieurs stratégies de survie pour échapper aux systèmes de défense de l'organisme hôte. En restant dormantes et cachées du système immunitaire, elles peuvent causer des lésions tissulaires locales et ultérieurement provoquer une infection aiguë.

La croissance des cellules bactériennes au sein du biofilm est très lente et produit des cellules persistantes capables de survivre dans des conditions hostiles telles que l'exposition aux antibiotiques et autres biocides (**Flemming *et al.*, 2016**).

III.2. Formation des biofilms

Environ 40 à 80 % des cellules bactériennes présentes sur Terre peuvent former des biofilms (**Flemming et Wuertz, 2019**). Par exemple, dans les industries alimentaires, des bactéries pathogènes sont capables de former des biofilms à l'intérieur des installations de traitement, entraînant la détérioration des aliments et mettant en danger la santé des consommateurs (**Galie *et al.*, 2018**). Dans les établissements hospitaliers, il a également été démontré que les biofilms persistent sur les surfaces des dispositifs médicaux et dans les tissus des patients, causant des infections persistantes (**Dongari-Bagtzoglou, 2008 ; Percival *et al.*, 2015**).

III.2.1. Processus de formation des biofilms Bactériens

Les bactéries forment des biofilms en réponse à des contraintes environnementales telles que les radiations UV, la dessiccation, la limitation des nutriments, les pH et les températures extrêmes, les concentrations élevées en sel, la pression élevée et les agents antimicrobiens.

La formation de biofilms bactériens implique des processus complexes (**O'Toole *et al.*, 2000 ; Hall-Stoodley *et al.*, 2004 ; Lopez *et al.*, 2010 ; Galie *et al.*, 2018**). En général, la formation du biofilm commence par l'attachement réversible des bactéries à une surface, suivi par un attachement irréversible facilité par des structures adhésives bactériennes et des interactions à courte distance. L'attachement réversible se produit grâce à la production de substances polymériques extracellulaires (EPS). Ensuite, les bactéries se développent dans une

structure organisée emprisonnée dans une matrice EPS. Enfin, les cellules bactériennes peuvent se libérer du biofilm mature et se disperser dans l'environnement pour coloniser de nouveaux habitats (Berne *et al.*, 2015 ; Hoffman *et al.*, 2015 ; Limoli *et al.*, 2015 ; Toyofuku *et al.*, 2016). Ces différentes phases de formation des biofilms sont illustrées dans la Figure 07.

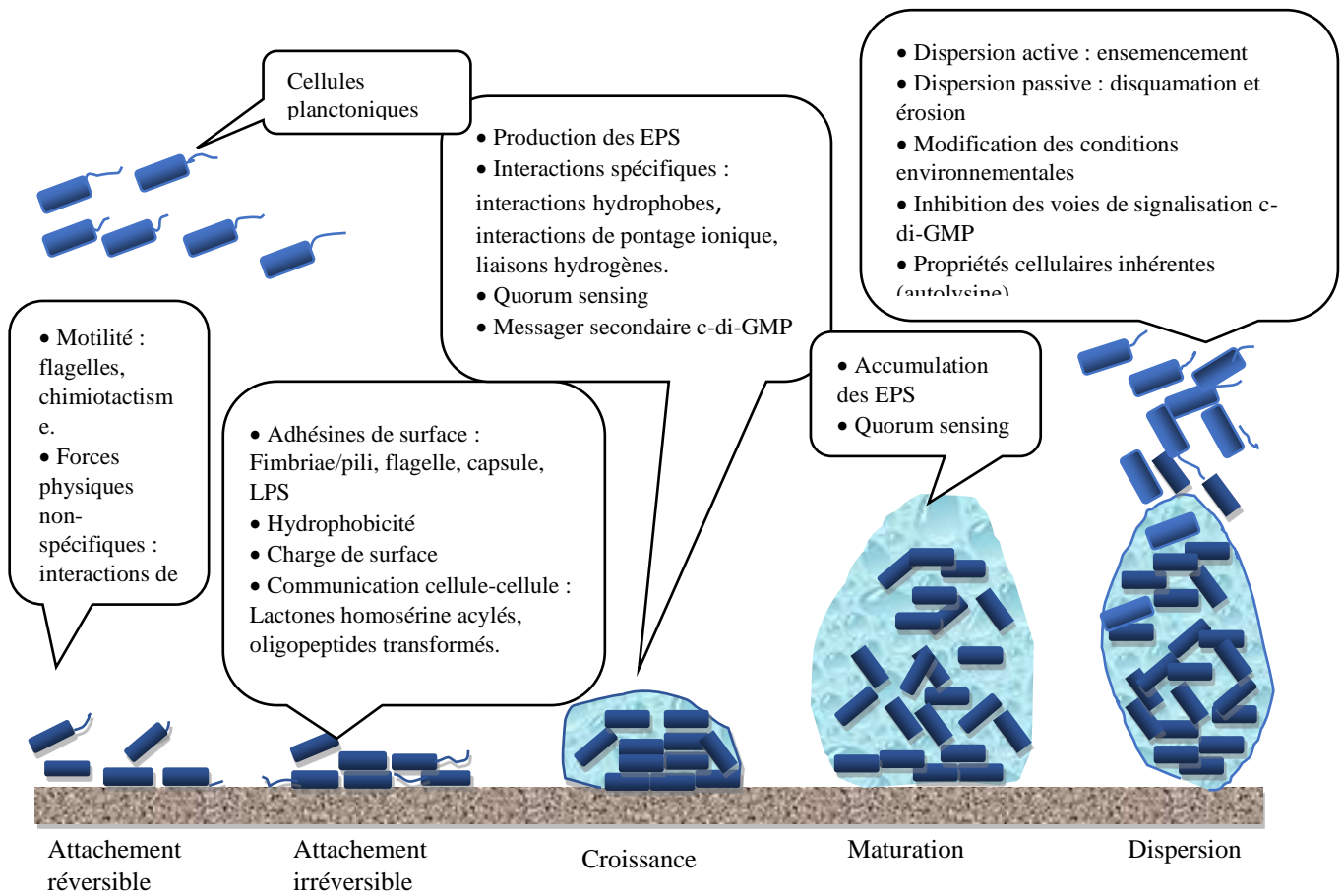


Figure 07 : Étapes de la formation du biofilm bactérien (Muhammad *et al.*, 2020)

Le tableau V montre les bactéries d’origines alimentaires capables de former des biofilms.

Tableau V : Bactéries d'origine alimentaire formatrices des biofilms (Muhammad *et al.*, 2020).

Organismes	Surfaces associées	Produits associés	Références
<i>Listeria monocytogenes</i>	Tuyaux d'eaux usées, sols, bandes transporteuses, joints en caoutchouc, élastomères et acier inoxydable	Produits laitiers, melons, salades de chou, produits de viande prêts à consommer et produits de poisson prêts à consommer	(Wirtanen et Salo, 2016)
<i>Pseudomonas</i> spp.	Bandes transporteuses, sols, drains, tranches et machine à traire	Produits laitiers, viande rouge et volaille	(Korber <i>et al.</i> , 2009; Mørretrø et Langsrud, 2017)
<i>Bacillus cereus</i>	Acier inoxydable, plastique, sol et laine de verre	Graines germées, jus de fruits, riz frit, plats de pâtes, produits de viande, légumes et produits laitiers	(Korber <i>et al.</i> , 2009; Wirtanen et Salo, 2016)
<i>Salmonella</i>	Acier inoxydable, élastomères, béton, verre et surfaces alimentaires (comme la laitue et la tomate)	Volaille, porc, viande bovine et produits laitiers	(Wirtanen et Salo, 2016)
<i>Escherichia coli</i>	Surfaces en acier inoxydable, surfaces de contact alimentaire	Produits laitiers, saucisse de viande fermentée, viande (produits de volaille, produits de poisson, boissons et légumes	(Wirtanen et Salo, 2016)
<i>Clostridium</i>	Biofilm multi-espèces	Produits laitiers, poisson, viande bovine, volaille, légumes, miel et conserves	(Wirtanen et Salo, 2016)
<i>Cronobacter</i> spp.	Salles de service et d'emballage de poudre, zones de séchage par pulvérisation et salles d'évaporation	Produits laitiers, légumes, céréales, pain, herbes, saucisses, épices et viande	(Wirtanen et Salo, 2016)
<i>Staphylococcus</i>	Acier inoxydable, plastiques (comme le polystyrène et le polypropylène) et verre	Produits laitiers, produits de viande prêts à consommer, produits de poisson et de fruits de mer prêts à consommer et produits laitiers prêts à consommer	(Wirtanen et Salo, 2016)

III.3. Maladies liées aux biofilms

Les biofilms sont omniprésents dans la nature, les bactéries forment des biofilms dans le cadre de leurs mécanismes de survie. Déjà en 1683, Antoni van Leeuwenhoek a observé et décrit des biofilms en utilisant son microscope primitif sur des matières provenant de ses propres dents. Cependant, le mode de vie en biofilm des microorganismes n'intéressait pas les microbiologistes médicaux avant le début des années 1970, lorsque Nils Høiby a observé un lien entre l'étiologie d'une infection persistante et des agrégats de bactéries chez les patients atteints de fibrose kystique (Høiby, 2017). Depuis lors, il a été reconnu que les biofilms sont impliqués dans de nombreuses infections cliniques (Costerton *et al.*, 1999 ; Hall-Stoodley et Stoodley, 2009) (Tableau VI)

Tableau VI : Maladies des différents systèmes corporels associées aux biofilms et organes affectés (Vestbyet *al.*, 2020).

Système corporel	Organes affectés	Maladies
Auditif	Oreille moyenne	Otite moyenne
Cardiovasculaire	Valves cardiaques	Endocardite infectieuse
	Artères	Athérosclérose
Digestif	Glandes salivaires	Sialolithiase (calculs des canaux salivaires)
	Vésicule biliaire	Fièvre typhoïde récalcitrante et prédisposition aux cancers hépatobiliaires
	Tractus gastro-intestinal, notamment l'intestin grêle et le gros intestin	Maladie inflammatoire de l'intestin et cancer colorectal
Tégumentaire	Peau et tissus sous-jacents	Infections des plaies
Reproducteur	Vagin	Vaginose bactérienne
	Utérus et trompes de Fallope	Endométrite chronique
	Glandes mammaires (seins)	Mastite

Tableau VI : Maladies des différents systèmes corporels associées aux biofilms et organes affectés (Vestbyet *al.*, 2020) (suite).

Système corporel	Organes affectés	Maladies
Respiratoire	Cavité nasale et sinus paranasaux	Rhino-sinusite chronique
	Gorge (pharynx avec amygdales et végétations adénoïdes, et larynx avec cordes vocales)	Pharyngite et laryngite
	Voies respiratoires supérieures et inférieures	Coqueluche et autres infections à Bordetella, Fibrose kystique
Urinaire	Prostate	Prostatite bactérienne chronique
	Urètre, vessie, uretères, reins	Infections des voies urinaires

III.4. Impact des biofilms sur la résistance aux antibiotiques

Les biofilms bactériens sont des communautés de bactéries qui forment des structures enchevêtrées et résistantes aux antibiotiques. Les biofilms offrent aux bactéries une protection contre les antibiotiques en formant une matrice polymérique (EPS) qui limite la pénétration des médicaments et qui restreint la diffusion des antibiotiques (Pinto *et al.*, 2020). De plus, les bactéries à l'intérieur d'un biofilm subissent des changements physiologiques qui les rendent plus résistantes aux antibiotiques (Donlan et Costerton, 2002 ; Chadha, 2014).

Les mécanismes de résistance comprennent la production d'enzymes qui inactivent les antibiotiques, des changements génétiques qui modifient les cibles des médicaments, l'expulsion des antibiotiques par des pompes à efflux et la présence de structures membranaires externes (Høiby *et al.*, 2010 ; Singh *et al.*, 2017).

Chez les bactéries formant des biofilms, il existe un taux élevé de mutations qui leur permet de développer des mécanismes de résistance, cela offre ensuite une opportunité à leurs gènes de produire des enzymes qui inactivent les antibiotiques ou d'expulser les antibiotiques à l'aide de pompes à efflux (Ciofu et Tolker-Nielsen, 2019).

Les biofilms favorisent également la transmission horizontale des gènes de résistance entre les bactéries (Costerton *et al.*, 2005), ce qui contribue à la propagation de la résistance

aux antibiotiques (**Pinto *et al.*, 2020**). Selon **Plusa (2019)**, les biofilms bactériens jouent donc un rôle crucial dans le développement de la résistance aux antibiotiques, ce qui pose des défis importants pour le traitement des infections.

PARTIE II
ETUDE EXPÉRIMENTALE

CHAPITRE I
MATÉRIEL ET MÉTHODE

➤ **Cadre de l'étude**

Notre recherche expérimentale a été réalisée au sein des laboratoires pédagogiques d'analyses microbiologiques (LABAB) et physico-chimiques, du département de Biochimie-Microbiologie de la Faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques de l'Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou.

I.1. Matériel

I.1.1. Matériel végétal

Le matériel végétal est constitué des graines de café vert robusta (*Coffea canephora*) broyées (Poudre de café vert) (Figure 08), c'est un bioproduit alimentaire, utilisé comme complément alimentaire destiné à soutenir la perte de poids, en effet, c'est un puissant bruleur de graisse naturelle et un super antioxydant en raison de sa teneur élevée en acides chlorogéniques. De plus, il a des propriétés stimulantes et énergisantes et il aide à la concentration du consommateur.

Ce produit est commercialisé, celui testé dans cette étude est obtenu par une commande en ligne.



Figure 08 : Graines de café vert (a) : broyées ; (b) : finement broyées

Cette poudre de café vert a été conservée dans un flacon en verre et a été réfrigérée jusqu'à son utilisation.

I.1.2. Matériel de laboratoire

I.1.2.1. Appareillage et réactifs

Les composants utilisés dans notre travail expérimental, tels que les solvants, les réactifs chimiques, les milieux de culture et les équipements, sont détaillés dans le tableau VII.

Tableau VII : Matériel utilisés (appareillage, solvants, réactifs chimique et milieux de culture).

Appareillage	Verreries et autres matériels	Solvant	Colorants et réactifs chimiques
<ul style="list-style-type: none"> • Etuve • Spectrophotomètre • pH-mètre • Bain marie • Autoclave • Four pasteur • Four a moufle • Dessiccateur • Broyeur • Agitateur magnétique • Plaque chauffante • Balance • Balance de précision (0.0001) • Bec bunsen 	<ul style="list-style-type: none"> • Becher • Erlenmeyer • Fiole jaugée • Entonnoirs • Cristallisoirs • Burette de graduation • Boites pétri • Pipettes pasteur • Ense à boucle • Micropipette de : 50 µL 1000 µL • Écouvillons • Papiers Wattman • Papiers filtre • Seringues de 1ml et 2.5ml • Capsules • Capsules en porcelaine • Verre de montre • Spatules • Passoire • Tubes à essai à vis stériles • Tubes à hémolyse • Eppendorfs • Barreaux magnétiques • Pince stérile 	<ul style="list-style-type: none"> • Eau distillée 	<ul style="list-style-type: none"> • Chlorure de fer (FeCl₃) • Acétate de sodium (CH₃COONa) • Magnézium • Ammoniaque • Chloroforme • NaOH • Phénolphtaléine • HCl • Acide sulfurique (H₂SO₄) • Alcool iso-butanol • Anhydride acétique • Folin-Ciocalteu • Carbonate de sodium (NaCO₃) • Acide gallique

I.1.2.2. Matériel biologique

Les extraits de la plante ont été testés sur des microorganismes (bactéries) provenant du laboratoire de Microbiologie du département de Biochimie-Microbiologie (LABAB) de l'université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou (Tableau VIII).

Tableau VIII : Souches bactériennes testées.

Espèce bactérienne	Type	Référence	Famille
<i>Escherichia coli</i>	Bacille à Gram négatif	ATCC 25922	Enterobacteriaceae
<i>Staphylococcus aureus</i>	Cocci à Gram positif	ATCC 25923	Staphylococcaceae

I.2. Méthodes

I.2.1. Analyse physico-chimique

I.2.1.1. Caractérisation physico-chimique de la poudre de café vert robusta (*Coffea canephora*)

✓ **Détermination de la teneur en eau (humidité) (AFNOR, 1986)**

❖ **Mode opératoire**

Cinq grammes de poudre de café vert ont été placés dans une capsule en porcelaine. Ensuite, la capsule est mise dans une étuve pendant 16h à une température de $105 \text{ °C} \pm 2 \text{ °C}$. Après cela, la capsule est retirée de l'étuve et placée dans un dessiccateur pour empêcher la réhydratation et permettre le refroidissement. L'échantillon est ensuite pesé à l'aide d'une balance précise en milligramme près (0.00001 mg). Cette opération est répétée pour le même échantillon jusqu'à obtenir un poids constant.

❖ **Expression des résultats**

La détermination de la teneur en humidité est calculée selon la formule ci-dessous :

$$H\% = \frac{M1 - M2}{M} \times 100$$

H : Humidité (%)

M1 : Masse de la capsule (tare) + la matière fraîche avant séchage (poudre) en g.

M2 : Masse de l'ensemble après séchage en g.

M : Masse de la prise d'essai.

✓ Mesure du pH (NFV 05-101, 1970)

Le pH (potentiel d'hydrogène) permet l'évaluation de l'acidité d'un produit donné, la mesure s'effectue en utilisant un pH-mètre.

❖ Mode opératoire

- Peser deux grammes de poudre du café vert, ajouter 15mL d'eau distillé chaude.
- Homogénéiser le mélange et laisser refroidir.
- Calibrer le pH-mètre avec une solution tampon (eau distillée).
- Extraire un volume V d'échantillon.
- Immerger l'électrode du pH-mètre dans l'extrait.
- Noter la valeur affichée.

Remarque : Rincer l'électrode avant et après chaque mesure.

✓ Détermination de l'acidité titrable (NF V 05-101, 1974)

L'acidité titrable désigne la quantité d'acide présente dans une solution, déterminée par titrage avec une solution basique de concentration connue.

❖ Principe

Ce processus est un titrage de NaOH en utilisant la phénolphtaléine comme indicateur de pH. Les étapes de la procédure sont les suivantes :

- Peser 2,5 g de la poudre de la poudre de café vert.
- Placer l'échantillon dans un bécher et ajouter 25 mL d'eau distillée chaude, récemment bouillie, puis mélanger jusqu'à obtention d'un mélange homogène.
- Chauffer au bain-marie pendant 15 minutes.
- Après refroidissement, transférer le contenu dans une fiole jaugée de 125 mL et compléter avec de l'eau distillée récemment bouillie et refroidie, homogénéiser, puis filtrer à travers une passoire et un papier filtre.
- Prélever un volume $V_0 = 25$ mL de la solution filtrée et ajouter 3 à 5 gouttes de phénolphtaléine.
- Utiliser une burette pour verser la solution de NaOH (0,1 N) tout en agitant le contenu, jusqu'à ce qu'une couleur rose persistante apparaisse pendant 30 secondes. Le volume de NaOH est déterminé en lisant le volume sur la burette graduée.

❖ Expression des résultats

L'acidité titrable, exprimée en grammes d'acide citrique pour 100 grammes d'échantillon, est calculée à l'aide de la formule suivante.

$$A (\%) = \frac{250 \times V_1 \times 100}{M \times V_0 \times 10} \times 0.07$$

A (%) = Pourcentage d'acidité titrable.

V₀ = Volume de la prise d'essai, exprimé en mL.

V₁ = Volume de NaOH (0.1N) versé, exprimé en mL.

M = La masse de l'échantillon à analyser en gramme.

0.07 = Le facteur de conversion de l'acidité titrable en équivalent de l'acide citrique.

✓ Détermination de la teneur en cendres (NFV 05-113, 1972)**❖ Principe**

L'échantillon est soumis à une calcination à une température de 550 °C dans un four à moufle jusqu'à ce que les cendres obtenues présentent une couleur blanchâtre ou grise claire.

❖ Mode opératoire

La procédure consiste à peser 5 g de l'échantillon dans des capsules en porcelaine, puis à placer ces dernières dans un four à moufle à une température de 550 °C pendant 5 heures. Ensuite, les capsules sont retirées et placées dans un dessiccateur. Après refroidissement, elles sont pesées à l'aide d'une balance de précision à une résolution de 0,00001 mg.

❖ Expression des résultats

Le calcul de la matière organique est effectué en utilisant l'équation suivante :

$$MO (\%) = \frac{M_1 - M_2}{P} \times 100$$

MO : Matière organique en g.

M1 : Masse de la capsule + masse de la prise d'essai.

M2 : Masse de la capsule + masse des cendres en g.

P : Masse de la prise d'essai en g.

La détermination de la teneur en cendres (Cd) est réalisée comme suit :

$$Cd = 100 - MO$$

I.2.1.2. Analyse phytochimique de la poudre de café vert robusta (*Coffea canephora*)

Les différentes classes de métabolites secondaires présentes dans la poudre de café vert robusta (*C. canephora*) sont identifiées en utilisant les méthodes standards du screening phytochimique (Dohou *et al.*, 2003 ; Kumar *et al.*, 2010).

➤ Préparation de l'infusé

Dix grammes de la poudre sont mélangés avec 50 mL d'eau distillée, portés à ébullition pendant 15 minutes. Après filtration, le filtrat est ajusté à un volume de 100 mL en ajoutant de l'eau distillée. L'infusé obtenu est utilisé pour l'analyse phyto-chimique.

✓ Anthocyanes

Mettre 5 mL d'infusé dans un Erlenmeyer, puis additionner quelques gouttes d'acide chlorhydrique (HCl). La détection des anthocyanes se fait par l'observation d'une coloration rouge qui apparaît.

✓ Tanins

Ajouter de l'acétate de Sodium (CH_3COONa) au filtrat jusqu'à saturation, additionner quelques gouttes de FeCl_3 . La réaction est dite positive s'il y a une coloration bleu foncée.

✓ Tannins galliques

Saturer le filtrat par l'acétate de Sodium (CH_3COONa), ajouter par la suite quelques gouttes de FeCl_3 . Une réaction positive donne une coloration bleu foncée.

✓ Quinones libres

- Peser 2 g de poudre de café vert, ajouter 2 mL d'HCl (1N)
- Ajouter 20 mL de chloroforme et laisser reposer durant 3 heures, ensuite filter.
- Ajouter 5mL d'ammoniaque.

Une coloration rouge violette indique une réaction positive.

✓ Saponosides

Préparer 2 tubes à essai fermés, mettre, dans le premier, 5mL d'acide chlorhydrique (HCl) 0,1N, et 5 mL de solution de soude (NaOH) 0,1N dans le deuxième. Ajouter 2 à 3 gouttes d'infusé dans chaque tube, agiter les 2 tubes verticalement et vigoureusement pendant quelques secondes et laisser reposer pendant 15 minutes. L'apparition d'une mousse explique la présence de saponosides dans l'échantillon selon deux cas différents :

- 1) Si les deux tubes produisent la même quantité de mousse, cela indique la présence de saponosides stéroïdiens.
- 2) Si une mousse plus abondante par stabilité et par volume se forme dans le tube contenant la solution basique, ceci implique la présence de saponines tri-terpénique.

✓ Glucosides

Peser 2g de poudre végétale, additionner quelques gouttes d'H₂SO₄. La réaction est dite positive (présence de glucosides) lorsqu'il y a apparition d'une couleur rouge brique qui vire en violet après quelques instants.

✓ Flavonoïdes

Mélanger 5mL d'HCl avec 5 mL d'infusé puis ajouter un copeau de magnésium (Mg) et 1 mL de l'alcool iso-butanol. Lorsqu'une coloration rouge orangé apparait, la réaction est dite positive, ce qui explique la présence des flavonoïdes.

✓ Coumarines

Prélever 2mL d'infusé, ajouter 3mL de NaOH (10%). Un virement de couleur en jaune implique une réaction positive.

✓ Stéroïde

Ajouter 5mL de l'anhydride acétique puis 5mL de l'acide sulfurique à 5mL d'infusé. Un changement de couleur en vert explique la présence des stéroïdes.

I.2.1.3. Dosage des sucres

À partir de ce dosage, deux catégories de sucres ont été mise en évidence, dont les sucres totaux et les sucres réducteurs. Pour le réaliser, deux solutions de Fehling A et B ainsi que deux filtrats (1) et (2) doivent être préparés.

• Filtrat (1)

- Peser 10g de l'échantillon dans un bécher de 100ml ;
- Ajouter 2,5ml d'acétate de plomb,
- Remplir jusqu'au 2/3 du volume de bécher avec l'eau distillée ;
- Agiter à plusieurs reprises et laisser reposer pendant 15mn ;
- Ajuster avec de l'eau distillée jusqu'à 100mL ;
- Homogénéiser et filtrer sur un papier filtre et récupérer le filtrat.

• Filtrat (2)

- Prélever 50ml du filtrat (1) et ajouter 5ml d'HCl concentré ;
- Chauffer le mélange au bain marie à 70°C pendant 5 min ;
- Neutraliser avec NaOH (10N) en présence de phénolphtaléine à 1%.

✓ Dosage des sucres totaux**❖ Mode opératoire**

- Prélever 5ml de la solution Fehling A et 5ml de la solution Fehling B ;
- Ajouter de l'eau de robinet jusqu'à atteindre un volume total de 100mL ;
- Chauffer le mélange jusqu'à ce qu'il atteigne le point d'ébullition et la maintenir pendant 2 minutes ;
- Titrer par le mélange en ajoutant progressivement le filtrat (2) jusqu'à ce que la couleur bleue disparaisse ;
- Ajouter 2 gouttes de bleu de méthylène jusqu'à ce que la coloration bleue soit remplacée par une coloration marron cuivrée ;

- Noter le volume V_2 de filtrat (2).

❖ **Expression des résultats**

La quantité des sucres totaux dans la prise d'essai est déterminée par l'équation ci-dessous :

$$S_T = \frac{500}{V \times (V_2 - 0.05)} \times 10$$

S_T : Quantité des sucres totaux (g/100mL) ;

V : Volume de la prise d'essai ;

V_2 : Volume du filtrat (2) dispensé pour le titrage.

✓ **Dosage des sucres réducteurs**

❖ **Mode opératoire**

- Dans un bécher de 500 mL, verser 5 mL de la solution Fehling A et 5 mL de la solution Fehling B ;
- Ajouter de l'eau de robinet jusqu'à atteindre un volume de 100 mL ;
- Chauffer le contenu du bécher jusqu'à ébullition et laisser bouillir pendant 2 minutes ;
- Commencer le titrage en ajoutant le filtrat (1) au mélange chauffé jusqu'à ce que la couleur bleue disparaisse ;
- Ajouter 2 gouttes de bleu de méthylène et continuer le titrage jusqu'à ce que la coloration bleue devienne rouge brique ;
- Arrêter le titrage et noter le volume V_1 du filtrat (1) dispensé.

❖ **Expression des résultats**

La quantité des sucres réducteurs dans la prise d'essai est déterminée par l'équation suivante :

$$S_R = \frac{240}{V \times (V_1 - 0.05)}$$

S_R : Quantité des sucres réducteurs (g/100mL) ;

V : Volume de la prise d'essai (mL) ;

V_1 : Volume du filtrat (1) utilisé dans le titrage.

I.2.1.4. Détermination de la teneur en polyphénols totaux

✓ Extraction aqueuse

Un extrait phénolique est préparé, l'extraction aqueuse a été réalisée en utilisant l'eau distillée comme solvant à l'abri de la lumière en recouvrant toute la verrerie avec du papier aluminium pour éviter l'oxydation des composés phénoliques de la plante. L'extrait est réfrigéré à 4°C jusqu'à son utilisation.

✓ Préparation de l'extrait

Peser 10 grammes de la poudre de café vert qui a été finement broyé, puis les mettre dans 100mL d'eau distillée, soumettre le mélange à une extraction par macération et agiter en parallèle pendant 24 heures à l'obscurité et à température ambiante.

Après macération, effectuer deux filtrations pour le mélange, premièrement avec une passoire pour éliminer les grosses particules ; deuxièmement avec du papier filtre. Un extrait de couleur brunâtre est obtenu.

Après évaporation à l'étuve à 40°C pendant 48 heures, l'extrait sec est récupéré et conservé à 4°C jusqu'à utilisation (Figure 09).

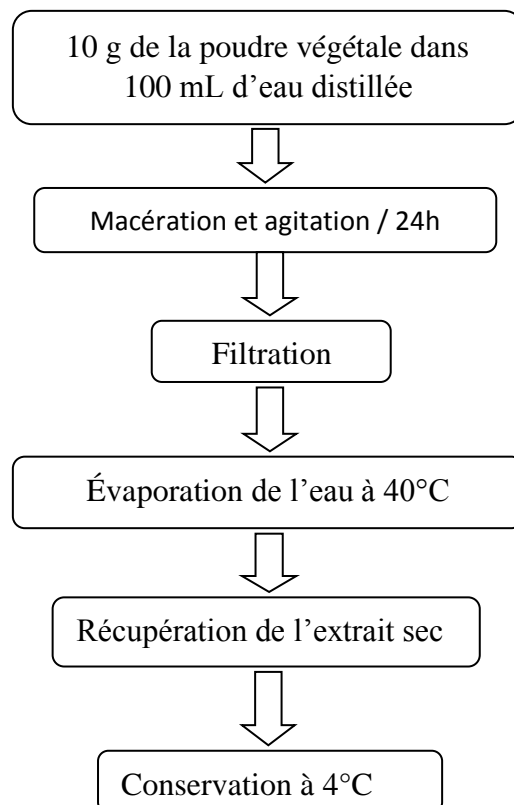


Figure 09 : Protocole d'extraction aqueuse à 10%.

✓ Détermination du rendement d'extraction

Le rendement est la quantité d'extrait sec obtenue à partir de l'extraction subite pour la poudre végétale. C'est le rapport de la masse de l'extrait sec sur la masse de la poudre multipliée par 100. Il est exprimé en pourcentage (**Camara *et al.*, 2016**), la formule qui permet de le calculer est la suivante :

$$R\% = \frac{P1}{P2} \times 100$$

R % : Rendement d'extraction.

P1 : Poids de l'extrait après évaporation de solvant.

P2 : Poids de la matière végétale utilisée pour l'extraction.

✓ Dosage des polyphénols totaux

La teneur en PPT des extraits de la plante a été déterminée selon la méthode colorimétrique basée sur l'utilisation de réactif de Folin-Ciocalteu (**Singleton et Rossi, 1965**).

❖ Principe

Le réactif de Folin-Ciocalteu (FCR) est un mélange de couleur jaune composé de deux acides : l'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et l'acide phosphomolybdique ($H_3PMO_{12}O_{40}$). Au moment de l'oxydation des phénols, il est réduit en un complexe bleu d'oxydes de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (M_8O_{23}). La quantité de phénols présents est proportionnelle à la couleur bleuâtre qui en résulte (**Boizot et Charpentier, 2006**).

❖ Mode opératoire

Le dosage des polyphénols (PPT) est effectué pour l'extrait aqueux selon le protocole décrit par **Talbi *et al.* (2015)** (Figure 10), est réalisé comme suit :

- Ajouter 1mL du réactif de Folin (1/10), à 200 μ L d'échantillon (solution de 0.5 mg d'extrait sec dans 1 mL d'eau distillée).
- Après 4 minutes, rajouter 800 μ L d'une solution de carbonate de sodium avec une concentration de 75 mg/mL).
- Après 2 heures d'incubations à température ambiante et à l'abri de la lumière, mesurer l'absorbance par un spectrophotomètre à 760 nm.

Trois répétitions ont été réalisées pour l'extrait. Le blanc a été préparé en remplaçant l'échantillon par 200 μ L d'eau distillé.

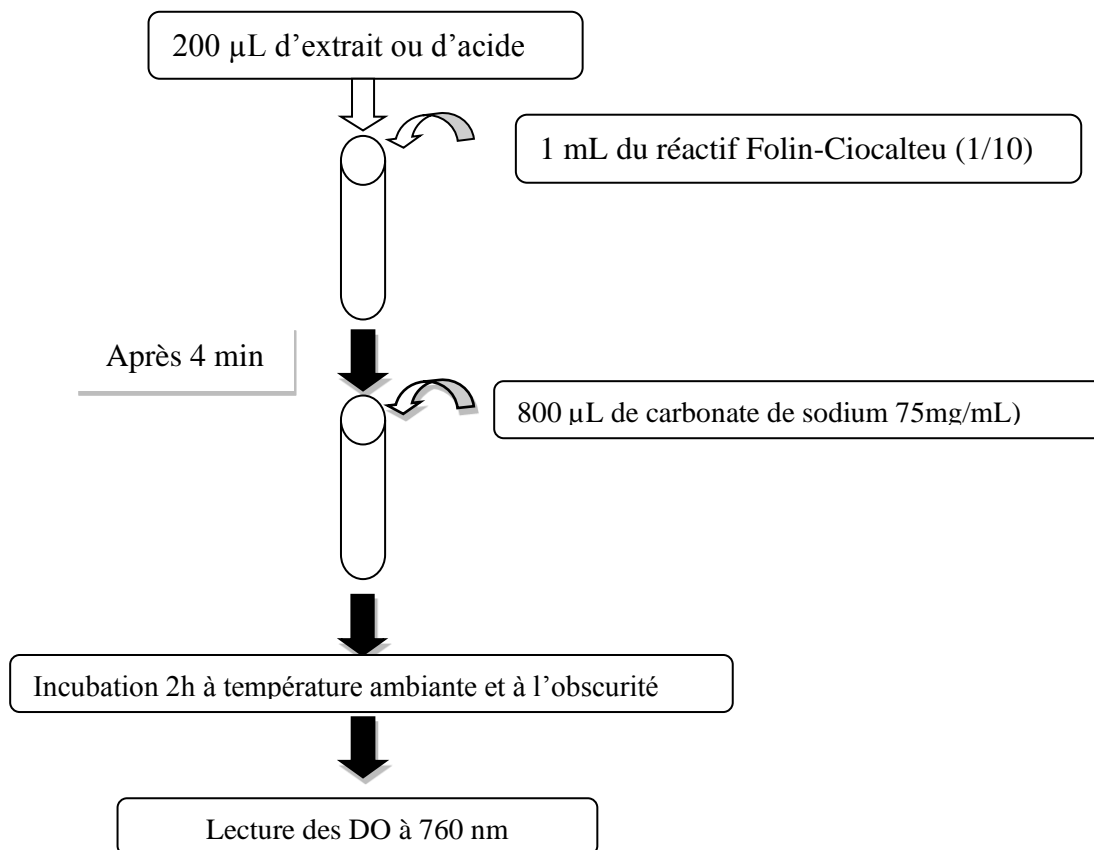
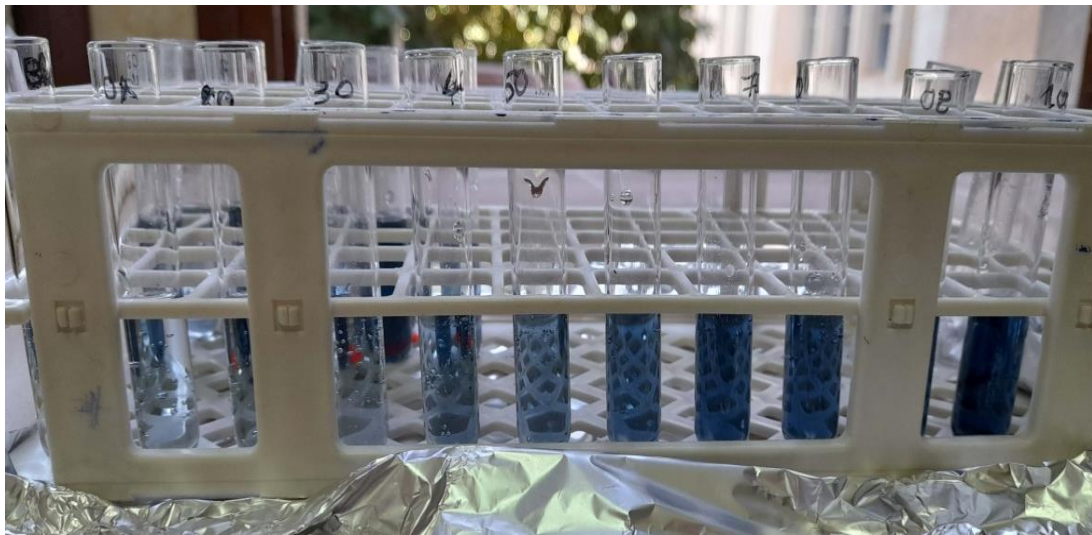


Figure 10 : Schéma récapitulatif du protocole de dosage des polyphénols totaux (Talbi *et al.*, 2015).

La concentration des polyphénols totaux est calculée par l'équation de régression linéaire de la gamme d'étalonnage établie avec l'acide gallique (AG) à différentes concentrations. Les dilutions sont préparées à partir de la solution mère (SM) de 100 μ g/mL (Tableau IX), (Figure 11).

Tableau IX : Préparation de la gamme de dilution de l'acide gallique.

Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
Volume SM (μL)	0	100	200	300	400	500	600	700	800	900	1000
Volume d'ED (μL)	1000	900	800	700	600	500	400	300	200	100	0

**Figure 11 :** Gamme d'étalonnage de l'acide gallique.

I.2.2. Partie microbiologique

I.2.2.1. Évaluation de l'activité antibactérienne

Le test de l'activité antibactérienne de l'extrait aqueux de la poudre de café vert robusta (*Coffea canephora*) a été réalisé sur les souches bactériennes provenant du laboratoire pédagogique de Microbiologie du département Biochimie-Microbiologie de la faculté des Sciences Biologiques de l'Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou, une souche à Gram négatif (*E. coli* ATCC 25922) et une autre à Gram positif (*S. aureus* ATCC 25923).

✓ Revivification et vérification de la pureté des souches

❖ Revivification des souches bactériennes

Pour permettre aux bactéries stressées de récupérer leurs potentialités ; 1 mL de la suspension bactérienne a été prélevé et additionné à 9 mL du BHIB. Les tubes sont mis à l'étuve pendant 24 h à 37 °C (Figure 12).

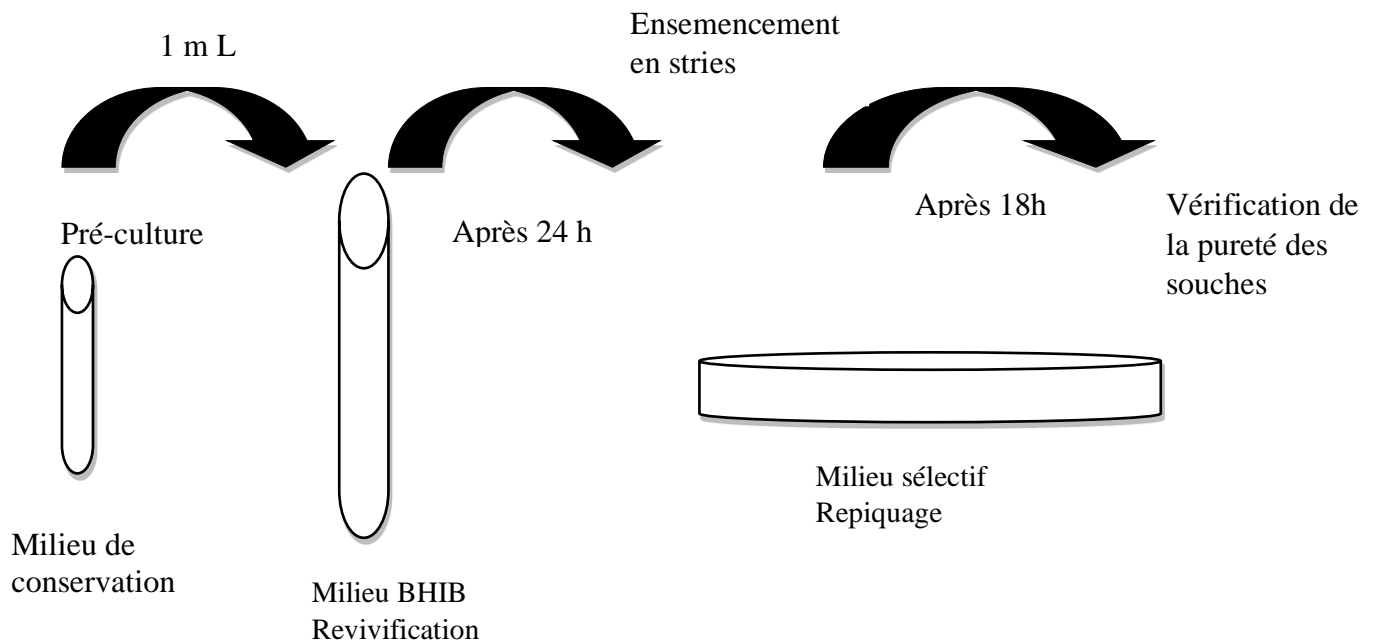


Figure 12 : Revivification et repiquage des souches bactériennes.

❖ Repiquage des souches bactériennes

Le repiquage des souches a été effectué dans des milieux sélectifs des bactéries à tester, dont le milieu Hektoen a été utilisé pour la culture d'*E. coli* tandis que *S. aureus* a été cultivé

sur le milieu Chapman, afin d'éviter les contaminations par d'autres souches. La méthode employée est celle de l'ensemencement en stries (Figure 13).

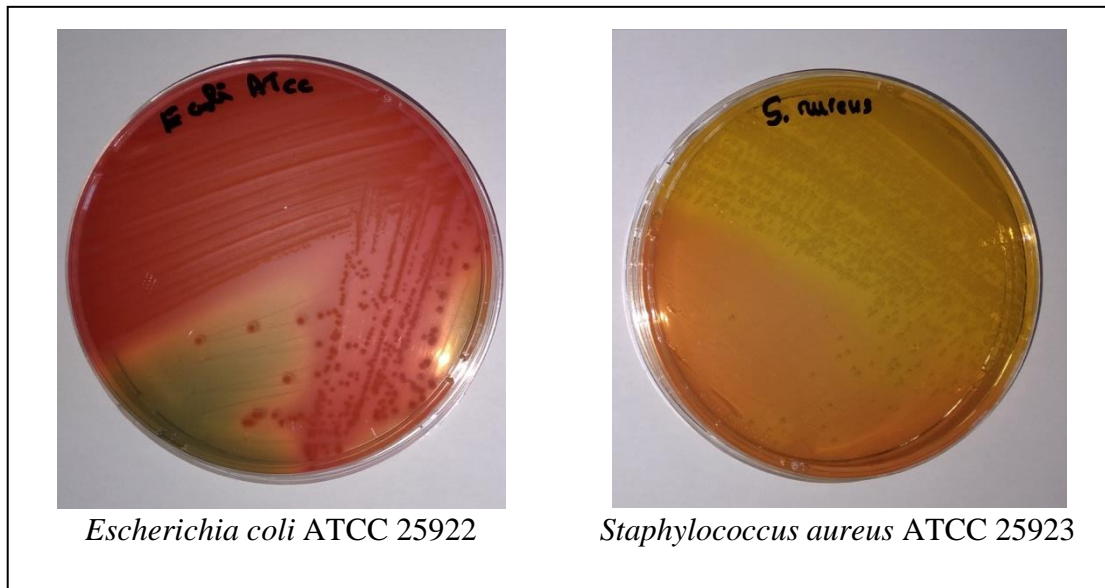


Figure 13 : Repiquage des souches bactériennes.

❖ Vérification de la pureté des souches Bactériennes

La pureté des souches *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* est vérifiée par la coloration de Gram et par la détermination de l'aspect des colonies isolées.

❖ Coloration de Gram

La coloration de Gram, développée par Hans Christian Gram en 1884, est une technique de coloration différentielle largement utilisée en microbiologie. Elle permet de distinguer les bactéries en fonction de leur type de coloration Gram, de leur forme et agencement cellulaire.

❖ Principe

La coloration de Gram est une méthode utilisée pour classifier les bactéries en fonction de la composition et de la structure de leurs parois. Les cellules bactériennes réagissent de manière distincte lors de cette coloration :

- Les bactéries à Gram négatif se décolorent rapidement. Leur paroi contient moins de peptidoglycanes et davantage de lipides, ce qui rend leur paroi plus perméable. Ainsi,

lors du processus de décoloration, les lipides se dissocient, entraînant la perte de coloration du cytoplasme.

- En revanche, les bactéries à Gram positif conservent leur coloration violette, car leur paroi contient principalement des peptidoglycanes formant une couche épaisse. Cette composition riche en peptidoglycanes empêche l'action de l'alcool utilisé lors de la décoloration, maintenant ainsi la coloration violette de leur cytoplasme.

❖ Mode opératoire

En suivant la méthode décrite par **Delarras (2007)**, le test est réalisé selon les étapes suivantes :

1. Préparation du frottis : Une goutte d'eau est déposée sur une lame, et un prélèvement provenant d'une culture jeune est déposé dessus. Le prélèvement est ensuite étalé pour obtenir une couche mince et uniforme. Ensuite, le frottis est fixé en le passant 4 à 5 fois dans la flamme.
2. Le frottis est recouvert avec le colorant primaire (violet de Gentiane) et laissé agir pendant 1 minute. Le colorant est ensuite éliminé sans rinçage.
3. Le Lugol est versé sur le frottis et laissé agir pendant 1 minute, puis il est rincé à l'eau distillée.
4. Une décoloration est réalisée en utilisant de l'alcool pendant 15 à 30 secondes, suivi d'un rinçage à l'eau.
5. Le frottis est recouvert de Fushine pendant 1 minute.
6. Le frottis est ensuite lavé à l'eau courante.
7. La lame est séchée, puis l'observation est effectuée à l'aide d'un microscope optique à un grossissement de $\times 100$.

Ce même protocole est appliqué à l'ensemble des souches bactériennes étudiées.

✓ Préparation de L'inoculum

Pour préparer la suspension bactérienne, 3 à 5 colonies identiques et isolées sont prélevées dans une culture jeune de 18 heures. Ces colonies sont ensuite mélangées dans 9 mL d'eau physiologique stérile à 0,9 % pour former une suspension bactérienne homogène. Pour évaluer la concentration bactérienne, l'absorbance (DO) de la suspension est mesurée à l'aide d'un

spectrophotomètre réglé sur une longueur d'onde de 620 nm. Une valeur d'absorbance comprise entre 0,08 et 0,1 correspond à une charge bactérienne entre 10^7 et 10^8 UFC/mL. Cette plage de valeurs est considérée comme standard pour la suspension bactérienne.

✓ Aromatogramme

❖ Principe

Le pouvoir antibactérien de l'extrait de poudre de café vert robusta a été évalué en utilisant la méthode de diffusion sur milieu solide sur gélose Mueller-Hinton (MH), qui est une technique conçue pour la réalisation des antibiogrammes, mais en utilisant des disques vierges imprégnés d'extrait de la plante, comme décrite dans les études de **Perez *et al.* (1990)** et **Nair et Chanda (2005)**. Cette méthode de l'aromatogramme est couramment employée pour évaluer l'activité antibactérienne de substances bioactives.

❖ Mode opératoire

La gélose Mueller-Hinton (MH) est versée de manière aseptique dans quatre boîtes de Pétri pour former une couche d'une épaisseur de 4 mm, puis elle est laissée refroidir. Les suspensions bactériennes sont ensuite ensemencées séparément par écouvillonnage (deux boîtes pour *E. coli* et deux autres pour *S. aureus*), en faisant tourner la boîte d'environ 60° à trois reprises, afin de garantir une distribution homogène des souches bactériennes.

Ensuite, des disques vierges sont déposés à la surface de chaque boîte de Pétri et sont imbibés par 15 µL d'extraits pur qui est la solution saturante (90mg d'extrait sec dans 1 mL d'eau distillée stérile) et dilué (1/2) respectivement.

Un témoin positif d'antibiotique (Gentamicine) et un disque vierge imprégné d'eau distillée stérile correspondant à un témoin négatif, ont été également utilisés. Puis les boîtes de Pétri sont réfrigérées à 4°C pendant 2 à 4 heures afin de permettre une bonne diffusion des extraits, ensuite, elles sont incubées à 37°C pendant 24h.

La lecture des résultats est effectuée par le calcul du diamètre de la zone d'inhibition entourant chaque disque à l'aide d'une règle. La réaction des souches testées vis-à-vis des extraits est déterminée comme ci-dessous :

- Souche résistante ou non sensible (-) : diamètre < 8 mm.

- Souche sensible (+) : diamètre entre 8 et 14 mm.
- Souche très sensible (++) : diamètre entre 14 et 20 mm.
- Souche extrêmement sensible (+++) : diamètre > 20 mm.

I.2.2.2. Sélection des bactéries formatrices de biofilms

La sélection des souches formatrices de biofilms a été réalisée sur milieu solide Rouge Congo Agar (RCA) (Figure 14).



Figure 14 : Rouge Congo Agar

❖ Principe

Le test du Rouge Congo Agar (RCA), développé par **Freeman *et al.* (1989)**, repose sur la culture secondaire de souches bactériennes sur un milieu d'agar d'infusion cerveau-cœur (BHIA), enrichi en saccharose et en colorant rouge Congo auquel se fixent les polysaccharides extracellulaires « EPS » produits par la souche (**Kaiser *et al.*, 2013**), cela repose sur l'affinité de ce colorant pour les EPS présents dans le biofilm, ce qui engendre une coloration des colonies.

❖ Mode opératoire

Les souches standardisées sontensemencées séparément dans les boîtes contenant la gélose Rouge Congo Agar (RCA), qui sont incubées à l'étuve à 37°C pendant 24h. Une coloration noirâtre des colonies indique la formation du biofilm.

I.2.2.3. Évaluation de l'activité antibiofilm**❖ Mode opératoire**

La méthode de diffusion sur gélose (aromatogramme) a été également utilisée pour déterminer l'activité antiadhésive de l'extrait aqueux de la poudre de café vert robusta vis-à-vis de *S. aureus*, sur le milieu Rouge Congo Agar (RCA).

Deux boîtes de Pétri contenant la gélose Rouge Congo Agar ont étéensemencées avec la suspension standardisée de la souche *S. aureus* ATCC 25923, par stries à l'aide d'une pipette Pasteur. Ensuite des disques de papier wattman stériles ont été déposés aseptiquement sur la surface de la gélose et imprégnés par 15 µL de l'extrait pur et dilué (1/2) de *Coffea Canephora*. Un témoin positif (Gentamicine) et un témoin négatif (eau distillée stérile) ont été également utilisés.

Les boîtes ont été mises au réfrigérateur à 4°C pendant 2 à 4h afin de favoriser la diffusion des extraits tout en empêchant la croissance de la bactérie.

Enfin, les boîtes sont incubées à 37°C pendant 24h. La lecture des résultats a été réalisée par la mesure des zones d'inhibition entourant les disques.

CHAPITRE II

RÉSULTATS ET DISCUSSION

II.1. Résultats des paramètres physico-chimiques de la poudre du café vert (*Coffea canephora*)

Les résultats obtenus pour quelques paramètres physico-chimiques de la poudre de café vert *Coffea canephora (robusta)* sont résumés dans le tableau X. Le résultat de chaque test est exprimé sous forme de moyenne de trois essais \pm l'écart-type.

Tableau X : Résultats des tests physicochimiques caractérisant le café vert.

Tests	Résultats
Teneur en eau (Humidité) %	8,50 \pm 0,04
Matière sèche (%)	91,5 \pm 0,04
pH à Température ambiante	4,63 \pm 0,25
Acidité (%)	6,03 \pm 0,30
Matière organique (%)	94,31 \pm 0,08
Teneur en cendre (%)	5,69 \pm 0,08

D'après les résultats obtenus, la teneur en eau (taux d'humidité) de la poudre de café vert est de 8,50%, ce qui contribue à une meilleure conservation, car une faible teneur en eau réduit le risque de détérioration due à la croissance de moisissures ou à l'activité de microorganismes indésirables. Le résultat obtenu est inférieur à celui énoncé par **Bewketu *et al.* (2021)** dont l'étude portait sur des grains de café vert provenant de différentes régions d'Éthiopie, leur étude a révélé une teneur en eau allant de 9,8 à 11,2 %, ainsi qu'à celui obtenu par **Silabdi (2010)**, dont la valeur est de 10,72 % pour les grains de café vert (robusta) et de 11,35 % pour l'arabica.

Le pH est une mesure qui évalue l'acidité d'un produit donné. D'après les résultats montrés dans le tableau VII, la valeur obtenue est de 4,63, elle indique un pH acide, elle contribue également à une meilleure conservation, de plus il favorise la stabilité chimique et il prévient l'oxydation et la dégradation des composés sensibles présents dans les grains de café vert. En comparant nos résultats aux résultats de **Kipkorir (2015)**, dont l'étude portait sur les propriétés physico-chimiques du café vert obtenu par différentes méthodes de traitement de deux saisons de récoltes, ils ont enregistré un pH de 5.95 et 5.92 des deux saisons, qui est supérieur à celui relevé dans notre étude. Il convient de noter que le pH optimal peut varier en

fonction de divers facteurs, notamment la variété, les conditions de culture, les pratiques de traitement et les préférences individuelles.

De même, l'acidité titrable est un test qui permet la détermination de l'acidité. La valeur que nous avons obtenue est de 6,03 %, qui est une valeur supérieure à celles de **Kipkorir (2015)** : 1,37 % et 1,54 %, ce qui explique que la poudre de café vert étudié est acide.

Le test de la teneur en cendres permet d'évaluer le taux de minéraux, un taux de 5,69 % a été relevé, qui est légèrement plus élevé que celui noté par **Maysarah et al. (2020)** : $4,37 \pm 0,21$ %. Un taux de cendres plus élevé peut-être associé à une plus grande quantité de matières minérales présentes dans les grains de café.

En analysant nos résultats, on peut constater que le café vert en poudre est riche en matière sèche (91,5%), et en matière organique (94,31%) qui peuvent comprendre plusieurs composés différents, tels que les glucides, les protéines, les lipides, les fibres, les minéraux, les acides chlorogéniques et d'autres composés organiques naturellement présents dans les grains de café.

Les antioxydants sont essentiels dans les grains de café pour limiter la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). Lorsque la production de ROS dépasse la capacité des systèmes antioxydants, des dommages aux compartiments subcellulaires se produisent, entraînant la destruction des cellules.

II.2. Résultats d'analyse phytochimique de la poudre de café vert (*Coffea canephora robusta*)

Les résultats des tests phyto-chimiques réalisés sur la poudre de café vert sont représentés dans le tableau XI.

Tableau XI : Résultats du screening phyto-chimique de *Coffea canephora*.


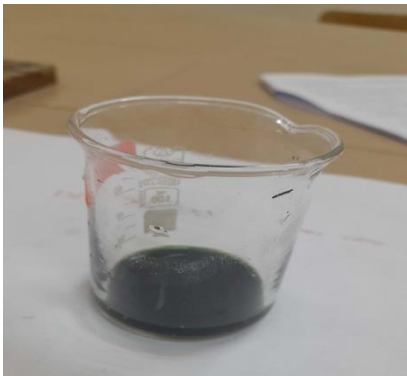
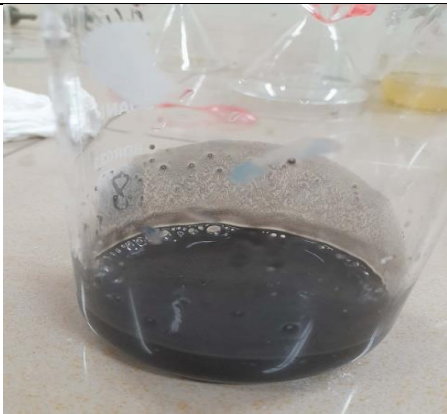
Tests	Observation	Résultats
Anthocyanes		Absence
Tanins		Présence
Tanins gallique		Présence

Tableau XI : Résultats du screening phyto-chimique de *Coffea canephora* (suite).

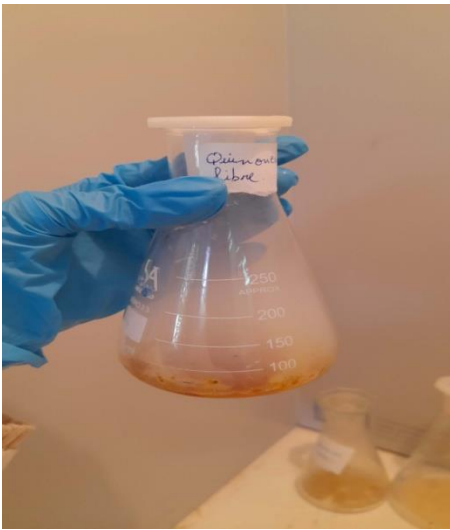

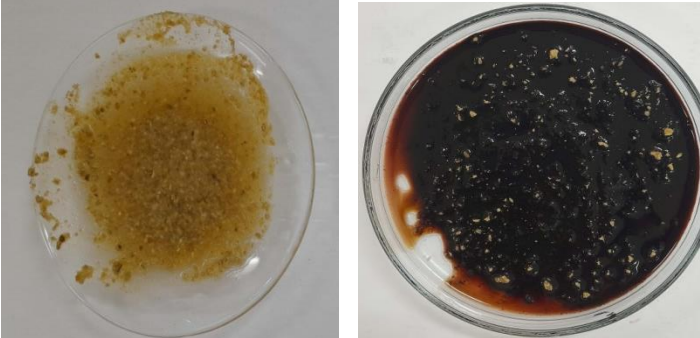
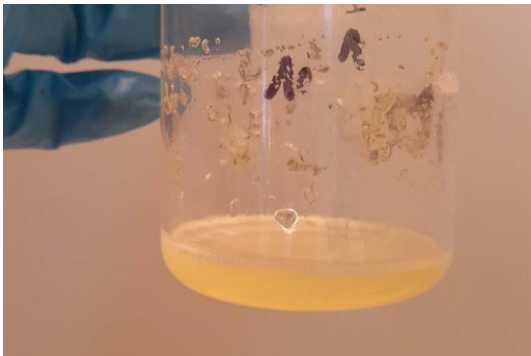

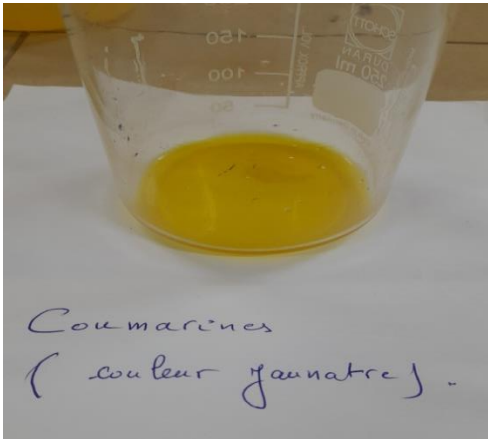
Tests	Observation	Résultats
Quinones libres		Absence
Saponosides		Absence
Glucosides	 <p data-bbox="831 1776 1126 1816">Poudre de café vert</p> <p data-bbox="555 1839 644 1879">+ eau</p> <p data-bbox="911 1839 1043 1879">+ H₂SO₄</p>	Présence

Tableau XI : Résultats du screening phyto-chimique de *Coffea canephora* (suite).

Tests	Observation	Résultats
Flavonoïdes		Absence
Steréroïdes		Absence
Coumarines		Présence

Les résultats de l'analyse phytochimique a permis la révélation de certains composés dans la poudre de café vert (*Coffea canephora robusta*) avec une quantité importante tel que les tannins, tannins galliques, glucosides et en coumarines, ce qui lui confère des propriétés

biologiques pertinentes et influence la saveur, l'astringence, les caractéristiques sensorielles et le profil aromatique du café. Quant aux tests réalisés pour la révélation des anthocyanes, quinones libres, saponosides, stéroïdes et les flavonoïdes ont montré des résultats négatifs.

L'analyse phyto-chimique faite par **Polamuri et al. (2020)** a révélé la présence des glycosides, des flavonoïdes, des tannins, des stéroïdes, des phénols et des terpénoïdes. De plus, le screening phyto-chimique qui a été effectué par **Kaur et al. (2018)** a montré des résultats positifs dans plusieurs composés, notamment les tannins, les stéroïdes, les flavonoïdes, les alcaloïdes et les phénols.

Les études qui ont été déjà réalisées affirment la richesse du café vert en métabolites secondaires.

Le résultat négatif du test des stéroïdes et des flavonoïdes peut être dû à des facteurs influençant l'expérience, tels que les erreurs de manipulation, les réactifs ainsi que le matériel utilisé, également différentes méthodes d'analyse phyto-chimique peuvent conduire à des résultats différents qui peuvent être en relation avec l'origine de la plante, les conditions pédagogiques, etc.

II.3. Résultats du dosage des sucres

Les résultats du dosage des sucres ont révélé un taux de sucres totaux de 3,63 g/mL et 0,64g/mL pour les sucres réducteurs, qui indiquent la quantité totale des sucres présents dans la poudre de café vert robusta, cela suggère que cet échantillon contient une quantité significative de sucres.

D'après l'étude de **Nemlin et al. (2009)** qui portait sur les caractéristiques physico-chimiques et organoleptiques du café robusta (*Coffea canephora L.*) en fonction des terroirs et des techniques culturales en Côte d'Ivoire, il a été démontré que les résultats de la moyenne du taux des sucres réducteurs en pourcentage dans trois terroirs différents sont de l'ordre de $1,35 \pm 0,3$ %. De plus, selon **Coste (1989)**, le café vert contient des quantités variables de sucres réducteurs, principalement du glucose, généralement autour de 1%.

Conformément à **Poisson et al. (2017)** les sucres sont parmi les principaux précurseurs de saveur du café vert, leur étude qui a été réalisée sur les grains de café vert robusta a révélé les résultats suivants :

- Les monosaccharides tels que le glucose, le fructose, le galactose et l'arabinose représentent de 0,2 à 0,5 % de la matière sèche.
- Les oligosaccharides tels que le saccharose, la raffinose et le stachyose représentent de 3 à 7 % de la matière sèche.

- Les polysaccharides, composés d'hétéro-polymères d'arabinose et de mannose, représentent environ 3 à 4 % de la matière sèche.

II.4. Résultats d'extraction et de dosage des polyphénols totaux

II.4.1. Rendement en extrait sec

L'extraction des composés phénoliques contenus dans la poudre de café vert *Coffea canephora* a été effectuée en utilisant l'eau distillée. Le rendement en extrait sec obtenu est représenté dans le tableau ci-dessous et dans la figure 15 :

Tableau XII : Résultats du rendement en extrait sec de la poudre de café vert robusta.

Extrait	Poids de l'extrait après évaporation (g)	Couleur	Rendement (%)
Extrait aqueux	2,81 g	Brune	28,1 %



Figure 15 : Rendement en extrait sec.

D'après ces résultats, nous constatons que l'extrait aqueux a donné un rendement important (28,1%), d'autre part, **Desai et al. (2019)** ont réalisé une étude sur la micro-encapsulation des composés phénoliques antioxydants du café vert décaféiné, avec un rendement de $23\% \pm 2\%$ de l'extraction aqueuse, il est légèrement inférieur à notre résultat.

Naidu et al. (2008) ont obtenu des rendements de conserves à partir de différents mélanges de solvants (isopropanol : eau) pour le café robusta qui varient entre 20 % et 29 %. On peut observer que le rendement de l'extraction aqueuse dans notre étude est légèrement

inférieur au rendement le plus élevé obtenu avec le mélange de solvants 60:40 pour le café robusta. Cela suggère que l'utilisation de solvants organiques tels que l'isopropanol peut améliorer le rendement de l'extraction par rapport à une extraction purement aqueuse. L'étude menée par **Díaz-Hernández *et al.* (2022)** a mis en évidence un rendement d'extraction aqueuse des grains de café verts de l'ordre de $22,17 \pm 0,39$ %, ce qui est légèrement inférieur à celui obtenu dans cette étude.

La différence de rendement peut être due aux variations dans les protocoles expérimentaux, les échantillons de café vert utilisés, les méthodes d'analyses, etc.

II.4.2. Dosage des polyphénols totaux

La méthode de Folin-Ciocalteu, basée sur la colorimétrie, est utilisée pour estimer la quantité de polyphénols présents dans l'extrait de la plante. L'apparition de la couleur bleue confirme la présence des polyphénols chez le café vert (Robusta). La couleur obtenue varie en fonction de la concentration des composés phénoliques contenus dans les extraits.

La concentration de polyphénols pour l'extrait (trois essais) a été déterminée en utilisant une équation de régression linéaire basée sur une courbe d'étalonnage établie à partir de concentrations précises d'acide gallique utilisées comme étalon ($y = 0,017x - 0,023$) et coefficient de corrélation $R^2 = 0,996$ (Figure 016)

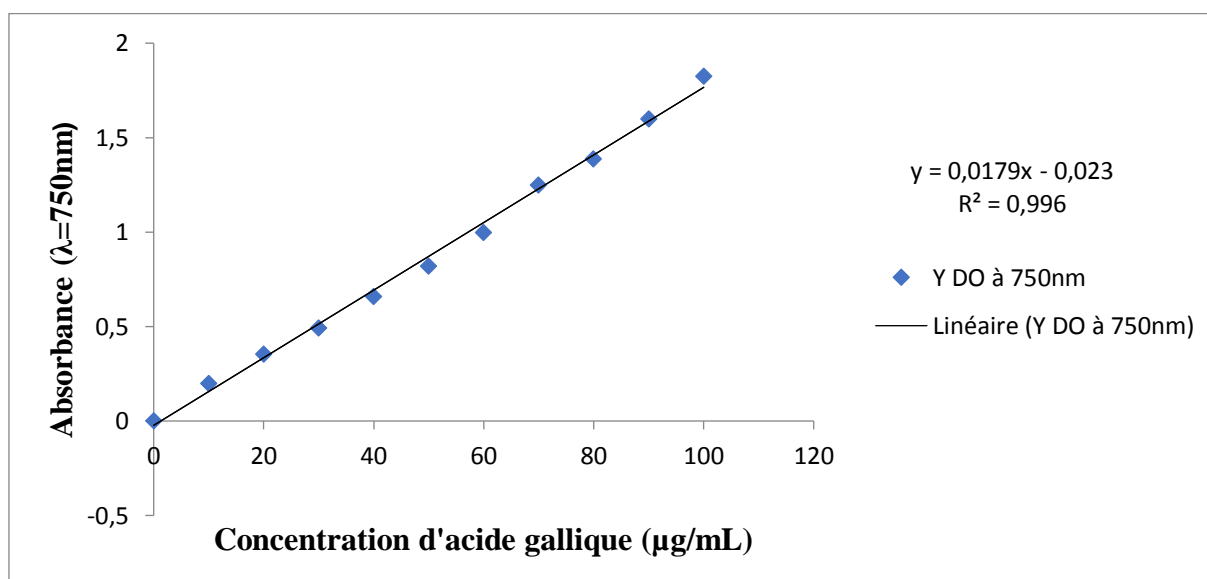


Figure 16 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique

Le résultat est présenté en milligrammes équivalents d'acide gallique par gramme de matière sèche (mg EAG/g MS).

La teneur en polyphénols obtenue pour l'extrait aqueux est de l'ordre de $64,54 \pm 0,14$ mg EAG/g MS. Ceci indique une concentration plus ou moins élevée de polyphénols totaux dans l'échantillon étudié (poudre du café vert robusta).

Selon **Ali-Rachedi et al. (2018)**, il a été observé que le contenu phénolique des extraits varie en fonction de la polarité du solvant utilisé lors de l'extraction. Dans notre étude, le solvant utilisé (l'eau distillée), est de nature polaire.

La teneur en polyphénols de l'extrait aqueux de la poudre de café vert Robusta était de $64,54 \pm 0,14$ mg EAG/g MS. Cette valeur peut être comparée aux résultats de l'étude de **Perdani et al. (2019)** qui ont examiné les polyphénols totaux présents dans le café vert Arabica et Robusta provenant de différents lieux dans l'est de Java (en utilisant un extrait aqueux). Selon cette étude, les teneurs en polyphénols totaux variaient de 3,86 à 33,21 mg EAG/g pour le café vert Arabica et de 5,24 à 35,67 mg EAG/g pour le café vert Robusta, en fonction des différentes localisations. Ainsi, la teneur en polyphénols de l'extrait aqueux de la poudre de café vert Robusta de notre étude est relativement élevée par rapport aux échantillons étudiés par **Perdani et al. (2019)** indiquant une forte concentration de polyphénols.

L'étude menée par **Siva et al. (2016)** sur l'activité antioxydante et les polyphénols totaux des extraits méthanoliques et isopropanoliques des grains de café vert Robusta, a révélé les résultats suivants : une teneur en polyphénols de $16,26 \pm 0,59$ mg EAG/g pour l'extraction méthanolique et une teneur en polyphénols de $30,65 \pm 0,44$ mg EAG/g pour l'extraction isopropanolique.

D'après ces comparaisons, on peut déduire que l'extrait aqueux de la poudre de café vert Robusta présente une teneur en polyphénols relativement élevée par rapport aux échantillons étudiés par **Perdani et al. (2019)** et **Siva et al. (2016)**. Nous constatons que la méthode d'extraction aqueuse utilisée dans notre étude est efficace pour extraire les polyphénols du café vert Robusta et obtenir une concentration importante de ces composés bénéfiques.

Le choix du solvant d'extraction joue un rôle crucial dans l'activité antioxydante et la teneur en polyphénols des aliments (**Daud et al., 2016**). Les antioxydants sont essentiels dans les grains de café pour limiter la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). Lorsque la production de ROS dépasse la capacité des systèmes antioxydants, des dommages aux compartiments subcellulaires se produisent, entraînant la destruction des cellules (**Davey et al., 2000**).

Selon **Siva et al. (2016)**, Ces extraits pourraient être utilisés comme ingrédients dans l'industrie pharmaceutique ou comme compléments alimentaires, car l'acide chlorogénique (CGA) a démontré des effets positifs sur la perte de poids et l'amincissement.

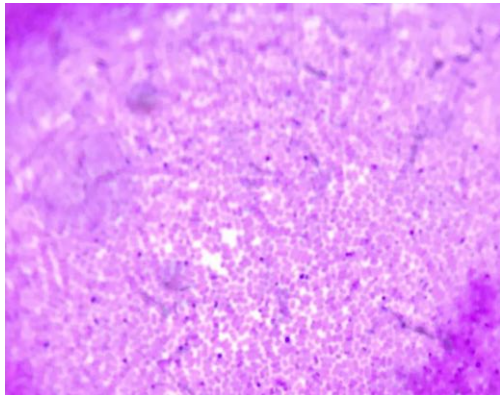
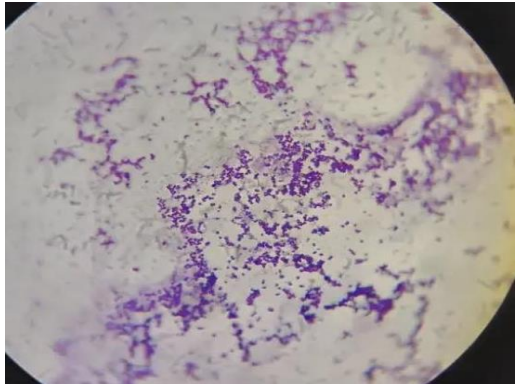
II.5. Résultats de l'évaluation de l'activité antibactérienne

II.5.1. Résultats de la vérification de la pureté de la souche

❖ Coloration de Gram

Les caractéristiques morphologiques observées sous microscope optique lors de l'identification bactérienne, sont résumées dans le tableau suivant :

Tableau XIII : Caractéristiques morphologiques observées chez les bactéries testées.

Espèce bactérienne	Observation sous microscope photonique au grossissement x100	Gram	Aspect morphologique
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	 <p><i>Escherichia coli</i> ATCC 25922</p>	Négatif	Bacille en rose
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	 <p><i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923</p>	Positif	Cocci en grappe en violet

II.5.2. Résultats de l'aromatogramme

L'évaluation de l'activité antibactérienne de l'extrait aqueux contre les bactéries *E. coli* ATCC 25922 et *S. aureus* ATCC 25923 a été réalisée en mesurant les zones d'inhibition autour des disques. La Gentamicine a été utilisée comme témoin positif, tandis que l'eau distillée a

servi de témoin négatif pour les deux souches étudiées. Les résultats obtenus grâce à cette méthode sont présentés dans les tableaux ci-dessous.

Tableau XIV (1) : Résultats de l'activité antibactérienne de l'extrait de la plante.





Souche testée Extrait étudié	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>S. aureus</i> ATCC 25923
Extrait aqueux pur		
Extrait aqueux dilué (1/2)		

Tableau XIV (2) : Résultats de l'activité antibactérienne de l'extrait aqueux de la plante.

Souche testée Extrait Étudié	Diamètres des zones d'inhibition en (mm)			
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922		<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	
	Extrait pur	Extrait dilué (1/2)	Extrait pur	Extrait dilué (1/2)
Extrait aqueux	12 mm (+)	(-)	20 mm (++)	15 mm (+)
Témoin négatif (eau distillé)	(-)	(-)	(-)	(-)
Témoin positif (Gentamicine)	35 mm (+++)	35 mm (+++)	38 mm (+++)	38 mm (+++)

Résistante (-) ; sensible (+) ; Très sensible (++) ; Extrêmement sensible (+++)

Les résultats obtenus montrent une variation dans le diamètre des zones d'inhibition entre les deux souches bactériennes. Cette différence dans l'activité antibactérienne met en évidence la diversité des composés chimiques de l'échantillon testé.

Il a été démontré qu'il y a une action inhibitrice sur la croissance des deux souches *E. coli* ATCC 25922 et *S. aureus* ATCC 25923.

Il convient de souligner que cet effet inhibiteur est plus prononcé vis-à-vis de *S. aureus* que d'*E. coli*.

Selon **Díaz-Hernánde et al. (2022)** l'extrait aqueux de café vert n'a démontré aucun effet antibactérien (CMI > 8 mg/mL) contre les souches bactériennes qui ont été testées, dont *E. coli* ATCC 25923, *S. aureus* ATCC 25923 ainsi que d'autres, contrairement à notre échantillon qui a révélé une activité significative. D'autre part, l'étude de **Tasew et al. (2020)** a évalué l'activité antibactérienne de différents extraits de café sur plusieurs souches bactériennes. Les extraits d'eau froide de café vert et de café torréfié n'ont montré aucune activité antibactérienne, mais les extraits d'eau bouillie, de méthanol et d'acétate d'éthyle ont présenté une activité antibactérienne. Les échantillons de café ont montré une activité antibactérienne significative, avec des variations entre les échantillons et les souches bactériennes testées.

La recherche d'effets antimicrobiens dans les extraits de plantes a gagné son importance récemment en raison de l'augmentation de la résistance bactérienne aux médicaments conventionnels (**Stefani et al., 2019**). Plusieurs études ont démontré que les extraits de café présentent des activités antibactériennes contre des pathogènes tels que *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* et *Enterococcus faecalis* (**Monenteet al., 2015 ; Getachew et al., 2018 ; Almeida et al., 2006 ; Torres-Valenzuela et al., 2019**).

II.6. Sélection des souches formatrices des biofilms

Les capacités des souches à former des biofilms ont été évaluées par une observation phénotypique en utilisant la méthode de Rouge Congo Agar telle que décrite par **Freeman et al. (1989)**. Cette méthode est une technique qualitative classique (**Mathur et al., 2006**). Les résultats obtenus sont indiqués dans le tableau XV et dans la figure 17.

Tableau XV : Formation de biofilm sur milieu RCA.

Souche	Couleur des colonies	Production des PIA	Interprétation
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	Noire foncée	+	Fortement formatrice
<i>E. coli</i> ATCC 25922	Translucide	-	Non formatrice

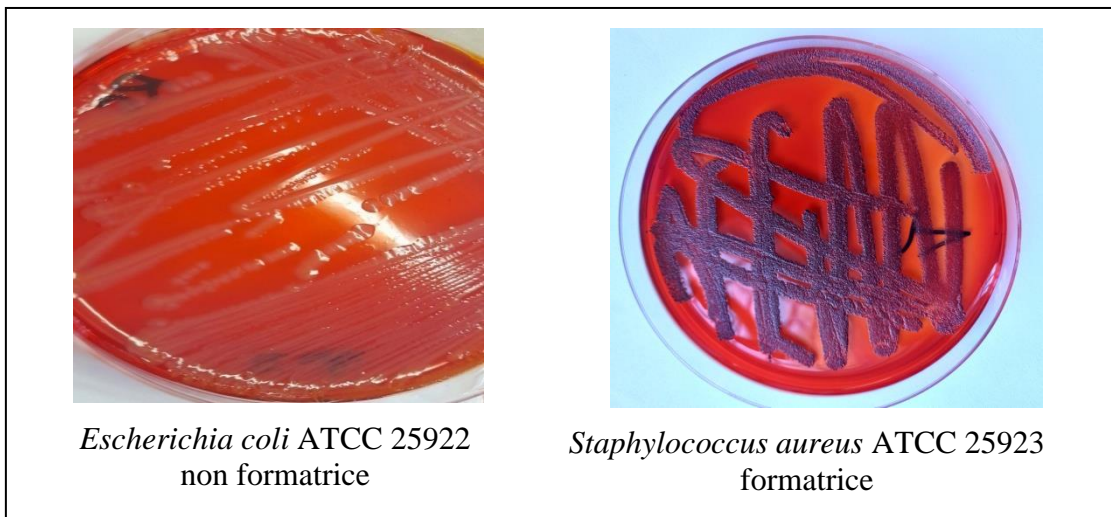


Figure 17 : Sélection des souches formatrices des biofilms sur milieu Rouge Congo Agar (RCA).

II.7. Résultats de l'évaluation de l'activité antibiofilm

L'activité antibiofilm de l'extrait aqueux de la poudre de café vert robusta étudiée a été réalisée sur le milieu solide RCA. Les résultats obtenus après 24 heures d'incubation sont présentés dans les tableaux suivants :

Tableau XVI : Résultats de l'activité antibiofilm de l'extrait aqueux de la poudre de café vert robusta.


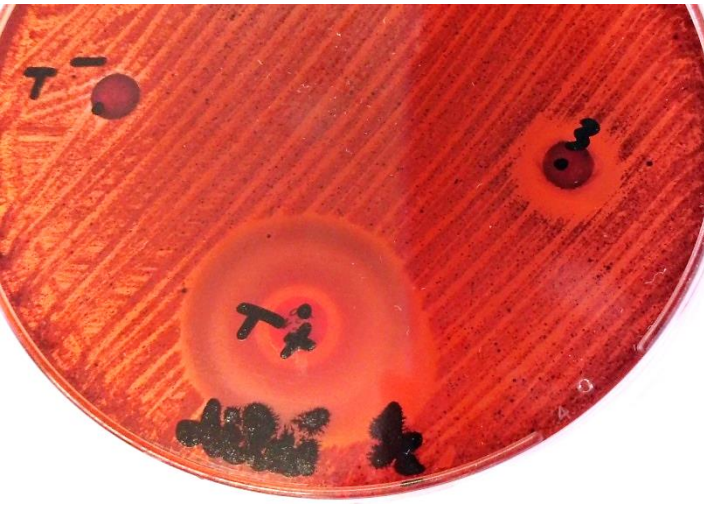
<p>Souche Testée</p> <p>Extrait Étudié</p>	<p><i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923</p>
<p>Extrait pur</p>	
<p>Extrait dilué</p>	

Tableau XVII : Résultats de l'activité antibiofilm de l'extrait aqueux de la poudre de café vert robusta.

Souche testée Extrait étudié	Diamètre des zones d'inhibition en (mm)	
	Staphylococcus aureus ATCC 25923	
	Extrait pur	Extrait dilué (1/2)
Extrait aqueux	18mm (++)	12mm (+)
Témoin négatif	(-)	(-)
Témoin positif	38mm (+++)	38mm (+++)

Résistante (-), sensible (+), Très sensible (++) , extrêmement sensible (+++)

D'après l'étude de **Duraffourd et al. (1990)** une zone d'inhibition inférieure à 8 mm indique une absence de sensibilité, une zone d'inhibition entre 8 et 14 mm est considérée comme une sensibilité limitée, tandis qu'une zone d'inhibition entre 14 et 20 mm correspond à une sensibilité moyenne. Enfin, un diamètre égal ou supérieur à 20 mm indique une forte sensibilité. Ces résultats confirment l'activité antibiofilm de l'extrait utilisé.

L'étude menée par **Sartini et al. (2019)** a révélé un résultat positif dans l'activité antibiofilm du café vert, avec une concentration inhibitrice médiane (IC₅₀) nécessaire pour inhiber la formation du biofilm de 14,6 mg/mL. De plus les recherches effectuées par **Aissaoui et al. (2021)** ont démontré que les extraits de *C. canephora* ont une activité antiadhésive supérieure à 70 % contre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. De même, le résultat obtenu par **Angcaya et al. (2019)** a mis en évidence une concentration minimale inhibitrice de 0,195% d'extrait d'acide chlorogénique du café vert, contre le biofilm formé par *Acinetobacter baumannii*. Selon cette étude l'acide chlorogénique présente une activité antibiofilm potentielle contre cette souche et qu'il existe une différence significative entre les antibiotiques disponibles dans le commerce et l'acide chlorogénique extrait des grains de café verts.

CONCLUSION

L'utilisation des plantes médicinales dans le domaine de la santé est une pratique ancienne qui gagne une popularité aujourd'hui. Elles sont une source importante de composés actifs, tels que les composés phénoliques (falvonoïdes, terpènes, acides chlorogénique, etc) et les alcaloïdes dont la caféine qui sont avérés avoir des propriétés antioxydants et antimicrobiennes.

Notre étude est menée sur la caractérisation physicochimique, phyto-chimique et l'évaluation de l'activité antibactérienne et antibiofilm des extraits d'une plante médicinale qui est le café vert.

Dans ce présent travail, diverses propriétés ont été examinées :

La partie physico-chimique de l'expérimentation nous a permis de mieux comprendre sa composition complexe et les molécules actives qui y sont présentes. Les analyses ont révélé la présence de composés phénoliques, d'autres antioxydants et composants qui confèrent au café vert ses propriétés bénéfiques pour la santé.

Les résultats ont révélé que les grains de café vert robusta (*Coffea canephora*) possèdent un pH acide, une faible teneur en eau, matière sèche élevée, une teneur en cendres élevée et une acidité importante.

D'après le screening phyto-chimique, les grains de café vert contiennent des molécules bioactives dont les tannins, tannins galliques, glucosides et les coumarines.

Le rendement en extrait sec est de l'ordre de 28,1 %, avec une teneur en polyphénols totaux de $64,54 \pm 0,14$ mg EAG/g MS.

L'évaluation de l'activité antibactérienne et antibiofilm de l'extrait aqueux sur les souches *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et *Escherichia coli* ATCC 25922, indique que l'extrait aqueux de *Coffea canephora* a un pouvoir antimicrobien intéressant vis-à-vis de ces souches.

Cependant, malgré ces résultats prometteurs, il est important de souligner que des études supplémentaires sont nécessaires pour mieux comprendre les mécanismes d'action des composés actifs du café vert et pour évaluer leur efficacité in vivo.

En conclusion, la caractérisation physico-chimique du café vert et l'évaluation de ses activités antibactériennes et antibiofilm ouvrent de nouvelles perspectives dans le domaine de la recherche antimicrobienne. Le café vert pourrait représenter une source précieuse de composés actifs pour le développement de nouveaux agents antimicrobiens, complétant ainsi l'arsenal thérapeutique existant dans la lutte contre les infections bactériennes et les biofilms.

Pour cela nous suggérons de compléter ce modeste travail par :

- Étude antioxydante et anticancéreuse

- Étude insecticide : grâce aux composés phénoliques qui peuvent agir comme insecticide naturel en tuant ou en repoussant les insectes nuisibles, ce qui permet le développement des alternatives plus écologiques aux pesticides chimiques.
- Étude des huiles essentielles qui offrent de nombreuses perspectives intéressantes en termes de bien être émotionnel, de santé physique, de beauté et de soins personnels, ainsi que de nettoyage naturel.
- Détermination des principes actifs de la plante.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

- 1) **Ahmed, S., Olsen, J. E., & Herrero-Fresno, A. (2017).** The genetic diversity of commensal *Escherichia coli* strains isolated from non-antimicrobial treated pigs varies according to age group. *PLoS One*, 12(5), e0178623.
- 2) **Aissaoui, M., Rahmoun, M., Latrache, H., Barek, S., Ellassri, A., Bensouici, C., El Hacı, I. & Choukchou-Braham, N. (2021).** Structural characterization, antioxidant, and antibiofilm activities of *Coffea canephora* green seeds. *Journal of Complementary and Integrative Medicine*, 18(1), 107-112. <https://doi.org/10.1515/jcim-2020-0046>
- 3) **Ali-Rachedi, F., Meraghni, S., Touaibia, N., & Mesbah, S. (2018).** Analyse quantitative des composés phénoliques d'une espèce endémique algérienne *Scabiosa Atropurpurea* sub. *Maritima* L. *Bulletin de la société royale des sciences de liège*.
- 4) **Almeida, A.A.P., Farah, A., Silva, D. A., Nunan, E. A., & Glória, M. B. A. (2006).** Antibacterial activity of coffee extracts and selected coffee chemical compounds against enterobacteria. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(23), 8738-8743.
- 5) **Angcaya, F. M. J., Bare, V. R. V., Remulla, A. C. A., & Stuart, L. M. S. (2019).** Antibiofilm activity of chlorogenic acid extracted from green coffee (*Coffea liberica*) beans against *acinetobacterbaumannii*. [Bachelor's thesis, De La Salle Medical and Health Sciences Institute]. GreenPrints. <https://greenprints.dlshsi.edu.ph/bsmls/3/>
- 6) **Aniszewski, T. (2015).** *Alkaloids: chemistry, biology, ecology, and applications*. Elsevier.
- 7) **Anonyme,** Botanique du café <https://www.hotellerie-restauration.ac-versailles.fr/cafeologie/diaporama/botanique.pdf>⁽¹⁾
- 8) **Anthony, F., Combes, M. C., Astorga, C., Bertrand, B., Graziosi, G., & Lashermes, P. (2002).** The origin of cultivated *Coffea arabica* L. varieties revealed by AFLP and SSR markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 104, 894-900.

- 9) **Anwar, S., Bhandari, U., Panda, B.P., Dubey, K., Khan, W., Ahmad, S. (2018).** Trigonelline inhibits intestinal microbial metabolism of choline and its associated cardiovascular risk. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 159, 100–112.
- 10) **Aref, M et Heded, M., (2014/2015).** Contribution à l'étude phytochimique, les activités biologiques (Antioxydante et Antibactérienne) d'une plante médicinale *Cleome arabica* L (Région d'Oued Souf).
- 11) **Avallone, S., Guyot, B., Brillouet, J.M., Olguin, E. and Guiraud, J.P., (2001b).** Microbiological and biochemical study of coffee fermentation. *Current Microbiolog* 42: 252-256.
- 12) **Babova, O., Occhipinti, A., Maffei, M.E. (2016).** Chemical partitioning and antioxidant capacity of green coffee (*Coffea arabica* and *Coffea canephora*) of different geographical origin. *Phytochemistry*,123: 33–39.
- 13) **Bakuradze, T., Boehm, N., Janzowski, C., Lang, R., Hofmann, T., Stockis, J. P., &Eisenbrand, G. (2011).** Antioxidant-rich coffee reduces DNA damage, elevates glutathione status and contributes to weight control: results from an intervention study. *Molecular nutrition & food research*, 55(5), 793-797.
- 14) **Balasundram, N., Sundram, K., &Samman, S. (2006).** Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*. 99(1), 191-203.
- 15) **Banerjee, P., Ali, Z., Levine, B., & Fowler, D. R. (2014).** Fatal caffeine intoxication: a series of eight cases from 1999 to 2009. *Journal of forensic sciences*, 59(3), 865-868.
- 16) **Belitz, H.D., Grosch, W., &Schieberle, P. (2009).** Coffee, tea, cocoa. *Food chemistry*, 938-970.
- 17) **Benhamama, L. (2015).** Contribution à l'étude phytochimique et évaluation de l'activité Antioxydante de la plante médicinale *Crataegus monogyna*.

- 18) **Benhamou, N. (2012).** Activité antioxydante des extraits des composés phénoliques de dix plantes médicinales de l'Ouest et du Sud-Ouest Algérien (Doctoral dissertation).
- 19) **Benmedjahed. A., (2017).** Effets de la consommation de café sur le profile lipidique chez les hommes. Mémoire de fin d'études pour l'obtention du diplôme Master en Nutrition et Santé, Université de Abou BekrBelkaid-Tlemcen.
- 20) **Berlanga, M., & Guerrero, R. (2016).** Living together in biofilms: the microbial cell factory and its biotechnological implications. *Microbialcellfactories*, 15(1), 1-11.
- 21) **Bjarnsholt, T. (2013).** The role of bacterial biofilms in chronic infections. *Apmis*, 121, 1-58.
- 22) **Bogino, P. C., & Oliva, M. (2013).** De la M., Sorroche FG, Giordano W. *International Journal of Molecular Sciences*, 30(14), 8.
- 23) **Boizot, N., & Charpentier, J. P. J. P. (2006).** Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. *Cahier des Techniques de l'INRA*, 79-82.
- 24) **Bouden, H et Kadri, A., (2019).** Contrôle de la qualité du café et du safran. Mémoire de fin d'étude pour l'obtention du diplôme de master en chimie des produits naturels. Université de Blida.
- 25) **Boukri N.E.H, (2014).** Contribution à l'étude phytochimique des extraits bruts des épices contenus dans le mélange Ras-el-hanout.
- 26) **Branda, S. S., Chu, F., Kearns, D. B., Losick, R., & Kolter, R. (2006).** A major protein component of the *Bacillus subtilis* biofilm matrix. *Molecular microbiology*, 59(4), 1229-1238.
- 27) **Breitler, J. C., Etienne, H., Léran, S., Marie, L., & Bertrand, B. (2022).** Description of an Arabica coffee ideotype for agroforestry cropping systems: A guideline for breeding more resilient new varieties. *Plants*, 11(16), 2133.

- 28) **bruca, S., Petrik, S., Benesova, P., Svoboda, Z., Eremka, L., & Marova, I. (2014).** Utilization of oil extracted from spent coffee grounds for sustainable production of polyhydroxyalkanoates. *Applied microbiology and biotechnology*, 98, 5883-5890.
- 29) **Bruneton, J. (2009).** Pharmacognosie, Phytochimie et plantes Médicinales. Technique et Documentation, 4^{ème} éd., Lavoisier, Paris.
- 30) **Camara, D., Bene, K., Gnahoue, G., & Zirihi, G. N. (2016).** Etude Ethnobotanique, Evaluation De L'activite Antifongique Sur Candida Albicans Et De La Toxicite Sur Des Cellules Hff De *Bersama Abyssinica* (Fresen.), Une Plante De La Pharmacopee Ivoirienne. *European Scientific Journal*, 12(3).
- 31) **Cambroni H. R. (1989).** Le caféier. Editions Maisonneuve et Larose, Paris, 166p.
- 32) **Castro, A. C. C. M., Oda, F. B., Almeida-Cincotto, M. G. J., Davanço, M. G., Chiari-Andréo, B. G., Cicarelli, R. M. B., ... & Santos, A. G. (2018).** Green coffee seed residue: A sustainable source of antioxidant compounds. *Food Chemistry*, 246, 48-57.
- 33) **Cepas, V., López, Y., Muñoz, E., Rolo, D., Ardanuy, C., Martí, S., ... & Soto, S. M. (2019).** Relationship between biofilm formation and antimicrobial resistance in gram-negative bacteria. *Microbial Drug Resistance*, 25(1), 72-79.
- 34) **Céspedes, S., Saitz, W., Del Canto, F., De la Fuente, M., Quera, R., Hermoso, M., ... & Vidal, R. M. (2017).** Genetic diversity and virulence determinants of *Escherichia coli* strains isolated from patients with Crohn's disease in Spain and Chile. *Frontiers in microbiology*, 8, 639.
- 35) **Chadha, T. (2014).** Bacterial biofilms: Survival mechanisms and antibiotic resistance. *Journal of Bacteriology & Parasitology*, 5(3), 1.
- 36) **Champéreaux. G., (1991).** Manuel du planteur de café Laotien, Département du Centre de Coopération Internationale rn Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD) E.P.I.C. –Siret 331S9627099976-R.C.S. Paris B 331596270 pais (France).

- 37) Chauhan, P. S., Sharma, P., Puri, N., & Gupta, N. (2014). A process for reduction in viscosity of coffee extract by enzymatic hydrolysis of mannan. *Bioprocess and biosystems engineering*, 37, 1459-1467.
- 38) Cherif-Antar, A., Moussa-Boudjemâa, B., Didouh, N., Medjahdi, K., Mayo, B., & Flórez, A. B. (2016). Diversity and biofilm-forming capability of bacteria recovered from stainless steel pipes of a milk-processing dairy plant. *Dairy science & technology*, 96, 27-38.
- 39) Chira, K., Suh, J.H., Saucier, C., & Teissèdre, P.L. (2008). Les polyphénols du raisin. *Phytothérapie*, 6, 75-82.
- 40) Ciofu, O., & Tolker-Nielsen, T. (2019). Tolerance and resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to antimicrobial agents—how *P. aeruginosa* can escape antibiotics. *Frontiers in microbiology*, 10, 913.
- 41) Coste R., (1989). « Caféiers et cafés », Editions G-P. Maisonneuve & Larose, Paris.
- 42) Costerton, J.W., Stewart, P.S., & Greenberg, E. P. (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, 284(5418), 1318-1322.
- 43) Costerton, J.W., Montanaro, L., Arciola, C.L., (2005). “Biofilm in implant infections: its production and regulation,”: e International Journal of Artificial Organs, vol. 28, no. 11, pp. 1062–1068.
- 44) Daniel, L., Hera, V., & Roberto, K. (2010). Biofilms. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2(7), a000398.
- 45) Daud, N. S. M., Zaidel, D. N. A., Song, L. K., Muhamad, I. I., & Jusoh, Y. M. M. (2016). Antioxidant properties of rice bran oil from different varieties extracted by solvent extraction methods. *Jurnal Teknologi*, 78(6-12).

- 46) Davey, M. W., Van Montagu, M., Inzé, D., Sanmartin, M., Kanellis, A., Smirnoff, N., Benzie, I. J. J., Strain, J. J., Favell, D. and Fletcher, J. (2000). Plant L-ascorbic acid: Chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(7) : 825 –860.
- 47) Debry, G., (1995). Le café. Sa composition, sa consommation, ses incidences sur la santé, Centre de Nutrition Humaine.
- 48) Delarras, C. (2007). Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire : Aliments, produits cosmétiques, eaux, produits pharmaceutiques. *Éditions Médicales Internationales, Lavoisier*.
- 49) Desai, N. M., Haware, D. J., Basavaraj, K., & Murthy, P. S. (2019). Microencapsulation of antioxidant phenolic compounds from green coffee. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 49(4), 400-406.
- 50) Díaz-Hernández, G. C., Alvarez-Fitz, P., Maldonado-Astudillo, Y. I., Jiménez-Hernández, J., Parra-Rojas, I., Flores-Alfaro, E., ... & Ramírez, M. (2022). Antibacterial, antiradical and antiproliferative potential of Green, Roasted, and spent coffee extracts. *Applied Sciences*, 12(4), 1938.
- 51) Dejmaoun, N. (2017). Contrôle de la qualité physico-chimique et analyse sensorielle d'un mélange de café (Robusta et Arabica). Mémoire de fin d'étude, Université Aboubekr Belkaid-Tlemcen, p19.
- 52) Donlan, R. M., & Costerton, J. W. (2002). Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical microbiology reviews*, 15(2), 167-193.
- 53) Dostál, J. (2000). Two faces of alkaloids. *Journal of Chemical Education*, 77(8), 993.
- 54) Dongari-Bagtzoglou, A. (2008). Pathogenesis of mucosal biofilm infections: challenges and progress. *Expert review of anti-infective therapy*, 6(2), 201-208.

- 55) Duraffourd, C., Hervicourt, L. d', & Lapraz, J.-C. (1990). Cahiers de phytothérapie clinique. 1. Examens de laboratoire galénique. Éléments thérapeutiques synergiques (2e éd.). Paris, France : Masson.
- 56) Dohou, R., Yamni, K., Tahrouch, S., Hassani, L. I., Badoc, A., & Gmira, N. (2003). Screening phytochimique d'une endémique iberomarocaine, *Thymelaea lythroïdes*. *Bulletin-Société de Pharmacie de Bordeaux*, 142(1/4), 61-78.
- 57) Eguchi, R., Ono, N., Horai, H., Amin, M. A. U., Hirai, A. M., Kawahara, J., ... & Kanaya, S. (2017). Classification of alkaloid compounds based on subring skeleton (srs) profiling: On finding relationship of compounds with metabolic pathways. *J Comput Aided Chem*, 18, 58-75.
- 58) Farah, Adriana, Tomas de Paulis, Luiz C. Trugo, et Peter R. Martin. (2005). « Effect of Roasting on the Formation of Chlorogenic Acid Lactones in Coffee ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53 (5): 1505-13. <https://doi.org/10.1021/jf048701t>.
- 59) Farias-Pereira, R., Park, C. S., & Park, Y. (2019). Mechanisms of action of coffee bioactive components on lipid metabolism. *Food Science and Biotechnology*, 28, 1287-1296.
- 60) Ferk, F., Huber, W. W., Grasl-Kraupp, B., Speer, K., Buchmann, S., & Bohacek, R. (2014). Protective effects of coffee against induction of DNA damage and preneoplastic foci by aflatoxin B₁. *Molecular Nutrition & Food Research*, 58(2), 229-238. doi:10.1002/mnfr.201300154.
- 61) Flemming, H. C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S. A., & Kjelleberg, S. (2016). Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nature Reviews Microbiology*, 14(9), 563-575.
- 62) Flemming, H.C & Wuertz, S. (2019). Bacteria and archaea on Earth and their abundance in biofilms. *Nature Reviews Microbiology*, 17(4), 247-260.

- 63) Franca, A.S., et Leandro S. Oliveira. (2019). « Coffee ». In *Integrated Processing Technologies for Food and Agricultural by Products*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814138-0.00017-4>.
- 64) Franca, A.S, Mendonça. J. C. F et Oliveira. M. B. P. P., (2005). Composition of Green and Roasted Coffees of different Cup Qualities. *LWT*, 38, pp 709715.
- 65) Freeman, D. J., Falkiner, F. R., & Keane, C. T. (1989). New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *Journal of clinical pathology*, 42(8), 872-874.
- 66) Friedman, L., & Kolter, R. (2004). Two genetic loci produce distinct carbohydrate-rich structural components of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix.
- 67) Fukutomi, R., Ohishi, T., Koyama, Y., Pervin, M., Nakamura, Y., & Isemura, M. (2021). Beneficial effects of epigallocatechin-3-O-gallate, chlorogenic acid, resveratrol, and curcumin on neurodegenerative diseases. *Molecules*, 26(2), 415.
- 68) Galié, S., García-Gutiérrez, C., Miguélez, E. M., Villar, C. J., & Lombó, F. (2018). Biofilms in the food industry: Health Chapter IV—Interspecies Interactions of *E. coli* and *S. Enteritidis* in *Dual-species Biofilms and their Control by Phages aspects and control methods*. *Front Microbiol*, 9, 1-18.
- 69) Getachew, A. T., Cho, Y. J., & Chun, B. S. (2018). Effect of pretreatments on isolation of bioactive polysaccharides from spent coffee grounds using subcritical water. *International journal of biological macromolecules*, 109, 711-719.
- 70) Gonzalez-Rios, O., Suarez-Quiroz, M. L., Boulanger, R., Barel, M., Guyot, B., Guiraud, J. P., & Schorr-Galindo, S. (2007). Impact of “ecological” post-harvest processing on the volatile fraction of coffee beans: I. Green coffee. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20(3-4), 289-296.
- 71) Haler, P. N. G. (2013). Le café : les effets bénéfiques et néfastes sur la santé. *Thèse de Doctorat en Pharmacie, Université de Lorraine*, 171.

- 72) Hall-Stoodley, L., Costerton, J.W., & Stoodley, P. (2004). Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nature reviews microbiology*, 2(2), 95-108.
- 73) Hall-Stoodley, L., & Stoodley, P. (2009). Evolving concepts in biofilm infections. *Cellular microbiology*, 11(7), 1034-1043.
- 74) Happonen, P., Läärä, E., Hiltunen, L., & Luukinen, H. (2008). Coffee consumption and mortality in a 14-year follow-up of an elderly northern Finnish population. *British journal of nutrition*, 99(6), 1354-1361.
- 75) Hčimović, Ivana, Ana Belščak-Cvitanović, Dunja Horžić, et Draženka Komes. (2011). «Comparative Study of Polyphenols and Caffeine in Different Coffee Varieties Affected by the Degree of Roasting». *Food Chemistry*: 991-1000. <https://doi.org/j.foodchem.2011.05.059>.
- 76) Hiramoto K; Li .X, Makimoto. M, Kato. T, Kikugawa. K., (1998). Identification of hydroxyl hydroquinone in coffee as a generator of reactive oxygen species that break DNA single strands. *Mutation Research*, 419, pp 43 -51.
- 77) Høiby, N., Bjarnsholt, T., Givskov, M., Molin, S., & Ciofu, O. (2010). Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *International journal of antimicrobial agents*, 35(4), 322-332.
- 78) Høiby, N. (2017). A short history of microbial biofilms and biofilm infections. *Apmis*, 125(4), 272-275.
- 79) Houessou, J. K. (2007). Les hydrocarbures aromatiques polycycliques dans le café : mise au point de méthodes analytiques et étude de l'étape de torréfaction. *Ecole Doctorale ABIES, Paris*.
- 80) Inoue, M., Tajima, K., Hirose, K., Hmajima, N., Takezaki, T., Kuroishi, T., ET Tominaga, S., (1998). Tea and Coffee consumption and the risk of digestive tract cancers:

data from a comparative case-referent study in Japan, *Cancer Causes Control*, 9, pp 209-216.

- 81) (ICO), I.C.O, 2019. *About Coffee*. Available in : www.ico.org/.
- 82) Jiang, W., Wu, Y., & Jiang, X. (2013). Coffee and caffeine intake and breast cancer risk: an updated dose–response meta-analysis of 37 published studies. *Gynecologic oncology*, 129(3), 620-629.
- 83) Kaiser, T. D. L., Pereira, E. M., Dos Santos, K. R. N., Maciel, E. L. N., Schuenck, R. P., & Nunes, A. P. F. (2013). Modification of the Congo red agar method to detect biofilm production by *Staphylococcus epidermidis*. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 75(3), 235-239.
- 84) Kaur, M., Tyagi, S., & Kundu, N. (2018). Effect of brewing methods and time on secondary metabolites, total flavonoid and phenolic content of green and roasted coffee *Coffea arabica*, *Coffea canephora* and Monsoonedmalabar. *Eur. J. Med. Plants*, 1-16.
- 85) Kipkorir, R. K. (2015). Effects of coffee processing technologies on physico chemical properties and sensory qualities of coffee.
- 86) Kumar, U., Kumar, B., Bhandari, A., & Kumar, Y. (2010). Phytochemical investigation and comparison of antimicrobial screening of clove and cardamom. *Int J Pharm Sci Res*, 1(12), 138-147.
- 87) Lafay, S., & Gil-Izquierdo, A. (2008). Bioavailability of phenolic acids. *Phytochemistry Reviews*, 7, 46-59.
- 88) Lahtz, C., & Pfeifer, G. P. (2011). Epigenetic changes of DNA repair genes in cancer. *Journal of molecular cell biology*, 3(1), 51-58.
- 89) Larsson, S. C., & Wolk, A. (2007). Coffee consumption and risk of liver cancer: a meta-analysis. *Gastroenterology*, 132(5), 1740-1745.

- 90) Lee, L. W., Tay, G. Y., Cheong, M. W., Curran, P., Yu, B., & Liu, S. Q. (2017). Modulation of the volatile and non-volatile profiles of coffee fermented with *Yarrowialipolytica*: I. Green coffee. *LWT*, 77, 225-232. Liczbiński, P., & Bukowska, B. (2022). Tea and coffee polyphenols and their biological properties based on the latest in vitro investigations. *Industrial Crops and Products*, 175, 114265.
- 91) Liu C., Yang N., Yang Q., Ayed C., Linforth R., Fisk ID, (2018). Enhancing Robusta coffee aroma by modifying flavour precursors in the green coffee bean. *Food Chemistry*. 281 : 8-17
- 92) Lopez Garcia, E., van Dam, R.M, et al., (2006). Coffee consumption and coronary heart disease in men and women:a prospective cohort study ; 113(17) : 204553.
- 93) Macheix, J. J., Fleuriet, A. et Billot, J., (1990). *Fruitphenolics*, CRC press, Boca Raton, 378p.
- 94) Macheix, J. J., Fleuriet, A. et Christian J.A., (2005). *Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires d'importances économiques*. Collection biologie, Presses polytech. Et universitaires Romandes, 192p.
- 95) Manach, C., Williamson, G., Morand, C., Scalbert, A., &Rémésy, C. (2005). Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 81(1), 230S-240S.<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409517-5.00021-8>.
- 96) Martin, M.J., Pablos, F. et Gonzalez, A.G., (1998). Discrimination between Arabica and Robusta Green Coffe varieties according to their chemical composition, *Talanta*, 46, pp 1259-1264.
- 97) Masoud, W., Cesar, L.B., Jespersen, L. and Jakobsen, M., (2004). Yeast involved in fermentation of *Coffea arabica* in East Africa determined by genotyping and by direct denaturing gradient gel electrophoresis. *Yeast* 21: 549-556.

- 98) Maysarah, H., Sari, I., Faradilla, M., & Kwok, K. (2020).** Formulation of effervescent granule from robusta green coffee bean ethanolic extract (Coffeacanephora). *Journal of pharmacy&BioAllied sciences*, 12(Suppl 2), S743.
- 99) Mazmanian, S. K., Liu, G., Jensen, E. R., Lenoy, E., & Schneewind, O. (2000).** Staphylococcus aureus sortasemutants defective in the display of surface proteins and in the pathogenesis of animal infections. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(10), 5510-5515.
- 100) Mehari, B., Chandravanshi, B. S., Redi-Abshiro, M., Combrinck, S., McCrindle, R., & Atlabachew, M. (2021).** Polyphenol contents of green coffee beans from different regions of Ethiopia. *International Journal of Food Properties*, 24(1), 17-27.
- 101) Michelle. J, Martine. S.G, Daniel. D., (2003).** Terres de café. France : Editions Quae. Ed1, p 120.
- 102) Michel, B, (2008).** Café : de la cerise à la tasse. Editions Techniques de l'Ingénieur. 1, p4.
- 103) Moeenfarid, M., Cortez, A., Machado, V., Costa, R., Luís, C., Coelho, P., ... & Santos, A. (2016).** Anti-angiogenic properties of Cafestol and Kahweol palmitate diterpene esters. *Journal of cellular biochemistry*, 117(12), 2748-2756.
- 104) Monente, C., Bravo, J., Vitas, A. I., Arbillaga, L., De Peña, M. P., & Cid, C. (2015).** Coffee and spent coffee extracts protect against cell mutagens and inhibit growth of food-borne pathogen microorganisms. *Journal of Functional Foods*, 12, 365-374.
- 105) Muhammad, M. H., Idris, A. L., Fan, X., Guo, Y., Yu, Y., Jin, X., ... & Huang, T. (2020).** Beyond risk: bacterial biofilms and their regulating approaches. *Frontiers in microbiology*, 11, 928.
- 106) Mussatto, S. I., Machado, E. M., Martins, S., & Teixeira, J. A. (2011).** Production, composition, and application of coffee and its industrial residues. *Food and Bioprocess Technology*, 4, 661-672.

- 107) Naidu, M. M., Sulochanamma, G., Sampathu, S. R., & Srinivas, P. (2008).** Studies on extraction and antioxidant potential of green coffee. *Food Chemistry*, 107(1), 377-384.
- 108) Narita, Yusaku, et KuniyoInouye. (2015)** « Chlorogenic Acids from Coffee ». In *Coffee in Health and Disease Prevention*, 189-99. Elsevier.
- 109) Nemlin, G. J., Irie, Z. B., Ban-Koffi, L., Koffi, N., Legnate, Y., Yoro, G., ... &Amani, G. (2009).** Caractéristiques physico-chimiques et organoleptiques du Café robusta (*Coffeacanephora* L.) en fonction des terroirs et des techniques culturales en Côte d'Ivoire. *Agronomie Africaine*, 21(2).
- 110) NFV 05-108., (1970).** Produit de l'agriculture. Produit dérivés des fruits et légumes. Détermination conventionnelle du potentiel hydrogène.
- 111) NFV 05-113., (1972).** Détermination des cendres totales, Vol 49, n°4,0289-0298.
- 112) NFV 05-101., (1974).** Produit dérivent des fruits et légumes. Détermination de l'acidité titrable.
- 113) Oosterveld, A., Harmsen, Voragen, Voragen, A.G.J. ET Schols, H.A., (2003).** Extraction and characterization of polysaccharides from green and roasted coffea Arabica beans, *carbohydrate Polymers*, 52, pp 285-269.
- 114) Organisation internationale du café (2013)** Revue annuelle 2011/12. Londres.
- 115) O'Toole, G., Kaplan, H. B., &Kolter, R. (2000).** Biofilm formation as microbial development. *Annual Reviews in Microbiology*, 54(1), 49-79.
- 116) Park, S. Y., Kim, J. S., Lee, S. G., Kim, Y. K., Ahn, Y. M., & Choi, Y. H. (2016).** Chemopreventive effects of kahweol on UVB-induced skin carcinogenesis. *PloS One*, 11(8), e0161026. doi: 10.1371/journal.pone.0161026.

- 117) Pauwels, E. K., & Volterrani, D. (2021).** Coffee consumption and cancer risk: an assessment of the health implications based on recent knowledge. *Medical Principles and Practice*, 30(5), 401-411.
- Percival, S. L., Suleman, L., Vuotto, C., & Donelli, G. (2015).** Healthcare-associated infections, medical devices and biofilms: risk, tolerance and control. *Journal of medical microbiology*, 64(4), 323-334.
- 118) Pauwels, E. K., & Volterrani, D. (2021).** Coffee consumption and cancer risk: an assessment of the health implications based on recent knowledge. *Medical Principles and Practice*, 30(5), 401-411.
- 119) Pederson, S. and Breed S., (1945).** Fermentation of coffee. *Journal of Food Science* Volume 11: 99–106.
- 120) Perdani, C. G., & Pranowo, D. (2019, February).** Total phenols content of green coffee (*Coffea arabica* and *Coffea canephora*) in East Java. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* (Vol. 230, No. 1, p. 012093). IOP Publishing.
- 121) Perez, C. (1990).** Antibiotic assay by agar-well diffusion method. *Acta Biol Med Exp*, 15, 113-115.
- 122) Pimpley, V., Patil, S., Srinivasan, K., Desai, N., & Murthy, P. S. (2020).** The chemistry of chlorogenic acid from green coffee and its role in attenuation of obesity and **Rendueles, O., Kaplan, J. B., & Ghigo, J. M. (2013).** Antibiofilm polysaccharides. *Environmental microbiology*, 15(2), 334-346
- 123) Pinto, R. M., Soares, F. A., Reis, S., Nunes, C., & Van Dijck, P. (2020).** Innovative strategies toward the disassembly of the EPS matrix in bacterial biofilms. *Frontiers in Microbiology*, 11, 952.
- 124) Poisson, R. (1979).** « Aspects chimiques et biologiques de la composition du café vert », VIII^e Colloque Scientifique International sur le Café, Abidjan, ASCI (Paris).

- 125) Poisson, L., Blank, I., Dunkel, A., & Hofmann, T. (2017). The chemistry of roasting—Decoding flavor formation. In *The craft and science of coffee*, pp. 273-309(293). Academic Press.
- 126) Polamuri, D., Valentina, C. H., Suresh, R., & Islam, A. (2020). In-vitro anticancer and antioxidant activity of green coffee beans extract. *Asian Food Science Journal*, 17(2), 24-35.
- 127) Priftis, A., Panagiotou, E. M., Lakis, K., Plika, C., Halabalaki, M., & Ntasi, G. (2018). Roasted and green coffee extracts show antioxidant and cytotoxic activity in myoblast and endothelial cell lines in a cell specific manner. *Food and Chemical Toxicology*, 114, 119-127.
- 128) RABAH, A., REDHA, B. H. M., & AMINA, B. (2021). *PREVALENCE DE CONTAMINATION DE GRAIN DE CAFE PAR LES MOISSURES MYCOTOXINOGENES* (Doctoral dissertation, Faculté Sciences de la Nature et de la Vie).
- 129) Ran, H. Q., Wang, J. Z., & Sun, C. Q. (2016). Coffee consumption and pancreatic cancer risk: An update meta-analysis of cohort studies. *Pakistan journal of medical sciences*, 32(1), 253.
- 130) Rosche, B., Li, X. Z., Hauer, B., Schmid, A., & Buehler, K. (2009). Microbial biofilms: a concept for industrial catalysis. *Trends in biotechnology*, 27(11), 636-643.
- 131) Roussos, S., Aquiahuatl, M.D., Trejohernandez, M.D., Perraud, I.G., Favela, E., Ramakrishna, M., Raimbault, M. and Viniéragonzalez, G., 1995. Biotechnological Management of Coffee Pulp - Isolation, Screening Characterization, Selection of Caffeine Degrading Fungi and Natural Microflora Present in Coffee Pulp and Husk. *Applied Microbiology and Biotechnology* 42: 756-762.
- 132) Sartini, S., Djide, M. N., & Nainu, F. (2019). Correlation phenolic concentration to antioxidant and antibacterial activities of several ethanolic extracts from Indonesia. In *Journal of Physics: Conference Series* (Vol. 1341, No. 7, p. 072009). IOP Publishing.

- 133) Scalabrin, S., Toniutti, L., Di Gaspero, G., Scaglione, D., Magris, G., Vidotto, M., ... & Bertrand, B. (2020).** A single polyploidization event at the origin of the tetraploid genome of *Coffea arabica* is responsible for the extremely low genetic variation in wild and cultivated germplasm. *Scientific reports*, *10*(1), 1-13.
- 134) Schmit, S. L., Rennert, H. S., Rennert, G., & Gruber, S. B. (2016).** Coffee consumption and the risk of colorectal cancer. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, *25*(4), 634-639. **Shahidi, F., & Chandrasekara, A. (2010).** Hydroxycinnamates and their in vitro and in vivo antioxidant activities. *Phytochemistry Reviews*, *9*, 147-170
- 135) Sharma, S., Cui, Y., He, Q., Mohammadi, R., & Li, Z. (2018).** Data-driven optimization of railway maintenance for track geometry. *Transportation Research Part C: Emerging Technologies*, *90*, 34-58.
- 136) Silabdi, S. (2010).** *Purification et caractérisation d'antioxydants naturels en vue d'une valorisation nutritionnelle* (Doctoral dissertation, Blida).
- 137) Silva, C.F., Schwan, R.F., Dias, E.S. and Wheals, A.E., (2000).** Microbial diversity during maturation and natural processing of coffee cherries of *Coffea arabica* in Brazil. *International Journal of Food Microbiology* *60*: 251-260.
- 138) Silva, C.F., Batista, L.R., Abreu, L.M., Dias, E.S. and Schwan, R.F., (2008a).** Succession of bacterial and fungal communities during natural coffee (*Coffea arabica*) fermentation. *Food Microbiology* *25*: 951-957.
- 139) Silva, C.F., Batista, L.R. and Schwan, R.F., (2008b).** Incidence and distribution of filamentous fungi during fermentation, drying and storage of coffee (*Coffea Arabica L.*) beans. *Brazilian Journal of Microbiology* *39*: 521-526.
- 140) Singh, S., Singh, S. K., Chowdhury, I., & Singh, R. (2017).** Understanding the mechanism of bacterial biofilms resistance to antimicrobial agents. *The open microbiology journal*, *11*, 53.

- 141) Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965).** Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144-158.
- 142) Siva, R., Rajikin, N., Haiyee, Z. A., & Ismail, W. I. W. (2016).** Assessment of antioxidant activity and total phenolic content from green coffee robusta sp. beans. *Malaysian Journal of Analytical Sciences*, 20(5), 1059-1065.
- 143) Sivalokanathan, S., Malek, L. A., & Malhotra, A. (2021).** The cardiac effects of performance-enhancing medications: caffeine vs. anabolic androgenic steroids. *Diagnostics*, 11(2), 324.
- 144) Stadheim, H. K., Spencer, M., Olsen, R., & Jensen, J. (2015).** Caffeine and performance over consecutive days of simulated competition.
- 145) Stanley, N. R., & Lazazzera, B. A. (2005).** Defining the genetic differences between wild and domestic strains of *Bacillus subtilis* that affect poly- γ -DL-glutamic acid production and biofilm formation. *Molecular microbiology*, 57(4), 1143-1158.
- 146) Stefani, T., Garza-González, E., Rivas-Galindo, V. M., Rios, M. Y., Alvarez, L., & Camacho-Corona, M. D. R. (2019).** *Hechtia glomerata* Zucc: phytochemistry and activity of its extracts and major constituents against resistant bacteria. *Molecules*, 24(19), 3434.
- 147) Stevanovic, T. (2005).** Automne : Chimie du bois. CHM-22170, Université Laval, Québec, Canada, 6.6-6.20.
- 148) Socala, K., Szopa, A., Serefko, A., Poleszak, E., & Wlaź, P. (2020).** Neuroprotective effects of coffee bioactive compounds: a review. *International journal of molecular sciences*, 22(1), 107.
- 149) Talbi, M. (2015).** *Dosage des polyphénols de la plante d'Artemisia Campestri L. par chromatographie HPLC. Mise en évidence de l'activité biologique* (Doctoral dissertation, Thèse de Magister. Faculté des Sciences Exactes et Appliqués. Université d'Oran 1 Ahmed Benbella. 2014-2015. (U)).

- 150) Tasew, T., Mekonnen, Y., Gelana, T., Redi-Abshiro, M., Chandravanshi, B. S., Ele, E., ... & Mamo, H. (2020).** In vitro antibacterial and antioxidant activities of roasted and green coffee beans originating from different regions of Ethiopia. *International Journal of Food Science*, 2020.
- 151) Torres-Valenzuela, L. S., Ballesteros-Gomez, A., Sanin, A., & Rubio, S. (2019).** Valorization of spent coffee grounds by supramolecular solvent extraction. *Separation and Purification Technology*, 228, 1157590.
- 152) Tverdal, A. (2015).** Boiled coffee consumption and the risk of prostate cancer: follow-up of 224,234 Norwegian men 20–69 years. *British journal of cancer*, 112(3), 576-579.
- 153) Van Pee, W., Castelein, J.M., (1972).** Study of the pectinolytic microflora, particularly the Enterobacteriaceae, from fermenting coffee in the Congo. *Food Sci.*, 37: 171-174.
- 154) Vats, A. (2022).** Pharmacological properties of Green coffee: A review.
- 155) Vestby, L. K., Grønseth, T., Simm, R., & Nesse, L. L. (2020).** Bacterial biofilm and its role in the pathogenesis of disease. *Antibiotics*, 9(2), 59.
- 156) Vila, J., Sáez-López, E., Johnson, J. R., Römling, U., Dobrindt, U., Cantón, R., ... & Soto, S. M. (2016).** Escherichia coli: an old friend with new tidings. *FEMS microbiology reviews*, 40(4), 437-463.
- 157) Wasim, S., Kukkar, V., Awad, V. M., Sakhamuru, S., & Malik, B. H. (2020).** Neuroprotective and neurodegenerative aspects of coffee and its active ingredients in view of scientific literature. *Cureus*, 12(8).
- 158) Xue, Y., Huang, F., Tang, R., Fan, Q., Zhang, B., Xu, Z., Sun, X., & Ruan, Z. (2019).** Chlorogenic acid attenuates cadmium-induced intestinal injury in Sprague-Dawley rats. *Food Chemistry and Toxicology*, 133, 110751. doi: 10.1016/j.fct.2019.110751.

- 159) **Yang, L., & Stöckigt, J. (2010).** Trends for diverse production strategies of plant medicinal alkaloids. *Natural product reports*, 27(10), 1469-1479.
- 160) **Youla, A et Latrous, IE., (2017).** Contribution à l'étude phytochimique des flavonoidesches l'espèce (*Melissa officinalis L*) et évaluation de leur pouvoir antibactérien.
- 161) **Yu, X., Bao, Z., Zou, J., & Dong, J. (2011).** Coffee consumption and risk of cancers: A meta-analysis of cohort studies. *BMC Cancer*, 11(96), 1-14.

