

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

Mémoire du Projet de fin d'étude

2^{ème} Année Master



Département : Génie des Procédés

Spécialité : Génie chimique

Présenté par :

**AIDOUD Rahima
BOURENEB Imène**

***Dosage par HPLC-DAD de l'épigallocatechine
gallate dans le thé et évaluation de son activité
antioxydante***

Sous la Direction de :

Dr. BELGUIDOUM Karima

Juillet 2019

REMERCIEMENTS

*Tout d'abord, nous tenons à remercier **ALLAH** le tout puissant pour nous avoir donné la foi et la force, d'avoir éclairé notre route et de nous guider dans le meilleur et le bon chemin.*

Nous remercions infiniment nos parents qui nous ont encouragé et aidé à arriver à ce stade de notre formation.

*Nous tenons à la fin de ce mémoire à remercier du fond du cœur notre encadreur **Dr. Karima BELGUIDOUM** ; pour nous avoir offert les conditions nécessaires et nous avoir guidé dans l'élaboration de ce travail et contribuer largement à sa réalisation avec la patience et le dynamisme qui la caractérise et aussi son soutien tout au long de notre projet.*

*Nos remerciements sont aussi adressés à **Dr. Yamina BOULMOKH** et*

***Dr.Mouna NACEF** ; enseignantes au département de génie des procédés pour l'aide qu'elles nous ont apportée au cours de la réalisation de ce travail.*

Nous exprimons notre gratitude aux membres de jury pour le temps consacré à lire et à juger notre travail.

*Nous tenons à remercier l'ingénieur de laboratoire pédagogique **M^{me} NISSA** et l'ingénieur de laboratoire de Chimie Appliquée **M^{me} BOULTIF Assia** pour toute l'aide qu'elles nous ont apportée à chaque fois que nous en avons besoin.*

Nous tenons également à remercier tous nos professeurs du département de génie des procédés de l'Université 08 Mai 1945– Guelma.

Nos remerciements vont aussi à toutes les personnes qui nous ont apporté de l'aide et que nous aurions malencontreusement oubliées.



Dédicace

Je dédie ce travail qui n'aura jamais pu voir le jour sans les soutiens indéfectibles et sans limite de mes chers parents (Ahmad et Halima) qui ne cessent de me donner avec amour le nécessaire pour que je puisse arriver à ce que je suis aujourd'hui. Que dieux vous protègent et que la réussite soit toujours à ma portée pour que je puisse vous combler de bonheur.

Je dédie aussi ce travail à :

Mon Marie (Alla Eddine)

Mes grands-parents.

Mon frère, mes sœurs et leur famille.

Mes oncles, mes tantes et leur famille.

Tous mes cousins et cousines.

Tous mes amis, mes collègues et tous ceux qui m'estiment. A ma binôme

AADOU Rahima

BORRENE Imene



Dédicace

Je dédie ce travail qui n'aura jamais pu voir le jour sans les soutiens indéfectibles et sans limite de mes chers parents (Farhet et Halima) qui ne cessent de me donner avec amour le nécessaire pour que je puisse arriver à ce que je suis aujourd'hui. Que dieux vous protège et que la réussite soit toujours à ma portée pour que je puisse vous combler de bonheur.

Je dédie aussi ce travail à :

Mes grands-parents.

Mon frère, mes sœurs et leur famille.

Mes oncles, mes tantes et leur famille.

Tous mes cousins et cousines.

Tous mes amis, mes collègues et tous ceux qui m'estiment. A ma binôme

BORRENE Imene

AJOUA Rahima

Résumé

Résumé

Ce travail porte essentiellement sur : une étude cinétique (dosage par HPLC-DAD) de l'EGCg dans l'infusé de thé vert, Oolong et noir à des temps variés), la mesure des pH des infusés des thés étudiés et le calcul des rendements de l'extraction par infusion des thés.

L'étude cinétique a montré que le temps est un facteur important dans la concentration de la catéchine étudiée dans la boisson de thé quel que soit son type et la plus grande concentration est trouvée dans le thé vert avec une valeur de 63,32 mg L⁻¹ pour une infusion dans l'eau à température de 85 °C pendant une durée de 3 min.

Les valeurs des pH des infusés qui étaient entre 4,96 et 5,90 ont indiqué que l'acidité augmente avec le degré de fermentation des thés, ainsi le pH du thé vert > pH du thé Oolong > pH du thé noir. Les valeurs des rendements de l'infusion pour les trois types de thé étaient entre 3,5 et 12,2 %, ce résultat paraît logique parce que la solubilité des constituants de thé et parmi lesquels; les polyphénols et les méthylxantines n'est que partielle.

En parallèle, l'activité antioxydante de l'épigallocatechine gallate a été évaluée par deux méthodes différentes : La méthode de réduction du fer «FRAP» et la méthode de piégeage du radical libre DPPH'. Les résultats obtenus montrent que ce composé possède un pouvoir très intéressant de réduire l'ion Fe⁺³ surtout à des concentrations très faibles. D'autre part, et d'après le test DPPH' ; l'EGCg a montré une bonne efficacité antioxydante (IC50 = 0,047 mg/ml) supérieure à celle de l'épicatéchine (IC50 = 0,047 mg/ml) ainsi qu'à celle du resvératrol (IC50 = 0,939 mg/ml) mais inférieur un peu à celle de l'acide ascorbique (IC50 = 0,026.mg/ml). L'étude de l'activité anti radicalaire du thé montre qu'elle dépend du type de thé ; le thé non fermenté présente une activité anti radicalaire supérieure à celles des thés semi fermenté (Oolong) et fermenté (noir).

Mots clés : Thé vert, thé Oolong, thé noir, dosage, EGCg, pH, infusion, HPLC, activité antioxydante, DPPH, FRAP, épicatechine, acide ascorbique et resvératrol.

Table des matières

TABLE DES MATIERES	
Titre	page
LISTE DES FIGURES	I
LISTE DES TABLEAUX	III
LISTE DES ABREVIATIONS	IV
INTRODUCTION GENERALE	1
Chapitre I : Généralités sur le thé	
I-1-Introduction	5
I-2-Botanique	5
I-3-Pays producteurs du thé	6
I-4-De l'Asie au reste du monde	6
I-5-Histoire et origine du thé	6
I-5-1-Thés de chine	6
I-5-2-Thés du Japon	7
I-5-3- Thés du d'Inde	7
I-5-4- Thés du Sri Lanka	7
I-5-5- Thés de Taiwan	7
I-5-6- Thés du Népal	8
I-5-7- Thés d'Afrique	8
I-5-8- Thés d'Asie du Sud-Est	8
I-5-9- Thés du Caucase	9
I-5-10- Thés d'Amérique du sud	9
I-6- Plantation du thé	9
I-7- Les types de thé	9
I-7-1- Le thé blanc	10
I-7-2-Le thé vert	11
I-7-3-Le thé Oolong	11
I-7-4-Le thé noir	12
I-8-Les procédés de fabrication des thés vert, Oolong et noir	12
I-8-1-La fabrication du thé vert	12
I-8-1-1-Le Flétrissage	12
I-8-1-2-Le Roulage	13
I-8-1-3-La Dessiccation	13
I-8-1-4-Criblage	14
I-8-2-La Fabrication du thé Oolong	14
I-8-3-La Fabrication du thé noir	14
I-8-3-1-Procédé Orthodoxe	14
I-8-3-1-1-Le flétrissage	15
I-8-3-1-2-Le roulage	15
I-8-3-1-3-La fermentation	16
I-8-3-1-4-La dessiccation	17
I-8-3-1-5-Le tamisage et l'emballage	17
I-8-3-2-Le procédé CTC ou «crushing-tearing-curling»	18
I-9-Composition chimique des feuilles de thé	19
I-9-1-Les polyphénols	20
I-9-2-Les glucides	20
I-9-3-Les acides aminés	20

I-9-4-Les enzymes	21
I-9-5-Les alcaloïdes	21
I-9-6-Les minéraux	21
I-9-7-Les pigments	21
I-10-Les effets thérapeutiques du thé	22
I-10-1-Le thé vert	22
I-10-2-Le thé noir	22
I-11-Les effets indésirables du thé	23
I-12-Les catéchines	23
I-12-1-Définition de la catéchine	23
I-12-2-Principales catéchines dans le thé	24
Chapitre II : Activité antioxydante	
I-1- Définitions	27
I-2- Le stress oxydatif	27
I-3- L'activité antioxydante	28
I-3-1- Définition	28
I-3-2- Pouvoir réducteur	28
I-3-3- Pouvoir anti radicalaire	28
I-4- Types des antioxydants	29
I-4-1- Classification des antioxydants par rapport à leur mécanisme d'action	29
I-4-1-1- Groupe I (les antioxydants primaires)	29
I-4-1-2- Groupe II (les antioxydants secondaires)	29
I-4-2- Classification des antioxydants suivant la nature chimique	29
I-4-2-1- Les antioxydants enzymatiques	29
I-4-2-2- Les antioxydants non enzymatiques	30
I-4-2-3- Les antioxydants synthétiques	33
I-4-2-4- Antioxydants synergiques	33
I-5- Méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante	33
Chapitre III: Matériels et méthodes	
III-1- Introduction	35
III-2- Matériels	35
III-2-1- Chromatographie liquide à haute performance couplée à un détecteur à barrette de diodes « HPLC-UV-DAD »	35
III-2-2- Spectrophotomètre UV. Visible	36
III-2-3- Solvants et réactifs	36
III-3- Méthodes	36
III-3-1- Analyse quantitative par HPLC de (EGCg) dans le thé	36
III-3-1-1- Echantillons de thé	37
III-3-1-1-1 Méthode de préparation et injection du standard	38
III-3-1-1-2- Méthode de préparation et injection des échantillons de thé	38
III-3-1-1-3- Méthode de préparation des échantillons	39
III-3-1-1-4- Mesure du pH des solutions de thé	39
III-3-1-1-5- Calcul des rendements	39
III-3-1-2- Dosage par HPLC-UV-DAD de l'EGCg dans les échantillons	40

III.3.1.2.1. Conditions de l'analyse	40
III-3-1-2-2- Phase mobile	40
III-3-1-2-3- Phase stationnaire	40
III-3-1-2-4- Gradient	40
III-3-2- Validation de la méthode analytique	40
III-3-2-1- Courbe d'étalonnage	40
III-3-2-2- Détermination des limites de détection et de quantification de l'EGCg	40
III-3-3- Détermination des taux de récupération	42
III-3-4- Injection	42
III-3-5- Intégration	42
III-4- Evaluation de l'activité anti oxydante de L'EGCg	43
III-4-1- Test de piégeage du radical libre DPPH[·]	43
III-4-1-1- Principe	43
III-4-1-2- Mode opératoire	44
III-4-2- Test de la réduction du fer FRAP	45
III-4-2-1- Principe	45
III-4-2-2- Mode opératoire	45
III-5- Conclusion	46
Chapitre IV: Résultats et discussions	
IV-1- Introduction	48
IV-2- Résultats	48
IV-2-1- Données chromatographiques de l'EGCg	48
IV-2-2- Validation de la méthode d'analyse	49
IV-2-2-1- Linéarité de la courbe d'étalonnage	49
IV-2-2-2- Limites de détection (LD) et de quantification (LQ) de l'EGCg	49
IV-2-2-3- Taux de récupération	50
IV-2-3- Présentation des chromatogrammes des échantillons de thé	51
IV-2-4- Concentrations de l'EGCg dans les différents échantillons	55
IV-2-5- pH des échantillons des thés	56
IV-2-6- Rendements de l'extraction	56
IV-3- Discussion	56
IV-3-1- Teneurs en EGCg dans les échantillons de thé	56
IV-3-1-Variation du pH	57
IV-3-3- Les rendements	58
IV-4- Evaluation de l'activité antioxydante de l'EGCg	58
IV-4-1- La réduction du fer (FRAP)	58
IV-4-2- Piégeage du radical DPPH[·]	61
IV-4-2-1- Détermination d'IC50	64
IV-5- Mise en évidence de l'activité anti radicalaire du thé vert, Oolong et noir (infusion de 3min) par le test DPPH[·].	66
IV-6- Conclusion	67
CONCLUSION GENERALE	V
REFERENCES	VII
ANNEXE	X

Liste des figures

Liste des figures

Numéro de figure	Titre de figure	Page
Chapitre I		
<i>Figure I-1</i>	<i>Fleur du théier (Inde).</i>	5
<i>Figure I-2</i>	<i>Thé séché au soleil.</i>	10
<i>Figure I-3</i>	<i>Le thé blanc.</i>	10
<i>Figure I-4</i>	<i>Le thé vert.</i>	11
<i>Figure I-5</i>	<i>Le thé Oolong.</i>	11
<i>Figure I-6</i>	<i>Le flétrissage du thé vert.</i>	13
<i>Figure I-7</i>	<i>Le roulage de thé vert.</i>	13
<i>Figure I-8</i>	<i>Criblage/tri du thé vert.</i>	14
<i>Figure I-9</i>	<i>Le flétrissoir.</i>	15
<i>Figure I-10</i>	<i>Le roulage.</i>	16
<i>Figure I-11</i>	<i>La dessiccation.</i>	17
<i>Figure I-12</i>	<i>Différents tamiseurs.</i>	18
<i>Figure I-13</i>	<i>La fabrication du thé selon le procédé CTC.</i>	18
<i>Figure I-14</i>	<i>Procédés de fabrication des thés vert, rouge et noir.</i>	19
<i>Figure I-15</i>	<i>Structure de base des catéchines.</i>	25
<i>Figure I-16</i>	<i>Structures des principaux catéchines de thé: (A) EC, (B) ECg, (C)EGC, (D) EGCg.</i>	25
Chapitre III		
<i>Figure III-1</i>	<i>Figure III-1 : Schéma descriptif de fonctionnement d'un spectrophotomètre UV. Visible.</i>	32
<i>Figure III-2</i>	<i>Structure de l'EGCg.</i>	33
<i>Figure III-3</i>	<i>Echantillons des thés étudiés.</i>	33
<i>Figure III-4</i>	<i>Protocole de préparation des échantillons.</i>	35
<i>Figure III-5</i>	<i>Gradient HPLC utilisé.</i>	37
<i>Figure III-6</i>	<i>Réaction de test DPPH· (2,2 Diphényl-1-picryl hydrazyl)</i>	39
<i>Figure III-7</i>	<i>Protocole du test « DPPH ».</i>	40
<i>Figure III-8</i>	<i>Mécanisme réactionnel intervenant lors du test FRAP entre le complexe ferricyanure ferrique Fe (III) et un antioxydant.</i>	41
<i>Figure III-9</i>	<i>Protocole du test « FRAP ».</i>	41
Chapitre IV		
<i>Figure IV-1</i>	<i>Chromatogrammes en 2D et 3D de l'EGCg ; $T_R=0.257\text{min}$, $\lambda_{\text{max}}=280\text{ nm}$.</i>	48
<i>Figure IV-2</i>	<i>Courbe d'étalonnage de l'EGCg.</i>	49

Liste des figures

<i>Figure IV-3</i>	<i>Taux de récupération du standard, obtenu à partir d'un extrait (infusion pendant 5 minutes) du thé vert dopé.</i>	50
<i>Figure IV-4</i>	<i>Chromatogramme HPLC du thé vert (Infusion pendant 3 minutes)</i>	51
<i>Figure IV-5</i>	<i>Chromatogramme HPLC du thé vert (Infusion pendant 5 minutes)</i>	51
<i>Figure IV-6</i>	<i>Chromatogrammes HPLC Thé vert (Infusion pendant 7 minutes)</i>	52
<i>Figure IV-7</i>	<i>Chromatogramme HPLC du Thé Oolong (Infusion pendant 3 minutes)</i>	52
<i>Figure IV-8</i>	<i>Chromatogramme HPLC du Thé Oolong (Infusion pendant 5 minutes)</i>	53
<i>Figure IV-9</i>	<i>Chromatogramme HPLC du Thé Oolong (Infusion pendant 7 minutes)</i>	53
<i>Figure IV-10</i>	<i>Chromatogramme HPLC du Thé noir (Infusion pendant 3 minutes)</i>	54
<i>Figure IV-11</i>	<i>Chromatogramme HPLC du Thé noir (Infusion pendant 5 minutes)</i>	54
<i>Figure IV-12</i>	<i>Chromatogramme HPLC du Thé noir (Infusion pendant 7 minutes)</i>	55
<i>Figure IV-13</i>	<i>Concentrations de l'EGCg dans les échantillons de thé vert, Oolong et noir.</i>	57
<i>Figure IV-14</i>	<i>Variation des pH des trois types de thé en fonction du temps d'infusion</i>	58
<i>Figure IV-15</i>	<i>Résultat du test FRAP de l'EGCg à différentes concentrations</i>	59
<i>Figure IV-16</i>	<i>Pouvoir réducteur de l'EGCg, l'épicatéchine, l'acide ascorbique et resvératrol.</i>	60
<i>Figure IV-17</i>	<i>Histogramme du pouvoir réducteur de l'EGCg, l'épicatéchine, l'acide ascorbique et le resvératrol</i>	60
<i>Figure IV-18</i>	<i>Résultats du test du DPPH à différentes concentrations.</i>	62
<i>Figure IV-19</i>	<i>Pourcentage d'inhibition du DPPH en fonction des différentes concentrations de l'EGCg, de l'acide ascorbique et de resvératrol.</i>	63
<i>Figure IV-20</i>	<i>Histogramme du pourcentage d'inhibition du DPPH en fonction des différentes concentrations de l'acide ascorbique, de l'EGCg et de resvératrol.</i>	63
<i>Figure IV-21</i>	<i>Histogramme de la concentration inhibitrice IC50 des composés testés</i>	65
<i>Figure IV-22</i>	<i>Pourcentage d'inhibition du DPPH en fonction des différentes concentrations de thé vert, rouge, Oolong et de l'acide ascorbique.</i>	66

Liste des tableaux

Liste des tableaux

Numéro de tableau	Titre de tableau	Page
Chapitre I		
Tableau I-1	Principales catéchines du thé et leurs substitutions relatives.	25
Chapitre II		
Tableau II-1	Principaux nutriments antioxydants et leur sources alimentaires.	32
Chapitre III		
Tableau III-1	Quelques caractéristiques de L'EGCg.	37
Tableau III-2	Caractéristiques organoleptiques des échantillons de thé.	38
Tableau III -3	Gradient HPLC pour l'analyse d'EGCg	40
Chapitre IV		
Tableau IV-1	Données HPLC de l'EGCg.	49
Tableau IV-2	Taux de récupération de la méthode analytique à trois niveaux d'enrichissement de composé standard. Les valeurs sont présentées sous forme de moyenne \pm SD.	50
Tableau IV-3	Concentrations de l'EGCg en mg L⁻¹ dans les échantillons de thé : vert, rouge et noir préparés par infusion pendant 85°C.	55
Tableau IV-4	pH des solutions des thés : vert, rouge et noir.	56
Tableau IV-5	Les rendements de l'infusion des différents échantillons de thé.	56
Tableau IV-6	Valeurs des IC50 de l'EGCg, l'acide ascorbique et le resvératrol.	64

Liste des abréviations

Liste des abréviations

LISTE DES ABREVIATIONS

AOX	Antioxydant
ABTS	(2,2-azinobis 3- rthyl-benzothiazoline 6-sulphonate)
Acide trichloracétique	C₂HCl₃O₂
BHA	Butylhydroxyanisole
BHT	Butylhydroxytoluène
CTC	Crushing-tearing-curling
°C	Degré Celsius
CAT	Catalase
Chlorure de fer	FeCl₃
DAD	Détecteur à barrette de diodes
SD	Déviatoin standard
DO	Densité Optique
DPPH	2,2-diphényl-picrylhydrazyle(C₁₈H₁₂N₅O₆)
EGCg	Epigallocatechine gallate
ECg	Epicatechine gallate
EGC	Epigallo catéchine
EC	Epicatechine
ERO	Espèces réactives de l'oxygène
Ferricynure de potassium	K₃Fe(CN)₆
FRAP	Pouvoir Antioxydant de réduction du fer
H₂O₂	Peroxyde d'hydrogène
HO[•]	Radicaux hydroxyles
HPLC	Chromatographique liquide à haute pression
IC50	Concentration Inhibitrice à 50 %
GPx	Glutathion peroxydase
GSHPX	Glutathions peroxydases et réductases
GSH	Glutathion
GSSG	Glutathion-disulfure
GSHPX	Glutathion peroxydase et réductase
LD	Limite de détection
LQ	Limite de quantification
λ	Longueur d'onde
M	Masse molaire
min	Minute
ml	Millilitre
nm	Nanomètre
ORAC	Oxygen radical absorbance capacity
pH	pouvoir d'hydrogène
T_R	Temps de rétention

Introduction générale

Introduction générale

Les infusions de thé qui sont préparées à partir des feuilles du théier ou *Camelia Sinensis*, sont la seconde boisson la plus consommée au monde après l'eau plate.

Après leur récolte, les feuilles du théier, appelées par abus de langage 'feuilles de thé', sont commercialisées en trois grandes familles : les thés verts, les thés Oolongs et les thés noirs.

C'est l'oxydation et la fermentation du thé qui déterminent sa couleur et son goût plus ou moins puissant. Actuellement, le thé vert est le plus réputé, notamment pour ses bénéfices sur la santé. En effet, il conserve toutes ses vertus car il subit moins de transformation que les autres sortes de thé.

Les feuilles de thé vert sont simplement roulées et séchées après la cueillette, le thé noir est obtenu après une phase d'oxydation totale des polyphénols présents dans les feuilles par les enzymes polyphénoloxydases [1]. Pour le thé Oolong, troisième type de thé, la phase d'oxydation n'est que partielle.

Les feuilles de thé contiennent majoritairement des polyphénols de la classe des flavonoïdes, des alcaloïdes et des éléments minéraux.

La catéchine est une molécule de la famille des flavonoïdes. Les catéchines sont présentes en quantité importante dans le thé vert. La fermentation des feuilles étant stoppée peu après leur récolte, elles ne sont quasiment pas oxydées. C'est pourquoi le thé vert retient la majorité des catéchines d'origine qui lui confèrent ce goût légèrement amer et astringent. Le thé vert contient des flavonoïdes dont 70 % sont des catéchines [2].

Cinq molécules de catéchines sont répertoriées : les catéchines, l'épicatéchine, l'épigallocatechine, l'épicatéchine gallate et l'épigallocatechine gallate. Cette dernière est la plus abondante dans le thé et la plus active de toutes les catéchines.

D'après de nombreuses études, les catéchines auraient, en plus de leurs propriétés antioxydantes, un rôle protecteur dans la prévention de certaines pathologies chroniques telles que le diabète et l'ostéoporose [3].

L'épigallocatechine gallate, comme tous les polyphénols, possède des groupes hydroxyles phénoliques, pouvant fournir des hydrogènes aux radicaux libres et par là, les neutraliser.

Comme il n'existe pas de mesure absolue d'évaluation du potentiel antioxydant d'un composé, il faut recourir à des évaluations comparatives avec d'autres composés. De plus ces comparaisons vont dépendre de la méthode d'évaluation et en particulier du radical libre utilisé.

Un thème s'articulant autour d'une boisson de cette grande importance et une molécule ayant des effets bénéfiques sur la santé humaine s'impose comme un sujet de projet de fin d'études.

Le présent travail est alors focalisé sur les trois types de thé : vert, Oolong et noir et aussi sur l'une de leurs principes actifs : L'épigallocatechine gallate (EGCg).

Les objectifs de cette étude se résument dans les points suivants :

- Mesure des pH des boissons des thés préparées par infusion.
- Analyse par HPLC des boissons de thé en EGCg.
- Etude cinétique ayant comme but de comparer les concentrations de la molécule étudiée dans les boissons de thé vert, Oolong et noir à différents temps de l'infusion.
- Calcul des rendements de l'infusion du thé dans l'eau.
- Evaluation de l'activité anti-oxydante in vitro de l'épigallocatechine gallate (EGCg) par deux méthodes différentes à savoir la technique de réduction du fer « FRAP » (ferric reducing antioxydant power) et le test de DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl).
- La mise en évidence de l'activité anti radicalaire du thé vert, Oolong et noir (infusion de 3min) par le test DPPH.

Le travail expérimental qui a été réalisé à l'université de Guelma au laboratoire de méthodes physiques d'analyse de génie des procédés et au laboratoire de chimie appliquée (LCA) a été précédé par une recherche bibliographique et l'ensemble a produit un mémoire structuré comme suit :

- Une introduction générale où ont été élucidés principalement les objectifs de cette étude.
- Le premier chapitre consistera à présenter des généralités sur le thé.
- Le deuxième chapitre s'intéressera d'assez près à l'activité antioxydante.

Introduction générale

- Dans le troisième chapitre, sera présentée la partie expérimentale qui comprend essentiellement : le matériel, les réactifs, les modes opératoires, et les méthodes analytiques mises en œuvre.
- L'interprétation des résultats obtenus sera détaillée dans le quatrième chapitre.
- Enfin, une conclusion générale achèvera ce travail.

Chapitre I :
Généralités sur le thé

I-1- Introduction

Le thé est une boisson aromatique préparée en infusant des feuilles séchées de théier, un arbuste à feuilles persistantes originaire d'Asie. Le thé est d'origine chinoise, où il est connu depuis l'antiquité .

Le thé est aujourd'hui la boisson la plus bue au monde après l'eau et avant le café. La boisson elle-même peut prendre des formes très diverses : additionnée de lait et de sucre au Royaume-Uni, longuement bouillie avec des épices en Mongolie, bouillie avec des épices et du lait comme en Inde, préparée dans de minuscules théières dans une technique chinoise, battue comme au Japon et préparée par décoction et mettant un long temps jusqu'à l'obtention d'une boisson mousseuse au sud algérien [1].

I-2- Botanique

Beaucoup de gens pensent que le théier est un buisson, à cause de sa coupe rase du sol pour faciliter la cueillette dans les plantations. Mais le théier est un arbre à part entière, pouvant atteindre, selon l'espèce, 5 à 15 mètres. (Certains théiers sauvages du Yunnan ; province en Chine, ont près de 2000 ans et dépassent les 25m). Le théier, de son vrai nom « *Camellia Sinensis* » est donc littéralement un « camélia chinois ». Cet arbre à feuilles persistantes, pousse à l'état sauvage dans les régions d'Asie au niveau du tropique nord, sous un climat de mousson. On situe son berceau 60 millions d'années avant notre ère aux sources du fleuve Irrawaddy au pied de l'Himalaya, entre la Chine et l'Inde [4].



Figure I-1: Fleur du théier (Inde) [1].

Les trois principales espèces de théiers :

- **Le *Camellia Sinensis* var. *Sinensis***

Le plus petit, même à l'état sauvage sa taille ne dépasse pas les 5 mètres, avec des feuilles de 3 à 10 centimètres. Ce théier « type chinois » supporte des conditions plus rigoureuses et a été exporté au Japon, en Russie, Iran, Turquie, etc .

- **Le *Camellia Sinensis* var. *Assamica***

Le plus grand, originaire de la région d'Assam en Inde, pouvant atteindre plus de 15 mètres à l'état sauvage et ses feuilles 20 cm. L'Assamica et ses hybrides sont plus adaptés aux plaines et aux régions de mousson .

- **Le *Camellia Sinensis* var. *Cambodiensis***

De taille intermédiaire entre le *Sinensis* et l'*Assamica* il sert surtout à l'hybridation [4].

I-3- Pays producteurs du thé

Le thé est principalement cultivé en Asie, en Afrique, en Amérique Latine, autour des mers Noire et Caspienne. Les quatre plus grands pays producteurs de thé aujourd'hui sont la Chine, l'Inde, le Kenya et le Sri Lanka. Ensemble, ils représentent 75% de la production mondiale [5].

I-4- De l'Asie au reste du monde

Jusqu'à la fin du XIX^{ème} siècle, la production était concentrée en Asie. La fièvre du thé a maintenant gagné des régions diverses telles que l'Amérique et l'Afrique. Le thé reste en effet la deuxième boisson la plus bue au monde après l'eau.

Le thé est aujourd'hui produit dans une quarantaine de pays. Ces pays sont aussi et de manière logique les exportateurs les plus importants de thé. Cependant il existe des exceptions telles que le Japon qui, bien qu'étant un producteur de thé de taille important, affiche un niveau très faible d'exportation. En effet, la forte consommation de thé dans ce pays absorbe la majeure partie de la production locale. A l'inverse, le Sri Lanka exporte une plus grande part de thé que le Japon [5].

I-5- Histoire et origine du thé

I-5-1- Thés de chine

Berceau du thé et premier producteur mondial jusqu'au XIX^{ème} siècle, la Chine occupe à nouveau aujourd'hui la première position devant l'Inde. Ce sont essentiellement dans les provinces du sud et du centre que se trouvent les plantations.

Les standards de qualité sont surtout valables pour les thés noirs, réservés essentiellement à l'exportation et dont la production se fait à très grande échelle, ce qui permet d'autant plus facilement d'atteindre une qualité homogène, en mélangeant de nombreux lots. Concernant les thés verts, et surtout les plus prestigieux d'entre eux, ils sont souvent produits en beaucoup plus petite quantité, ce qui en fait des thés rares dont il est parfois difficile d'obtenir la même qualité d'une année sur l'autre. Pour en apprécier toute la fraîcheur et la finesse, ces thés verts doivent être bus primeurs, c'est-à-dire dans les 8 à 10 mois qui suivent la cueillette. Les principales provinces de plantation des thés en chine : Anhui, Fujian, Zhejiang, Yunnan, Jiangu et Sichuan [6].

I-5-2- Thés du Japon

Le thé apparaît au Japon sous l'influence de la dynastie chinoise des Tang, au cours du VII^{ème} siècle, mais sa diffusion dans la société japonaise est très lente. Réservé aux moines bouddhistes zen, le thé reste longtemps le privilège des prêtres. Il faut attendre le IX^{ème} siècle pour que les premiers théiers soient cultivés, et 1202 pour qu'ils soient plantés dans la province d'Uji, actuellement réputée pour produire les meilleurs thés verts du Japon [6].

I-5-3- Thés d'Inde

L'Inde est le second plus gros producteur de thé, et représente à elle seule un cinquième de la production mondiale. Les thés d'Inde sont très différents les uns des autres. D'une part, parce que d'une région à l'autre, les conditions climatiques et le relief sont très variables : régions de montagnes, de plateaux ou de plaines; d'autre part, parce que les plantations ne sont pas toutes constituées des mêmes types de théiers: *Camellia Assamica* en Assam, *Camellia Sinensis* dans le sud de l'Inde, présence des deux variétés dans les jardins de Darjeeling, etc [6].

I-5-4- Thés du Sri Lanka

En 1972, l'île de Ceylan prend le nom de Sri Lanka, mais cette appellation, datant de l'Empire britannique, est restée en usage dans l'univers du thé et il est fréquent de parler d'une Ceylan pour désigner un thé de ce pays. C'est le quatrième producteur mondial et est le surnommé l'île du thé [6].

I-5-5- Thés de Taiwan

L'île de Taïwan porte encore son ancien nom de Formose lorsqu'il s'agit du thé. Annexée par les chinois à la fin du XVII^{ème} siècle, Formose a commencé par produire du thé en très petites quantités, à partir de plants de théiers transplantés du Fujian. Ce n'est qu'avec la prise du pouvoir en Chine continentale par les communistes en 1949 que la production a été considérablement diversifiée et augmentée. L'île, extrêmement fertile, présente des conditions de culture idéales : plantations d'altitude où la température est toujours comprise entre 12°C et 20°C et bonne humidité [6].

I-5-6- Thés du Népal

Les thés du Népal sont parmi les meilleurs thés au monde. Principalement cultivés dans la plaine du Terai proche de l'Himalaya, ils sont d'une délicatesse et d'une richesse aromatique hors du commun [6].

I-5-7- Thés d'Afrique

L'introduction du thé en Afrique remonte à la fin du XIX^{ème} siècle. Elle débuta d'abord en Afrique du Sud, où les anglais en développèrent la culture pour s'assurer de nouvelles sources d'approvisionnement. A leur suite, des colons allemands expérimentèrent la culture du thé sur les pentes du Mont Cameroun ainsi qu'en Tanzanie [6].

- **Le Kenya** : est aujourd'hui le troisième producteur mondial, avec environ 8% de la production.
- **Ile de Maurice** : produit différents thés dont le plus célèbre est apprécié pour son goût vanillé.
- **Rwanda** : La production du Rwanda est tout à fait mineure, rapportée à l'échelle mondiale, mais la qualité des thés produits est très intéressante.

I-5-8- Thés d'Asie du Sud-Est [6]

- **Indonésie** : Depuis le début du XIX^{ème} siècle, Sumatra et Java produisent du thé à partir de plants d'Assam. Huitième producteur mondial, l'Indonésie donne des thés plutôt corsés et ronds s'accommodant assez bien du lait, surtout pour les feuilles brisées .
- **Vietnam** : Gros producteur avant la guerre, le Vietnam a repris ces dernières années la culture du thé, essentiellement sur les hauts plateaux. Ce pays est aujourd'hui le sixième producteur mondial .
- **Malaisie** : Petit producteur, la Malaisie donne des thés noirs peu corsés .
- **Sikkim** : Ce petit état himalayen produit un thé fin et aromatique, très voisin des meilleurs Darjeeling, dont il est géographiquement proche .
- **Bangladesh** : Proche de l'Assam, le thé du Bangladesh coloré et aromatique, pousse au nord du pays, à la frontière indienne .

I-5-9- Thé du Caucase

C'est surtout grâce aux Mongols et aux marchands de la route de la soie que le thé parvint chez les Russes, les Turcs, les Perses, mais aussi chez les Kirghiz, les Turkmènes et les Ouzbeks. Vers la fin du XIX^{ème} siècle et au début du XX^{ème}, on réussit, après de nombreuses tentatives, à pratiquer la culture du thé dans les massifs montagneux situés entre la Mer Noire et la Mer Caspienne [6].

I-5-10- Thé d'Amérique du Sud

L'Amérique du Sud produit des thés, noirs pour l'essentiel, et presque exclusivement à feuilles brisées. Ils sont surtout recherchés pour les blends (mélanges). Citons l'Argentine, le Brésil, l'Equateur et le Pérou [6].

I-6- Plantations du thé

Les jeunes plants sont élevés en pépinière, d'abord ombragée 2 à 3 mois, soit en plantant une graine, soit le plus souvent par bouturage (tige de 3 à 4 cm prélevée sur l'arbre-mère, qui comporte au moins un œil et une feuille). Après une première taille en pépinière l'arbuste passera par des tailles de « formation » et (ou) par des arcures, afin de modeler sa forme en « table de cueillette » (environ 1m de haut). Il commencera à être exploité vers l'âge de 5 ans, bien que les meilleurs thés proviennent d'arbres plus âgés [7].

I-7- Les types de thé

Le thé dans sa forme la plus simple est la feuille du théier que l'on cueille fraîche sur l'arbre pour l'infuser. Mais tout le monde n'a pas un théier dans son jardin et malheureusement la feuille de thé se décompose rapidement. Un simple séchage au soleil sur des nattes, durant 1 à 2 jours, brassé et retourné régulièrement pour assurer un séchage uniforme, suivi d'un bref chauffage au feu. C'est un façonnage qui est à l'avantage d'être simple à réaliser, mais qui demande des conditions climatiques idéales [8].



Figure I-2 : Thé séché au soleil [8].

Bien que tous les thés proviennent à l'origine du même type de plante (le *Camellia Sinensis*) ; et que techniquement on puisse faire du thé vert, Oolong ou noir avec n'importe quelle récolte, le choix de cultivar, le terroir, le climat et la date et le type de cueillette vont déjà lui donner une grande partie de son caractère. Aussi, bien qu'il y ait autant de procédés de fabrication, on peut regrouper les thés en 5 familles principales :

I-7-1- Le thé blanc

D'origine chinoise, les thés blancs sont des thés très délicats qui ne subissent aucune fermentation. Le thé blanc est issu des 3 premières feuilles et du bourgeon de l'arbuste, toujours entières [9].



Figure I-3 : Le thé blanc [9].

Après la cueillette, les feuilles sont souvent flétries puis chauffées très rapidement à haute température afin de détruire les enzymes et ainsi bloquer la fermentation. Elles sont ensuite roulées et séchées plusieurs fois [9].

I-7-2- Le thé vert

Le thé vert (en botanique : *Camellia Sinensis* variété *Sinensis*) est utilisé et connu comme une des plus puissantes plantes médicinales au monde depuis près de 5000 ans. De nombreuses sources rapportent que le thé vert est bu depuis des siècles en Chine et au Japon, et ce presque exclusivement pour ses propriétés médicinales [11].



Figure I-4 : Le thé vert [10].

I-7-3- Le thé Oolong

C'est un thé semi-fermenté, entre le thé vert et le thé noir. Une fois récolté, le thé est flétri, puis les feuilles sont brassées et fermentées en même temps, à haute température. Selon le résultat souhaité, le temps de fermentation sera plus ou moins long [11].



Figure I-5 : Le thé Oolong [9].

Dans certaines régions, les feuilles sont ensuite légèrement torréfiées, ce qui leur donne ce petit goût de châtaigne grillée. C'est un thé très cultivé et apprécié en Inde et en Chine [11].

I-7-4- Le thé noir

Un thé noir est un thé qui a subi une oxydation complète. La plupart des thés consommés en Occident sont des thés noirs.

Alors qu'un thé vert perdra sa fraîcheur après 12 à 18 mois, un thé noir peut se conserver plusieurs années sans perdre sa saveur. Il est donc plus facilement transportable et commercialisable. Ces raisons ont fait longtemps préférer ce thé en Occident [12].

I-8- Les procédés de fabrication des thés vert, Oolong et noir

I-8-1- La Fabrication du thé vert

Les feuilles de thé vert sont préalablement pesées, puis transportées vers la fabrique de thé. Les quantités livrées sont une nouvelle fois pesées et enregistrées avant que la production de thé proprement dite, répartie sur cinq processus individuels, puisse commencer [8].

I-8-1-1- Le Flétrissage [8]

A ce niveau, environ 30 % de son humidité sont enlevés à la feuille épaisse et rigide. Il existe deux méthodes :

a) Le flétrissage naturel en répandant les feuilles sur des claies en toile de jute, treillis métallique ou de nylon. Selon les intempéries et le degré d'humidité de la feuille, le flétrissage dure environ 14-18 heures.

b) Le flétrissage moderne dans de grosses cuves de 25 à 30 m de longueur, tendues dans de treillis métalliques et ventilées par des soufflantes géantes. Celles-ci permettent également de réchauffer le cas échéant les feuilles, ce qui réduit la durée du flétrissage à environ 8-12 heures.



Figure I-6 : Le flétrissage du thé vert [13].

I-8-1-2- Le roulage

a) Méthode orthodoxe

Avec des vis de pressage ou des rouleaux, les cellules des feuilles encore vertes sont brisées et le jus qui s'en écoule est lié avec l'oxygène de l'air. Cette opération dure 30 minutes et est répétée jusqu'à 3 fois. Les feuilles humides et grumeleuses sont triées par le biais d'un agitateur ou d'un crible [8].



Figure I-7 : Le roulage de thé vert [14].

b) Méthode CTC (Crushing – Tearing – Curling)

Roulées une fois pendant 30 minutes, toutes les feuilles sont ensuite cassées dans des rouleaux à mandrin spéciaux. La tige et les nervures des feuilles sont pour la majeure partie éliminées et seule la chair broyée des feuilles arrive à l'étape de traitement suivante. Ce traitement simple est d'un rapport nettement meilleur que celui obtenu avec la méthode de traitement traditionnelle. En raison des besoins trop élevés, cette méthode est appliquée à proportion de plus de 50 % en l'Inde [8].

I-8-1-3- La Dessiccation

Les feuilles sont transférées sur des convoyeurs métalliques via ce qu'on appelle des dessiccateurs à étages. Le thé est séché à l'air chaud d'environ 80-90 °C pendant environ 20 minutes, les huiles essentielles demeurant sur les feuilles et celles-ci prenant une couleur vert foncé et l'humidité résiduelle est de 5-6 % [8].

I-8-1-4- Criblage /tri

Le thé prêt est ensuite trié dans les grades usuels dans le commerce au moyen de cribles mécaniques.

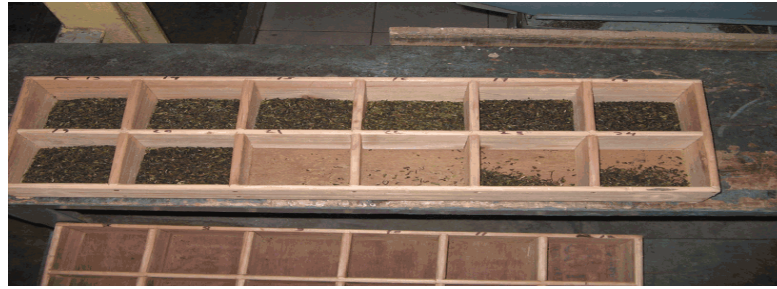


Figure I-8 : Criblage/tri du thé vert [13].

I-8-2- La Fabrication du thé Oolong

Après un flétrissage, les feuilles sont refroidies, puis roulées jusqu'à ce qu'elles virent au Oolong et dégagent un léger parfum.

Puis intervient une courte fermentation stoppée par chauffage des feuilles dans une bassine en fer, suivie d'un séchage des feuilles dans des paniers. En fonction de l'origine géographique, la fermentation est plus ou moins longue [11].

I-8-3- La Fabrication du thé noir

Une anecdote raconte la découverte du thé noir par les Européens : en effet, l'humidité du bateau transportant les caisses de thé vert aurait provoqué le développement de moisissures. Le thé ainsi noirci plaisait particulièrement aux occidentaux.

Les procédés traditionnels chinois d'obtention du thé furent modernisés avec l'arrivée des Anglais, à l'origine du déplacement des plantations vers l'Inde [11].

I-8-3-1- Procédé Orthodoxe

Les six étapes initiales furent perfectionnées et raccourcies en cinq étapes : on parle du procédé « orthodoxe ».

L'élément crucial dans l'obtention du thé est le démarrage rapide de la première étape, le flétrissage, assurant l'absence d'un début de fermentation. Pour cela, des factories et les maisons servant à la préparation du thé, sont installées à côté des plantations [11].

I-8-3-1-1- Le flétrissage

Les feuilles fraîchement cueillies sont étalées sur des plateaux, des toiles, ou des treillis métalliques en couches de 15 cm. Un dispositif de ventilation aspire l'air à travers les feuilles, les privant d'un certain taux d'humidité. Ces appareils sont appelés « flétrissoirs », fonctionnant à une température de 26 °C.

D'autres enceintes sont constituées de plateaux séparés de 20 cm, sur lesquels on étale les feuilles de thé, en faisant circuler l'air produit par un système de ventilation.

La durée du flétrissage dépend des variétés du thé, s'étendant de 6 à 24 heures et conférant à l'infuser un arôme plus ou moins mordant en fonction du taux d'humidité résiduelle.

On qualifie de medium withering ou flétrissage moyen un taux idéal d'humidité résiduelle de 50% [11].

Le flétrissage produit des feuilles de thé souples, partiellement sèches et à poids réduit.

D'autre part, la libération de composés volatils confère une odeur de pomme aux feuilles de thé.

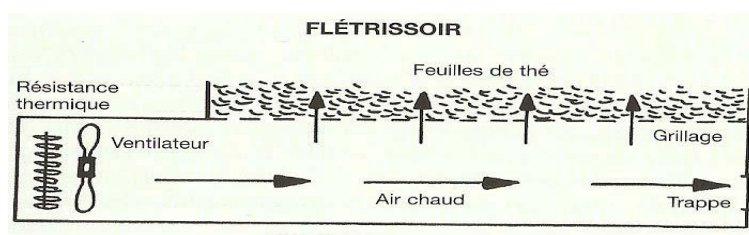


Figure I-9 : Le flétrissoir [11].

I-8-3-1-2- Le roulage

Une déshydratation adéquate est nécessaire pour effectuer un roulage efficace, en trois à cinq étapes d'une dizaine de minutes. Ainsi le roulage s'effectue pendant 30 à 40 minutes, pouvant être répété plusieurs fois dans le but d'augmenter la quantité d'huiles essentielles pour accentuer la force du thé.

L'opération a lieu dans des cuves cylindriques : lors du roulage les cellules végétales sont brisées, libérant des huiles essentielles ainsi que des enzymes.

Le nombre d'étapes du roulage dépend de l'altitude des plantations :

Les feuilles issues de basses altitudes subissent un roulage léger ou light rolling en cinq étapes : des feuilles peu brisées, libérant peu de sucres en sont issues. Les bourgeons ne sont que peu oxydés.

Par contre, les feuilles issues d'altitudes plus élevées subissent un roulage plus fort ou hard rolling. L'opération se déroule en trois étapes, de façon à ne pas trop endommager les feuilles : elles libèrent une plus grande quantité de sucres, colorant les bourgeons en jaune par oxydation.

D'autres thés, comme ceux issus du Darjeeling, nécessitent d'abord un roulage léger, puis fort. Ces variétés sont caractérisées par un arôme intense et des feuilles entières.

Pour contrecarrer une fermentation trop rapide et pour séparer les fragments de feuilles brisées et les débris végétaux grossiers, une étape de tamisage ou dhool sépare chaque étape du roulage [11].

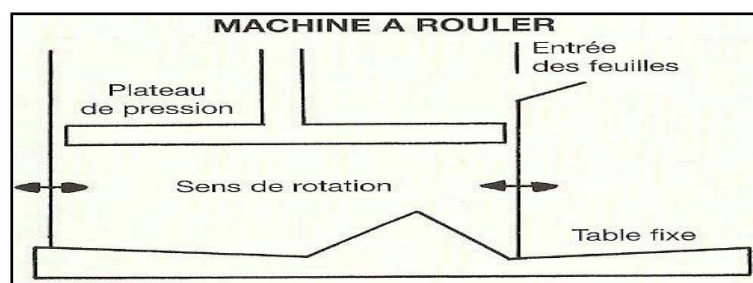


Figure I-10 : Le roulage [11].

I-8-3-1-3- La fermentation

Cette étape consiste à étaler les feuilles issues du roulage en couches de 5 à 7 cm dans une pièce à hygrométrie de 95 à 98 %, à température de 27 °C, à hygiène et à ventilation très surveillées.

La durée de la fermentation est tout aussi importante : elle s'échelonne entre 1 et 4 heures. Ainsi la fermentation est presque absente pour le thé vert, moyenne pour le thé rouge, et la plus longue pour le thé noir.

En effet, un thé amer témoigne d'une fermentation trop courte, tandis qu'un thé trop fermenté perdra son pouvoir astringent à cause de l'oxydation excessive des polyphénols.

Le respect rigoureux de ces conditions idéales est nécessaire à l'action des enzymes libérées par le roulage. Parmi ces enzymes, la polyphénoloxydase est la plus importante. Elle est responsable de la transformation d'une quantité plus ou moins importante (allant jusqu'à 50 %), en fonction du temps de fermentation, de polyphénols en théaflavines, théarubigines et théasinensines. Ces derniers composés seront à l'origine de l'astringence et de la couleur de l'infusé [10].

I-8-3-1-4- La dessiccation

La dessiccation est l'étape la plus délicate de la préparation du thé. Son but est de stopper la fermentation, qui trop longue, pourrait anéantir la qualité du produit.

Le thé sortant de l'enceinte de fermentation est transféré sur le tapis roulant d'un dessiccateur produisant un courant d'air très sec et chaud de 85 à 90 °C. Le taux résiduel d'humidité est de l'ordre de 2 à 3 %.

Le procédé doit être rapide, mais une dessiccation trop rapide peut rendre la feuille cassante et évaporer le meilleur de l'arôme [10].

Inversement, une dessiccation trop lente ne pourrait pas stopper la fermentation, le but du procédé étant l'inactivation des enzymes responsables de celle-ci.

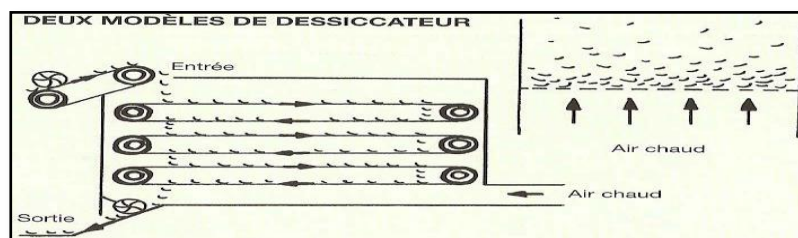


Figure I-11 : La dessiccation [10].

I-8-3-1-5- Le tamisage et l'emballage

Le triage des feuilles sèches se fait à l'aide de tamis vibrants ou de souffleries d'air, pour les séparer en fonction de leur taille. Un rouleau de bakélite retient les fibres superflues par son pouvoir électrostatique. Cette étape doit se dérouler très rapidement pour éviter un noircissement ou greying des feuilles.

Pour les thés de haute qualité, le tamisage est réalisé manuellement. Les feuilles sont emballées après un stockage éventuel du thé dans des silos à l'abri de l'humidité. Des caisses en bois d'un volume de 40 kg doublées de feuilles d'aluminium, pour protéger le thé de l'humidité externe et éviter qu'il ne s'imprègne d'odeurs externes, servent d'emballage. Généralement on appose une feuille de riz entre le thé et l'aluminium.

Les sacs en papier, destinés à recevoir de plus petites quantités de thé, sont eux aussi doublés d'aluminium.

Pour la plupart des thés, on mélange les feuilles de plusieurs jours pour obtenir des lots homogènes, car il est impossible d'obtenir un thé de qualité identique deux jours de suite. Par contre, les thés de très haute qualité sont emballés jour après jour, afin qu'ils soient les plus purs possibles[10].

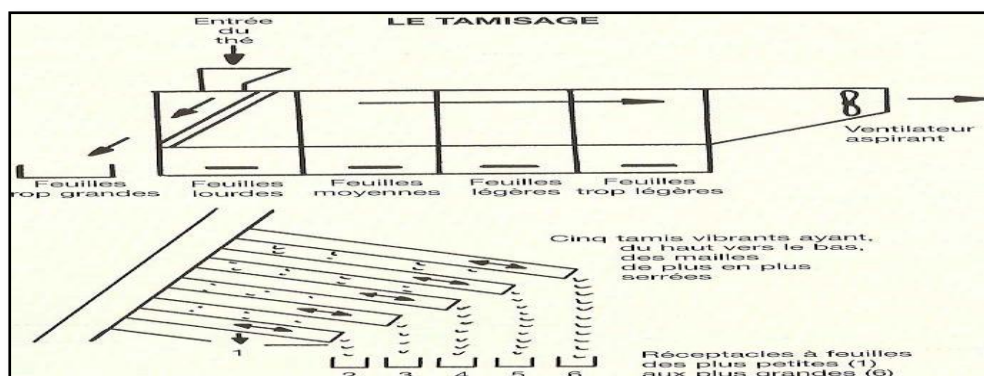


Figure I-12 : Différents tamiseurs [10].

Voici quelques pays utilisant préférentiellement le procédé « orthodoxe » pour leur fabrication de thé : Le Sri Lanka, suivi de la Turquie, de l'Indonésie, de l'Inde, de la Chine, de l'Argentine, du Viêtnam.

I-8-3-2- Le procédé CTC ou « crushing-tearing-curling »

Le procédé CTC remplace aujourd'hui souvent le procédé « orthodoxe », nettement plus fastidieux. Le procédé de fermentation est raccourci, suivi d'une étape de broyage entre les dents aiguisées d'un cylindre. Les feuilles déchiquetées donnent un aspect en boules au thé, préférentiellement utilisées pour la composition de blends. Il s'agit de mélanges de thés d'une même région ou d'un même pays, nommés suivant leur origine et conditionnés dans des sachets. Le mélange de thés de plusieurs jardins permet ainsi de conserver une qualité constante du produit durant toute l'année. Quelques exemples sont les « Darjeeling », les « Ceylan », les thés « Assam », etc. Les thés fabriqués selon le procédé CTC donnent une liqueur ou infusé plutôt corsée largement appréciée [11].

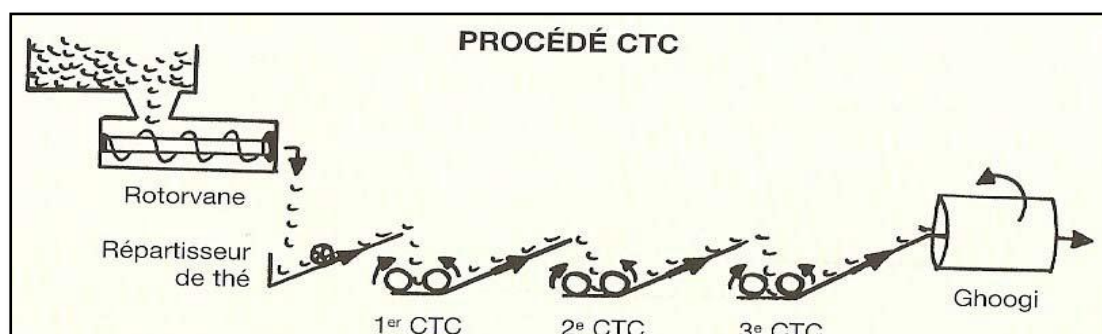


Figure I-13 : La fabrication du thé selon le procédé CTC [11].

Voici quelques pays utilisant en premier lieu le procédé CTC pour leur production de thé : L'Inde, suivie du Kenya, du Bangladesh, du Malawi, de la Tanzanie, du Sri Lanka, de l'Ouganda, du Zimbabwe, de l'Indonésie, etc. On peut conclure que le procédé CTC est essentiellement mis en œuvre par les pays nouvellement producteurs [11].

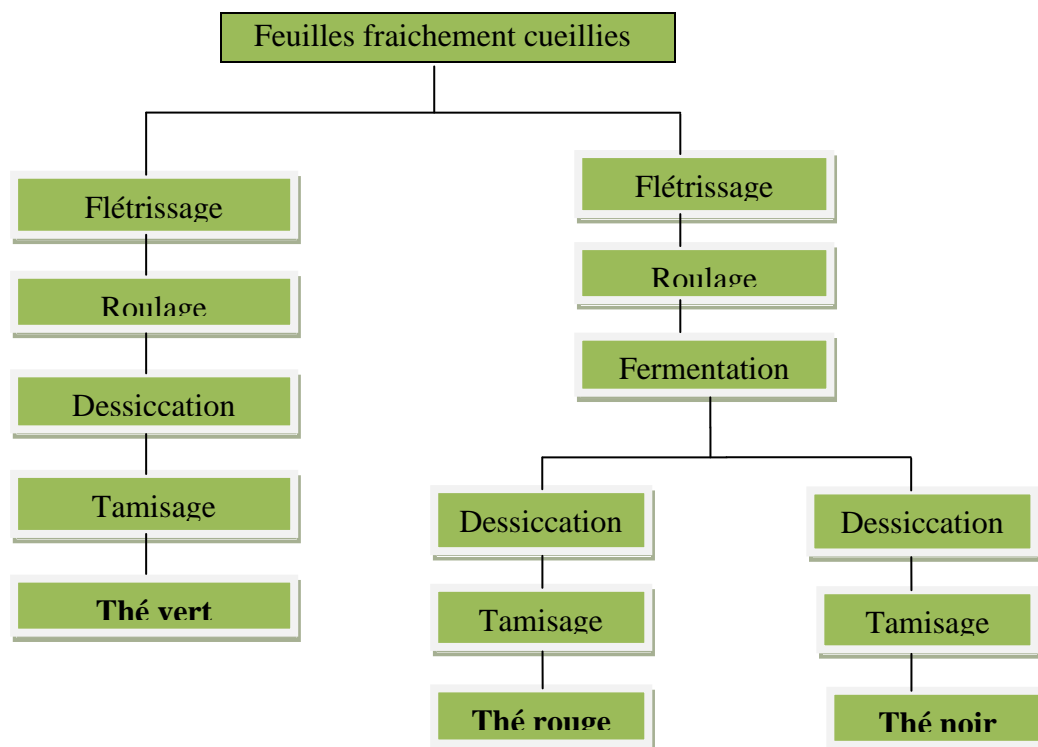


Figure I-14 : Procédés de fabrication des thé vert, Oolong et noir [15].

I-9- Composition chimique des feuilles de thé

Dans la nature, les feuilles de thé contiennent des milliers de composés chimiques, qui une fois traités forment des complexes et de nouveaux composés. Lorsque nous infusions des feuilles de thé, nos sens sont titillés par les milliers de composés volatils et non volatils. La feuille de thé est composée essentiellement d'eau, et dès qu'elle est cueillie, commence immédiatement à se flétrir et à perdre son eau. Se faisant, ses parois cellulaires commencent à se décomposer et dans cette réaction d'oxydation, les composants actifs entrent en contact entre eux et avec l'oxygène.

Les composants actifs et leur concentration varient considérablement d'un thé à l'autre, en fonction aussi de son stade de traitement ou d'infusion et des méthodes de mesure utilisées. À titre informatif, ci-dessous la liste et un pourcentage massique relatif des

principaux composants actifs du thé qui participent à son goût, sa texture, son aspect et ses effets sur l'organisme : [16].

- Polyphénols : 30 %
- Glucides : 25%
- Protéines (acides aminés, enzymes) : 15 %
- Alcaloïdes : 3 %
- Minéraux : 3 %
- Pigments : 0,5 %
- Substances volatiles : 0,1 %

I-9-1- Les polyphénols

Les polyphénols ou tanins végétaux sont des métabolites produits par les plantes comme langage relationnel avec leur environnement. Ils peuvent servir à favoriser la pollinisation en attirant certains insectes ou au contraire comme moyen de défense contre d'autres insectes ou parasites. Ils proviennent de l'action de la lumière du soleil sur les acides aminés et sont largement responsables de la sensation d'astringence du thé en combinaison avec les glycoprotéines de la salive. Ce qui explique qu'un thé élevé en parti à l'ombre est faiblement astringent dû à une faible concentration en polyphénols [16].

Logiquement le bourgeon et les premières feuilles ont la plus forte concentration en polyphénols, qui diminue dans les feuilles du bas plus ombrées. Des 30000 composés phénoliques du thé, les flavonoïdes (flavanols, flavonols, flavones, isoflavones et anthocyanes) sont le groupe le plus important auquel on attribue les effets antioxydants du thé. Au sein du groupe des flavonoïdes, les flavan-3-ols ou flavanols ou catéchines sont converties au cours de l'oxydation en théaflavines et théarubigines, responsables de la couleur foncée et de la saveur charpentée des thés noirs [16].

I-9-2- Les glucides

Les plantes stockent l'énergie formée au cours de la photosynthèse sous forme d'amidons et de sucres. Les plantes utilisent cette énergie stockée pour alimenter des réactions importantes. Dans le thé, les glucides aident à alimenter les réactions enzymatiques qui ont lieu au cours de l'oxydation et sont également responsables de la création de polyphénols dans les feuilles de thé jeunes. Les glucides apportent quant à eux de la douceur au thé.

I-9-3- Les acides aminés

Le plus abondant des acides aminés est la théanine.

I-9-4- Les enzymes

La polyphénoloxydase et la peroxydase sont les deux principales enzymes de la feuille de thé. Elles sont responsables du brunissement enzymatique des feuilles qui a lieu lorsque les parois des cellules sont cassées et qu'elles sont exposées à l'oxygène. Ces enzymes peuvent être dénaturées ou désactivées par la chaleur afin de retarder le brunissement. C'est l'une des premières étapes dans la production du thé vert et c'est aussi pourquoi ses feuilles restent vertes [15].

I-9-5- Les alcaloïdes

Les alcaloïdes du thé comprennent la caféine et deux composés similaires : la théobromine et la théophylline. Le théier crée ces substances chimiques comme répulsif naturel contre les attaques des insectes et des autres animaux. Ces alcaloïdes sont aussi responsables de l'amertume dans l'infusion de thé [15].

I-9-6- Les minéraux

La composition en minéraux varie considérablement avec chaque récolte et change même au cours du traitement. Comparé à d'autres plantes, le thé est riche en minéraux, plus de 40 éléments ont été isolés : manganèse, arsenic, aluminium, fer, nickel, sélénium, iode, potassium, fluor, etc. Le fluor connu aussi pour son action préventive contre la carie dentaire reste nocif absorbé en trop grande quantité. Il est à noter que ce dernier est stocké en plus grande quantité par les feuilles les plus âgées du théier, et se retrouve donc en plus grande concentration dans les cueillettes grossières qui composent les principaux thés en sachet ou bas de gamme du commerce [15].

I-9-7- Les pigments

Les pigments végétaux sont responsables de l'absorption de la lumière pour la photosynthèse et donnent leur couleur aux feuilles. Il existe deux grands groupes de pigments dans les feuilles de thé frais : chlorophylle et les caroténoïdes. Ces pigments se condensent au cours du flétrissage et de l'oxydation et deviennent plus sombres. La couleur verte des chlorophylles est convertie en pigments noirs, appelés phéophytines donnant un aspect plus sombre aux thés oxydés. Les caroténoïdes sont principalement composés de carotènes de

couleur orange et de xanthophylles jaunes, qui participent également à la couleur des feuilles de thé façonnées [16].

I-10- Les effets thérapeutiques du thé

I-10-1- Le thé vert

Le thé vert est une plante médicinale naturelle très puissante. Elle a des applications dans la prévention et le traitement d'un très grand nombre de maladies. Voici quelques-unes de ses propriétés médicinales : [10].

- Un des plus puissants antioxydants (neutralise les radicaux libres).
- Puissant désintoxiquant.
- Baisse du cholestérol dans le sang.
- Active le métabolisme.
- Stimule la brûlure des graisses.
- Augmente la sensibilité à l'insuline (baisse du risque de diabète de type 2).
- Aide à la prévention de différents cancers, de l'artériosclérose, des maladies cardiovasculaires.
- Effet anti-inflammatoire.
- Effet antiviral, antibactérien, antifongique.
- Effet anti-angiogénique (détruit l'arrivée d'oxygène vers les tumeurs).
- Effet anti-hypertenseur (réduction de la tension artérielle).
- Aide à la digestion.
- Effet désacidifiant (baisse le pH du corps).

I-10-2- Le thé noir

Bien que le thé vert soit le meilleur pour la santé, le thé noir possède de nombreux bienfaits. D'après une étude, 3 tasses quotidiennes de thé noir permettraient, grâce aux antioxydants, de réduire le risque d'infarctus de 11%, et de manière générale, il serait bon pour tout le système cardiovasculaire. Ces mêmes antioxydants permettent d'améliorer la circulation sanguine, et de lutter contre les maladies liées au vieillissement. Il est très riche en catéchines (mais moins que le thé vert), principe actif aux vertus amincissantes. Il contribuerait à ralentir la progression de l'ostéoporose chez les femmes.

Les effets du thé ne sont pas plafonnés : plus la consommation de thé noir est grande, plus son effet protecteur serait élevé (sans dépasser 6/8 tasses par jour). Les études sur son aspect préventif du cancer sont assez minces pour le moment. Cependant, il permet d'améliorer la concentration de calcium chez les femmes. On le conseille dans les cas d'infections digestives ou de migraines. C'est un allié des régimes car il aide à la perte de poids, il prévient aussi la formation des caries. Il est conseillé en cas d'hépatite [17].

I-11- Les effets indésirables du thé

Le thé, malgré ses puissantes propriétés curatives, peut dans certaines circonstances avoir des effets secondaires, et parfois même comporter des risques. On pense immédiatement aux effets indésirables et bien connus de la caféine. Mais il y a quelques autres facteurs à prendre en considération : [10].

- Les produits de qualités inférieures sont moins bien tolérés par l'organisme.
- Pollution ou contamination du produit (toxines, pesticides, dépôts, résidus ou contamination due à l'emballage ou au transport).
- Réduction de l'assimilation du fer et l'acide folique (vitamine B9) pendant 30 minutes après la boisson.
- Certaines maladies ou en cas de grossesse ou d'allaitement.
- Interactions médicamenteuses.
- Maladies de l'estomac ou des reins.

I-12- Les catéchines

I-12-1- Définition de la catéchine

La catéchine est un composé de la famille des flavonoïdes de la sous-classe des flavanols. Elle est aussi connue sous le nom de catéchol, avec le risque de confusion avec le pyrocatechol parfois dénommé lui aussi catéchol. L'usage dans la communauté scientifique a fini par imposer le terme de catéchine, dérivé du terme anglais catechin.

Le terme de catéchine est aussi parfois utilisé pour désigner la classe des flavanols (flavan-3-ols, flavan-3,4-ols et leurs esters galliques) [11].

I-12-2- Principales catéchines dans le thé

Les flavonoïdes sont des polyphénols, cette sous-famille est la plus abondante du thé, de l'ordre de 25% par rapport au poids sec. Il s'agit de dérivés hydrosolubles, essentiellement représentés par les catéchines, flavanols ou flavan-3-ols qui sont stockées dans les vacuoles cellulaires.

Les catéchines sont les principaux polyphénols responsables de la saveur âpre du thé. Leur passage de la feuille de thé vers l'infusé est facilité par leur caractère hydrosoluble.

Différentes substitutions sur le squelette de base sont à l'origine des quatre principales épicatechines, les deux premières étant plus astringentes par rapport aux autres :

- Le gallate d'épigallocatechine (EGCg).
- Le gallate d'épicatechine (ECg).
- l'épigallocatechine (EGC).
- l'épicatechine (EC).

Le terme « épi » désigne la position en β de l'hydrogène du groupement hydroxyle en 3. Ce groupement hydroxyle confère à la molécule un caractère acide. Une deuxième particularité de l'hydroxyle en 3 est la capacité d'oxydation en quinone en présence d'oxygène ; cette particularité confère, notamment à l'EGCg et à l'ECg une puissante activité anti-oxydante.

Les feuilles fraîches de thé sont les plus riches en EGCg et le processus de fermentation fait diminuer ses concentrations dans les thé Oolong et noir [11].

Avec un degré soutenu de fermentation des feuilles, l'oxydation peut dégrader les catéchines par une enzyme appelée la polyphénoloxydase. De ce fait, les catéchines du thé Oolong sont nettement moins concentrées, et dans le thé noir souvent très minimes. En revanche, ils sont présents en grande quantité dans le thé vert.

Une tasse d'infusé de thé vert contient de 300 à 400 mg de catéchines, dont 10 à 30 mg d'EGCg.

Les teneurs en catéchines peuvent différer selon les variétés de thé : ainsi des études ont révélé une teneur de 30% pour la variété *Camellia Assamica*, tandis que d'autres variétés chinoises, telles que *Camellia Sinensis*, renferment 20% de catéchines.

On peut classer leur présence par ordre décroissant : EGCg, suivie de l'ECg, de l'EGC et de l'EC [11].

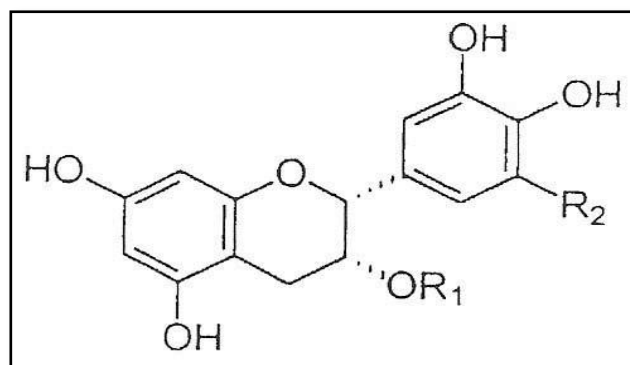
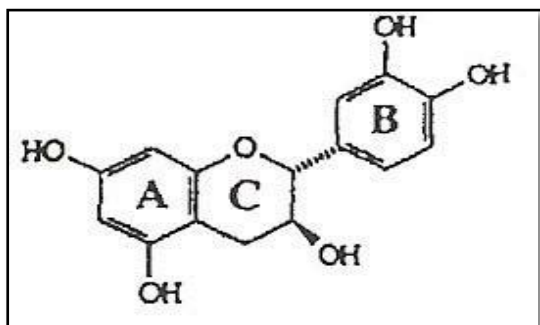


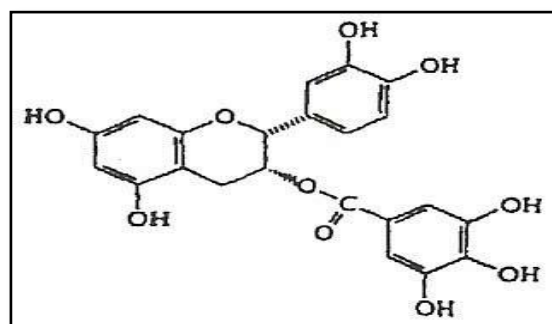
Figure I-15 : Structure de base des catéchines [11].

Tableau I-1 : Principales catéchines du thé et leurs substitutions relative [11].

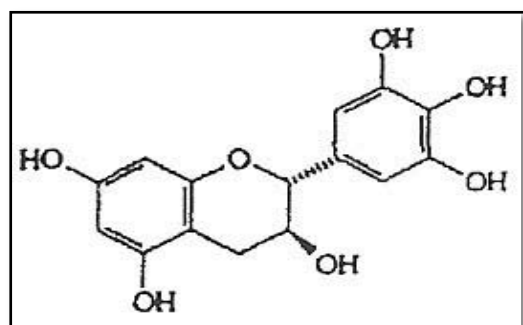
Catéchines de thé	Abréviation	R1	R2
Gallate d'épigallocatechine	EGCg	Gallate	OH
Gallate d'épicatéchine	ECg	Gallate	H
Epigallocatechine	EGC	H	OH
Epicatéchine	EC	H	H



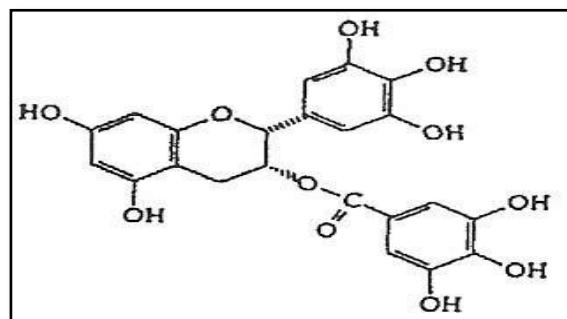
(A)



(B)



(C)



(D)

Figure I-16 : Structures des principales catéchines de thé : (A)EC, (B)ECg, (C)EGC, (D)EGCg [11].

Chapitre II :
Activité Antioxydante

II-1- Définitions

Un antioxydant est défini comme une substance qui, ajoutée à faible dose à un produit naturellement oxydable à l'air, est capable de ralentir ou d'inhiber le phénomène d'oxydation. Cette définition peut être élargie et le terme "antioxydant" englobe ainsi toutes les substances qui protègent les systèmes biologiques contre les effets délétères potentiels des processus ou réactions qui engendrent une oxydation excessive.

Un antioxydant (AOX) est une molécule qui ralentit ou empêche l'oxydation d'autres substances chimiques à leur contact.

L'oxydation fait partie d'une réaction d'oxydoréduction qui transfère des électrons d'une substance vers un agent oxydant. Cette réaction peut produire des radicaux qui entraînent des réactions en chaîne destructrices. Les antioxydants sont capables d'arrêter ces réactions en chaîne en se réduisant avec les radicaux et annihilant ainsi leur action. Ces propriétés se trouvent beaucoup dans les familles des thiols et des phénols.

Un antioxydant est défini comme toute substance ayant la capacité de retarder, prévenir ou inhiber la génération d'un oxydant toxique, d'arrêter ceux qui sont déjà produits et de les inactiver, bloquer de ce fait la réaction en chaînes de propagation produite par ces oxydants [12].

II-2- Le stress oxydatif

Le stress oxydatif ou stress oxydant correspond à une agression des cellules par des radicaux libres, aussi appelés « espèces réactives de l'oxygène » (ERO). Il ne faut pas confondre stress oxydatif, qui s'observe au niveau cellulaire, et stress psychologique, au niveau de l'organisme.

Lorsque les ERO s'accumulent dans la cellule, ils peuvent être neutralisés par des molécules antioxydants, comme les vitamines E et C, ou des enzymes, comme la superoxyde dismutase. La production élevée de radicaux libres peut être liée à l'inflammation, au tabagisme, à une alimentation trop riche en graisses, etc. L'accumulation des agressions par les radicaux libres favoriserait le vieillissement.

Un état de stress oxydant existe lorsqu'au moins une des trois conditions suivantes est présente :

- Excès des espèces réactives de O, N ou Cl
- Défenses insuffisantes (endogènes et exogènes)

- Mécanismes de réparation insuffisante

Le stress oxydatif correspond à une oxydation des différents constituants de l'organisme.

Les molécules responsables de cette oxydation sont les radicaux libres. Ils proviennent de l'oxygène contenu dans l'air que nous respirons. Les radicaux libres dénaturent les constituants de notre corps :

- les protéines, lipides et sucres,
- l'ADN,
- les cellules et leurs membranes.

Ainsi, sous l'action des radicaux libres, nos cellules et leurs constituants « rouillent » pareil à un morceau de métal laissé à l'air libre [13].

II-3- L'activité antioxydante

II-3-1- Définition

Nous distinguons deux sortes d'activité antioxydante selon le niveau de leur action. Une activité primaire et une activité préventive (indirecte). Les composés qui ont une activité primaire sont interrompus dans la chaîne autocatalytique de l'oxydation. En revanche, les composés qui ont une activité préventive sont capables de retarder l'oxydation par des mécanismes indirects tels que la complexation des ions métalliques ou la réduction d'oxygène...etc [14].

II-3-2- Pouvoir réducteur

Le pouvoir réducteur est la capacité qu'a un antioxydant à donner un électron et à réduire le fer. De nombreux auteurs considèrent la capacité réductrice d'un composé comme indicateur significatif de son pouvoir antioxydant [14].

II-3-3- Pouvoir anti radicalaire

L'efficacité d'un antioxydant peut être définie comme sa capacité à fixer des radicaux libres, donc à arrêter la propagation de la réaction en chaîne. Afin d'évaluer cette efficacité, la méthode au diphényl-picryl hydrazyl (DPPH) est utilisée. Le degré de décoloration indique le potentiel piègeur des antioxydants présents dans les extraits [14].

II-4- Types des antioxydants

II-4-1- Classification des antioxydants par rapport à leur mécanisme d'action

II-4-1-1- Groupe I (les antioxydants primaires)

Ce genre d'antioxydants peut inhiber la réaction d'initiation et la propagation de l'oxydation en participant au processus d'oxydation et en convertissant les radicaux libres vers leurs formes inactives.

Les antioxydants primaires sont généralement des composés phénoliques (AH) capables de donner un atome d'hydrogène au radical libre et le convertir en un composé stable non radicalaire.

Les antioxydants de ce groupe réagissent de façon prédominante avec les radicaux peroxydés, pour deux raisons : la concentration élevée de ces radicaux et la faible énergie du groupement (ROO·), un piègeur du radical libre, même à des concentrations faibles, entre en compétition avec les lipides pour rendre le radical libre inactif par l'intermédiaire d'une réaction de libération d'un électron, suivie d'une déprotonation [15].

II-4-1-2- Groupe II (les antioxydants secondaires)

Les antioxydants secondaires englobent une large gamme de différentes substances chimiques chélateurs de métaux pro-oxydatifs, des piègeurs de la molécule d'oxygène, inhibiteurs des enzymes pro-oxydative, enzymes antioxydants et destructeurs des hydroperoxydes [15].

II-4-2- Classification des antioxydants suivant la nature chimique

Plusieurs substances peuvent agir en tant qu'antioxydants in vivo. Elles incluent le bêta carotène, l'albumine, l'acide urique, les oestrogènes, les polyamines, les flavonoïdes, l'acide ascorbique, les composés phénoliques, la vitamine E...etc. Elles peuvent stabiliser les membranes en diminuant leur perméabilité et elles ont également une capacité de lier les acides gras libres [16].

II-4-2-1- Les antioxydants enzymatiques

Les antioxydants enzymatiques, il s'agit principalement de trois enzymes ; le superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT) et la glutathion peroxydase (GPx). Ces enzymes ont une action complémentaire sur la cascade radicalaire au niveau du $O_2^{\bullet-}$ et du H_2O_2 , conduisant finalement à la formation de l'eau et de l'oxygène moléculaire [16].

A. Les superoxydes dismutases (SOD)

La famille des superoxyde-dismutases comporte trois isoformes (SOD1, SOD2, SOD3) dont le rôle est la dismutation de deux anions superoxyde en espèces oxygénées moins réactives que sont H_2O_2 et O_2 . L'activité des SOD est dépendante des apports nutritionnels en cuivre et à un moindre degré en zinc [16].

B. Les catalases

Essentiellement présentes dans les peroxysomes et dans les érythrocytes, sont capables de transformer le peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire, mais leur rôle est très important surtout en présence d'ions ferreux [16].

C. Les glutathions peroxydases et réductases (GSHPX)

Les glutathions peroxydases et réductases sont localisées dans le cytosol et dans les mitochondries. Le rôle de la glutathion peroxydase (GPx) est de réduire d'une part le peroxyde d'hydrogène en molécule d'eau, et d'autre part les hydroperoxydes organiques (ROOH) en alcools. Lors de cette réaction, qui demande l'intervention de deux molécules de glutathion (GSH), celles-ci se transforment en glutathion-disulfure (GSSG) [16].

II.4.2.2. Les antioxydants non enzymatiques

Contrairement aux enzymes antioxydantes, la plupart de ces composants ne sont pas synthétisés par l'organisme et doivent être apportés par l'alimentation. Dans cette catégorie d'antioxydants, nous retrouvons les oligoéléments, la glutathion réduit (GSH), les vitamines E et C et les polyphénols [16].

A. La vitamine C

L'acide L-ascorbique ou vitamine C est considéré comme le plus important antioxydant dans les fluides extracellulaires. C'est un piègeur très efficace des ions superoxydes O_2^- , du peroxyde d'hydrogène H_2O_2 et des radicaux hydroxyles HO^\bullet .

Le rôle antioxydant de la vitamine C est basé sur sa réaction avec les radicaux peroxydes aqueux, avant qu'ils initient la peroxydation lipidique le produit formé étant le radical ascorbyle. La vitamine C protège ainsi les biomembranes et les lipoprotéines [17].

B. La vitamine E

La vitamine E regroupe de nombreux composants, les α -, β -, γ - et δ -tocophérols et tocotriénols. La vitamine E étant liposoluble, elle se fixe aux membranes et peut ainsi séquestrer les radicaux libres empêchant la propagation des réactions de peroxydation lipidique [17].

En protégeant ainsi les cellules contre les dommages associés aux radicaux libres et par conséquent, prolonge la vie cellulaire tout en ralentissant le processus de vieillissement. La vitamine E joue un rôle important dans l'agrégation de la β -amyloïde ($A\beta$), d'ailleurs, les données cliniques ont prouvé que les patients d'Alzheimer obtiennent des avantages remarquables au traitement par la vitamine E. Il a été déterminé que la vitamine E naturelle, semble être deux fois plus biodisponible que la vitamine E synthétique [16].

C. Le β -carotène

Le β -carotène, précurseur de la vitamine A, est apporté par l'alimentation, il a le pouvoir de terminer les réactions en chaîne de lipoperoxydation. Il protège les structures cellulaires contre l'agression oxydante en s'opposant à la génotoxicité de nombreux agents.

L'activité antioxydante du β -carotène est liée à leur longue chaîne polyénique qui leur permet de réagir avec les radicaux $ROO\cdot$, $HO\cdot$, $O_2\cdot^-$, $R\cdot$ par simple addition électrophile et transfert d'électron [17].

D. Glutathion

Le glutathion est agent anti radicalaire composé de 3 acides aminés : cystéine, acide glutamique et glycine. Les deux derniers acides aminés sont produits rapidement par l'organisme mais la cystéine est un acide aminé semi-essentiel, qui doit donc être présent dans notre alimentation.

Le glutathion joue un rôle majeur dans la protection des lipides, des protéines et des acides nucléiques contre l'oxydation. Le rôle protecteur et détoxifiant de glutathion résulte principalement de sa fonction comme coenzyme de glutathion peroxydase (GSHPX). De plus il a des interactions synergiques avec d'autres composants du système de protection antioxydant tels que la vitamine C ou la vitamine E [17].

E. Les oligoéléments

Le cuivre, le zinc, le manganèse, le sélénium et le fer sont des métaux essentiels dans la défense contre le stress oxydant. Ces oligoéléments jouent le rôle de cofacteur pour maintenir l'activité catalytique des enzymes antioxydantes.

Le sélénium (Se) joue un rôle clé dans la protection des cellules et de leurs constituants contre l'attaque radicalaire. Cette fonction est due à sa présence dans le site actif des glutathions peroxydases sélénodépendantes, et à l'activité biologique anti radicalaire des scléroprotéines. Le zinc (Zn) et le Cu jouent un rôle dans le fonctionnement

de SOD. Le zinc protège les groupements thiols (SH) des protéines contre l'oxydation induite par le fer, en empêchant la formation de ponts disulfure intramoléculaires [17].

F. Polyphénols

Les polyphénols, représentés par les flavonoïdes, les acides phénoliques, les tannins, coumarines, stilbibènes et les lignanes, sont d'un intérêt croissant. Une des raisons principales de cet intérêt est la reconnaissance de leurs propriétés antioxydantes et ainsi leur implication, probable dans la prévention des diverses pathologies associées au stress oxydant.

Un très grand nombre de données expérimentales plaide aujourd'hui en faveur de leur implication dans la prévention des maladies dégénératives telles que : cancers, maladies cardio-vasculaires, ostéoporose ou maladies inflammatoires [17].

Tableau II-1 : Principaux nutriments antioxydants et leur sources alimentaires [15].

Principaux nutriments antioxydants	Sources alimentaires
Vitamine C	Agrume, melon, brocoli, fraise, kiwi, chou, poivron
Vitamine E	Huile de tournesol, de soja, de maïs, beurre et dans les œufs et les noix
β-Carotène	Légumes et fruits orangés et vert foncés
Sélénium	Poisson, œufs, viandes, céréales et volaille
Zinc	Viande, pain complet, légumes verts, huîtres et produits laitiers
Flavonoïdes	Fruits, légumes et thé vert
Acides phénoliques	Céréales complètes, baies et cerise
Tanins	Lentilles, thé, raisins
Métabolisme de cystéine, glutathion	Caséine, Lactalbumine (petit-lait), produits laitiers Brocoli, chou, œufs, poissons et viandes

II-4-2-3- Les antioxydants synthétiques

Dans l'industrie alimentaire, les antioxydants synthétiques, tels que le butylhydroxyanisole (BHA), butylhydroxytoluène (BHT), gallate propylée (PG) et le tétrabutylhydroquinone (TBHQ), sont largement utilisés parce qu'ils sont efficaces et moins chers que les antioxydants naturels [12]. Cependant, il a été montré que ces antioxydants de synthèse pouvaient être toxiques, en effet, le BHA convertirait certains produits ingérés en substances toxiques ou carcinogènes en augmentant la sécrétion des enzymes microsomales du foie et des organes extra-hépatiques. Le BHT présenterait des effets carcinogènes chez le rat [18].

II-4-2-4- Antioxydants synergiques

Les antioxydants synergiques sont des substances qui ne sont guère actives en tant qu'antioxydants, et dont les propriétés apparaissent surtout en présence des autres antioxydants. Il en est ainsi des lécithines, des acides citrique et tartrique, des acides aminés, de certains flavonoïdes. Leurs propriétés peuvent s'expliquer par un effet chélatant de métaux comme le fer ou le cuivre, dont on connaît bien l'effet pro-oxydant à faible dose.

Cependant, ce n'est peut-être pas la seule explication, car plusieurs de ces produits sont d'assez mauvais chélatants. Certains produits ont un effet inhibiteur de la décomposition des hydroperoxydes, et d'autres semblent régénérer des antioxydants, comme les tocophérols ou les dérivés de l'acide ascorbique à partir de leurs formes oxydées [19].

II-5- Méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante

Plusieurs méthodes sont utilisées pour la détermination de l'activité antioxydante nommées d'après le nom de la substance utilisée comme source de radicaux libres, par exemple :

- FRAP (Ferric reducing antioxidant power).
- ORAC (Oxygen radical absorbance capacity).
- TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity) ou ABTS (2,2-azinobis 3-rthylbenzothiazoline 6-sulphonate) et DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl).

Il est à indiquer que différentes méthodes donnent des résultats assez différents et devraient être appliquées préférentiellement pour la comparaison de produits similaires [20].

Chapitre III :
Matériels et Méthodes

III-1- Introduction

Dans ce chapitre, nous présenterons le matériel, les réactifs, les modes opératoires, et les méthodes analytiques mises en œuvre pour l'analyse de différents types de thés, en l'occurrence ; le thé vert, le thé Oolong et le thé noir.

Les méthodes analytiques utilisées sont :

- La chromatographie liquide à haute performance couplée à un détecteur à barattes de diode (HPLC-UV-DAD) pour le dosage de l'épigallocatechine gallate (EGCg) ; un composé majoritaire dans le thé.
- La spectrophotométrie UV. Visible pour l'évaluation de l'activité antioxydante de l'EGCg et des extraits du thé.

III-2- Matériels

La conduite de ce travail a nécessité l'utilisation de différents matériels d'importance variée tels que :

- ✓ Balance technique.
- ✓ Lyophilisateur (Alpha 1-2 LD plus).
- ✓ pH-mètre du type HANNA, HI 208 pH mètre
- ✓ Centrifugeuse (EBA III Pehich).
- ✓ HPLC-DAD du type Agilent, série 1260 Infinity.
- ✓ Spectrophotomètre UV-visible

III-2-1- Chromatographie liquide à haute performance couplée à un détecteur à barrette de diodes « HPLC-UV-DAD »

Un appareil HPLC-DAD de type Agilent, série 1260 Infinity est muni d'un réservoir contenant la phase mobile, d'une pompe quaternaire, d'un dégazeur (G1354A), d'un auto-échantillonneur (G1313A), d'un compartiment de colonne thermostatée (G1316A) et d'un détecteur à barrette de photodiodes (G1315B). La colonne de type C18 à silice greffée. Les données ont été analysées en utilisant le logiciel de chromatographie ChemStation. Les appareils à barrette de diodes donnent la lecture simultanée des intensités lumineuses sur tout le spectre et permettent l'obtention de chromatogrammes en trois dimensions.

III-2-2- Spectrophotomètre UV. Visible

Le spectrophotomètre est constitué de cinq parties :

- 1) Lampes tungstène et deutérium destinées à fournir de la lumière
- 2) Un monochromateur servant à isoler la longueur d'onde d'intérêt et éliminer le rayonnement secondaire non désiré
- 3) un compartiment permettant de recevoir la solution échantillon

- 4) Un détecteur destiné à recevoir la lumière transmise et qui la convertit en un signal électrique
- 5) Un dispositif d'affichage numérique permettant d'indiquer l'absorbance ou la transmittance. Le schéma (**Figure III.1**) ci-dessous illustre la relation entre ces différentes parties.



Figure III-1 : Schéma descriptif de fonctionnement d'un spectrophotomètre UV-Visible.

III-2-3- Solvants et réactifs

Tous les produits utilisés dans ce travail ont été achetés auprès de Sigma Aldrich (Sigma, Allemagne). Les solvants que nous avons utilisés en chromatographie sont de grade HPLC.

Le méthanol, l'acide formique, l'épigallocatechine gallate, l'épicatéchine, le resvératrol, l'acide ascorbique, et le DPPH ont été fournis par le laboratoire de chimie applique (LCA). L'Acide trichloracétique, Chlorure de fer, Phosphate de potassium et le ferricyanure de potassium ont été trouvés dans le magasin de génie des procédés.

Les molécules standards sont d'une pureté supérieure à 98 %. A ces différents solvants s'ajoute l'eau déminéralisée et filtrée trois fois.

III-3- Méthodes

III-3-1- Analyse quantitative par HPLC de (EGCg) dans le thé

Le but de cette analyse est de déterminer la dose de ce composé organique (EGCg) présent dans les différents thés concernés par cette étude dont la structure moléculaire ainsi que quelques caractéristiques sont, respectivement, représentées dans **la figure (III.2)** et le **tableau (III.1)**.

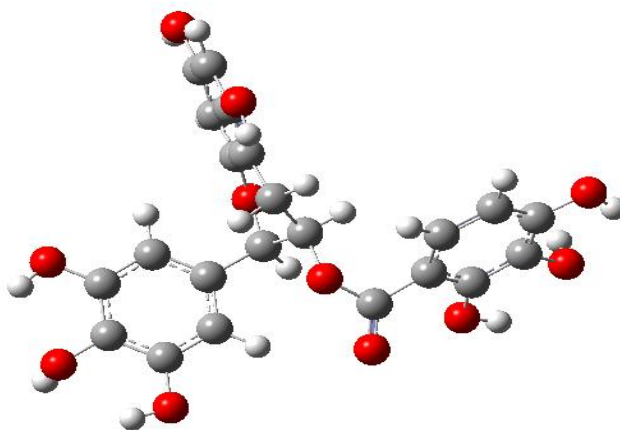


Figure III-2 : Structure de l'EGCg.

Tableau III-1 : Quelques caractéristiques de L'EGCg [8].

Formule brute	Nom chimique	Masse Molaire (g/mol)	Solubilité
$C_{22}H_{18}O_{11}$	[(2R,3R)-5,7-dihydroxy-2-(3,4,5-trihydroxyphenyl)chroman-3-yl] 3,4,5-trihydroxybenzoate	458,37	Soluble dans l'eau, le méthanol et l'éthanol.

III-3-1-1- Echantillons de thé

Trois marques de thé (vert, Oolong et noir) ont été achetées du marché local dans la ville de Guelma et utilisées dans cette étude.



Figure III-3 : Echantillons des thé étudiés.

Tableau III-2 : Caractéristiques organoleptiques des échantillons de thé.

Thé	Origine	Couleur	Forme
EV (vert)	Chine	Vert clair	Grains oblongs droits
EO (Oolong)	Inde	Sombre	Petits grains de différentes formes
EN (noir)	Vietnam	Noir	Petits grains de différentes formes

III-3-1-1-1 Méthode de préparation et injection du standard

Le but de cette étape est de construire la courbe d'étalonnage du composé pur (standard) qu'on veut doser ultérieurement, dans les différents échantillons de thé.

La solution mère est préparée à partir de 1mg du standard pur dans 15 ml de méthanol. Par la suite, des dilutions successives ont été effectuées, selon la nécessité.

Des concentrations de : 0,025 ; 0,050 ; 0,075 et 0,100 mg/ml de la solution standard préparée ont été injectées en triplicata dans l'appareil HPLC.

La courbe étalon est une droite (tracée en utilisant Microsoft Excel 2016) qui donne la variation des aires des pics en fonction des concentrations injectés à un volume constant de 2 μ l.

La teneur de l'EGCg dans différents échantillons a été calculée en utilisant l'équation de régression de la meilleure ligne d'ajustement.

III-3-1-1-2- Méthode de préparation et injection des échantillons de thé

Comme il est illustré par la figure (III.3), Une quantité de 2 g de chaque échantillon de thé a été infusée dans 100 ml d'eau pure et bouillie à une température de 85 °C [3] pendant 3, 5 et 7 minutes. Après filtration, les solutions ont été congelées, puis passée au lyophilisateur pour sécher.

Pour l'analyse par HPLC, les extraits séchés obtenus ont été mis en solution par méthanol, ensuite des volumes de 20 μ l ont été injectés.

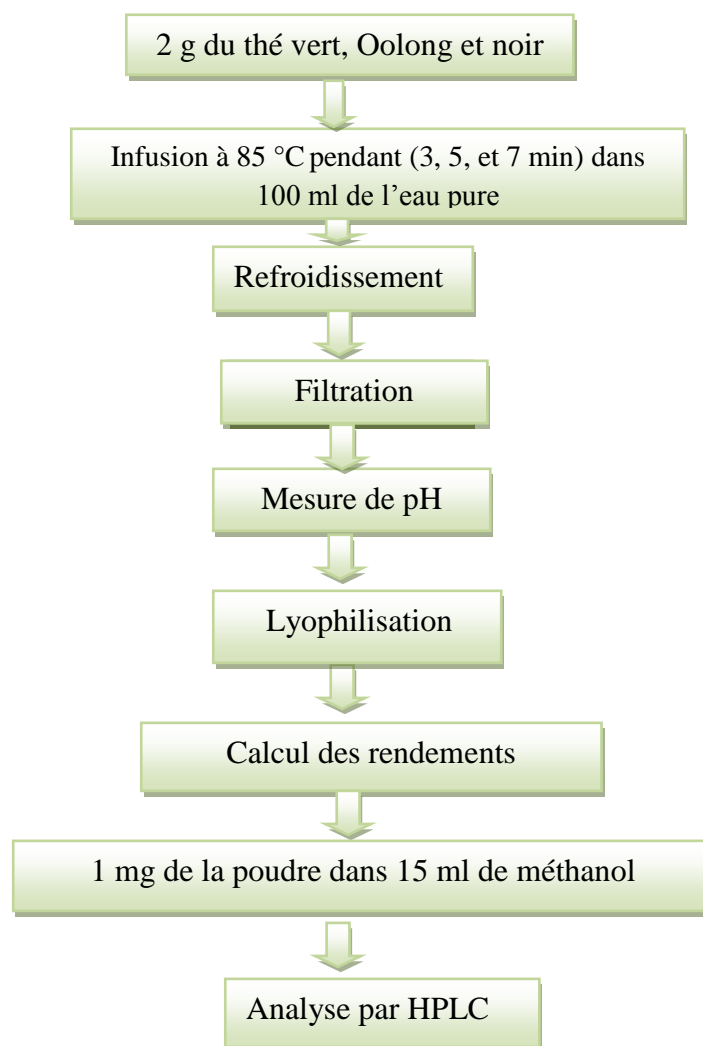
III-3-1-1-3. Méthode de préparation des échantillons

Figure III.4 : Protocole de préparation des échantillons.

III-3-1-1-4- Mesure du pH des solutions de thé

Le pH-mètre est calibré avec les deux solutions tampon à pH 4 et 7 et les pH des extraits obtenus de chaque échantillon sont mesurés.

III-3-1-1-5- Calcul des rendements

Les valeurs des rendements montrent l'efficacité de l'extraction par infusion. Le calcul de rendement a été basé sur la relation suivante :

$$R = \frac{mf}{mi} \times 100$$

mf: La masse de l'extrait du thé après la lyophilisation (g).

mi: La masse du thé pesée avant l'infusion (g).

III.3.1.2. Dosage par HPLC-UV-DAD de L'EGCg dans les échantillons de thé

III.3.1.2.1. Conditions de l'analyse

Pour ce dosage, le débit de la phase mobile a été fixé à 1ml /min. La détection du composé étudié a été réalisée à 280 nm ; la longueur d'onde maximale d'absorption de L'EGCg. La séparation a été réalisée en mode gradient et en phase inverse avec un temps d'acquisition de 37 minutes.

III-3-1-2-2- Phase mobile

Les solvants de la phase mobile utilisés dans le dosage de L'EGCg sont :

Solvant A : Eau / Acide formique (0,1%).

Solvant B : Méthanol / Acide formique (0,1%).

III-3-1-2-3- Phase stationnaire

Le matériau de la phase stationnaire est la silice greffée avec C18. Ce matériau est contenu dans une colonne de marque Zorbax Eclipse Plus C 18 (analytique 4.6x250mm, 5-Micron) (Agilent, USA).

III-3-1-2-4- Gradient

Après plusieurs essais de séparation pour les différents échantillons de thé, nous avons constaté qu'une bonne séparation est obtenue pour un gradient établi sur 37 min avec un pourcentage initial de 75 % du solvant A (**Tableau III-3**).

Tableau III -3 : Gradient HPLC pour l'analyse d'EGCg

<i>Temps (min)</i>	<i>Composition volumique du solvant A (%)</i>	<i>Composition volumique du solvant B (%)</i>
<i>0</i>	<i>75</i>	<i>25</i>
<i>10</i>	<i>50</i>	<i>45</i>
<i>20</i>	<i>50</i>	<i>50</i>
<i>30</i>	<i>0</i>	<i>100</i>
<i>31</i>	<i>0</i>	<i>100</i>
<i>35</i>	<i>75</i>	<i>25</i>
<i>37</i>	<i>75</i>	<i>25</i>

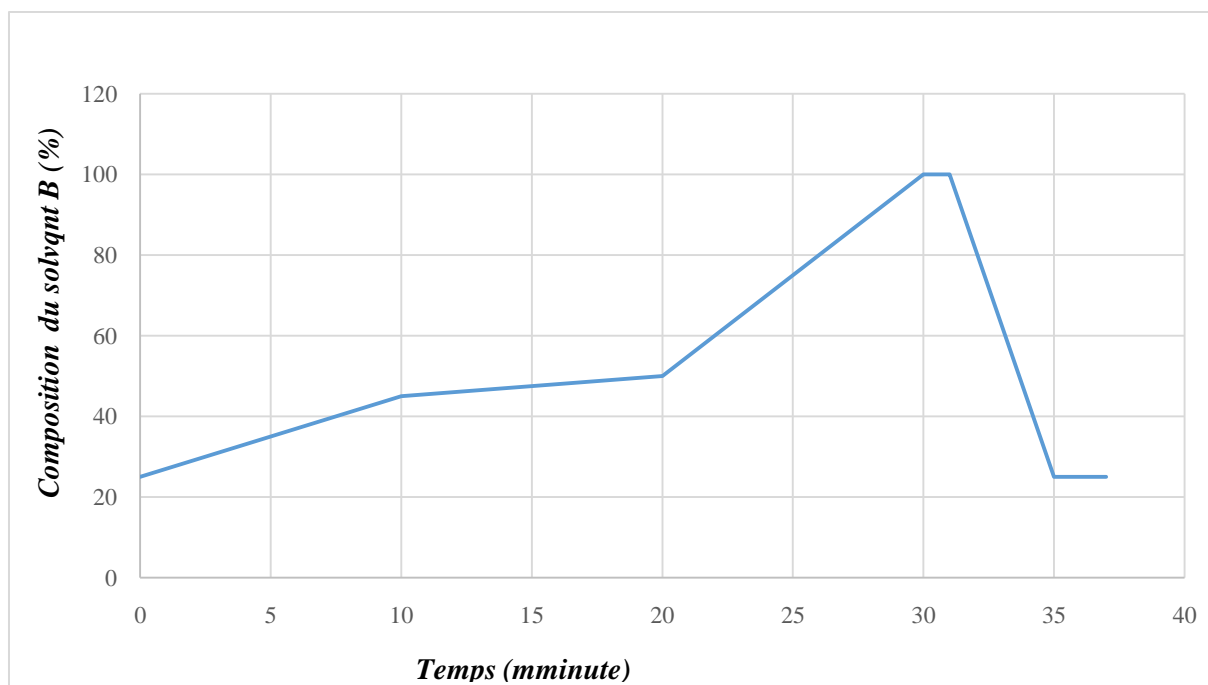


Figure III-5 : Gradient HPLC utilisé.

III-3-2 Validation de la méthode analytique

III-3-2-1- Courbe d'étalonnage

La molécule a été dosée par la méthode du standard externe. La gamme de concentrations injectées était de 0,025 à 0,100 mg/ml. La courbe d'étalonnage a été tracée en représentant les aires des pics (Y) par rapport aux concentrations (X, mg/ml) pour quatre concentrations différentes, chaque point étant la valeur moyenne de trois mesures indépendantes de surface.

III-3-2-2- Détermination des limites de détection et de quantification de L'EGCg

La limite de détection (LD) est la plus petite concentration ou teneur de l'analyte pouvant être détectée. Alors que, la limite de quantification (LQ) est la plus petite concentration ou teneur de l'analyte pouvant être quantifiée, bien entendu, dans les conditions expérimentales de la colonne.

La limite de détection (LD) a été calculée en considérant une valeur égale à trois fois l'écart type des trois essais effectués pour tracer la courbe d'étalonnage, divisée par la pente de la courbe. La limite de quantification (LQ) a été déterminée en tenant compte d'une valeur égale à dix fois l'écart type obtenue, divisée par la pente de la courbe [11].

Les LD et LQ sont déterminées comme suit :

$$\text{LD} = 3. \text{Ecart type/Pente}$$

$$\text{LQ} = 10. \text{Ecart type/Pente}$$

III-3-3- Détermination des taux de récupération

Le pourcentage de récupération permet d'identifier, pour un échantillon donné ou un type de matrice donnée et à un niveau de concentration donné, la présence d'interférence potentielle lors du processus d'analyse.

Le taux de récupération correspond à la différence (en pourcentage) entre la concentration mesurée d'un échantillon enrichi et la concentration mesurée du même échantillon non enrichi, divisée par la concentration de la substance ajoutée [21].

Afin de déterminer les taux des récupérations du standard, une solution de thé vert préparée par infusion pendant 5 min et à une température de 85 °C a été enrichie par des quantités connues en standard, puis analysée dans les mêmes conditions. Les quantités supplémentaires détectées ont alors été soustraites aux quantités déterminées dans la même solution de thé vert non enrichie. Quatre répétitions sont réalisées par échantillon.

$$\text{Taux de récupération (\%)} = (C_e - C) / C_a \cdot 100$$

Où :

C_e : Concentration mesurée d'un échantillon enrichi.

C : Concentration mesurée d'un échantillon non enrichi.

C_a : Concentration de la substance ajoutée

III-3-4- Injection

L'appareil HPLC-UV-DAD analytique est équipé d'un injecteur automatique, les échantillons ont été préparés dans des cupules spéciales et injectés dans la colonne. Le volume d'injection était de 20 μ l. L'appareil d'HPLC a été programmé pour exécuter une série de trois analyses consécutives [11].

III-3-5- Intégration

Une intégration consiste à mesurer la surface sous un pic. La détection d'un pic chromatographique par l'intégrateur, dépend de deux paramètres :

- La largeur attendue des pics.
- Le seuil d'intégration (sensibilité).

La largeur du pic est à peu près prévisible en fonction de la technique d'analyse et des conditions opératoires. Le seuil d'intégration est la valeur du signal à partir de laquelle le

calculateur repère un début de pic. Les surfaces des pics correspondant au composé étudié pour chaque échantillon sont données par le logiciel dans un fichier contenant les données chromatographiques sous forme de tableaux contenant le numéro du pic, son temps de rétention et sa surface et ce à la fin de chaque analyse [11].

III-4- Evaluation de l'activité anti oxydante de L'EGCg

De nombreuses méthodes sont utilisées pour l'évaluation de l'activité antioxydante des composés purs. Dans cette étude, les méthodes utilisées sont :

- Test de piégeage du radical libre DPPH•
- Test de réduction du fer « FRAP »

III-4-1- Test de piégeage du radical libre DPPH•

Le DPPH• est un radical libre stable qui absorbe entre 512-517 nm en présence de composés anti-radicalaire, le DPPH• de couleur violette se réduit en 2,2 Diphényle-1-Picryl hydrazine de couleur jaune.

III-4-1-1- Principe

Le test DPPH• permet de mesurer le pouvoir antiradicalaire de molécules pures ou d'extraits végétaux dans un système modèle (solvant organique, température ambiante). Il mesure la capacité d'un antioxydant « AH » (composés phénoliques généralement) à réduire le radical chimique DPPH° (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) par transfert d'un hydrogène. Le DPPH°, initialement violet, se transforme en DPPH-H, jaune pâle. Le changement de couleur peut être suivi par spectrophotométrie à 517 nm et de cette façon le potentiel antioxydant d'une substance peut être déterminé.

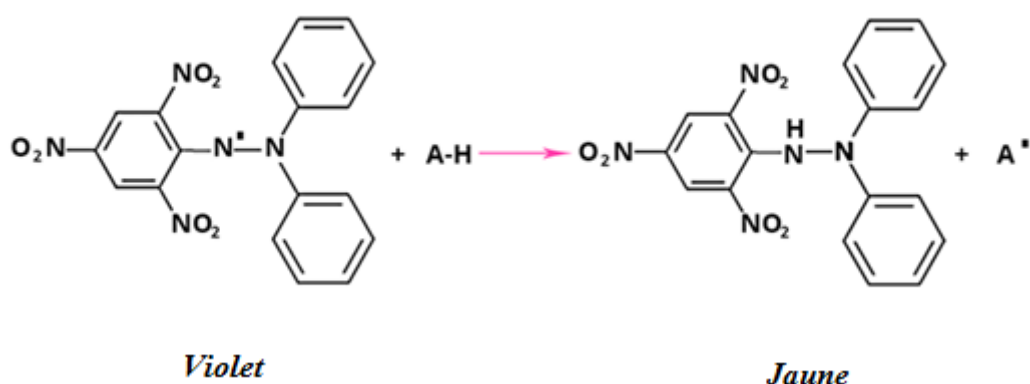


Figure III -6 : Réaction de test DPPH• (2,2 Diphényle-1-picryl hydrazyl) [31].

III-4-1-2- Mode opératoire

Le protocole expérimental utilisé est basé sur les conditions préalablement optimisées par **Sanchez-Moreno (1998)**.

La solution de DPPH est préparée par solubilisation de 2 mg de ce produit dans 100 ml de méthanol. Un volume de 1,95 ml de cette solution est ajouté à 50 μ l, de la solution méthanolique de l'épigallocatechine gallate à diverses concentrations (0,05 à 1 mg/ml) (**Figure III.6**). Parallèlement, un témoin négatif est préparé. La lecture de l'absorbance est faite contre un blanc préparé pour chaque concentration à 517 nm après 30 min d'incubation à l'obscurité et à la température ambiante.

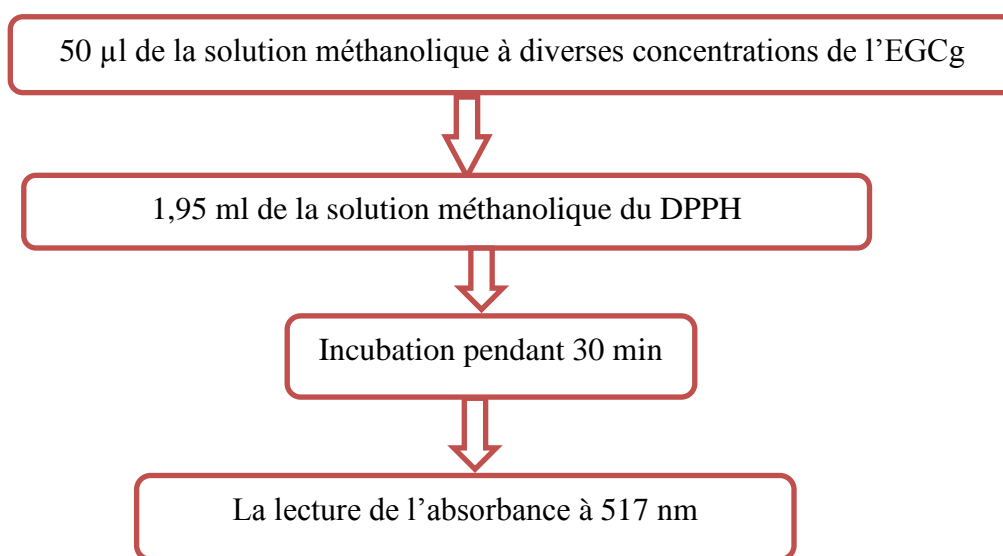


Figure III-7 : Protocole du test « DPPH ».

L'épicatéchine, l'acide ascorbique et le resvératrol sont utilisés comme antioxydants de références dont l'absorbance a été mesurée dans les mêmes conditions et pour chaque concentration le test est répété 3 fois. Les résultats ont été exprimés en pourcentage d'inhibition (I %).

$$I \% = [(Abs\ contrôle - Abs\ test) / Abs\ contrôle] \times 100$$

Abs test : Absorbance de l'échantillon, qui contient les réactifs et le composé à tester.

Abs contrôle : Absorbance du blanc qui contient tous les réactifs sauf le composé à tester.

I % : pourcentage d'inhibition.

III-4-2- Test de la réduction du fer FRAP

III-4-2-1- Principe

Le pouvoir réducteur du fer (Fe^{3+}) dans les extraits est déterminé selon la méthode décrite par **Oyaizu, M. (1986)**. La méthode de la réduction du fer est basée sur la réduction de fer ferrique en sel de fer par les antioxydants qui donnent la couleur bleue.

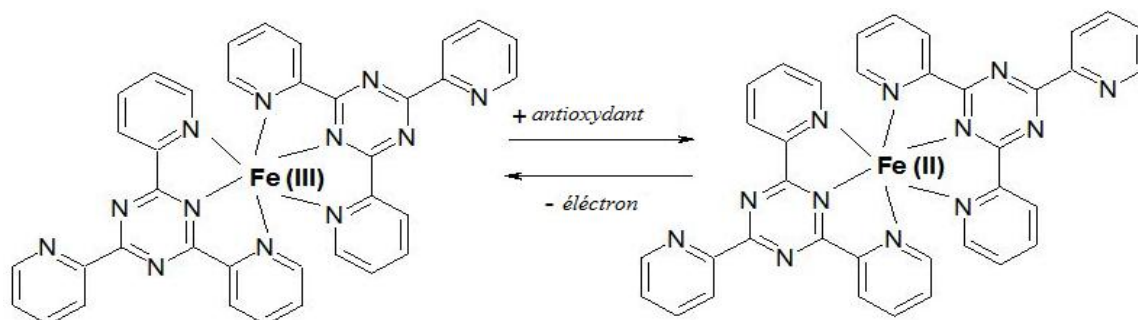


Figure III-8 : Mécanisme réactionnel intervenant lors du test FRAP entre le complexe ferricyanure ferrique Fe (III) et un antioxydant [32].

III-4-2-2- Mode opératoire

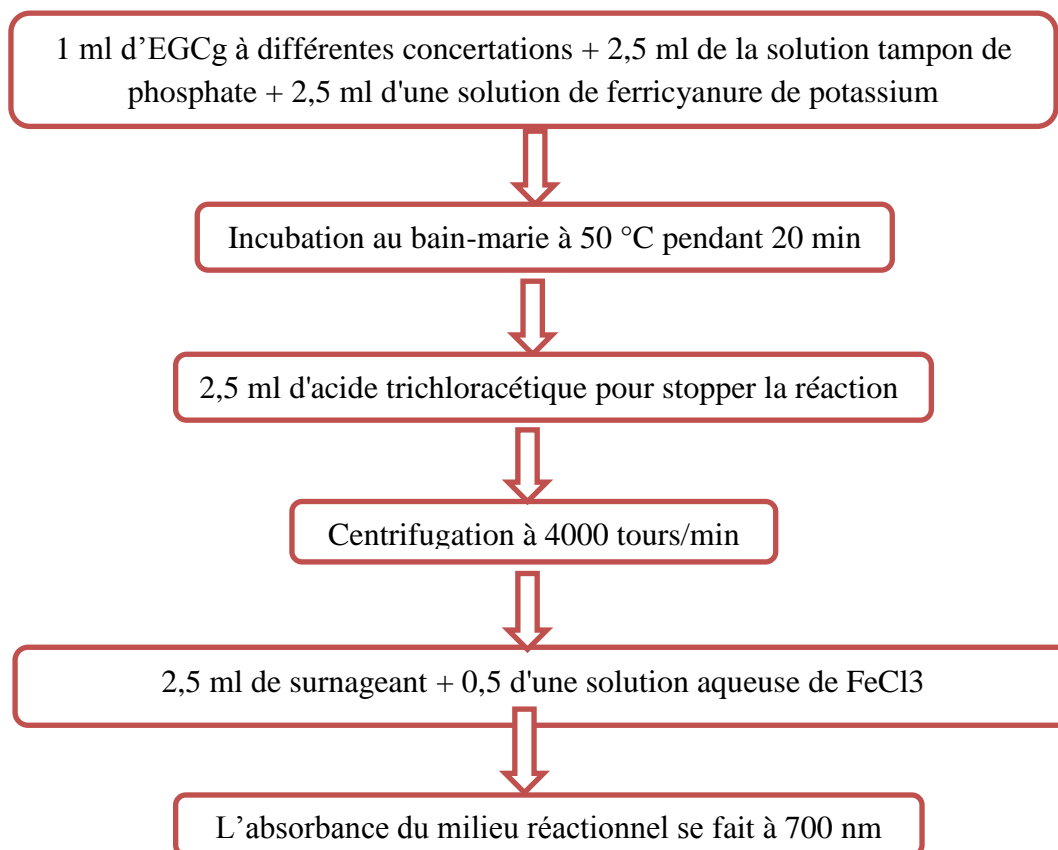


Figure III-9 : Protocole du test « FRAP ».

Comme il est montré sur **la figure (III.8)** ; Un millilitre de l'EGCg à différentes concentrations (de 0,005 à 1,5 mg/ml) est mélangé avec 2,5 ml d'une solution tampon phosphate 0,2 M (pH 6,6) et 2,5 ml d'une solution de ferricyanure de potassium $K_3Fe(CN)_6$ à 1 %. L'ensemble est incubé au bain-marie à 50 °C pendant 20 min ensuite, 2,5 ml d'acide trichloracétique à 10 % sont ajoutés pour stopper la réaction. Les tubes sont centrifugés à 4000 tours/min pendant 10 min. Un aliquote (2,5 ml) de surnageant est combinée avec 2,5 ml d'eau distillée et 0,5 ml d'une solution aqueuse de $FeCl_3$ (Chlorure ferrique) à 0,1 % fraîchement préparé. La lecture de l'absorbance du milieu réactionnel se fait à 700 nm contre un blanc semblablement préparé, en remplaçant l'extrait par de l'eau distillée qui permet de calibrer l'appareil (spectrophotomètre UV-Vis) [32].

L'activité de l'échantillon est en fin comparée à celle de resvératrol et l'acide ascorbique dont l'absorbance a été mesuré dans les mêmes conditions que les échantillons.

Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des composés testés.

III-5- Conclusion

Après le détail du matériel et des méthodes mises en œuvre dans ce chapitre, nous pouvons constater que les méthodes d'analyse choisies pour notre étude sont des méthodes simples, efficaces et adéquates ; en fait, l'HPLC-DAD a permis d'identifier et de doser avec une grande précision, l'EGCg contenus dans le thé et la spectrophotométrie UV-visible a permis en mesurant l'absorbance d'évaluer son activité antioxydante.

Chapitre IV :
Résultats et Discussions

IV-1- Introduction

Dans ce chapitre, nous commençons par la présentation de la courbe d'étalonnage de l'EGCg, les chromatogrammes, les rendements de l'infusion, les résultats du dosage par HPLC- UV-DAD des différents types de thé étudiés (vert, noir et Oolong) et les pH de leurs infusés.

Ensuite nous présentons les résultats de l'activité antioxydante de ce composé organique qui a été évaluée par la technique de réduction du fer « FRAP » et par le test du DPPH et la mise en évidence de la capacité de piégeage du DPPH[•] par le thé vert, Oolong et noir (infusion de 3 min).

IV-2- Résultats

IV-2-1- Données chromatographiques de l'EGCg

La figure (IV-1) montre le chromatogramme de notre composé pur (l'EGCg), la longueur d'onde maximale d'absorption étant à 280 nm [2] et le temps de rétention est 7,89 min.

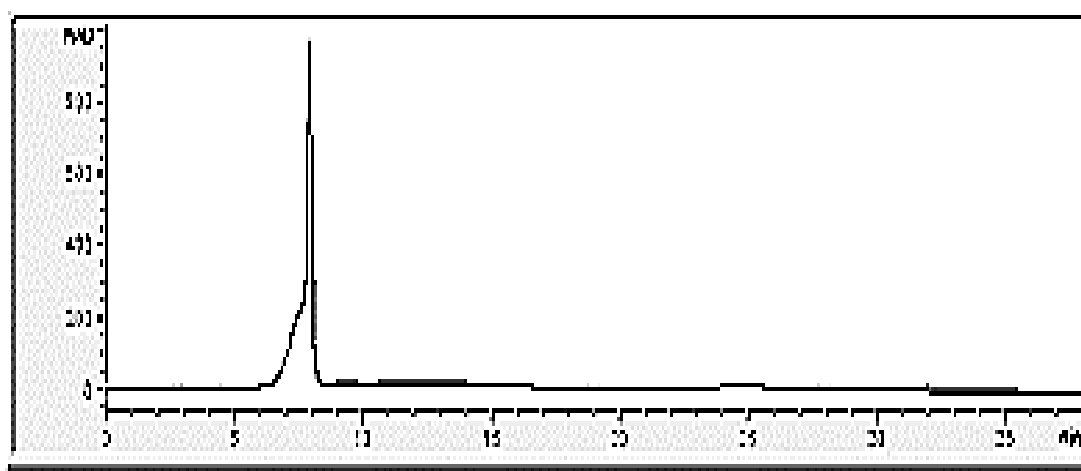


Figure IV-1 : Chromatogramme de l'EGCg ; $T_R=7,89$ min, $\lambda_{max}=280$ nm.

Le tableau (IV-1) et la figure (IV-2) indiquent respectivement les données HPLC et la courbe d'étalonnage de l'EGCg.

Tableau IV-1 : Données HPLC de l'EGCg.

Concentration	Aire 1	Aire 2	Aire 3	Moyenne	Ecart-type
0,025	6457,2	6455,8	6471,5	6461,5	8,68
0,050	12800,6	12801,1	12807	12802,9	3,55
0,075	18809,3	18815,4	18812,2	18812,3	3,05
0,100	23390,7	23397,3	23410,2	23399,4	9,91

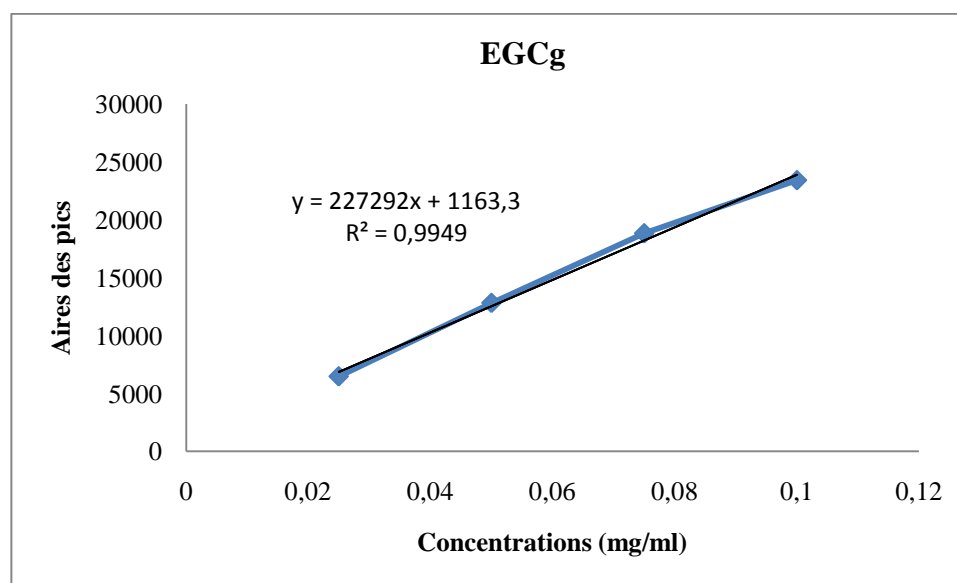


Figure IV-2 : Courbe d'étalonnage de l'EGCg.

IV-2-2- Validation de la méthode d'analyse

IV-2-2-1- Linéarité de la courbe d'étalonnage

Comme nous l'avons vu précédemment, la courbe d'étalonnage était linéaire et un facteur de régression, ($R^2 > 0,99$) a été obtenu pour notre composé standard (l'EGCg). Concernant les écart-types calculés des aires des pics du standard, nous remarquons que les valeurs sont comprises entre 3,05 et 9,91 ce qui indique une homogénéité dans les trois valeurs des aires pour toutes les concentrations du standard injecté.

IV-2-2-2- Limites de détection (LD) et de quantification (LQ) de l'EGCg

Nous avons calculé la limite de la détection, LD (0,09 $\mu\text{g/ml}$) et la limite de quantification, LQ (0,27 $\mu\text{g/ml}$), ces valeurs sont donc tout à fait acceptables.

IV-2-2-3- Taux de récupération

Les taux de récupération de la méthode ont été évalués en quadruple par dopage du thé vert préparé par infusion pendant 5 min avec trois concentrations différentes des standards (0,005 ; 0,010 et 0,020 mg/ml). Les résultats sont rassemblés dans le tableau (IV-2) et représentés par la figure (IV-3).

Tableau IV-2 : Taux de récupération de la méthode analytique à trois niveaux d'enrichissement de composé standard. Les valeurs sont présentées sous forme de moyenne \pm SD.

Composé	Concentrations ajoutées (mg/ml)	n	Taux de récupération (%)
Epigallocatechine gallate (EGCg)	0,005	4	98,7 \pm 1,8
	0,010	4	99,3 \pm 1,7
	0,020	4	100,7 \pm 1,9

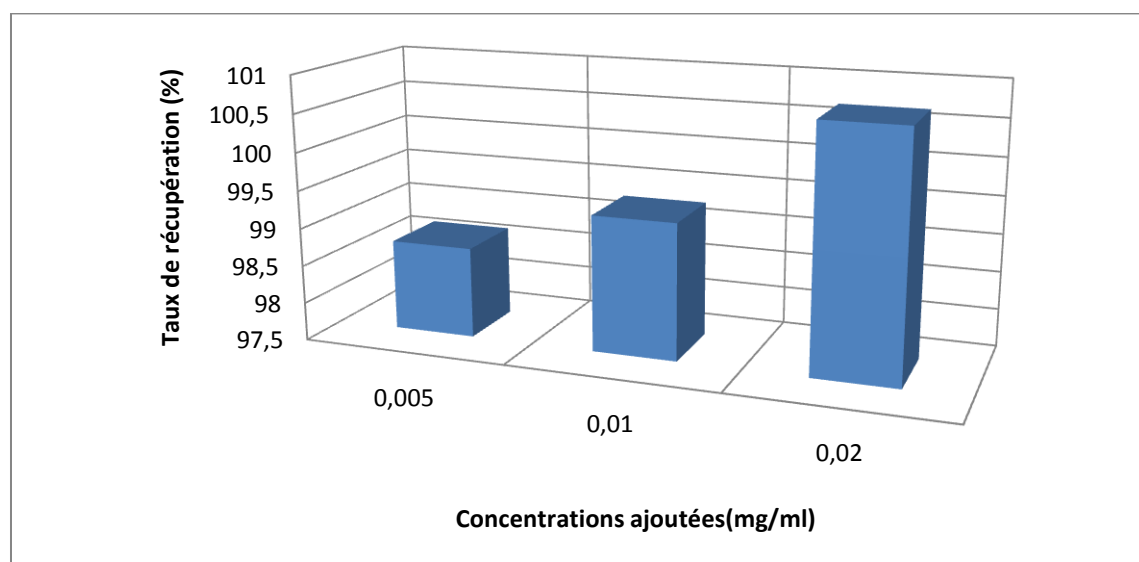


Figure IV-3 : Taux de récupération du standard, obtenu à partir d'un extrait (infusion pendant 5 minutes) du thé vert dopé.

Les résultats du dopage réalisé, présentent de très bons rendements. La récupération moyenne est supérieure à 98 % et elle varie de 98,7 \pm 1,8 à 100,7 \pm 1,9 % ; ceci fait apparaître l'efficacité de la méthode utilisée. En effet, les taux de récupération du standard ajouté à l'échantillon testé à des différentes concentrations sont reproductibles, et ont des valeurs très satisfaisantes.

IV-2-3- Présentation des chromatogrammes des échantillons de thé

Nous représentons dans les figures de (IV-4) à (IV-13) les chromatogrammes HPLC des échantillons du thé vert, Oolong et noir obtenus par infusion à une température de 85°C et cela pendant 3, 5, et 7 minutes respectivement. Le pic de l'épigallocatechine gallate est désigné par EGCg.

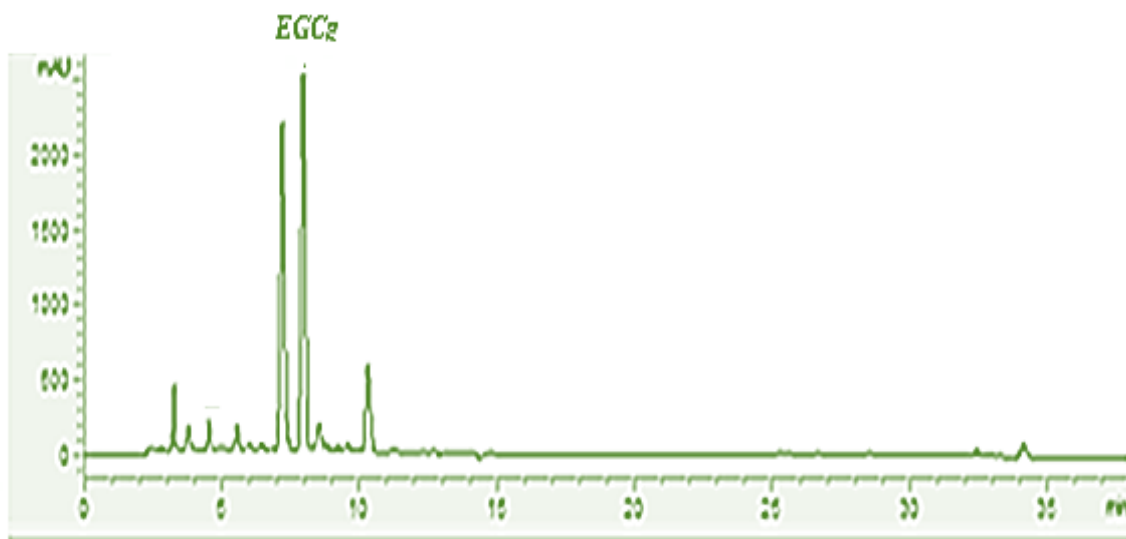


Figure IV-4 : Chromatogramme HPLC du thé vert (Infusion pendant 3 minutes)

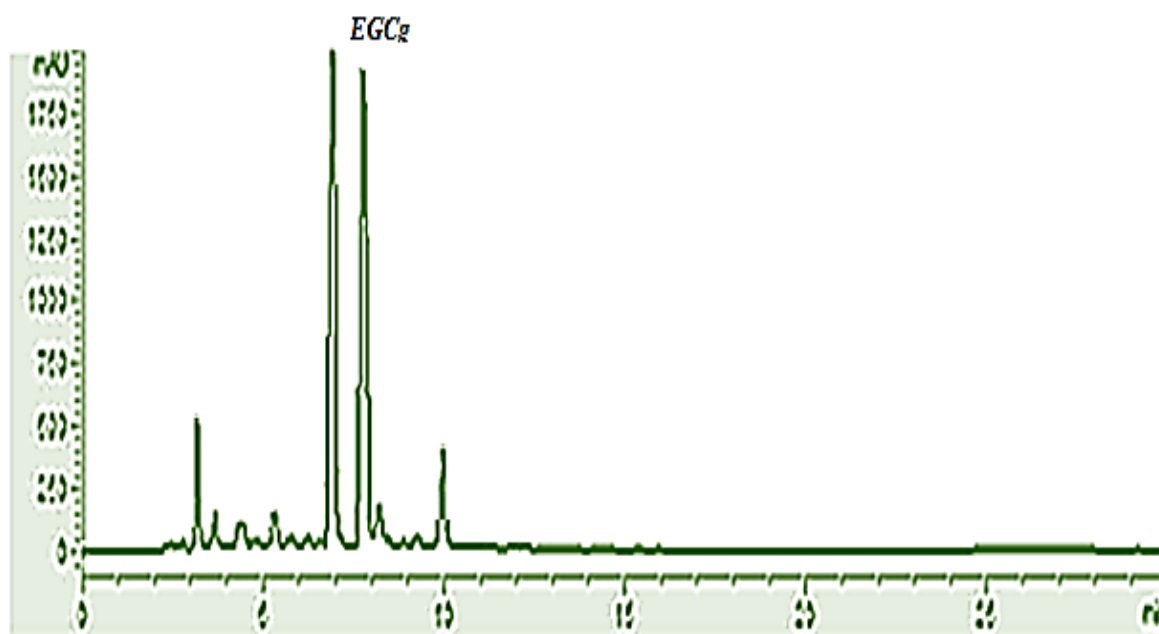


Figure IV-5 : Chromatogramme HPLC du thé vert (Infusion pendant 5 minutes)

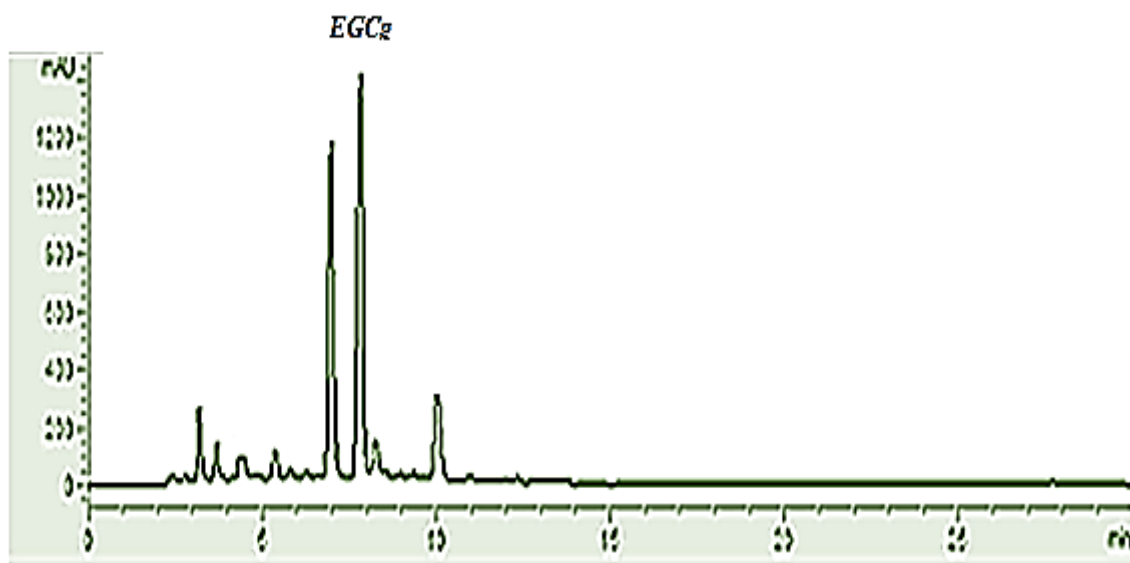


Figure IV-6 : Chromatogrammes HPLC Thé vert (Infusion pendant 7 minutes)

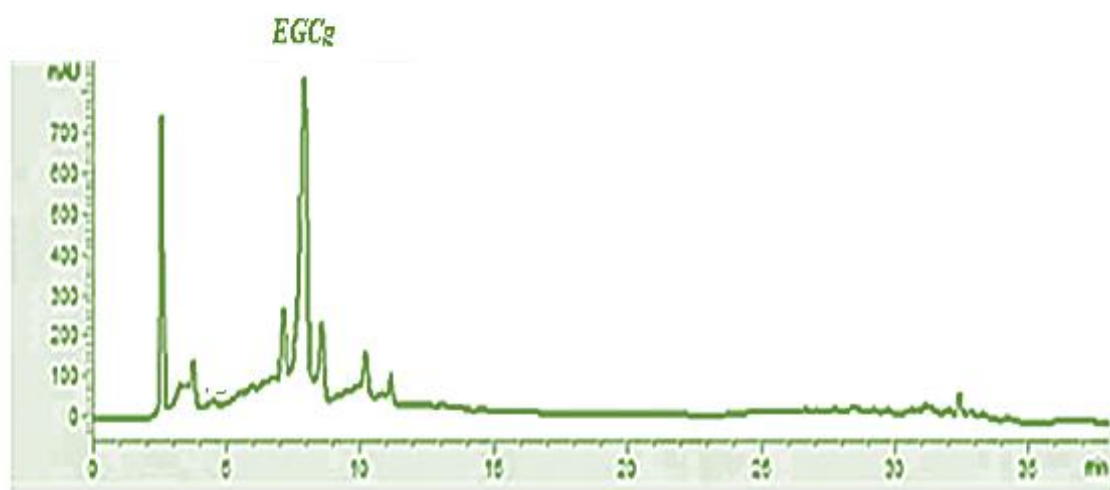


Figure IV-7 : Chromatogramme HPLC du Thé Oolong (Infusion pendant 3 minutes)

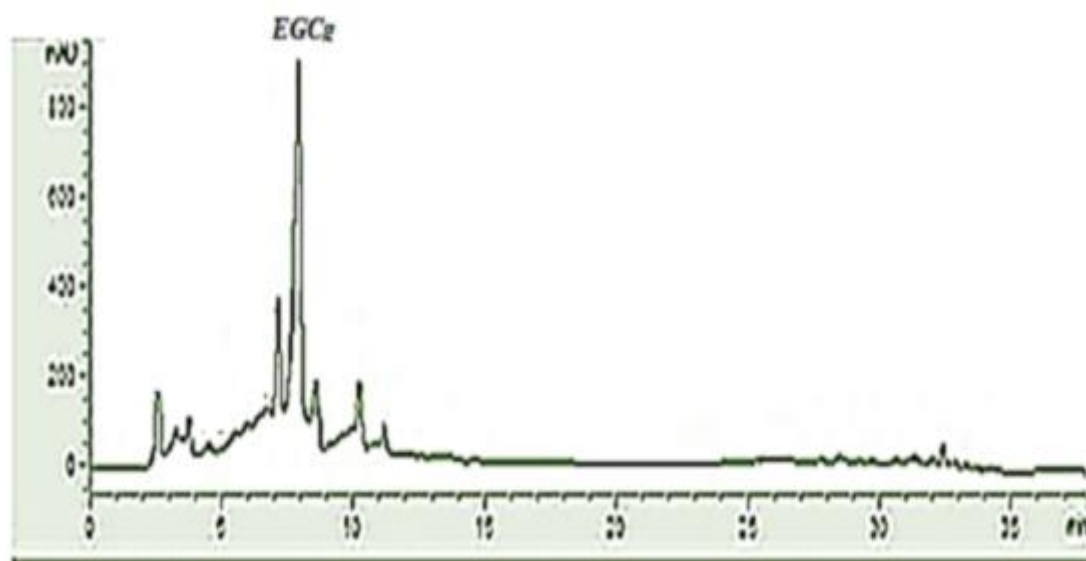


Figure IV-8 : Chromatogramme HPLC du Thé Oolong (Infusion pendant 5 minutes)

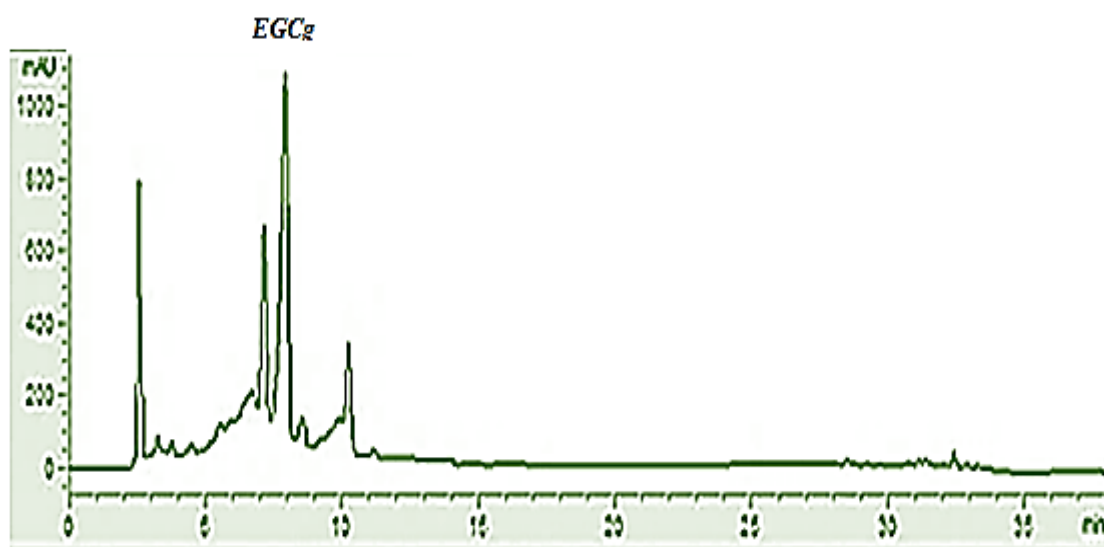


Figure IV-9 : Chromatogramme HPLC du Thé Oolong (Infusion pendant 7 minutes)

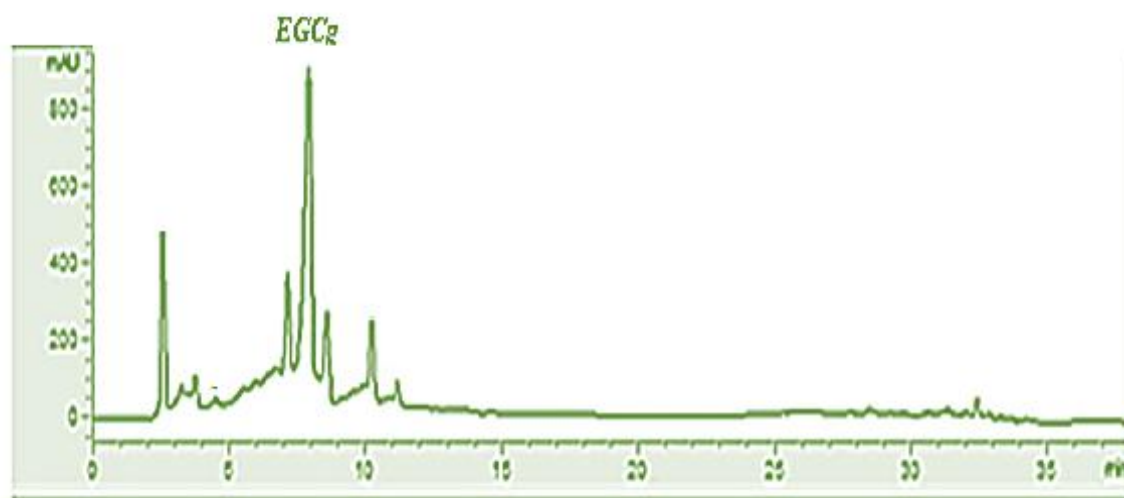


Figure IV-10 : Chromatogramme HPLC du Thé noir (Infusion pendant 3 minutes)

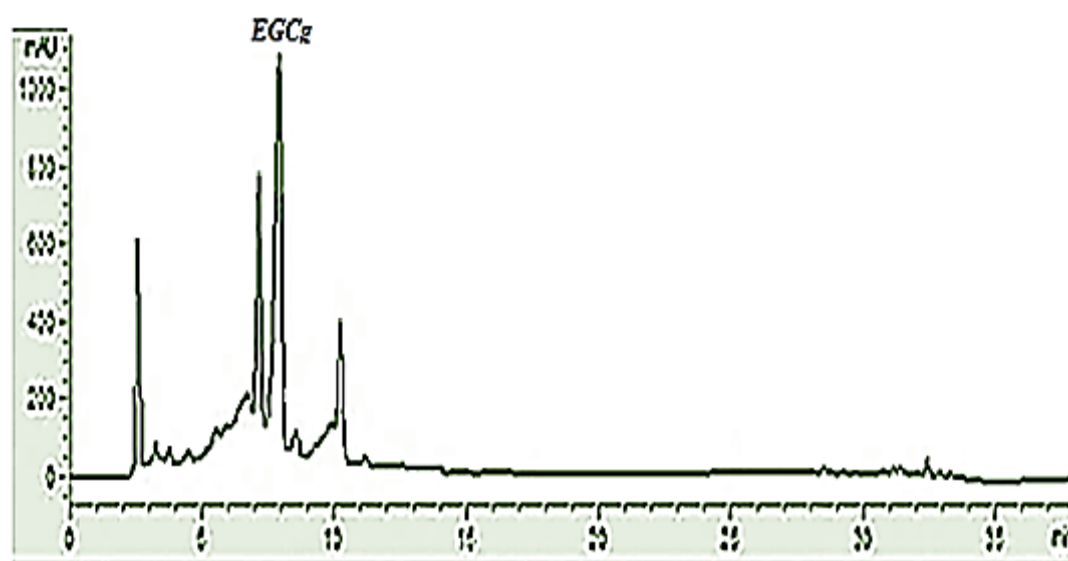


Figure IV-11 : Chromatogramme HPLC du Thé noir (Infusion pendant 5 minutes)

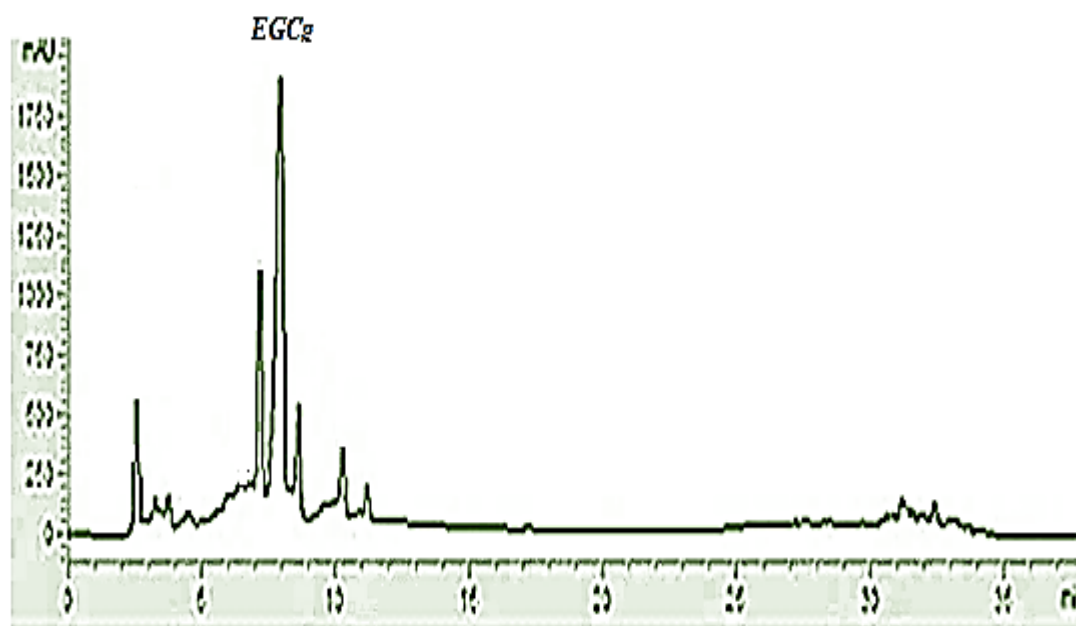


Figure IV-12 : Chromatogramme HPLC du Thé noir (Infusion pendant 7 minutes)

IV-2-4- Concentrations de l'EGCg dans les différents échantillons

Les concentrations de l'EGCg ont été déterminées par HPLC-UV-DAD pour les trois types de thé (vert, Oolong et noir) et la séparation des composés a été réalisée en 37 minutes. Les concentrations en mg L^{-1} du composé analysé sont résumées dans le tableau (IV-3).

Tableau IV-3 : Concentrations de l'EGCg en mg L^{-1} dans les échantillons de thé : vert, Oolong et noir préparés par infusion à $85\text{ }^{\circ}\text{C}$ les valeurs sont présentées sous forme de moyenne \pm SD.

	Concentration dans le thé vert (mg L^{-1})	Concentration dans le thé Oolong (mg L^{-1})	Concentration dans le thé noir (mg L^{-1})
3 min	$63,32 \pm 1,90$	$40,96 \pm 0,16$	$39,02 \pm 0,21$
5 min	$59,29 \pm 0,07$	$55,39 \pm 0,10$	$48,61 \pm 0,81$
7 min	$46,99 \pm 0,07$	$58,48 \pm 0,56$	$52,24 \pm 0,09$

IV-2-5- pH des échantillons des thés

Les pH des extraits obtenus de chaque échantillon sont mesurés et les résultats sont récapitulés dans le tableau (IV-4).

Tableau IV-4 : pH des solutions des thés : vert, Oolong et noir.

Thé vert			Thé Oolong			Thé noir		
3 min	5 min	7 min	3 min	5 min	7 min	3 min	5 min	7 min
5,84	5,88	5,90	4,97	4,99	5,06	4,97	4,96	5,59

IV-2-6- Rendements de l'extraction

Dans le tableau (IV-5), nous présentons les résultats des rendements d'extraction par infusion effectuée dans cette étude.

Tableau IV-5 : Les rendements de l'infusion des différents échantillons de thé.

Thé vert			Thé Oolong			Thé noir		
3 min	5 min	7 min	3 min	5 min	7 min	3 min	5 min	7 min
5,9	10	12,2	3,5	6,5	10,2	5,2	6,3	9,2

IV-3- Discussion

IV-3-1- Teneurs en EGCg dans les échantillons de thé

Le dosage de l'EGCg qui représente plus de la moitié de la totalité des catéchines [22] dans le thé vert, Oolong et le thé noir d'origine chinoise a été réalisé par HPLC-DAD. Les résultats des différentes concentrations de l'épigallocatechine gallate sont présentés sur la figure (IV-13). Ainsi Les teneurs en EGCg varient de $39,02 \pm 0,21$ à $63,32 \pm 1,90$ mg/l, avec la plus grande valeur trouvée pour l'échantillon de thé vert ce qui est expliqué par la dégradation des catéchines par l'oxydation dans les deux autres types de thé [22]. Le thé noir a donné la plus basse concentration en EGCg ($39,02 \pm 0,21$ mg/l).

En outre, la variation de la quantité de l'EGCg libéré lors de l'infusion de feuilles de thé vert, Oolong et noir pendant 3, 5 et 7 min a été étudiée. Les résultats obtenus montrent

clairement que les niveaux du composé étudié dans le thé Oolong et le thé noir augmentent avec l'augmentation du temps de l'infusion ; par contre dans le thé vert ; sa teneur est importante pour un temps d'infusion de 3 minutes (63 mg/l) ; il paraît que l'EGCg passent très rapidement en infusion et il sera transformé avec le temps en nouveaux composés [22]. Il est donc important de respecter le temps d'infusion de chaque thé.

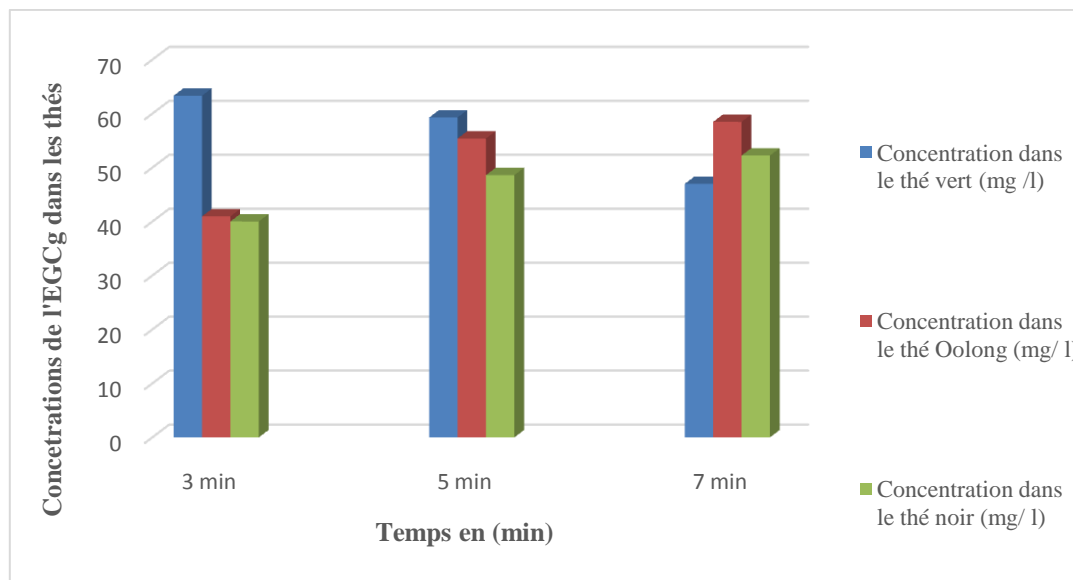


Figure IV-13 : Concentrations de l'EGCg dans les échantillons de thé vert, Oolong et noir.

IV-3-1-Variation du pH

Globalement et pour tous les types de thé, les pH sont compris entre 4,96 et 5,90. L'acidité de la boisson du thé est logique du fait de la composition chimique de la feuille de thé (vert, Oolong ou noir) où on trouve parmi autres les polyphénols, possédant des groupements OH sur le cycle benzénique [22], et aussi des acides phénols comme l'acide gallique et l'acide caféique, les vitamines (l'acide ascorbique et l'acide folique), les catéchines et aussi les acides aminés comme la théine.

Nous remarquons à travers les résultats obtenus une augmentation des pH des échantillons de thés étudiés lorsque le temps croît. Nous pouvons expliquer ce résultat par la dégradation des acides phénols comme l'acide gallique et l'acide caféique au cours du temps de l'infusion.

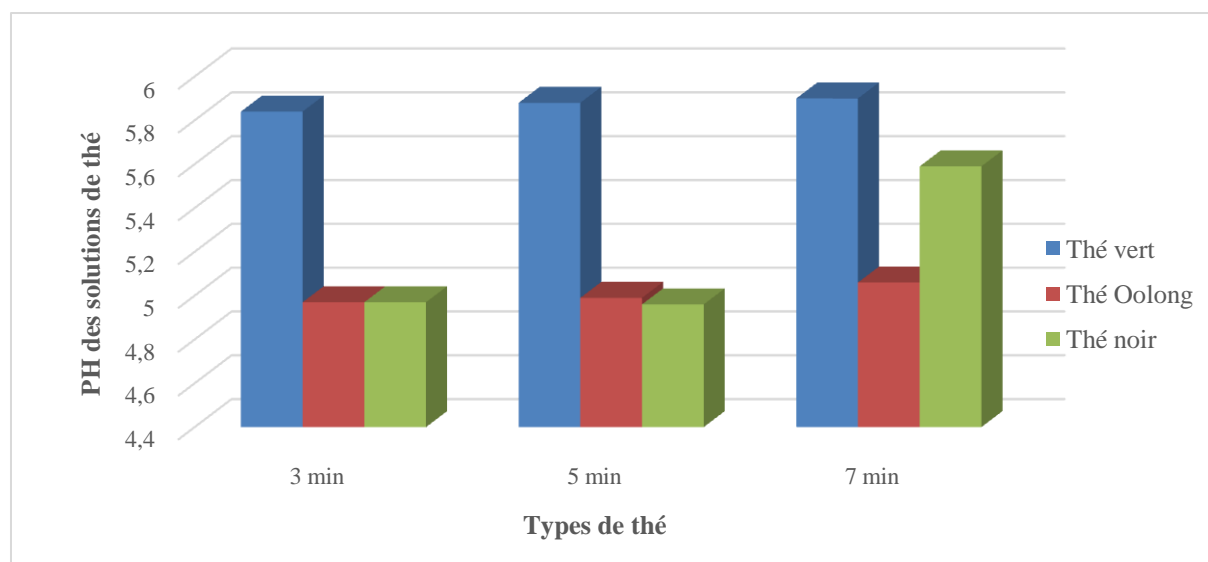


Figure IV-14 : Variation des pH des trois types de thé en fonction du temps d'infusion

En outre, on constate que le pH diminue quand le degré d'oxydation augmente (pH du thé vert > pH du thé Oolong > pH du thé noir) à l'exception du pH du thé noir à 7 min où nous avons trouvé une valeur de 5,59. Cette augmentation de l'acidité est peut-être due à la transformation des catéchines en théaflavine et théarubigine pendant le phénomène de fermentation du thé Oolong et noir respectivement.

IV-3-3- Les rendements

Les valeurs des rendements de l'infusion pour les différents types du thé vert, Oolong et noir étudiés sont entre 3,5 % et 12,2 %. Ce résultat paraît logique parce que la solubilité des composés chimiques qui constituent le thé et parmi lesquels : les polyphénols, les bases puriques, les acides aminés est partielle.

IV-4- Evaluation de l'activité antioxydante de l'EGCg

Concernant le pouvoir antioxydant de l'EGCg, deux méthodes ont été utilisées pour le tester :

- La méthode de réduction du fer « FRAP ».
- La méthode de piégeage du DPPH`.

IV-4-1- La réduction du fer (FRAP)

C'est l'un des mécanismes antioxydants de mesure de la puissance des substances à réduire le fer ferrique Fe^{3+} présent dans le complexe $K_3Fe(CN_6)$ en fer ferreux Fe^{2+} . La capacité réductrice d'un composé peut servir comme un indicateur significatif de son activité antioxydante potentielle [23].

La figure ci-dessous montre la réduction de l'ion ferrique en ion ferreux à diverses concentrations de l'EGCg. Une augmentation de la densité de couleur bleu dans le milieu réactionnel a été constatée.

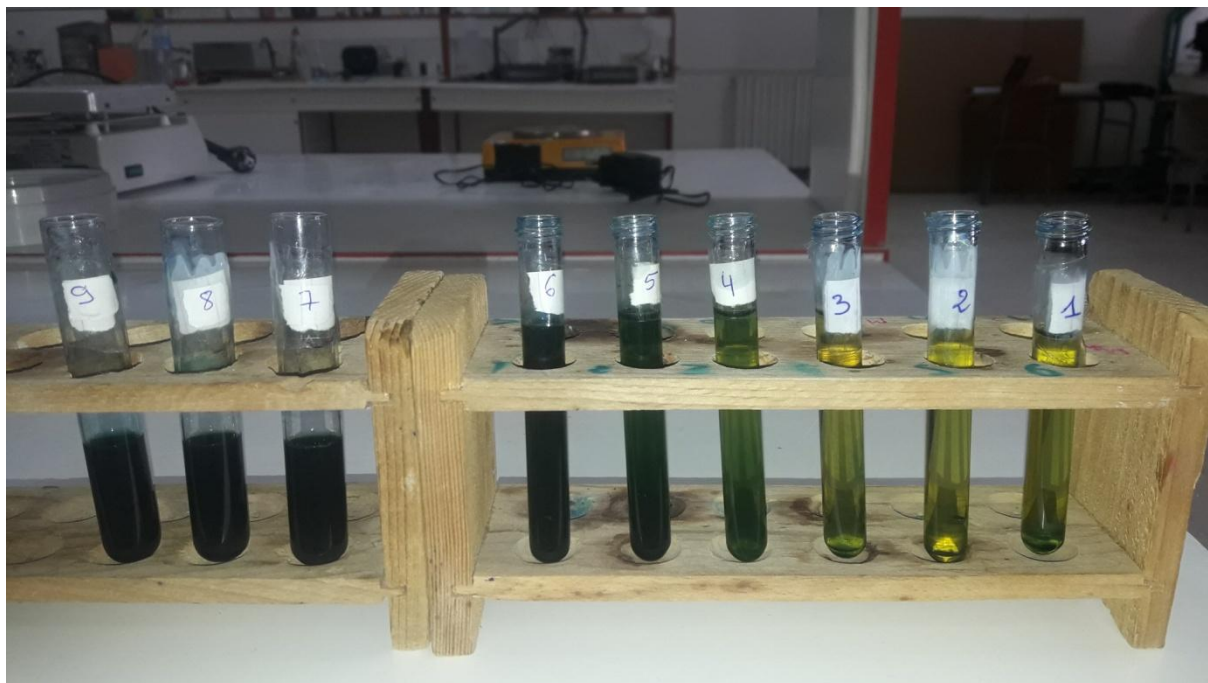


Figure IV-15 : Résultat du test FRAP de l'EGCg à différentes concentrations

Les échantillons obtenus ont été analysés par spectrophotomètre UV-visible à 700 nm. [23]. Les valeurs moyennes ont été calculées à partir de trois mesures de l'absorbance pour chaque échantillon afin de s'assurer de la reproductibilité.

L'évaluation de l'activité antioxydante de l'EGCg est comparée par rapport à l'épicatéchine, à l'acide ascorbique et au resvératrol, qui ont été utilisés comme références pour leur grande activité antioxydante.

Les résultats obtenus nous a permis de tracer les courbes représentant la variation du pouvoir réducteur exprimée en absorbance en fonction de la concentration (**Fig. IV-16**).

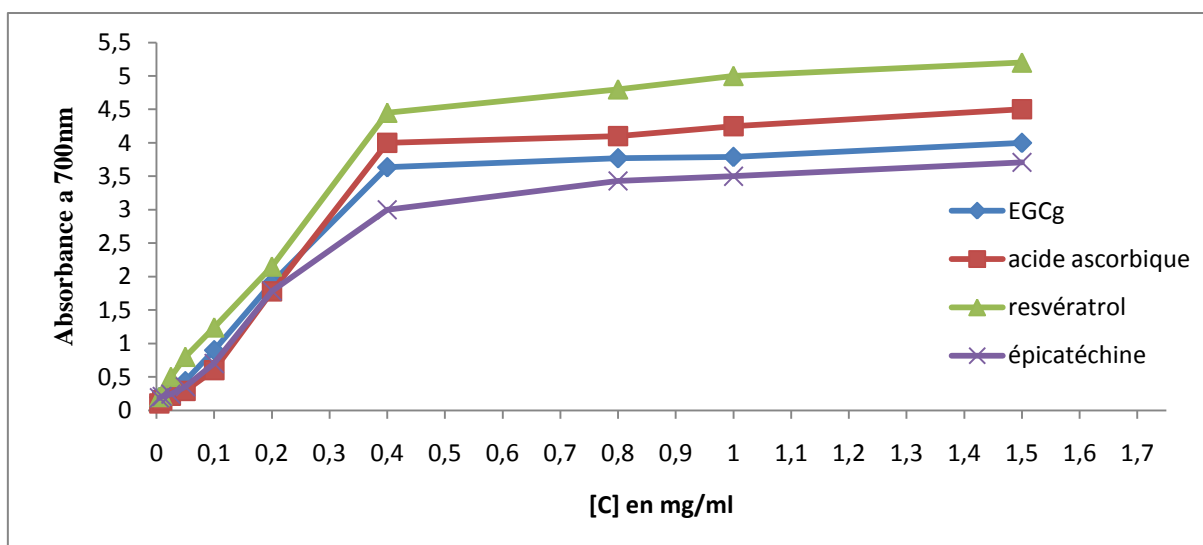


Figure IV-16 : Pouvoir réducteur de l'EGCg, l'épicatéchine, l'acide ascorbique et resvératrol.

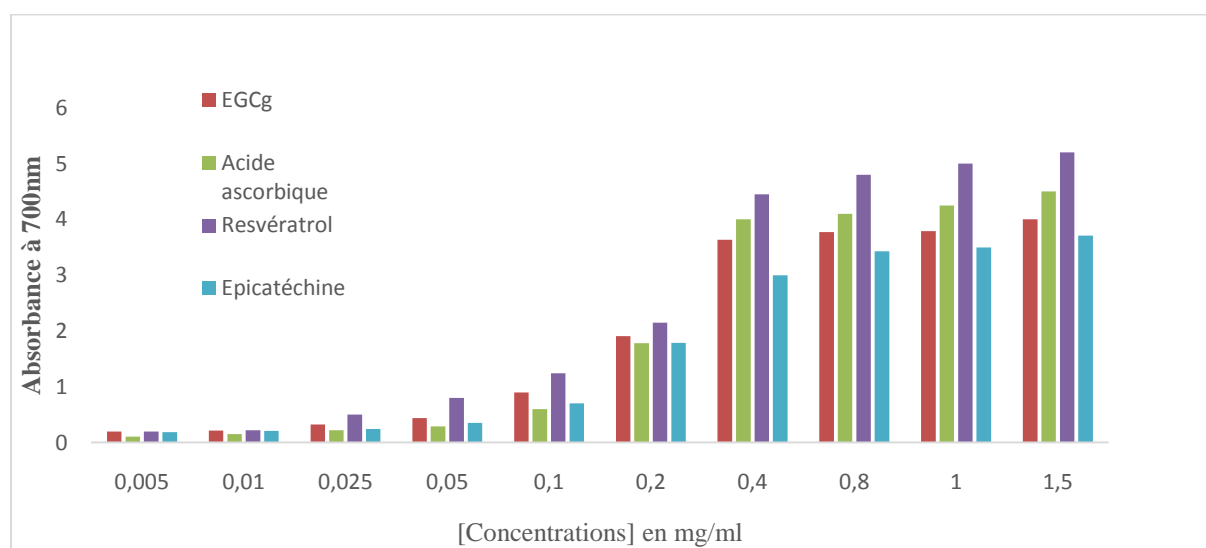


Figure IV-17 : Histogramme du pouvoir réducteur de l'EGCg, l'épicatéchine, l'acide ascorbique et le resvératrol

L'augmentation de l'absorbance dans le milieu réactionnel signifie l'augmentation de la réduction du fer [20], qui est proportionnelle à l'augmentation de la concentration des échantillons utilisés (Fig. (IV-16) et (IV-17)).

Au regard de ces résultats, on constate que l'EGCg présente une activité antioxydante supérieure à celle de l'épicatéchine, ce qui est conforme avec la littérature [24].

Pour les concentrations de 0,005 à 0,2 mg/ml, le pouvoir réducteur de la molécule étudiée est également supérieur à celui de l'acide ascorbique ; au-delà de ces concentrations, la capacité réductrice de l'EGCg est très importante mais inférieure à celle de l'acide ascorbique.

La capacité réductrice de l'EGCg (DO = 4,000) est comparable à celle de l'épicatéchine (DO =3,708), de l'acide ascorbique (DO =4,501) et du resvératrol (DO =5,200) et ceci pour la concentration la plus élevée des échantillons (1,5 mg/ml).

Ces résultats montrent que l'EGCg présente un pouvoir très intéressant de réduire l'ion Fe^{+3} surtout à des concentrations très faibles. Le pouvoir réducteur de l'EGCg est probablement dû à la présence de groupement hydroxyle qui peut servir comme donneur d'électron. Par conséquent, les antioxydants sont considérés comme des réducteurs des oxydants [25].

IV-4-2- Piégeage du radical DPPH·

Le DPPH (2,2 diphényl-1-picrylhydrazyl) est généralement le substrat le plus utilisé pour l'évaluation rapide et directe de l'activité antioxydante en raison de sa stabilité en forme radicale libre et la simplicité de l'analyse [26].

La méthode du DPPH· est basée sur la réduction d'une solution méthanolique de DPPH· en présence d'un antioxydant qui donne un proton.

La réduction du radical DPPH· s'accompagne par son passage de la couleur violette caractéristique de la solution de DPPH· à la couleur jaune (le diphényl-picrylhydrazine) [27] (**Fig. IV-5**). L'intensité de la coloration est inversement proportionnelle à l'activité anti-radicalaire des échantillons étudiés ; la capacité de réduction est alors déterminée par une diminution de l'absorbance induite par ces échantillons.



Figure IV-18 : Résultats du test du DPPH à différentes concentrations.

Le pourcentage d'inhibition du radical qui permet d'évaluer l'activité antioxydante, a été calculé à partir des valeurs obtenues par spectrophotomètre UV-visible à 517 nm [27].

Les résultats obtenus lors du test de la mesure du pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH pour l'EGCg, l'épicatéchine, l'acide ascorbique et le resvératrol, sont représentés sur les figures (IV-19 et IV-20). Le pourcentage d'inhibition du radical libre est proportionnel à la concentration.

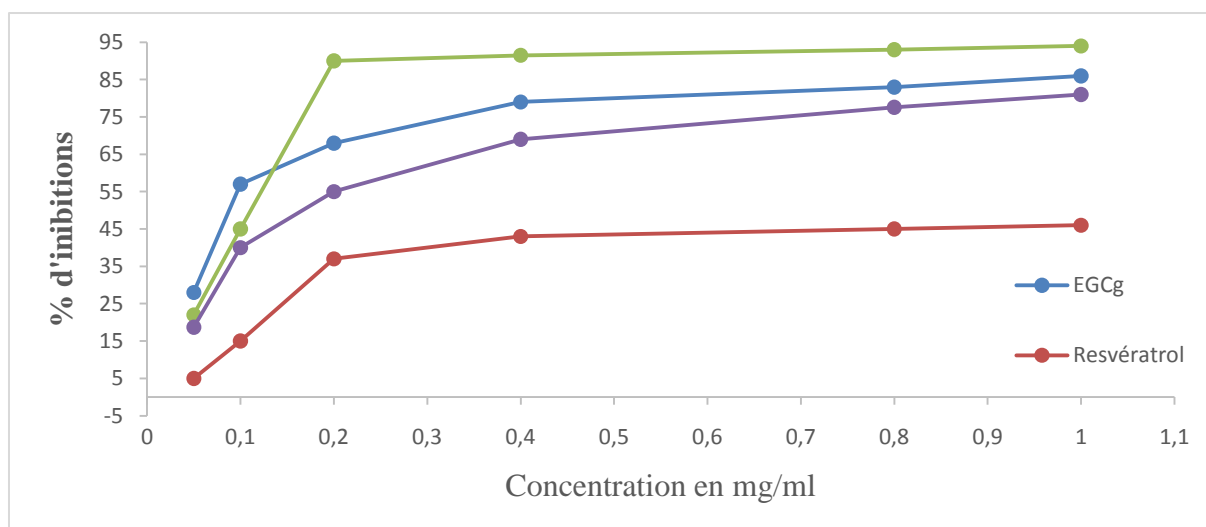


Figure IV-19 : Pourcentage d’inhibition du DPPH° en fonction des différentes oncentrations de l’EGCg, de l’acide ascorbique et de resvératrol.

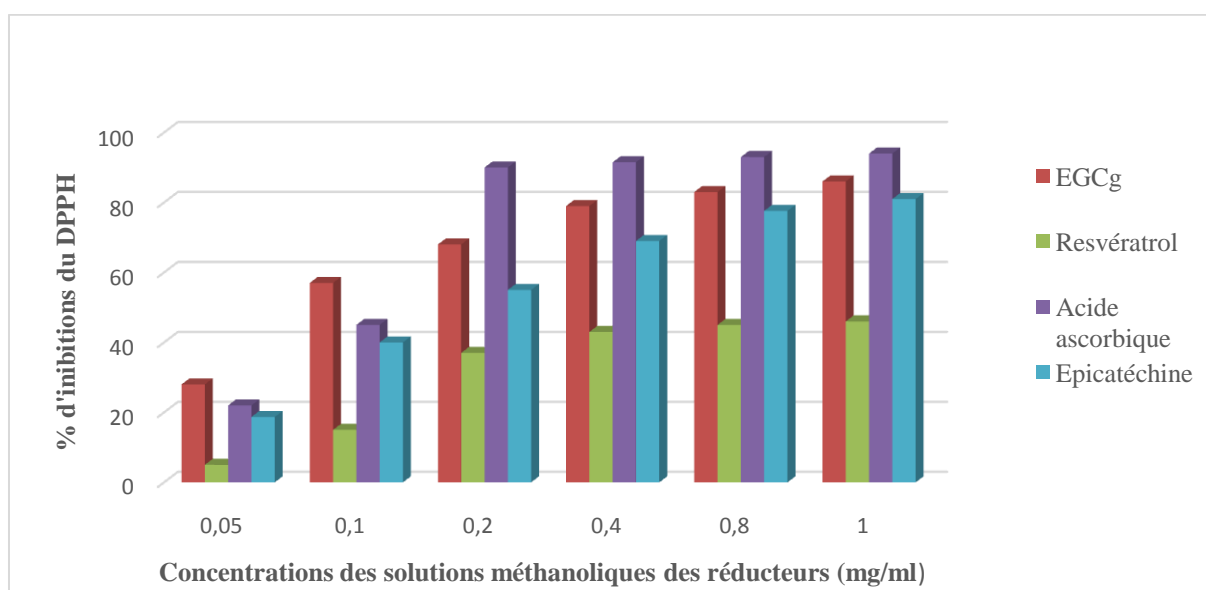


Figure IV-20 : Histogramme du pourcentage d’inhibition du DPPH° en fonction des différentes concentrations de l’acide ascorbique, de l’EGCg et de resvératrol.

D’après les figures (IV-19 et IV-20), le pourcentage d’inhibition du radical libre pour l’EGCg qui varie entre 28 % et 86 % dans une gamme de concentration de 0,05 à 0,1 mg/ml, était inférieur à celui de l’acide ascorbique mais il était supérieur à celui de resvératrol pour les concentrations de 0,2 à 1 mg/ml. En revanche, pour les faibles concentrations (0,05 et 0,1

mg/ml), l'activité de l'EGCg est plus importante sur la réduction du DPPH par rapport à celles des références.

En outre, on constate que l'épicatéchine, caractérisée par la présence du groupe 3-OH [2], est considérée également comme un antioxydant fort, possède un pourcentage d'inhibition inférieur à celui de l'EGCg et surtout pour les faibles concentrations parce que les dérivés galloylés de catéchines sont des piègeurs plus puissants que les non-galloylés.

Ces résultats montrent que l'EGCg ainsi que les molécules de références possèdent une puissante activité à céder le proton pour neutraliser le radical DPPH ; et elles ont un très bon pouvoir antioxydant, ce qui est conforme avec la littérature [27].

IV-4-2-1- Détermination d'IC50

La capacité antioxydante a été déterminée à partir de l'IC50, c'est la concentration nécessaire pour réduire 50 % du radical DPPH [29].

L'IC50 de chaque échantillon a été déterminée graphiquement à partir de l'équation de régression linéaire correspondante, elle est inversement proportionnelle avec l'activité antioxydante des échantillons testés [29].

Les valeurs sont récapitulées dans le tableau (IV-6) et illustrées par la figure (IV-21).

Tableau IV-6 : Valeurs des IC50 de l'EGCg, l'acide ascorbique et le resvératrol.

Echantillon	IC50 (mg/ml)
EGCg	0,047
Acide ascorbique	0,026
Resvératrol	0,939
Epicatéchine	0,289

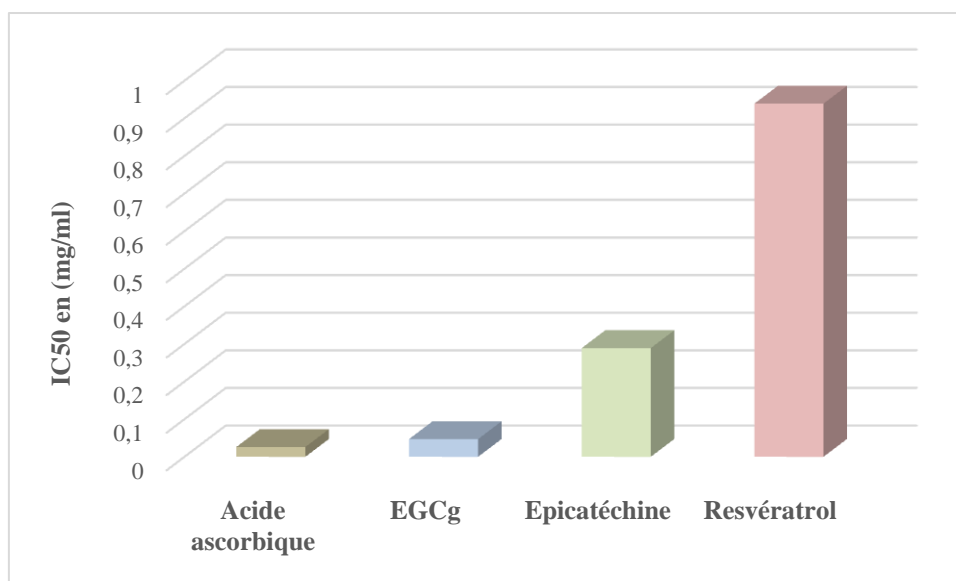


Figure IV-21 : Histogramme de la concentration inhibitrice IC50 des composés testés

A travers la littérature il a été montré que les molécules antioxydantes telles que, l'acide ascorbique, les phénols et les flavonoïdes réduisent et décolorent le DPPH en raison de leur capacité à céder l'hydrogène [30]. En outre les flavonoïdes et en particulier l'épigallocatechine gallate (EGCg) sont des contributeurs majeurs à la propriété antioxydante du thé.

Selon les résultats présentés ci-dessus et avec une IC50 de 0,047 mg/ml ; l'EGCg a montré une activité de piégeage du DPPH très importante que celles obtenues par l'épicatéchine (0,289 mg/ml) et le résveratrol (0,939 mg/ml) mais un peu inférieure à celle de l'acide ascorbique (0,026 mg/ml).

IV-5- Mise en évidence de l'activité anti radicalaire du thé vert, Oolong et noir (infusion de 3min) par le test DPPH.

L'activité de piégeage des radicaux libres des thés a été étudiée à l'aide du test de décoloration du produit stable 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle connu sous le nom de DPPH.

La figure ci-dessous représente la variation du pourcentage d'inhibition (%) de DPPH en fonction des concentrations des échantillons étudiés.

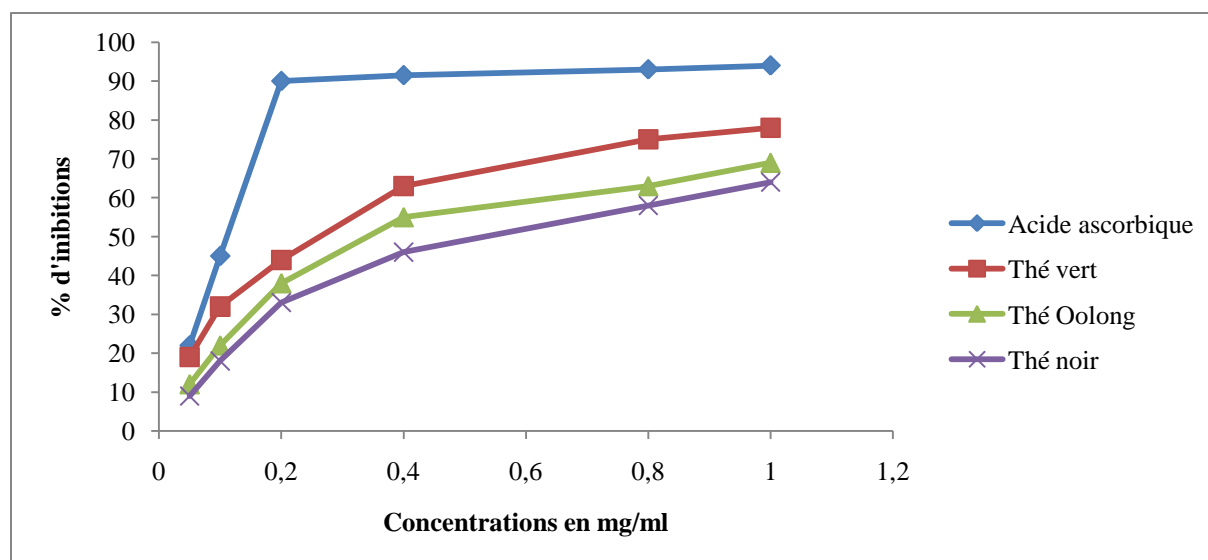


Figure IV-22 : Pourcentage d'inhibition du DPPH' en fonction des différentes concentrations de thé vert, Oolong, et de l'acide ascorbique.

Le pourcentage d'inhibition du radical libre est toujours proportionnel à la concentration, soit pour le composé standard ou pour les extraits de thé. On a remarqué également que le pourcentage d'inhibition du radical libre pour les infusions de thé, était inférieur à celui du standard pour toutes les concentrations utilisées. Pour une concentration de 0,8 mg/ml, l'acide ascorbique a donné un pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH de 93 %, tandis que les pourcentages d'inhibition obtenus pour les thés vert, oolong et noir sont respectivement de 75 %, 63 % et 58 %. Ceci est probablement dû à la pureté du composé standard et sa forte polarité.

En plus, l'activité anti radicalaire des extraits dépend du type de thé. Le thé non fermenté présente une activité anti radicalaire supérieure aux thés semi fermenté (Oolong) et fermenté (noir).

Nos résultats suggèrent qu'il y a une certaine corrélation entre la teneur en EGCg déterminée par HPLC et l'activité anti-radicalaire (décoloration de DPPH) ; les thés, diffèrent considérablement par leur teneur en EGCg et donc par leurs activités anti-radicalaires mise en évidence ce qui est conforme avec la littérature [35].

IV-6- Conclusion

Cette étude est menée sur le thé du marché algérien afin d'identifier et déterminer sa composition en EGCg ; un flavonoïde majoritaire dans le thé, et cela par des analyses en HPLC-UV-DAD et d'évaluer sa capacité antioxydante par deux techniques différentes à savoir : La réduction du fer « FRAP » et par le test du DPPH.

Les résultats obtenus indiquent que la composition en EGCg est affectée par le temps de l'infusion et par le processus de fermentation. Ce dernier réduit la teneur en ce composé dans les thés Oolong et noir. En plus, les résultats de mesure de pH montrent que l'acidité des échantillons testés augmente avec le degré de fermentation.

L'étude de l'activité anti-oxydante de l'EGCg par la méthode de réduction de fer, montre que ce composé se comporte en antioxydant capable de diminuer les dommages engendrés par les ions Fe^{+3} . Il est aussi un piègeur de radicaux libres. A la concentration de 1 mg/l, il est capable de piéger 80 % des radicaux DPPH'.

L'étude de l'activité anti radicalaire du thé montre qu'elle dépend du type de thé ; le thé non fermenté présente une activité anti radicalaire supérieure à celles des thés semi fermenté (Oolong) et fermenté (noir).

Conclusion générale

Conclusion générale

Conclusion générale

Le thé, deuxième boisson mondiale, est réputé depuis longtemps en Asie pour ses propriétés médicinales. Celles-ci furent découvertes plus tard dans les autres continents.

La partie de plante (*Camellia Sinensis*) utilisée telle quelle comme boisson ou servant de base en tant que complément alimentaire ou dans des spécialités pharmaceutiques, est la feuille de thé.

Parmi les nombreux composés chimiques de la feuille, on a pu retenir que ceux majoritairement impliqués dans les effets thérapeutiques observés, sont les polyphénols (principalement les catéchines).

Toutefois, les catéchines, et essentiellement l'épigallocatechine gallate (EGCg), sont responsables de la plupart des effets bénéfiques du thé sur notre organisme ; oxydées par la fermentation, leur présence est majoritaire dans le thé vert par rapport aux thés : Oolong et noir.

L'objectif de ce travail était d'une part l'étude cinétique (dosage de l'EGCg dans l'infusé de thé vert, Oolong et noir à des temps variés), la mesure des pH des infusés des thés étudiés et le calcul des rendements de l'extraction par infusion des thés étudiés, et d'autre part l'évaluation de l'activité anti-oxydante de la molécule dosée par deux méthodes à savoir : le pouvoir réducteur du fer (FRAP) et le test DPPH^{*}.

Les méthodes analytiques utilisées étaient : HPLC-DAD et la spectrométrie UV-visible.

L'étude cinétique a montré que le temps est un facteur important pour la diffusion de l'épigallocatechine gallate dans la boisson de thé quel que soit son type. la plus grande concentration est trouvée dans le thé vert avec une valeur de 63.32 mg L⁻¹ pour une infusion dans l'eau pendant une durée de 3 min.

En outre, la fermentation réalisée lors de la fabrication de thé, réduit d'une manière significative les niveaux de l'épigallocatechine gallates dans les thés Oolong et noir.

Les valeurs des pH des infusés qui étaient entre 4,96 et 5,90 ont indiqué d'une part que les infusés des trois types de thé sont des acides faibles et d'autre part; l'acidité augmente avec le degré de fermentation des thés, ainsi le pH du thé vert > pH du thé Oolong > pH du thé noir.

Conclusion générale

Les valeurs des rendements de l'infusion pour les trois types de thé étaient entre 3,5 et 12,2 %, ce résultat paraît logique parce que la solubilité des constituants de thé et parmi lesquels; les polyphénols et les méthylxantines n'est que partielle.

De l'autre côté, l'étude de l'activité anti-oxydante de l'EGCg selon la méthode de réduction de fer montre que ce composé présente un pouvoir très intéressant de réduire l'ion Fe^{+3} surtout à des concentrations très faibles. Egalement le test de piégeage du radical libre DPPH a montré que l'EGCg présente une activité anti radicalaire comparable à celles obtenues par les antioxydants de références. Il est réputé comme un agent antioxydant de première classe responsable de la prévention du stress oxydatif provoqué par les radicaux libres et peut être utilisé pour des applications thérapeutiques.

Les résultats de l'étude de l'activité anti radicalaire des infusions de thé préparés pendant 3 minutes indiquent qu'il y a une certaine corrélation entre la teneur en EGCg déterminée par HPLC et l'activité anti-radicalaire (décoloration de DPPH').

Enfin, ce travail qui a mis au clair l'une des boissons les plus populaires avec l'un de ces principes actifs ayant des effets thérapeutiques considérable, peut être suivi par d'autres études ultérieures mettant au point d'autres composés chimiques bénéfiques pour la santé humaine.

Références

REFERENCES

- [1] <https://fr.wikipedia.org/wiki/Thé>.
- [2] <https://www.thevert.com/catechines/>
- [3] **SLIMANI, B.** Analyse par HPLC de la catéchine de différents thés du marché de la ville de Guelma. Université 08 Mai 1945, Guelma. **2016.**
- [4] https://chathe.fr/THE_Origine.html.
- [5] <https://www.lepartiduthe.com/content/29-grandes-origines-du-the>.
- [6] <https://www.terre-des-thes.fr/histoire/>
- [7] <https://www.palaisdesthes.com/fr/comprendre/plantation-de-the/>
- [8] [http:// chathe.fr/THE_Types_1.html](http://chathe.fr/THE_Types_1.html).
- [6] <https://www.lauterthe.com/aubuste-a-tasse-fabrication-the.htm>.
- [9] https://chathe.fr/THE_Composition.html.
- [10] <https://www.thevert.com/bienfaits/>.
- [11] **F. BOUKHDENNA et I. YAHAMDI**, Analyse qualitative de différentes marques de thé de marché local en ses deux principaux constituants : La caféine et la catéchine, mémoire de master, Université 08 Mai1945, Guelma, **2015.**
- [12] **MANALLAH, A**, Activités antioxydante et anticoagulante des polyphénols de la pulpe d'olive olea europaea, mémoire de master. Université Ferhat Abbas, Sétif. **2012.**
- [13] <https://www.futura-sciences.com/sante/definitions/biologie-stress-oxydatif-15156/>
- [14] **KHIMI, S.** Evaluation de l'activité antioxydante des huiles essentiellesde Calamintha officinalis et Abies numidica , mémoire de master. Béjaia. **2015.**
- [15] **AATTI, I.** Evaluation des activités antioxydant et antiradicalaire d'un mélange d'épices « ras el hanout ». Université Kasdi Merbah , Ouargla. **2014.**
- [16] **BENASSOU, N.** Etude de l'activité antioxydante des polyphénols de quelques variétés de dattes, mémoire de master. Guelma. **2013.**
- [17] **MERIDJA, D.** Evaluation des constituants bioactifs et potentiel antioxydant des extraits de quelques plantes medicinales poussant en algerie, mémoire de master. Béjaia. **2014.**
- [18] **AZOUZI, D.** Effet d'un traitement thermique sur les polyphenols du millet et leur pouvoir antioxydant, mémoire de master. Adrar. **2014.**
- [19] https://www.memoireonline.com/03/15/8988/m_Methodes-d-etudes-d-activite-des-antioxydants-des-plantes-medicinales10.html

- [20] **S, GEORGIEVA. L, BOYADZHIEV. G, ANGELOV.** Revue de génie industriel, 5, 124-132. **2010.**
- [21] **CHHA, N.** Dosage par HPLC-UV-DAD des méthylxantines dans le thé vert, Université 08 Mai 1945, Guelma **2018.**
- [22] **JEONG SM, KIM SY, KIM DR, JO SC, NAM KC, AHN DU, LEE SC.** Effects of heat treatment on the antioxidant activity of extracts from citrus peels. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 52 : 3389-3393. **2004.**
- [23] **SIDDHURAJU. P, BECKER. K.** Antioxidant properties of various solvent extracts of total phenolic constituents from three different agroclimatic origins of drumstick tree (*Moringa oleifera* Lam.) leaves. Food Chemistry, 101(1),10-19, **2003.**
- [24] **SIDDHURAJU P, BECKER K..** The antioxidant and free radical scavenging activities of processed cowpea (*Vigna unguiculata* Walp) seed extracts. Food Chemistry, 101(1) : 10-1. **2007.**
- [25] SAADALLAH, Nessrine. (2015) Les polyphénols de l'extrait éthanolique de Thé vert (*Camelliasinensis*): Evaluation de leur pouvoir antioxydant et protecteur vis-à-vis la toxicité cardiaque de la doxorubicine.
- [26] **MECHERNENE, B.** Évaluation de l'activité antioxydante de quelques extraits de la racine de *Bryonia dioica*, Telemcen. **2014.**
- [27] H. Talbi¹, A. Boumaza², K. El-mostafa³, J. Talbi⁴, A. Hilali, Evaluation de l'activité antioxydante et la composition physico-chimique des extraits méthanolique et aqueux de la *Nigella sativa* L. Mater. Environ. Sci. 6 (4) 1111-1117, **2015.**
- [28] **PANOVSK, K.T. KULEVANOVA S. AND STEPOVA, M.** In vitro antioxydant activity of some *Teucrium* species (Lamiaceae). Acta Pharm. 55, 20. P. 7-214. **2005.**
- [29] https://www.researchgate.net/figure/Histogramme-des-DO-des-extraits-etudies-par-FRAP-en-fonction-de-differentes-concentrations_fig4_260364679
- [30] **BOUGANDOURA N, BENDIMERAD N.** Évaluation de l'activité antioxydante des extraits aqueux et méthanolique de *Satureja calamintha* ssp. *Nepeta* (L.) Briq. Revue « Nature & Technologie » B- Sciences Agronomiques et Biologiques, 9 : 14-19. **2013.**
- [31] <http://chimactiv.agroparistech.fr/fr/aliments/antioxydant-dpph/principe>
- [32] **MEDJOUJDA, O.** Méthodes d'études d'activité des antioxydants des plantes médicinales. Université d'Agadir, mémoire de licence **2014.**
- [33] **Oyaizu, M.** Assessment of the Quality and Shelf-Life in Enriched n3 PUFA Raw Beef Patties Using Dry Soybean Sprouts as Antioxidant, Food and Nutrition Sciences, 7, 5 -24. **2014.**

Références

[34]**Sánchez,M.** A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols, Science of Food and Agriculture, 76, 270- 276. **1998.**

[35]**Sanchez,M.**Comparative Analysis of the Antioxidant and Free-Radical Scavenging Activities of Different Water-Soluble Extracts of Green, Black and Oolong Tea Samples,Food and Nutrition Sciences, 5, 22. **2014.**

Annexes

Annexe 1 : Différents appareils utilisés dans ce travail

1. Lyophilisateur

- **Principe de fonctionnement**

La lyophilisation est une méthode de dessiccation sous vide, à basse température, de produits liquides préalablement congelés, par passage à la phase vapeur, sans passer par la phase liquide. Ce changement d'état s'appelle la sublimation.

- **Les étapes du processus de lyophilisation**

- **Congélation**

La première étape consiste à congeler les produits pour que l'eau qu'ils contiennent soit transformée en glace. La température doit rester plus basse que -20 °C tout au long du processus de lyophilisation.

- **Lyophilisation primaire**

Elle doit se dérouler sans décongeler le produit avec une pression partielle inférieure à la tension de vapeur de la glace (conditionnée par la température). Plus cette température sera basse et plus le vide devra être bas.

- **Lyophilisation secondaire**

Destiné à éliminer les dernières traces d'eau retenues par absorption ou pour assurer une quantité d'eau résiduelle la plus faible possible.

La chauffe ne doit pas conduire à la destruction partielle ou totale par dénaturation du produit.

- **Caractéristiques du lyophilisateur Alpha 1-2 LD plus**

- Performance 2 kg de glace par 24 h.
- Piège -55 °C en acier inox 316, volume 2,5 kg de glace.
- Affichage numérique température condenseur et pression.
- Contrôleur de vide et microvanne pour casser le vide.
- Chambre transparente avec 8 embouts pour robinets.
- Kit de tubulure pour raccordement DN16 pour pompe à vide livrée avec 8 flacons.

Pour lyophilisation sur manifold ayant:

- Un volume 75 ml.
- Un col large 49 mm.
- Filtre retenant le lyophilisat, stérilisable à 121 °C .
- Diamètre 60 mm.
- Hauteur 87 mm.

- Poids 130 g.



Figure-1 :Lyophilisateur Alpha 1-2 LD plus

(Laboratoire de Chimie Appliquée, Université de Guelma).

2. (Chromatographie liquide à haute performance couplée à un détecteur à barrette de diodes « HPLC-UV-DAD »)



*Figure-2 : Appareil pour HPLC (Agilent série 1260 Infinity) utilisé pour le dosage de la catéchine
(Laboratoire de Chimie Appliquée, Université de Guelma).*

3- Principe de fonctionnement de l'HPLC

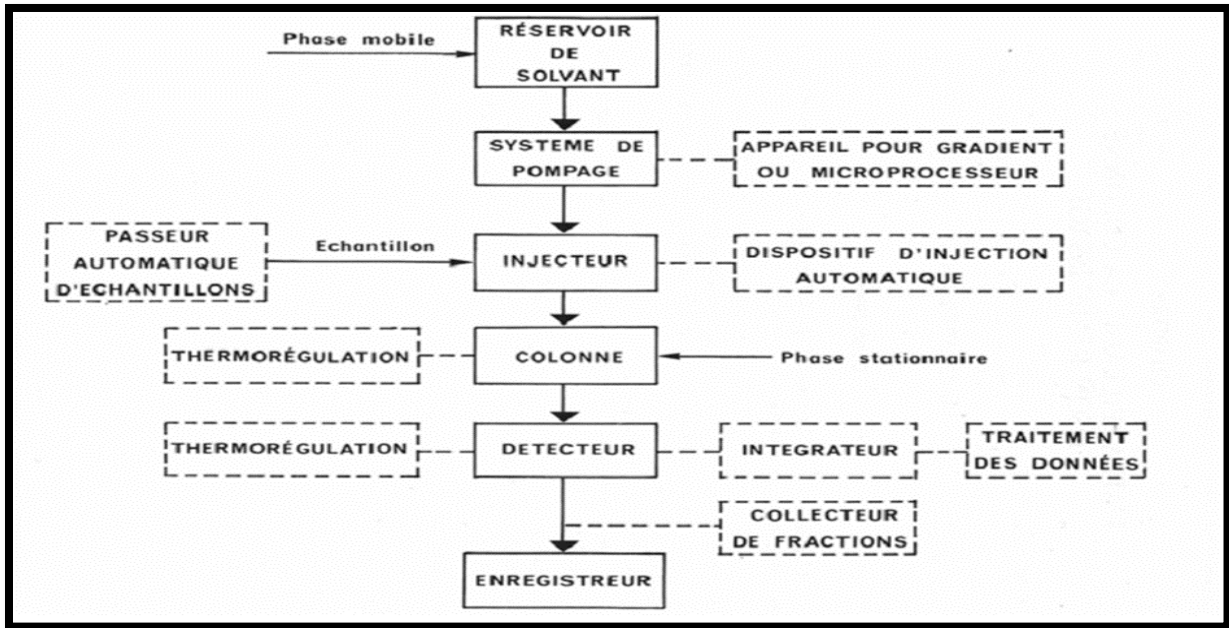


Figure 3 : Schéma descriptif d'une chaîne HPLC

4- Spectrophotomètre UV. Visible

Un spectrophotomètre est un appareil qui permet de mesurer l'absorbance d'une solution à une longueur d'onde donnée ou sur une région donnée du spectre. Selon la loi de Beer-Lambert, l'absorbance d'une solution est proportionnelle à la concentration des substances en solution, à condition de se placer à la longueur d'onde à laquelle la substance absorbe les rayons lumineux.



Figure 4 : Spectrophotomètre UV. Visible (DR6000 HACH).

3. centrifugeuse

Une centrifugeuse est un appareil destiné à imprimer une accélération, grâce à un mouvement de rotation, à un mélange liquide-solide (par exemple, un colloïde). Le plus souvent, le mélange est déposé dans un récipient perforé de multiples orifices, la taille de ceux-ci étant suffisamment grande pour laisser passer le liquide et assez petite pour empêcher le passage du solide. Ce type d'appareil peut aussi servir à séparer les mélanges constitués de parties ayant une densité différente.



Figure-5 : Centrifugeuse (Laboratoire de Chimie Appliquée, Université de Guelma).

Annexe 2: Structures des références (standards) utilisées

- *Le resvératrol*

Le resvératrol est un polyphénol de la classe des stilbènes de formule chimique $C_{14}H_{12}O_3$, aussi appelé 3,5,4'-trihydroxystilbène, est connu pour ses propriétés antioxydantes.

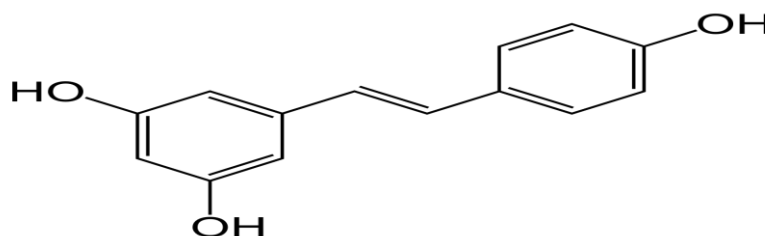


Figure-6 : structure chimique de le resvératrol.

- *L'acide ascorbique*

L'acide ascorbique (vitamine C) : est un acide organique ayant des propriétés antioxydantes. L'acide ascorbique ayant deux atomes de carbone asymétriques et étant sans plan de symétrie, il se présente sous la forme de deux paires d'énantiomères, diastéréoisomères entre elles.

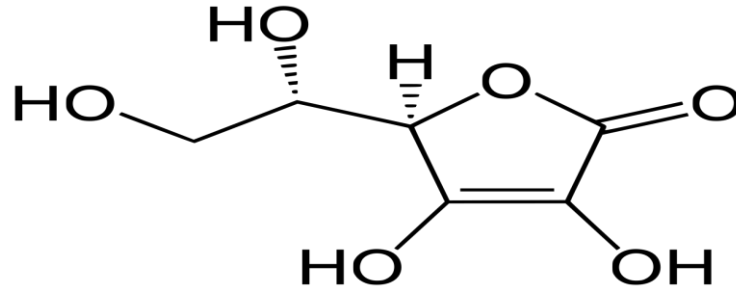


Figure-7 : structure chimique de l'acide ascorbique.

- *Epicatéchine*

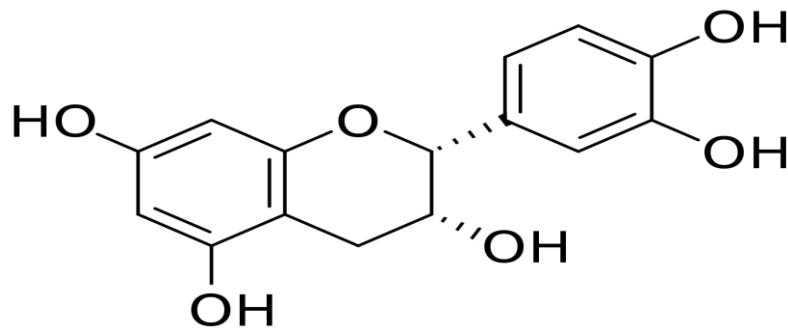


Figure-8 : Structure chimique de l'épicatéchine.