



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي



RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Université des Frères Mentouri Constantine 1

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biochimie et Biologie Cellulaire et moléculaire

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة 1

كلية علوم الطبيعة والحياة

قسم الكيمياء الحيوية والبيولوجيا الخلوية والجزيئية

N° d'ordre :

Série :

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : *Biochimie Appliqué*

Thème

*Etude comparative de l'aspect chimique et biologique du marc
de café récupéré par la méthode de filtration et de décoction*

Présenté par

BENAHMED Chaima & BELKHAIRI Chahinez

Soutenu le : 22/09/2020

Devant le jury

Présidente

M^{me} AGGOUNE Moufida

MCA à l'institut de la nutrition, de l'alimentation et
des technologies agro-alimentaires (INATAA),
Constantine.

Encadreur :

M^{me} AMOKRANE Serine

Maitre de recherche B, Centre de .Recherche en
Biotechnologie (CRBt).

Examineur:

Mr : BENSOUICI Chawki

Maitre de recherche B, Centre de .Recherche en
Biotechnologie (CRBt)

*Année universitaire
2019 – 2020*

Remerciement

On tient tout d'abord à remercier en premier lieu Allah le tout puissant pour toute la volonté et le courage qu'il nous a donné pour accomplir ce modeste travail.

Un grand merci à notre Encadreur Amokrane sirine Maitre de recherche au niveau de centre de recherche en biotechnologie de Constantine, qui a tout d'abord acceptée la conduite et la direction de notre mémoire, par son soutien, ses conseils et ses encouragement et merci de nous intégrer au CRBt.

Nous remercions Mme. AGGOUNE Moufida (MCA à l'institut de la nutrition, de l'alimentation et des technologies agro-alimentaires (INATAA) de Constantine d'avoir acceptée de présider le jury d'évaluation de notre travail. Nous remercions également Mr BENSOUICI Chawki maitre de recherche classe B, chef laboratoire de biochimie au niveau de CRBt pour son grand aide et sa grande patience qu'il a manifestée.

Nos remercions toute l'équipe de centre de recherche en biotechnologie (CRBt), et surtout laboratoire des aliments au niveau de CRBt pour leur accueil, leur sympathie ainsi que leurs idées constructives.

Enfin, nous adressons nos plus sincères remerciements à nos familles ainsi qu'à toute personne qui contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Dédicace

Je dédie ce modeste travail

A mes très chers parents ; ma mère FATIHA et mon père ABDELOUAHEB .Aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices que vous avez consenti pour mon instruction et mon bien. J'espère que par ce modeste travail je vous rends un peu de ce sentiment de fierté que j'éprouve d'être votre fille, et qu'il sera le fruit de vos innombrables sacrifices. Puisse dieu le très haut vous accorde santé, bonne heure et longue vie.

A mes très chères sœur AMIRA et CELIA et mon petit frère ISLEM pour leur soutien moral et leur amour.

A toute la famille BELKHAIRI et ARGOUBE

A toute mes collègues de la promotion biochimie appliquée.

A toutes les personnes qui ont contribué à mon éducation mon enseignement et ma formation.

CHAHINEZ

Dédicace

Ce travail, et bien au-delà, je le dédie à

Ma mère, mère, qui a œuvré pour ma réussite, de par son amour, son soutien, tous les sacrifices consentis et ses précieux conseils, pour toute son assistance et sa présence dans ma vie, reçois à travers ce travail aussi modeste soit-il, l'expression de mes sentiments et de mon éternelle gratitude.

Mon père, qui peut être fier et trouver ici le résultat de longues années de sacrifices et de privations pour m'aider à avancer dans la vie. Puisse Dieu faire en sorte que ce travail porte son fruit ; Merci pour les valeurs nobles, l'éducation et le soutien permanent venu de toi.

Mon frère Adam, mes sœurs Hanane et Hadjer pour leur soutien et leur présence que dieux vous garde pour moi

A ma chère copine chahinez

A wail, merci pour votre présence et votre aide et ton soutien moral.

A la mémoire de mon cher grand père allah yarahamo

À tous ceux et toutes celles Qui m'ont accompagné et soutenu

Durant la réalisation de ce travail

CHAIMA

TABLE DES MATIERES

Introduction générale.....	1
----------------------------	---

Première partie : Revue Bibliographique

Chapitre I : Le marc du café

1. Définition.....	03
2. les propriétés du marc de café.....	03
2.1. Propriétés physiques du marc de café.....	03
2.2. Propriétés chimiques du marc de café.....	03
2.3. Composition secondaire du marc de café.....	05
2.4. Propriétés bioactives du marc de café.....	05
3. Domaines de valorisation du marc de café.....	06
3.1. Production de biocarburants.....	06
3.2. Agriculture et production de composts.....	06
3.3. Production de charbon actif.....	06
3.4. Substrat pour la culture des micro-organismes et de champignons comestibles.....	07
3.5. Matière première pour l'industrie pharmaceutique et cosmétique.....	07

Chapitre II : Les différentes méthodes de préparation du café

1. La préparation de café.....	09
1.1. La mouture.....	09
1.2. L'eau.....	09
2. Les méthodes de préparation du café.....	10
2.1. La décoction (café turque).....	10
2.2. La filtration avec la pression.....	11
2.2.1. L'espresso.....	11
2.2.2. Café italienne (Moka).....	12
2.2.3. La cafetière à dépression de type Cona.....	12
2.2.4. La cafetière à piston (French Press).....	13
2.3. filtration avec gravitation (cafetière à filtre).....	14

Chapitre III : Les principaux composés secondaires isolés du café et du marc de café

1. Les principaux composés secondaires isolés du café.....	15
1.1. Les alcaloïdes.....	16
1.2. Les terpénoïdes.....	17
1.3. Les acides phénoliques.....	18
2. Les principaux composés secondaires isolés du marc de café.....	19
2.1. Les polyphénols.....	19
2.2. Les tanins.....	19

Deuxième partie : Matériel et Méthodes

1 Echantillonnage	20
2. Préparation du marc de café.....	20
3. Analyse chimique des échantillons.....	21
3.1. Détermination de la matière sèche (MS).....	21
3.2. Détermination de la matière minérale (MM).....	22
3.3. Détermination de la teneur en matière grasse (MG).....	23
4. Analyse phytochimique des échantillons.....	24
4.1. Préparation des extraits.....	24
4.2. Détermination du contenu en total phénolique (TPC).....	25
4.3. Détermination du contenu en Flavonoïdes totaux (TFC).....	26
5. Evaluation du potentiel antioxydant des échantillons.....	26
5.1. L'activité antiradicalaire au DPPH.....	27
5.2. L'activité de réduction du complexe cuivre - néocuproïne (CUPRAC).....	28
5.3. Activité du pouvoir réducteur (FRAP).....	29
5.4. L'activité de réduction par la formation du complexe Fe ⁺² Phénanthroline	30
6. Evaluation du potentiel enzymatique des échantillons.....	31
6.1. Evaluation de l'activité anti diabétique.....	31
6.2. Evaluation de l'activité anti Alzheimer.....	32
7. Analyse statistique.....	33

Troisième partie : Résultats et Discussion

1. Analyse chimique des échantillons.....	34
1.1 Teneur en eau et matière sèche.....	34
1.2 Teneur en Matière minérale.....	35
1.3 Teneur en Matière grasse.....	35
2. Analyses colorimétriques par spectrophotométrie (UV-Visible).....	35
2.1 Détermination de la teneur en phénols totaux (PT).....	35
2.2 Détermination de la teneur en flavonoïdes totaux (FT).....	36
3. Evaluation du potentiel antioxydant des échantillons.....	37
3.1 L'activité du piégeage du radical libre DPPH.....	37
3.2 L'activité antioxydante par réduction du cuivre (CUPRAC).....	38
3.3 Activité du pouvoir réducteur (FRAP).....	40
3.4 Activité de réduction par la formation du complexe Fe ⁺² -phénanthroline.....	41
4. Evaluation du potentiel enzymatique des échantillons.....	42
4.1. L'activité antidiabétique des échantillons.....	43
4.2. L'activité anticholinestérase des échantillons.....	44
Conclusion générale	45
Références bibliographiques	47

Annexes

Résumé

Abstract

ملخص

LISTE DES FIGURES

Figure 01	Le marc du café.....	03
Figure 02	L'utilisation du marc de café comme fertilisant.....	07
Figure 03	L'utilisation du marc de café pour la culture des champignons.....	08
Figure 04	L'utilisation du marc de café comme gommage e la peau.....	08
Figure 05	Le café turc ou la décoction (ibrik).....	10
Figure 06	Le café de l'espresso.....	11
Figure 07	Cafetière italienne (Moka).....	12
Figure 08	Cafetière de type Cona.....	13
Figure 09	Cafetière à piston.....	13
Figure 10	Cafetière à filtre.....	14
Figure 11	Le café torréfié.....	15
Figure 12	La structure de caféine.....	16
Figure 13	La structure de trigonelline.....	17
Figure 14	La structure de cafestol et kahweol.....	17
Figure 15	La structure de l'acide chlorogénique.....	18
Figure 16	structure et les catégories des tanins.....	19
Figure 17	méthode de préparation du marc de café. (A : Espresso ; B : Décoction ; C : marc de café récupéré).	20
Figure 18	Détermination de la matière sèche (A : La pesée des échantillons ; B : Etuve ventilée ; C : Echantillons secs).	21
Figure 19	Détermination de la matière minérale (A : Fourre à moufle ; B : Echantillons incinérés).	22
Figure 20	Détermination de la matière grasse (A : Appareil SOXHLET ; B : Creusets et matière grasse).....	23
Figure 21	Les étapes de préparation d'extrait (A : Macération ; B : Filtration ; C : Evaporation à pression réduite ; D : Extrait brut).	24
Figure 22	Principe de la réaction de Folin-ciocalteu (FCR).	25
Figure 23	Structure de base des flavonoïdes	26
Figure 24	Réaction du radical stable DPPH avec un composé anti radicalaire (AH)	27
Figure 25	A : Lecteur de microplaque ; B : Microplaque à 96 puits.....	28
Figure 26	Réaction du complexe néocuproïene avec un antioxydant	28

Figure 27	Mécanisme réactionnel du test FRAP.....	29
Figure 28	Formation du complexe Fe+2-phénanthroline.	30
Figure 29	Mécanisme chimique de la méthode d'Ellman	32
Figure 30	teneurs en phénols totaux (ug GAE/mg) et flavonoïdes (ug Quercétine/ mg) du marc de café préparé par les deux méthodes.....	36
Figure 31	IC50 pour l'activité antiradicalaire DPPH des échantillons et des standards exprimée en µg/ml.....	38
Figure 32	Activité CUPRAC des deux échantillons et standards à différentes concentrations.....	39
Figure 33	A0.50 pour l'activité antioxydante CUPRAC des échantillons et des standards exprimé en ug/ml.....	39
Figure 34	Activité FRAP des échantillons et standards à différentes concentrations.....	40
Figure 35	Valeur d'A0.5 du test FRAP des deux extraits du Marc de café.....	41
Figure 36	Activité phénanthroline des différentes échantillons et standards à différentes concentrations.....	42
Figure 37	Valeur d'A0.50 du test phénanthroline des deux extraits du Marc de café.....	42
Figure 38	activité d'alpha amylase des échantillons.....	43
Figure 39	activité d'alpha amylase du standard.....	43

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 01	Les caractéristiques physiques du marc de café en fonction de l'humidité	04
Tableau 02	Les principaux composés du marc de café.....	04
Tableau 03	Principaux minéraux dans les deux types de café (robusta et arabica).....	05
Tableau 04	La mouture des grains de café en fonction de la méthode de préparation.....	09
Tableau 05	le taux de la matière sèche(MS), de la matière minérale (MM) et de la matière grasse (MG) du marc de café préparé par les deux méthodes.....	34

LISTE DES ABRÉVIATIONS

<i>Abréviation</i>	<i>Signification</i>
A0.5	Concentration à A=0,5.
Abs	Absorbance
ABTS	2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique).
ACHE	Acétylcholine estérase
BHA	Butyl-hydroxy-anisole
BHT	Butyl-hydroxy-toluène.
CUPRAC	Cupric Reducing Antioxidant Capacity
DPPH	2,2-Di-Phényl-1 -Picryl-Hydrazyl
DTNB	5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid.
FT	Flavonoïdes totaux
HCl	Hydrochlorique acid.
IC50	Concentration d'inhibition à 50%.
MC	Marc de café
MG	Matière grasse
MM	Matière minérale
MS	Matière sèche
PT	Phénols totaux
TFC	Contenu en flavonoïdes totaux
TPC	Contenu en phénols totaux

INTRODUCTION
GENERALE



Le marc du café est considéré comme un déchet solide par les consommateurs de café.

Disponible en grande quantité dans le monde est estimé en millions des tonnes, il est généralement destiné vers la décharge ce qui affecte l'environnement. Mais aujourd'hui le marc de café est le point central de nombreuses recherches récentes dans plusieurs domaines, comme les engrais, la production des aliments pour les animaux, de charbon actif (Caetano *et al* 2012). Des études ont montré que le marc de café contient de grande quantité de composés précieux et à haute valeurs, à l'instar des hydrocarbures, des protéines, des polysaccharides et les lipides. Le marc du café est une source pour l'extraction des composés phénoliques, ce qui suggère la possibilité de son utilisation comme une source naturelle d'antioxydants pour l'industrie cosmétique et pharmaceutique (Hadoudi *et al.*, 2014).

De ce fait, l'importance substantielle octroyée au marc du café en tant qu'une matière de valeur ajoutée dans plusieurs domaines nous propose la problématique de choisir le marc le plus effectif en matière de sa richesse en composants naturels d'un côté, et celui doté d'une importance biologique majeure d'autre coté. A cet égard, deux types du marc de café sont étudiés, le premier est obtenu à l'issue de la préparation de la boisson du café par décoction, cependant le deuxième est obtenu par pression « expresso ». Le choix de ces deux méthodes est basé sur le fait qu'elles sont les méthodes les plus communément utilisées en Algérie et à travers le monde.

De ce fait, l'objectif de notre travail est de comparer ces deux types du marc de café à l'échelle chimique et biologique pour des raisons de valorisation ultérieure. La comparaison chimique consiste à doser les composants primaires (minéraux, protéines, sucres et lipides) et secondaires (phénols et flavonoïdes) des deux échantillons. La comparaison à l'échelle biologique détermine leur capacité à neutraliser les radicaux libres dans un milieu biologique par des essais de DPPH, ABTS, CUPRAC, FRAP et phénanthroline. Le potentiel biologique de nos échantillons est également évalué par l'étude de l'activité antidiabétique et anti-Alzheimer des marcs étudiés via la détermination de l'activité des enzymes impliqués dans ces deux pathologies, à savoir , l'alpha amylase pour le diabète et l'Acétylcholine estérase pour l'Alzheimer. Nous souhaiterons à travers cette étude savoir si la méthode de préparation de la boisson du café affecte-elle la qualité chimique et biologique du marc de café obtenu !

Notre manuscrit est subdivisé en trois parties fondamentales, une partie bibliographique dont nous avons mis en lumière le marc du café, sa composition, ses caractéristiques et sa valorisation. Dans le même contexte, nous avons exposé les différentes méthodes de préparation de la boisson du café, en mettant l'accent sur deux méthodes ; la décoction et la filtration.

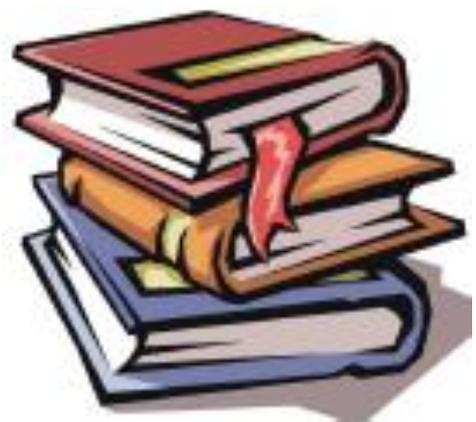
Deuxièmement, une partie expérimentale est déroulée comme mentionnée en ci-dessus. La troisième et la dernière partie du travail apporte les différents résultats obtenus et discutés séparément. L'absence des travaux menés sur le marc de café obtenu par décoction offre à notre travail de recherche une originalité et une valeur ajoutée avec des avantages socio-économiques et environnementaux appréciables.

Il paraît très intéressant à noter que pour des raisons échappant à la volonté relatives à la pandémie du coronavirus et aux exigences de confinement imposées par les hautes instances pour la sécurité du peuple, nous n'avons pas pu accomplir plusieurs tests à l'instar de :

- L'activité anti-inflammatoire de nos échantillons pour confirmer leur aptitude biologique *in vitro* en cas de leur valorisation ultérieure ;
- L'analyse statistique de nos résultats ;
- Le traitement des données de l'activité antidiabétique (détermination de l'IC50) ;
- Détermination du potentiel antimicrobien de nos échantillons vis -à- vis quelques souches bactériennes et fongiques pathogènes.

Ces travaux vont être accomplis, Ensh'ALLAH dès le retour aux conditions de la vie quotidienne est autorisé.

PREMIERE PARTIE
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE



Chapitre I : Le marc de café

1. Définition

Le marc de café est le résidu de la consommation du café soluble obtenu après torréfaction des grains de café marchands, après mouture et extraction à l'eau bouillante ou à la vapeur d'eau (Mansour-Benamar *et al.*, 2016).



Figure 01 : Marc de café.

2. Les propriétés du marc de café

Il possède plusieurs propriétés, physiques, chimiques et également bioactives.

2.1. Propriétés physiques du marc de café

Le marc de café possède un haut taux d'humidité variant entre 55 et 80 % (Gomez-de la Cruz *et al.*, 2015). Plus l'humidité est grande plus la croissance microbienne est favorisée, donc des stratégies de conservations optimales sont nécessaires afin de récupérer une matière de qualité. Ces stratégies peuvent représenter des coûts économiques supplémentaires pour le transport (Cruz *et al.*, 2009).

2.2. Propriétés chimiques du marc de café

Le carbone est l'élément majoritaire du marc de café. Le tableau 02 présente la composition élémentaire du marc de café. La composition chimique du marc de café est très variée, des

glucides aux lipides, en passant par les protéines, et sans oublier les minéraux et les antioxydants.

Tableau 01 : caractéristique physique du marc de café en fonction de l'humidité (Silva <i>et al.</i> , 2012)					
Humidité %	Angle de talus (°)	Densité apparente(g/cm ³)	Densité réelle(g/cm ³)	Diamètre(µm)	Porosité
0.00	s.d	s.d	1.20	50-100	s.d
15.2	38.7	0.43	1.16	583	0.63
17.7	37.8	0.43	1.16	617	0.63
43.31	37.7	0.41	1.11	880	0.63

Tableau 02 : Les principaux composés du marc de café (Limousy <i>et al.</i> , 2013)	
Elément	Quantités
Glucides	45,3
Lipids	9.3-16.2
Protéines	14
Minéraux	6800 mg/kg de matière sèche
Polyphénols	13-18 mg acide gallique éq

Les glucides sont les éléments les plus abondants dans le marc de café. Plus précisément, le marc de café contient 46,8 % de mannose, 30,4 % de galactose, 19 % de glucose et 3,8 % d'arabinose. Ces données varient d'une étude à l'autre, cela pouvant être dû à la variété des grains de café utilisés. Dans le marc de café expresso, le galactomannane est le plus abondant et représente 50 % des glucides (Ballesteros *et al.*, 2015). En ce qui concerne *les lipides*, les données varient principalement entre 9,3 % et 16,2 %, parfois aux alentours de 20 %. De plus, cet ordre de grandeur ne varie pas significativement entre l'arabica et le robusta. Aussi, les lipides du marc de café sont composés de 84,4 % de triglycérides. (Campos-Vega *et al.*, 2015). De plus, le marc de café contient entre 6, 7 et 14% de *protéines* selon les études et est de même ordre chez l'arabica ou le robusta. Cependant, il se peut que ces estimations soient surévaluées à cause de la présence d'autres composés contenant de l'azote tel que la caféine ainsi que plusieurs acides aminés. En effet, 17 aminés sont présents dans le marc de café, dont 1 Les neuf acides aminés essentiels. Ces derniers représentent presque 50 % des acides aminés présents. Il possède

une forte concentration en acides aminés à chaîne latérale ramifiée (BCAA) (Campos-Vega *et al.*, 2015) . *Les minéraux* sont présents dans le marc de café aussi, en plus grande quantité dans le marc de café à expresso, que dans le marc de café filtre (Tableau 03).

Minéral	Arabica (% en poids)	Robusta (% en poids)
P	1.5	1.7
K	0.152	0.20
Ca	0.107	0.130
Cu	1.610- 3	2.210- 3
Mn	3.1.10- 3	1.610- 3

2.3. La composition secondaire du marc de café

Le marc de café contient également d'autres éléments d'intérêt, tels que des antioxydants. Plusieurs tanins sont présents dans le marc de café, parmi eux, la catéchine, la gallocatéchine, la gallocatéchine galate et l'acide chébulique. La catéchine est un antioxydant puissant qui possède une action complémentaire à la vitamine C (Low *et al.*, 2015). Les tanins ne sont pas les seuls antioxydants présents dans le marc de café. En effet, d'autres polyphénols sont présents ainsi que de la caféine. Parmi ces polyphénols, les principaux sont les flavonoïdes, l'acide protocatéchuïque et l'acide chlorogénique. Ce sont les acides chlorogéniques qui sont retrouvés en plus grande abondance, celui-ci étant plus important dans le marc de café arabica que dans le marc de café robusta (Carassou, 2015).

2.4. Les propriétés bioactives du marc de café

Le marc de café arabica possède une activité anti-radicalaire légèrement supérieure à celle du marc de café robusta. Cependant, le marc de café robusta montre une meilleure capacité d'absorption de l'oxygène radicalaire que le marc de café arabica. Aussi, le marc de café des deux espèces possède une activité antitumorale assez similaire. Cette activité est sans doute liée à la présence de pigments bruns (mélanoides et polyphénols) formés lors de la torréfaction des grains de café. De plus, il a été montré que le marc de café possède également des propriétés anti-

allergènes et dans une moindre mesure des propriétés anti-inflammatoires. (Ramalakshmi *et al.*, 2009).

3. Domaines de valorisation du marc de café

3.1. Production de biocarburants

Les productions successives de différents biocarburants sont possibles avec le marc de café. Cependant, certaines étapes sont nécessaires afin d'obtenir un rendement optimal. La production de biocarburant nécessite au préalable le séchage du marc de café. En effet, éliminer l'humidité est nécessaire afin d'obtenir des solvants de qualité dans la production de biocarburant (biodiesel, bioéthanol, bio huile). De plus, l'utilisation directe du marc de café comme granule de combustion nécessite la recherche d'un équilibre d'humidité afin d'améliorer les paramètres énergétiques du biocarburant. Aussi, la production de biodiesel, de bioéthanol, de bio huile et de granule de combustion peut se faire après une unique étape de séchage. Ainsi, les coûts de transformation du marc de café en sont diminués (Cruz *et al.*, 2015).

3.2. Agriculture et production de composts

Le marc de café peut être utilisé comme fertilisant. Ainsi, trois méthodes de compostage avec du marc de café ont été comparées, soit le vermis compostage, le compostage en cuve et le compostage en andain. Le compostage en cuve présente des résultats plus rapides, mais montre une plus grande perte en azote. En ce qui concerne le vermis compostage, il est fortement suggéré d'agir en compostage en mélangeant le marc de café avec d'autres matières organiques pour augmenter la quantité de nutriments (Adi et Noor, 2009), car l'utilisation du marc de café seul augmente la mortalité des vers de terre (Liu et Price, 2011).

3.3. La production de charbon actif

Le marc de café peut être transformé en charbon actif qui est ainsi produit possédant une performance comparable ou meilleure que les charbons actifs commercialisés sur le marché actuel. Dans l'optique de produire du charbon actif à partir de marc de café, ce dernier ne doit pas être exploité au préalable pour sa caféine. En effet, la caféine joue un rôle important dans la préparation du charbon actif en tant que catalyseur (Campos-Vega *et al.*, 2015).



Figure 02 : l'utilisation du marc de café comme fertilisant

3.4.Substrat pour la culture de micro-organismes et de champignons comestible

Le marc de café peut être utilisé comme substrat pour la production de caroténoïde grâce à la culture de levure. Les caroténoïdes sont utilisés dans les industries agroalimentaires (colorant), cosmétiques et pharmaceutiques et sont donc des composés d'intérêts (Petrick *et al.*, 2014). Le marc de café peut aussi servir de substrat pour la culture de champignons comestibles sans ajout de supplément nutritionnel (Leifa *et al.*, 2001). La haute teneur en protéines et en humidité du marc de café explique certainement ce phénomène, car ce sont deux paramètres essentiels à la croissance de microorganismes et de champignons (Mussatto *et al.*, 2011). Aussi, dans l'hypothèse d'utiliser le marc de café dans la culture de champignons, il est essentiel de connaître les meilleures conditions de culture qui peuvent varier d'une espèce à une autre. En somme, le marc de café est un substrat à considérer pour la culture de microorganismes et de champignons, de nombreuses portes pouvant être ouvertes par cette avenue, notamment l'industrie de l'alimentation.

3.5. Matière premières pour l'industrie pharmaceutique et cosmétique

Très utile pour les adeptes des cosmétiques maison, le marc de café est un parfait exfoliant naturel. Il permet de débarrasser la peau de ses cellules mortes et d'affiner notre grain de peau. Le café est un mélange complexe de composés dont l'influence sur la santé humaine a fait l'objet de nombreuses études. Il devient de plus en plus évident que certains cafés sont associés à une réduction de l'incidence de certains cancers, notamment du cancer de la prostate.



Figure 03 : L'utilisation du marc de café pour la culture des champignons.



Figure 04 : L'utilisation du marc de café comme gommage de la peau

Des scientifiques japonais ont étudié les effets de deux composés présents dans le café, l'acétate de kahweol et le cafestol, sur des cellules cancéreuses de la prostate et sur des animaux. Ces deux hydrocarbures ont pu inhiber la croissance de cellules résistantes aux médicaments anticancéreux tels que le cabazitaxel. L'acétate de kahweol et le cafestol sont des hydrocarbures, naturellement présents dans le café Arabica. Le processus de fabrication a une incidence sur le fait que ces composés restent dans le café après avoir été brassés (comme dans un expresso) ou s'ils sont éliminés (si le café est filtré).

Chapitre II : les différentes méthodes de préparation du café

1. La préparation de café

1.1. la mouture

La règle de base pour une bonne préparation du café est que plus le temps d'extraction de la méthode choisie est long, plus le café devra être moulu gros. A l'inverse, pour une méthode de préparation rapide, il faut choisir un café à mouture fine. Exception faite pour la décoction.

Tableau 04 : La mouture des grain de café en fonction de la méthode de préparation

Méthode de préparation	Mouture
Décoction	Extra fine
Espresso	Très fine
Italienne à pression de vapeur	Fine
A filtre	Moyenne
A dépression de type Cona	Moyenne
A piston	Grosse

Les arômes désirés ainsi que la caféine seront extraits en premier temps lors de la préparation du café, par conséquent si le café est fin mais le temps de contact trop long, il y aura extraction d'autres composants et le café sera amer. A l'inverse, si le café est moulu grossièrement et que le temps de contact avec l'eau est trop court, le café va manquer de gout vu que tous les arômes n'ont pas pu être extraits.

1.2. L'eau

Le café étant constitué majoritairement d'eau, la qualité de cette dernière est essentielle pour avoir un bon café. Une eau faiblement minéralisée, avec peu de calcium, de magnésium, de sodium et de chlore, est idéal pour la préparation de café. Une eau trop dure va donner un café amer et trop de chlore va également altérer le gout du produit final. On peut soit filtrer l'eau de robinet ou alors prendre de l'eau minéral pour la préparation de café. L'eau devrait être de

préférence fraîche, chaude mais non bouillante quand elle entre en contact avec le café, autour de 85 à 96°C, exceptée pour la méthode turque, l'eau est obligatoirement bouillante.

2. Les méthodes de préparation du café

Toutes les préparations s'appuient sur le même principe : l'extraction des composants du café, qui sont hydrosolubles. L'eau dissout ces composants et produit une solution liquide, « *le café* ». Cette transformation peut être obtenue grâce à l'**infusion** (café dans de l'eau chaude), à la **décoction** (café chauffé dans l'eau), à la **filtration** appelée « lixiviation » (l'eau passe à travers le café). Cette dernière s'effectue en réalité de deux manières : forcée par la pression (Moka, espresso, piston, AeroPress) ou par gravitation (filtre, infusion à froid).

Rares sont les machines qui ne combinent pas plusieurs méthodes. La French Press à piston, par exemple, associe l'infusion puis la filtration, tandis que les siphons proposent une filtration ascendante par pression, suivie d'une infusion et enfin d'une filtration descendante.

2.1. La décoction (Café turque)

C'est probablement la méthode la plus ancienne de préparation de café. Le café doit être très fin comme la farine. La cafetière «**ibrik**», un petit pot en cuivre muni d'une longue poignée (Figure 05). Une cuillère à soupe bombée par tasse de café préparée est utilisée, ensuite de l'eau froide sera ajoutée et le tout sera porté à ébullition. On retire du feu et on laisse reposer pendant deux minutes. Après trois à cinq répétitions, le café est pété, du sucre ou de la cardamome seront ajoutés selon le goût.



Figure 05 : le café turc ou la décoction (l'ibrik).

2.2. La filtration avec la pression

2.2.1. L'espresso

Il faut une machine spéciale, la machine à espresso. Elle est composée d'un réservoir d'eau, d'une pompe, d'un système de chauffage, d'un groupe distribution ainsi que d'un porte filtre. Sur certains modèles, on peut également trouver un réservoir pour les grains de café ainsi qu'un moulin intégré ou encore une buse pour mousser du lait (Figure 06).

Pour faire un espresso la dose normale est de sept grammes par tasse, la température de l'eau doit être constante et comprise entre 92 et 96°C. Lors de la préparation, l'eau chaude est forcée avec une pression d'au moins neuf bars à travers le café moulu très fin. Le temps de passage de l'eau est très court, de l'ordre de 20 à 30 secondes. Contrairement au café normal, l'espresso est non seulement une solution, mais également une suspension de solide ainsi qu'une émulsion. La crema, émulsion caractéristique de l'espresso est due à la pression de l'eau qui passe par le café et qui libère ainsi le dioxyde de carbone contenu dans les grains de café. Cette mousse est constituée à côté du CO₂, de protéines, de sucre, d'huiles et l'eau.



Figure 06 : le café de l'espresso.

2.2.2. Café Italienne (Moka)

Cette cafetière, entièrement en métal est composés de trois parties : celle en dessous dans laquelle on verse de l'eau froide, le filtre avec un tube pour laisser passer l'eau qui va contenir le café moulu et la partie supérieure qui va recueillir le café. Par tasse il faut compter 12 grammes de café moulu (Figure 07).

La cafetière est chauffée soit par un système de chauffage intégré, soit en le posant directement sur la cuisinière, l'eau dans la partie inférieure est portée à ébullition et va diffuser par le tube à travers le café moulu.



Figure 07 : Cafetière italienne (Moka).

2.2.3. La Cafetière à dépression de type Cona

Cette cafetière est constituée de deux globes en verre superposés liés avec une tige (Figure 08). En dessous il y a généralement un brûleur ou un chauffage électrique. L'eau est versée dans le globe inférieur, dans le globe supérieur la mouture du café est mise, ensuite la source de chaleur est mise en route. L'eau et l'air vont être chauffés, donc la pression va faire passer l'eau dans le globe supérieure via la tige en verre. Une fois toute l'eau en haute, on coupe la source de chaleur.

Le globe inférieur refroidit, l'air rétracte et aspire le café du haut vers le bas, dans la tige en verre entre les globes se trouve un filtre qui retient le marc de café.



Figure 08: cafetière de type Cona.

2.2.4. La cafetière à piston (French Press)

Cette cafetière constituée d'un récipient en verre de type bécier, d'un couvercle avec un piston sur lequel est fixé un filtre et finalement une fine grille métallique (Figure 09).

La mouture est placée au fond du récipient, l'eau chaude est par la suite versée. On met le couvercle avec le piston relevé. Il faut attendre deux à quatre minutes. Avant de pousser le piston avec le filtre vers le bas pour séparer le marc du café.



Figure 09 : la cafetière à piston.

2.3.Filtration avec gravitation (cafetière à filtre)

La mouture de café doit être moyenne.il faut compter de 65 à 100 grammes de café par litre d'eau selon le type de filtre. La cafetière est constituée de deux parties, la partie supérieure avec un filtre, souvent en papier qui contient le café moulu et la partie inférieure, la verseuse qui recueille le café.De l'eau chaude, non bouillante est versée dans la partie supérieureà travers le café moulu pour passer par le filtre pour tomber dans la verseuse.

Il existe des cafetières électriques qui ont un réservoir d'eau, une résistance chauffante, un filtre pivotant et la verseuse, souvent la verseuse est posée sur une plaque chauffante, pour garder le café au chaud.



Figure 10 : Cafetière à filtre

NB : Toutes les informations rapportées dans ce chapitre sont collectées du site www.restaurant.com

Chapitre III : les principaux composés secondaires isolés du café et du marc de café

1. Les principaux composés secondaires isolés du café

La composition du café est très complexe, plus d'une centaine de substances chimiques ont été identifiées (Houessou, 2007). La composition du café a été déterminée par plusieurs auteurs, cependant, elle diffère suivant la variété du caféier, la maturité du fruit, le type de traitement appliqué et le lieu de production ainsi que d'autres facteurs environnementaux (Guyot *et al.*, 1996).



Figure 11 : le café torréfié

Beaucoup de chercheurs se sont intéressés dans leurs travaux aux deux espèces de café ; l'Arabica et le Robusta , cependant, d'autres auteurs ont focalisé leurs travaux, sur quelques composés chimiques de ce fruit, notamment: Fujioka et Shibamoto, (2008), sur l'acide chlorogénique et la caféine ; Trugo, (1984) sur les acides chlorogéniques ; Casal *et al.* (1999) sur les acides hydroxycinnamiques; Naira et Neura, (2013) sur la caféine et les acides phénoliques ; Farah et Donangelo, (2006) sur les composés phénoliques; Huck *et al.* (2005) sur la caféine et la théobromine ; Rakotomalala et Charrier, (1993) sur les acides phénoliques et Peronne *et al.* (2008) sur les teneurs en caféine, trigonelline et acide nicotinique. Nous exposons dans cette optique les composants majoritairement abondants dans le café.

1.1.les alcaloïdes

➤ la caféine

L'un des composés majeurs du café est la caféine, elle constitue le principal alcaloïde et assurément l'un des principes actifs le plus connu du café. On la retrouve également dans d'autres aliments comme le thé, le chocolat, le cacao, le coca et dans d'autres boissons énergisantes. Sa présence dans les grains de café, et ensuite dans le café boisson, est d'une grande importance en raison de son activité physiologique importante et multiple. Le goût de la caféine est plutôt amer, mais elle ne compte que pour 10% de l'amertume totale du café (Comer *et al.*, 2001).

La caféine est une base purique de la famille des méthylxanthines, c'est la 1,3,7 triméthylxanthine. La teneur en caféine d'une tasse de café peut varier de façon considérable selon l'origine et la composition du mélange, la méthode de préparation et la dose de la mouture (Mccusker *et al.*, 2006). Selon Francky *et carassou*, (2015), 75 à 85% de la caféine est extraite en utilisant la méthode expresso, ainsi le marc du café qu'en résulte contient 15 à 25% de la caféine initiale ; des études ont montré que le marc de café robusta contient plus de caféine que celui de l'arabica.

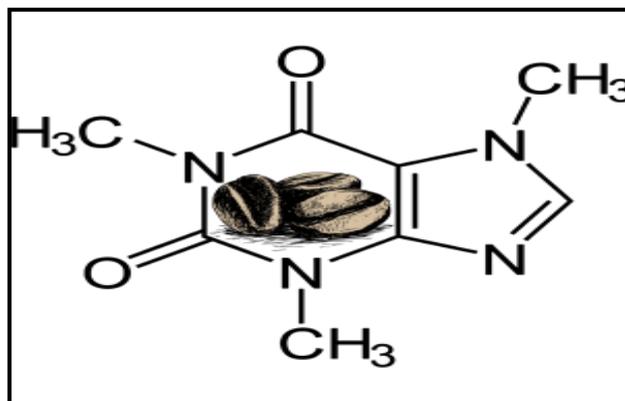


Figure 12 : la structure de caféine

➤ la trigonelline

La trigonelline ou N-méthyl-nicotinate qui est un alcaloïde ainsi abondant dans le café, dérivé de l'acide nicotinique, à noyau pyridinique (C₇H₇NO₂) de masse moléculaire égale à 137,14 g/mol. Elle possède des propriétés variables, dont on cite l'effet hypocholestérolémiant, l'effet

anticancéreux et régénérateur des neurones. Des préparations contenant de la trigonelline sont utilisées pour renforcer les cheveux et les ongles (Ribeiro *et al.*, 2010).

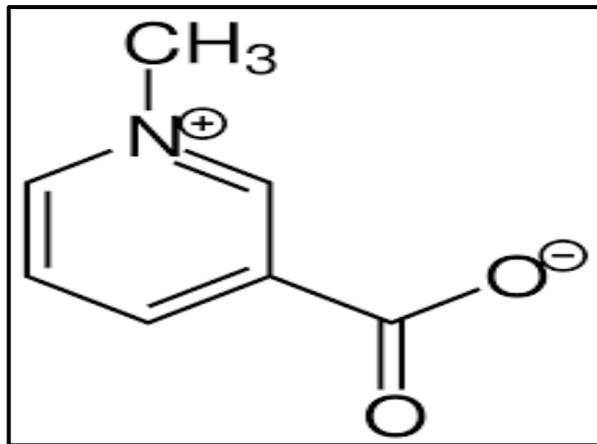


Figure 13 : la structure de trigonelline

1. 2. les terpénoïdes

Plusieurs constituants lipidiques (plus de 10 % du poids de la matière sèche) sont présents : à côté des stérols, des hydrocarbures, de tocophérols, on note la présence d'alcools di terpéniques.

Les deux diterpènes caractéristiques du café sont le cafestol et le kahweol (Figure 12), ce dernier est présent uniquement à l'état de traces dans le Robusta. On peut considérer que les Arabicas sont des cafés riches en lipides (10 à 18 %); les Robustas en contiennent relativement moins (8 à 13 %) (Houessou, 2007).

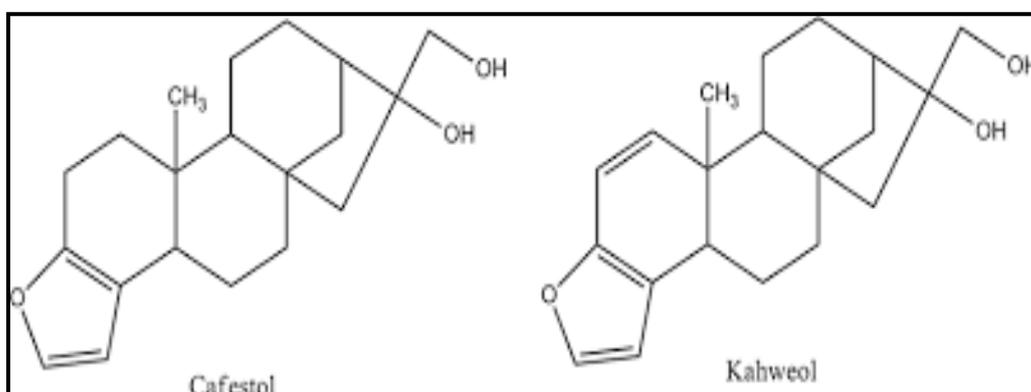


Figure 14 : la structure de cafestol et kahweol

1.3. Les acides-phénoliques

Les grains de café contiennent notamment divers acides organiques aliphatiques mais surtout des acides-phénoliques (acide quinique (AQ), acide caféique (AC) et acide chlorogénique (ACG)) qui présente les caractères des tanins. Les phénols simples et les flavonoïdes sont distingués des phénols tanins (tanins condensés et hydrolysables). Les composés phénoliques des graines vertes de *Coffea robusta* préviennent l'oxydation des lipoprotéines de faible densité (LDL), en empêchant la formation de plaques d'athérome. Au niveau artériel : elle inhibe l'agrégation plaquettaire impliquée dans les thromboses et améliore le fonctionnement de l'endothélium artériel. D'autre côté, dans les cas du cancer. Ces polyphénols peuvent agir au stade de l'initiation (actions bloquantes, antimutagène et réparatrice d'ADN) et au stade de la promotion et de la progression (suppression de tumeur) (Astrid Nehlig *et al.*, 2010).

Les acides hydroxycinnamiques sont particulièrement représentés dans les graines, sous forme surtout d'acides chlorogéniques (4 à 8 %) à l'état de chlorogénate. Ces derniers sont des esters composés d'un acide hydroxycinnamique et de l'acide quinique (7% et 10%) (Selmar *et al.*, 2014). Ces composés seront en grande partie détruits au cours de la torréfaction avec la libération de la caféine. Les acides chlorogéniques (ACG) sont de puissants antioxydants. Ils ont un effet bénéfique dans les maladies neurologiques comme la maladie d'Alzheimer et la maladie de Parkinson ainsi que dans le diabète de type II et le cancer du foie.

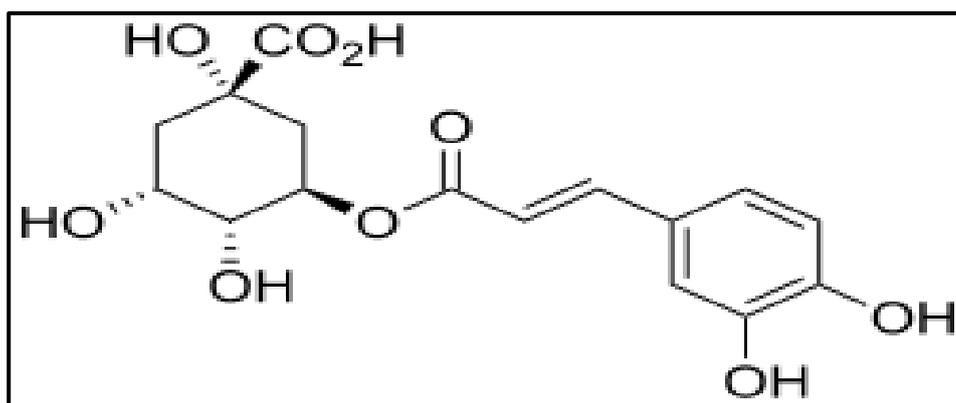


Figure15 : la structure de l'acide chlorogénique

2. Les principaux composés secondaires isolés du marc de café

Malgré l'absence des études spécifiques sur la composition secondaire du marc de café, nous suggérons qu'il partage, approximativement la majorité des composants avec le grains du café torréfié, en tenant compte des composants hydrophyles totalement extraite par l'eau lors de la préparation de la boisson. Tous les résultats des travaux antérieurs prouvent la richesse du marc de café, particulièrement en tanins, en flavonoïdes et, à certains degrés en caféine quel que soit le procédé de la préparation adopté.

2.1. Les polyphénols

parmi ces polyphénols les principaux sont les flavonoïdes, l'acide protocatéchique et l'acide chlorogénique qui sont retrouvés en plus grande abondance, celui-ci étant plus important dans le marc du café robusta.

2.1.2 Les tanins

Plusieurs tanins sont présents à l'instar de la catéchines qui est un antioxydant puissant avec une action complémentaire à la vitamine C; la gallocatéchines; la gallocatéchine galate et l'acide chébulique (low *et al.*, 2015).

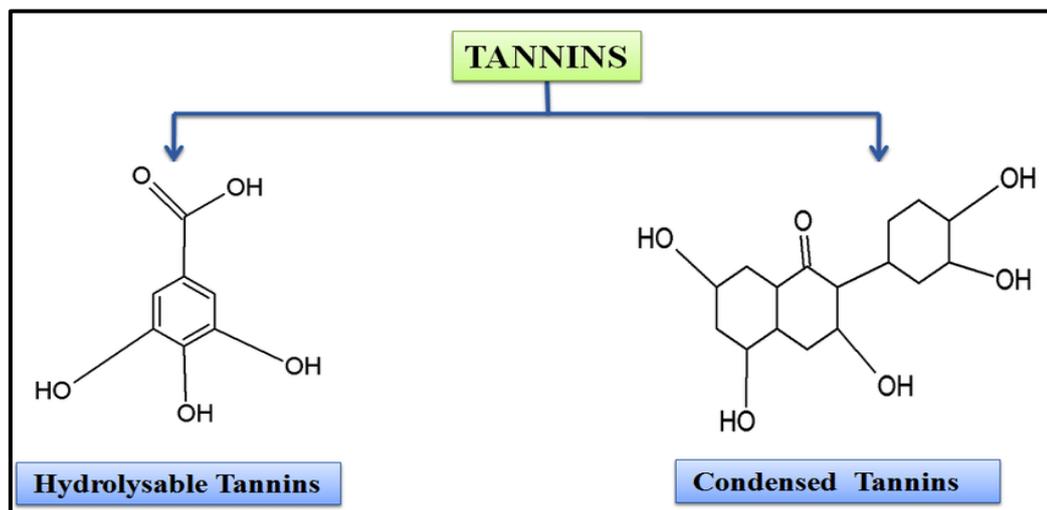


Figure 16 : structure et les catégories des tanins.

DEUXIEME PARTIE
MATERIEL ET METHODES



1. Échantillonnage

500 g du café sont obtenus auprès du distributeur de « **Bouanaba** » sis à Ali-Mendjli, nouvelle ville. Plusieurs types de café sont exposés, *Arabica* (*Coffea arabica*) et *Robusta* (*Coffea canefora* var. *Robusta*) sont choisis du faite qu'ils sont les deux types du café majoritairement produits et consommés à travers le monde. A cause de son acidité élevée, et selon la littérature, Arabica est mélangé avec Robusta à raison de 20-80 (%-%) pour obtenir un café équilibré et demandé par la majorité des consommateurs du café à tous types confondus (café public, cafeteria...etc.).

2. Préparation du marc de café

Deux méthodes sont utilisées pour la récupération du marc de café ;

- **L'expresso** dont le marc est récupérer à partir d'une machine à pression dans une cafétéria public « Albarka » à zwaghi Slimane (figure 01, A).
- **La décoction consistant à faire bouillir le café dans l'eau pendant 15 minutes.** Enfin, le marc précipité est directement récupéré après épuisement de la boisson du café. (figure 01, B). Cette méthode de préparation est très ancienne et utilisée fréquemment par nos grands-parents.

Après récupération, ils sont directement transportés dans des boites hermétiquement fermés et étiquetés vers le centre de recherche en biotechnologie (figure 01, C).



Figure 17 : méthode de préparation du marc de café. (A : Espresso ; B : Décoction ; C : marc de café récupéré).

3. Analyse chimique des échantillons

3.1. Détermination de la matière sèche (MS)

✓ Principe

La détermination de la matière sèche ou la teneur d'un Echantillon en eau est faite en portant une quantité bien définie d'un échantillon à la dessiccation dans une Etuve à 45°C pendant 24 heures jusqu'à poids stable. La différence de poids avant et après dessiccation correspond à la perte d'eau, le reste correspond à la matière sèche de notre échantillon.

✓ Mode opératoire

3g de chaque type du marc de café sont pesés séparément dans des creusets en porcelaine tarés ; ils sont mis dans une étuve à 45°C pendant 24 heures jusqu'à poids constant. Ils sont par la suite placés dans un dessiccateur pendant 2 heures pour éviter toute sorte d'absorption d'humidité à l'air libre. Trois répétitions sont faites pour chaque échantillon. La matière sèche (MS) est calculée selon cette expression :

$$\%MS = \frac{p2-tc}{p1-tc} * 100$$

- **P2** : poids d'échantillon après dessiccation (g)
- **Tc** : poids de creuset vide (g)
- **P1** : poids d'échantillon avant dessiccation (g)

Le taux d'humidité est calculé à partir de la formule suivante :

$$\% \text{ Humidité} = 100 - \% \text{ MS}$$



Figure 18 : Détermination de la matière sèche (**A** : La pesée des échantillons ; **B** : Etuve ventilée ; **C** : Echantillons secs).

3.2. Détermination de la matière minérale (MM)

✓ Principe

Les échantillons sont soumis à une incinération dans un four à moufle à 550°C pendant 12 heures. La matière organique se consume et le reste correspond à la matière minérale, qui se trouve sous forme de cendres blanches.

✓ Mode opératoire

Les 3g d'échantillons du marc de café (expresso et décoction) secs sont placés dans un four à moufle porté à 550°C pendant 12 heures, ils sont par la suite mis dans un dessiccateur pendant 2 heures. Les cendres blanches représentent la matière minérale. La matière minérale (MM) est calculée selon cette expression :

$$\%MM = \frac{p3 - tc}{p2 - tc} * 100$$

- **P2** : poids de creuset après dessiccation.
- **P3** : poids de creuset après incinération.
- **Tc** : poids de creuset vide.

La teneur en matière organique est calculée comme suit :

$$\%MO = 100 - \% \text{ des cendres blanches}$$

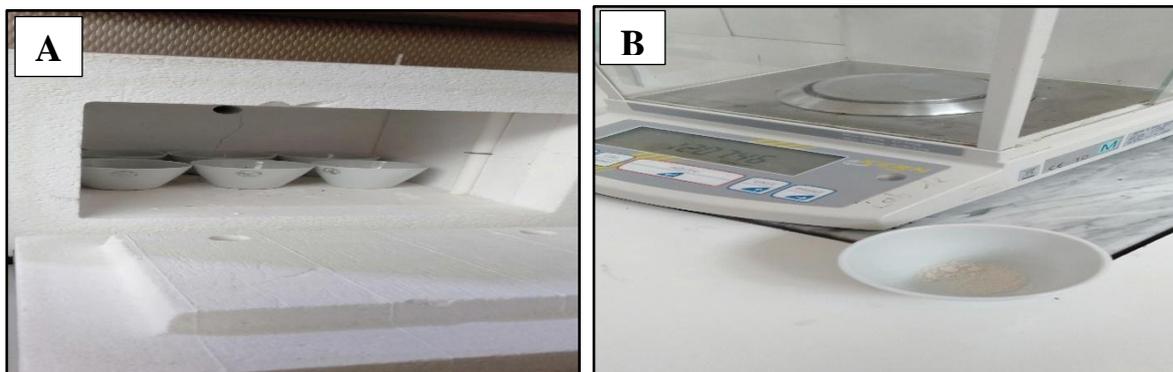


Figure 19 : Détermination de la matière minérale (**A** : Fourneaux à moufle ; **B** : Échantillons incinérés).

3.3. Détermination de la teneur en matière grasse (MG)

✓ Principe

L'extraction de la matière grasse est faite d'une manière continue dans un appareil « **SOXHLET** » composé de : creusets en aluminium portant le solvant choisie, un extracteur, des cartouches poreuses pour le dépôt des échantillons et un réfrigérateur à reflux (l'eau), ainsi qu'un appareil pour le réglage de la température. L'extraction se fait selon trois étapes : **Ébullition** (contacte d'échantillon avec le solvant pendant 15 min), **Rinçage** (lavage pendant 30 min) et **Récupération** (pendant 10 min).

✓ Mode opératoire

Environ 1 g de chaque échantillon sont pesés dans des cartouches poreuses, après introduction de 25 ml d'hexane dans chaque creusé en aluminium, la cartouche est déposée dans l'extracteur et les parties de l'appareil sont assemblées. L'hexane est alors porté à ébullition pendant 55 min sur des plaques chauffantes jusqu'à obtention d'un maximum d'hexane dans l'extracteur. Une fois l'hexane éliminé, les cartouches sont séchées à l'étuve à 105°C pendant 1 à 2 h et les creusés sont pesés. L'expression des résultats se fait comme suit

$$\%MG = \frac{PE - PV}{\text{prise d'essai} * \%MS} * 100$$

- **PE** : poids du creuset avec l'extrait Hexane.
- **PV** : poids du creuset vide.

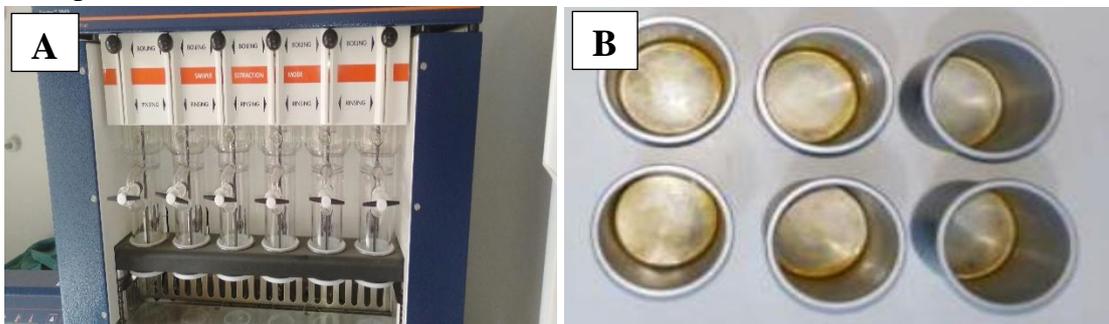


Figure 20 : Détermination de la matière grasse (**A** : Appareil SOXHLET ; **B** : Creusets et matière grasse).

4. Analyse phytochimique des échantillons

L'analyse phytochimique des extraits des deux échantillons est effectuée via le dosage de leur contenu en composés secondaires à l'instar des phénols totaux et flavonoïdes par la méthode colorimétrique.

4.1. Préparation des extraits

✓ Principe

La macération est une opération qui consiste à laisser l'échantillon en contact avec un solvant à température ambiante pendant un temps bien défini pour en extraire les substances chimiques solubles.

✓ Mode opératoire

Deux extraits **hydro-éthanoïques** sont préparés par macération de 50 g de chaque type du marc de café (Expresso ; Décoction) dans un système solvant éthanol-eau (50 :50 v/v ; 1 :5 p/v) pendant 72 h sous agitation et à l'obscurité, avec renouvellement du solvant chaque 24h par un système décroissant (1 :5 ; 1 :4 ; 1 :3 p/v).

Les trois filtrats sont réunis et concentrés sous pression réduite dans un rota vapeur à 40° C.

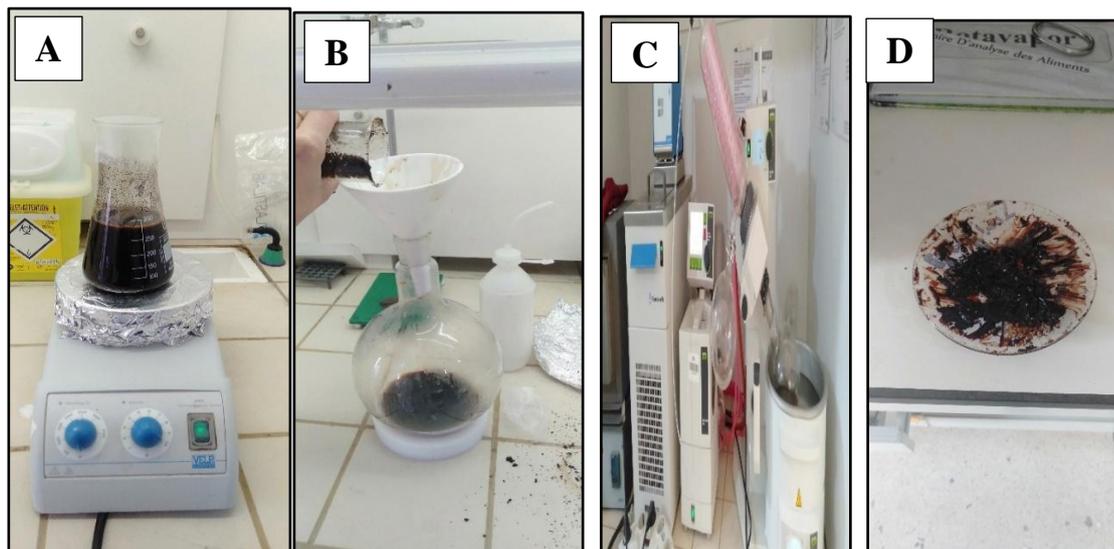


Figure 21 : Les étapes de préparation d'extrait (A : Macération ; B : Filtration ; C : Evaporation à pression réduite ; D : Extrait brut).

4.2. Détermination du contenu en total phénolique (TPC)

✓ Principe

Le contenu en polyphénols totaux est réalisé selon la méthode de dosage de **Singleton et Rossi, 1965** ; modifiée par **Muller et al., 2010**. C'est une méthode colorimétrique de Folin-Ciocalteu : un réactif acide jaune constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMO_{12}O_{40}$). Il est réduit lors de l'oxydation des polyphénols en un mélange bleu d'oxyde de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (Mo_8O_{23}). L'augmentation de la couleur bleu et de l'absorbance est proportionnelle aux teneurs en polyphénols totaux.

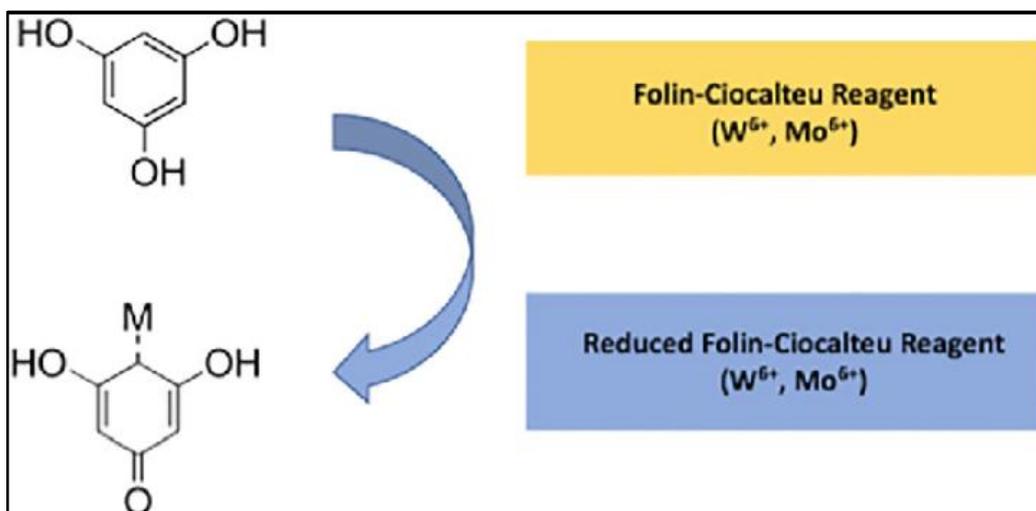


Figure 22 : Principe de la réaction de Folin-ciocalteu (FCR).

✓ Mode opératoire

Sur une microplaque à 96 puits, un volume de 20 μ l d'extrait (une masse de 1 mg est dissoute dans 1 ml de méthanol) est ajouté à 100 μ l de Folin-ciocalteu dilué (1 ml de FCR est dilué dans 9 ml d'eau distillée) ; supplémenté par un volume de 75 μ l de carbonate de sodium (7.5 g de Na_2CO_3 est dissouts dans 100 ml d'eau distillée). Le mélange est ensuite incubé pendant 2h à l'abri de la lumière ; et l'absorbance est mesurée à 765 nm. L'acide gallique est utilisé comme un contrôle positif ; à partir duquel une courbe d'étalonnage est établie (annexe III).

4.3. Détermination du contenu en Flavonoïdes totaux (TFC)

✓ Principe

Le contenu en flavonoïdes totaux est réalisé selon la méthode décrite par **Topçu et al., 2007**. Le principe est basé sur la formation d'un complexe jaunâtre ; entre le chlorure d'aluminium et le groupement OH libre en position 5 dans les flavonoïdes. La coloration est proportionnelle aux teneurs en Flavonoïdes totaux (Riberau-Gayon, 1968).

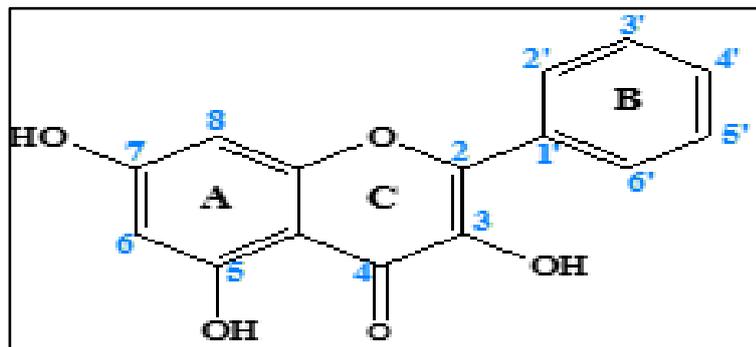


Figure 23 : Structure de base des flavonoïdes (Lin et al., 2015).

✓ Mode opératoire

Dans une microplaque de 96 puits, un volume de 50 µl d'extrait (une masse de 1 mg dissoute dans 1ml de méthanol) est mélangé avec : 130 µl de méthanol ; 10 µl d'acétate de potassium (CH₃COOK) (9.8 g dans 100 ml de méthanol) et 10 µl de nitrate d'aluminium (AL(NO₃)₂, 9 H₂O). Le blanc est préparé avec 150 µl de méthanol et 50 µl d'extrait. Le mélange est ensuite incubé pendant 40 min à température ambiante, l'absorbance est mesurée à 415 nm. La quercétine est utilisée comme un contrôle positif ; à partir duquel une courbe d'étalonnage est établie (annexe III)

5. Evaluation du potentiel antioxydant des échantillons

La détermination du potentiel antioxydant des deux extraits du marc de café a été réalisé par l'utilisation de cinq méthodes : piégeage du radical libre **DPPH** ; piégeage de l'**ABTS** ; pouvoir réducteur **FRAP** ; réduction du complexe cuivre-néocuproïne **CUPRAC** et réduction par la formation de complexe Fe²⁺ phénanthroline.

5.1. L'activité antiradicalaire au DPPH

✓ Principe

L'activité antiradicalaire au DPPH est déterminée spectrophotométriquement par la méthode décrite **par Blois, 1958**. Le principe est de mesurer la capacité d'un antioxydant à réduire le DPPH (un radical libre stable) initialement de couleur violette en Hydrazine de couleur jaune, en recevant un atome d'hydrogène des antioxydants ; l'absorbance diminue lorsque le DPPH est réduit par l'antioxydant.

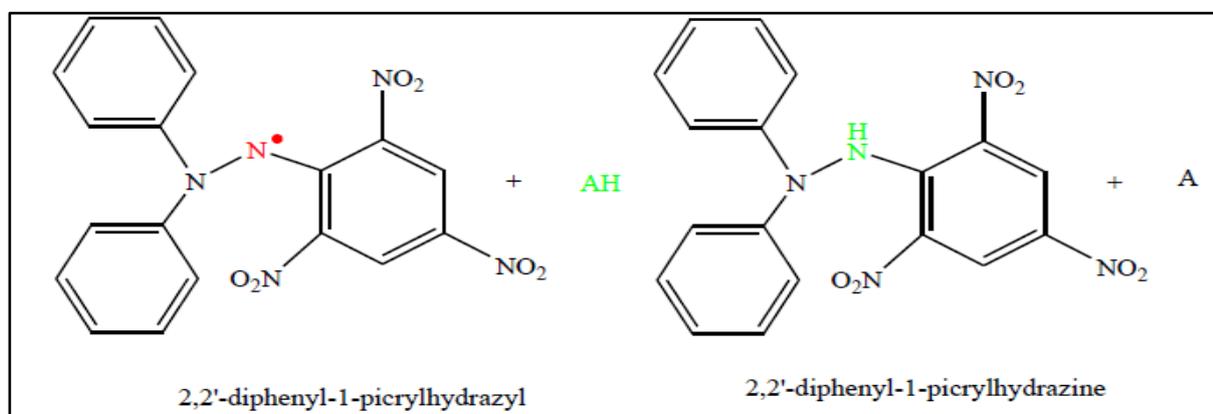


Figure 24 : Réaction du radical stable DPPH avec un composé anti radicalaire (AH) (Oliveira *et al.*, 2014).

✓ Mode opératoire

Dans une microplaque à 96 puits, 40 µl de chaque extrait (expresso et décoction) dilué dans le méthanol à différentes concentrations sont introduits. Ils sont par la suite supplémentés par 160 µl de la solution de DPPH fraîchement préparée à concentration de 0,1 mM ; le mélange réactionnel est maintenu à une température ambiante et à l'obscurité pendant 30 min. l'absorbance est mesurée à 517 nm. La préparation du blanc est faite en remplaçant l'extrait par le méthanol.

Le **BHA**, **BHT** et **α-Tocophérol** sont utilisés comme des standards. Les résultats sont exprimés en % d'inhibition et d'IC₅₀. Le pourcentage d'inhibition est calculé selon cette équation :

$$\text{inhibition\%} = \frac{A_{\text{contrôle}} - A_{\text{extrait}}}{A_{\text{contrôle}}} * 100$$

A Contrôle : L'absorbance du contrôle négatif.

A extrait : L'absorbance d'extrait ou le standard.

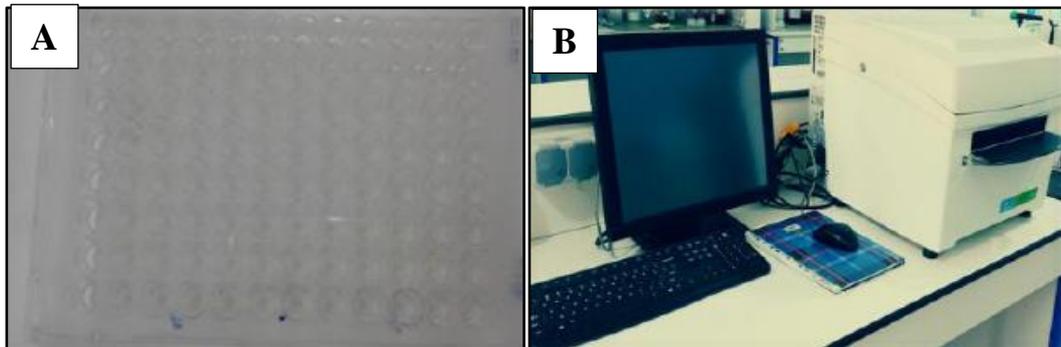


Figure 25 : A : Lecteur de microplaque ; B : Microplaque à 96 puits.

5.2. L'activité de réduction du complexe cuivre - néocuproïne (CUPRAC)

✓ Principe

La capacité de réduction du complexe cuivre_néocuproïne (CUPRAC) est déterminée selon la méthode d'Apak *et al.*, 2004. Cette dernière est basée sur la diminution de l'absorbance du complexe cuivre_néocuproïne [Cu²⁺- Nc₂]. En effet en présence d'un agent antioxydant, le complexe [Cu²⁺- Nc₂] est réduit produisant un complexe chromogène de Cu⁺-Nc.

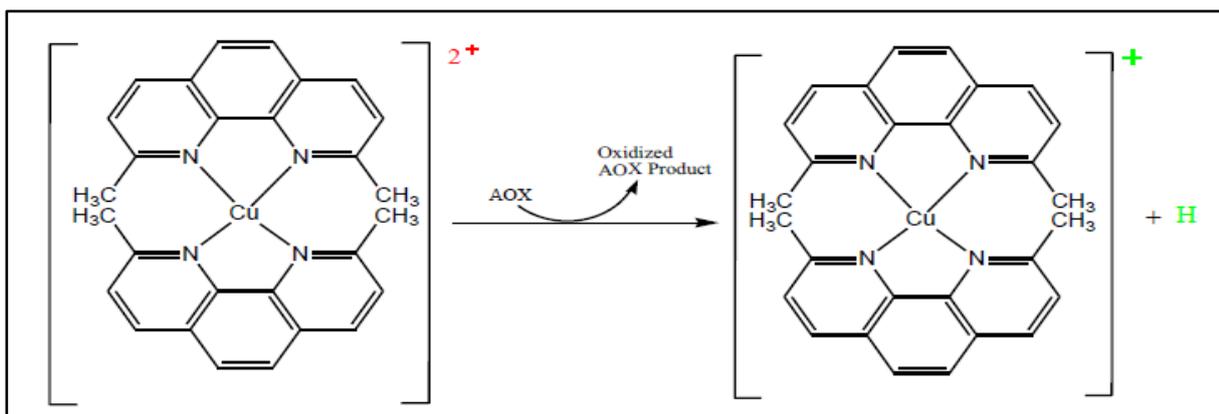


Figure 26 : Réaction du complexe néocuproïne avec un antioxydant (Apak *et al.*, 2004).

✓ **Mode opératoire**

Dans une microplaque à 96 puits un volume de 40 µl d'extrait dilué dans le méthanol à différentes concentration sont introduits ; et 40 µl de méthanol dans le blanc au lieu d'extrait. Ils sont par la suite supplémentés par un mélange réactionnel contenant 60 µl d'acétate d'ammonium (tampon) ; 50 µl de néocuproïne ; 50 µl de chlorure de cuivre (CuCl₂). Après une incubation de 1h, l'absorbance est mesurée à 450 nm. Le **BHA** et le **BHT** sont utilisés comme des standards ; et les résultats sont calculés à titre d'**A_{0,5}** (µg/ml).

5.3. Activité du pouvoir réducteur (FRAP)

✓ **principe**

Le pouvoir réducteur du fer (Fe⁺³) est déterminé selon la méthode d'**Oyaizu, 1986**. C'est un dosage colorimétrique du transfert d'électrons repose sur la capacité des antioxydants à réduire le Fer Ferrique (Fe⁺³) présent dans le Ferrocyanure de potassium (K₃Fe(CN)₆) en Fer Ferreux (Fe⁺²) et le Ferrocyanure (K₄[Fe(CN)₆]) ; ceci traduit par le virage de la couleur jaune du (Fe⁺³) vers une couleur bleu vert du (Fe⁺²), dont l'intensité dépend du pouvoir réducteur de l'antioxydant.

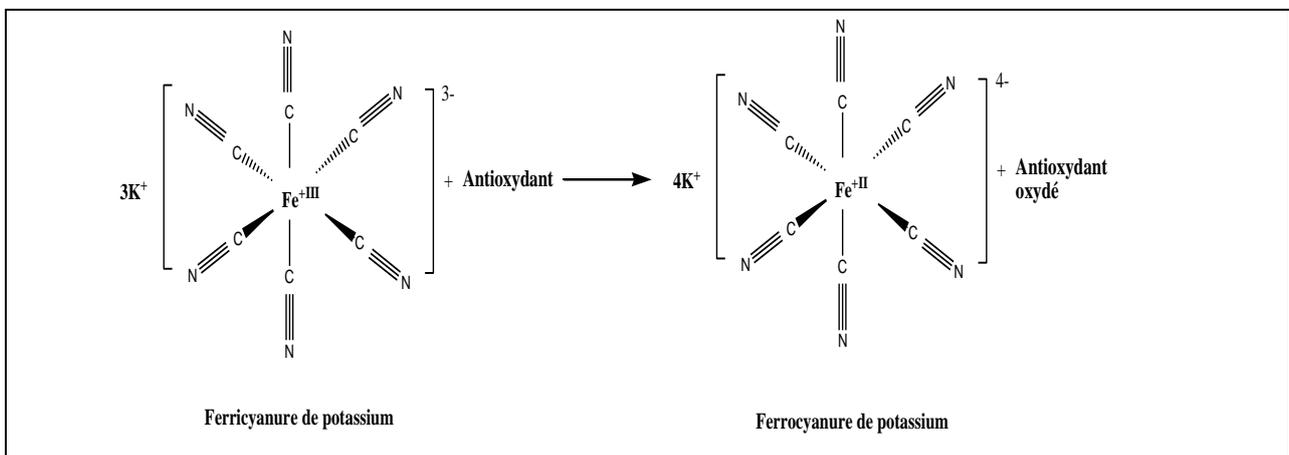


Figure 27 : Mécanisme réactionnel du test FRAP (Gülçin, 2012)

✓ **Mode opératoire**

Un volume de 10 ul de l'extrait à différentes concentration sont introduits dans la plaque supplémentés par la suite par 40 µl d'une solution tampon phosphate (ph=6,6) et 50 ul d'une

solution de Ferricyanide de potassium (1%). Après l'ensemble est incubé à l'étuve à 50°C pendant 20 min. Ensuite l'ajout par ordre : 50 µl d'acide tris-chloroacétique (10%) ; 40 µl d'eau distillée ; 10 µl d'une solution de chlorure de Fer anhydre ; l'absorbance est ensuite mesurée à 700 nm. **L'acide ascorbique** et **α-Tocophérol** sont utilisés comme des standards ; et les résultats sont calculés à titre d' $A_{0.5}$ (µg/ml).

5.4. L'activité de réduction par la formation du complexe Fe^{+2} Phénanthroline

✓ Principe

L'activité de la phénanthroline est déterminée par la méthode de (Szydłowska-Czerniaka *et al.*, 2008). Elle est basée sur la réduction du Fer Ferrique (Fe^{+3}) en Fer Ferreux (Fe^{+2}) à la présence d'un antioxydant. Seul le Fer Ferreux (Fe^{+2}) forme un complexe avec l'orthophénanthroline suite à une réaction d'oxydoréduction ; et donne une couleur orangée c'est le complexe Ferroïne (Fe^{+2} - phénanthroline).

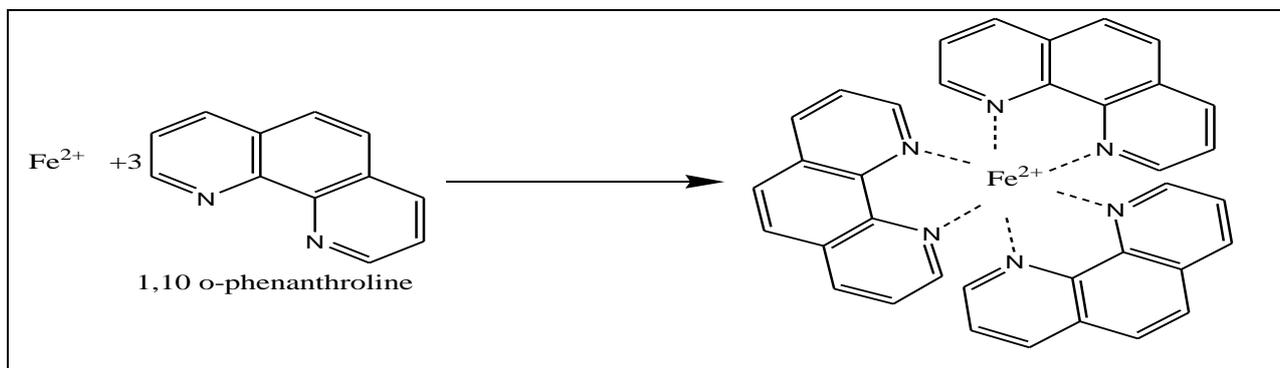


Figure 28 : Formation du complexe Fe^{+2} -phénanthroline (Apak *et al.*, 2007).

✓ Mode opératoire

50 µl de chlorure de Fer ($FeCl_3$) supplémentés de 30 µl de phénanthroline et 110 µl de méthanol sont ajoutés à 10 µl de chaque dilution des extraits étudiés. Le mélange est incubé à 30°C pendant 20 min. l'absorbance est mesurée à 510 nm. Le **BHA** et le **BHT** sont utilisés comme des standards, et les résultats sont calculés à titre d' $A_{0.5}$ (µg/ml).

6. Evaluation du potentiel enzymatique des échantillons

Deux activités enzymatiques sont évalués, l'activité antidiabétique et anti Alzheimer, par l'utilisation des Enzymes spécifiques pour les deux pathologies. L' α -amylase pour le diabète ; l'inhibiteur de cet enzyme ralentit l'absorption des glucides, donc le glucose passe lentement dans le sang, réduisant ainsi l'hyperglycémie. L'Acétylcholinestérase pour l'Alzheimer ; l'inhibition de cet enzyme vas augmenter la concentration de l'Acétylcholine, ce qui est considéré comme un traitement de ladite maladie.

6.1. Evaluation de l'activité anti diabétique

✓ principe

L'activité inhibitrice de l' α -amylase est déterminée selon la méthode de Zengin et *al.* (2014). Le principe consiste de mettre en contact l'extrait avec l'enzyme α -amylase et son substrat étant l'amidon afin d'évaluer la capacité de l'extrait d'inhiber l'activité de l'enzyme à dégrader son substrat.

✓ Mode opératoire

La microplaque à 96 puits est remplie par un volume de 25 μ l d'extrait de différentes concentrations puis on ajoute 50 μ l de solution de l' α -amylase, on incube pendant 10 min à 37° C. Ensuite 50 μ l d'amidon sont additionnés. Après une deuxième incubation de 10 min à 37° C, 25 μ l d'acide hypochlorique (HCl) (1M) et 100 μ l d'iodure de potassium iode (IKI) sont ajoutés. L'absorbance est mesurés à 620 nm. L'**acarbose** est utilisé comme un standard, et les résultats sont exprimés en **% d'inhibition** et **d'IC₅₀**. Le pourcentage d'inhibition l' α -amylase est calculé selon cette équation :

$$\% d'inhibition = 1 - \frac{(Ac - Ae) - (As - Ab)}{(Ac - Ae)}$$

Ac : Absorbance [Amidon + IKI+ HCl+ V solvant d'extrait + V tampon d'enzyme].

Ae : Absorbance [Enzyme + Amidon + IKI + HCl + V solvant d'extrait].

As : Absorbance [Enzyme + Extrait + amidon + IKI + HCl].

Ab : Absorbance [Extrait + IKI+ Tampon].

6.2. Evaluation de l'activité anti Alzheimer

✓ Principe

L'activité inhibitrice de l'Acétylcholinestérase (AChE) des deux extraits est déterminée par la méthode spectrophotométrique d'Ellman *et al.* (1961). Le principe consiste de mettre en contact l'extrait avec l'enzyme Acétylcholinestérase et son substrat étant l'Acétylcholine afin d'évaluer la capacité de l'extrait d'inhiber l'activité de l'enzyme l'AChE à dégrader son substrat l'Acétylcholine

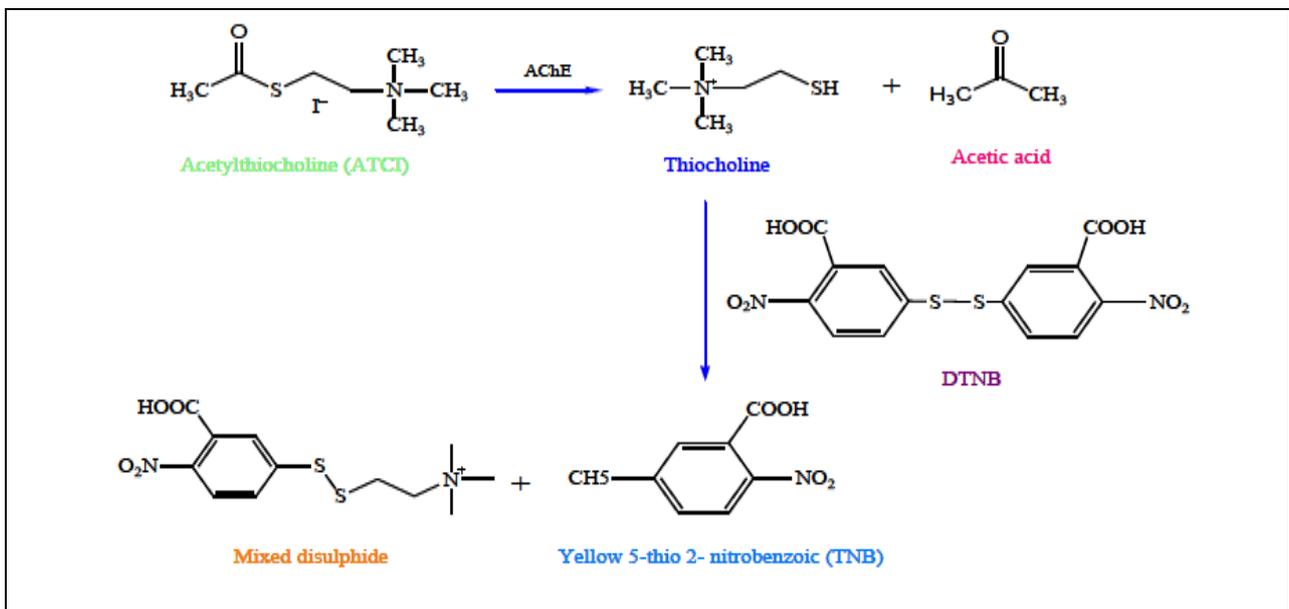


Figure 29 : Mécanisme chimique de la méthode d'Ellman (Shtayeh *et al.* 2014).

✓ Mode opératoire

Dans une microplaque à 96 puits ; 150 μl de tampon phosphate de sodium (PH=8) sont ajoutés à 10 μl d'extrait à différentes concentrations et à 20 μl d'enzyme AChE ($5,32 \times 10^{-3}$ U) ; le mélange est incubé à 25°C pendant 15 min. Après 10 μl de DNTB (0.5 mM) sont ajoutés. La réaction est ensuite initiée par l'ajout de 20 μl d'iodure d'acétylcholine (0.7mM). L'absorbance est mesurée à 412 nm. **La galanthamine** est utilisé comme un composé de référence ; et les résultats sont exprimés en % d'inhibition et d'IC₅₀. Le pourcentage d'inhibitions est calculé selon cette équation :

$$\%d'inhibition = \frac{E - S}{E} * 100$$

E : L'activité de l'enzyme sans extrait.

S : L'activité de l'enzyme avec l'extrait.

7. Analyse statistique

Les résultats des activités biologiques sont exprimés en pourcentage d'inhibition et en IC_{50} ou $A_{0.5}$. La concentration inhibitrice médiane (IC_{50}) est l'efficacité d'un composé (extrait) pour inhiber à moitié une fonction biologique spécifique. $A_{0.5}$ et IC_{50} sont inversement liés à la capacité biologique (antioxydante ou enzymatique) d'un composé ; plus elles sont faible plus l'activité est grande. Tous les résultats sont les moyennes de trois répétitions.

Eu regard les circonstances imposées, nous n'avons pas pu réaliser une analyse statistique de type "anova one way" de nos résultats. A cet effet, nous essayons, en quelque sorte, de faire une approximation relative pour comparer les résultats obtenus pour le marc du café obtenu par décoction avec ceux de la méthode expresso pour tous les paramètres étudiés.

TROISIEME PARTIE

RESULTATS ET DISCUSSION



1. Analyses physico-chimiques des échantillons

1.1 Teneur en eau (Humidité)

Les résultats rapportés dans le tableau (05) montrent une variabilité entre le marc de café obtenu par Espresso et celui par décoction dans la majorité des composants chimiques.

Le marc de café préparé par **pression (Espresso)** se distingue par sa **teneur élevée** en matière sèche comparativement au marc préparé par **Décoction** ; soient **33.94%** Verus **13.92%** respectivement. Autrement dit le marc du café **Décoction** contient une teneur en eau relativement élevée comparativement au marc **Espresso**, soit 66.06 et **86.08%**, respectivement.

Cruz et al. (2015) ont notifié un taux d'humidité du marc de café variant entre 18 à 45%. Les différentes techniques de préparation de la boisson (Décoction ; infusion ; pression) ont été rapportés avoir un effet significatif sur le taux finale d'humidité du marc (**Al Hamamre et al ., 2012 ; Cruz et al ., 2015**).

Tableau 05 : le taux de la matière sèche(MS), de la matière minérale (MM) et de la matière grasse (MG) du marc de café préparé par les deux méthodes.

Echantillons	MS (matière sèche)	MM (matière minérale)	MG (matière grasse)
MC Espresso	33.94 ± 0.60	1.75 ± 0.05	26.84 ± 0.1
MC Décoction	13.92 ± 0.89	2.55 ± 0.08	20.55 ± 0.29

Les résultats sont exprimés comme la moyenne des trois répétitions ± écart type.

Pour cette raison, la différence de la teneur en eau pourrait être attribuée au faite que la méthode de préparation du marc par décoction consiste à faire bouillir le café dans l'eau pour faire sortir tous les composants soluble, donc un long contact du marc avec l'eau. Cependant, l'utilisation de la pression dans la deuxième méthode limite le contact avec l'eau et ne laisse que les molécules d'eau emprisonnées dans la matrice interne du café.

En fait, la teneur élevé en humidité du marc de café est rapportée un point négatif pour sa valorisation en tant que matière première pour les biocarburants et récupération des lipides (**Corréla et al., 2016 ; Cruz et al., 2015**).

1.2 Teneur en Matière minérale

Le taux des minéraux dans le marc du café expresso est estimé à 1,75% MS versus 2,55 %MS pour celui récupéré par décoction. Cruz *et al.*, (2015) rapportant une quantité des minéraux dans le marc du café variant entre 0.8-3.5% MS. Dans ce dernier, plusieurs éléments ont été identifiés et quantifiés, à savoir le phosphore, le potassium, le magnésium, le calcium, le manganèse, le cuivre, le sodium, le fer et le zinc. Le potassium est considéré comme le minéral le plus abondant dans le marc (Capos-véga *et al.*, 2015; Cruz *et al.*, 2015; Mussatto *et al.*, 2011). Les taux faibles des minéraux enregistrés reflètent leur solubilisation quasi-exhaustive dans l'eau durant la préparation de la boisson

1.3 Teneur en Matière grasse

Les deux types du marc détiennent des taux différents en lipides variant de 26.84 et 20.55 % pour le marc de café filtré et le marc récupère par la décoction successivement, ces proportions ne diffèrent pas énormément entre les deux échantillons. Nos résultats sont cohérents avec ceux rapportés par Jenkins *et al.* (2014) ayant rapportés un taux lipidique du marc de café variant entre 19,9 et 27, 8 % MS avec une moyenne de 20% MS. Fortune et Chuck. (2014) ont signalé également un intervalle du taux de la matière grasse allant de 19.9 à 27.8% MS.

Le taux plus élevé des lipides dans le marc du café récupéré par la méthode expresso par rapport à celui obtenu par décoction est logique car, en plus de leur caractère hydrophobe, le temps de contact entre le café et l'eau chaude est très court dans l'expresso comparativement à la décoction. Cette suggestion fait le temps de contact entre l'eau et le café durant le procédé de préparation de la boisson un facteur limitant influençant, par ainsi le taux lipidique dans le marc.

2. Analyses colorimétriques par spectrophotométrie (UV-Visible)

2.1 Détermination de la teneur en phénols totaux (PT)

Les extraits bruts du marc de café préparés par pression et décoction ont été analysés quantitativement par spectrophotométrie UV-visible pour déterminer leurs contenus en phénols totaux. Les résultats exprimés en termes d'équivalent d'acide gallique sont exposés dans la figure 30.

Les résultats montrent que les teneurs en polyphénols totaux des deux extraits sont comparables. L'extrait du marc préparé par pression renferme 24.78 ug EAG par milligramme

versus 23.02 ug EAG par milligramme d'extrait du marc préparé par décoction. A titre de comparaison, ces valeurs sont en accord avec celles de l'étude de **Panusa et al. (2013)** variant de 19.3 à 25.5 ug AUG/mg. Cependant, ils sont supérieurs à ceux de **Mussatto et al. (2011)** ayant noté 16 ug d'EAG/mg.

Cette similarité des quantités phénoliques des deux extraits (Expresso et Décoction) pourrait être justifié par l'utilisation de la même technique de préparation d'extrait (**macération**) ainsi que les conditions d'extraction incluant l'utilisation du même système solvant **éthanol/eau** rapporté avoir une grande puissance à extraire une large gamme des composants phénoliques (**Panusa et al., 2013**), ainsi le temps d'extraction (**Mussatto et al.,2011**). Donc la méthode de préparation de la boisson café (pression et décoction) n'a pas influencé le taux des phénols totaux.

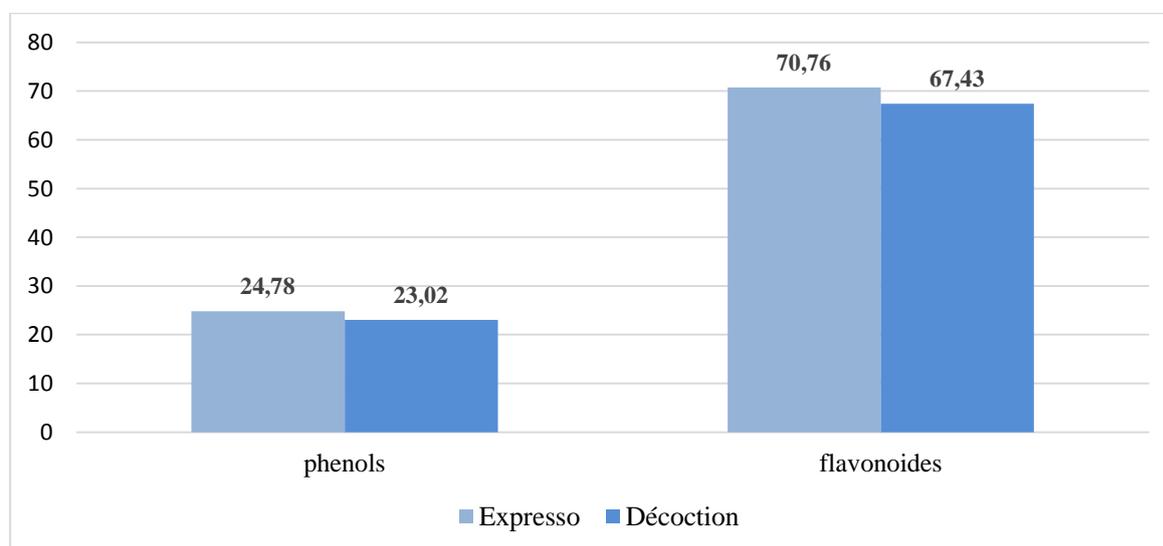


Figure 30 : teneurs en phénols totaux (ug GAE/mg) et flavonoïdes (ug Quercetine/ mg) du marc de café préparé par les deux méthodes.

2.2 Détermination de la teneur en flavonoïdes totaux (FT)

Les extraits bruts du marc de café préparé par Pression et Décoction ont été analysés quantitativement par spectrophotométrie UV-visible, pour déterminer leur contenu en flavonoïdes. Les résultats exprimés en termes d'équivalent de la Quercétine sont exposés dans la figure (30).

Les résultats montrent que les teneurs en flavonoïdes totaux des deux extraits étudiés révèlent peu de variabilités. L'extrait du marc préparé par pression (Expresso) referme une

quantité des flavonoïdes égaux à 70.76 ug GAE/mg contre 67.4 ug GAE/mg d'extrait pour celui préparé par décoction. Cette équivalence relative exclue, une autre fois, l'influence de la méthode de préparation du café sur le contenu flavonoïque du marc.

Une valeur inférieure au notre est enregistrée par **Phung *et al.* (2017)** pour l'extrait Hydrométhanolique (1 : 20, v/v) du marc de café, estimée à 31.15 µg d'EAG/mg d'extrait.

3. Evaluation du potentiel antioxydant des échantillons

Il est préférable d'utiliser plusieurs méthodes pour mesurer l'activité antioxydante car chaque méthode est spécifique par son mode d'action. Pour rappeler, les méthodes utilisées pour l'évaluation de l'activité antioxydante de nos extraits sont : DPPH ; CUPRAC ; FRAP et Phénanthroline.

3.1 L'activité du piégeage du radical libre DPPH

Les valeurs du pourcentage d'inhibition pour cette activité n'ont pas pu être calculées à cause d'un chevauchement des valeurs d'absorbance de différentes concentrations. Seules les valeurs d'IC50 sont rapportées et discutées.

➤ La valeur IC50

L'activité antioxydante DPPH est exprimée par la valeur IC50 (la concentration d'extrait nécessaire pour inhiber 50% du radical libre DPPH). D'après l'histogramme présenté dans la figure 31. Les deux extraits du marc de café Espresso et Décoction sont pratiquement similaires pour l'activité antioxydante DPPH avec une $IC_{50} = 47.69 \pm 1.14$ et $IC_{50} = 45.78 \pm 0.74$ respectivement. Cette activité est quatre fois plus faible à celle du standard BHT ($IC_{50} = 12.99 \pm 0.41$) ; et sept fois plus faible que celle du BHA ($IC_{50} = 6.14 \pm 0.41$).

Cette similarité dans l'activité antiradicalaire du DPPH entre l'extrait Espresso et Décoction peut être expliquée par leurs similarités en composants polaires à savoir les polyphénols et les flavonoïdes. Des études ont montrés que le dosage des phénols totaux pouvant être considéré comme une méthode d'évaluation de l'activité antioxydante des extraits analysés ; ainsi une relation entre la structure des composés phénoliques et leur pouvoir antioxydant est rapportée (Perior *et al.*, 2005). Les mêmes auteurs stipulent que l'activité antioxydante d'un échantillon peut être expliquée par leurs contenus en composés phénoliques. Donc les résultats de ce test DPPH sont cohérents avec les résultats du dosage total phénolique.

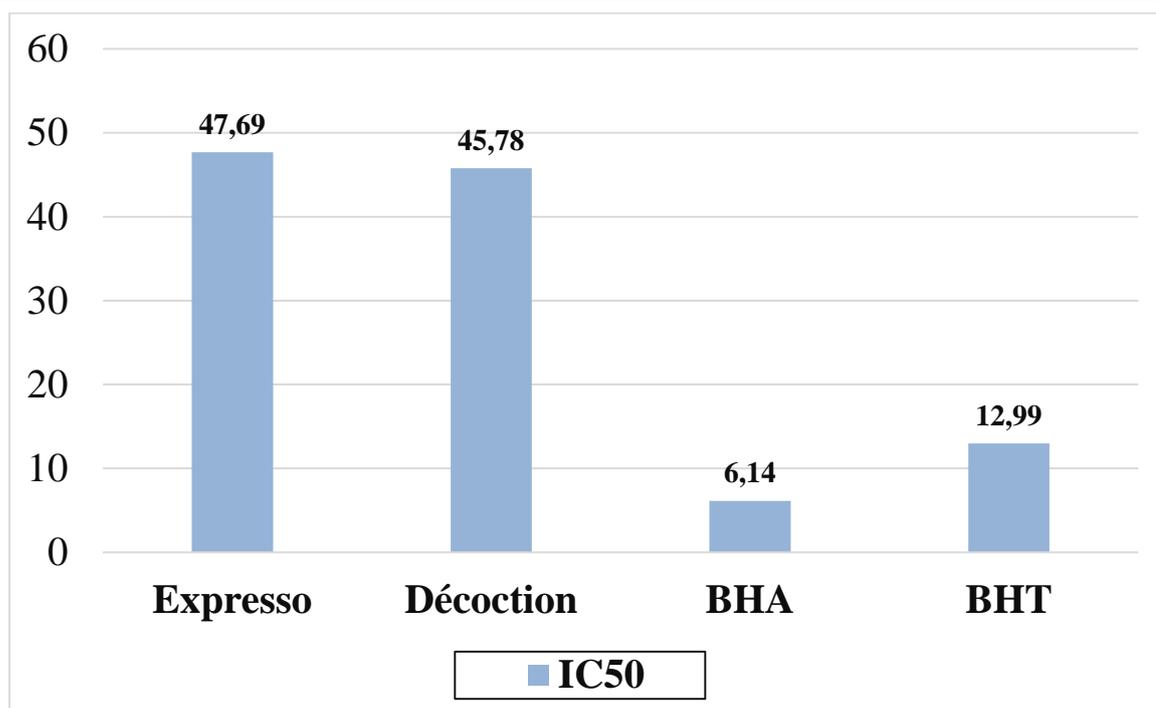


Figure 31 : IC50 pour l'activité anti-radicalaire DPPH des échantillons et des standards exprimée en µg/ml.

3.2 L'activité antioxydante par réduction du cuivre (CUPRAC)

➤ Le pourcentage d'inhibition

Les résultats rapportés dans la figure 32 montrent que les deux extraits du marc de café (Expresso et Décoction) présentent des taux d'inhibitions de l'activité CUPRAC similaire entre eux à différentes concentrations (100-800 ug) ; et très proche aux standard BHA à partir de la concentration 400 ug. Les deux échantillons dépassent les taux enregistrés par le standard BHT à partir de la concentration 100 ug.

➤ La valeur A0.50

D'après la figure 33, les deux extraits Expresso et Décoction ont une valeur A0.5 presque similaire 18.25 ± 1.17 et 20.29 ± 0.79 ug/ml respectivement. En comparaison avec les standards, la valeur A0.5 des deux extraits est quatre fois plus faible que le standard BHA (A0.5 : 5.35 ± 0.71 µg/ml) ; et deux fois plus faible que BHT (A0,5 : 8.97 ± 3.94 µg/ml). Donc les deux extraits (Expresso et Décoction) montrent une activité CUPRAC moyenne est, à certain degré proche aux standards, cela pourrait être justifié par la teneur des marcs par les composés phénoliques et non phénoliques.

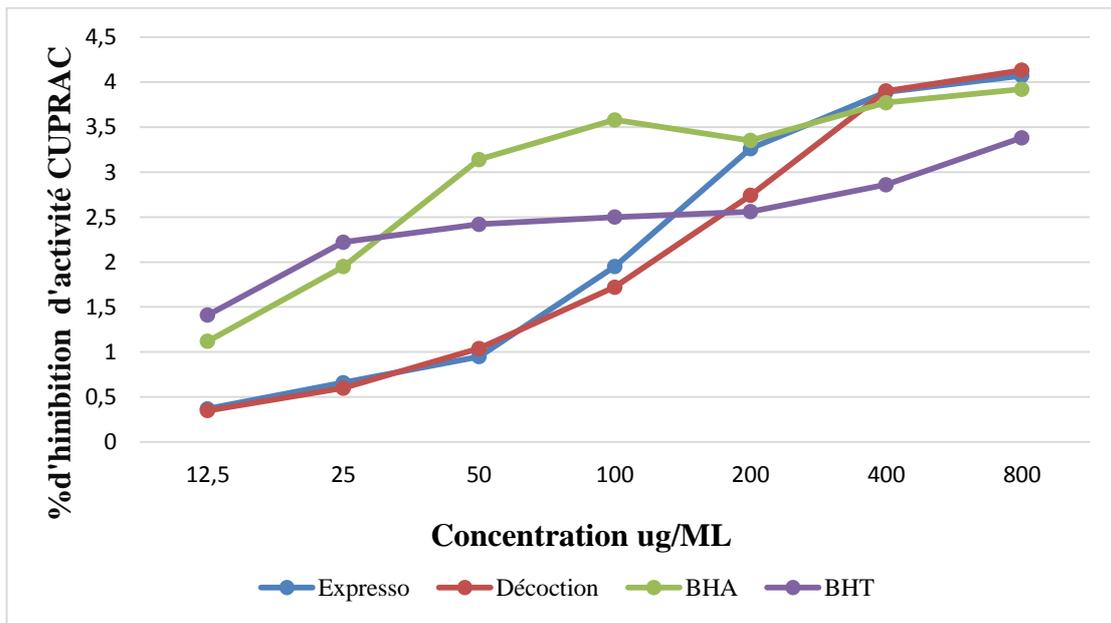


Figure 32 : Activité CUPRAC des deux échantillons et standards à différentes concentrations.

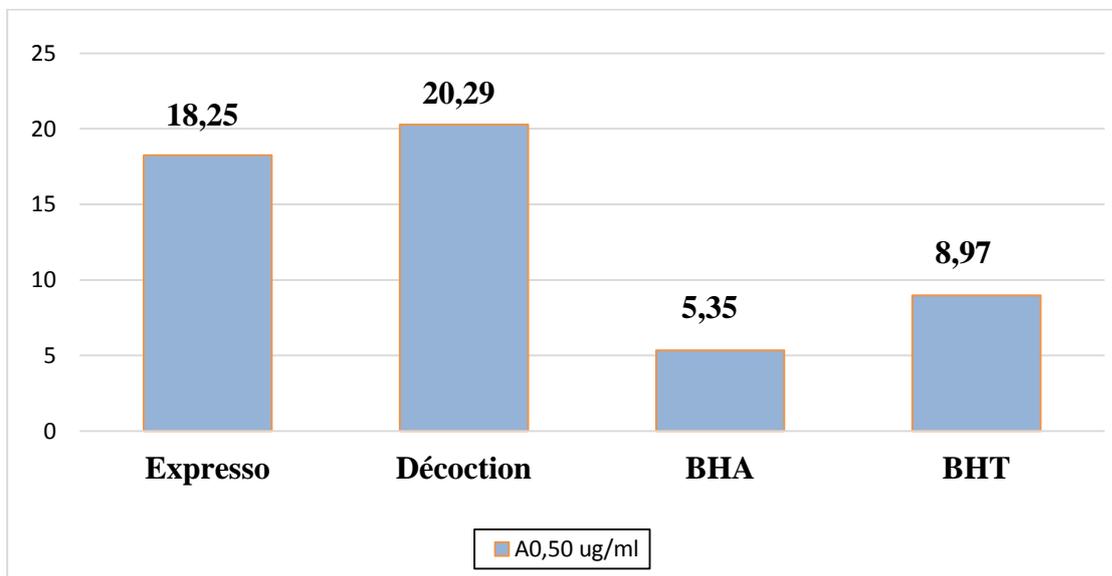


Figure 33 : A0.5 pour l'activité antioxydante CUPRAC des échantillons et des standards exprimé en ug/ml.

3.3 Activité du pouvoir réducteur (FRAP)

➤ Le pourcentage d'inhibition

D'après la figure 34, les deux extraits Espresso et Décoction présentent des taux d'inhibitions de l'activité FRAP similaire à différentes concentrations (3.125, 200 ug/ml) ; ces résultats sont peu loin des résultats des standards (acide ascorbique et alpha tocophérol).

➤ La valeur A0.50

Les résultats du test du pouvoir réducteur confirment les résultats précédents. Les extraits Espresso et Décoction montrent des valeurs A0.5 de l'ordre de 104.17 ± 1.17 et 112.50 ± 0.98 respectivement (figure 35) ; donc les deux extraits montrent une activité FRAP similaire. Cette activité est un peu loin d'être comparé avec les deux standards, l'acide ascorbique, 6.77 ± 1.15 et alpha tocophérol 34.93 ± 2.38 . La nature de la composition des échantillons en matière de leurs contenus en composés phénoliques et non phénoliques pourrait, à un certain degré, justifier ces constats.

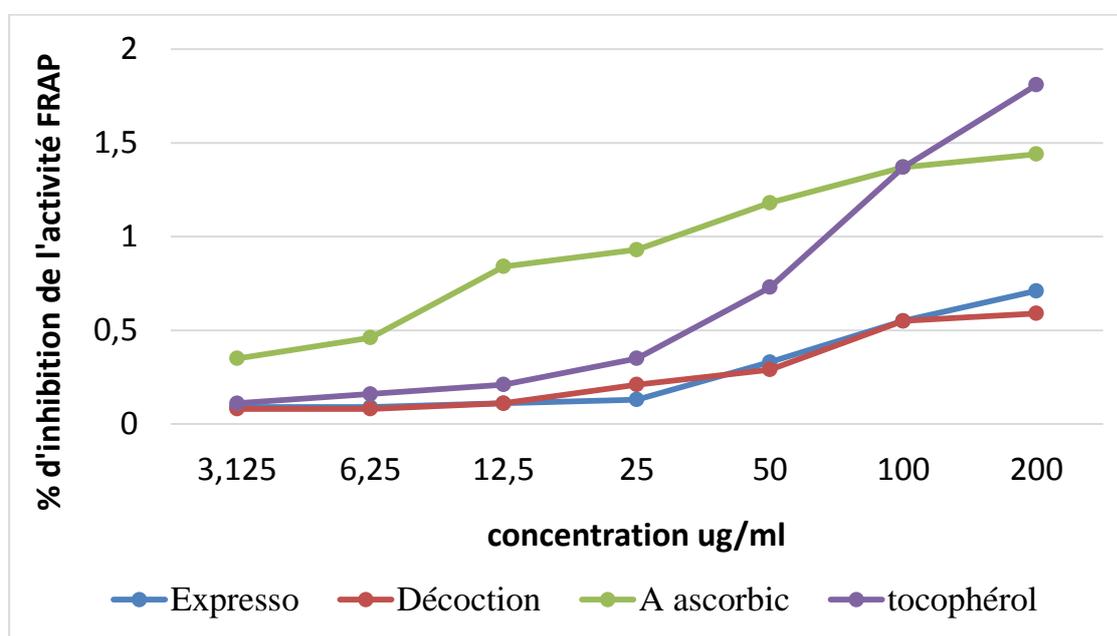


Figure 34 : Activité **FRAP** des échantillons et standards à différentes concentrations.

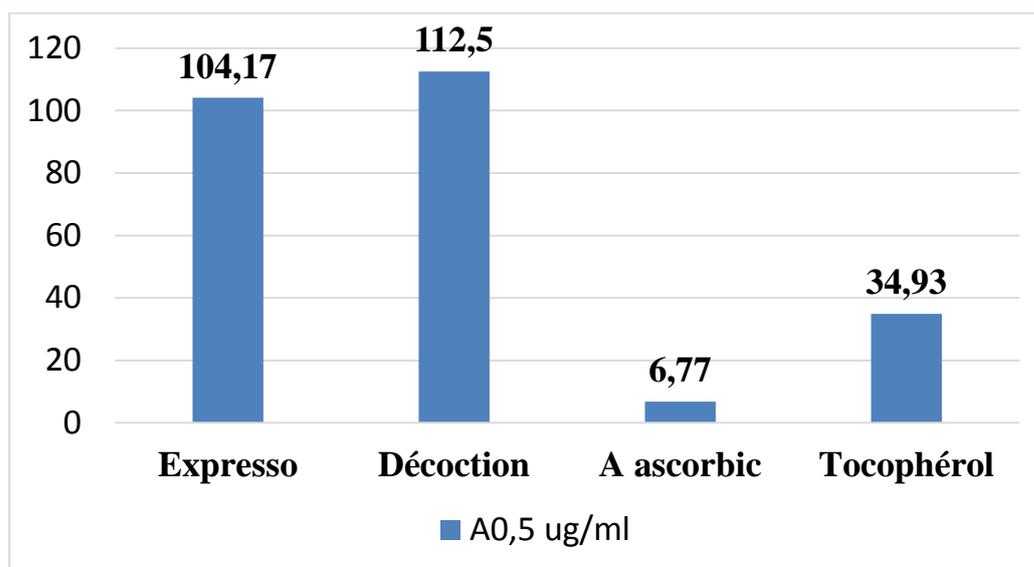


Figure 35 : Valeur d'A0.5 du test **FRAP** des deux extraits du Marc de café.

3.4 Activité de réduction par la formation du complexe Fe^{+2} -phénanthroline

➤ Le pourcentage d'inhibition

En observant la figure (36), on remarque que les deux extraits Espresso et Décoction présentent des taux d'inhibitions de l'activité phénanthroline similaire à différentes concentrations (3.125-200 ug/ml) ; et un taux faible par rapport aux standards BHA et BHT à partir de la concentration 12.5 ug/ml

➤ La valeur A0.50

Les deux extraits du marc de café ont une valeur A0.50 très proche 17.97 ± 1.14 ug/ml et 12.47 ± 1.04 ug/ml pour l'Expresso et la Décoction respectivement (figure 37). En comparaison avec les standards ; les deux extraits montrent une activité antioxydante phénanthroline moyennement faible par rapport aux BHA (0.93 ± 0.07) et BHT (2.24 ± 0.17). Cette similarité dans l'activité Phénanthroline entre l'extraits Espresso et Décoction pourrait être attribuée à leurs contenus polyphénoliques. Donc les résultats de cette activité sont en accord avec les méthodes précédentes.

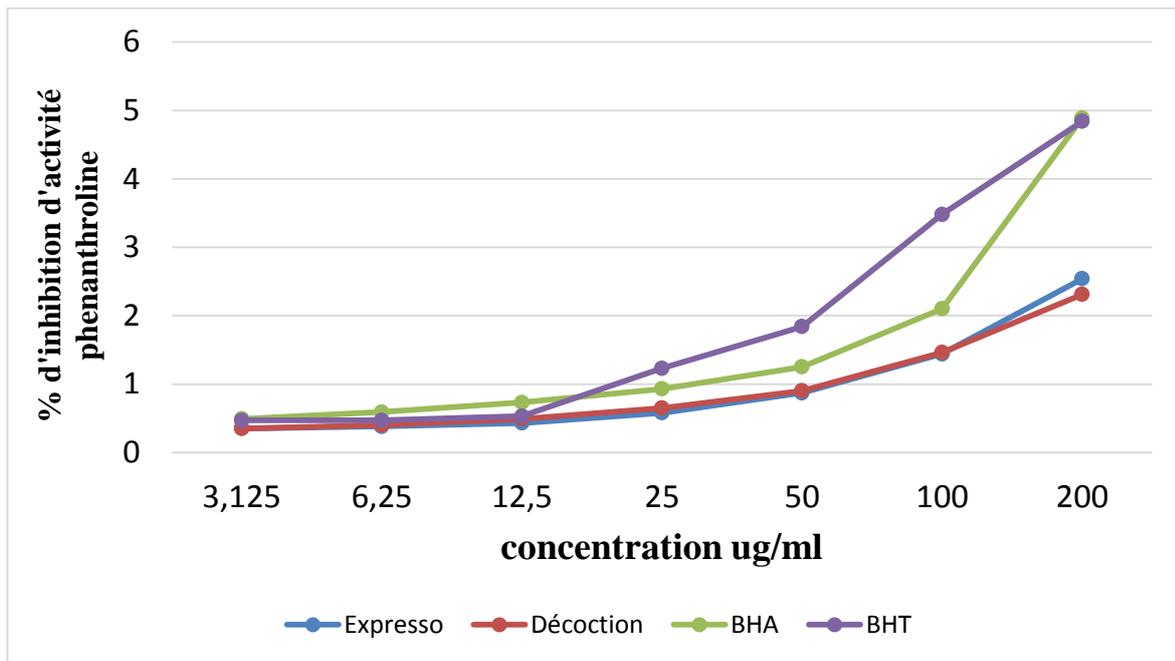


Figure 36 : Activité phénanthroline des différents échantillons et standards à différentes concentrations.

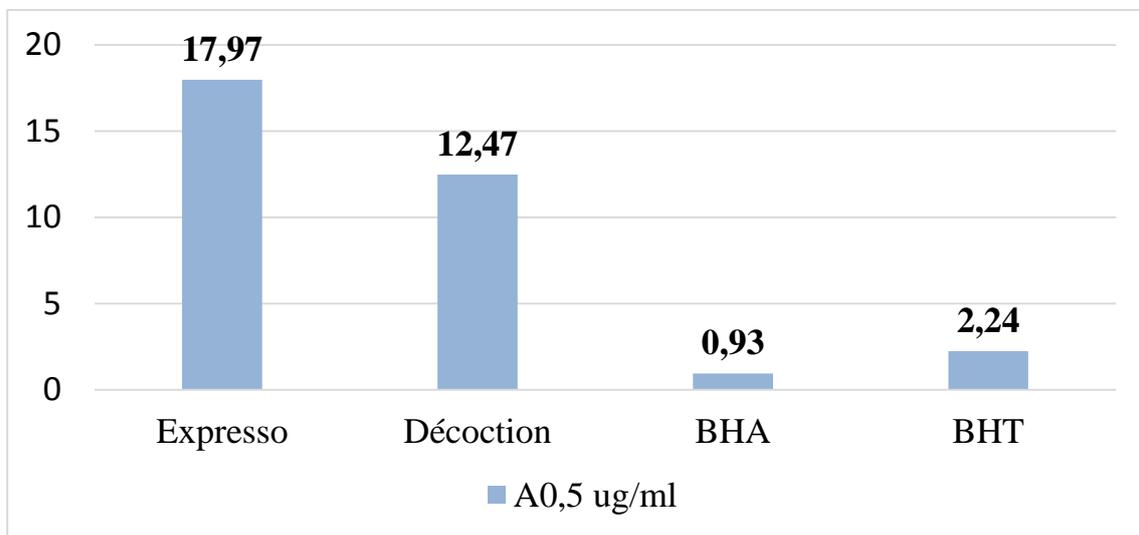


Figure 37 : Valeur d'A0.5 du test phénanthroline des deux extraits du Marc de café.

4. Evaluation du potentiel enzymatique des échantillons

Pour déterminer la capacité antidiabétique et Alzheimer des échantillons étudiés, deux enzymes potentielles thérapeutiques ont été ciblées : l'alpha amylase pour le diabète le cholinestérase pour Alzheimer.

4.1. L'activité antidiabétique des échantillons

En absence des valeurs de l'IC50 et se basant seulement sur le pourcentage d'inhibition, nous pouvons conclure que les deux extraits présentent un pourcentage d'inhibition supérieurs à celui noté pour le standard. De ce fait, leur activité antidiabétique est décelable, cependant, le manque des données de l'IC50 est limitant pour savoir l'efficacité de telle activité inhibitrice de l' α -amylase. L'activité remarquable des échantillons vis-à-vis l' α -amylase pourrait être attribuée à la présence de divers produits naturels inhibant les récepteurs de telle enzyme telles que les flavones et les flavonoïdes (Kim *et al.*, 2000). De plus, les polyphénols ont également des effets antihyperglycémiques selon les rapports de Hanamura *et al.* (2006) et Hossain *et al.* (2007) avec un rapport structure-activité très puissant.

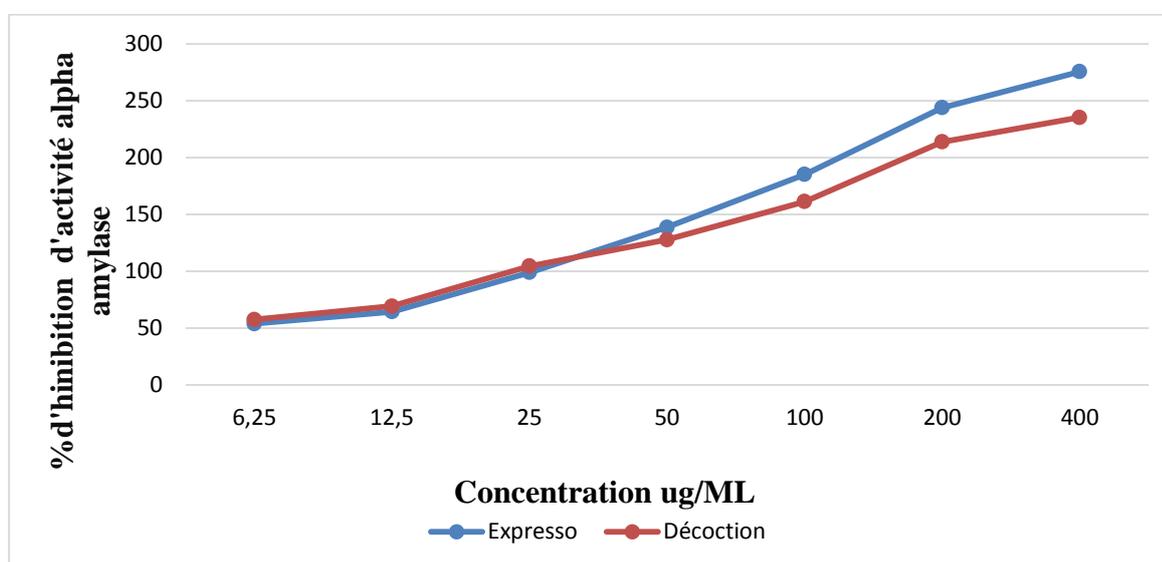


Figure 38 : activité d'alpha amylase des échantillons.

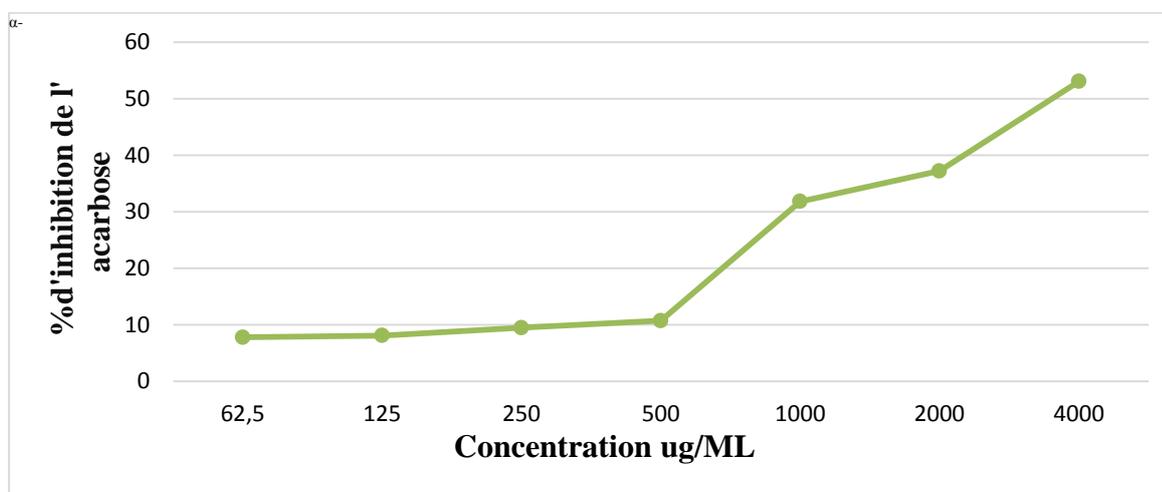
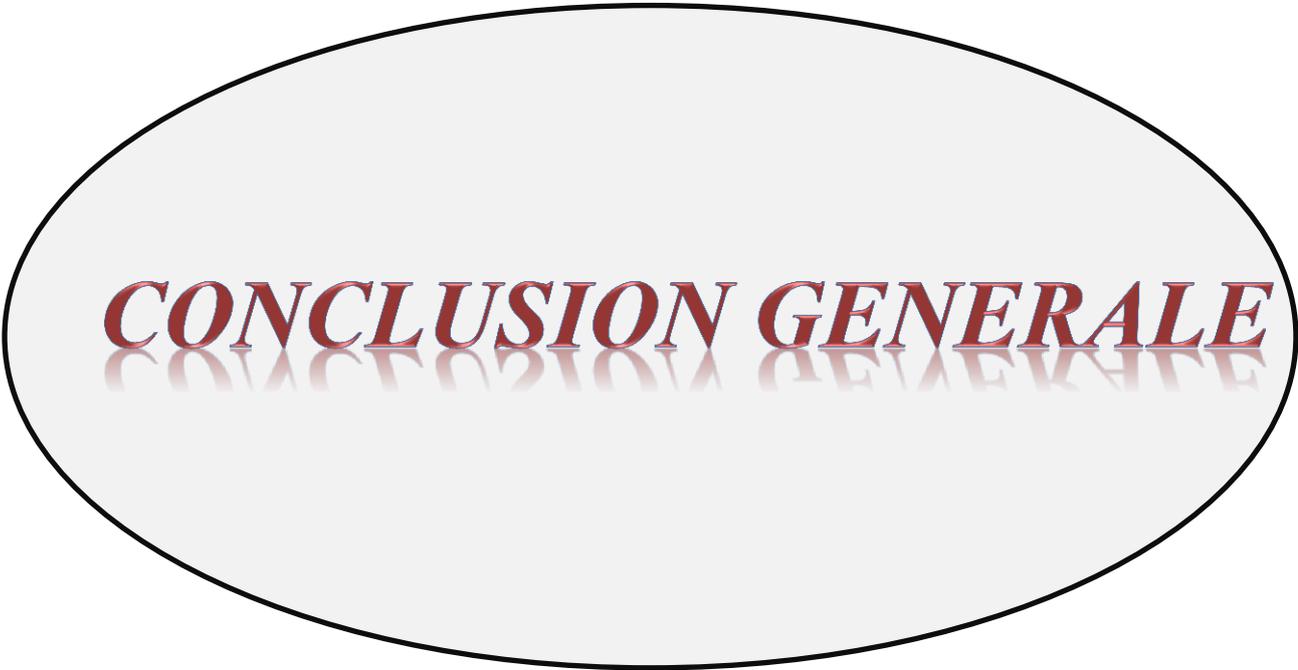


Figure 39 : activité d'alpha amylase du standard.

4.2 L'activité anticholinestérase des échantillons

L'évaluation de la capacité anti-Alzheimer de nos extraits a montré que les échantillons testés dans notre étude ne présentent aucune activité vis-à-vis l'enzyme responsable de la maladie. L'inactivité de nos échantillons pourrait avoir deux aspects : **soit un aspect quantitatif** ou la présence des composants secondaires comme les phénols et les flavonoïdes dans marc du café était en quantité inférieures aux seuils d'inhibition, **soit** le processus de torréfaction a influencé sur la composition chimique et l'activité biologique du café et par conséquent de son marc. Il a été rapporté que lors de la torréfaction, les composés phénoliques se dégradent partiellement et / ou forment des composés polymères dans les réactions de Maillard, et la caramélisation des saccharides ainsi que la pyrolyse des composés organiques (Yilmaz *et al.*, 2011).



CONCLUSION GENERALE

Notre travail s'oriente vers une voie d'investigation et de caractérisation jusque-là n'a jamais entreprise en Algérie, de deux extraits du marc de café préparés par deux méthodes différentes : par pression (expresso) et par Décoction. L'objectif de mener ce type de comparaison et de choisir le marc le plus effectif chimiquement et biologiquement pour des raisons de valorisation ultérieure et de savoir, parallèlement l'influence de la méthode de préparation de la boisson sur la qualité du marc récupéré. En premier lieu, une comparaison chimique (matière sèche, matière minérale et matière grasse) et phytochimique (teneur en phénols totaux et en flavonoïdes) des deux extraits est entreprise, suivie par une évaluation de leur potentiel antioxydant et enzymatique. D'autres analyses chimiques, tels que le dosage des sucres, des protéines et des minéraux sont prévues, cependant pour des circonstances imposées, elles ont été prorogées à un moment ultérieur. Parallèlement pour l'activité anti-inflammatoire et antimicrobienne ainsi que l'analyse statistique.

La comparaison chimique entre les deux types de marc révèle une variation du taux d'humidité, des minéraux et des lipides. L'extrait décoction est caractérisé par sa teneur élevée en humidité et en matière minérale par rapport à l'Expresso. Ce constat est tout à fait logique du fait que la méthode de décoction présente un contact avec l'eau plus long que l'expresso. Le marc obtenu par la méthode expresso est caractérisé par sa teneur plus élevée en matière grasse comparativement au marc décoction ce qui fait ce dernier une bonne source de lipides.

L'analyse phytochimique est ainsi une étape importante pour la comparaison des deux extraits. L'utilisation des mêmes conditions d'extraction ; macération, un système solvant (éthanol /eau : 50% : 50%) et le même temps de contact pourrait justifier le taux des phénols totaux et flavonoïdes pratiquement similaire dans les deux types de marc.

L'évaluation du potentiel biologique des deux marcs est faite à travers l'évaluation de l'activité antioxydante et enzymatique. La première est réalisée par quatre méthodes différentes : Le piégeage du radical libre DPPH ; le test de réduction du cuivre CUPRAC, le teste FRAP et le phénanthroline. Les résultats de ces tests montrent que les deux extraits présentent les activités antiradicalaires et antioxydantes similaires et faibles par rapport aux standards. Ce constat pourrait être justifié par leurs teneurs similaires en composants chimiques et phytochimiques. De plus, l'activité antioxydante n'est généralement pas due à l'action d'un seul composé mais aux interactions entre plusieurs composés. C'est pour cette raison que plusieurs méthodes pour l'évaluation de cette activité sont recommandées car chaque méthode est spécifique par son mode d'action.

Le deuxième aspect de l'évaluation du potentiel biologique de nos échantillons est fait par la détermination de l'activité antidiabétique et anti-Alzheimer. Les résultats ont montré que les deux extraits ne présentent aucune activité anticholinestérase, cela pourrait être traduit par un **aspect quantitatif** ou les quantités des composants responsables de cette activité sont inférieures au seuil critique. Cependant, les mêmes extraits possèdent une d'activité antidiabétique décelable à travers seulement les résultats de pourcentage d'inhibition.

A notre niveau et à la lumière de ces résultats, nous pouvons conclure que les différents types de préparation de la boisson (pression, décoction) ont influencé, d'une manière non appréciable, la qualité du marc de café récupéré. Le choix de la méthode de préparation adéquate dépend de la valorisation attendue. Enfin, il est souhaitable de mener une étude plus approfondie pour isoler et caractériser les principes actifs responsables de ces propriétés pharmacologique et d'évaluer d'autres activités biologiques *in vitro* et *in vivo*.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

- ✚ **Al-Hamamre**, Z., Foerster, S., Hartmann, F., Kröger, M., & Kaltschmitt, M. (2012). Oil extracted from spent coffee grounds as a renewable source for fatty acid methyl ester manufacturing. *Fuel*, 96, 70-76.
- ✚ **Ali-Shtayeh**, M. S., Jamous, R. M., Zaitoun, S. Y. A., & Qasem, I. B. (2014). In-vitro screening of acetylcholinesterase inhibitory activity of extracts from Palestinian indigenous flora in relation to the treatment of Alzheimer's disease. *Functional Foods in Health and Disease*, 4(9), 381-400.
- ✚ **Apak**, R., Güçlü, K., Demirata, B., Özyürek, M., Çelik, S. E., Bektaşoğlu, B., & Özyurt, D. (2007). Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay. *Molecules*, 12(7), 1496-1547.
- ✚ **Apak**, R., Güçlü, K., Özyürek, M., & Karademir, S. E. (2004). Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(26), 7970-7981.
- ✚ **Belguidoum** K. (2015). Analyse par hblc-uv et hblc-dad-ms du café de la marche algérienne pour sa composition nutraceutique et mise en évidence de la présence de l'acrylamide, un cancérigène et génotoxique potentiel dans le café torréfié. Thèse.D : faculté des mathématiques, informatiques et sciences de la matière.
- ✚ **Benikhlef Khadra** J.(2017). Contribution à l'étude phytochimique et activité biologique des extraits des graines coffea canephora. Mémoire. M.E.B : biochimie : faculté des sciences de la nature et de la vie et des sciences de la terre et de l'univers.
- ✚ **Blois**, M. S. (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181(4617), 1199-1200.
- ✚ **Bravo**, J., Monente, C., Juániz, I., De Peña, M. P., & Cid, C. (2013). Influence of extraction process on antioxidant capacity of spent coffee. *Food Research International*, 50(2), 610-616.
- ✚ **Carassou**, F. (2015). Une récupération spécifique du marc de café aurait-elle une plus-value pour la communauté ?cas de l'île de montréal. Université de Sherbrooke. (15-16)
- ✚ **Chen**, K.I., Lo, Y.C., Liu, C.W., Chou,C.C. et Cheng, K.C. (2013) Enrichment of two isoflavone aglycones inblack soymilk by using spent coffee grounds as an immobiliser for b-glucosidase. *Food Chemistry*,vol. 139, p. 79-85.
- ✚ **Corrêa**, J. L. G., Mendonça, K. S. D., Rodrigues, L. R., Resende, M. L. V., & Alves, G. E. (2016). Spray drying of coffee leaf extract.

- ✚ **Cruz, R., Mendes, E., Torrinha, Á., Morais, S., Pereira, J. A., Baptista, P., & Casal, S.** (2015). Revalorization of spent coffee residues by a direct agronomic approach. *Food Research International*, 73, 190-196.
- ✚ **Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres Jr, V., & Featherstone, R. M.** (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical pharmacology*, 7(2), 88-95.
- ✚ Des composés du café pourraient freiner le cancer de la prostate [en ligne] disponible sur <http://www.doctissimo.fr/nutrition/news/des-composes-du-cafe-pourraient-freiner-le-cancer-de-la-prostate> [consulter le 27 aout 2020]
- ✚ **Gülcin, I.** (2012). Antioxidant activity of food constituents: an overview. *Archives of toxicology*, 86(3), 345-391.
- ✚ **Karthik, I.** (2013). Evaluation of anti-inflammatory activity of canthium parviflorum by in-vitro method.
- ✚ **Le, P. T., Vu, Q. T. H., Nguyen, Q. T. V., Tran, K. A., & Le, K. A.** (2017). Spent coffee grounds as a valuable source of bioactive compounds and bioenergy. *Chemical Engineering Transactions*, 56, 37-42.
- ✚ **Lin, S., Zhang, G., Liao, Y., Pan, J., & Gong, D.** (2015). Dietary flavonoids as xanthine oxidase inhibitors: Structure–affinity and structure–activity relationships. *Journal of agricultural and food chemistry*, 63(35), 7784-7794.
- ✚ **Low, J. H., Rahman, W. A. W. A., & Jamaluddin, J.** (2015). Structural elucidation of tannins of spent coffee grounds by CP-MAS 13C NMR and MALDI-TOF MS. *Industrial Crops and Products*, 69, 456-461.
- ✚ **Mansour-Benamar M.** (2016).valorisation des résidus agricoles par la culture de deux souches de champignons comestibles de genre pleurotus. These. D.E.S.B : biologie végétale : faculté des sciences biologiques et des sciences agronomiques.
- ✚ **Müller, L., Gnoyke, S., Popken, A. M., & Böhm, V.** (2010). Antioxidant capacity and related parameters of different fruit formulations. *LWT-Food Science and Technology*, 43(6), 992-999.
- ✚ **Mussatto, S. I., Carneiro, L. M., Silva, J. P., Roberto, I. C., & Teixeira, J. A.** (2011). A study on chemical constituents and sugars extraction from spent coffee grounds. *Carbohydrate polymers*, 83(2), 368-374.
- Oyaizu, M. (1986). Studies on products of browning reaction. *The Japanese journal of nutrition and dietetics*, 44(6), 307-315.

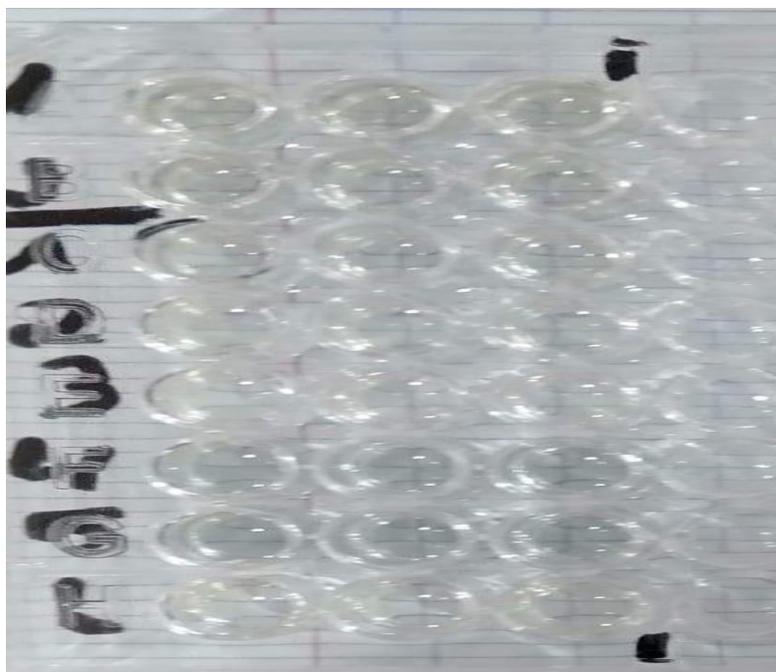
- ✚ **Oliveira, S. D., Souza, G. A. D., Eckert, C. R., Silva, T. A., Sobral, E. S., Fávero, O. A., & Baader, W. J. (2014).** Evaluation of antiradical assays used in determining the antioxidant capacity of pure compounds and plant extracts. *Química Nova*, 37(3), 497-503.
- ✚ **Oyaizu, M. (1986).** Studies on products of browning reaction. *The Japanese journal of nutrition and dietetics*, 44(6), 307-315.
- ✚ **Panusa, A., Zuurro, A., Lavecchia, R., Marrosu, G., & Petrucci, R. (2013).** Recovery of natural antioxidants from spent coffee grounds. *Journal of agricultural and food chemistry*, 61(17), 4162-4168.
- ✚ **Peshev, D., Mitev, D., Peeva, L., & Peev, G. (2018).** Valorization of spent coffee grounds—A new approach. *Separation and Purification Technology*, 192, 271-277.
- ✚ **Pol Nicolas Guy HALER J. 2013.**le café : les effets bénéfiques et néfastes sur la santé. These.D.E.PH : faculté de pharmacie.
- ✚ **Prior, R. L., Wu, X., & Schaich, K. (2005).** Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(10), 4290-4302.
- ✚ **Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999).** Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine*, 26(9-10), 1231-1237.
- ✚ **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.
- ✚ **Szydłowska-Czerniak, A., Dianoczki, C., Recseg, K., Karlovits, G., & Szłyk, E. (2008).** Determination of antioxidant capacities of vegetable oils by ferric-ion spectrophotometric methods. *Talanta*, 76(4), 899-905.
- ✚ **Topçu, G., Ay, M., Bilici, A., Sarıkürkü, C., Öztürk, M., & Ulubelen, A. (2007).** A new flavone from antioxidant extracts of *Pistacia terebinthus*. *Food Chemistry*, 103(3), 816-822.
- ✚ **Van Dam, J. E. & Harmsen, P. F. H. (2010).**Coffee residues utilization. Wageningen UR-Food & Biobased Research, 2010.
- ✚ **Zengin, G., Sarikurkcü, C., Aktumsek, A., Ceylan, R., & Ceylan, O. (2014).** A comprehensive study on phytochemical characterization of *Haplophyllum myrtifolium* Boiss. endemic to Turkey and its inhibitory potential against key enzymes involved in Alzheimer, skin diseases and type II diabetes. *Industrial Crops and Products*, 53, 244-251.



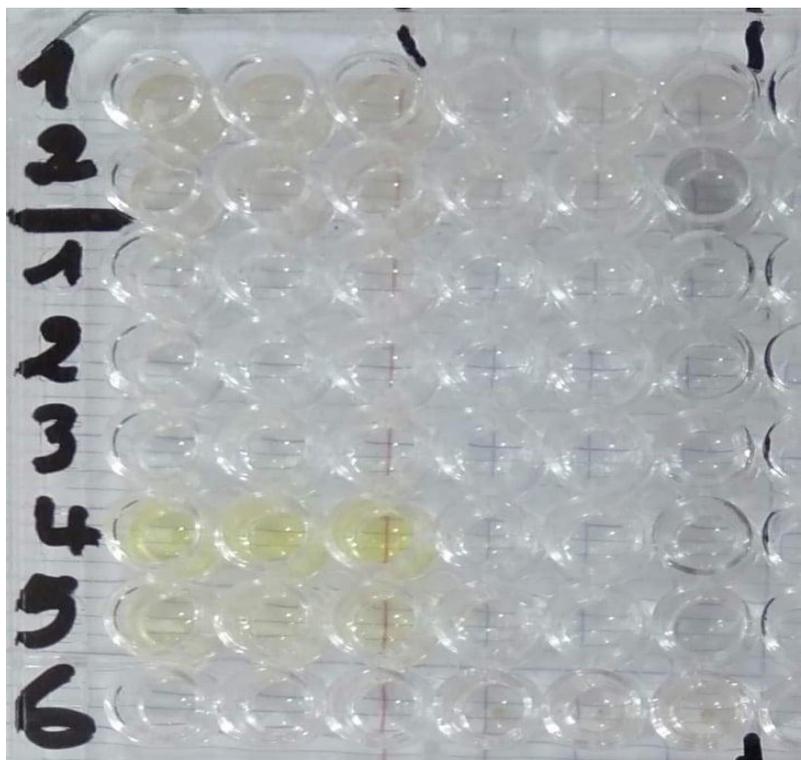
ANNEXES

Annexe I : Photos de résultats des microplaques

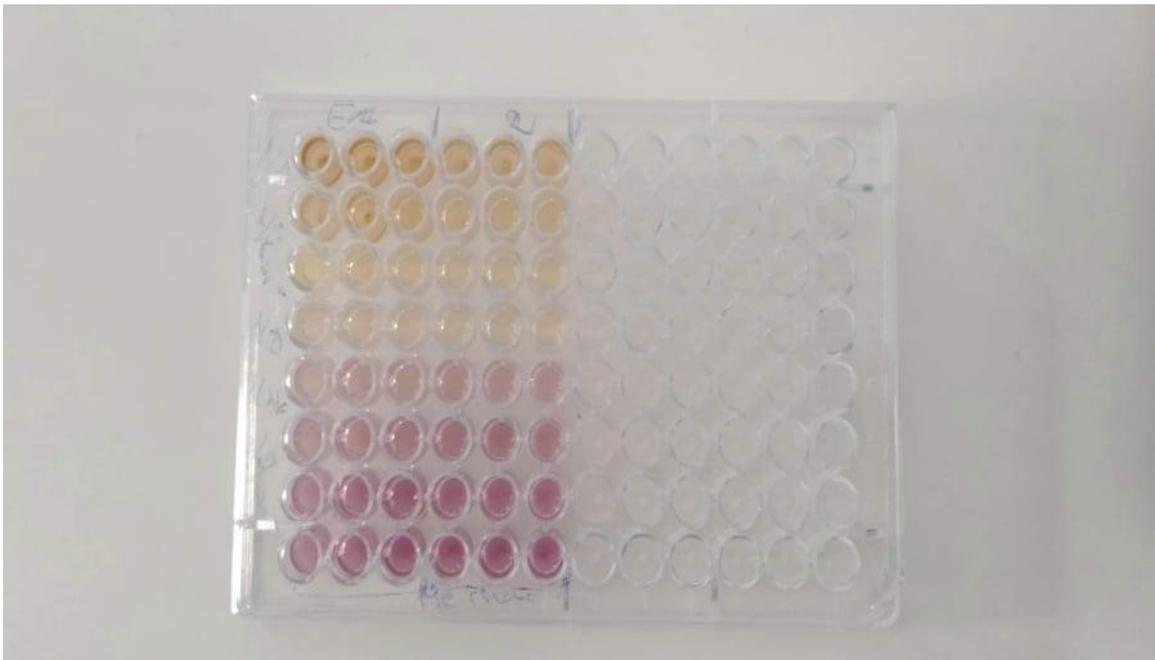
1/ Phénols totaux (PT)



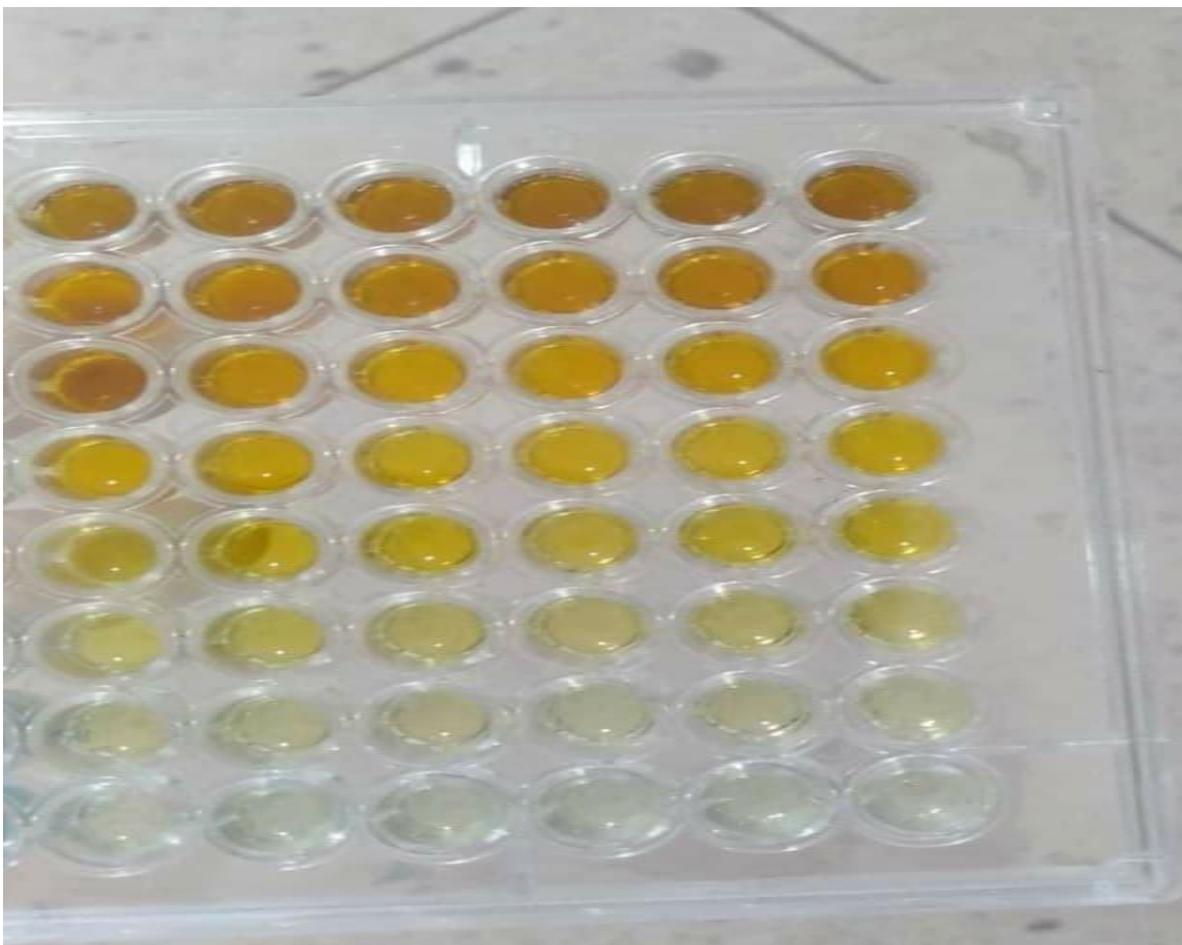
2/ Flavonoïdes totaux



3/ DPPH



4/ CUPRAC



5/ FRAP



6/ Phénanthroline



Annexe II : Préparation des réactifs et des solutions des activités biologiques

Réactifs	Composition	Quantité
DPPH[*]	• DPPH	6 mg
	• Méthanol	100 ml
Néocuproïne	• Néocuproïne	0,039 g
	• Ethanol	25 ml
Phénantroline (0.5%)	• 1,10-Phénanthroline monohydrate	0,05g
	• Méthanol	10 ml

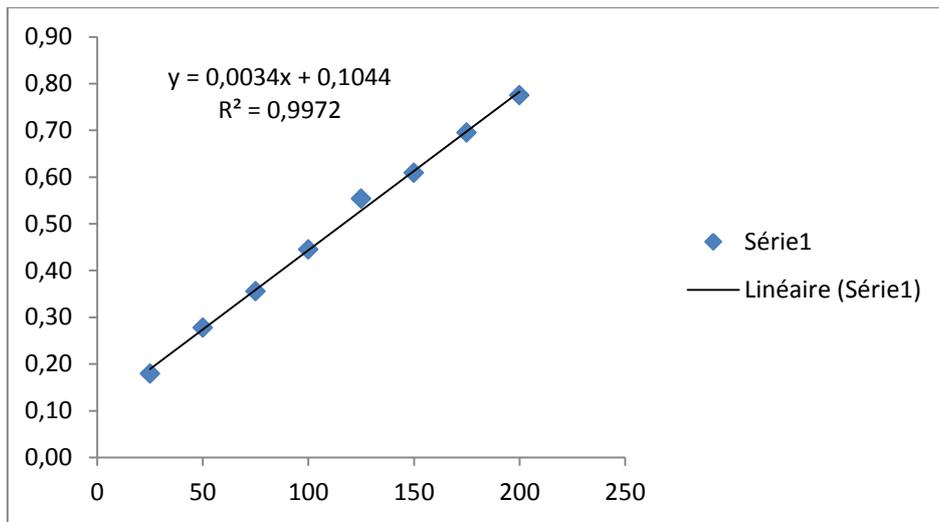
Préparation des standards

Standards	Compositions	Quantités
Acide gallique	Acide gallique	0,5 mg
	Méthanol	5 ml
Quercétine	Quercétine	1 mg
	Méthanol	5 ml
BHA	BHA	0,5 mg
	Méthanol	1 ml
BHT	BHT	0,5 mg
	Méthanol	1 ml
Acide ascorbique	Acide Ascorbique	4 mg
	Méthanol	1 ml
α-Tocophérol	α -Tocophérol	4 mg
	Méthanol	1 ml
Acarbose	Acarbose	4mg
	Méthanol	1ml
Galantamine	Galantamine	4mg
	Méthanol	1ml

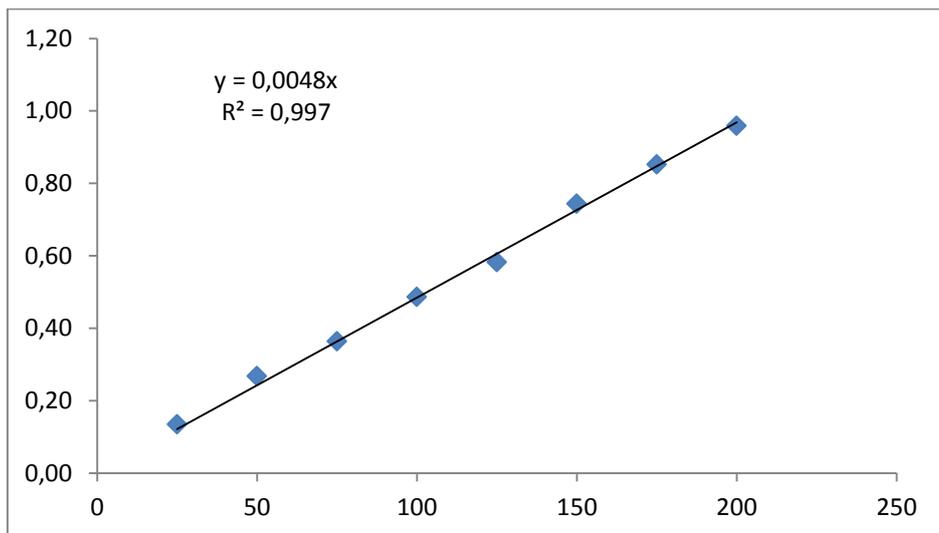
Préparation des solutions chimiques

Solutions chimiques	Compositions	Quantités
Réactif de Folin-Ciocalteu dilué 10 fois	FCR concentré (2M)	1ml
	H ₂ O	q.s.p 10 ml
Carbonate de sodium anhydre (7,5%)	Na ₂ CO ₃	7,5 g q.s.p
	H ₂ O	100 ml
Acétate de potassium (1M)	CH ₃ COOK	9,80 g
	H ₂ O	100 ml
Nitrate d'aluminium	Al(NO ₃) ₃ , 9H ₂ O	10g
	H ₂ O	100ml
Acétate d'ammonium	CH ₃ COONH ₄	1,927 g
	H ₂ O	25 ml
Chlorure de cuivre II dihydraté	CuCl ₂ , 2H ₂ O	0,042625 g
	H ₂ O	25 ml
Tampon phosphate pH 6,6	NaH ₂ PO ₄	62,5 ml
	Na ₂ HPO ₄	37,5 ml
Chlorure de fer III anhydre (0.1%)	FeCl ₃	0,1 g
	H ₂ O	q.s.p 100 ml
Chlorure de fer III anhydre (0.2%)	FeCl ₃	0,02g
	H ₂ O	q.s.p 10 ml
Chlorure de fer III tetrahydraté (0,2 mM)	FeCl ₂ , 4H ₂ O	4 mg
	H ₂ O	100 ml
Tampon phosphate (pH 6.9) (0.2 M)	NaH ₂ PO ₄	51 ml
	Na ₂ HPO ₄	49 ml
Acide hydrochlorique (1M)	HCl	4.17 ml
	H ₂ O	45.83 ml
Iodure de potassium iode (IKI)	KI / H ₂ O / Iodine (5mM)	3 g/100 ml/ 127 mg
Tampon phosphate (pH 8) (100 mM)	NaH ₂ PO ₄	5,3
	Na ₂ HPO ₄	94,5
DTNB	DTNB	16 mg
	Tampon phosphate (pH 7)	4 ml
	NaHCO ₃	7,5 mg
	Tampon phosphate (pH 8)	4 ml
Tampon phosphate (pH 7)	NaH ₂ PO ₄	39 ml
	Na ₂ HPO ₄	61 ml

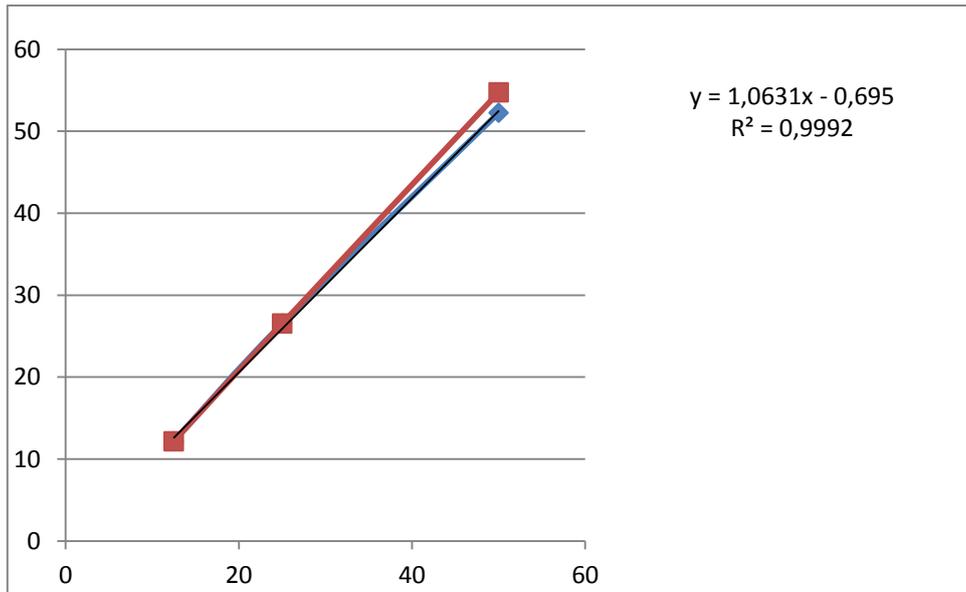
Annexe III : Les courbes détalonnages



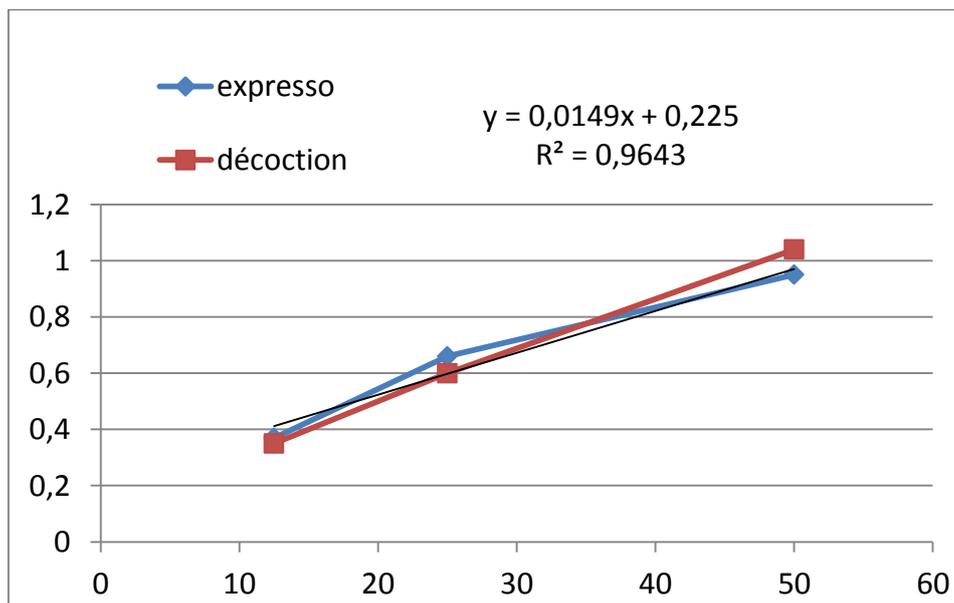
Courbe étalon du dosage des polyphénols



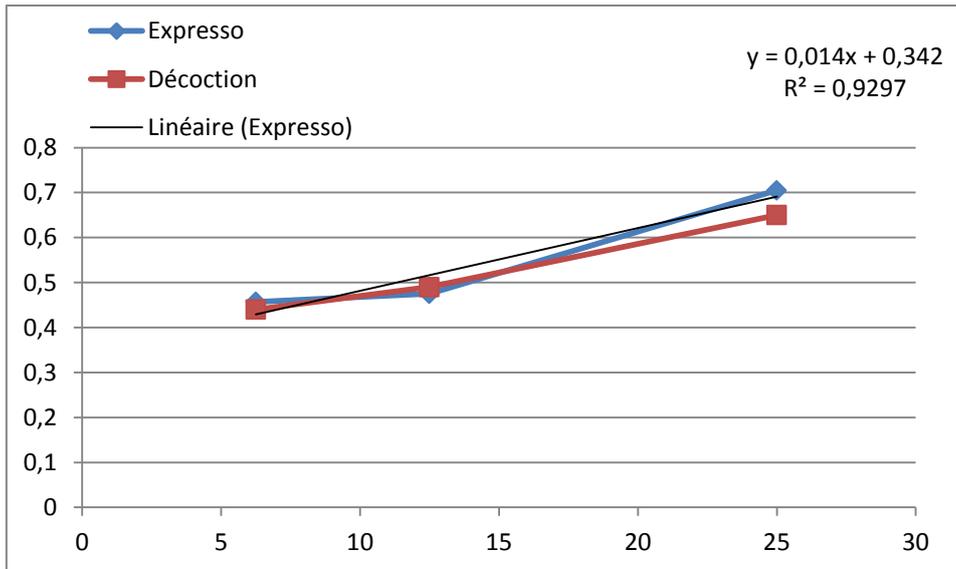
Courbe étalon du dosage des flavonoïdes



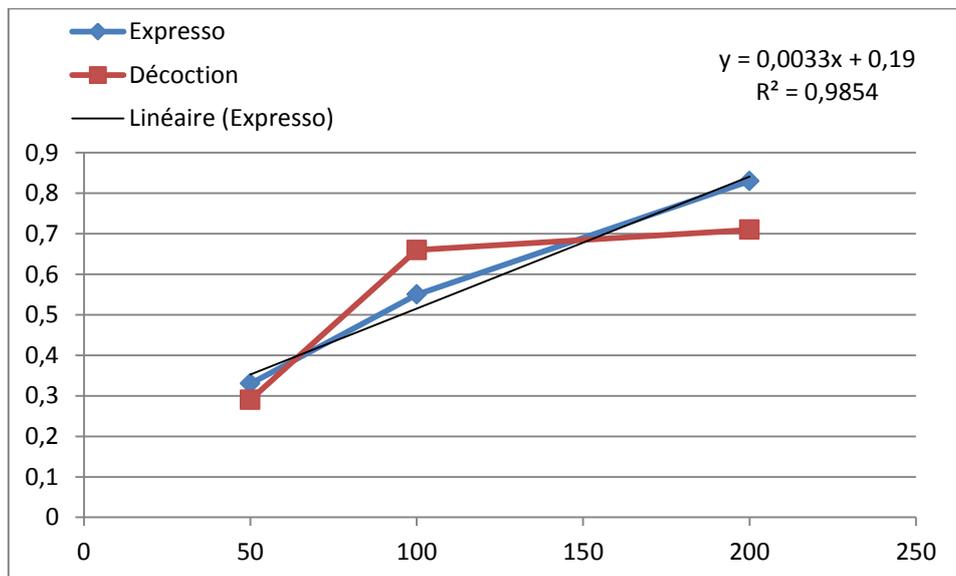
Courbe d'étalonnage de l'activité DPPH



Courbe étalonnage de l'activité CUPRAC



Courbe étalonnage de l'activité phénanthroline



Courbe d'talonnage de l'activité FRAP

RESUMES

Résumé

Deux types du marc de café sont étudiés ; le premier est extrait par pression, cependant, le deuxième est obtenu par décoction. L'objectif de notre travail est de comparer le marc récupéré à partir de ces méthodes à l'échelle chimique et biologique. La première concerne les composés primaires (matière sèche, minéral, grasse) et les composés secondaire (phénols, flavonoïde), cependant, la deuxième repose sur l'évaluation du potentiel antioxydant (DPPH, CUPRAC, FRAP, Phénanthroline) et enzymatiques (anti-Alzheimer et antidiabétique) des deux échantillons. En choisissant le marc le plus actif pour des fins de valorisation, nous mettant au point parallèlement l'effet de la méthode de préparation sur la qualité du marc récupéré. Les résultats montrent une différence entre les deux extraits dans la composition primaire (MS, MM, MG) et une similarité dans la composition secondaire pour le taux des phénols et des flavonoïdes. L'évaluation de l'activité antioxydante montre que les deux extraits présentent un potentiel antioxydant faible et similaire ; alors que les deux extraits n'avait aucune activité vis-à-vis la maladie d'Alzheimer. En contrepartie, les deux substrats détiennent une activité décelable contre l'enzyme thérapeutique responsable de l'apparition du diabète.

De ce qui précède, le marc du café expresso semble être plus riche en source lipidique que le marc décoction. De ce fait, les deux méthodes de préparation de la boisson étudiées herein n'ont pas influencé grandement sur la qualité du marc de café. De plus, vu sa composition phénolique et chimique le marc présente une source importante de composé naturel à intérêt biologique et thérapeutique.

Mots clés : marc du café ; Espresso ; Décoction ; phénol ; Flavonoïdes ; activité antioxydante.

Abstract

Two types of coffee grounds has been studied; the first type was extracted by pressure, while the second was obtained by decoction. The aim of our work is to compare the recovered ground using these two methods on both, chemical and biological scales. The chemical study concerns primary compounds (dry, mineral and fatty matter) and secondary compounds (phenols, flavonoids), the biological study however, is about assessing the antioxidant potential (DPPH, CUPRAC, FRAP, Phenanthroline) aswell as the enzymatic one (anti-Alzheimer's and anti-diabetic) of the two samples. For valuation purposes, and by choosing the most active coffee ground, we simultaneously elaborate the effect of the preparation method on the quality of the recovered coffee ground. The results show a difference between the two extracts in the primary composition (DM, MM, FM) and a similarity in the secondary composition for phenols and flavonoids' levels. The evaluation of the antioxidant activity shows that the two extracts have a low and similar antioxidant potential; and that both had no activity against Alzheimer's disease. In return, the two substrates possess a detectable activity against the therapeutic enzyme responsible for the development of diabetes.

From the above, espresso coffee grounds seem to be richer in fat source than decoction grounds. Therefore, the two beverage preparation methods discussed herein did not greatly influence the quality of the coffee grounds. In addition, given its phenolic and chemical composition, the coffee ground presents an important source of natural compounds of biological and therapeutic interest.

Keywords: spent coffee grounds Pressure; Decoction; phenols; Flavonoids; antioxidant potential.

ملخص

تمت دراسة نوعان من مخلف تحضير شراب القهوة، الأول مستخلص من آلة إسبريسو والثاني من طريقة تحضير القهوة المنزلية التقليدية. يتركز الهدف من هذا العمل على مقارنة مخلف تحضير شراب القهوة (إسبريسو و التقليدي) على المستوى الكيميائي والبيولوجي. المقارنة الأولى تتركز على المستوى المكونات الأولية (رطوبة، معادن و الدهون) والمكونات الثانوية (فينول و فلافونويد). أما الدراسة الثانية هي مقارنة القدرة المضادة للأكسدة من خلال الطرق phénanthroline، FRAP،DPPH CUPRAC وكذلك القدرة الإنزيمية (ضد الزهايمر وضد السكري) لكلا المخلفين لاختيار أيهما أكثر نشاط وأهمية، لمعرفة تأثير طريقة تحضير القهوة على مكونات مخلف تحضير شراب القهوة.

أوضحت النتائج أن هناك فرق في المكونات الأولية، بينما تماثل في المكونات الثانوية للمخلفين. أما دراسة القدرة المضادة للأكسدة أوضحت أن كلتا الركيزتين ليهما قدرة مضادة للأكسدة ضعيفة ومتماثلة، ولم يكن لأي منهما نشاط ضد مرض الزهايمر. كما توضحان نشاط مثبط تماثل ضد الانزيم العلاجي المسؤول عن ظهور مرض السكري.

كنتيجة نهائية مخلف تحضير شراب القهوة إسبريسو يعتبر مصدر غني بالدهون مقارنة بذاك المحضر تقليديا، وأن طريقة تحضير القهوة لم تؤثر على مكونات المخلف بشكل كبير. لكن يبقى مستخلص شراب القهوة مصدر مهم للمركبات الثانوية الممكن استغلالها بيولوجيا وعلاجيا.

كلمات مفتاحية: مخلف تحضير شراب القهوة، إسبريسو، تقليدي، فينول، فلافونويد، القدرة المضادة للأكسدة.

Université El Arbi Ben M'Hidi –Oum El Bouaghi
Faculté des sciences Exactes et sciences de la Nature et de la vie
Département de sciences de la Nature et de la Vie

Nom : Khamoudji, Bourass

Date de soutenance : 25/09/2020

Prénom : Hanane, Férial

Intitulé

Analyse physico-chimique et évaluation des activités biologiques de l'huile grasse du marc de café

Résumé

Une étude comparative entre une huile grasse extraite à partir de l'un des sous-produits de l'industrie cafetière, à savoir le marc de café, et une autre commerciale destinée à l'alimentation des volailles est entreprise. L'objectif principal de notre étude est la valorisation de cette huile chimiquement et biologiquement et savoir la possibilité de l'inclure en tant qu'un complément alimentaire dans l'alimentation animale. En effet, la production des huiles grasses, est une voie de valorisations possibles parmi tant d'autres.

L'analyse chimique du marc de café révèle sa richesse en lipides. L'évaluation de l'activité antioxydante à travers quatre tests différents (DPPH, ABTS, CUPRAC et FRAP) montre que les deux huiles ont une activité tantôt absente tantôt très faible comparativement aux standards. Ces mêmes échantillons ont montré une activité inhibitrice vis-à-vis le cholinestérase et le butyryléstérase, ainsi une activité antidiabétique considérable à l'encontre de l'alpha-amylase. Un potentiel antifongique pratiquement absent est ainsi enregistré pour les deux échantillons.

Les deux huiles semblent avoir un comportement biologique pratiquement similaire, cependant, l'inclusion de telle huile grasse dans l'alimentation animale nécessite d'autres tests *in vitro* et *in vivo*.

Mots clés: valorisation, marc de café, huile grasse, activités biologiques, comparaison

Laboratoires de recherche :

*Laboratoire d'analyse des aliments, CRBt ;

*Laboratoire d'analyse et contrôle qualité, CRBt ;

*Laboratoire de Biochimie, CRBt