

M/1540.834

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



Université 8 Mai 1945 Guelma
Faculté des Sciences et de la Technologie
Département de Génie des Procédés

Mémoire du Projet de Fin d'Etudes
2^{ème} Année Master

**Analyse par HPLC de l'épigallocatechine gallate et mesure
de l'acidité des boissons de thé vert, rouge et noir du marché
de la ville de Guelma: Etude cinétique.**

**Filière: Génie des procédés
Spécialité: Génie chimique**

**Présenté par :
SLIMANI Basma**



**Sous la direction de :
M^{me} BOULMOKH Yamina**

Juin 2016

Résumé

16/3291

Ce travail porte essentiellement sur: une étude cinétique (dosage de l'EGCg dans l'infusé de thé vert, rouge et noir à des temps et températures variés), la mesure des pH des infusés des thés étudiés à 25°C et le calcul des rendements de l'extraction par infusion des thés vert, rouge et noir vendus au marché de la ville de Guelma.

L'étude cinétique a montré que le temps et la température sont des facteurs importants 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 27,96 mg L⁻¹ pour une infusion dans l'eau à température de 85°C pendant une durée de 7 min.

Les valeurs des pH des infusés qui étaient entre 5,08 et 5,90 ont indiqué que l'acidité augmente avec le degré de fermentation des thés, ainsi pH du thé vert > pH du thé rouge > pH du thé noir.

L'augmentation de la température d'infusion entraîne une diminution de l'acidité des boissons du fait de la dégradation des acides phénols à des températures élevées.

Les valeurs des rendements de l'infusion pour les trois types de thé étaient entre 2,8 et 11,2%, ce résultat paraît logique parce que la solubilité des constituants de thé et parmi lesquels; les polyphénols et les méthylxantines n'est que partielle.

Mots clés: Thé vert, thé rouge, thé noir, dosage, EGCg, pH, infusion et HPLC.

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail avec amour à mes très chères parents et

Ma très chère tante Rabia.

Ma mère, qui a sacrifié pour ma réussite, par son amour, son soutien, tous ses précieux conseils, pour toute son assistance et sa présence dans ma vie,

Qu'elle reçoit à travers ce mémoire, l'expression de mes sentiments et de mon

éternel gratitude.

Ma tante pour tout le temps qu'elle m'a donné et le bonheur qu'elle m'a offert qu'elle trouve ici toutes mes reconnaissances.

Mon père, qui a été toujours fier et qui va trouver ici le résultat de longues années de sacrifices et de privations pour m'aider à avancer dans la vie.

Merci pour les valeurs nobles, l'éducation et le soutien permanent venus de vous.

A mes gentils Frères chacun à son nom. Zinou, Fouzi et Ahmed Yacine.

A mes très chères sœurs : Nadjette, Khaoula, Lamis.

Que Naima et Souad trouvent ici tout l'amour et le respect.

A mon très chère ami. Amine.

A tous mes amies, Fouzia, Roukia, Loula, Nour, Asma, Zahra, Selma, Wided, Samira, et Manel.

A toute personne qui me connaît et qui a participé de près ou de loin à la réalisation de ce mémoire.

Basma

Sommaire

Sommaire

| <i>Titre</i> | <i>page</i> |
|--|-------------|
| <i>Introduction générale</i> | <i>1</i> |
| <i>Chapitre I : Généralités sur le thé</i> | |
| <i>I-1- Introduction</i> | <i>3</i> |
| <i>I-2- Botanique</i> | <i>3</i> |
| <i>I-3- Pays producteurs du thé</i> | <i>4</i> |
| <i>I-4- De l'Asie au reste du monde</i> | <i>4</i> |
| <i>I-5- Histoire et origine du thé</i> | <i>5</i> |
| <i>I-5-1- Thés de chine</i> | <i>5</i> |
| <i>I-5-2- Thés du Japon</i> | <i>5</i> |
| <i>I-5-3- Thés d'Inde</i> | <i>5</i> |
| <i>I-5-4- Thés du Sri lanka</i> | <i>6</i> |
| <i>I-5-5- Thés de Taiwan</i> | <i>6</i> |
| <i>I-5-6- Thés du Népal</i> | <i>6</i> |
| <i>I-5-7- Thés d'Afrique</i> | <i>6</i> |
| <i>I-5-8- Thés d'Asie du Sud-Est</i> | <i>7</i> |
| <i>I-5-9- Thé du Caucase</i> | <i>7</i> |
| <i>I-5-10- Thé d'Amérique du sud</i> | <i>7</i> |
| <i>I-6- Plantations du thé</i> | <i>7</i> |
| <i>I-7- Les types de thé</i> | <i>8</i> |
| <i>I-7-1- Le thé blanc</i> | <i>8</i> |
| <i>I-7-2- Le thé vert</i> | <i>9</i> |
| <i>I-7-3- Le thé rouge</i> | <i>9</i> |

| | |
|--|-----------|
| <i>I-7-4- Le thé noir</i> | <i>10</i> |
| <i>I-8- Les procédés de fabrication des thés vert, rouge et noir</i> | <i>10</i> |
| <i>I-8-1- La Fabrication du thé vert</i> | <i>10</i> |
| <i>I-8-1-1- Le Flétrissage</i> | <i>10</i> |
| <i>I-8-1-2- Le Roulage</i> | <i>11</i> |
| <i>I-8-1-3- La Dessiccation</i> | <i>12</i> |
| <i>I-8-1-4- Criblage /tri</i> | <i>12</i> |
| <i>I-8-2- La Fabrication du thé rouge</i> | <i>12</i> |
| <i>I-8-3- La Fabrication du thé noir</i> | <i>12</i> |
| <i>I-8-3-1- Procédé Orthodoxe</i> | <i>13</i> |
| <i>I-8-3-1-1- Le flétrissage</i> | <i>13</i> |
| <i>I-8-3-1-2- Le roulage</i> | <i>13</i> |
| <i>I-8-3-1-3- La fermentation</i> | <i>14</i> |
| <i>I-8-3-1-4- La dessiccation</i> | <i>15</i> |
| <i>I-8-3-1-5- Le tamisage et l'emballage</i> | <i>15</i> |
| <i>I-8-3-2- Le procédé CTC ou « crushing-tearing-curling »</i> | <i>16</i> |
| <i>I-9- Compositions chimiques des feuilles de thé</i> | <i>18</i> |
| <i>I-9-1- Les polyphénols</i> | <i>18</i> |
| <i>I-9-2- Les glucides</i> | <i>19</i> |
| <i>I-9-3- Les acides aminés</i> | <i>19</i> |
| <i>I-9-4- Les enzymes</i> | <i>19</i> |
| <i>I-9-5- Les Alcaloïdes</i> | <i>19</i> |
| <i>I-9-6- Les Minéraux</i> | <i>19</i> |
| <i>I-9-7- Les Pigments</i> | <i>20</i> |

| | |
|---|----|
| <i>I-10- Les effets thérapeutiques du thé</i> | 20 |
| <i>I-10-1- Le thé vert</i> | 20 |
| <i>I-10-2- Le thé noir</i> | 21 |
| <i>I-11- Les effets indésirables du thé</i> | 21 |
| <i>I-12- Les Catéchines</i> | 22 |
| <i>I-12-1- Définition de la catéchine</i> | 22 |
| <i>I-12-2- Principales catéchines dans le thé</i> | 22 |
| <i>Chapitre II: La chromatographie liquide haute performance</i> | |
| <i>II-1- La théorie de la chromatographie en phase liquide</i> | 25 |
| <i>II-1-1- Définition</i> | 25 |
| <i>II-1-2- Principe</i> | 25 |
| <i>II-1-3- Les différents modes de séparation</i> | 25 |
| <i>II-1-3-1- La chromatographie d'adsorption</i> | 26 |
| <i>II-1-3-2- La chromatographie de partage</i> | 26 |
| <i>II-1-4- Polarité et chromatographie</i> | 26 |
| <i>II-1-4-1- Polarité d'une molécule</i> | 26 |
| <i>II-1-4-2- Interactions entre molécules</i> | 26 |
| <i>II-1-4-3- Notion de polarisabilité</i> | 27 |
| <i>II-1-4-4- Application à la chromatographie</i> | 27 |
| <i>II-1-5- Notions fondamentales</i> | 28 |
| <i>II-1-5-1- Phases Mobile et stationnaire</i> | 28 |
| <i>II-1-5-2- Notion de temps</i> | 28 |
| <i>II-1-5-3- Notion de concentration</i> | 29 |
| <i>II-1-5-4- Notion d'efficacité</i> | 30 |

| | |
|--|-----------|
| <i>II-1-5-5- Qualité de la séparation</i> | <i>31</i> |
| <i>II-2- Appareillage</i> | <i>32</i> |
| <i>II-2-1- Réservoir de la phase mobile (solvant)</i> | <i>33</i> |
| <i>II-2-2- Pompe</i> | <i>33</i> |
| <i>II-2-3- Injecteur</i> | <i>33</i> |
| <i>II-2-4- Colonne</i> | <i>34</i> |
| <i>II-2-5- Détecteurs</i> | <i>35</i> |
| <i>II-2-6- Intégrateur</i> | <i>35</i> |
| <i>Chapitre III: Modes opératoires et méthodes de calcul et d'analyse</i> | |
| <i>III-1- Introduction</i> | <i>37</i> |
| <i>III-2- Matériels</i> | <i>37</i> |
| <i>III-3- Solvants et réactifs</i> | <i>37</i> |
| <i>III-4- Lyophilisateur</i> | <i>37</i> |
| <i>III-5- La méthode d'analyse (chromatographie liquide à haute performance couplée à un détecteur à barrette de diodes « HPLC-UV-DAD »)</i> | <i>39</i> |
| <i>III-6- Données sur la catéchine</i> | <i>40</i> |
| <i>III-7- Echantillons de thés</i> | <i>41</i> |
| <i>III-8- Méthode de préparation et injection du standard</i> | <i>41</i> |
| <i>III-9- Méthode de préparation et injection des échantillons de thé</i> | <i>42</i> |
| <i>III-10- Mesure du pH des solutions de thé</i> | <i>42</i> |
| <i>III-11- Calcul des rendements</i> | <i>42</i> |
| <i>III-12- Dosage par HPLC-UV-DAD de la catéchine dans les échantillons de thé</i> | <i>42</i> |
| <i>III-12-1- Conditions de l'analyse</i> | <i>42</i> |
| <i>III-12-2- Phase mobile</i> | <i>43</i> |

| | |
|-------------------------------|-----------|
| <i>IV-3-3- Les rendements</i> | <i>60</i> |
| <i>Conclusion générale</i> | <i>61</i> |

Listes des tableaux et des figures

Liste des tableaux

| <i>Numéro de tableau</i> | <i>Titre des tableaux</i> | <i>Page</i> |
|--------------------------|---|-------------|
| Chapitre I | | |
| <i>Tableau I-1</i> | <i>Principales catéchines du thé et leurs substitutions relatives.</i> | <i>23</i> |
| Chapitre II | | |
| <i>Tableau II-1</i> | <i>Solvants utilisés en HPLC avec degré de polarité approximatif (0 à 10).</i> | <i>33</i> |
| Chapitre III | | |
| <i>Tableau III-1</i> | <i>Quelques caractéristiques de la catéchine étudié(EGCg).</i> | <i>40</i> |
| <i>Tableau III-2</i> | <i>Caractéristiques organoleptiques des échantillons de thé.</i> | <i>41</i> |
| <i>Tableau III-3</i> | <i>Gradient HPLC pour l'analyse de la catéchine.</i> | <i>43</i> |
| Chapitre IV | | |
| <i>Tableau IV-1</i> | <i>Données HPLC de la catéchine.</i> | <i>48</i> |
| <i>Tableau IV-2</i> | <i>Concentrations de la catéchine en mg L⁻¹ dans les échantillons de thé: vert, rouge et noir préparés par infusion pendant 3 min.</i> | <i>53</i> |
| <i>Tableau IV-3</i> | <i>Concentrations de la catéchine en mg L⁻¹ dans les échantillons de thé: vert, rouge et noir préparés par infusion pendant 5 min.</i> | <i>53</i> |
| <i>Tableau IV-4</i> | <i>Concentrations de la catéchine en mg L⁻¹ dans les échantillons de thé: vert, rouge et noir préparés par infusion pendant 7 min.</i> | <i>54</i> |
| <i>Tableau IV-5</i> | <i>pH des échantillons des thé: vert, rouge et noir.</i> | <i>54</i> |
| <i>Tableau IV-6</i> | <i>Les rendements en pourcentage massique (%) de l'infusion des différents échantillons de thé.</i> | <i>54</i> |

Liste des figures

| <i>Numéro de figure</i> | <i>Titre de figure</i> | <i>Page</i> |
|-------------------------|---|-------------|
| Chapitre I | | |
| Figure I-1 | <i>Fleur du théier (Inde).</i> | 3 |
| Figure I-2 | <i>Thé séché au soleil.</i> | 8 |
| Figure I-3 | <i>Le thé blanc.</i> | 9 |
| Figure I-4 | <i>Le thé vert.</i> | 9 |
| Figure I-5 | <i>Le thé rouge.</i> | 10 |
| Figure I-6 | <i>Le flétrissage du thé vert.</i> | 11 |
| Figure I-7 | <i>Le roulage de thé vert.</i> | 11 |
| Figure I-8 | <i>Criblage/tri du thé vert.</i> | 12 |
| Figure I-9 | <i>Le flétrissoir.</i> | 13 |
| Figure I-10 | <i>Le roulage.</i> | 14 |
| Figure I-11 | <i>La dessiccation.</i> | 15 |
| Figure I-12 | <i>Différents tamiseur.</i> | 16 |
| Figure I-13 | <i>La fabrication du thé selon le procédé CTC.</i> | 17 |
| Figure I-14 | <i>Procédés de fabrication des thé vert, rouge et noir.</i> | 17 |
| Figure I-15 | <i>Structure de base des catéchines.</i> | 23 |
| Figure I-16 | <i>Structures des principaux catéchines de thé: (A)EC, (B)ECg, (C)EGC, (D)EGCg.</i> | 24 |
| Chapitre II | | |
| Figure II-1 | <i>La phase stationnaire et la phase mobile.</i> | 28 |
| Figure II-2 | <i>La valeur de détection en fonction du temps avec un seul pic.</i> | 28 |
| Figure II-3 | <i>Types de temps pour un pic chromatographique.</i> | 29 |
| Figure II-4 | <i>La valeur de détection en fonction du temps avec deux pics.</i> | 31 |
| Figure II-5 | <i>Composition d'une chaîne HPLC.</i> | 32 |
| Figure II-6 | <i>Quelques types de colonnes pour HPLC.</i> | 34 |
| Chapitre III | | |

| | | |
|---------------------|---|-----------|
| Figure III-1 | <i>Lyophilisateur Alpha 1-2 LD plus (Laboratoire de Chimie Appliquée, Université de Guelma).</i> | 39 |
| Figure III-2 | <i>Appareil pour HPLC (Agilent 1260 Infinity) utilisé pour le dosage de la catéchine (Laboratoire de Chimie Appliquée, Université de Guelma).</i> | 40 |
| Figure III-3 | <i>Structure de la catéchine (EGCg).</i> | 40 |
| Figure III-4 | <i>Echantillons des thés étudiés.</i> | 41 |
| Chapitre IV | | |
| Figure IV-1 | <i>Chromatogramme en 2D et 3D de la catéchine; $t_R=0,257\text{min}$, $\lambda_{\text{max}}=280\text{nm}$.</i> | 47 |
| Figure IV-2 | <i>Courbe d'étalonnage de la catéchine.</i> | 48 |
| Figure IV-3 | <i>Chromatogrammes HPLC : A) Thé vert, B) thé rouge, C) thé noir (75°C et 3 min).</i> | 50 |
| Figure IV-4 | <i>Chromatogrammes HPLC : A) Thé vert, B) thé rouge, C) thé noir (80°C et 5 min).</i> | 51 |
| Figure IV-5 | <i>Chromatogrammes HPLC : A) Thé vert, B) thé rouge, C) thé noir (85°C et 7 min).</i> | 52 |
| Figure IV-6 | <i>Variation des concentrations de la catéchine dans les échantillons de thé vert, rouge et noir à différents temps et à 80°C.</i> | 56 |
| Figure IV-7 | <i>Variation des concentrations de la catéchine dans les échantillons de thé vert, rouge et noir en fonction de température d'infusion, au temps 7 min.</i> | 57 |
| Figure IV-8 | <i>Variation des concentrations de la catéchine dans les échantillons de thé vert, rouge et noir en fonction des temps d'infusion à 75°C.</i> | 58 |
| Figure IV-9 | <i>Variation des pH en fonction du type de thé à la température d'infusion 85°C.</i> | 59 |
| Figure IV-10 | <i>Variation du pH des échantillons du thé vert en fonction du temps et de températures.</i> | 59 |
| Figure IV-11 | <i>Rendement des différents types de thé à différentes températures et différents temps.</i> | 60 |

Introduction générale

Introduction générale

Introduction générale

Les infusions ou liqueurs de thé qui sont préparées à partir des feuilles du théier ou *Camelia Sinensis*, sont la seconde boisson la plus consommée dans le 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 rouges 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. Pour le thé rouge, 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.

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.

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, rouge 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, rouge et noir à différents temps et différentes températures.
- Calcul des rendements de l'infusion du thé dans l'eau.

Le travail expérimental qui a été réalisé 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 a été élucidé 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 la chromatographie liquide à haute performance (HPLC).
- Dans le troisième chapitre, sera présentée la partie expérimentale qui comprend essentiellement: le matériel et les réactifs, les paramètres de validation de la méthode d'analyse utilisée et la méthode de calcul des concentrations de la catéchine dans les boissons de thé.
- L'interprétation des résultats obtenus sera détaillée dans le quatrième chapitre.
- Enfin, une conclusion générale achèvera ce travail.

Chapitre I

Généralités sur le thé

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. [1]

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 ras 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. [2]



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.[2]

- **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 20cm. L'Assamica et ses hybrides sont plus adaptés aux plaines et aux régions de mousson.[2]

- **Le Camellia Sinensis var. Cambodiensis**

De taille intermédiaire entre le Sinensis et l'Assamica il sert surtout à l'hybridation.[2]

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.[3]

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. [3]

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 importante, 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. [3]

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. [3]

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, Jiangsu et Sichuan. [3]

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. [3]

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. [3]

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'un Ceylan pour désigner un thé de ce pays. C'est le quatrième producteur mondial et est le surnommé l'île du thé. [3]

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. [3]

I-5-6- Thés du Népal

Les thés du Népal sont parmi les meilleurs thés au monde. Principalement cultivés dans la plaine du Teraï proche de l'Himalaya, ils sont d'une délicatesse et d'une richesse aromatique hors du commun. [3]

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. [3]

- **Le Kenya:** est aujourd'hui le troisième producteur mondial, avec environ 8% de la production. [3]
- **Ile de Maurice:** produit différents thés dont le plus célèbre est apprécié pour son goût vanillé. [3]
- **Rwanda:** La production du Rwanda est tout à fait mineure, rapportée à l'échelle mondiale, mais la qualité des thés produits est très intéressante. [3]

I-5-8- Thés d'Asie du Sud-Est

- **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. [3]
- **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. [3]
- **Malaisie:** Petit producteur, la Malaisie donne des thés noirs peu corsés. [3]
- **Sikkim:** Ce petit état himalayen produit un thé fin et aromatique, très voisin des meilleurs Darjeeling, dont il est géographiquement proche. [3]
- **Bangladesh:** Proche de l'Assam, le thé du Bangladesh coloré et aromatique, pousse au nord du pays, à la frontière indienne. [3]

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. [3]

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. [3]

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'arbrière, 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. [4]

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.[5]



Figure I-2: Thé séché au soleil.[5]

Bien que tous les thés proviennent à l'origine du même type de plante (le *Camelia Sinensis*); et que techniquement on puisse faire du thé vert, rouge ou noir avec n'importe quelle récolte, le choix de cultivar, le terroir, le climat, 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. [6]



Figure I-3: Le thé blanc. [6]

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. [6]

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. [5]



Figure I-4: Le thé vert. [7]

I-7-3- Le thé rouge

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. [8]



Figure I-5: Le thé rouge. [6]

Dans certaines régions, les feuilles sont ensuite légèrement torrifiées, ce qui leur donne ce petit goût de châtaigne grillée. C'est un thé très cultivé et apprécié en Inde et en Chine. [8]

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. [9]

I-8- Les procédés de fabrication des thés vert, rouge 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. [5]

I-8-1-1- Le Flétrissage

A ce niveau, environ 30% de son humidité sont enlevés à la feuille épaisse et rigide. Il existe deux méthodes: [5]

- 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. [5]
- 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.[5]



Figure I-6: Le flétrissage du thé vert.[10]

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. [5]



Figure I-7: Le roulage de thé vert. [11]

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 Inde. [5]

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%. [5]

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. [10]

I-8-2- La Fabrication du thé rouge

Après un flétrissage, les feuilles sont refroidies, puis roulées jusqu'à ce qu'elles virent au rouge et dégagent un léger parfum. [8]

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. [8]

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. [8]

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. [8]

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'infusé 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%. [8]

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.

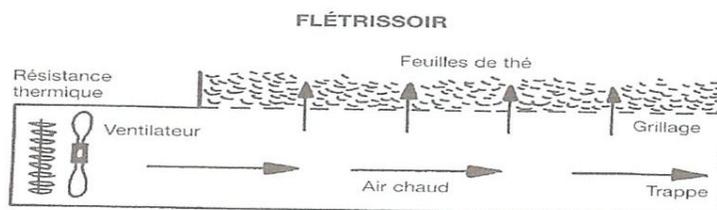


Figure I-9: Le flétrissoir. [8]

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. [8]

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 sucs 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 sucs, 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. [8]

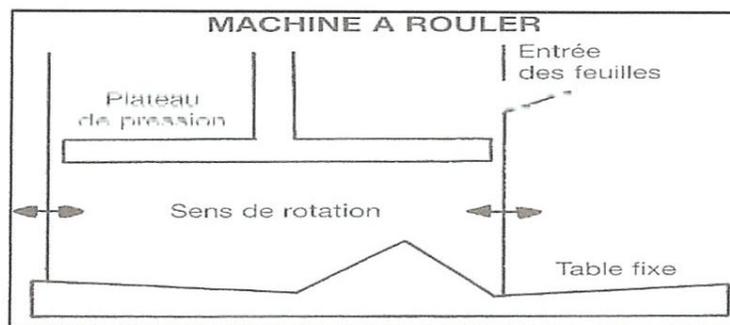


Figure I-10: Le roulage. [8]

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. [8]

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. [8]

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

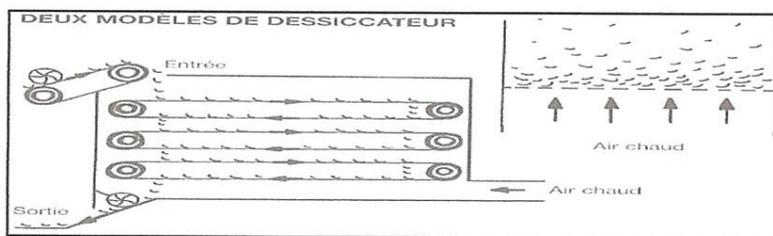


Figure I-11: La dessiccation. [8]

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. [8]

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.

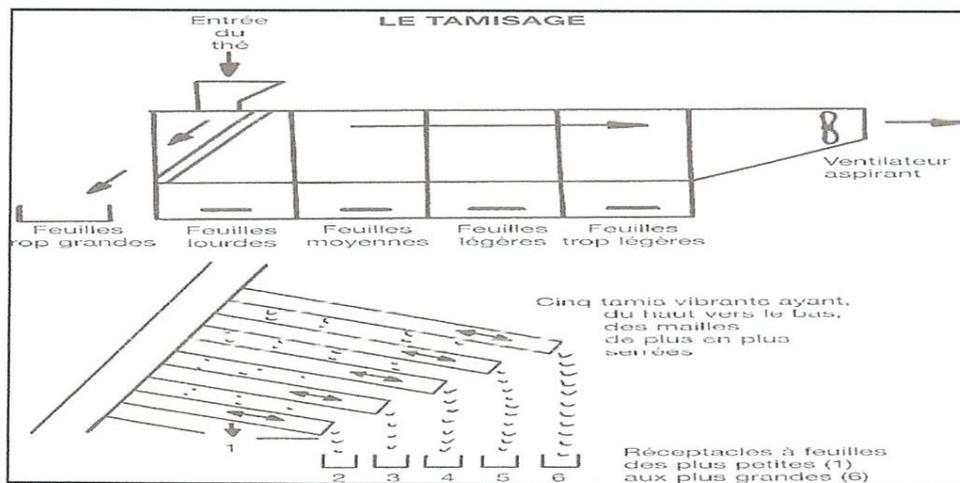


Figure I-12: Différents tamiseurs. [8]

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. [8]

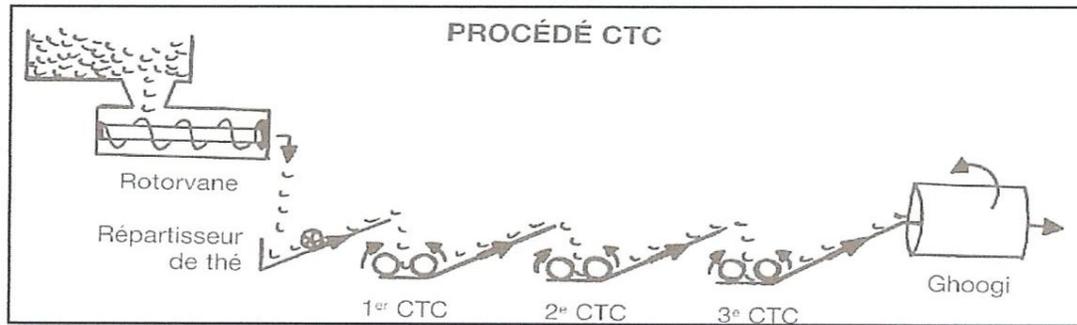


Figure I-13: La fabrication du thé selon le procédé CTC. [8]

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. [8]

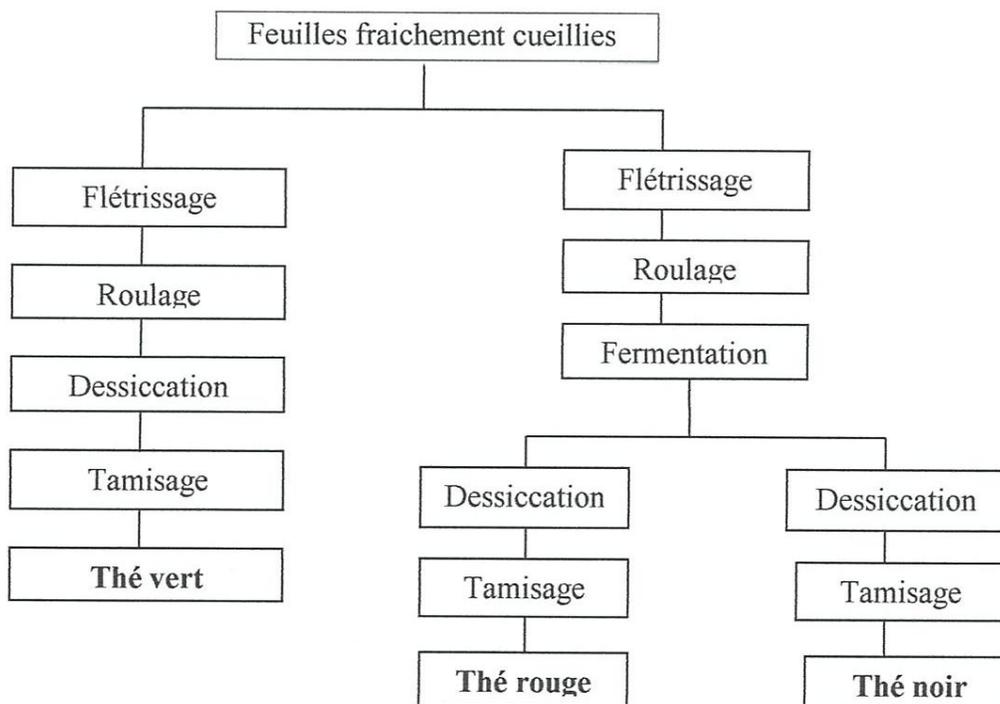


Figure I-14: Procédés de fabrication des thés vert, rouge et noir. [12]

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: [13]

- 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. [13]

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. [13]

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. [13]

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. [13]

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. [13]

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.

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: [7]

- 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

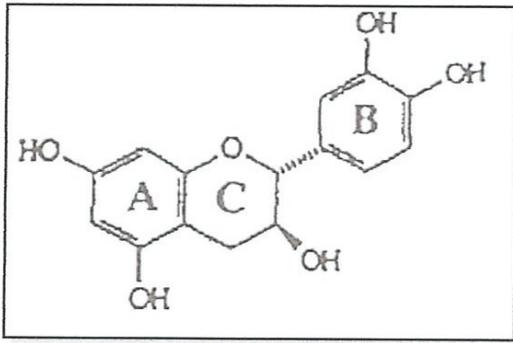
Bien que le thé vert soit le meilleur pour la santé, le thé noir possède de nombreux bienfaits. D'après une étude, 3 tasses quotidiennes de thé noir permettraient, grâce aux antioxydants, de réduire le risque d'infarctus de 11%, et de manière générale, il serait bon pour tout le système cardiovasculaire. 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. [14]

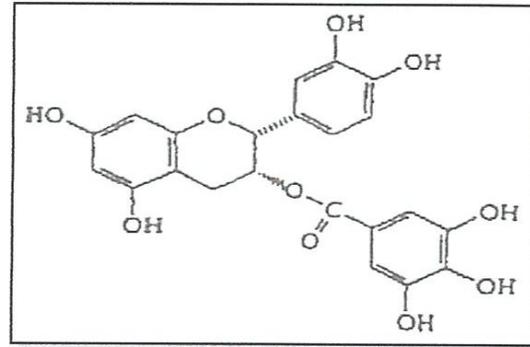
I-11- Les effets indésirables du thé

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: [7]

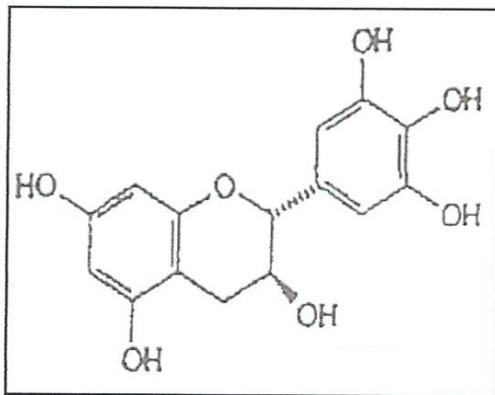
- Les produits de qualités inférieures sont moins bien tolérés par l'organisme.
- Pollution ou contamination du produit (toxines, pesticides, dépôts, résidus ou contamination due à l'emballage ou au transport).
- Réduction de l'assimilation du fer et l'acide folique (vitamine B9) pendant 30 minutes après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



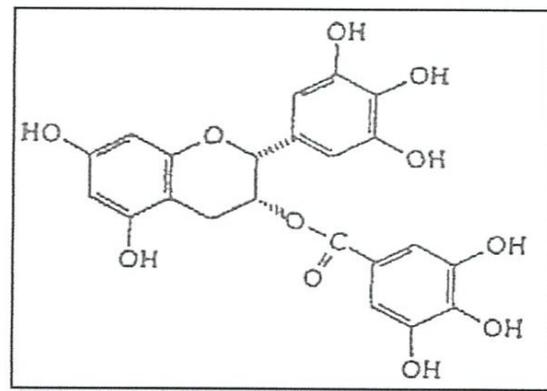
(A)



(B)



(C)



(D)

Figure I-16: Structures des principaux catéchines de thé: (A)EC, (B)ECg, (C)EGC, (D)EGCg. [8]

Chapitre II

La chromatographie liquide haute performance

Chapitre II: La chromatographie liquide haute performance

II-1- La théorie de la chromatographie en phase liquide

II-1-1- Définition

La chromatographie permet la séparation ou la purification d'un ou de plusieurs composés d'un mélange en vue de leur identification et de leur quantification. La chromatographie en phase liquide a permis de réaliser des analyses qui n'étaient auparavant pas possible avec les techniques sur couche mince ou en phase gazeuse. [15]

A l'origine la chromatographie en phase liquide se faisait sur des colonnes en verre. Le liquide traversait la phase stationnaire par gravité ou sous faible pression. Puis pour augmenter le débit, des manipulations ont été réalisées sous pression plus forte. C'est ce que l'on a appelé la chromatographie liquide sous haute pression (HPLC). Très rapidement le P de pression est devenu le P de performance lorsque l'on a optimisé la technique (diminution de la taille de particules de la phase stationnaire c'est-à-dire la régularité de cette phase). [15]

II-1-2- Principe

Les composés à séparer (solutés) sont mis en solution dans un solvant. Ce mélange est introduit dans la phase mobile liquide (éluant). Suivant la nature des molécules, elles interagissent plus ou moins avec la phase stationnaire dans un tube appelé colonne chromatographique. La phase mobile poussée par une pompe sous haute pression, parcourt le système chromatographique. Le mélange à analyser est injecté puis transporté au travers du système chromatographique. Les composés en solution se répartissent alors suivant leur affinité entre la phase mobile et la phase stationnaire.

En sortie de colonne grâce à un détecteur approprié les différents solutés sont caractérisés par un pic. L'ensemble des pics enregistrés est appelé chromatogramme. [15]

II-1-3- Les différents modes de séparation

Il existe différents modes de séparation en chromatographie en phase liquide:

- l'adsorption.
- le partage (80% des séparations).
- l'échange d'ions.
- l'exclusion.

Les trois premiers types utilisent la polarité des solutés pour les séparer. [15]

II-1-3-1- La chromatographie d'adsorption

La chromatographie d'adsorption met en œuvre des phases stationnaires ayant des propriétés adsorbantes, principalement les gels de silice poreuse et les gels d'alumine. On parle aussi de chromatographie liquide-solide. La chromatographie liquide d'adsorption s'applique surtout à la séparation des composés organiques relativement non polaires, insolubles dans l'eau et dont les masses molaires sont inférieures à environ 5000 g mol^{-1} . Sur ces phases, les molécules polaires sont souvent adsorbées de façon irréversible.

Cette technique est utilisée essentiellement pour fractionner les mélanges de composés présentant des groupements fonctionnels différents et des isomères de position tels que les dérivés du benzène substitués en méta et en para. [16]

II-1-3-2- La chromatographie de partage

C'est la technique chromatographique la plus utilisée de toutes les méthodes chromatographiques en phase liquide. Elle met en œuvre des phases stationnaires greffées. La séparation des solutés dépend des différences de solubilité des solutés dans la phase mobile, et des différentes interactions des solutés avec la phase stationnaire (force de Van der Waals, forces électrostatiques). La phase stationnaire est un liquide immobilisé par greffage sur gel de silice. La phase mobile est un liquide dont les interactions avec la phase stationnaire doivent être faibles, ce qui est obtenu lorsque leurs polarités sont différentes. [16]

II-1-4- Polarité et chromatographie

II-1-4-1- Polarité d'une molécule

La polarité d'une molécule est une notion intrinsèque. Certaines molécules étant dissymétriques, les électrons ne sont pas uniformément répartis autour d'elles. De ce fait il existe un moment dipolaire permanent qui crée un champ électrique local. Ces molécules sont dites polaires. [15]

II-1-4-2- Interactions entre molécules

Dans la nature, les molécules ne sont pas isolées. Entre elles il existe différents types d'interactions: [15]

- Les interactions diélectriques ou ioniques;
- les liaisons " hydrogène ";
- les forces de Van Der Waals.

II-1-4-3- Notion de polarisabilité

Sur certaines molécules isolées qui ne possèdent pas de moment dipolaire permanent, un champ électrique peut créer un champ dipolaire induit, en déformant les orbitales électroniques ou en modifiant la position relative des atomes. Ces molécules sont dites polarisables. [15]

II-1-4-4- Application à la chromatographie

Il existe des échelles de polarité, mais de manière on utilise la notion de polarité comme une donnée comparative entre molécules. On dit que tel composé est plus polaire ou moins polaire qu'un autre. De même on dit que la phase mobile et la phase stationnaire sont polaires, peu polaires ou apolaires.

Pour qu'il y ait séparation chromatographique de composés, il faut que leurs molécules interagissent de manières différentes avec au moins une des phases (stationnaire et mobile). Ces phases doivent avoir des polarités différentes. On peut appliquer la règle "qui se ressemble s'assemble" à l'ensemble soluté - phase stationnaire. [15]

- Si la phase stationnaire est polaire, les composés polaires seront plus retenus que les composés non polaires.
- Si la phase stationnaire est apolaire, les composés apolaires seront plus retenus que les composés polaires.

✓ *Polarité de phase*

A l'origine, les colonnes étaient remplies de silice (phase stationnaire polaire). Elle doit sa polarité aux groupements silanols Si-OH qui sont polaires. Pour que la séparation soit efficace, la phase mobile doit alors être peu polaire. L'ensemble "phase stationnaire polaire et phase mobile peu polaire" forme la chromatographie à polarité de phase normale. [15]

Par la suite, les particules de silice (support) ont été enrobées de paraffine en C 18 pour faire une phase apolaire. Dans ce cas, pour que la séparation soit efficace, la phase mobile est polaire (généralement à base d'eau). L'ensemble "phase stationnaire apolaire et phase mobile polaire" forme la chromatographie à polarité de phase inversée. [15]

✓ *Composition de la phase mobile*

Dans la pratique, chaque séparation nécessite une polarité de la phase mobile qui lui est propre. Chaque solvant ayant une polarité donnée, on ajuste la polarité globale de la phase mobile en mélangeant plusieurs solvants miscibles. A cette composition de phase mobile correspond une force éluante qui caractérise le pouvoir d'entraîner les solutés. [15]

Il faut ajuster la force éluante en fonction des solutés à séparer. Pour cela, on peut utiliser un solvant pur ou un mélange de solvants : on dit travailler en mode isocratique. Dans certains cas il est utile de faire varier la force éluante au cours de l'analyse. Si le mélange de différents solvants varie au cours de la séparation, on réalise alors un gradient d'éluant, car la meilleure force éluante pour le début de l'analyse n'est pas forcément adaptée pour une bonne séparation des solutés sortant en fin de chromatogramme. Ces 2 modes sont utilisés pour des analyses en chromatographie à polarité de phase normale ou inversée. [15]

II-1-5- Notions fondamentales

II-1-5-1- Phases mobile et stationnaire

La phase stationnaire est un support plus ou moins poreux recouvert d'un gel (liquide greffé) qui a les propriétés désirées pour retenir les molécules de solutés. La phase mobile ou éluant est un liquide qui entraîne les solutés à travers la colonne. [15]

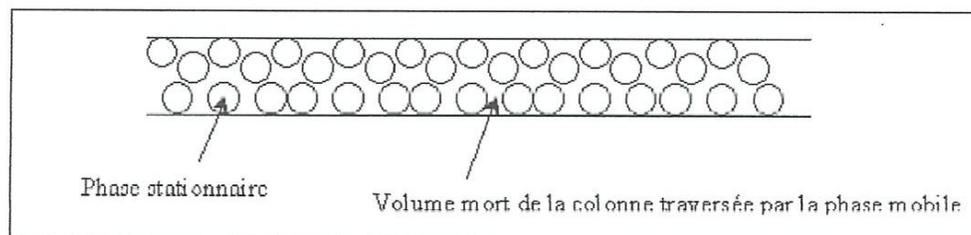


Figure II-1: La phase stationnaire et la phase mobile. [15]

II-1-5-2- Notion de temps

En chromatographie, le temps est un paramètre important pour l'analyse qualitative d'un mélange de différents solutés.

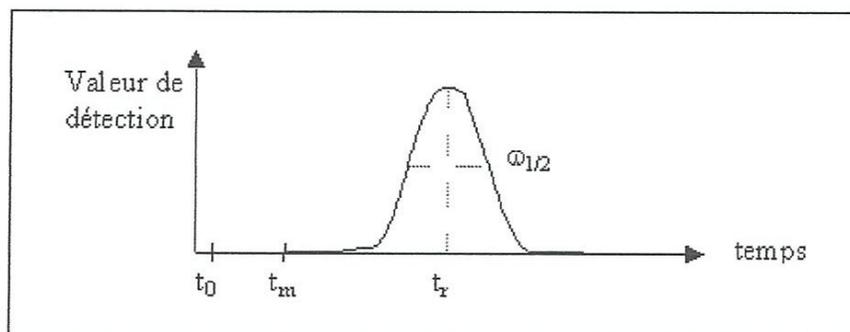


Figure II-2: La valeur de détection en fonction du temps avec un seul pic. [15]

- t_0 est le temps du début de l'injection.
- t_m (le temps mort) qui est le temps mis par un composé non retenu par la phase stationnaire pour traverser la colonne (temps passé dans la phase mobile).
- t_r (le temps de rétention) est le temps mis par un soluté pour traverser la colonne. C'est le temps passé dans la phase stationnaire et dans le volume mort de la colonne. Ce temps est caractéristique d'un soluté dans des conditions d'analyse donnée. La surface du pic est fonction de la quantité du constituant étudié.
- Le temps de rétention réduit t'_r est le temps passé par un soluté dans la phase stationnaire, soit:

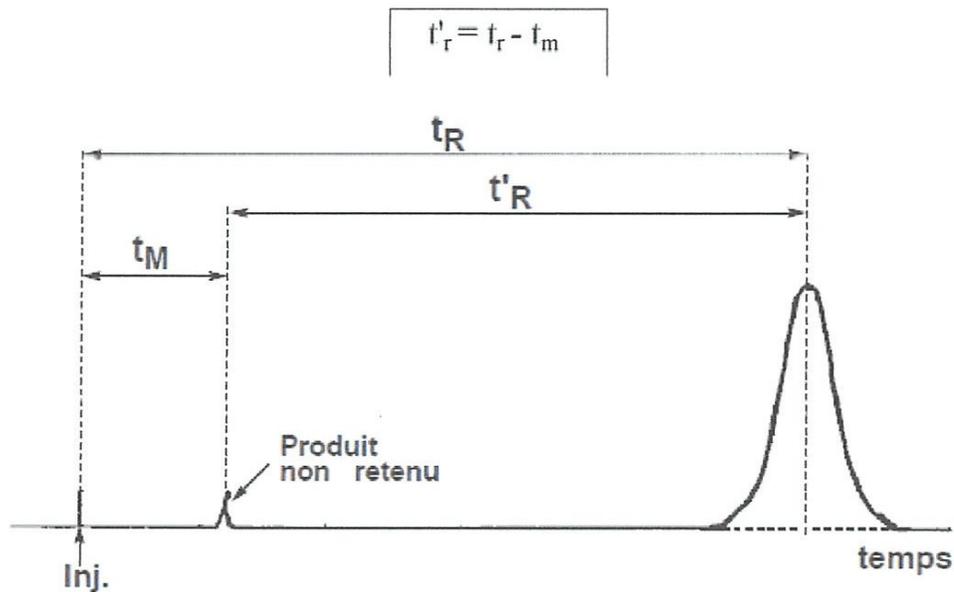


Figure II-3: Types de temps pour un pic chromatographique. [15]

II-1-5-3- Notion de concentration

- **Le coefficient de partage K**

A un instant donné, le soluté est à la concentration C_m dans la phase mobile et C_s dans la phase stationnaire. Leur rapport à l'équilibre est appelé coefficient de partage K. [15]

$$K = C_s / C_m$$

Ce coefficient est fonction de 2 types d'affinités:

- Celle entre le soluté et la phase mobile.
- Celle entre le soluté et la phase stationnaire.

- **Le facteur de capacité K'**

Le facteur de capacité K' est le rapport de la quantité d'un soluté dans la phase stationnaire et dans la phase mobile.

$$K' = \frac{C_s \times V_s}{C_m \times V_m} = K \times \frac{V_s}{V_m}$$

V_s: volume de la phase stationnaire.

V_m: volume de la phase mobile ou volume mort.

K' est aussi le rapport du temps passé par un soluté dans la phase stationnaire sur le temps passé par ce même soluté dans la phase mobile.

$$K' = \frac{t_r - t_m}{t_m}$$

II-1-5-4- Notion d'efficacité

La largeur d'un pic est caractéristique de l'efficacité de la séparation: plus le pic est fin plus la chromatographie est efficace. L'efficacité est mesurée par:

- **Le nombre de plateaux théoriques N_{th}**

$$N_{th} = 5,54 \left[\frac{t_r}{\omega_{1/2}} \right]^2$$

t_r: temps de rétention.

ω_{1/2}: largeur du pic à mi-hauteur.

- **La hauteur équivalente à un plateau théorique: HEPT, qui est défini comme:**

$$HEPT = \frac{L}{N_{th}}$$

L: Longueur de la colonne.

N_{th}: Nombre de plateaux théoriques.

II-1-5-5- Qualité de la séparation

Supposons un mélange liquide de deux constituants, analysé par chromatographie liquide. Le schéma ci-dessous représente le chromatogramme correspondant:

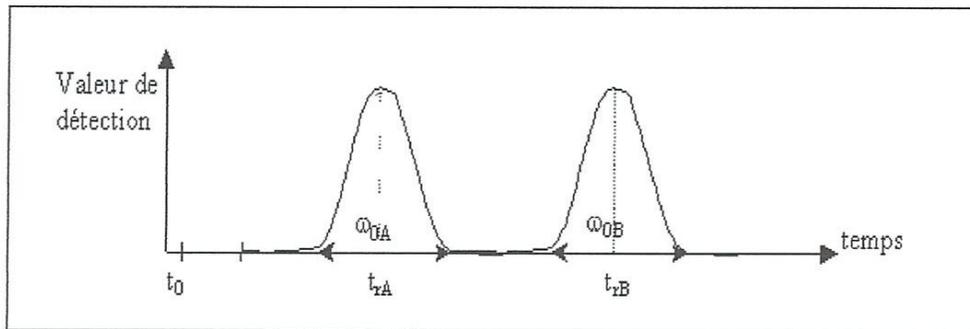


Figure II-4: La valeur de détection en fonction du temps avec deux pics.

- **La sélectivité (α)**

Elle est définie comme le rapport des temps de rétention réduits. α est toujours > 1 car on choisit $t'_{rB} > t'_{rA}$.

A et B : Solutés dans le mélange à analyser.

$$\alpha = \frac{t'_{rB}}{t'_{rA}}$$

- **La résolution (R)**

Elle quantifie la qualité de la séparation en caractérisant le fait qu'il y ait ou non chevauchement de 2 pics contigus.

$$R = \frac{(t'_{rB} - t'_{rA})}{(\omega_{0B} + \omega_{0A})}$$

ω_{0A} et ω_{0B} sont les largeurs des pics des composés A et B respectivement.

$R < 1$: mauvaise résolution.

$1 < R < 1,4$: résolution acceptable.

$1,4 < R < 1,6$: résolution optimale.

$R > 1,6$: résolution trop bonne car le temps d'analyse est allongé.

II-2- Appareillage

En raison de sa polyvalence et du vaste domaine de ses applications, la chromatographie liquide haute performance (CLHP ou HPLC) est actuellement la plus utilisée de toutes les techniques de séparation. Le champ d'application de ce type de chromatographie recouvre une grande partie du domaine de la chromatographie en phase gazeuse auquel s'ajoute l'analyse: [16]

- Des composés thermosensibles;
- des composés très polaires;
- ainsi que des composés de masses molaires élevées.

Un appareil d'HPLC comprend différents modules : un réservoir à solvant contenant la phase mobile, un système de pompage permettant d'effectuer des éluions graduées, un injecteur, une colonne, un détecteur et un système d'acquisition de données. [16]

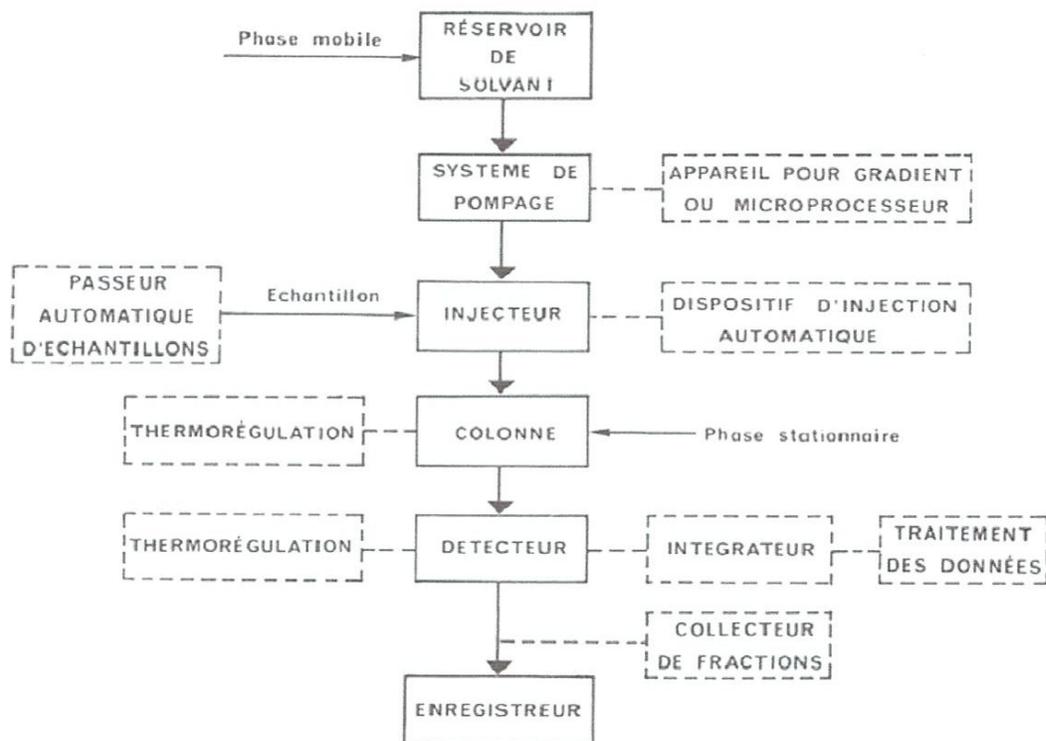


Figure II-5: Composition d'une chaîne HPLC.

II-2-1- Réservoir de la phase mobile (solvant)

Le plus souvent ce réservoir est une bouteille en verre dans lequel plonge un tube avec une extrémité filtrante en téflon. Le dégazage de la phase mobile (solvants) est indispensable avant de commencer une analyse par HPLC. [16]

Tableau II-1: Solvants utilisés en HPLC avec degré de polarité approximatif (0 à 10).

| Solvants polaires | Solvants de polarité moyenne | Solvants de polarité faible ou apolaires |
|--------------------|------------------------------|--|
| Eau (10) | Ethanol (4) | Bromoéthane (2) |
| DMSO (7) | Chloroforme (4) | Chloroéthane (1) |
| Acétonitrile (6) | Propan-2-ol (4) | Cyclohexane (0) |
| Acide acétique (6) | THF (4) | Isooctane (0) |
| Méthanol (5) | Propanol (4) | |
| | Fluorobenzene (3) | |
| | Chlorure de Méthylène (3) | |

II-2-2- Pompe

Elle délivre en continu la phase mobile. Elle est définie par la pression qu'elle permet d'atteindre dans la colonne, son débit, et la stabilité du flux. [16]

II-2-3- Injecteur

Le type d'injecteur le plus couramment utilisé comporte une vanne à boucle d'échantillonnage d'une capacité fixe (10, 20, 50 μL ...). Cette boucle permet d'introduire l'échantillon sans modifier la pression dans la colonne. [15]

- *Vanne à boucle d'échantillonnage*

Elle possède 2 positions. La première permet le remplissage de la boucle d'injection de volume fixe (load), la seconde permet la mise en circulation de l'échantillon dans le système chromatographique (inject).

Le remplissage de la boucle d'injection se fait à l'aide d'une seringue. Actuellement, les appareils pour HPLC sont munis des auto échantillonneurs et injecteurs, le volume injecté est programmé.

II-2-4- Colonne

En mode analytique, les colonnes en inox ont généralement un diamètre interne inférieur ou égal à 4,6 mm. La longueur est de 5, 10, 15, ou 25 cm. Le remplissage (en silice, silice greffée ou particules polymériques) a une granulométrie de 3, 5, ou 10 μm ou même moins. Si des substances pures doivent être collectées en fin de chromatogramme des colonnes de gros diamètre seront nécessaires. [15]

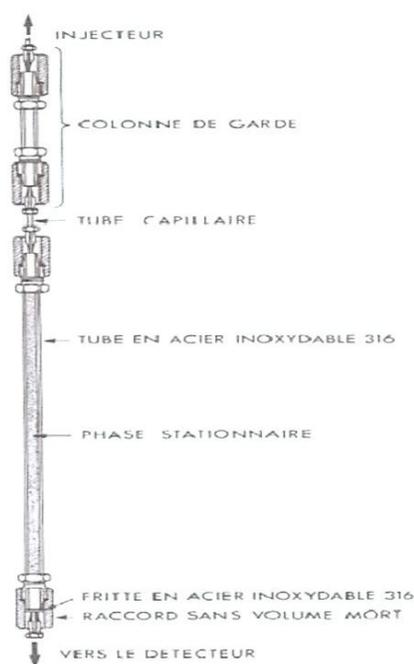


Figure II-6: Quelques types de colonnes pour HPLC. [16]

- **Les gels de silice**

Excepté quelques nouvelles phases constituées par des polymères organiques, le gel de silice est le matériau de base des phases stationnaires des colonnes HPLC. [16]

Ce matériau doit être exempt de tout ion métallique et les grains doivent être de dimension régulière. Ces gels de silices:

- Sont résistants à la pression (ils résistent à l'écrasement sous 1000 bars) ;
- ont des surfaces spécifiques de l'ordre de $350 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$;
- comportent des groupements silanols (groupement Si-OH) à leur surface à raison de 5 groupements par μm^2 environ, ce qui confère au gel de silice ses propriétés polaires.

- **Les gels de silice greffée**

La plupart des silices greffées sont préparées par la réaction d'un organochlorosilane avec les groupements silanols à la surface du gel de silice. Cette réaction se fait par hydrolyse dans l'acide chlorhydrique dilué et chaud:



Où R est un groupement n-octyle (-C₈H₁₇) ou un groupement octadécyle (-C₁₈H₃₇). D'autres groupements fonctionnels peuvent être greffés (amines aliphatiques, éthers, nitriles, hydrocarbures aromatiques) pour étendre la gamme de polarité des phases stationnaires.

Ces supports chromatographiques sont stables thermiquement et difficilement hydrolysables dans le domaine de pH compris entre 2 et 7.

II-2-5- Détecteur

Le détecteur suit en continu l'apparition des solutés. Le signal obtenu est enregistré en fonction du temps. Généralement, on compare le signal obtenu pour la phase mobile et le soluté à celui de la phase mobile seule. Le détecteur le plus utilisé en HPLC est un spectrophotomètre d'absorption UV-visible (190-600 nm) relié à la sortie de colonne. [15]

Il existe d'autres détecteurs:

- Réfractomètre différentiel.
- UV à barrette de diodes.
- Electrochimique.
- Fluorimétrique.

Ainsi, il existe aussi différents types de couplage:

- Spectrométrie infrarouge.
- Spectrométrie de masse.
- Résonance magnétique nucléaire.

II-2-6- Intégrateur

La chromatographie est une méthode de séparation utilisée en vue d'un dosage. Il faut donc avant tout chercher à séparer correctement les pics avant de les intégrer. Une intégration consiste à mesurer la surface sous un pic. La détection d'un pic chromatographique par l'intégrateur, dépend de 2 paramètres:

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

La largeur de pic est à peu près prévisible en fonctions de la technique d'analyse et des conditions opératoires. Elle détermine la fréquence d'échantillonnage du signal. Le pic est alors découpé en tranches. Le seuil d'intégration est la valeur du signal à partir de laquelle le calculateur repère un début de pic.[15]

Chapitre III

Modes opératoires et méthodes de calcul et d'analyse

Chapitre III: Modes opératoires et méthodes de calcul et d'analyse

III-1- Introduction

Ce chapitre est consacré à présenter en détail tout le nécessaire pour réaliser la partie expérimentale de ce travail en l'occurrence: matériel, réactifs, modes opératoires et méthodes de calcul de la concentration du composé étudié et d'analyse des échantillons de thé.

Le composé étudié est l'épigallocatechine gallate. Dans cette partie, ce composé est désigné sous le nom de catéchine.

III-2- Matériel

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

- Verrerie usuelle de laboratoire.
- Agitateur magnétique.
- Etuve.
- Balance analytique (sortoniuscp 2245).
- Lyophilisateur (Alphal 1-2 LD plus).
- pH-mètre du type HANNA, HI 208 pH mètre.
- HPLC-DAD du type Agilent, série 1260Infinity.

III-3- Solvants et réactifs

Les solvants que nous avons utilisés en chromatographie sont de grade HPLC:(l'acétonitrile et le méthanol). L'acide formique ajouté à la phase mobile et le composé pur étudié (la catéchine) sont d'une pureté supérieure à 98%. L'eau a été distillée et filtrée trois fois.

III-4- 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.[8]

- **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 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ tout au long du processus de lyophilisation. [8]

- **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 III-1: Lyophilisateur Alpha 1-2 LD plus
(Laboratoire de Chimie Appliquée, Université de Guelma).*

III-5- La méthode d'analyse (chromatographie liquide à haute performance couplée à un détecteur à barrette de diodes « HPLC-UV-DAD »)

- **Constituants de l'appareil pour HPLC (Agilent, série 1260 Infinity)**

Un appareil HPLC-DAD de type Agilent, série 1260 Infinity (**Figure III-2**) 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. [8]

III-13- Validation de la méthode analytique

III-13-1- Courbe d'étalonnage

La molécule a été dosée par la méthode du standard externe. La gamme de volumes injectés était de 5 à 20 µl. La courbe d'étalonnage a été tracée en représentant les aires des pics (Y) par rapport aux volumes injectés (X, µl) pour quatre volumes différents, chaque point étant la valeur moyenne de trois mesures indépendantes de surface.

III-13-2- Détermination des limites de détection et de quantification de la catéchine

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. [8]

Les LD et LQ sont déterminés comme suit:

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

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

III-14- 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 µl. L'appareil d'HPLC a été programmé pour exécuter une série de trois analyses consécutives. [8]

III-15- 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. [8]

III-16- Méthode de calcul de la concentration de la catéchine dans les échantillons de thé

- 1- Peser 5 g de thé: 5 g → 50 ml d'eau distillée.
- 2- Après infusion, prélever 25 ml de 50 ml de l'infusé.
- 3- Prendre une quantité de l'extrait sec de thé après lyophilisation de masse (0,02 g). puis dissoudre cette quantité dans 20 ml de méthanol.
- 4- Injecter 20 µl de la solution obtenue dans l'appareil HPLC.
- 5- L'aire du standard (la catéchine) est mesurée par intégration manuelle pour chaque essai.
- 6- En se référant de l'équation de la courbe d'étalonnage: $y = 1046,2 x_{\text{cat}} + 3708,3$, trouver à chaque fois x_{cat} en µl qui représente le volume de la catéchine dans 20 µl du mélange (échantillon de thé).
- 7- Convertir le volume de la catéchine (µl) en mg comme suit:

2,5 mg (catéchine) → 50 ml de méthanol

$m_{\text{cat}} \text{ (mg)} \rightarrow x_{\text{cat}} \text{ (}\mu\text{l)}.$
- 8- Trouver la masse de catéchine en mg (m'_{cat}) dans 20 ml de la solution préparée initialement dans le méthanol.

$m_{\text{cat}} \text{ (mg)} \rightarrow 20 \mu\text{l}$

$m'_{\text{cat}} \text{ (mg)} \rightarrow 20 \text{ ml (0,02 g de l'extrait)}.$
- 9- Peser à chaque fois l'extrait sec ($m \text{ extrait}$) qui a été obtenu après lyophilisation à partir d'une solution de 25 ml.

$m'_{\text{cat}} \text{ (mg)} \rightarrow 0,02 \text{ g}$

$m''_{\text{cat}} \text{ (mg)} \rightarrow m \text{ de l'extrait (g)}$

$m''_{\text{cat}} \text{ (mg)} \rightarrow 25 \text{ ml}.$

10- Calculer la concentration de la catéchine (C_{cat}) dans les échantillons de thé dans 1 L d'eau.

$$m_{\text{cat}}(\text{mg}) \rightarrow 0.025 \text{ L}$$

$$C_{\text{cat}}(\text{mg/L}) \rightarrow 1\text{L}.$$

III-17- L'écart-type (S)

L'écart-type sert à quantifier la dispersion des valeurs (aires des pics) par rapport à la moyenne. L'écart-type a été calculé en utilisant Excel.

- L'écart-type = $\sqrt{\text{variance}}$.
- La variance (S^2): permet de combiner toutes les valeurs à l'intérieur d'un ensemble de données afin d'obtenir la mesure de dispersion.

$$S^2 = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^{n-1} (x_i - \bar{x})^2$$

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

- \bar{x} : la moyenne des mesures (moyenne des aires).



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

III-6- Données sur la catéchine (EGCg)

La structure moléculaire et quelques caractéristiques chimiques du standard étudié la catéchine: (EGCg) sont représentées dans la figure (III-3) et le tableau (III-1).

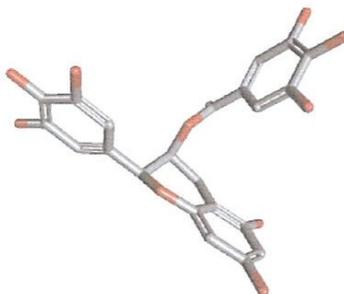


Figure III-3: Structure de la catéchine (EGCg).

Tableau III-1: Quelques caractéristiques de la catéchine (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-7- Echantillons de thé

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



SR1SN1SV1

Figure III-4: Echantillons des thés étudiés.

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

| Thé | Origine | Couleur | Forme |
|-------------|---------|---------------|-------------------------------------|
| SV1 (vert) | Chine | Vert clair | Grains oblongs droits |
| SR1 (rouge) | Inde | Rouge et noir | Petits grains de différentes formes |
| SN1 (noir) | Vietnam | Rouge et noir | Petits grains de différentes formes |

III-8- 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 2,5 mg du standard pur dans 50 ml de méthanol.

Des volumes de: 5 μ l ; 10 μ l ; 15 μ l ; 20 μ l de la solution standard préparée ont été injectés en triplicata dans l'appareil d'HPLC. La courbe étalon a été tracée.

La courbe est une droite (tracée en utilisant Microsoft Excel 2010) qui donne la variation des aires des pics en fonction des volumes injectés.

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

III-9- Méthode de préparation et injection des échantillons de thé

Une quantité de 5 g de chaque échantillon de thé a été infusée dans 50 ml d'eau pure et bouillie à des températures de 75, 80 et 85°C pendant 3, 5 et 7 minutes. Après filtration, les solutions ont été congelées, puis passées 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 µl ont été injectés.

III-10- Mesure du pH des solutions de thé

Le pH de chaque solution de thé a été mesuré à la température de 25°C à l'aide d'un pH-mètre.

III-11- 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-12- Dosage par HPLC-UV-DAD de la catéchine dans les échantillons de thé

III-12-1- 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 la catéchine. La séparation a été réalisée en mode gradient et en phase inverse avec un temps d'acquisition de 14 minutes.

III-12-2- Phase mobile

Les solvants de la phase mobile utilisés dans le dosage de la catéchine sont:

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

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

III-12-3- Phase stationnaire

Le matériau de la phase stationnaire est la silice greffée avec C18. Ce matériau est contenu dans une colonne de marque Poroshell 120 EC-C18, de longueur 50 mm et de diamètre intérieur de 3 mm. Les particules de la phase stationnaire ayant une de taille de 2,7 μm .

III 12 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 14 min avec un pourcentage initial de 85% du solvant A (**Tableau III-3**). [8]

Tableau III -3: Gradient HPLC pour l'analyse de la catéchine.

| Temps (min) | Composition volumique du solvant A (%) | Composition volumique du solvant B (%) |
|-------------|--|--|
| 0 | 85 | 15 |
| 5 | 63 | 37 |
| 7 | 20 | 80 |
| 10 | 0 | 100 |
| 13 | 0 | 100 |
| 14 | 85 | 15 |

Chapitre IV

Résultats et discussions

Chapitre IV: Résultats et discussions

IV-1- Introduction

Dans ce chapitre, nous présentons, la courbe d'étalonnage de la catéchine (EGCg), quelques chromatogrammes, les résultats du dosage par HPLC-UV-DAD des trois types de thé étudiés (vert, rouge et noir) vendus au marché de la ville de Guelma, les pH de leurs infusés à 25°C et les rendements de l'extraction de ces thés par infusion à différents temps (3, 5 et 7 min) et à différentes températures (75, 80 et 85°C).

IV-2- Résultats

IV-2-1- Données chromatographiques de la catéchine

Les figures (IV-1) et (IV-2) montrent des chromatogrammes en 2D et 3D de notre composé pur (la catéchine), la longueur d'onde maximale d'absorption étant à 280 nm et le temps de rétention est 0,257 min.

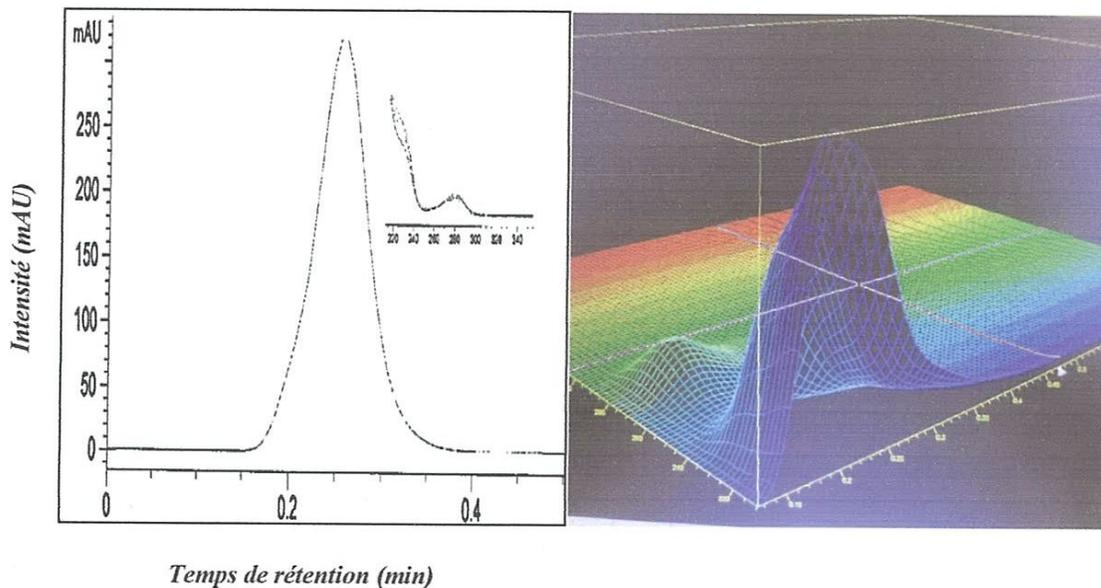


Figure IV-1: Chromatogrammes en 2D et 3D de la catéchine; $t_R = 0,257$ min, $\lambda_{max} = 280$ nm.

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

Tableau IV-1: Données HPLC de la catéchine.

| Volume injecté (µl) | Aires | | | Moyenne | Écart type |
|---------------------|----------|----------|----------|---------|------------|
| | 1 | 2 | 3 | | |
| 5 | 8903,2 | 8901,04 | 8896,96 | 8900,4 | 3,17 |
| 10 | 14157,9 | 14154,06 | 14155,44 | 14155,8 | 1,94 |
| 15 | 19541,4 | 19547,52 | 19548,18 | 19545,7 | 3,73 |
| 20 | 24543,32 | 24541,7 | 24535,07 | 24540 | 4,37 |

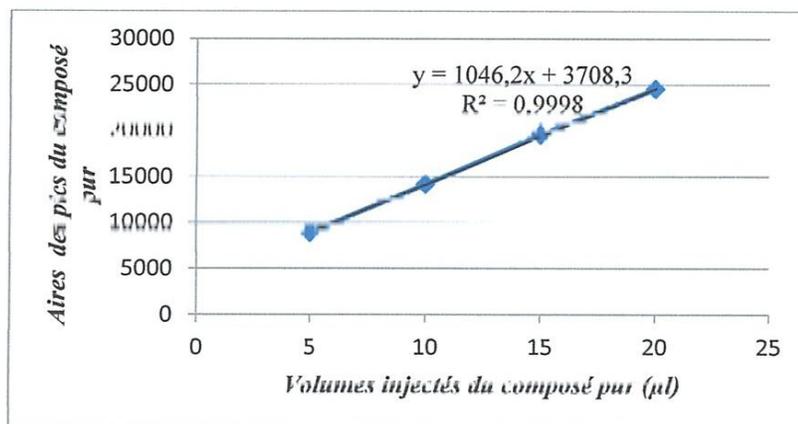


Figure IV-2: Courbe d'étalonnage de la catéchine.

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 (la catéchine).

Concernant les écart-types calculés des aires des pics pour les quatre volumes injectés du standard, nous remarquons que les valeurs sont comprises entre 1,94 et 4,37, ce qui indique une homogénéité dans les trois valeurs des aires pour tous les volumes du standard injecté.

IV-2-2-2- Limites de détection (LD) et de quantification (LQ) de la catéchine

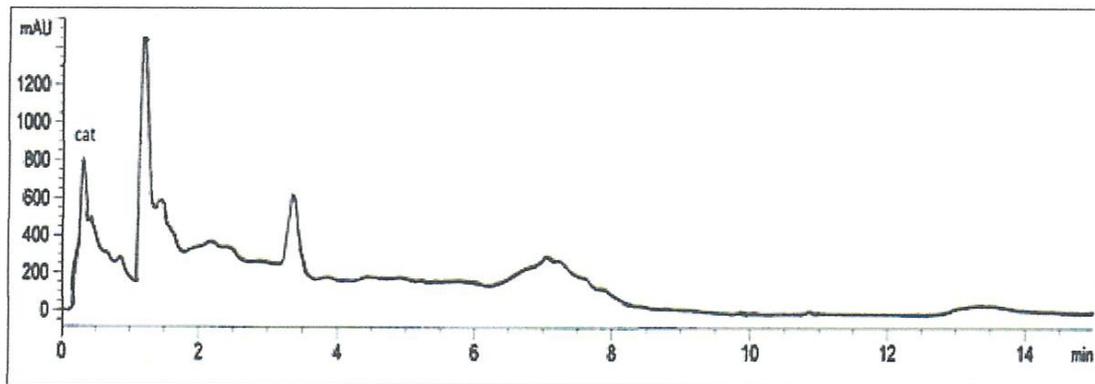
Nous avons calculé la limite de détection; LD ($2,40 \mu\text{g L}^{-1}$) et la limite de quantification; LQ ($8,01 \mu\text{g L}^{-1}$), ces valeurs sont donc tout à fait acceptables.

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

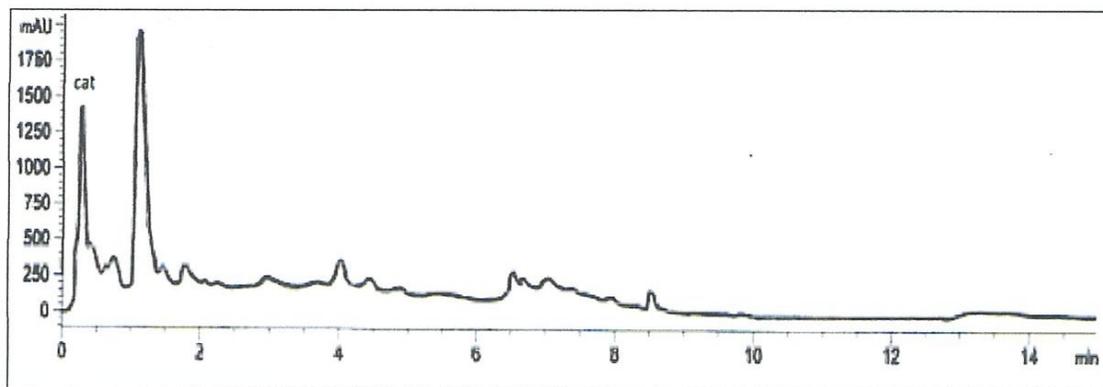
Nous représentons dans les figures (IV-3), (IV-4) et (IV-5) les chromatogrammes HPLC de quelques échantillons du thé vert, rouge et noir obtenus par infusion. Le pic de la catéchine est désigné par (cat).

• Infusion à 75°C pendant 3 minutes

A)



B)



C)

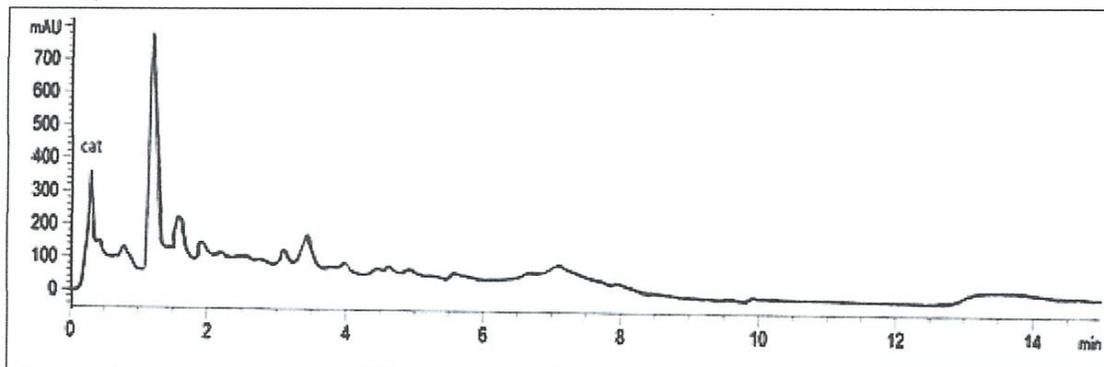
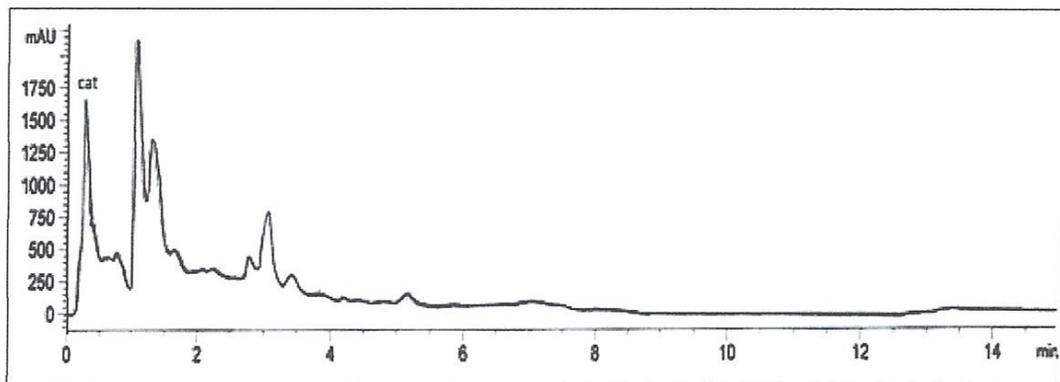


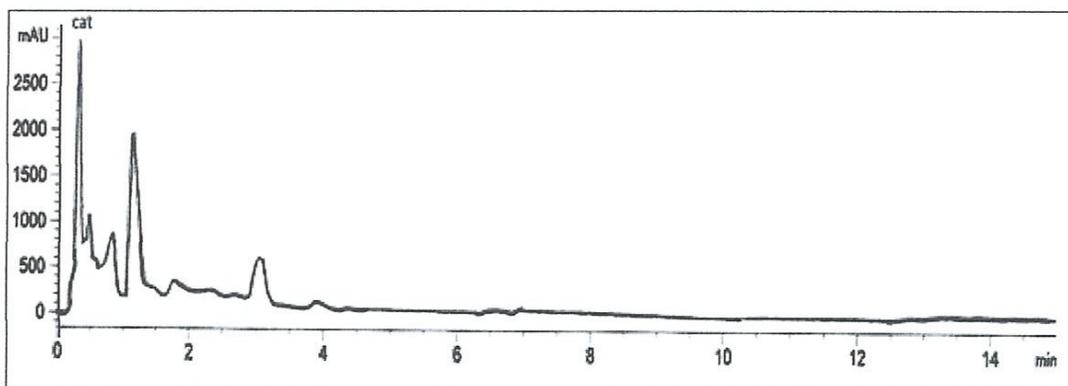
Figure IV-3: Chromatogrammes HPLC: A) Thé vert, B) Thé rouge, C) Thé noir (75°C et 3 min).

• Infusion à 80°C pendant 5 minutes

A)



B)



C)

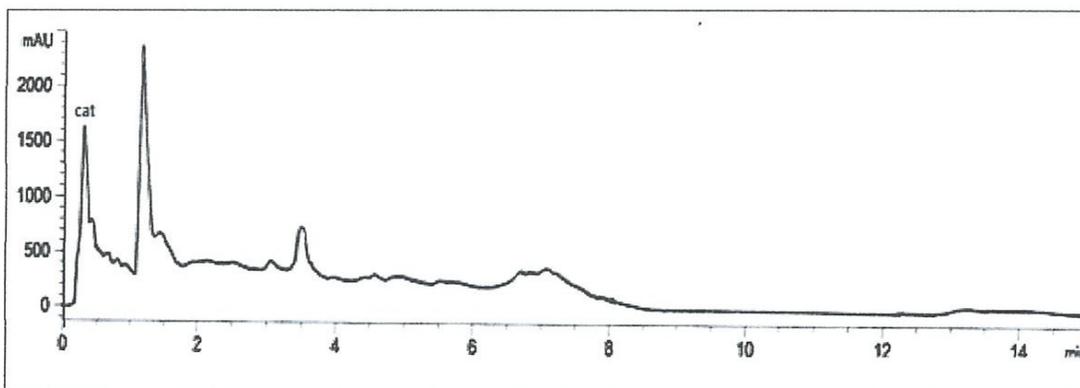
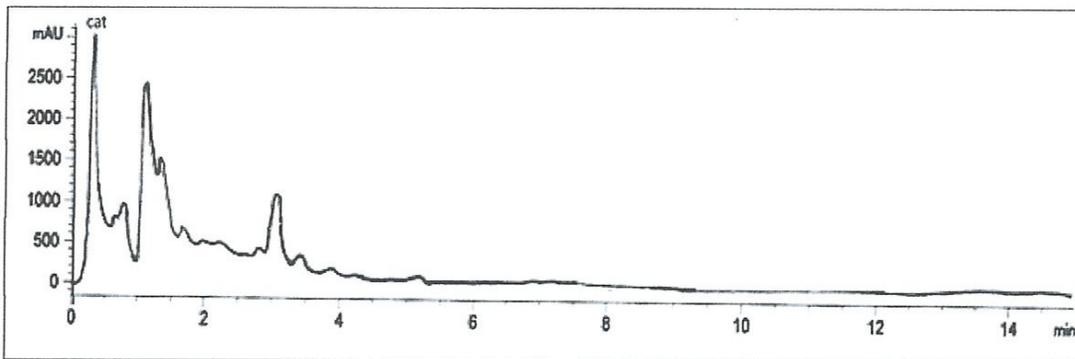


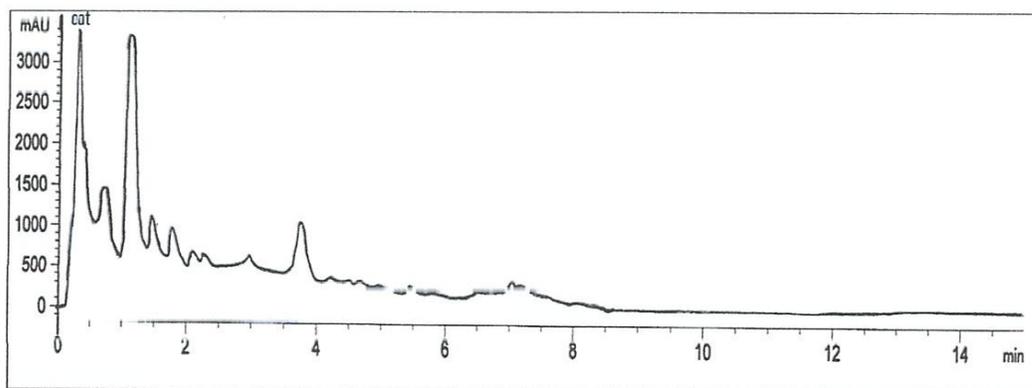
Figure IV-4: Chromatogrammes HPLC : A) Thé vert, B) Thé rouge, C) Thé noir (80°C et 5 min).

• Infusion à 85°C pendant 7 minutes

A)



B)



C)

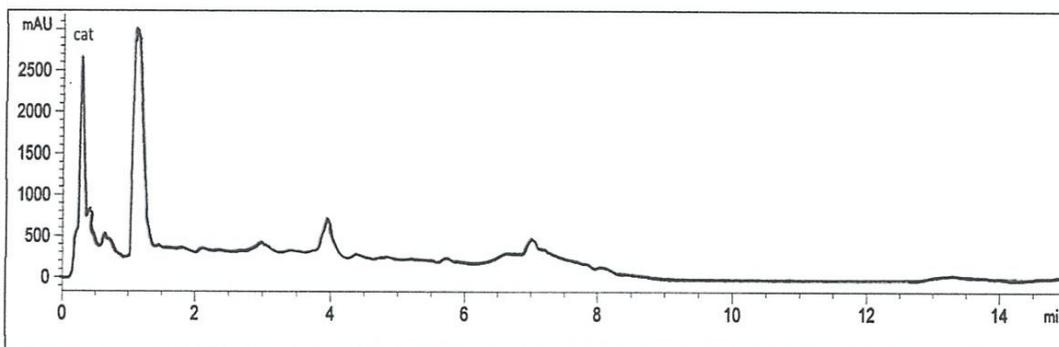


Figure IV-5: Chromatogrammes HPLC: A) Thé vert, B) Thé rouge, C) Thé noir
(85°C et 7 min).

IV-2-4- Concentrations de la catéchine dans les différents échantillons de thé

Les concentrations de la catéchine ont été déterminées par HPLC-UV-DAD dans les échantillons des trois types de thé (vert, rouge et noir) et la séparation des composés a été réalisée en 14 minutes.

Les concentrations en mg L^{-1} du composé analysé sont résumées dans les tableaux (IV-2) à (IV-4) pour l'infusion à 3, 5 et 7 minutes respectivement.

Tableau IV-2: Concentrations de la catéchine en mg L^{-1} dans les échantillons de thé: vert, rouge et noir préparés par infusion pendant 3 min.

| Infusion pendant 3 min | Concentration dans le thé vert | Concentration dans le thé rouge | Concentration dans le thé noir |
|---------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|-----------------------------------|
| | (mg L^{-1}) | (mg L^{-1}) | (mg L^{-1}) |
| à 75°C | 17,23±0,62 | 14,31±0,33 | 8,64±0,11 |
| à 80°C | 19,05±0,93 | 15,73±0,47 | 10,06±0,27 |
| à 85°C | 20,84±1,09 | 16,51±0,65 | 11,49±0,45 |

Tableau IV-3: Concentrations de la catéchine en mg L^{-1} dans les échantillons de thé: vert, rouge et noir préparés par infusion pendant 5 min.

| Infusion pendant 5 min | Concentration dans le thé vert | Concentration dans le thé rouge | Concentration dans le thé noir |
|---------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|-----------------------------------|
| | (mg L^{-1}) | (mg L^{-1}) | (mg L^{-1}) |
| 75°C | 21,12±1,07 | 17,23±0,36 | 15,66±0,95 |
| 80°C | 23,01±1,98 | 19,88±0,99 | 18,47±1,06 |
| 85°C | 26,36±2,05 | 21,13±1,03 | 20,70±1,18 |

Tableau IV-4 : Concentrations de la catéchine en mg L⁻¹ dans les échantillons de thé: vert, rouge et noir préparés par infusion pendant 7 min.

| Infusion pendant 7 min | Concentration dans le thé vert | Concentration dans le thé rouge | Concentration dans le thé noir |
|------------------------|--------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|
| | (mg L ⁻¹) | (mg L ⁻¹) | (mg L ⁻¹) |
| 75°C | 24,33±0,44 | 17,78±0,54 | 17,39±0,49 |
| 80°C | 25,65±0,57 | 20,25±0,68 | 18,51±0,53 |
| 85°C | 27,96±0,83 | 21,3±0,94 | 20,96±0,72 |

IV-2-5- pH des échantillons de thés

Les valeurs de pH des échantillons des thés vert, rouge et noir sont récapitulées dans le tableau (IV-5).

Tableau IV-5: pH des échantillons des thés: vert, rouge et noir.

| Température d'infusion | pH du thé vert | | | pH du thé rouge | | | pH du thé noir | | |
|------------------------|----------------|-------|-------|-----------------|-------|-------|----------------|-------|-------|
| | 3 min | 5 min | 7 min | 3 min | 5 min | 7 min | 3 min | 5 min | 7 min |
| 75°C | 5,08 | 5,15 | 5,31 | 5,25 | 5 | 4,8 | 4,79 | 5,05 | 4,93 |
| 80°C | 5,17 | 5,67 | 5,71 | 5,08 | 5,04 | 5,03 | 5 | 4,95 | 4,97 |
| 85°C | 5,84 | 5,88 | 5,90 | 4,97 | 4,99 | 5,06 | 4,97 | 4,96 | 5,58 |

IV-2-6- Rendements de l'extraction par infusion

Dans le tableau (IV-6), nous présentons les résultats des rendements d'extraction par infusion effectuée dans cette étude.

*Tableau IV-6: Les rendements en pourcentage massique (%)
de l'infusion des différents échantillons de thé.*

| Température d'infusion | Rendement (%) (thé vert) | | | Rendement (%) (thé rouge) | | | Rendement (%) (thé noir) | | |
|---------------------------|-----------------------------|-------|-------|------------------------------|-------|-------|-----------------------------|-------|-------|
| | 3 min | 5 min | 7 min | 3 min | 5 min | 7 min | 3 min | 5 min | 7 min |
| 75°C | 5,2 | 6,8 | 9,4 | 3,2 | 5,4 | 5,6 | 2,8 | 3,6 | 5,6 |
| 80°C | 5,8 | 7,8 | 10,2 | 4 | 6,4 | 7,4 | 5,2 | 5,8 | 6,8 |
| 85°C | 5,8 | 9 | 11,2 | 4,8 | 7,8 | 10,2 | 5,2 | 6,2 | 7,4 |

IV-3- Discussion

IV-3-1- Concentrations de la catéchine dans les échantillons de thé

- Selon le type de thé

Les concentrations de la catéchine du thé vert sont les plus élevées par rapport au thé rouge et noir, pourtant ils n'ont pas la même origine (le thé vert d'origine chinoise, le thé rouge est d'origine de l'Inde et le thé noir est d'origine du Vietnam). On explique cette différence par le processus de fermentation réalisé durant le procédé de fabrication; le thé vert est non fermenté, le thé rouge est semi fermenté et le thé noir est fermenté.

La fermentation réduit d'une façon significative les niveaux des catéchines. Ce processus permet l'oxydation par l'enzyme: polyphénoloxydase et la condensation des catéchines en des molécules polyphénoliques comme les théaflavines et les théarubigines qui sont les polyphénols et les antioxydants majoritaires dans le thé rouge et le thé noir, et comme la fermentation pour obtenir les thés noirs est plus poussée que celle effectuée pour

les thés rouges, nous remarquons une décroissance remarquable des teneurs de la catéchine dans les variétés de thé (vert, rouge et noir) dans cet ordre.

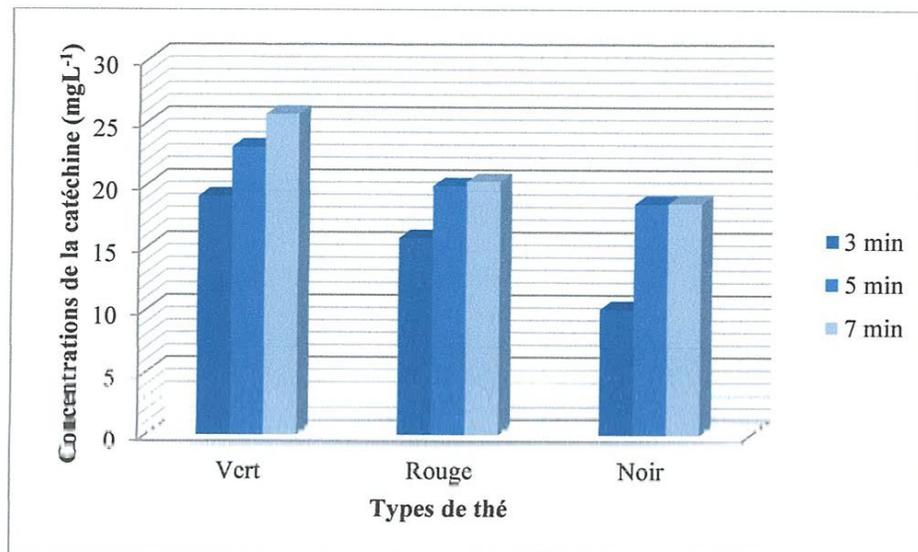


Figure IV-6: Variation des concentrations de la catéchine dans les échantillons de thé vert, rouge et noir à différents temps et à 80°C.

• Selon la température d'infusion

Les concentrations de la catéchine dans les échantillons de thé augmentent en fonction de la température dans tous les temps d'infusion.

Ainsi, nous avons trouvé les concentrations au temps 7 min:

- A la température 75°C: 24,33 , 17,78 et 17,39 mg L⁻¹ pour le thé vert, rouge et noir respectivement.
- A la température 80°C: 25,65 , 19,88 et 18,51 mg L⁻¹ pour le thé vert, rouge et noir respectivement.
- A la température 85°C: 27,96 , 21,3 et 20,96 mg L⁻¹ pour le thé vert, rouge et noir respectivement.

Nous pouvons dire que la température est un facteur important dans l'infusion du thé pour augmenter la solubilité de la catéchine dans l'eau.

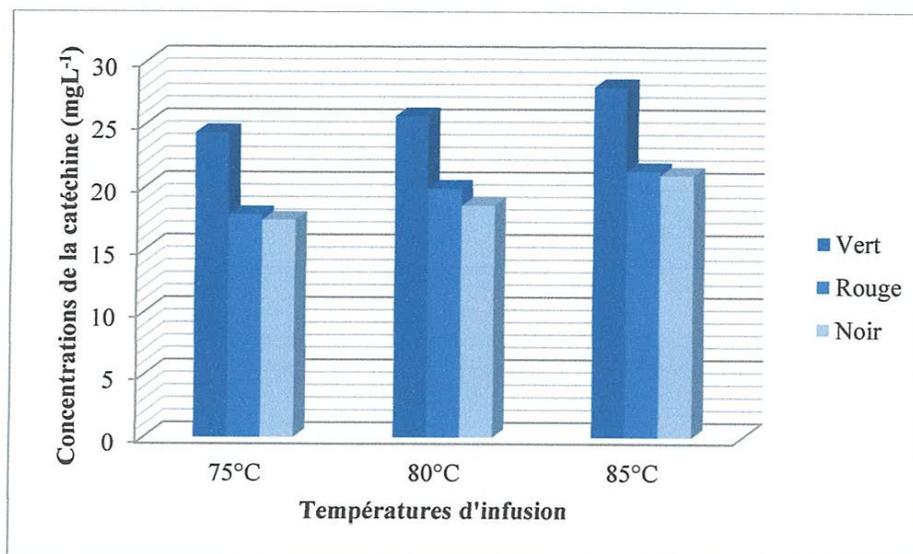


Figure IV-7: Variations des concentrations de la catéchine dans les échantillons de thé vert, rouge et noir en fonction de température d'infusion, au temps 7min.

- Selon la durée d'infusion

La durée d'infusion a une influence significative sur les teneurs de la catéchine, ainsi au fur et à mesure que le temps d'infusion augmente, les concentrations augmentent quel que soit le type de thé et la température d'infusion.

Pour une infusion de 3 min à une température de 75°C, les valeurs sont respectivement: 17,23, 14,31 et 8,64 mg L⁻¹, pour le thé vert, rouge et noir.

A 5 min et pour la même température (75°C) d'infusion, les teneurs en ce principe actif ont augmenté jusqu'à 21,12, 17,23 et 15,66 mg L⁻¹ pour le thé vert, rouge et noir respectivement. Enfin, pour une infusion de 7 min de durée, nous avons trouvé les valeurs suivantes: 24,33 mg L⁻¹ pour le thé vert, 17,78 mg L⁻¹ pour le thé rouge et 17,39 mg L⁻¹ pour le thé noir.

La même remarque pourra être faite pour les autres températures (80 et 85°C) c-à-d, en fixant la température et variant la durée d'infusion, la concentration de la catéchine augmente.

Ce qui nous amène à conclure que la durée d'infusion est un autre facteur important pour la diffusion de la catéchine dans l'eau.

Références