

UNIVERISTÉ – BLIDA 1-

Faculté des sciences de la nature et de la vie

Département Agro-alimentaire

THESE DE DOCTORAT

En Sciences Agronomiques

**ROLE DES ANTIOXYDANTS CONTRE LE STRESS OXYDATIF
PROVOQUE CHEZ LE RAT**

Présenté par :

Zoheir AMROUCHE

Devant le jury composé de :

A. BADIS	Pr., U. Blida 1	Président
D. ELHADI	Pr., U. Blida 1	Directeur de thèse
K. BENRACHEDI	Pr., U. M. B. Boumerdes	Examineur
K. LOUHAB	Pr., U. M. B. Boumerdes	Examineur
D. DJENANE	Pr., U. Tizi ouzou	Examineur
S. MEGATLI	MCA., U. Blida	Examineur

Blida le, 20 Avril 2019

REMERCIEMENTS

Je remercie, incessamment, le bon Dieu qui m'a accordé courage, patience et volonté pour pouvoir verser cette goutte dans l'océan de la science.

La réalisation de cette thèse a été favorisée par un homme exceptionnel, Pr. El HADI Djamel, Professeur à l'université Blida 1, qui a appris vite le plaisir au travail est un concept réel. Leurs capacité de motivation, sans pression aucune, et surtout de valorisation sont absolument stupéfiantes! Merci pour ce respect et ce soutien.

Mes sincères remerciements à tous les membres du comité du jury, Pr. BADIS ABDELMALEK., Professeur à l'université Blida 1, Pr LOUHAB Krim, professeur à l'université M'hamed Bouguera - Boumerdes, Pr BENRACHEDI Khaled, professeur à l'université M'hamed Bouguera – Boumerdes, Pr. DJENANE Djamel, Professeur à l'université Tizi ousou et Dr. MEGATLI Smain, MCA à l'université Blida1, pour leurs efforts, leur contribution et leurs commentaires précieux non seulement dans l'amélioration de ma thèse, mais également dans le savoir-faire scientifique : «Vous me faites l'honneur de juger ce travail et je vous en remercie ».

Je tiens à remercier Pr. BITAM AREZKI, Professeur à l'ENSA El Harrach, pour son aide ces idées scientifiques remarquable, durant tout la période de la thèse.

Je tiens à remercier Pr. BLECKER Christophe, directeur de laboratoire Sciences alimentaire et Formulation Agro-biotech université liège-Belgique, qui m'a ouvert une porte de lumière vers la science et la recherche, sans oublier les techniciens de laboratoire Vanesa Ardito, Sandrino et Line. Pour leurs aides et leurs sympathies

Je remercie chaleureusement Pr Marie Laure Faucounier, directrice de laboratoire Chimie organique- Agro-biotech université liège-Belgique et je lui exprime toute mon amicale et immense reconnaissance de m'avoir accueillie dans son laboratoire avec gentillesse et bienveillance, ainsi que pour ses qualités intellectuelles et l'enthousiasme communicatif dont elle sait faire preuve. C'est à la fois un privilège et une expérience exceptionnelle d'avoir pu bénéficier de ses conseils.

Je tiens à remercier Pr. AOUABED ALi, directeur de laboratoire d'analyse fonctionnelle des procédés chimiques pour sa collaboration, ces encouragements et ces orientations.

Je n'oserai guère laisser passer inaperçue une personne qui m'a aidé tout au long de mon stage pratique au laboratoire Chimie organique - Agro-biotech université liège-Belgique, des personnes qui n'ont cessé une seconde à me faciliter le difficile, pour avoir été là dès qu'il le fallait malgré toutes leurs responsabilités, et pour toute aide précieuse je vous remercie infiniment Mr. Danny Trisman et Vanesa pour tout ce que vous m'avait apporté.

Je tiens à remercier les responsables de laboratoire de biochimie et anatomie des hôpitaux de Frantz Fanon –Blida et mutapha Pacha-Alger, qui m'ont toujours aidé activement dans les analyses et leur connaissances ont été sincèrement très appréciées.

Et à tous ceux que j'aurais oubliés bien involontairement, merci !

Dédicace

*Je dédie cet humble travail à mes chers parents,
Au plus beau cadeau que le bon dieu m'a offert
Et à qui je dois tant, ma fille CHAIMA,*

A

Ma femme

A mon frère Nabil,

Mes tantes et mes oncles,

A mes cousins et cousines,

A mes amis : Abdelnour, Dr Sakhane, Sofiane, Dahmane, mohamed, Miloud ...

Zoheir

ملخص

الكاتيكينات هي جزيئات نشطة بيولوجيًا تجذب انتباه العلماء بسبب أنشطتها المتعددة المضادة للأكسدة، العلاجية والبيولوجية. تتمثل في استخراج مادة البوليفينول من أوراق الشاي الأخضر *Camellia sinensis* L. عن طريق الموجات فوق الصوتية ، و البحث عن بعض الجوانب العلاجية.

إن استخراج الكاتيكينات بواسطة الموجات فوق الصوتية وتحديد الجزيئات النشطة بيولوجيا بواسطة LC-MS، يسمح لنا للتطبيق على جسم حي ، يتم إجراء اختبار التسمم على الفئران ، ونشاط التخسيس على الأرانب ودراسة سامة للخلايا على جرذان إناث في حالة نمو ب 125 ± 5 غرام من الوزن ، تليها دراسة نسيجية للكبد ، وكذلك لرؤية تأثير الكاتيكينات على معاملات التأكسد (MDA، GSH، GPx). في المختبر، تم البحث على النشاط المضاد للأكسدة بواسطة اختبار DPPH ، دراسة لزراعة الخلايا الكبدية للجرذان لمعرفة أثر معاملات التأكسد على تراكم الدهون داخل الخلايا ، ورؤية تأثير الكاتيكينات UE (95م° ، 15 د) على القدرة الكبدية. يبقى البحث عن النشاط المضاد للجراثيم والفطريات ضروريًا.

حددت النتائج التحليلية للجزيئات النشطة حيويًا من الكاتيكينات بواسطة LC-MS ، بما في ذلك Epigallocatechin gallate (EGC) بمقدار 60.1 %، أن هذه الجزيئات المضادة للأكسدة والحيوية ليست سامة وفقا لجرعات 400 و 600 ميكروغرام / مل من الكاتيكينات UE (95 م° ، 15 د) حيث لها نشاط مضاد للأكسدة قوي جدا ، و كذلك تأثير على التخسيس ، ونشاط مضاد للبكتيريا فعال جدا ، ولكن لا نشاط مضاد للفطريات.

أثبتت الدراسة السامة للخلايا على نمو جرذان إناث ، متبوعة بدراسة نسيجية ، أن جرعة 800 ميكروغرام / مل من المادة السامة، وجود معاناة الكبد مع تغير في اللون. تظهر حصيلة الدهون فرقا كبيرا للغاية ($p < 0.05$) بالنسبة لجرعة 800 ميكروغرام / مل ، والتي لها تأثير موالى للأكسدة. الكاتيكينات UE (95 م° ، 15 د) له تأثير ضئيل ($p > 0.05$) على معاملات التأكسد (MDA و GSH و GPx) على كبد الجرذان الإناث في حالة نمو للجرعات 400 و 600 ميكروغرام / مل ، لكن تأثير مهم للغاية ($P < 0.05$) لجرعة 800 ميكروغرام / مل.

كشفت دراسة زراعة الخلايا للكاتيكينات على الخلايا الكبدية للجرذان عن حماية أفضل لوقاية الكبد ، مع تقييم جيد لتراكم الدهون داخل الخلايا لجرعات 400 و 600 ميكروغرام / مل في وجود عامل الأكسدة t-BHP

□ إن استخدام كاتيكينات الشاي الأخضر كعلاج طبيعي فعال جداً ، يسمح بالعودة إلى الصيدلة التقليدية لاستخدام هذه الجزيئات في صناعة المستحضرات الصيدلانية.

كلمات الرئيسية: نشاط التخسيس، جرذان، الكاتيكينات، نشاط مضاد للأكسدة، الجهد التأكسدي، نشاط مضاد للجراثيم *Camellia sinensis*.

RESUME

Les catéchines sont des molécules bioactive attire l'attention des scientifiques en raison de leurs multiples activités antioxydants, thérapeutiques et biologiques. Consiste à extraire des polyphénols des feuilles du thé vert *Camellia sinensis* L. par ultrason, et de recherché quelque aspect thérapeutique.

L'extraction des catéchines par ultrason et identification des molécules bioactive par LC-MS. *In-vivo* on réalise un test de toxicité sur souris, et l'activité amincissante sur lapin et une étude cytotoxique sur des rat femelles en croissance de 125 ± 5 g de poids, suivi d'une étude histologique de foie, ainsi de voir l'effet des catéchines sur les paramètres du stress oxydatif (MDA, GSH, GPx) . *In-vitro* la recherche de l'activité antioxydant par test de DPPH, une étude de culture cellulaire d'hépatocyte de rat pour voir l'impact du stress oxydant sur l'accumulation des lipides intracellulaire , ainsi de voir la capacité hépato protectrice des catéchines UE (95°C, 15min). La recherche de l'activité antibactérienne et antifongique reste nécessaire.

Les résultats analytiques ont identifié les molécules bioactive de catéchines par LC-MS, dont l'Epigallocatechine gallate (EGCG) de l'ordre de 60.1%. Ces molécules antioxydant et bioactive sont pas toxique selon les doses de 400 et 600 µg/mL des catéchines UE (95°C, 15min) et possède une activité antioxydant très puissante, un effet amincissant, et une activité antibactérienne très efficace, mais pas d'activité antifongique.

L'étude cytotoxique sur des rats femelles en croissance suivi d'une étude histologique a démontré que la dose de 800 µg/mL est toxique : présence d'un foie souffrant avec un changement de couleur. Le bilan lipidique présente une différence hautement significative ($p < 0.05$) pour la dose de 800 µg/mL, dont elle présente un effet pro oxydant. Les catéchines UE (95°C, 15min) présente un effet non significative ($p > 0.05$) sur les paramètres des stress oxydatif (MDA, GSH et GPx) sur les foies des rats femelles en croissance pour les doses de 400 et 600 µg/mL, or que hautement significative ($p < 0.05$) pour la dose de 800µg/mL.

L'étude de culture cellulaire des catéchine sur hépatocyte de rat a révélé une meilleur protection hépato protectrice, avec une bonne évaluation de l'accumulation de lipide intracellulaire pour les doses de 400 et 600 µg/mL en présence d'un facteur responsable de stress le *t*-BHP.

L'application des catéchines du thé vert comme un remède naturel est très efficace, qui permet un retour à la pharmacie traditionnelle d'utiliser ces molécules dans l'industrie pharmaceutique.

Mots clés: stress oxydatif ; Rats ; *Camellia sinensis* ; Ultrason ; Catéchines ; Activité antioxydants ; Activité amincissante ; activité antibactérienne.

ABSTRACT

Catechins are bioactive molecules exhibiting a lot of scientific attention due to their multiple activities antioxidants, therapeutic and biological. Consists on extract polyphenols from green tea *Camellia sinensis* L. by ultrasound, and search some therapeutic.

Ultrasonic extract catechins and identification of bioactive molecules with LC-MS. *In-vivo* we realize a test of toxicity on mouse, and the slimming activity on rabbit and a study cytotoxic on rat females increasing by 125 ± 5 g of weight, followed by a histological study of liver, so to see the effect of catechins on the parameters of the oxidative stress (MDA, GSH, GPx). *In-vitro* the search for the antioxidant activity by test of DPPH, a study of cell culture of hepatocyte of rat to see the impact of the stress oxidizing on the intracellular accumulation of lipids, so to see the hépato protective capacity of the catechins extracts from some green tea. The research for the antibacterial and antifungal activity remains necessary.

The analytical results have identify molecules bioactive of catechins by LC-MS, of whom the Epigallocatechine gallate (EGCG) of the order of 60.1 %. These molecules antioxidant and bioactive are not toxin according to the doses of 400 and 600 $\mu\text{g} / \text{mL}$ catechins UE (95°C, 15min) and possess an activity antioxidant very powerful, a slimming effect, and a very effective antibacterial activity, but no antifungal activity.

The study cytotoxic on rats growing females followed by a histological study demonstrated that the dose of 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ is toxic: presence of a liver sulphurating with a change of color. The lipid balance sheet presents a highly significant difference ($p < 0.05$) for the dose of 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$, an effect prooxidizing. Catechins UE (95°C, 15min) presents an effect not significant ($p > 0.05$) on the parameters of the oxidative stress (MDA, GSH and GPx) on the livers of rats growing females for the doses of 400 and 600 $\mu\text{g} / \text{mL}$, yet that highly significant ($p < 0.05$) for the dose of 800 $\mu\text{g} / \text{mL}$.

The study of cell culture of the catechin on hépatocyte of rat revealed better one protection protective hépato, with a good evaluation of the accumulation of intracellular lipid for the doses of 400 and 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in the presence of a factor responsible for stress the t-BHP.

The application of the catechins of the tea green as a natural remedy is very effective, who allows a return the traditional pharmacy to use these molecules in the pharmaceutical industry.

Keywords: Oxidative stress; Rats ; *Camellia sinensis* ; Ultrasonic ; Catechins ; Antioxidant activity ; slimming activity ; antibacterial activity.

TABLE DES MATIERES

RESUME

REMERCIEMENTS

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ILLUSTRATIONS GRAPHIQUES ET TABLEAUX

INTRODUCTION	16
1. LE THE	19
1.1. Présentation de <i>Camellia sinensis</i>	19
1.1.1. Historique	19
1.1.2. <i>Origine du Camellia Sinensis</i>	20
1.2. Le thé au monde	21
1.2.1. Marché international du thé vert	21
1.2.2. Processus de fabrication	22
1.2.3. Le thé en Algérie	22
1.3. Composition des feuilles de thé	23
1.3.1. La paroi cellulaire	23
1.3.1.1. Les celluloses	23
1.3.1.2. Les hémicelluloses	24
1.3.1.3. Les substances pectiques	24
1.4. Composition chimique des polyphénols du thé	25
1.4.1. Description générale des polyphénols du thé vert	26
1.4.2. Propriétés biochimiques des polyphénols du thé vert	26
1.5. Les vertus thérapeutiques du thé	27

2. STRESS OXYDATIF	28
2.1. Définition	28
2.2. Origine du stress	28
2.3. Les radicaux libres	29
2.3.1. Définition	29
2.3.2. Principaux radicaux libres	29
2.3.3. Origine des radicaux libres	29
2.4. Les conséquences du stress oxydant	30
2.5. Les antioxydants	31
2.5.1. Définition	32
2.5.2. Les antioxydants endogènes	32
2.5.3. Les antioxydants naturels	33
2.6. Stress oxydant hépatique et dysfonctions mitochondriales	35
2.6.1. Stress oxydant hépatique	35
2.6.1.1. Peroxydation lipidique	35
2.6.1.2. Inflammation	36
2.6.1.3. Fibrose	36
2.6.1.4. Adipokines et inflammation adipocytaire	37
2.6.2. Dysfonctions mitochondriales	37
3. MECANISME D’ACTION BIOLOGIQUE DES CATECHINES	40
3.1. La biodisponibilité des catechines du thé vert	40
3.2. Action des catéchines dans l’organismes	41
3.2.1. Concentration plasmatique	41
3.2.2. Concentration hépatique	42

3.3. Mécanisme d'action de l'EGCG	44
3.4. Activité anti-cancérogène	45
3.4.1. La signalisation cellulaire dans le cancer	45
3.4.2. Inhibition de tumorigenèse et mécanisme possible	46
3.4.3. Méthylation de l'ADN et comparaison entre cellule normale et tumorale	47
3.4.4. Impacte de l'EGCG sur l'expression de l'ARN	49
4. LES DIFFERENTS PROCEDES D'EXTRACTION	51
4.1. La distillation	51
4.1.1. La distillation à la vapeur, ou hydrodistillation	51
4.1.2. La distillation à la vapeur saturée ou Entraînement à la vapeur d'eau	52
4.1.3. Hydrodiffusion	52
4.2. Extraction par les solvants volatils	53
4.3. Extraction par micro-ondes	54
4.4. Extraction au CO2 supercritique	54
4.5. Extraction par ultrasons	55
4.5.1. Les facteurs influençant l'extraction par ultrasons	56
4.5.2. Equipement ultrasons de laboratoires	58
4.5.3. Ultrasons en technologie de transformation	59
4.5.4. Ultrasons en technologies d'extraction	59

5. MATERIEL ET METHODES	61
5.1. Matériel	61
5.1.1. Matériel végétal	61
5.1.2. Matériel animale	61
5.1.3. Matériel biologique	62
5.1.4. Matériel de laboratoire	62
5.1.4.1. Appareillage	62
5.1.4.2. Réactifs et milieux de cultures	62
5.2. Méthodes	63
5.2.1. Méthodes d'extraction des catéchines du thé vert <i>Camillia sinensis</i>	63
5.2.1.1. Extraction par ultrason (UE)	63
5.2.1.2. Extraction par agitation mécanique (MAE)	64
5.2.2. Analyses des extraits aqueux du thé vert	65
5.2.2.1. Dosage des polyphénols totaux	65
5.2.2.2. Dosage des flavonoïdes	66
5.2.3. Identification chromatographiques des catéchines	67
5.2.3.1. HPLC-DAD	67
5.2.3.2. LC-MS	68
5.2.4. Analyses biologiques	69
5.2.4.1. Activité antioxydante	69
5.2.4.1.1. Test de DPPH	69

5.2.4.1.2. Test FRAP	70
5.2.4.2. Activité antimicrobienne	71
5.2.5. Etude toxicologique	74
5.2.5.1. Test DL ₅₀	74
5.2.5.2. Test de toxicité	74
5.2.6. Etude cytotoxique des catéchines sur les paramètres lipidiques chez les rats femelles en croissance	75
5.2.6.1. Mesures pondérales	76
5.2.6.1.1. Poids corporels	76
5.2.6.1.2. Poids du foie	76
5.2.6.1.3. Indice hépato somatique (IHS)	76
5.2.6.2. Etude biochimique.	77
5.2.6.2.1. Dosage du cholestérol total	77
5.2.6.2.2. Dosage de triglycérides	78
5.2.6.2.3. Dosage des lipides totaux	79
5.2.6.3. Etude histologique	80
5.2.7. Etude des Catéchines UE (95°C, 15min) sur les paramètres du stress oxydatif chez les rats femelles en croissance	82
5.2.7.1. Dosage des malondialdéhyde (MDA)	82
5.2.7.2. Dosage de glutathion réduit (GSH)	83
5.2.7.3. Dosage de l'activité du glutathion peroxydase (GPx)	84

5.2.8. Etude des Catéchines sur l'activité amincissante chez les lapins	86
5.2.9. Etude des catéchines extrait du thé vert sur culture cellulaire d'hépatocytes de rat	87
5.2.9.1. Mesures de la viabilité cellulaire	89
5.2.9.1.1. Test MTT	89
5.2.9.1.2. Test rouge neutre	89
5.2.9.2. Mesure de l'impédance cellulaire	90
5.2.9.3. Mesures par microscopie à fluorescence	91
5.2.9.3.1. Test LipidTox	91
5.2.9.3.2. Test MitoSox	92
5.2.9.3.3. Test TMRE	93
5.2.10. Analyse statistique	95
6. RESULTATS ET DISCUSSION	96
6.1. Résultats d'analyses des extraits aqueux UE et MAE du thé vert	96
6.1.1. Les polyphénols totaux	96
6.1.2. Les flavonoïdes	97
6.2. Résultats des tests biologiques	98
6.2.1. Activité antioxydante	98
6.2.1.1. Test de DPPH	98
6.2.1.2. Test de FRAP	100
6.2.2. Activité antimicrobienne	102

6.3.	Résultats d'identification des catéchines par HPLC et par LC-MS	103
6.4.	Etude toxicologique	106
6.4.1.	Test DL ₅₀	106
6.4.2.	Test de toxicité	107
6.5.	Etude cytotoxique des catéchines sur les paramètres lipidiques chez les rats femelles en croissance	109
6.5.1.	Effets des catéchines sur le poids	109
6.5.1.1.	Poids corporel	109
6.5.1.2.	Poids du foie	110
6.5.1.3.	Indice hépatosomatique (IHS)	111
6.5.2.	Effet des catéchines sur les paramètres biochimiques lipidiques	112
6.5.2.1.	Cholestérol total	112
6.5.2.2.	Triglycérides	113
6.5.2.3.	Lipides totaux	115
6.5.3.	Effets des catéchines sur les tissus hépatiques	116
6.6.	Etude des Catéchines UE (95°C, 15min) sur les paramètres du stress oxydatif chez les rats femelles en croissance	117
6.6.1.	Concentration de malondialdéhyde (MDA)	117
6.6.2.	Concentration de glutathion réduit (GSH)	118
6.6.3.	Activité du glutathion peroxydase (GPx)	119

6.7. Etude des Catéchines sur l'activité amincissante chez les lapins	120
6.8. Etudes des catéchines sur culture cellulaire d'hépatocyte de rat	122
6.8.1. Effet des catéchines sur les lipides intra cellulaire hépatique	122
6.8.2. Capacité antioxydante et hépatoprotéctrice des catéchines du thé	125
6.9. Discussion Générale	130
CONCLUSION	137
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	
APPENDICES	

LISTE DES ILLUSTRATIONS GRAPHIQUES ET TABLEAUX

Figures

Figure 1.1 : Les variétés de <i>Camellia Sinensis</i>	20
Figure 1.2 : Répartition de la production mondiale du thé en 2016	21
Figure 1.3 : Processus de fabrication des différents types de thés	22
Figure 1.4 : Les structures moléculaires des catéchines du thé vert	26
Figure 2.1 : Stress oxydant hépatique et dysfonctions mitochondriales	39
Figure 3.1 : Métabolisme des catéchines du thé dans l'organisme	43
Figure 3.2 : Mécanisme d'actions de l'EGCG	47
Figure 3.3 : Les différents profils de méthylation d'ADN et la modification des histones entre les cellules normales et tumorales	49
Figure 3.4 : L'impact de l'EGCG sur l'expression de microARN (ARN _{mi})	50
Figure 4.1 : Domaine d'utilisation des ultrasons en fonction de la fréquence	56
Figure 4.2 : Schéma des dispositifs à ultrasons : bac et sonde	58
Figure 4.3 : Mécanisme de dommage cellulaire par ultrasons	59
Figure 5.1 : Thé vert <i>Camellia sinensis</i> L. (photo originale)	61
Figure 5.2 : L'acide gallique (Acide 3,4,5 hydroxybenzoïque)	66
Figure 5.3 : Réduction du radical DPPH	69
Figure 5.4 : Les expérimentations des études cellulaire	94
Figure 6.1 : Teneur des polyphénols totaux en mg EAG/g du thé vert	96
Figure 6.2 : Teneur en flavonoïdes en mg EQ/g du thé vert	98
Figure 6.3 : L'activité antioxydante des catéchines extraite UE et MAE	99
Figure 6.4 : Comparaison de l'activité antioxydante des catéchine UE (95°C, 15 min) avec BHT	99
Figure 6.5 : Activité antioxydante FRAP	101
Figure 6.6 : Chromatograms LC-MS de MAE et UE (95°C, 15 min)	104
Figure 6.7 : Les spectres de masse des molécules obtenues par LC-MS	105
Figure 6.8 : Evolution de poids corporel en fonction des doses de catéchines	110
Figure 6.9 _a : Foie des rats après 28 jours de traitement	110
Figure 6.9 _b : Evolution de poids du foie en fonction des doses de catéchines	111
Figure 6.10 : Evolution de l'IHS en fonction des doses des catéchines	112
Figure 6.11 : Concentration plasmatique en cholestérol chez les rats traités par les catéchines UE (95°C, 15min) pendant 28 jours	112

Figure 6.12 : Concentration plasmatique en triglycérides chez les rats traités par les catéchines UE (95°C, 15min) pendant 28 jours	114
Figure 6.13 : Concentration plasmatique en lipides chez les rats traités par les catéchines UE (95°C, 15min) pendant 28 jours	115
Figure 6.14 : Histologie des foies des rats femelles en croissance traités par les catéchines UE (95°C, 15 min)	117
Figure 6.15 : Concentrations de Malondialdéhyde (MDA) chez les rats traités pendant 28 jours	118
Figure 6.16 : Concentrations de glutathion réduit (GSH) chez les rats traités pendant 28 jours	119
Figure 6.17 : Activité du glutathion peroxydase chez les rats traités pendant 28 jours	120
Figure 6.18 : La perte du poids des lapins en fonction temps	121
Figure 6.19 : La diminution de l'accumulation de lipides dans les hépatocytes isolés de rat	123
Figure 6.20 : Analyse micrographique Lipid Tox des hépatocytes de rat	124
Figure 6.21 : Test de viabilité cellulaire	126
Figure 6.22 : La fonctionnalité mitochondrial	127
Figure 6.23 : Analyse micrographique MitoSox des hépatocytes de rat	128
Figure 6.24 : L'effet de catéchines sur la production de l'anion superd'oxyde mitochondrial (O_2^-), ainsi sur la fonctionnalité mitochondrial	129

Tableaux

Tableau 1.1 : Composition chimique des polyphénols des feuilles de thé vert	25
Tableau 5.1 : Debit des gradients de phase mobile de l'HPLC	68
Tableau 5.2 : Dosage du cholestérol total	77
Tableau 5.3 : Dosage des triglycérides	78
Tableau 5.4 : Récapitulatifs des volumes pour la préparation des solutions	79
Tableau 6.1 : Activité antimicrobienne des catéchines UE (95°C, 15min)	102
Tableau 6.2 : Les proportions Majeurs des Catéchines UE et MAE	104
Tableau 6.3 : Evaluation de la DL50 de différentes doses de catéchines UE (95°C, 15min)	107
Tableau 6.4 : Les résultats de l'étude toxicologique	108

INTRODUCTION

Le stress oxydant correspond à un déséquilibre entre la génération d'espèces oxygénées activées (ROS) et les défenses antioxydantes de l'organisme. L'oxygène, molécule indispensable à la vie, est susceptible d'entraîner des effets dommageables dans l'organisme via la formation de radicaux libres et d'espèces oxygénées activées (ROS). Notre mode de vie (tabagisme, alcoolisme, obésité, exercice physique intense), mais aussi nos mauvaises habitudes alimentaires, augmentent de façon anormale la production des ROS dans notre organisme. A long terme, ceci peut contribuer à l'apparition de diverses pathologies liées au vieillissement comme les cancers ou les maladies cardio-vasculaires. Dans un souci de prévention, il conviendra donc de disposer d'outils performants permettant d'évaluer correctement le statut de stress oxydant chez un individu afin d'apporter les corrections nécessaires pour optimiser nos défenses antioxydantes et diminuer les dommages oxydatifs induits par les ROS au niveau de l'ADN, des protéines et des lipides [1, 2].

Depuis des milliers d'années, le thé vert (*Camellia sinensis*) est utilisé comme plante médicinale pour la préservation et le rétablissement de la santé. L'importance de cette plante se reflète dans son large éventail de variétés, mais également dans la précieuse tradition entourant sa préparation et les divers accessoires l'accompagnant, qui par ailleurs occupent une place prépondérante au sein de l'histoire et la culture asiatique [3].

Le thé est la deuxième boisson la plus consommée au monde après l'eau [3]. Il a toujours fait partie de la médecine orientale depuis des millénaires et devient de plus en plus populaire en occident. Des études épidémiologiques ont rapporté un effet bénéfique du thé pour lutter contre les désordres hépatiques, possédant des propriétés hypolipémiantes. De plus, le thé possède des propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires permettant de lutter contre le stress oxydant [4].

Les récentes recherches sur les bienfaits du thé mettent surtout en avant l'activité antioxydants des catéchines qui préviendraient certains cancers (prostate, pancréas, colon, et rectum) par inhibition d'une enzyme, l'urokinase, nécessaire à la progression des tumeurs [5].

Les catéchines sont des molécules bioactive attire l'attention des scientifiques en raison de leurs multiples activités antioxydants, thérapeutiques et biologiques. Les antioxydants sont des substances dont la fourniture est obligatoire pour l'organisme. Les catéchines constituent aujourd'hui un vaste sujet de recherches et intéressent non seulement le chimiste, mais aussi les industries agroalimentaires par leurs effets conservateurs, mais aussi dans celui des cosmétiques et de la pharmacologie [6]. Les catéchines du thé vert *Camellia sinensis* agissent comme des antioxydants et préviennent les dommages causée par les radicaux libres sur les tissus. Ils protègent les gènes des effets mutagènes dus aux facteurs environnementaux [6, 7].

Actuellement, grâce au développement des méthodes d'extraction et des techniques d'identification moléculaire et biologiques, une meilleure connaissance de la composition des plantes d'importance alimentaire et des aliments qui en dérivent, du devenir de leurs principaux micronutriments après ingestion et des effets nutritionnels qui en découlent, est devenue possible. La recherche d'extraits végétaux riches en molécules à fort pouvoir antioxydant et la mesure de l'activité antioxydants dans différents milieux restent des domaines de recherche importants [8, 9].

Dans notre étude, nous nous intéressons aux catéchines du thé vert *Camellia sinensis*. Ces derniers ont été démontrés avoir des propriétés antioxydantes très bénéfiques et qui soupçonnent jouer un rôle important dans la biologie des vivants. A cet égard, des études sur le modèle animale ont été opérées et ont montré leurs effets bénéfiques qui commencent aujourd'hui à recevoir l'attention scientifique qu'elles méritent.

Pour ces effets, notre travail porte sur l'exploration de ces molécules bioactives antioxydants par le choix du procédé d'extraction des catéchines de *Camillia sinensis* du thé vert contenant un pouvoir antioxydant. Une comparaison entre l'extraction par agitation mécanique et ultrasonique avec variation temps et température. La lyophilisation de ces molécules extraites catéchines (polyphénols totaux) du thé vert est nécessaire, afin de conserver ces molécules bioactives et de garder leurs pouvoir antioxydant, dont l'objective de réaliser des études :

- *in-vitro* : des analyses phytochimiques dont le dosage des polyphénols et flavonoïdes, une identification chromatographique des catéchines par HPLC-DAD et LC-MS. L'activité antioxydant a été recherchée par différentes méthodes : test de DPPH, et le test FRAP.
- *In-vivo* : une étude toxicologique est réalisée, ainsi une étude cytotoxique des catéchines sur les paramètres lipidiques chez les rats femelles en croissance, suivie d'une étude histologique.
- Effet des Catéchines UE (95°C, 15min) sur les paramètres du stress oxydatif (MDA, GSH et GPx) chez les rats femelles en croissance
- Etude de l'activité amincissante (amaigrissante) est réalisée sur lapins.
- Une culture cellulaire hépatocyte de rat qui nous permet de voir l'effet des catéchines sur les lipides intracellulaire hépatique, et d'évaluer la capacité antioxydant et hépato-protectrice des catéchines du thé par le test MitoSox et le test TMRE, ainsi de voir l'impact du stress oxydant sur l'accumulation de lipide hépatique.

Chapitre 1

LE THE

1.1. Présentation du thé «*Camellia sinensis* »

1.1.1. Historique

L'histoire du thé vert commence il y a environ 5000 ans en Chine. La légende raconte que c'est l'empereur Shennong (2.737 av. JC. aussi écrit Shen Nong) qui aurait découvert le thé en premier. A l'origine, il s'agissait d'arbres sauvages principalement dans la région montagneuse du sud de la Chine qui servaient à produire le thé. La découverte de son effet tonique et rafraichissant, mais aussi de ses puissantes propriétés médicinales ont participé au développement de son utilisation principalement par les moines bouddhistes, mais aussi par la classe supérieure chinoise.



L'empereur Shennong

Le thé vert arriva au Japon au VIIIème siècle, via des moines bouddhistes chinois. Ces moines auraient organisé des voyages dans ce but. Par ailleurs, il semblerait que des moines bouddhistes japonais seraient partis étudier «l'art du thé» en Chine. A leur retour, ces moines auraient participé à rendre l'implantation de cette culture possible dans l'archipel. Le bouddhisme et les propriétés particulières du thé vert ont donc joué et jouent encore à ce jour, un rôle important dans le développement de cette culture au sens large du terme.

La première trace d'existence de thé en Europe provient des écrits d'un voyageur arabe qui en 879 retirait à Canton ses principaux revenus des taxes sur le sel et sur le thé. C'est seulement au début du XVII siècle que les marchands hollandais facilitèrent l'approvisionnement du thé en Europe. Le premier chargement de thé arriva en Europe en 1610 via la Compagnie hollandaise des

Indes détenant le monopole du commerce européen avec l'Asie [9]. Le thé vert provient du sud-ouest de la Chine et a été utilisé comme une boisson dans la médecine en Chine, le Royaume-Uni de la Grande-Bretagne importait du thé vert de Chine depuis plus de 200 ans, vers 1830 les Britanniques ont découvert des plantes indigènes de thé noir dans leur colonie en Inde, où le travail a permis des plantations à grande échelle pour sa proximité avec l'Europe par la mer, il a également été moins cher à produire qu'à acheter du thé vert de Chine, les Britanniques ont donc cessé de consommer du thé vert au profit du thé noir, depuis, ils ont contrôlé la commercialisation mondiale de thé noir. Le développement et la diffusion de thé ont été étroitement associés aux problématiques de rendement productif et de conservation [9, 10].

1.1.2. Origine du *Camellia Sinensis*

L'arbre ou arbuste à thé, *Camellia Sinensis*, est à l'origine de tous les types de thés et les thés verts peuvent provenir des deux variétés *Sinensis* et *Assamica*. Le terme *Sinensis* indique l'origine géographique de la plante, en l'occurrence la Chine. De même, la variété *Assamica* prend son nom de la région d'Assam au Nord de l'Inde. Les thés de qualité supérieure viennent avant tout de la variété *Sinensis*. Il n'est pas encore fermement établi laquelle des deux variétés était réellement la variété de base de cette espèce, mais il semblerait que l'espèce d'origine soit le *Camellia Sinensis* provenant de la province de Yunnan en Chine [10].



Camellia Sinensis var. *Sinensis*



Camellia Sinensis var. *Assamica*

Figure 1.1 : Les variétés de *Camellia Sinensis* [11]

1.2. Le thé au monde

1.2.1. Marché international du thé vert

Actuellement, le thé est la boisson la plus consommée dans le monde après l'eau plate. La production mondiale a atteint 3 459 000 tonnes en 2005. Le thé vert est une des boissons les plus importantes dans le monde, il existe deux principaux types de thé, la production mondiale de thé vert (*Camellia sinensis var sinensis*) est d'environ 500 000 tonnes et le thé noir (*Camellia sinensis var assamica*) est d'environ 1,6 millions de tonnes [11].

Le thé vert a aujourd'hui été implanté dans 50 pays. Selon la FAO la production mondiale de thé vert en 2010 avoisinait les 900.000 tonnes. En comparaison avec l'année 2016, la production de thé toutes catégories confondues était d'environ 5.4 millions de tonnes (Figure 1.2). En 2000, la production mondiale de thé vert était de 681.000 tonnes, ce secteur a connu une croissance moyenne de 2,7% par an. Un rapport de la FAO datant de février 2012 prévoit que la production de thé vert, émanant surtout de chine, approcherait les 2.1 millions en 2021 [12].

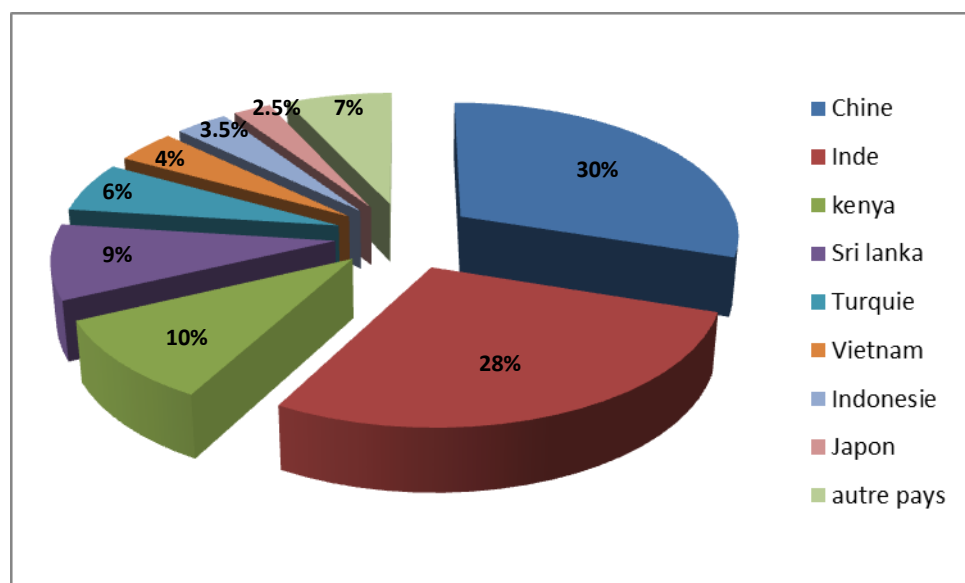


Figure 1.2 : Répartition de la production mondiale du thé en 2016 [13]

1.2.2. Processus de fabrication

Plus de 300 sortes de thé sont produites à partir des feuilles de *Camellia sinensis* et sont généralement réparties en cinq groupes principaux selon leurs processus de fabrication (Figure 1.3) et principalement en fonction du processus de fermentation des feuilles de thé [14]. À l'échelle mondiale, environ 78% des thés produits sont des thés noirs, 20% des thés verts et moins de 2% des thés blancs, oolong et puerh [13].

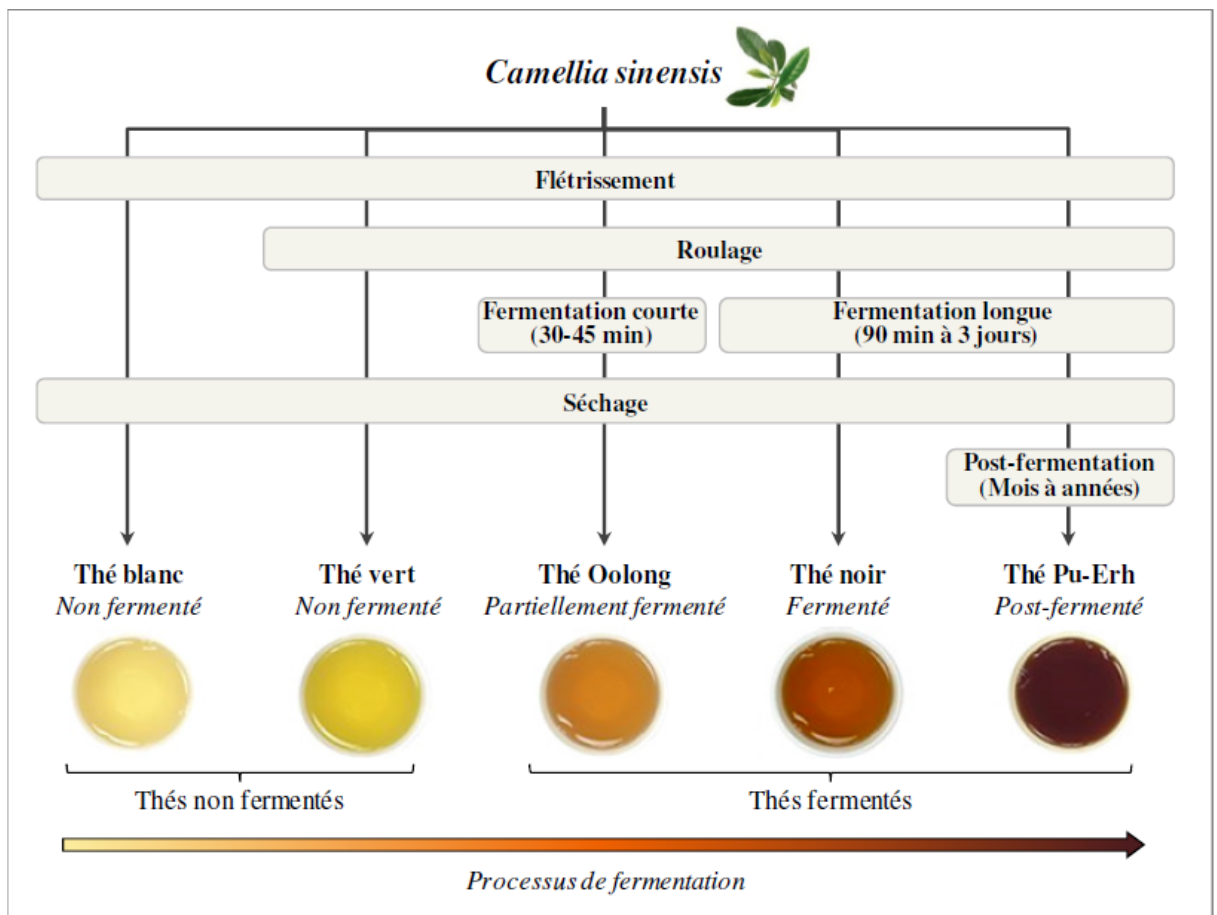


Figure 1.3. Processus de fabrication des différents types de thés [13]

1.2.3. Le thé en Algérie

Le marché du thé en Algérie a connu une croissance de 10% en termes de valeur et 5% en termes de volume en 2014. La vente du thé en Algérie a trouvé ses adeptes au sein de la population, au point d'en faire des émules parmi les consommateurs de café qui n'ont pas hésité à changer d'habitude devant cette

boisson qu'on dit propre aux gens du Sud. Ce sont justement les gens du Sud qui sont à l'origine de cette nouvelle activité commerciale qui se limitait, l'été, à la vente du thé sur les plages ou encore au carrefour d'une route. Aujourd'hui, avec l'ouverture de nouvelles échoppes de vente de thé, la consommation s'est ancrée dans les habitudes des jeunes gens et des moins jeunes.

Le thé a presque détrôné le café, surtout avec souvent la mauvaise qualité de ce dernier. El kheima, Timimoune, le Sahara, ou encore le thé du sud, sont autant d'appellations de commerces qui ont fleuri ces derniers temps.

1.3. Composition des feuilles de thé

Les feuilles de thé fraîches contiennent en règle générale 36 % de composés polyphénoliques, 25 % de glucides, 15 % de protéines, 6,5 % de lignines, 4 % d'acides aminés, 2 % de lipides, 1,5 % d'acides organiques, 0,5 % de chlorophylles et de caroténoïdes et enfin moins de 0,1 % de substances volatiles [15], ainsi que des éléments minéraux environ 3 %. Les éléments constitutifs de la paroi cellulaire représentent environ 45 % de la matière sèche des feuilles de thé [16].

1.3.1. La paroi cellulaire

La paroi cellulaire joue un rôle essentiel dans le contrôle des échanges entre l'eau et les feuilles. Les éléments constitutifs de la paroi cellulaire sont majoritairement des polysaccharides (celluloses, hémicelluloses, substances pectiques) ainsi que des protéines constituées d'acides aminés tels que la glycine, la lysine et la thréonine entre autres [16].

1.3.1.1. Les celluloses

Les celluloses regroupent un ensemble de polysaccharides de la série des β -D-glucanes. Les maillons D-glucopyranoses sont séparés entre eux par des liaisons glycosidiques de type β (1- 4), avec tous les groupements latéraux en

position équatoriale. Lors de leurs travaux réalisés en 1971, Selvandran et Perera (1971) ont trouvé 6,5 % de cellulose dans les feuilles de thé noir analysées [16].

1.3.1.2. Les hémicelluloses

Les hémicelluloses englobent tous les composés polysaccharidiques autres que la cellulose et les substances pectiques présents dans la paroi cellulaire. Les hémicelluloses sont intimement associées avec la cellulose. Les feuilles de thé contiennent 11,5 % d'hémicelluloses [16].

1.3.1.3. Les substances pectiques

Les pectines, découvertes en 1825 par Braconnot, représentent la troisième catégorie de polysaccharides. Elles tiennent leur nom du grec *Pectos* qui signifie coagulé [17]. Les pectines sont donc des polysaccharides qui ont en commun une forte teneur en acide galacturonique et sont constituées par trois types de polysaccharides de structure différente reliés entre eux par des liaisons covalentes. Ces polysaccharides sont [18] :

- les homogalacturonanes (HG) : polymères linéaires constitués de molécules d'acide α -D-galacturonique (GalA), en conformation chaise, liées en α (1-4) ;
- les rhamnogalacturonanes (RGI) : polymères constitués par la répétition du motif [(1→ 4)- α -D-GalA-(1→2)- α -L-Rha-] auquel peuvent être attachées des chaînes de type arabinane et galactane ;
- les rhamnogalacturonanes II (RGII) : polymères plus proches des HG avec des chaînes complexes rattachées au motif GalA.

Les pectines sont connues pour leur capacité de gélification et ainsi souvent utilisées dans l'industrie agro-alimentaire en tant que gélifiant. Selon le taux de méthylation des fonctions carboxyliques des acides galacturoniques constitutifs de la chaîne principale des pectines, la répartition des groupements méthyles le long de la chaîne principale joue un rôle important dans les processus de gélification [17,19].

Les pectines sont assimilables à des polyélectrolytes (présence de groupements carboxyliques) plus ou moins solubles dans l'eau en fonction de la température, de leur degré d'estérification et de leur état d'ionisation, en fonction du pH notamment et de la présence de cations mono-, di- ou trivalents. Les feuilles de thé contiennent environ 10 % de pectines [17].

1.4. Composition chimique des polyphénols du thé

Le thé vert est un produit contenant des polyphénols riche en catéchines, qui lui confèrent des propriétés particulières. Ces catéchines sont répartis dans le thé vert voir tableau 1.1. L'analyse du thé vert par HPLC a révélé que l'épigallocatechine-3-gallate EGCG est le constituant polyphénolique majeur environ 60% des catéchines totales, ce qui représente 10% du poids sec [20], suivi de l'épigallocatechine EGC (19%), l'épicatéchine-3-gallate ECG (13,6%) et l'épicatéchine EC (6,4%) [21].

Tableau 1.1 : Composition chimique des polyphénols des feuilles de thé vert [20, 21]

Polyphénols	Pourcentage (%)	
Epicatéchine (EC)	1.3	6.4
Epicatéchine gallate (ECG)	18.1	13.6
Epigallocatechine (EGC)	12.5	19
Epigallocatechine gallate (EGCG)	58.1	60
Autre	10	1

Cette composition permet au thé vert d'avoir les effets bénéfiques sur la santé, notamment en ce qui concerne l'hypertension, les caries dentaire, les problèmes cardiovasculaire, et les cancers [22]. En outre, le thé vert contient d'autres polyphénols tels que l'acide gallique, la quercétine, le kaempférol, myricétine et leurs glycosides, mais en concentration plus faible [23, 24].

La composition du thé vert est très stable dans son état sec. La durée de conservation des polyphénols est supérieure à 1 année dans un endroit sec et peuvent être oxydés en 30 minutes dans l'eau [25].

1.4.1. Description générale des polyphénols du thé vert

Le thé vert est un excellent complément alimentaire. Il contient un certain nombre de composés chimiques bioactifs et est particulièrement riche en polyphénols [21]. Ces derniers existent dans tout le végétal (racines, tiges, feuilles et fleurs) mais les feuilles en contiennent la plus grande proportion environ 30% du poids sec [26]. De nos jours, l'attention a été accordée à la promotion de santé des effets des extraits du thé vert [27]. Sa consommation régulière était revendiquée pour réduire l'incidence d'une variété de maladies. Cependant, le marché des suppléments de thé vert est en pleine croissance en raison de la grande réputation d'avoir des effets favorables sur la santé [28,29].

1.4.2. Propriétés biochimiques des polyphénols du thé vert

Beaucoup d'études ont montré que la plus part des polyphénols du thé vert sont des flavanols, communément appelés catéchines. Ces derniers sont stockés dans les vacuoles des cellules [28,30]. L'activité antioxydante des polyphénols dépend étroitement de leurs structures moléculaires, en particulier, le nombre des groupements hydroxyle. La figure 1.4 montre la structure moléculaire des 4 majeurs polyphénols du thé vert donnée par Peters et al. (2010) [31].

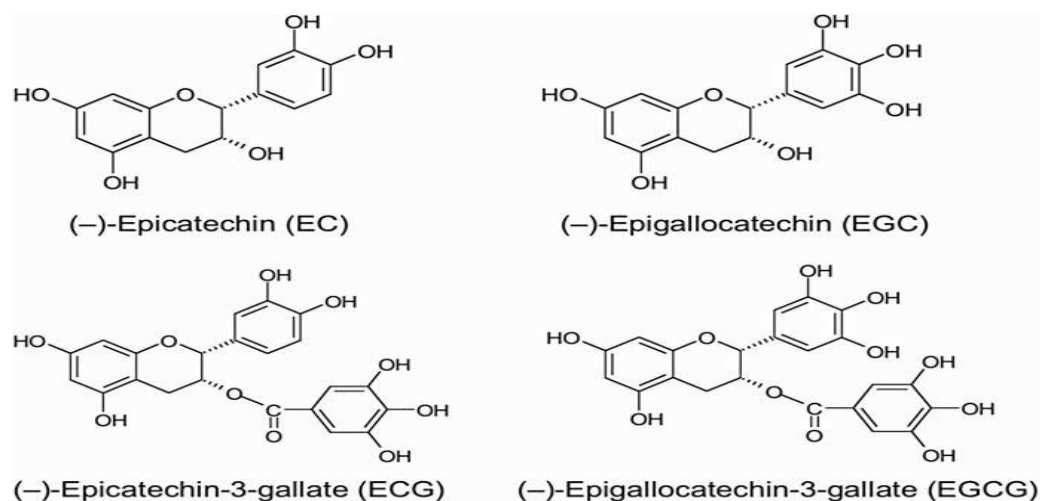


Figure 1.4 : Les structures moléculaires des catéchines du thé vert [31]

Les catéchines du thé, dans des solutions aqueuses, sont très stables lorsque le pH est inférieur à 4, alors qu'ils sont instables dans des solutions avec un pH supérieur à 6. En outre, la température de stockage affecte la stabilité des catéchines d'une manière significative, même dans des conditions ambiantes [32].

1.5. Les vertus thérapeutiques du thé

Les propriétés du thé vert sont multiples : riche en tanins, ce sont ces catéchines antioxydants qui donnent au thé son arôme et son goût amer particulier. Le thé vert contient également de la vitamine C [32], mais ce qui rend le thé vert remarquable, c'est qu'il contient une catéchine nommée épigallocatechine EGC ou encore épigallocatechine-3-gallate (EGCG). L'EGC est la substance qui lui confère des propriétés remarquables, propriétés bien plus puissantes que celles d'un simple antioxydant. Le thé vert (vert car non fermenté) contient 10 fois plus d'EGCG que le thé noir et 25 fois que le thé Oolong [33].

Quant au taux de caféine (théine), il est semblable à celui du thé noir soit 20-90mg par tasse mais ses effets excitants sont atténués par la présence des tanins [34]. Les thés verts contiennent de la théanine, un acide aminé, reconnu comme un des composés responsables de goût umami et de la réduction de leur amertume. L'activité de la théanine sur le cerveau a montré une réduction du stress mental et physique avec un effet relaxant [35, 36].

Plusieurs études semblent démontrer une certaine efficacité de sa consommation dans la diminution du risque de faire une maladie cardiovasculaire [37]. Il diminuerait également le taux de cholestérol sanguin [38].

Les cultures cellulaires et les modèles animaux montrent que l'épigallocatechine-3-gallate(EGCG), le principal polyphénol présent dans le thé vert, possède une puissante activité anti-inflammatoire et anti-proliférative capable d'inhiber sélectivement la croissance cellulaire et d'induire l'apoptose dans les cellules cancéreuses sans affecter les cellules normales [39]. Par contre, l'efficacité réelle est loin d'être prouvée chez les êtres humains [40], même s'il est largement utilisé dans cette indication (notamment dans la prévention du cancer [41]).

Chapitre 2

LE STRESS OXYDATIF

Les radicaux libres sont des substances produites par le métabolisme cellulaire qui peuvent être toxiques pour les tissus biologiques et source de lésions de l'ADN, des lipides, des membranes cellulaires et des protéines. Des systèmes protecteurs efficaces contrôlent leurs effets délétères au sein de la cellule. Ces systèmes reposent en particulier sur trois enzymes : la superoxyde dismutase (SOD), la catalase et la glutathion peroxydase. Au niveau cérébral, la SOD et la glutathion peroxydase jouent un rôle majeur, tandis que la catalase a une faible activité. Un défaut d'équilibre entre la production de radicaux libres et les mécanismes de défense constitue un stress oxydant [1].

2.1. Définition

Le stress oxydatif est le déséquilibre entre la génération des ROS (espèces réactives oxygenés) et la capacité du corps à les neutraliser et à réparer le dommage oxydatif [42]. Il correspond à une perturbation du statut oxydatif intracellulaire [43].

2.2. Origine du stress

Les radicaux libres sont produits par divers mécanismes physiologiques car, ils sont utiles pour l'organisme à doses raisonnables. Cette production physiologique est parfaitement maîtrisée par des systèmes de défense. Dans les circonstances normales, on dit que la balance antioxydants/prooxydants est en équilibre. Si tel n'est pas le cas, que ce soit par déficit en antioxydants ou par suite d'une surproduction énorme de radicaux, l'excès de ces radicaux est appelé « stress oxydant » [44].

2.3. Les radicaux libres

2.3.1. Définition

Un radical libre est une molécule ou un atome ayant un ou plusieurs électrons non appariés, ce qui le rend extrêmement réactif [45]. L'ensemble des radicaux libres et leurs précurseurs est souvent appelé *espèces réactives de l'oxygène* [44].

L'appellation « dérivés réactifs de l'oxygène » n'est pas restrictive. Elle inclut les radicaux libres de l'oxygène proprement dit, mais aussi certains dérivés oxygène réactifs non radicalaires dont la toxicité est importante tels peroxydes d'hydrogènes (H_2O_2). Peroxynitrite ($ONOO^-$) [46].

2.3.2. Principaux radicaux libres

- L'anion superoxyde : la molécule d'oxygène, mise en présence d'une quantité d'énergie suffisante, peut acquérir un électron supplémentaire et former ainsi l'anion superoxyde, cet anion intervient comme facteur dans de nombreuses réactions.
- Le radical hydroxyde : OH^- , il est très réactif vis-à-vis des structures organiques et joue un rôle initiateur dans l'auto-oxydation lipidique.
- Acétyl choline estérase ;
- Le radical peroxyde : ROO^-
- L'oxygène singulet : O_2 , forme « excitée » de l'oxygène moléculaire, est souvent assimilé à un radical libre en raison de sa forte réactivité [47].

2.3.3. Origine des radicaux libres

Ils sont produits par divers mécanismes physiologiques afin de détruire des bactéries au sein des cellules phagocytaires (macrophages, polynucléaires) ou pour réguler des fonctions cellulaires létales telle la mort cellulaire programmée ou apoptose [44]. Toutefois, au contact entre l'oxygène et certaines protéines du système de la respiration, une production d'anions superoxydes se produit lors du fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale.

L'inflammation est par ailleurs une source importante de radicaux oxygénés produits directement par les cellules phagocytaires activées. Le monoxyde d'azote, est produit par les systèmes enzymatiques que sont les différentes NO synthétase, à des fins de médiation par les neurones, les cellules endothéliales ou macrophages [44]. Des sources importantes de radicaux libres sont les mécanismes de cycles redox qui se produisent dans l'organisme, l'oxydation de molécules comme les quinones. Ce cycle redox a lieu soit spontanément, soit surtout lors de l'oxydation de ces composés au niveau du cytochrome P450. Les rayonnements sont capables de générer des radicaux libres et les particules inhalées (amiante, silice) sont aussi des sources de radicaux libres [44].

L'ingestion d'alcool est suivie de la formation de radicaux libre selon divers mécanismes, également des antibiotiques, des anticancéreux [47]. L'infection au VIH a pour effet d'accroître la production de radicaux libres dans l'organisme [48].

2.4. Les conséquences du stress oxydant

La production excessive de radicaux libres provoque des lésions directes de molécules biologiques : oxydation de l'ADN, des protéines, des lipides et des glucides. Les lipides et principalement leurs acides gras polyinsaturés sont la cible privilégiée de l'attaque par radical hydroxyle, réaction appelée peroxydation lipidique. Les conséquences qui, captées par des macrophages, formeront le dépôt lipidique de la plaque d'athérome des maladies cardiovasculaires, l'attaque des phospholipides membranaires modifiant la fluidité de la membrane et donc le fonctionnement de nombreux récepteurs et transporteurs et la transduction des signaux [44].

Les radicaux libres peuvent induire des effets mutagènes ou l'arrêt des réplifications de l'ADN. Ils agissent en provoquant des altérations de bases, des pontages ADN protéine ou des ruptures de brins [47]. Ils inhibent la sécrétion d'insuline [49], modifient les structures primaires, secondaires et tertiaires des protéines [50].

Par ailleurs, le glucose peut s'oxyder dans des conditions physiologiques en présence de traces métalliques, en libérant des cétoaldéhydes, H_2O_2 et OH^- , qui entraîneront la coupure de protéines ou leur glycation par attachement du cétoaldéhyde. Ce phénomène de glyco-oxydation est très important chez les diabétiques et contribue à la fragilité de leurs parois vasculaires et de leur rétine [44].

Le stress oxydant, principale cause initiale de plusieurs maladies : cancer, cataracte, sclérose latérale amyotrophique, syndrome de détresse respiratoire aigu, oedèmes pulmonaire, vieillissement accéléré, le diabète, la maladie d'Alzheimer, les rhumatismes et les maladies cardiovasculaires [44], maladie de parkinson, les inflammations gastro-intestinales, ulcères [51], les oedèmes et vieillissement prématurée de la peau [52].

2.5. Les antioxydants

Les antioxydants sont des substances dont la fourniture est obligatoire pour l'organisme. Un déséquilibre entre la production des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et la capacité de défense des antioxydants conduit au stress oxydant ou stress oxydatif. Ce dernier a des effets néfastes sur la santé de la population générale et de certains groupes de patients avec des maladies chroniques et aiguës, que certains micronutriments et habitudes alimentaires peuvent moduler [53].

Notre organisme est équipé de tout un système complexe de défense antioxydante, enzymatique (super-oxydes dismutases SOD, catalases, glutathion peroxydases, glutathion réductases) et non-enzymatique (vitamines A, C et E, certains minéraux comme le zinc et le sélénium et d'autres molécules telles que l'albumine, l'acide urique, sulfhydryles et la bilirubine), localisé dans les compartiments intra et extracellulaire [54]. Ce système de défense permet de neutraliser les ROS de plusieurs manières. Alors, les antioxydants jouent un rôle d'enzymes protectrices dont la production est stimulée par l'entraînement en durance et de vitesse selon un mécanisme d'adaptation.

En raison de cet engouement scientifique, les impératifs technologiques et économiques des industries pharmaceutiques et alimentaires ont développés considérablement l'emploi d'agents antioxydants [55].

2.5.1. Définition

Un antioxydant est défini comme étant substance qui peut retarder ou empêcher l'oxydation des substrats biologiques [42]. Ce sont des composés qui réagissent avec les radicaux libres et les rendent ainsi inoffensifs [45]. La raison pour laquelle les antioxydants sont importants vient du fait que l'oxygène est un élément potentiellement toxique puisqu'il peut être transformé en formes plus réactives telles que le superoxyde, le peroxyde d'hydrogène actif [42].

Ils agissent en formant des produits finis non radicaux, d'autres en interrompant la réaction en chaîne de peroxydation, en réagissant rapidement avec un radical d'acide gras avant que celui-ci ne puisse réagir avec un nouvel acide gras, tandis que d'autres antioxydants absorbent l'énergie excédentaire de l'oxygène singlet pour le transformer en chaleur. D'une manière générale, un antioxydant peut empêcher l'oxydation d'un autre substrat en s'oxydant lui-même plus rapidement que celui-ci. En même temps, les antioxydants arrêtent la réaction, la plupart du temps parce que la structure des antioxydants est relativement stable [45, 50].

2.5.2. Les antioxydants endogènes

Les défenses antioxydantes de l'organisme peuvent se diviser en :

- Un système de défense primaire : composé d'enzymes et de substances antioxydantes :
 - ✓ La superoxyde dismutase (SOD) : diminue la durée de vie de l'anion superoxyde O_2^- .
 - ✓ La catalase : transforme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en simple molécule d'eau.

- ✓ La glutathion peroxydase (GPX) : détruit le peroxyde d'hydrogène et les peroxydes lipidiques.
- ✓ Les molécules piègeurs : le glutathion (GSH), l'acide urique, les protéines à groupements thiols, ubiquinones,.....etc.
- Un système de défense secondaire : composé d'enzymes protéolytiques des phospholipases, des ADN endonuclease et ligase, des macrooxyproteinases [50].

2.5.3. Les antioxydants naturels

Plusieurs substances peuvent agir en tant qu'antioxydants *in vivo* ont été proposés. Elles incluent le bêta carotène, l'albumine, l'acide urique, les oestrogènes, les polymères, les flavonoides, l'acide ascorbique, les composés phénoliques, la vitamine E...etc. Elles peuvent stabiliser les membranes en diminuant leur perméabilité et elles ont également une capacité de lier les acides gras libres [56].

- La vitamine E est un antioxydant important qui protège les cellules contre les dommages associés aux radicaux libres [57] et par conséquent, prolonge la vie cellulaire tout en ralentissent le processus de vieillissement [58] et la diminution de l'athérosclérose [59].
- Les caroténoïdes sont une classe de composés phytochimiques très importante, trouvés dans les légumes et fruits, également dans le lait, empêchant les dommages génétiques, protègent contre les dommages oxydants en augmentant le métabolisme de désintoxication, empêchent l'expression des oncogènes, augmentent l'activité de communication des gap jonctions [60]. Les exemples de caroténoïdes, incluent l'alpha carotène, bêta carotène, lycopène. Phytofluène, phytoène, lutéine, neoxanthine, viloxanthine, anthéroxanthine, alpha cryptoxanthine et bêta cryptoxanthine. Leur structure polyène, par mécanisme d'addition, permet l'incorporation des espèce réactives ou radicaux libres et de ce fait ralentir

leur propagation. Les caroténoïdes sont impliqués dans la prévention de nombreux types de cancer ; cancer de prostate ; cancer du poumon [53].

- La vitamine C est largement répandue dans les fruits [45], l'influence sur les dégâts protéiques a été examinée dans les études d'apports de suppléments principalement sur des modèles de rats et il y a eu quelques essais chez l'homme. De façon intéressante, de supplémenter des volontaires sains pendant 5 semaines avec la vitamine C n'a aucun effet. Cependant, après 10 à 15 semaines de traitement, les taux de carbonyles ont été significativement abaissés [61]. L'apport de suppléments antioxydants, devrait être prolongées sur une plus longue durée. L'apport de supplément de vitamine C prévient également des dégâts oxydatifs sur les protéines induits par la fumée de cigarette [62]. Des études animales avec du β -carotène [63] et de l'acide α -lipoïque [64] ont aussi démontré qu'ils empêchaient les dégâts protéiques.
- L'acide alpha lipoïque : lorsqu'il fut isolé il y a cinquante ans, l'acide alphalipoïque fut identifié comme vitamine. Il a depuis été reclassé comme antioxydant et peut piéger les radicaux libres au niveau intracellulaire et extracellulaire. Du fait qu'il est aussi bien liposoluble qu'hydrosoluble, il peut accéder à toutes les parties de nos cellules [65]. L'acide lipoïque réduit la glycation et favorise le transfert du glucose sanguin aux cellules en stimulant l'activité insulinique [66]. De nombreuses preuves existent montrant que les composés phénoliques peuvent prévenir l'oxydation des LDL [67].

Des flavanols (catéchine, flavan-3-ols), un groupe important de polyphénols de thé en une grande partie existent sous forme d'esters de gallate, sont considérés comme responsable des effets anticarcinogénique du thé vert dont les principaux sont (epigallocatechine et ses esters gallate, et à moins degré epicatechine et ses esters gallate et catéchine [68].

Des études en laboratoire présentées à une réunion de l'Américan Chemical Society en septembre 1997 ont démontré que le gallate d'épigallocatechine était 100 fois plus efficace que la vitamine C et 25 fois plus efficace que la vitamine E pour neutraliser les radicaux libre. La recherche semble indiquer que cette puissance antioxydant pourrait jouer un rôle dans le maintien de l'immunité humain. Dans le cadre d'études menées sur des animaux au japon au début des années 1990, ont constaté que les polyphénols du thé vert augmentent l'activité des macrophages, des lymphocytes B, des lymphocytes T et des cellules tueuses naturelles. Toutes ces cellules sont des globules blancs [69].

Il semble que la capacité antioxydante d'un flavonoïde dépend de son affinité pour les radicaux libres [70]. De récentes études ont suggéré que des suppléments glyconutritionnelle (GN), jouant un rôle au niveau de la communication cellulaire et de la fonction immunitaire, ont des propriétés antioxydantes à la fois *in vitro* et *in vivo*. Des cellules de foie de rat, cultivées dans un milieu de culture contenant des suppléments GN, ont permis de mettre en évidence des niveaux plus élevés de glutathion réduit que dans des cellules témoins, démontrant ainsi une protection antioxydant accrue [42].

2.6. Stress oxydant hépatique et dysfonctions mitochondriales

2.6.1. Stress oxydant hépatique

La progression de la stéatose hépatique vers la stéatohépatite est une augmentation du stress oxydant dans les hépatocytes due à une dérégulation du métabolisme redox. Le stress oxydant hépatique augmente, ce qui engendre la peroxydation lipidique, des dommages sur l'ADN génomique et mitochondrial et l'induction de marqueurs inflammatoires. L'ensemble de ces événements participe activement au phénomène de fibrose caractéristique des NASH [71].

2.6.1.1. Peroxydation lipidique

L'augmentation de la peroxydation lipidique dans le foie a été mise en évidence *in vitro* sur culture primaire d'hépatocytes de rat, chez des modèles animaux de NASH ainsi que chez des patients présentant une NASH [72, 73]. En

outre, il a été rapporté que la peroxydation lipidique pouvait provoquer une diminution du taux de l'ApoB100 au niveau du réticulum endoplasmique et de ce fait diminuer la sécrétion de VLDL [74]. Cependant, le mécanisme d'action précis reste encore à élucider. La peroxydation lipidique peut également induire des dommages sur l'ADN génomique et mitochondrial et favoriser la surproduction de ROS [75].

2.6.1.2. Inflammation

L'augmentation du stress oxydant ainsi que les produits de la peroxydation lipidique dans les hépatocytes conduisent à l'augmentation de cytokines inflammatoires tels que le facteur de nécrose tumorale TNF (Tumor necrosis factor alpha), les interleukines IL-1 et IL-6 ainsi que le facteur de transcription NF- κ B (nuclear factor kappa B). Ces facteurs inflammatoires sont significativement augmentés en cas d'une stéatose hépatique non alcoolique (NAFLD) [76]. Une étude chez la souris a notamment montré que l'inhibition de TNF permettait d'atténuer l'inflammation et la stéatohépatite [77]. Ces facteurs pro-inflammatoires seraient synthétisés par les macrophages hépatiques à savoir les cellules de Küpffer. Ces cellules induisent également l'infiltration de monocytes en augmentant la production de chémocytokines, en particulier MCP-1 (monocyte chemoattractant protein 1) et IP-10 (inducible protein 10). De plus, TNF est capable d'activer le facteur de transcription NF- κ B qui permettra de transcrire les gènes impliqués dans la réponse inflammatoire favorisant davantage l'augmentation de l'inflammation [78].

2.6.1.3. Fibrose

Le flux de facteurs et de cellules inflammatoires dans le foie activent les cellules étoilées, conduisant au dépôt de collagène, à la fibrose et à la répétition de la réponse inflammatoire [79].

2.6.1.4. Adipokines et inflammation adipocytaire

C'est un facteur important dans la progression de l'inflammation hépatique, qui se produit dans le cadre de l'obésité et de l'insulino-résistance, est la production de facteurs pro-inflammatoires par le tissu adipeux. En effet, les patients atteints d'une stéatose hépatique présentent une inflammation adipocytaire associée [80]. Des études ont pu mettre en évidence une augmentation de la production d'adipokines proinflammatoires tels que TNF-, IL-1 et IL-6 et une diminution d'adipokines anti-inflammatoire telle que l'adiponectine chez des individus obèses et diabétiques et/ou atteints d'une stéatose hépatique [81, 82].

2.6.2. Dysfonctions mitochondriales

L'augmentation du stress oxydant, en dehors de l'implication de la stéatose hépatique, ne sont pas encore clairement comprises. Parmi les sources de stress oxydant, de nombreuses études tendent à penser que le dénominateur commun sont les dysfonctions mitochondriales [71, 83]. En effet, des études ont mis en évidence des anomalies structurales mitochondriales chez des patients atteints de NASH via l'analyse de biopsies hépatiques [84]. Les dysfonctions mitochondriales sont principalement caractérisées par une diminution de l'activité de la chaîne respiratoire, une diminution de la capacité de phosphorylation, une production d'ATP altérée, une diminution du potentiel membranaire mitochondrial, une quantité d'ADN mitochondrial (ADNmt) plus faible et une structure anormale de la mitochondrie [85].

Ces dysfonctions conduisent à une perturbation du flux d'électrons de la chaîne respiratoire qui vont réagir d'avantage avec l'O₂ et produire une quantité plus importante de O₂⁻ et de H₂O₂. Le H₂O₂, en condition physiologique, est détoxifié en H₂O par la GPx. Cette enzyme est très importante dans la détoxification de la mitochondrie qui est dépourvue de catalase [86]. De plus, la GPx a besoin d'une quantité suffisante de glutathion réduit (GSH) afin de fonctionner. La déplétion de GSH est donc un point critique qui peut conduire à des dysfonctions mitochondriales, à l'augmentation de ROS et au développement

de NASH [87]. L'augmentation des ROS va alors entraîner des dommages cellulaires et peut notamment endommager l'ADNmt conduisant à la diminution de la synthèse des complexes de la chaîne respiratoire favorisant la dysfonction mitochondriale, et ainsi induire un cercle vicieux dans la production de ROS [86].

Les dysfonctions mitochondriales suggèrent l'implication du cytochrome P450 2E1 (CYP2E1) comme producteur important de ROS hépatiques [72]. Plusieurs études ont en effet rapporté l'augmentation de l'expression et de l'activité hépatiques de CYP2E1 [88]. Il a été suggéré que la capacité oxydative de la mitochondrie étant altérée en raison de ses dysfonctions, les acides gras libres s'accumulaient dans le cytosol et activaient différentes voies cataboliques, la β -oxydation peroxysomale et l'oxydation microsomale, résultant en la formation de ROS additionnels [71]. Effectivement, la β -oxydation des acides gras par les peroxysomes induits la formation de H_2O_2 , et l'oxydation des acides gras par l'oxydation dans les microsomes est catalysée par CYP2E1 et provoque la formation des ROS [73]. En effet, CYP2E1 régule la biotransformation des acides gras en acides gras hydroxylés transformés ensuite en acides gras dicarboxyliques pouvant avoir des effets délétères [89]. Ils peuvent en particulier découpler la phosphorylation oxydative et inhiber la chaîne de transfert d'électrons au sein de la mitochondrie favorisant la production de ROS [88].

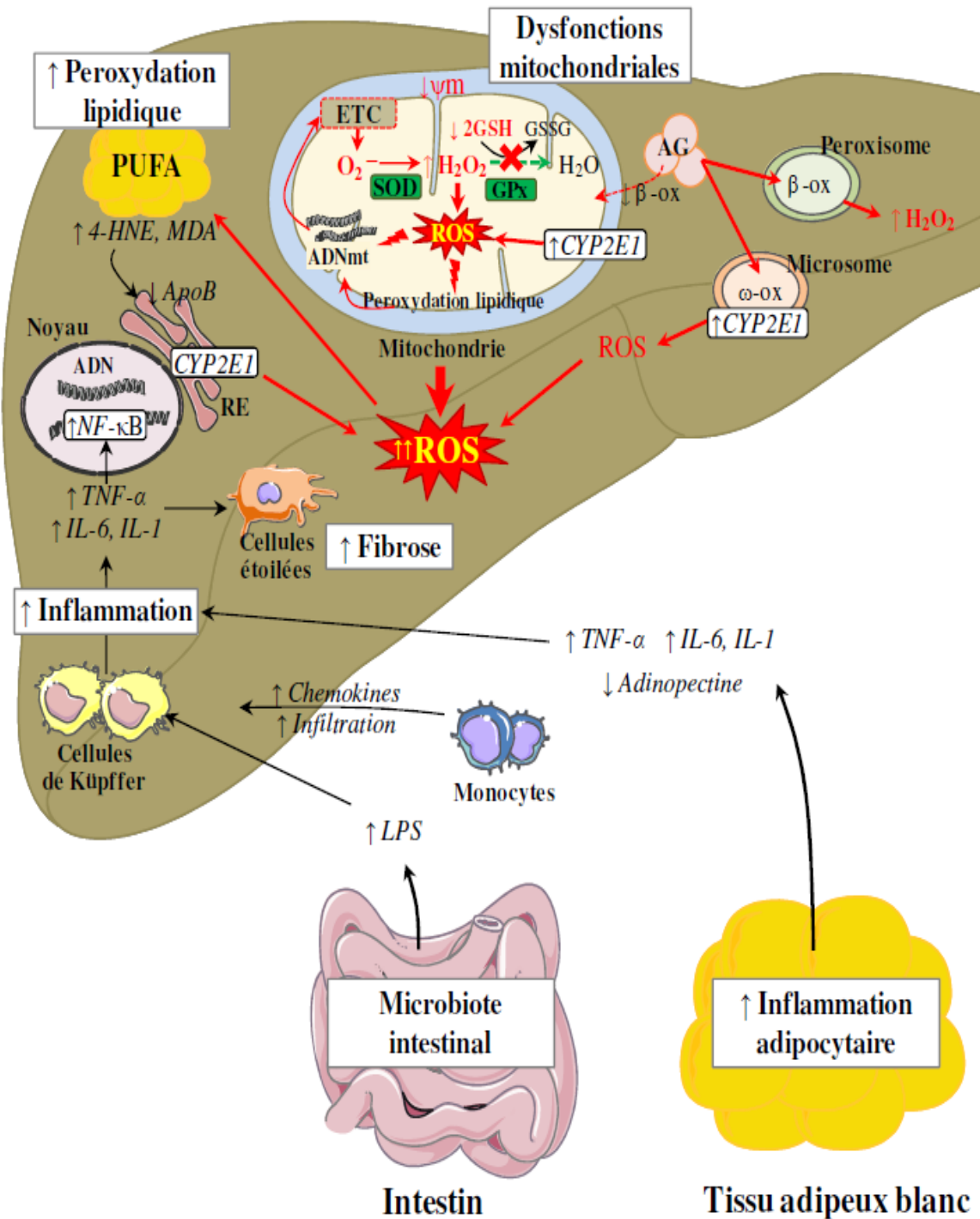


Figure 2.1. Stress oxydant hépatique et dysfonctions mitochondriales [77]

AG: Acide gras; ApoB: Apolipoprotéine B; CYP2E1: Cytochrome P450 2E1; ETC: Chaîne de transfert d'électron; GPx: Glutathion peroxydase; GSH: Glutathion réduit; GSSG: Glutathion oxydé; H₂O₂: Peroxyde d'hydrogène; 4-HNE: 4- hydroxynonéal; IL-6,1: Interleukine 6,1; LPS: Lipopolysaccharide; MDA: Malondialdéhyde; NF-kB: Facteur nucléaire kB; O⁻: Anion superoxyde; RE: Réticulum endoplasmique; ROS: Espèces réactives de l'oxygène; SOD: Superoxyde dismutase; TNF- α : Facteur de nécrose tumorale α ; ψ m: Potentiel membranaire mitochon

Chapitre 3

MECANISME D'ACTION BIOLOGIQUE DES CATECHINES

3.1. La biodisponibilité des catéchines du thé vert

La biodisponibilité des catéchines du thé est considéré comme relativement faible. Chez l'homme, le maximum des concentrations plasmatiques des catéchines (1-2 $\mu\text{mol/l}$) sont atteints entre 1 et 2 heures après la consommation suivie d'une élimination rapide des concentrations plasmatiques restaurées aux niveaux de base dans les 24 heures de la consommation initiale [28, 90]. Plusieurs facteurs sont censés limiter la biodisponibilité des catéchines intacts, y compris :

- La sensibilité des catéchines au potentiel de troubles digestifs [91, 92] ;
- Le transport intestinal pauvre [93, 94] ;
- Un métabolisme rapide et la clairance.

Auparavant, l'exposition de thé vert à conditions digestives simulées a été trouvé pour réduire les niveaux de catéchines totales de 80% et de 90% par rapport aux témoins non digérés. La dégradation de la majorité des catéchines cru de se produire dans de petites conditions intestinales où à un pH élevé et à la présence d'espèces réactives de l'oxygène offrent des conditions favorables à la réaction d'auto-oxydation des catéchines [91, 92].

Suite à la possibilité d'une perte significative digestif, le transport de catéchines dans l'intestin est limitée par leur affinité pour les systèmes de transport, y compris l'efflux protéines de multi-résistance (MRP) et la P-glycoprotéine (Pgp) connus pour limiter l'absorption de nombreux xénobiotiques dont les catéchines [93, 94]. Combinée, une mauvaise stabilité intestinale et le transport intestinal peut servir à limiter l'absorption des catéchines intactes après consommation orale du thé [90].

3.2. Action des catéchines dans l'organismes

Chez l'Homme, la concentration plasmatique maximale des catéchines et théaflavines de thé est atteinte environ 2h après ingestion ce qui indique une absorption intestinale des molécules [95]. Les flavonoïdes non absorbés au niveau de l'intestin grêle, ou ceux qui sont absorbés, métabolisés par le foie puis excrétés dans l'intestin via la bile, telles que les catéchines, vont atteindre le gros intestin [96].

3.2.1. Concentration plasmatique

Chez l'Homme, les catéchines et les théaflavines atteignent une concentration maximale plasmatique en 2 à 3h après l'administration de thé sous forme d'infusion ou de complément alimentaire. La concentration maximale de flavonoïdes (toutes molécules confondues) dans le plasma excède rarement 1 μM après consommation de 10 à 100 mg d'un composé seul [97]. De manière plus spécifique, les formes conjuguées des catéchines (glucuronidées, sulfatées ou méthylées) se retrouvent généralement en quantité supérieure dans le plasma et les urines (>95%) par rapport à leur forme libre Figure (3.1) [98].

Une étude réalisée en 2001 chez une femme et un homme adultes sains montre une teneur maximale plasmatique en théaflavines de 0,5 et 1 $\mu\text{g/L}$, respectivement, et de 0,6 et 4,2 $\mu\text{g/L}$ dans les urines (2h après l'ingestion), respectivement, après ingestion de 700 mg de théaflavines (équivalent d'environ 30 tasses de thé noir) [99]. Cependant, le dosage des théaflavines sous forme libre dans le plasma ne permet pas de statuer sur le devenir de ces molécules qui sont fortement métabolisées par le microbiote du côlon. Chez le modèle murin, il a été rapporté des concentrations de catéchines dans le plasma de l'ordre de 10 μM [100, 101].

3.2.2. Concentration hépatique

D'après une étude réalisée chez le rat, les concentrations hépatiques des catéchines, d'EGCG, EC et EGC sous forme libre sont de 50.2, 43.5 et 20.8 ng/g de tissu, respectivement, suite à une consommation chronique de thé vert durant 30 jours [101]. D'après une autre étude réalisée chez la souris, au niveau hépatique les catéchines : EGC, EC, EGCG et ECG sont en quantité supérieure sous forme conjuguées (en moyenne environ 50 ng/g foie) par rapport à leur forme libre (en moyenne environ 7 ng/g foie) [102]. En revanche, les théaflavines sont en quantité légèrement supérieure sous forme libre (en moyenne environ 100 ng/g de foie) que sous forme conjuguée (en moyenne environ 75 ng/g de foie) [102]. Ces résultats suggèrent que la concentration des catéchines et des théaflavines sous forme libre ou conjuguée est de l'ordre de la centaine de nanogrammes par gramme de foie (Figure 3.1). Cependant, une étude menée chez le rat a permis de détecter 23 et 7 métabolites différents de catéchines dans le plasma et le foie, respectivement, suggérant une sous-estimation de la quantité des molécules dont seule la forme libre et certaines formes conjuguées sont généralement dosées [103].

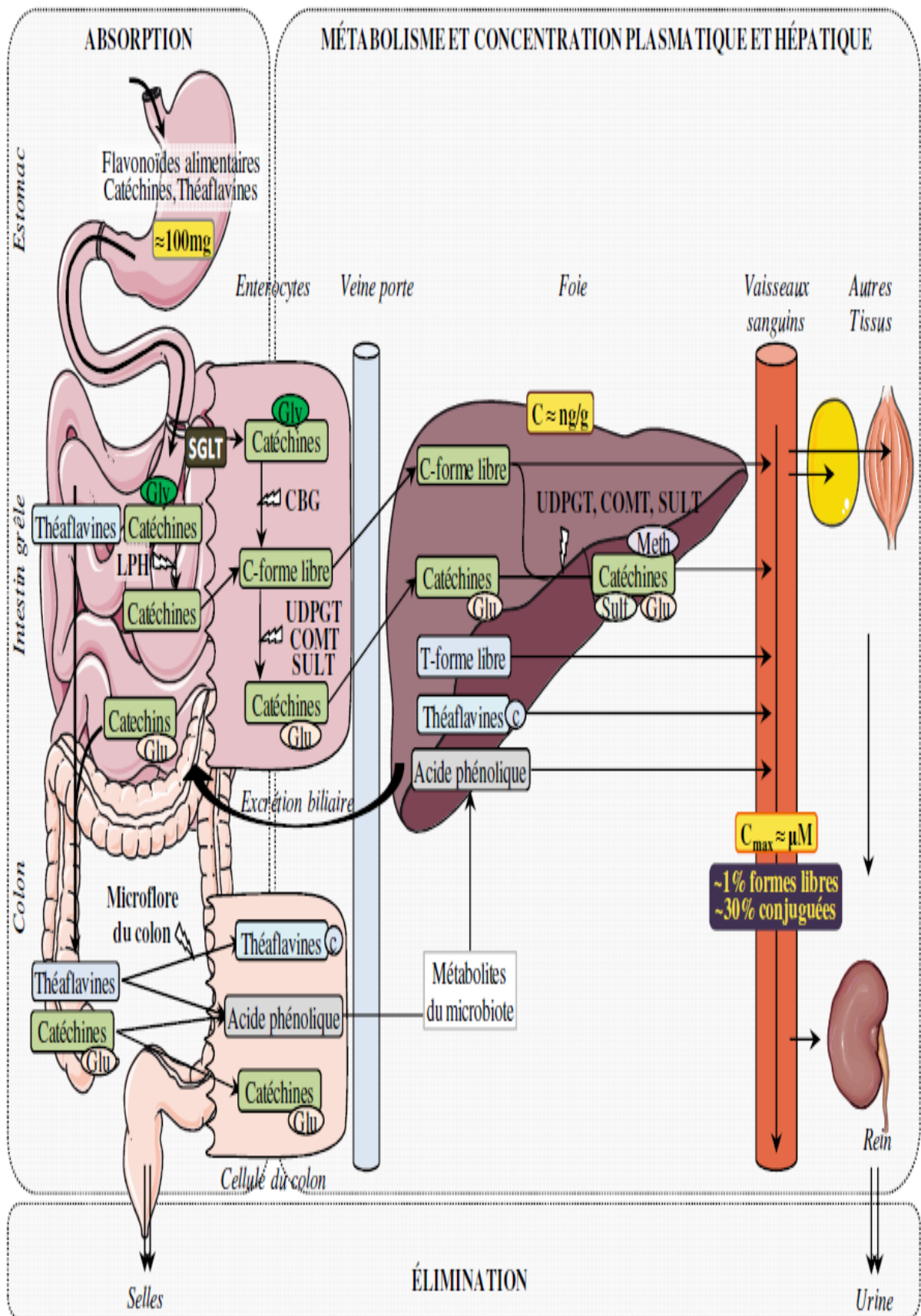


Figure 3.1 : Métabolisme des catéchines du thé dans l'organisme

3.3. Mécanisme d'action de l'EGCG

Les effets préventifs de cancer par épigallocatechine gallate (EGCG) sont largement soutenus par des résultats de la culture cellulaire, ainsi que des études sur model animal. EGCG de thé verts inhibe la prolifération cellulaire et exercent une forte activité anti-radicalaire [104]. EGCG peut améliorer la communication de jonction entre des cellules et protéger ainsi des cellules du développement de tumeur [105]. Les études expérimentales ont suggéré un effet de cet antioxydant qui peut bloquer la promotion de croissance de tumeur en scellant des récepteurs dans les cellules affectées. Un autre mécanisme possible indique que ce composé peut faciliter l'attache directe de certains cancérigènes. Ses influences inhibitrices peuvent supprimer les étapes finales de carcinogenèse, à savoir angiogenèses et la métastase [106].

L'EGCG bloque aussi la carcinogenèse en modulant les sentiers de transduction de signal impliqués dans le développement de cancer. Récemment, le progrès énorme a été fait dans l'élucidation des mécanismes moléculaires de cancer Chemoprevention par EGCG. La suppression des biomarqueurs de tumeur divers incluant un récepteur de facteur de croissance tyrosine kinases, le récepteur de cytokine kinases, et des protéines de transformation liées par des polyphénols de thé d'EGCG [107, 108, 109].

Plusieurs travaux ont été publiés le plus sont limité à l'effet de consommation de thé verte riche en EGCG sur des types de cancer spécifiques ou leurs facteurs de risque. Des études ont montré que l'EGCG peut inhiber et empêcher certain cibles moléculaires bio-médicalement importantes comme DNMTS, DES CHAPEAUX et HDACS, antiapoptotic des protéines, VEGFR signalisation et squalène epoxidase, ainsi des effets de chemopreventive par l'EGCG chez les humains. La prévention de cancer est d'intégrer des nouvelles découvertes moléculaires dans la pratique clinique, qui récapitule des données de recherche récentes se concentrant EGCG a incité les événements de transduction de signal cellulaires qui semblent avoir des implications dans l'inhibition de prolifération cellulaire et la transformation [108, 110].

3.4. Activité anti-cancérogène

3.4.1. La signalisation cellulaire dans le cancer

Le développement de carcinogenèse est généralement reconnu comme un complexe traite des modifications moléculaires et cellulaires. Pour simplifier les options possibles différentes pour chemoprevention et chimiothérapie dans le développement de cancer et sa progression, trois étapes bien définies ont été décrites :

- ✓ Initiation est une rapide phase, comprend l'exposition ou l'assimilation et l'interaction de cellules, particulièrement l'ADN, avec un agent de cancérogène et sa distribution et son transport aux organes avec une activation métabolique et d'interaction covalente avec l'ADN cellulaire cible arrive, menant des dégâts génotoxiques.
- ✓ Promotion relative est un processus réversible dans lequel l'activement faisant proliférer de cellules anormales persiste, reproduit et peut être originaire d'un foyer de cellules pre-néoplastique.
- ✓ La progression est la phase finale de transformation néoplasique, c'est une croissance non contrôlée des cellules (la tumeur), implique la conversion graduelle de cellules pre-maligne aux néoplasiques avec une augmentation de fait d'être envahissant et la métastase potentiel et formation d'angiogenèse [111].

Les facteurs de transcription, comme NF κ B et l'AP 1, sont transitoirement activés pour régler l'expression de gène cible en réponse aux stimuli extracellulaires par des sentiers de transduction de signal intracellulaires spécifiques. Les cancers métastasés avancés sont surtout incurables, un effort de prolonger ou bloquer le processus de carcinogenèse par chemoprevention est devenu une stratégie importante et faisable pour le contrôle de cancer [108]. L'inhibition des dégâts oxydatifs constitue la première ligne de système de défense contre les cellules cancérogène et peut considérer comme efficace pour empêcher le cancer. Il peut être réalisé en enlevant les espèces d'oxygène réactive (c'est-à-dire OH et O₂) ou en incitant leur désintoxication [105].

Les enzymes d'antioxydant (la TAO, le GAZON, GPx et GR) sont les composants importants de la réponse de stress cellulaire par lequel des substances toxiques oxydatives peut être enlevé de la cellule avant qu'ils ne puissent endommager la cellule cible, ADN dans l'étape de promotion de tumeur, les mécanismes qui s'arrêtent ou ralentit la division cellulaire pourrait être potentiellement avantageuse (l'induction d'arrestation de cycle cellulaire et apoptose) pour rétablir l'équilibre perdu entre la prolifération cellulaire et d'apoptose [106]. À la dernière phase de carcinogenèse de la progression, l'interruption d'angiogenèse ou la prévention de cellules malignes pour s'échapper de l'emplacement original et envahit d'autres tissus pourrait aussi être potentiellement utile. Pendant toutes les étapes de développement de cancer beaucoup de protéines clés liées à la défense d'antioxydant cellulaires (par exemple : GAZON, TAO, GST, GPx et GR) [106, 112].

La biologie du cancer perturbe des cascades de signalisation intracellulaires, qui transmettent des signaux anormaux aboutissant aux fonctions cellulaires anormales. Des études récentes ont montré que l'EGCG est chémopreventive l'agent exerce son effet en modulant une ou plusieurs cellules signalant des sentiers dans une façon qui interrompt le processus de cancérigène. Le potentiel chémopreventive et l'effet d'EGCG semble être tout à fait spécifique et les lignes de cellule cancéreuse semblent être plus sensibles que des cellules normales, puisque l'EGCG a montré plus haut cytotoxicité dans les cellules cancéreuses que les cellules normales [113].

3.4.2. Inhibition de tumeurogenèse et mécanisme possible

Les mécanismes d'activités biologiques d'EGCG représenté par :

- ✓ Des activités d'antioxydant ;
- ✓ L'arrestation de cycle cellulaire ;
- ✓ L'induction d'apoptose,
- ✓ L'induction ou l'inhibition d'enzymes de métabolisme des médicaments;
- ✓ la modulation de signalisation de cellule ;
- ✓ l'inhibition d'ADN de methylation ;
- ✓ Effet sur l'expression ARNm, DHFR, protéases et telomerase (Figure 3.2).

L'EGCG a été trouvé pour affecter des sentiers de transduction de signal différents, comme l'inhibition de beaucoup de protéine kinases; suppression de l'activation de facteurs de transcription (par exemple. L'AP 1 et NFKB) et le récepteur de croissance de blocage a obtenu par médiation des sentiers [113] [114].

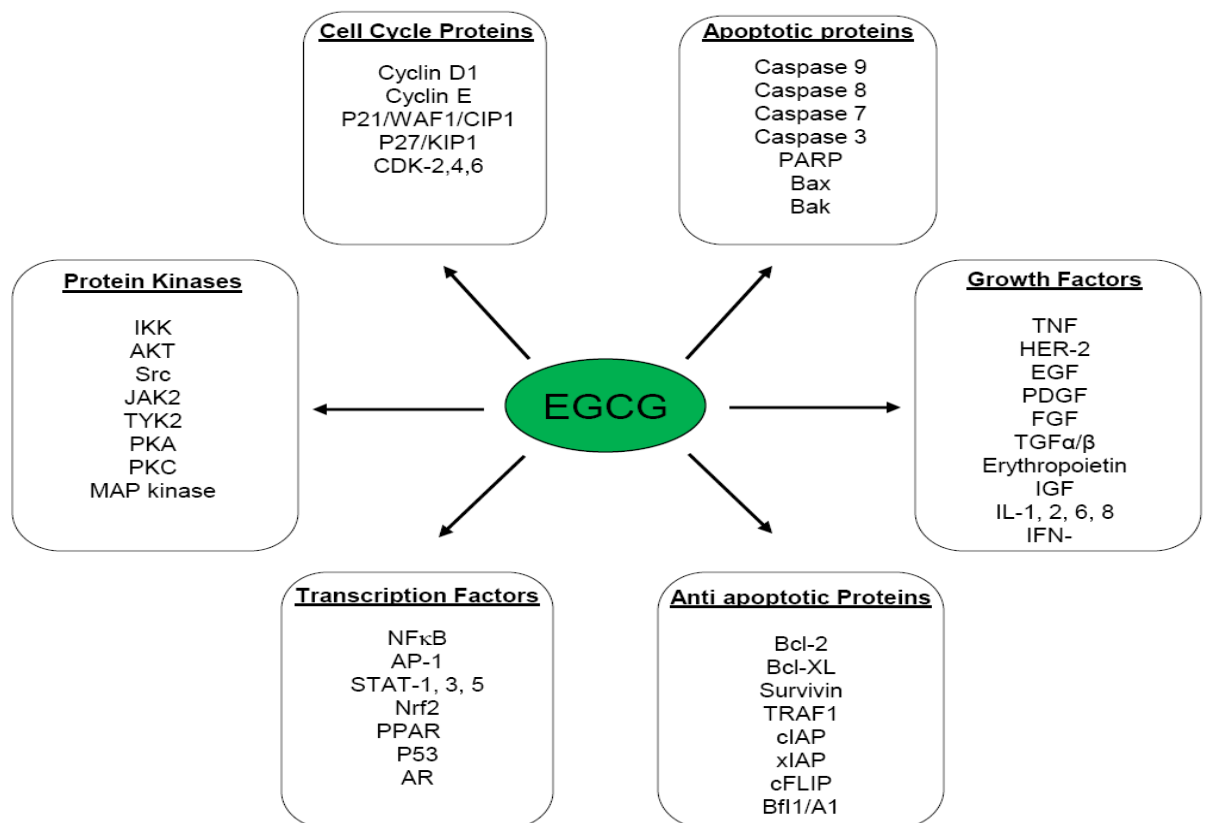


Figure 3.2 : Mécanisme d'actions de l'EGCG [114]

3.4.3 Methylation de l'ADN et Comparaison entre cellule normale et tumorale

L'angiogenèse est un événement complexe qui exige à la cellule endothélial la formation de tubulogenesis et est réglé par l'action de coordination des facteurs de transcription différents [105]. Leur interaction mène à la différenciation cellulaire endothéliale et l'acquisition de propriétés artérielles, veineuses et lymphatiques. Les facteurs de transcription règlent l'organisation correcte du système vasculaire, contrôlant la croissance endothélial excessive et incitant une apoptose.

Les facteurs de transcription FOXO jouent un rôle crucial dans le règlement d'homéostasie dans les organes comme le pancréas et les ovaires et les maladies complexes comme le diabète et le cancer. EGCG inhibe et empêche la formation d'angiogenèse en améliorant l'activité transcriptionnelle FOXO [106].

Bartholome et al. (2010). [115] ont prouvé que l'EGCG stimule le facteur de transcription FOXO, l'accumulation nucléaire et l'ADN liant l'activité. EGCG diminue l'expression et sécrétion des cellules endothéliales, dont le FOXO1 AMPK-stimulé de promoteur. Ces résultats peuvent être pertinents pour les actions cardiovasculaires avantageuses de thé vert.

La modélisation moléculaire des interactions entre EGCG et DNMT dans les cellules normales sont généralement non méthylés et emballés avec des protéines histones acétylés associés avec le HAT (Figure 3.3_a) ainsi que la machine de facteur de transcription basale. Ces éléments épigénétiques constituent une structure de la chromatine « ouverte » qui favorise la transcription. Dans les cellules cancéreuses, les mêmes gènes peuvent devenir hyperméthylé (Figure 3.3_b), et les sites méthylés CpG sont reconnus par les protéines de liaison méthyle (MBDs), qui sont couplés avec des répresseurs (R) et des histones acétyl-transférase pour retirer le groupe acétyle de l'histone, qui génère un état de chromatine bien fermé pour arrêter l'expression du gène. L'activité DNMT (Figure 3.3_c) est bloquée par EGCG en formant des liaisons hydrogène avec les acides aminés (Pro, Glu, Cys, Ser, et Arg) dans la poche catalytique de DNMT. Les brins d'ADN nouvellement synthétisés sont hémi-méthylé après la première phase de réplication de l'ADN qui devient progressivement plus déméthylés après plusieurs cycles de réplication en raison de l'effet de dilution. En utilisant EGCG comme inhibiteur du DNMT, la modification épi-génétique silencieuse pourrait être commutée à un état actif [116].

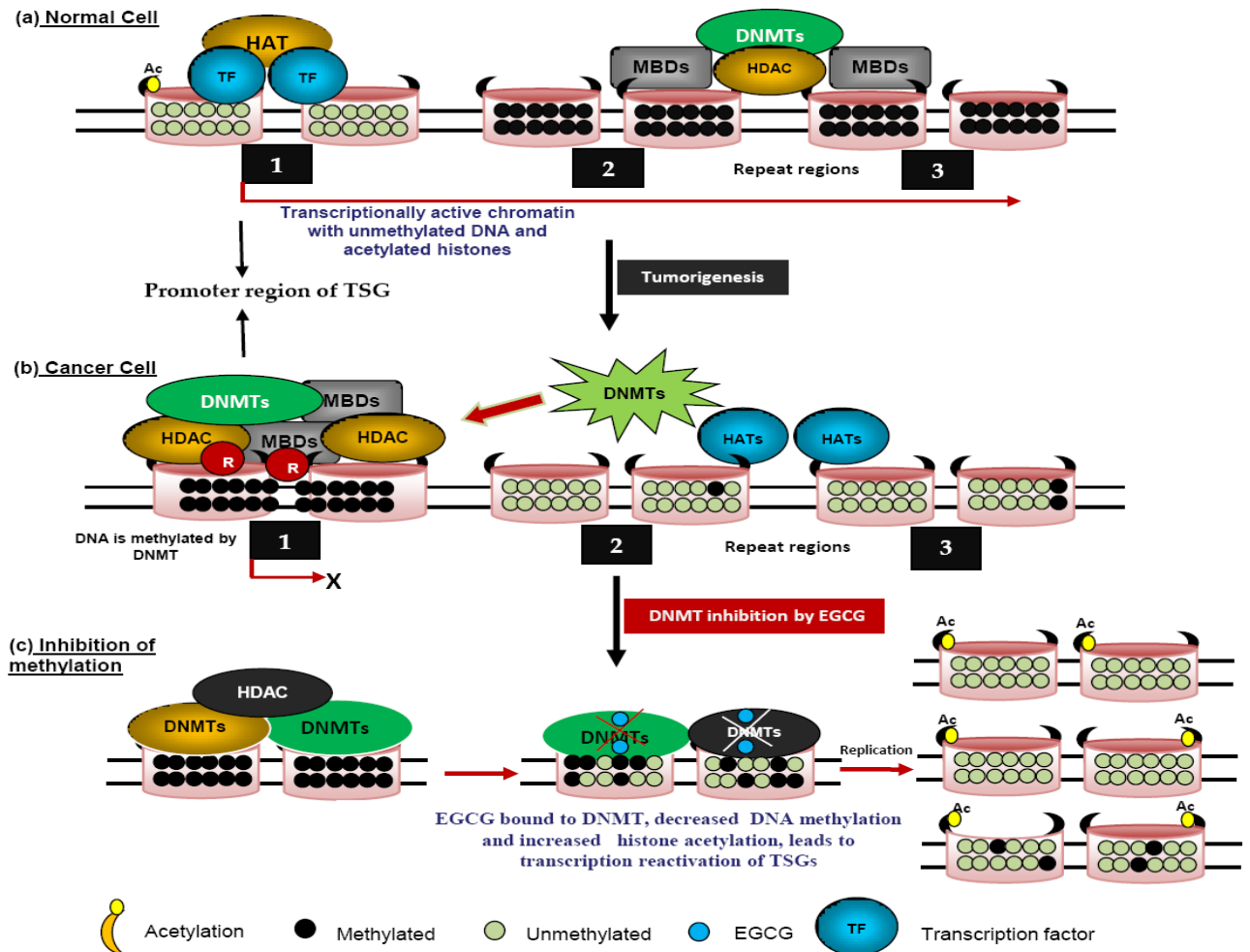


Figure 3.3 : Les différents profils de méthylation d'ADN et la modification des histones entre les cellules normales et tumorales [114]

3.3.4. Impacte de l'EGCG sur l'expression de l'ARN

Les miRNAs ont été récemment découverts comme les régulateurs clés d'expression de gène en contrôlant la traduction d'un type spécifique d'ARN appelé l'ARN messenger qui retransmet les instructions génétiques pour faire des protéines [117]. Les recherches ont indiqué que miRNAs est exprimé d'une façon spécifique et contrôle un large éventail de processus biologiques incluant la prolifération cellulaire, l'apoptose et la différenciation. Le miRNA soit vital à la physiologie cellulaire normale, l'expression anormale entre les petits ARN de non-codage ont été liés avec la carcinogenèse [118]. La récente découverte que l'expression de l'ARNm est fréquemment dérégulé dans la tumeur de cancer miRNAs suppressif. L'une des caractéristiques intéressantes de miRNAs est qu'il semblable aux gènes régulateurs de leur propre expression peut être réglée par

d'autre ADN de méthylation. L'expression de miRNA suggère que son expression anormale pendant la carcinogenèse est une implication importante pour le règlement global de cancer. Le traitement d'hepatocellular le carcinome HepG2 des cellules avec EGCG a été récemment trouvé pour inhiber et empêcher l'expression de miRNA oncogène et incite le niveau de tumeur miRNAs suppressif (Figure 3.4). Les ARNm sont transcrits dans le noyau en miARN primaires qui est en outre clivée par Drosha en précurseur miARN. Pre-miARN est exporté de noyau vers le cytoplasme et traité ultérieurement par Dicer en miARN duplex. Un simple brin de miARN duplex est également appelé ARNm mature conduit ce complexe au clivage de l'ARNm ou de répression traductionnelle qui dépend de l'ARNm (l'ARNm complémentarité et de divers facteurs). L'ARNm peut avoir soit un rôle oncogénique appelé Onco miARNs si la cible d'ARNm est un gène suppresseur de tumeur ou un rôle de suppresseur de tumeur. Si la molécule cible est un oncogène, l'EGCG peut avoir un impact sur le niveau d'expression de l'ARNm et participe à la régulation de l'expression des gènes [117, 118].

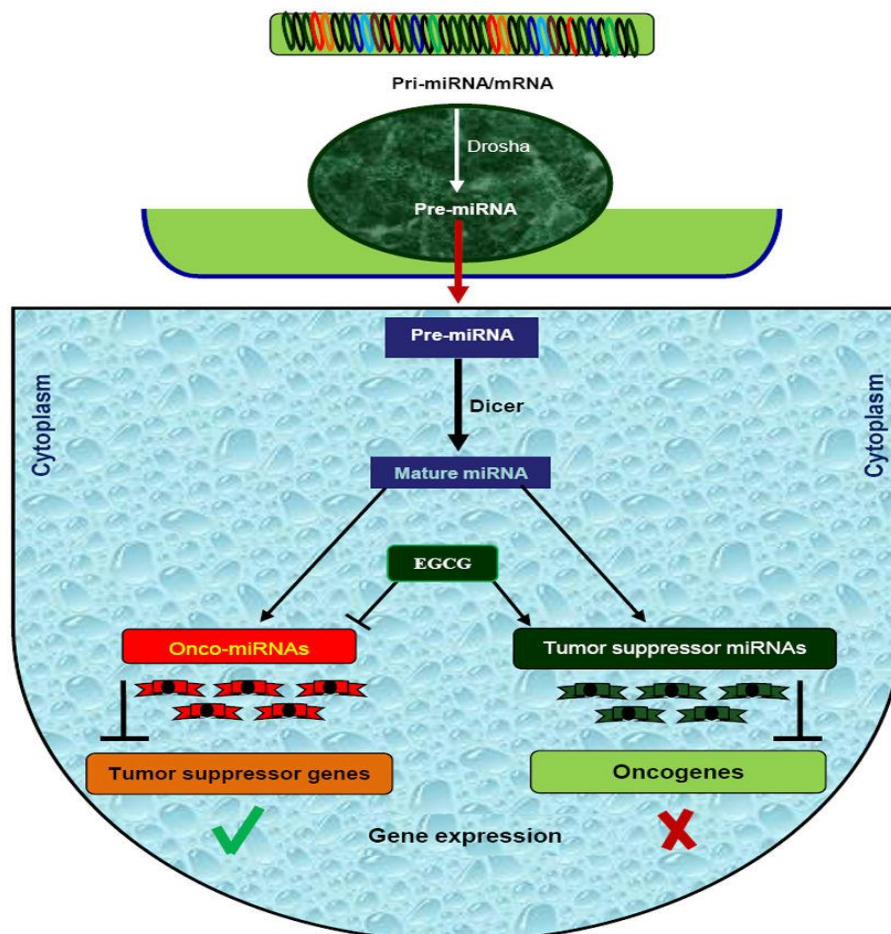


Figure 3.4 : L'impact de l'EGCG sur l'expression de microARN (ARN_{mi}) [114]

Chapitre 4

LES DIFFERENTS PROCEDES D'EXTRACTION

Le thé vert est riche en antioxydants 300 - 400 mg/ g [32]. En raison de leur grande utilité, plusieurs méthodes d'extraction sont possibles mais, elles sont pilotées selon l'application des polyphénols extraits. Pour cela, différents protocoles sont applicables [119]. Certains auteurs préfèrent l'extraction par solvants tels que le Na_2CO_3 [120], l'éthanol, l'acétate d'éthyle [31] et le méthanol [27]. D'autres privilégient l'extraction par les radiations comme Peng et *al.* (2011) [121] et Islam et Ebihara (2017) [122]. Le choix de la méthode d'extraction en fonction de la nature de la matière végétal ainsi l'usage de l'extrait et ces caractéristique physico-chimique.

À ce jour Plusieurs procédés d'extraction des principes végétaux sont connus et utilisés et développés. L'entraînement à la vapeur d'eau et l'hydrodistillation sont les deux procédés les plus utilisés.

4.1. La distillation

Les trois procédés d'extraction les plus utilise basse sur le principe de distillation : hydrodistillation, hydrodiffusion et L'entraînement à la vapeur d'eau [123].

4.1.1. La distillation à la vapeur, ou hydrodistillation

Le procédé le plus anciennement utilisé et le plus simple et le mieux adapté à l'extraction des essences des végétaux aromatiques qui ne sont pas altérées par l'action de l'eau à 100°C, dans laquelle le végétal est en contact direct avec l'eau bouillante, dans une appareil à distiller ou alambic

(voir appendice 2) sert à l'extraction quantitative et qualitative des huiles essentielles. La vapeur générée par l'eau en ébullition imprègne et traverse la matière végétale, dissout et vaporise les molécules aromatiques puis les entraîne vers le réfrigérant. Après la condensation de huile essentielle se sépare ou hydrolat par gradient de densité car l'huile est plus légère que l'eau elle surnage au-dessus de l'hydrolat [123].

4.1.2. La distillation à la vapeur saturée ou Entraînement à la vapeur d'eau

L'entraînement à la vapeur d'eau est relativement ancien, sa mise en œuvre simple et l'utilisation de la vapeur d'eau, disponible et à bas prix, constituent ses principaux avantages. Ce mode d'extraction est basé sur le fait que la plupart des composés odorants volatils contenus dans les végétaux sont susceptibles d'être entraînés par des aérosols de vapeur d'eau, du fait de leur point d'ébullition relativement bas et de leur caractère hydrophobe. Il est recommandé pour l'extraction des matières végétales dont les constituants de l'huile essentielle sont stables à hautes températures. Le principe consiste de mettre la matière végétale de celle-ci dans un appareil de distillation traversé par un courant de vapeur d'eau (voir appendice 2). Les constituants volatils, peu solubles dans l'eau sont entraînés et après condensation, séparés du distillat par décantation [124].

4.1.3. Hydrodiffusion

L'hydro-diffusion, est une co-distillation descendant, cette technique relativement récente et particulière. Elle exploite ainsi l'action osmotique de la vapeur d'eau. Elle consiste à faire passer, du haut vers le bas et à pression réduite, la vapeur d'eau à travers la matrice végétale (voir appendice 2).

La vapeur d'eau emporte avec elle toutes les substances volatiles. L'huile essentielle recueillie grâce à un collecteur qui permet un équilibre avec la pression atmosphérique. on peut aussi préciser qu'il y a un procédé de cohobation qui renvoie dans la chaudière toutes les eaux qui sont séparées

des huiles. L'avantage de cette méthode est d'être plus rapide donc moins dommageable pour les composés volatils, et de ne pas mettre en contact le matériel végétal et l'eau. L'hydro diffusion permet une économie d'énergie due à la réduction de la durée de la distillation et donc à la réduction de la consommation de vapeur [125].

4.2. Extraction par les solvants volatils

La technique d'extraction « classique » par solvant, consiste à placer dans un extracteur un solvant volatil et la matière végétale à traiter. Grâce à des lavages successifs, le solvant va se charger en molécules aromatiques, avant d'être envoyé au concentrateur pour y être distillé à pression atmosphérique.

L'extraction par solvant organique volatil reste la méthode la plus pratiquée. Les solvants les plus utilisés à l'heure actuelle sont : l'hexane, le cyclohexane, l'éthanol, le méthanol, le dichlorométhane et l'acétone. Le solvant choisi, en plus d'être autorisé devra posséder une certaine stabilité face à la chaleur, la lumière ou l'oxygène, sa température d'ébullition sera de préférence basse afin de faciliter son élimination, et il ne devra pas réagir chimiquement avec l'extrait. L'extraction est réalisée avec un appareil de Soxhlet ou un appareil de Lickens-Nickerson (voir appendice 2) [126].

Ces solvants ont un pouvoir d'extraction plus élevé que l'eau si bien que les extraits ne contiennent pas uniquement des composés volatils mais également bon nombre de composés non volatils tels que des cires, des pigments, des acides gras et bien d'autres substances.

La technique d'extraction par solvant volatil, consiste à placer dans un extracteur la matière végétale à traiter et un solvant. Grâce à des lavages successifs, le solvant va se charger en huiles essentielles, avant d'être envoyé au concentrateur pour y être distillé sous pression atmosphérique [126].

4.3. Extraction par micro-ondes

Cette technique d'extraction a été développée au cours des dernières décennies à des fins analytiques, C'est un procédé utilisant les micro-ondes (voir appendice 2) pour extraire de façon rapide et sélective des produits chimiques de diverses substances.

Le matériel végétal est immergé dans un solvant transparent (le méthanol, l'hexane) aux micro-ondes de manière à ce que seul le végétal soit chauffé. Les micro-ondes vont chauffer l'eau présente dans le système glandulaire et vasculaire de la plante, libérant ainsi les produits volatils qui passent dans le solvant (non chauffé). On filtre et on récupère ensuite l'extrait. L'extraction par micro-ondes a le grand avantage de réduire le temps d'extraction à quelques secondes. Ce procédé très rapide et peu consommateur d'énergie, livre un produit qui, est le plus souvent, de qualité supérieure à celle du produit d'hydrodistillation traditionnelle. Par ailleurs, l'analyse des huiles essentielles obtenues par cette méthode a montré que la composition qualitative des huiles essentielles était la même que celle des huiles obtenues par distillation mais le pourcentage des constituants variait de manière significative [127].

4.4. Extraction au CO₂ supercritique

Il s'agit du procédé le plus récent d'extraction à froid des matières premières végétales utilisant le gaz carbonique ou CO₂. Sous pression et à température supérieure à 31°C, le gaz carbonique se trouve dans un état dit «supercritique», intermédiaire entre le gaz et le liquide. La technique est fondée sur la solubilité des constituants dans le dioxyde de carbone (CO₂) à l'état supercritique. Grâce à cette propriété, le dioxyde de carbone permet l'extraction dans le domaine liquide (supercritique) et la séparation dans le domaine gazeux. Le dioxyde de carbone est liquéfié par refroidissement et comprimé à la pression d'extraction choisie. Il est ensuite injecté dans l'extracteur contenant le matériel végétal, puis le liquide se détend pour se convertir à l'état gazeux pour être conduit vers un séparateur où il sera séparé en extrait et en solvant. Dans cet

état, le CO₂ présente la particularité de dissoudre de nombreux composés organiques [128]. Cette propriété a été mise à profit pour extraire des matières premières végétales intéressantes pour la parfumerie.

La matière végétale dans cette méthode est chargée dans l'extracteur, puis le CO₂ introduit sous pression et réfrigéré. Le mélange est recueilli dans un vase d'expansion. La pression y étant réduite, le CO₂ reprend sa forme gazeuse et est complètement éliminé, et l'extrait végétal est isolé. L'avantage de cette méthode est la possibilité d'éliminer et de recycler le solvant par simple compression détente. De plus les températures d'extraction sont basses dans le cas de dioxyde de carbone et non agressives pour les constituants les plus fragiles. Cette technique est utilisable pour les essences difficilement distillables [129].

4.5. Extraction par ultrasons

Les ultrasons sont des ondes mécaniques qui sont capables de se déplacer dans un milieu élastique à une fréquence supérieure à la limite maximale d'audibilité de l'oreille humaine (16 kHz) (Figure 4.1). Les ultrasons peuvent être divisés en deux catégories en fonction de leurs fréquences :

- Ultrasons de diagnostic: Ces ultrasons sont aussi appelés ultrasons de basse intensité ou de haute fréquence (2 à 10 MHz). Les ultrasons constituent une méthode non destructive d'évaluation de propriétés physico-chimiques ou mécaniques, de mesures de concentrations, de mesures de niveaux, etc. Les applications sont nombreuses dans le domaine médical comme outil de diagnostic et de contrôle car leur utilisation est simple, efficace et autorise une visualisation en temps réels des organes comme le cœur sans effet ionisant ni destructif [130].
- Ultrasons de puissance: Aussi appelés ultrasons de haute intensité ou de basse fréquence (20 kHz à 100 kHz). Ils sont appliqués à des domaines industriels variés comme le nettoyage des surfaces, la production d'émulsion, l'accélération de réactions chimiques en milieu hétérogène ou

l'extraction d'arômes. Contrairement aux ultrasons de diagnostic, ces ultrasons sont capables de générer des bulles de cavitation. Les ultrasons permettent non seulement d'augmenter le rendement de l'extraction mais rend celle-ci moins dépendante du solvant [130].

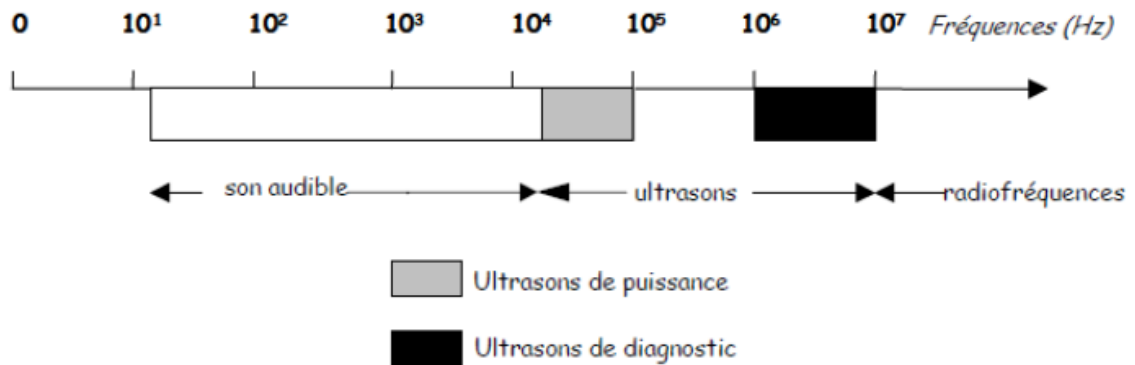


Figure 4.1 : Domaine d'utilisation des ultrasons en fonction de la fréquence [130]

4.5.1. Les facteurs influençant l'extraction par ultrasons

- ✓ Présence de gaz dissous : Les bulles de cavitation peuvent être constituées de vapeur du liquide dans lequel elles sont générées. La cavitation prend naissance à partir des noyaux qui sont constitués par les occlusions gazeuses au sein du liquide. La présence de gaz dissous favorisera donc le phénomène de cavitation [131].
- ✓ Pression du milieu : Les bulles de cavitation peuvent être générées lorsque la pression appliquée au milieu descend au-dessous de la tension de vapeur de ce liquide. La pression appliquée au milieu quand celui-ci est soumis aux ultrasons peut être calculée comme étant la somme de la pression hydrostatique et de la pression acoustique. Par conséquent la cavitation sera possible dans le liquide si la tension de vapeur du liquide est supérieure à la somme de la pression hydrostatique et la pression acoustique. Cela signifie que plus la pression appliquée au milieu sera élevée, plus il sera difficile de provoquer de la cavitation. En effet, pour la

provoquer, il faudra augmenter la pression acoustique et donc augmenter l'intensité des ultrasons [131].

- ✓ Intensité des ultrasons : Il y a une relation directe entre l'intensité des ultrasons et l'amplitude de la pression de l'onde sonore qui est-elle corrélée à la pression acoustique. La pression acoustique étant un paramètre clé dans la génération des ultrasons, plus l'intensité des ultrasons sera élevée plus facilement la cavitation pourra se faire [131].

- ✓ Fréquence des ultrasons : Les fréquences les plus couramment utilisées sont entre 20 et 40 kHz. De plus haute fréquences rendent plus difficile la cavitation. En effet, les bulles de cavitation ont besoin d'un petit laps de temps pour être générées. Plus la fréquence est élevée, plus les phases de raréfaction sont courtes donc moins la bulle a de chance d'être créée. C'est la raison pour laquelle les ultrasons de haute fréquence sont dits non destructeurs ; la fréquence est trop élevée pour pouvoir permettre la cavitation [131].

- ✓ Température : L'importance de ce paramètre est difficile à évaluer, car elle modifie la viscosité du milieu et la pression de vapeur saturante ce qui peut influencer la capacité de cavitation du milieu d'étude. Plus l'on se rapproche du point d'ébullition du liquide, plus les bulles de cavitation vont être générées facilement, mais elles perdent leur capacité d'implosion, c'est pourquoi la majorité des réactions sonochimiques sont favorisées par de faibles températures [131].

- ✓ Impuretés : Chaque impureté présente dans le liquide ou à la surface de la verrerie utilisée peut agir comme un nouveau site de cavitation. En effet, des gaz peuvent être emprisonnés dans les interstices des impuretés et les dépressions générées par les cycles de raréfaction vont déloger ces gaz de l'impureté et constituer un nouveau noyau de cavitation [131].

4.5.2. Équipement ultrasons de laboratoires

Deux types d'équipements sont couramment utilisés dans les laboratoires. Le premier est le bac à ultrasons qui est peu onéreux et trouve de nombreuses applications pour la préparation d'échantillons, l'homogénéisation, la dispersion, le dégazage et le nettoyage (Figure 4.2). Il génère des fréquences comprises entre 25 et 50 kHz et des puissances acoustiques de 1 à 5 W.cm⁻². Ce type d'instrumentation possède l'avantage d'être simple à utiliser mais nécessite l'emploi d'un contenant pour le mélange à traiter qui va agir comme amortisseur de l'effet des ultrasons qui ne pourront agir que de manière indirecte [132].

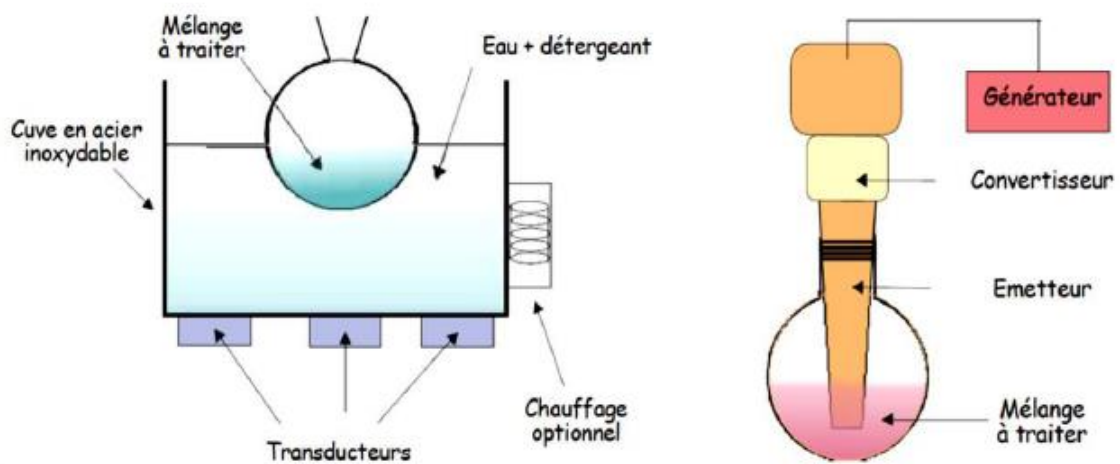


Figure 4.2 : Schéma des dispositifs à ultrasons : bac et sonde [132]

Le second appareillage est la sonde à ultrasons. A la différence du bac, elle permet une irradiation directe du milieu tout en générant des puissances acoustiques nettement supérieures (100 fois plus élevées). Cependant, son utilisation reste seulement adaptée au traitement de petits volumes de liquide et une attention particulière doit être portée à ce type de manipulation car l'échantillon peut subir une augmentation rapide de température. Le couplage de ces deux types d'appareillage à des systèmes de pompes permet un travail en mode continu car cela favorise la circulation ininterrompue de solvant «frais» à travers l'échantillon soumis aux ultrasons [132].

4.5.3. Ultrasons en technologie de transformation

Les ultrasons de puissance génèrent d'intenses forces de pression et de cisaillement ainsi que des forts gradients de température dans le milieu traité. Cette action physique intense des ultrasons permet de déstructurer la matière et/ou induire des réactions chimiques ou biochimiques. L'énergie ultrasonore résultante peut ainsi améliorer les transferts de chaleur, de matière ou bien de quantité de mouvement. Dans de nombreuses applications, la technologie des ultrasons possède des avantages considérables par rapport aux autres technologies conventionnelles. Les ultrasons améliorent le rendement réactionnel, les qualités organoleptiques ainsi que les propriétés visuelles du produit agroalimentaire final destiné à la consommation humaine [132].

4.5.4. Ultrasons en technologies d'extraction

L'utilisation des ultrasons pour l'extraction sur les matrices végétales ou alimentaires est un nouvel outil permettant d'augmenter les rendements ou/et d'accélérer les cinétiques d'extraction. Ces améliorations peuvent être attribuées à l'amélioration de la diffusion des substances dissoutes de l'intérieur de la cellule vers le milieu d'extraction. Les applications couvrent aujourd'hui l'extraction de nombreux autres composés comme les arômes, les antioxydants, les huiles et les colorants (Figure 4.3). L'extraction assistée par ultrasons des antioxydants peut être un outil avantageux dans le but d'optimiser le rendement et la pureté des extraits [133].

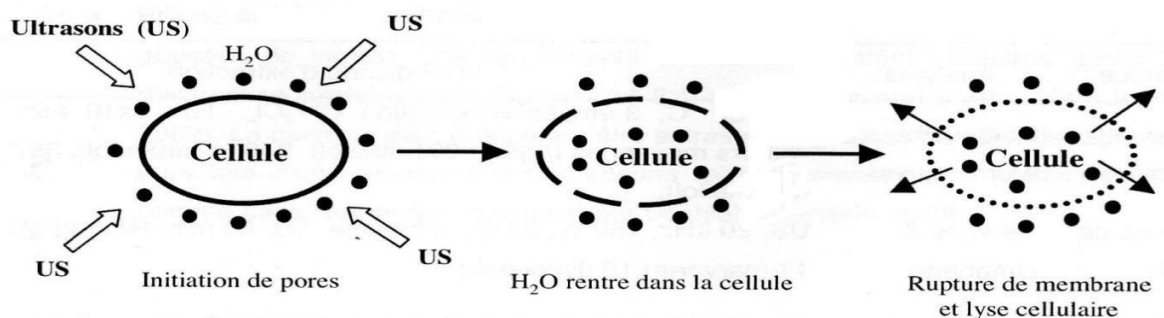


Figure 4.3 : Mécanisme de dommage cellulaire par ultrasons [133]

Chapitre 5

MATERIEL ET METHODES

Cette recherche est réalisée en 6 parties :

- La première partie, consiste à l'extraction et lyophilisation des catéchines du thé vert *Camellia sinensis*, est réalisée au niveau des laboratoires des sciences alimentaires et formulation Gembloux Agro-BioTech, Université de liège- Belgique.
- La deuxième partie consiste l'identification des molécules bioactives (catéchines) par HPLC-DAD et LC-MS spectrométrie réalisée au laboratoire de chimie générale et organique Gembloux Agro-BioTech Université de liège- Belgique.
- La troisième partie étant une expérimentation sur model animale souris et lapins et rat, dont l'objective de réaliser des tests de DL₅₀ et test de toxicité sur souris, par contre l'étude des catéchines sur les paramètres du stress oxydatif est réalisée sur les rats ; or que l'activité amincissante réalisée sur les lapins. Les animaux de laboratoire ont été fournis par l'institut pasteur d'Alger. Les expériences ont été réalisées au niveau de la station expérimentale de l'université de Blida1.
- La quatrième partie est une étude Biochimique dont la recherche du bilan lipidique, réalisée au laboratoire central de l'Hôpital de FRANTZ FANON-Blida.
- La partie histologique est réalisée au niveau de laboratoire d'anatomie pathologique de l'hôpital de Mustapha Pacha-Alger.
- La sixième partie est une approche sur modèle cellulaire d'hépatocyte de rat, réalisé au laboratoire de toxicologie Université de liège- Belgique.

5.1. Matériel

5.1.1. Matériel végétal

C'est du Thé vert type chinois *Camellia sinensis* L. var *sinensis* de 1^{er} choix vendu en Europe. La particularité de ce type de thé c'est que la feuille entière est utilisée et non pas des feuilles brisées.



Figure 5.1 : Thé vert *Camellia sinensis* L. (photo originale)

5.1.2. Matériel animale

- Souris blanches type Swiss issu de l'institut Pasteur d'Alger, dont leur poids varie entre 18-20 g, et âgés de 4 à 5 semaines. Utilisés pour réaliser le test de toxicité et la DL₅₀
- Rats femelles en croissance type Wistar issu de l'institut Pasteur d'Alger, dont leur poids varie entre 125-130 g, et âgés de 3 à 4 semaines, dont l'objectif de réalisées :
 - Une étude cytotoxique des catéchines sur les paramètres lipidiques ;
 - Une étude histologique du foie ;
 - Et de voir l'effet des catéchines sur les paramètres du stress oxydatif (MDA, GSH, GPx) foie de rat
- Lapins type albinos issu de l'institut Pasteur d'Alger, âgés de 3 à 5 mois et pesant entre 2.3 - 3.7 Kg. Utilisés pour étudier de l'activité amincissante.

N.B : Les animaux ont un accès libre à l'eau et à la nourriture, leur régime alimentaire est standard énergétique (calorique et lipidique).

- ❖ Sacrifice et prélèvement de sang et des organes : Les rats sont anesthésiés par chloroforme (94%), puis sacrifiés (par décapitation). Au moment du sacrifice, le sang est collecté sur des tubes secs et des tubes EDTA. Après centrifugation à 3000 tours/minute pendant 15 minutes, le sérum et le plasma sont récupérés et conservés à (-20°C), le plasma utilisé pour le dosage des paramètres lipidique. Après la dissection le foie rincé avec l'eau physiologique, ensuite pesés. Les homogénats des organes sont utilisés pour le dosage des paramètres du stress oxydatif (MDA, GSH et GPx).

5.1.3. Matériel Biologique

- ❖ Expérimentation sur model cellulaire :
Culture cellulaire d'hépatocyte de rat utilisé dont l'objective de voir la capacité antioxydant et hépato-protectrice des catéchines du thé vert extrait et de voir l'impact du stress oxydant sur l'accumulation de lipide hépatique. Les cellules hépatocyte de rats ont été fournies par le laboratoire de toxicologie, université de liège Belgique.
- ❖ Souches bactériennes utilisées :
 - *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442™
 - *Escherichia coli*, ATCC 10536™
 - *Staphylococcus aureus subsp. Aureus* ATCC 6538™
 - *Bacillus subtilis*
 - Levure et moisissure : *Aspergillus niger* et *Candida albicans*

Les souches de bactéries utilisées pour étudier l'activité antimicrobienne, issu du centre de biotechnologie Sfax- Tunisie.

5.1.4. Matériel de laboratoire

5.1.4.1. Appareillage

(Voir appendice 1)

5.1.4.2. Réactifs et milieux de cultures

(Voir appendice 1)

5.2. Méthodes

5.2.1. Méthode d'extraction des catechines du thé vert *Camillia sinensis*

5.2.1.1. Extraction par ultrason (UE)

But :

Cette étape est réalisée pour ôter et purifier les polyphénols inclus dans la feuille du thé vert. Ainsi, les transformer à une forme lyophilisée et donc une poudre qui a été utilisée dans la suite des essais.

Principe :

Il consiste à faire sortir les catéchine des feuilles du thé vert par ultrason dans l'eau par éclatement des cellules, mais à différente températures. Sachant y a pas un solvant organique ou d'autres produits chimiques afin d'éviter la possibilité d'intoxiquer les animaux utilisés dans les expériences réalisées.

Mode opératoire

- Mettre les feuilles du thé vert dans l'eau distillée (1:10) dans le bac de l'appareil d'ultrason [134] ;
- Faire plonger la sonde à l'intérieur, assurer une fréquence de 25 KHz émis (10s/10s) ;
- Régler temps (5, 10 et 15 min) et température (25, 60 et 95°C) ;

- Le filtrat obtenu subi une centrifugation pendant 15 min à 4000 rpm ;
- Filtrer par une membrane filtrante de 0.45 µm ;
- Le filtrat est récupéré, congelé à -45°C pendant 24h puis lyophilisé ;
- Il faut signaler que le lyophilisat doit être porté loin de la lumière, de l'humidité, et doit être conservé à +4°C.

5.2.1.2. Extraction par agitation mécanique (MAE)

Principe :

Il consiste à faire sortir les polyphénols de la feuille du thé vert sans l'utilisation de solvants ou d'autres produits chimiques afin d'ignorer la possibilité d'intoxiquer les animaux utilisés dans les expériences réalisées.

Mode opératoire :

- Les feuilles du thé vert sont partiellement broyées à l'aide d'un mortier ;
- Après broyage, l'eau distillée est ajoutée à raison de 10 ml pour chaque gramme de thé vert ;
- Le mélange (thé vert broyé + eau distillée) est mis directement sur une plaque chauffante réglée à 95°C pendant 15 min notant que ce mélange est vêtu du papier aluminium pour éviter l'oxydation des polyphénols à l'air et à la lumière ;
- Après 15 min, l'infusion est filtrée à l'aide d'un passoir fin ;
- Le filtrat obtenu subi une centrifugation pendant 15 min à 4000 rpm ;
- Le filtrat est récupéré, congelé à -45°C pendant 24h puis lyophilisé ;
- Il faut signaler que le lyophilisat doit être porté loin de la lumière, de l'humidité, et doit être conservé à +4°C [134].

5.2.2. Analyse des extraits aqueux du thé vert

5.2.2.1. Dosage des polyphénols totaux

Principe :

Les métabolites secondaires constituent une large gamme de molécules végétales, dont leur nature chimique et teneurs sont extrêmement variables d'une espèce à l'autre. Plusieurs méthodes analytiques peuvent être utilisées pour la quantification des polyphénols totaux. L'analyse par le réactif de Folin Ciocalteu est la plus utilisée.

Ce réactif est constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$). Lors de l'oxydation, il est réduit en un mélange d'oxyde bleu. La coloration produite est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans l'extrait analysé [135].

Mode opératoire :

Les polyphénols totaux ont été déterminés par spectrophotométrie, suivant le protocole appliqué par Miliauskas (2004) [136] :

- ✓ introduire dans une fiole de 50 ml, 1 ml de l'extrait de thé vert ;
- ✓ Ajouter 5 ml de Folin ciocalteu (2M) dilué au 1/10 ;
- ✓ Après 2 minutes ajouter 4ml de carbonate de sodium (Na_2CO_3) à concentration de 75g/L ;
- ✓ Les solutions des extraits de thé vert sont maintenues à l'obscurité pendant 30 min à température ambiante ;
- ✓ L'absorbance est mesurée à 765 nm.

La courbe d'étalonnage est effectuée par l'acide gallique, comme standard (Figure 5.2) en suivant les mêmes étapes du dosage.

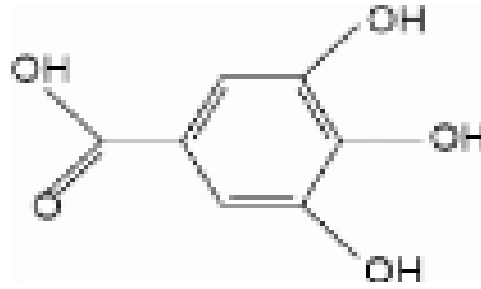


Figure 5.2 : L'acide gallique (Acide 3,4,5 hydroxybenzoïque).

Toutes les mesures sont répétées 3 fois. La quantité des polyphénols totaux est calculée par l'équation suivante :

$$C = c \cdot v / m$$

C : contenu total des polyphénols (mg équivalent acide gallique /g d'extrait de thé).

c : concentration d'acide gallique (mg/ml).

v : volume de l'extrait (ml).

m : masse de l'extrait pur du thé (g).

5.2.2.2. Dosage des flavonoïdes

Principe :

La quantification du contenu flavonoïque est estimée par la méthode d' AlCl_3 , selon le protocole modifié de: Kumaran et Karunakaran, (2006) [137].

Mode opératoire :

- Introduire dans un tube, 1ml de l'extrait de thé vert dans lequel on ajoute 1 ml de la solution trichlorure d'aluminium (AlCl_3) à une concentration 20mg/ml, et une goutte d'acide acétique ;
- Incuber à température ambiante pendant 40 min à l'obscurité ;
- L'absorbance est mesurée à 415 nm.

Dans les mêmes conditions, la solution standard de quercétine est préparée avec une concentration égale à 0,1 mg/ml. Toutes les manipulations sont répétées 3 fois. Le taux de flavonoïdes contenu dans l'extrait de thé est calculé selon l'équation suivante :

$$X = (A \cdot m_0) / (A_0 \cdot m)$$

X : la quantité des flavonoïdes (mg équivalent quercétine /g d'extrait thé).

A : Absorbance de l'extrait de thé vert.

A₀ : Absorbance de la solution quercétine.

m : masse de l'extrait de thé (mg).

m₀ : masse de la quercétine dans la solution.

5.2.3. Identification chromatographiques des catéchines

5.2.3.1. Analyse par HPLC-DAD

Principe : L'identification de la composition des polyphénols totaux extrait du thé vert s'effectue par HPLC-DAD, LC-MS, en utilisant des standards : la catéchine, EGCG, EGC, ECG comme étalon.

Mode opératoire :

- ✓ L'extrait des polyphénols totaux utilisé et celui de la méthode d'extraction par agitation mécanique, et par ultrasons (95°C, 15 min).
- ✓ A l'aide d'une seringue d'HPLC, prendre 25µl, injecter successivement dans l'HPLC les polyphénols totaux extrait du thé vert, puis les catéchines comme étalon.

Les caractéristiques de l'HPLC :

- ✓ Colonne C18 150×4.6mm 3µ Hypersil® BDS C8;
- ✓ Débit 0.4ml/mn;
- ✓ Phase mobile : Solvant A = eau/0,1% méthanol, Solvant B = Acétonitrile/0,1% méthanol (Tableau 5.1) ;
- ✓ Volume d'injection 25 µl (catéchines extrait du thé vert).

Lecture : La composition des polyphénols totaux (Catéchines) extrait du thé vert est exprimée par des pics et en %.

Tableau 5.1: Debit des gradients de phase mobile de l'HPLC

Temps (min)	Solv.A	Solv.B	Debit mL/min	Pression(bar)
0.00	95.0	5.0	1.200	250
40.00	5.0	95.0	1.200	250
45.00	95.0	5.0	1.200	250
50.00	95.0	5.0	1.200	250

5.2.3.2. Analyse par LC-MS

La technique d'identification LC-MS est une chromatographie couplée au système détection Massive. La phase mobile a consisté en eau contenant 0.1 % d'acide fourmique (A) et acetonitrile le contenant de 0.1 % d'acide fourmique (B). La séparation a été exécutée sur un gradient linéaire d'acétonitrile dans l'eau (5-95% B) pendant 40 min (Tableau 5.1). Les volumes d'injection pour tous les échantillons étaient 20 μ L.

Les spectres massifs ont été obtenus à un ratio massif-à-charge (m/z) la gamme de feuilletage de 100-600. Les paramètres utilisée pour l'analyse : tension capillaire, 4500V; pression de nébuliseur, 50 psig; séchage de débit à gaz, 10 L/min; séchage d'intérimaire 365°C. Les échantillons ont été analysés dans le mode positif. Les composants d'extraits de thé verts ont été identifiés selon leurs valeurs de m/z, UV/Vis des spectres absorbants et des temps de rétention en comparaison de ceux trouvés dans la littérature [15]. L'identification de sommets est confirmée par le spectre de masse. Les quantités de catéchines ont été calculées de zones maximales sur les chromatogrammes.

Les positions des pics ont été identifiées au départ des temps des rétentions obtenues avec des standards connus. L'identification des pics ont été confirmé par spectres des masses.

5.2.4. Analyses biologiques

5.2.4.1. Activité antioxydante

5.2.4.1.1. Test de DPPH

Principe :

L'activité antiradicalaire des composés phénoliques de l'extrait à partir du thé vert est évaluée en mesurant leurs capacités de piéger le radical libre DPPH (1,1-diphényl- 2-pycril-hydrazyl) sa couleur violette foncée se transforme en jaune lors de sa réduction.

Le radical DPPH• présente une bande d'absorption maximale à 515 nm dans le méthanol. Cette bande disparaît lors de la réduction du DPPH (en l'hydrazine correspondante) par un composé donneur d'atomes H (ArOH), selon et la Figure 5.3

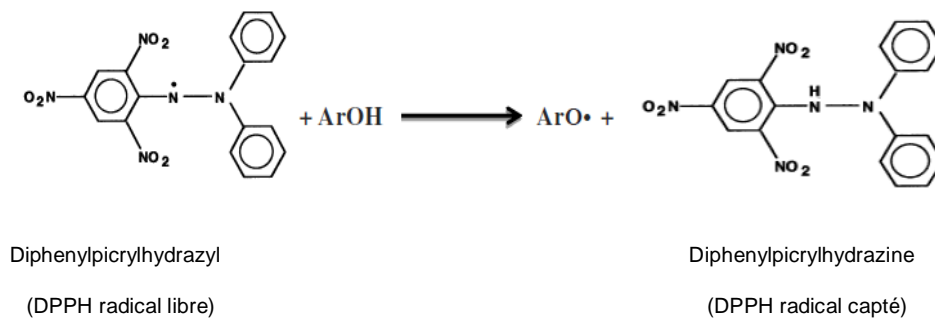


Figure 5.3 : Réduction du radical DPPH[•] [138].

Mode opératoire :

- Préparation de la solution du DPPH : la concentration de cette solution est de 0,037mg/ml préparée à partir de 9,25 mg solubilisé dans 250ml de méthanol absolu ;
- 100 µl d'extrait de thé vert à concentration de 5mg/ml (choisie après des essais préliminaires) ;

- Ajouter 3ml de la solution du DPPH préparée ;
- Laisser 30 minutes à l'obscurité ;
- L'absorbance est mesurée à 517 nm contre le blanc. Le pourcentage de piégeage du radical est calculé selon l'équation suivante [138] :

$$A = [(A1 - A2) / A1] \times 100$$

A1 : absorbance du contrôle (solution du DPPH sans extrait de thé vert).

A2 : absorbance en présence d'extrait de thé vert.

NB : Chaque test est répété trois fois, les résultats ont été présentés par la moyenne des trois essais.

5.2.4.1.2. Test FRAP

But :

La présente pratique porte sur l'évaluation de la propriété anti-oxydante des catéchines lyophilisés du thé vert *Camellia sinensis* par la méthode de FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*). La méthode FRAP est une méthode rapide et peu coûteuse spécifiquement orientée sur la capacité des produits testés à réduire le fer oxydé.

Principe :

Cette technique consiste à observer durant quatre minutes le changement d'absorbance à $\lambda = 700$ nm et à pH acide, résultant de la réduction du complexe Fe-TPTZ (ferric-tripyridyltriazine complexe) [139]. Cette méthode est adéquate pour caractériser le potentiel antioxydant de composés purs. Toutefois, le potentiel de plusieurs molécules, comme une variété de catéchines, ne peut être mesuré précisément du fait que leur temps de réaction dépasse les quatre minutes standard de cinétique [140].

Mode opératoire :

FRAP (*Ferric reducing antioxidant power*) ou le pouvoir réducteur du fer est déterminée selon la méthode d'Oyaizu [141].

- ✓ Dans des tubes à essai, 0,5 ml de solution de l'échantillon à différentes concentrations (de 0 à 1000 mg/ml) sont préparées.
- ✓ 2,5 ml de tampon phosphate (0,2 M ; pH 6,6) sont ajoutés à chaque tube puis 2,5 ml de potassium hexacyanoferrate [$K_3Fe(CN)_6$] à 1 % (dilué dans l'eau distillée).
- ✓ L'ensemble est chauffé à 50°C au bain marie pendant 20 min.
- ✓ Un volume de 2,5 ml d'acide trichloracétique (10%) est ensuite ajouté.
- ✓ Le mélange est centrifugé à 3000 rpm pendant 10 min.
- ✓ Le surnageant (2,5 ml) est mélangé avec 2,5 ml d'eau distillée et 0,5 ml de $FeCl_3$ à 1% fraîchement préparée dans de l'eau distillée.
- ✓ Un blanc sans échantillon (témoin) est préparé dans les mêmes conditions.
- ✓ La lecture se fait à 700 nm et la vitamine E est utilisée comme contrôle positif.

Dans cette méthode, plus l'absorbance est haute, plus la puissance de réduction est haute [141].

5.2.4.2. Activité antimicrobienne

Les composés phénoliques et catéchines sont doués d'un effet inhibiteur sur la croissance bactérienne. À partir de là, on a testé notre meilleur extrait lyophilisé présente la plus forte activité antioxydante UE (95°C, 15 min) en présence de différentes souches bactériennes pathogènes, pour mettre en évidence et évaluer cette propriété [142].

Principe :

La méthode des disques permet la mise en évidence de l'effet antibactérien des composés testés sur des bactéries, ainsi que la détermination de la résistance et la sensibilité de ces souches vis-à-vis des composés phénoliques testés. Le principe de cette technique est le même que celui du test d'antibiogramme, dont les disques sont chargés

d'antibiotiques et déposés à la surface des milieux de cultures solides et ensemencés par des espèces bactériennes bien déterminées.

Mode opératoire :

➤ Les souches testées :

On a choisi de travailler sur des bactéries pathogènes :

- *Escherichia coli* ATCC 10536TM et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442TM (Gram-);
- *Bacillus subtilis* et *Staphylococcus aureus subsp. Aureus* ATCC 6538TM (Gram+);
- ainsi sur des levures et moisissures : *Aspergillus niger* et *Candida albicans*.

➤ Repiquage des bactéries :

- ✓ Les colonies isolées des différentes bactéries sont incubées pendant 24 heures dans des bouillons nutritifs à 37°C, pour obtenir une croissance bactérienne optimale.

➤ Préparation des disques :

Des disques de 6 mm de diamètre préparés en papier wathman n°1, et autoclavés pendant 20 min à 120°C. Ces disques stériles sont plongés dans l'extrait aqueux du thé vert contenant des catéchines qui ont été identifiés.

➤ Application du test :

- ✓ Dans des boîtes de pétri stériles, les milieux de culture : gélose Muller Hinton pour rechercher des substances inhibitrices de *bacillus subtilis*; *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*;
- ✓ gélose de Sabouraud à 1% de glucose et 1% de maltose pour *Aspergillus niger* et *Candida albicans* sont coulées ;

- ✓ Laisser pendant 15 min pour se solidifier, sur lequel 200 μ L (10^6 UFC) de la suspension bactérienne sont déposées etensemencées à l'aide d'un râteau ;
- ✓ Imbiber les disques par 50 μ L l'extrait du thé vert UE (95°C, 15) et déposé sur la surface de la gélose ;
- ✓ Incubées les boites *E.coli* à 44°C, et 37°C pour *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus*, par contre à 22°C pour *Aspergillus niger* et *Candida albicans* pendant 24 heures [142].

Remarque :

- Ce test se réalise dans une zone stérile (à côté du bec benzène) pour éviter la contamination des cultures utilisées.
- L'utilisation d'un disque référence d'antibiotique est essentielle pour illustrer la différence entre les zones d'inhibition obtenues :
 Pour *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus* : le disque d'antibiotique utilisé est Gentamicine.
 Pour *Escherichia coli* : le disque d'antibiotique utilisé est Furane.
 Pour *Bacillus subtilis* le disque d'antibiotique utilisé est Streptomycine
Aspergillus niger et *Candida albicans* le disque d'antibiotique utilisé est Ketoconazole

Lecture :

L'activité antimicrobienne se manifeste par l'apparition d'un halo d'inhibition de la croissance microbienne autour des disques contenant les catéchines UE (95°C, 15min) ou l'antibiotique à tester.

Le résultat de cette activité est exprimé par le diamètre (D) de la zone d'inhibitions, dont la sensibilité est exprimée selon ce diamètre [143] :

- $D < 9$ mm : souche résistante (-) ;
- $9\text{mm} \leq D \leq 14\text{mm}$: souche sensible (+) ;
- $15\text{ mm} \leq D \leq 19\text{ mm}$: souche très sensible (++) ;
- $D > 20$ mm : souche extreme sensible (+++)

5.2.5. Etude toxicologique

5.2.5.1. Test DL₅₀

Principe : C'est le test de mortalité qui s'effectue par la mort de 50% de souris (DL₅₀), exprimé par la dose létale qui tue 50% de souris.

Mode opératoire :

- ✓ Préparer des concentrations 400, 600 et 800 µg/mL des catéchines UE (95°C, 15min) ;
- ✓ Filtrer à 0.22µm ;
- ✓ Répartie 4 lots de souris blanche male à raison de 4 souris/lot/dose, et les témoins ;
- ✓ Injecter en intraveineuse aux souris la quantité de 1ml de chaque dose (400 µg, 600 µg et 800 µg) des lyophilisat de catéchines UE (95°C, 15min) ;
- ✓ Injecter ces doses chaque jour jusqu'à l'obtention de la DL₅₀.

Lecture :

La dose létale exprimée par 50% de souris mortes (DL₅₀).

5.2.5.2. Test de toxicité

Le test de toxicité est réalisé en application d'une dose de 2500mg/Kg de souris et par jour [146].

Principe :

C'est la recherche de la toxicité des catéchines lyophilisées présentant le plus fort pouvoir antioxydant après leur extraction par ultrasons UE (95°C, 15 min), dont nous pouvons s'attendre à ce qu'elle provoque la mort des animaux d'expérience dans un temps donné, et après administration par voie orale (gavage).

Mode opératoire :

- ✓ Avant administration, la quantité des polyphénols lyophilisés désirée pour l'analyse est diluée dans de l'eau distillée ;
- ✓ La dose appliquée est 2500 mg/kg de poids corporel [146]
- ✓ Après administration par voie orale chaque jour des catéchines UE (95°C, 15 min), le résultat attendu s'avère après 10 jours.

Lecture :

Après 10 jours, le nombre d'animaux survivants est pris comme indicateur de toxicité :

- ✓ Si la mortalité des animaux utilisés est de 50% ou plus, cela signifie que la dose administrée est mortelle.
- ✓ Si le niveau de mortalité est égal au niveau de survie (50% mortalité, 50% survie), la dose administrée est dite toxique ou plus ou moins toxique.
- ✓ Si la mortalité des animaux utilisés est moins de 50% (entre 0% et 50%), cela signifie que la dose administrée n'est pas toxique et donc cette dose peut être intensifiée [144].

5.2.6. Etude cytotoxique des catéchines sur les paramètres lipidiques chez les rats femelles en croissance

Les rats sont réparties en 4 lots en nombre de 6 (24 rats). 5 régimes alimentaires sont préparés, la composition est comme suite :

- ✓ Régime d'adaptation administré à tous les souris durant 3 jours avant le début de l'expérimentation.
- ✓ Régime alimentaire standard énergétique et de l'eau à volonté, ce régime est donné au lot témoins.
- ✓ Régime standard énergétique + 400 mg/L de catéchines UE (95°C, 15min).

- ✓ Régime standard énergétique + 600 mg/L de catéchines UE (95°C, 15min).
- ✓ Régime standard énergétique + 800 mg/L de catéchines UE (95°C, 15min).

La durée de l'expérimentation est de 28 jours, avec accès libre à la nourriture et reçoivent des concentrations de catéchines UE (95°C, 15min) chaque jour à la place de l'eau.

5.2.6.1. Mesures pondérales

5.2.6.1.1. Poids corporel

Le poids corporels de tous les animaux est pris le 1^{er} jour et le jour de sacrifice des souris de chaque lot afin de suivre l'évolution de leur masse corporelle.

5.2.6.1.2. Poids du foie

Le poids de foie des souris est mesuré le 1^{er} jour et le jour de sacrifice des souris de chaque lot afin de suivre l'évolution de leur masse de foie lors de la consommation des catéchines.

5.2.6.1.3. Indice hépato somatique (IHS)

Nous renseigne sur l'hypertrophie du foie [147]. Il est calculé à partir d'un rapport entre le poids du foie et celui du corps qu'on multiplie par 100 :

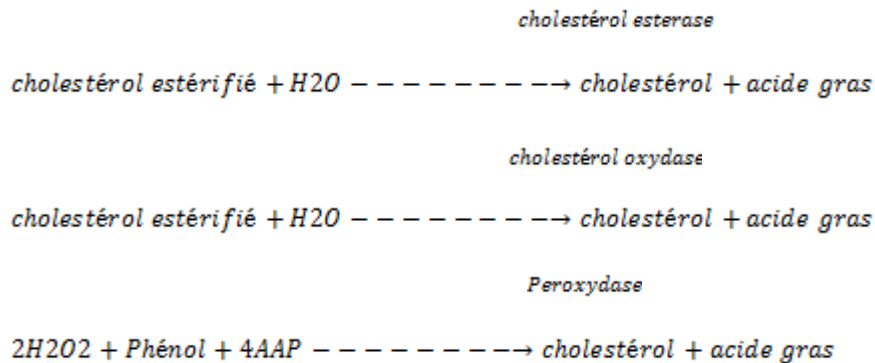
$$\text{IHS} = 100 \times \text{Poids de foie(g)} / \text{Poids du corps (g)}$$

5.2.6.2. Etude biochimique

5.2.6.2.1. Dosage du cholestérol total

Principe :

La détermination colorimétrique enzymatique du cholestérol suit les réactions suivantes [148] :



Mode opératoire :

Les étapes de dosage du cholestérol total sont résumées dans le tableau 5.2 ci-dessous :

Tableau 5.2 : Dosage du cholestérol total

	Blanc réactif	Plasma	Standard
Plasma (µl)	/	10	/
Standard (µl)	/	/	10
Réactif 1 (µl)	1000	1000	1000
Réactif 2 (µl)	1000	1000	1000

Après agitation, la lecture de la densité optique est effectuée après 5 minutes d'incubation. La coloration finale devient stable après 1 heure.

Lecture :

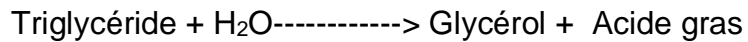
La lecture est réalisée par l'afficheur de spectrophotomètre, dont les conditions suivantes : température 37°C, épaisseur de la cuve 1 cm.

5.2.6.2.2. Dosage de triglycérides

Principe :

La détermination enzymatique des triglycérides suit les réactions suivantes [149].

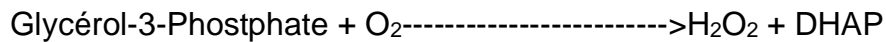
Lipase



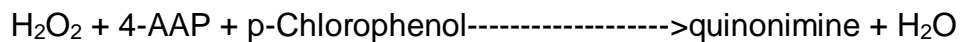
Glycérol kinase



Glycérol-3-phosphate oxydase



Peroxydase



Mode opératoire :

Les étapes de dosage des triglycérides sont résumées dans le tableau 5.3 ci-dessous :

Tableau 5.3 : Dosage des triglycérides

	Blanc réactif	Plasma	Standard
Plasma (µl)	/	10	/
Standard (µl)	/	/	10
Réactif 1 (µl)	1000	1000	1000
Réactif 2 (µl)	1000	1000	1000

Après agitation, les tubes sont incubés à 37°C pendant 10 minutes.

Lecture :

La lecture est sur l'afficheur de spectrophotomètre, dont les conditions suivante : température 37°C, longueur d'onde 505 nm (505-550nm), épaisseur de la cuve 1 cm.

5.2.6.2.3. Dosage des lipides totaux

But :

C'est la détermination de la concentration en g/L des lipides totaux sérique par spectrophotométrie

Principe :

C'est une extraction à l'isopropanol qui sera suivi d'une floculation quantitative. Le trouble qui en résulte est mesuré par turbidimétrie à 620 nm.

Mode opératoire :

- ✓ Préparer le réactif de floculation (solution a sulfate dextrane 0.5 g/L et la solution b chlorure de magnésium 0.1M) ;
- ✓ Faire une extraction à l'isopropanol, homogénéiser par retournement ;
- ✓ Tous les échantillons sont traités en même temps (tableau 5.4) ;
- ✓ Centrifuger 10 min à 3000 tours/min ;
- ✓ Reprendre 1 mL de chaque tube est ajouté 5 mL de réactif floculant ;
- ✓ Le témoin est réalisé 1mL isopropanol +5 mL de réactif floculant ;
- ✓ Agiter par retournement et laisser reposer pendant 45min [150].

Lecture :

Au spectrophotomètre 620 nm contre le témoin

Le calcul de la concentration des lipides totaux de l'inconnu sérique, par graphique via la loi de beer-lambert ($E = k.c.l$) sur base de la droite de standardisation établie avec l'extinction (E) en fonction des concentrations des lipides totaux (Appendices 4).

Tableau 5.4 : Récapitulatifs des volumes pour la préparation des solutions

Réactif (mL)	A	S1	S2
Isopropanol	3,8	3,8	3,8
Sérum	-	0,2	0,2
Serum inconnu*	0,2	-	-

A : inconnu sérique à analyser ; S1 : Standard1 ; S2 : Standard 2

5.2.6.3 Etude histologique

Principe :

Aperçu des principales colorations histologiques et intérêt pour le pathologiste de se faire une idée de la pathologie présente et d'avoir une vision globale de la morphologie des tissus (noyau, cytoplasme et collagène) [151].

Mode opératoire :

- ✓ Fixation : La fixation a été effectuée par émersion des fragments des organes prélevés dans une solution de formol 10% pendant 24h.
- ✓ Déshydratation et éclaircissement : Après rinçage à l'eau courante, les pièces ont été imprégnées dans cinq bains d'alcool éthylique à concentration croissante : alcool 70° (1 bain de 30min), 95° (2 bain de 30min), 100° (2 bain de 30min). L'éclaircissement a été effectué dans 3 bains de toluène pendant 15 min pour chacun.
- ✓ Imprégnation : Dans une étuve les fragments ont été imprégnés dans deux bains successifs : le 1^{er} bain de 50% de paraffine et 50% de toluène, le 2^{eme} bain comprend de la paraffine pure. La durée est d'une heure pour chacun.
- ✓ Inclusion et mise en bloc : L'inclusion est réalisée selon les étapes suivantes :
 - Ecoulement de la paraffine dans des moules métalliques ;
 - Inclusion et orientation des pièces dans la paraffine ;
 - Refroidissement des blocs de paraffine sur une plaque métallique réfrigérée environ 15 min.
- ✓ Confection des coupes : Les blocs ont été coupés à l'aide d'un microtome avec un épaisseur de 3 µm.
- ✓ Collage des rubans des coupes. Les rubans obtenus ont été étalés décevement sur des lames gélatinées.

- ✓ Déparaffinage et hydratation : Le déparaffinage a été réalisé dans quatre bains de xylène pendant deux minutes pour chacun. Après le déparaffinage, les coupes ont été hydratées dans quatre bains d'éthanol décroissant : 100°, 95°, 90°, 70° pendant deux minutes chacun.
- ✓ Coloration : La coloration a été réalisée par l'hématoxyline d'éosine selon les étapes suivant :
 - Trois bains d'hématoxyline pendant 2 minutes chacun ;
 - Rinçage à l'eau courante ;
 - Un bain d'acide chlorhydrique pendant 2 minutes ;
 - Rinçage à l'eau courante ;
 - Un bain d'ammoniac pendant 2 minutes ;
 - Rinçage à l'eau courante ;
 - Un bain d'éosine pendant 2 minutes ;
 - Rinçage à l'eau courante.
- ✓ Déshydratation et éclaircissement : Les coupes ont été déshydratées par le passage successif dans quatre bains d'éthanol pendant 2 minutes pour chacun. Ensuite, elles ont été introduites dans cinq bains de xylène pendant 2 minutes chacun, pour l'éclaircissement [151].

Lecture :

Une lamelle a été fixée à l'aide d'un l'Eukitt sur chaque coupe. Les lames ont été séchées et nettoyées par le xylène. L'observation microscopique a été réalisée à l'aide d'un microscope photonique au grossissement x100. La prise des photos a été effectuée par un photo-microscope Leica.

5.2.7. Etude des Catéchines UE (95°C, 15min) sur les paramètres du stress oxydatif chez les rats femelles en croissance

Un gramme de tissu de foie de chaque rat des différents groupes étudiés, a été utilisé. Après broyage et homogénéisation des tissus dans le TBS (Tris 50 mM, NaCl 150m M, pH 7.4), on a procédé à une centrifugation de la suspension cellulaire (3000 tours/min, 15 min), puis le surnageant obtenu est conservés à -20°C en attendant d'effectuer les dosages des paramètres du stress oxydatif.

5.2.7.1. Dosage des malondialdéhyde (MDA)

Principe :

Les composés carbonylés à l'instar du malondialdéhyde réagissent avec l'acide thiobarbiturique (TBA) pour donner des chromophores de couleur rose absorbant à 532 nm [152].

Mode opératoire :

- ✓ Pipeter dans les tubes à essai en verre et à vis, 100µl d'échantillon
- ✓ Ajouter 400µl de réactif TBA et fermer hermétiquement ;
- ✓ Chauffer le mélange au bain Marie à 100 °C pendant 15 minutes ;
- ✓ Refroidir dans un bain d'eau froide pendant 30 minutes en laissant les tubes ouverts pour permettre l'évacuation des gaz formés lors de la réaction ;
- ✓ Centrifuger à 3000 tours/minutes pendant 5 minutes et lire l'absorbance du surnageant à 532 nm à l'aide d'un spectrophotomètre [152].

Lecture : La concentration de TBARS a été déterminée en utilisant le coefficient d'extinction moléculaire du MDA ($\epsilon = 1,53 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Les résultats ont été exprimés en µmol/L.

$$\text{MDA } (\mu\text{mol/mg de prot}) = (\text{Do échantillon}/1.53 \times 10^5)/\text{mg de protéine}$$

5.2.7.2. Dosage de glutathion réduit (GSH)

Principe :

Le glutathion a été déterminé selon la méthode colorimétrique par un spectrophotomètre d'absorption moléculaire, la mesure de la densité optique résulte de la formation de l'acide 2- nitro-5 mercocapturique à partir de la réduction de l'acide dithio-bis2-nitrobenzoïque ce qu'on appelle réactif de d'Ellman avec les groupements SH existent dans le GSH [153].

Mode opératoire :

- ✓ Peser 250mg de tissus hépatique ;
- ✓ Broyer le tissu avec 10 ml de TBS (Tris 50 mM, NaCl 150 mM pH 7.4) jusqu'à l'obtention d'une solution homogène ;
- ✓ Prendre 0.8 mL de solution homogène et 0.2ml de l'acide salicylique (0.25%) ;
- ✓ Mélanger avec l'agitateur et laisser 15 minute dans le réfrigérateur puis centrifuger à 1000 tr/min pendant 5min ;
- ✓ Utiliser le surnageant pour le dosage de glutathion
- ✓ Prendre 0.5ml de surnagent, ajouter 1ml de solution tampon tris avec NaCl, puis ajouter 0.025ml de DTNB (0.01mol) méthanol ;
- ✓ Laisser le mélange 5min à une température ambiante pour effectuer la lecture [153].

Lecture : Lire l'absorbance avec spectrophotomètre d'absorption moléculaire à 412 nm contre le blanc (eau distillé).

$$[\text{GSH}] \text{ (nM/mg de prot)} = (\text{Do} \times 1 \times 1.525 \times d) / (13133 \times 0.8 \times 0.5 \times \text{mg de prot})$$

13133: constante d'absorption des groupes SH à 412 nm.

DO: la lecture d'absorbance par le spectrophotomètre.

1.525ml: volume total de mélange.

0.5ml: volume de solution surnagent ; 1: volume de mélange de protéine.

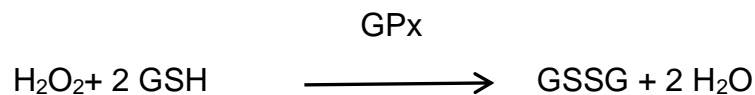
0.8ml: volume de solution homogène sans protéine existe dans 1ml.

[GSH]: concentration de glutathion ; d : facteur de dilution.

5.2.7.3. Dosage de l'activité du glutathion peroxydase (GPx)

Principe :

L'activité enzymatique du glutathion peroxydase (GPx) a été mesurée par la méthode de Flohé et Gunzler (1984) [154], en utilisant un spectrophotomètre d'absorption moléculaire. Cette méthode est basée sur la réduction de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en présence de glutathion réduit (GSH), ce dernier est transformé en (GSSG) sous l'influence de la GPx selon la réaction suivante :



Mode opératoire :

- ✓ Peser 250mg de tissus hépatique ;
- ✓ Broyer le tissu avec 10 ml de TBS (Tris 50 mM, NaCl 150 mM pH 7.4) jusqu'à l'obtention d'une solution homogène ;
- ✓ Prendre 0.8 mL de solution homogène et 0.2ml de l'acide salicylique (0.25%) ;
- ✓ Mélanger avec l'agitateur et laisser 15 minute dans le réfrigérateur puis centrifuger à 1000 tr/min pendant 5min ;
- ✓ Prélever 0.2 mL de l'homogénat (surnageant) ;
- ✓ Ajouter 0.4 mL de GSH (0.1 mM) ;
- ✓ Ajouter 0.2 mL de la solution tampon TBS (Tris 50 mM, NaCl 150 mM pH 7.4) ;
- ✓ Incuber au bain marie à 25°C, pendant 5 min ;
- ✓ Ajouter 0.2mL de H_2O_2 (1.3 mM) pour initier la réaction ;
- ✓ Laisser agir pendant 10 minutes ;
- ✓ Ajouter 1 mL de TCA (1%) pour arrêter la réaction ;
- ✓ Mettre le mélange dans la glace pendant 30 minutes ;
- ✓ Centrifuger durant 10 minutes à 3000 tours /minutes ;
- ✓ Prélever 0.48 mL du surnageant ;
- ✓ Ajouter 2.2 mL de la solution tampon TBS ;

- ✓ Ajouter 0.32 mL de DTNB (1.0 mM) ;
- ✓ Mélanger et après 5 minutes lire les densités optiques à 412 nm [154].

Lecture :

La détermination de l'activité enzymatique de la GPx se fait à l'aide de la formule suivante:

$$\text{GPx } (\mu\text{mol GSH/mg de prot}) = [(\text{Do échantillon} - \text{Do étalon}) / \text{Do étalon} \times 0.04] \times 5/\text{mg de prot}$$

DO échantillon: Densité optique de l'échantillon.

DO étalon: Densité optique de l'étalon.

0.04: Concentration de substrat (GSH).

Remarque :

Le dosage des protéines tissulaires de foie a été déterminés suivant une méthode colorimétrique par un spectrophotomètre en utilisant le bleu de Comassie comme réactif qui est réagi avec les groupements amines (-NH₂) des protéines pour former un complexe de couleur bleu. (L'apparition de la couleur bleue reflète le degré d'ionisation du milieu acide et l'intensité correspond à la concentration des protéines).L'absorption est mesurée à 595 nm (voir Appendice 1).

5.2.8. Etude des Catéchines sur l'activité amincissante chez les lapins

But :

Cette analyse est accomplie pour témoigner le pouvoir diététique des catéchines extraite du thé vert. Sachant qu'un poids élevé est la source de plusieurs maladies (diabète, obésité, maladies cardiovasculaires...etc) et que le thé est connu depuis longtemps comme aliment amincissant, cet examen est réalisé pour prouver l'efficacité des catéchines dans la perte de poids.

Principe :

Le principe consiste à suivre les variations du poids chez les lapins, en leur administrant les Catéchines du thé vert UE (95°C, 15 min) 3 fois par jours (au contour des repas), par gavage, pendant 90 jours (3 mois).

Mode opératoire :

Cette analyse était réalisée sur 5 lots de lapins. Pendant les 90 jours, aucune modification sur la quantité de polyphénols consommée par jour n'était entraînée.

- ✓ Les lapins triés pour l'analyse sont sélectionnés selon leur poids ;
- ✓ Les 3 premiers jours, les lapins consomment une alimentation équilibrée et 100% énergétique (riche en glucides, protéines et lipides). Dans la suite de l'analyse, le régime alimentaire habituel est repris ;
- ✓ Durant les 90 jours, les lapins prenaient les catéchines du thé vert UE (95°C, 15min), par gavage 130mg, 3 fois par jour [155] ;
- ✓ La quantité des catéchines administrée chaque jour est 390 mg de poudre lyophilisés de catéchines extraite du thé vert ce qui équivaut à 130 mg par dose [156];
- ✓ La mesure du changement du poids est chaque semaine durant toute l'analyse pendant 3 mois [155].

5.2.9. Etude des catéchines extrait du thé vert sur culture cellulaire d'hépatocytes de rat

Le modèle de culture primaire d'hépatocytes de rat, à la différence des cultures sur lignées cancéreuses humaines, a été décrit comme étant le modèle cellulaire le plus physiologique pour étudier des effets hépatiques [157]. Cependant, les hépatocytes en culture primaire perdent peu à peu leur fonctionnalité et leur morphologie au cours du temps. Une représentation schématique des protocoles expérimentaux et des tests effectués *in vitro* est proposée en Figure 5.4.

- **Ensemencement des cellules :** Les hépatocytes ont été décongelés par immersion complète des cryotubes (fermés) dans un bain marie à 37°C puis resuspendus immédiatement dans un milieu William's E contenant 10% de sérum de veau fœtal, 50 UI/mL de pénicilline, 50 µg/mL de streptomycine et 0,1UI/mL d'insuline (Milieu M1). Les hépatocytes en suspension ont alors étéensemencés directement sur plaque 96 puits à fond plat pré-cotés au collagène (50 µL de collagène à 200 µg/mL, séchage à l'air libre). La densité de l'ensemencement cellulaire était de $2,5 \times 10^4$ ou 3×10^4 cellules par puits suivant les expériences. Une foisensemencées, les cellules ont été cultivées sans traitement durant 24h à 37°C (dans une atmosphère humide à 95% O₂ et 5% CO₂) afin de permettre leur adhésion au fond des puits.

- **Après 24h le milieu de culture William's E a été remplacé par un milieu de culture sans sérum mais supplémenté en hydrocortisone héli-succinate (1µM) et de l'albumine de sérum de veau (240 µg/mL) (milieu de traitement M2). Les hépatocytes en culture primaire ont alors pu être soumis aux**

protocoles expérimentaux. Les différents tests réalisés illustré dans la figure 5.4

- Effet des catéchines sur les lipides intra cellulaire hépatique : L'évaluation de l'effet des catéchines du thé sur le taux de lipides intracellulaires dans les hépatocytes de rat en culture primaire. Pour se faire, les hépatocytes ont d'abord été soumis à des doses croissantes d'extrait de thé (0-10 mg/mL de M2) et un test de viabilité cellulaire, le test MTT, a été réalisé afin de sélectionner les doses non toxiques pour réaliser la suite de l'expérimentation. Les hépatocytes ont ensuite été exposés durant 24 h à différentes concentrations de catéchines extrait du thé (400 et 600 µg/mL de M2). Suite à cette exposition, une mesure de l'accumulation de lipides a été réalisée à l'aide du test LipidTox.
- Capacité antioxydante et hépatoprotéctrice des catéchines du thé : Pour évaluer l'effet hépatoprotecteur et antioxydant des catéchines du thé extrait, on a pré-traité les hépatocytes de rat en culture primaire pendant 4h avec trois concentrations différentes des catéchines extrait (400, 600 et 800 µg/mL de M2), ainsi une concentrations en EGCG de 12 µM pur administré seul. Après les 4h de pré-traitement, le milieu contenant les solutions de thé ou d'EGCG a été enlevé, et remplacé, après rinçage, par du milieu M2 contenant 150 µM d'hydroperoxyde de tert-butyl ou *t*-BHP (tert-Butyl hydroperoxide) laissé à incuber durant 1h afin d'induire un stress oxydant. Une fois les cellules traitées au *t*-BHP, des tests de viabilité cellulaire (Test MTT, Rouge Neutre, Impédance), de mesure de la production d'anions superoxydes (Test MitoSox) et de mesure de l'intégrité de la fonction mitochondriale (Test TMRE) ont été effectués (Figure 5.4).
- Impact du stress oxydant sur l'accumulation de lipide hépatique et effet des catéchines du thé : Afin d'évaluer l'impact du stress oxydant sur le taux des lipides intracellulaires, les hépatocytes ont été traités avec une solution à

120 μM de t-BHP durant 12 h afin d'induire un stress oxydant en présence ou non de plusieurs concentrations de catéchines de thé (100, 250, 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de M2) ou de 50 μM de Tempol, molécule antioxydante hétérocyclique. Après 12 h de traitement, un test de mesure des lipides intracellulaires (Test LipidTox) et un test de mesure de la production d'anions superoxydes (Test MitoSox) ont été effectués (Figure 5.4).

5.2.9.1. Mesures de la viabilité cellulaire

5.2.9.1.1. Test MTT

Principe :

Le test MTT est une méthode rapide de numération des cellules vivantes. Le réactif utilisé est le sel de tétrazolium MTT (Bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium). L'anneau de tétrazolium qu'il contient est réduit en formazan par la succinate déshydrogénase (SD) mitochondriale des cellules vivantes actives. Ceci forme un précipité de couleur violette dans la mitochondrie. La quantité de précipité formée est proportionnelle à la quantité de cellules vivantes de chaque puits [158].

Mode opératoire :

Avant d'effectuer le test, les cellules ont été préalablement rincées à deux reprises avec du M2. Les cellules ont ensuite été incubées pendant 2h à 37°C avec une solution de MTT (0,5 mg/mL milieu M2). Après les 2h d'incubation, la solution de MTT a été enlevée, les cellules ont été à nouveau rincées deux fois avec du M2, et 100 μL de DMSO 100% ont été ajoutés aux cellules afin de les faire éclater pour dissoudre les précipités de Formazan violets dans le milieu. Une mesure de la densité optique à 570 nm par spectroscopie a alors été effectuée pour déterminer la quantité relative de cellules qui étaient vivantes. Les résultats ont été exprimés en pourcentage de viabilité cellulaire par rapport à la viabilité cellulaire des cellules contrôles (non-traitées) [158].

5.2.9.1.2. Test rouge neutre

Principe :

Le rouge neutre est un composé chimique aromatique hétérocyclique souvent utilisé comme colorant (ou indicateur coloré) par les biologistes. Le rouge neutre peut être utilisé pour distinguer les cellules vivantes, qui intégreront le rouge neutre dans leurs lysosomes, des cellules mortes, qui ne l'intégreront pas. Plus une cellule est proche de la mort cellulaire, plus sa capacité à intégrer le rouge neutre diminue [159].

Méthode :

Avant d'effectuer le test, les cellules ont été préalablement rincées à deux reprises avec du M2. Elles ont été ensuite incubées pendant 2h à 37°C avec une solution de rouge neutre (40 µg/mL M2). Après les 2h d'incubation, la solution de rouge neutre a été enlevée, les cellules ont été rincées deux fois avec du M2 et 100 µL d'une solution "neutral red destain" (50% éthanol 100% + 49% H₂O distillée + 1% acide acétique glacial) ont été ajoutés afin de libérer dans le milieu le rouge neutre intégré par les cellules vivantes. La quantité relative de cellules vivantes a été déterminée par mesure de la densité optique à 550 nm par spectroscopie. Les résultats ont été exprimés en pourcentage de viabilité cellulaire par rapport à la viabilité cellulaire des cellules contrôles (non-traitées) [159].

5.2.9.2. Mesure de l'impédance cellulaire

Principe :

L'impédance électrique cellulaire correspond à l'opposition exercée par un tapis cellulaire au passage d'un courant alternatif sinusoïdal. Elle est mesurée dans des puits de cultures dédiés, dans lesquels le fond est recouvert de microélectrodes. L'index cellulaire (Cell Index) est obtenu à partir des variations d'impédance électrique ; il est représentatif du statut cellulaire global. La présence de cellules dans le fond des puits affecte l'environnement électrique des électrodes et conduit à une augmentation de l'index cellulaire. Ainsi, plus le nombre de cellules est élevé, plus les valeurs d'impédance sont importantes. Le

Cell Index varie par ailleurs en fonction de la morphologie cellulaire, de la qualité des interactions cellulaires et des interactions entre cellules et support. Cet outil d'analyse cellulaire retranscrit en temps réel l'état global de la culture. Il est adapté à l'étude de la plupart des fonctions cellulaires : adhésion et étalement, croissance et viabilité, ou tout autre événement biologique accompagné d'une modification de morphologie cellulaire [159].

Méthode :

Les cellules ont étéensemencées à $2,5 \times 10^4$ cellules par puits dans des plaques XCelligence puis directement placées dans l'appareil de mesure après ensemencement. Le traitement des cellules a été effectué 24h après l'ensemencement afin de permettre aux cellules d'adhérer au fond du puits. La mesure de cell index a été effectuée sur chacun des puits, et afin d'observer l'influence de chaque traitement sur les cellules traitées en comparaison avec les cellules contrôles (non-traitées), le cell index a été normalisé par rapport au dernier point avant l'ajout des traitements [159].

5.2.9.3. Mesures par microscopie à fluorescence

La spectroscopie à fluorescence repose sur l'affinité de marqueurs fluorescents (fluorochromes) pour des cibles intracellulaires d'intérêt. L'exposition des cellules avec un ou plusieurs fluorochromes permet ainsi de marquer certains organites intracellulaires spécifiques qui se lient spécifiquement aux fluorochromes, et d'analyser ensuite la fluorescence intracellulaire pour discriminer la ou les cibles étudiées. La mesure et l'analyse de la fluorescence intracellulaire ont été effectuées.

5.2.9.3.1. Test LipidTox

But : C'est la mesure de l'accumulation de lipides intracellulaires

Principe : Le LipidTox est un marqueur fluorescent vert qui a une forte affinité pour les lipides neutres tels que les triglycérides et qui peut être ensuite détecté par microscopie à fluorescence. Le Hoechst 33342 est un marqueur fluorescent bleu possédant une forte affinité pour l'ADN génomique et qui permet ainsi de marquer spécifiquement les noyaux cellulaires et de discriminer chaque cellule du tapis cellulaire [159].

Méthode :

Une fois les protocoles 1 et 3 effectués, chacun des puits contenant les hépatocytes ont été rincés avec du M2 et ont été incubés 30 minutes à 37°C avec 100 µL d'une solution de marquage contenant du LipidTox (concentration finale : 0,5x de la solution stock commerciale, Ex/Em = 577/609 nm) et du Hoechst 33342 (concentration finale = 2,5 µg/ml, Ex/Em = 365/515 nm). Le milieu de marquage a ensuite été enlevé, rincé puis remplacé avec du M2 sans traitement. La plaque a alors été placée dans l'appareil de mesure et une acquisition puis une analyse des images de fluorescence ont été effectuées. La cyclosporine A (10 µM) a été utilisée comme contrôle positif (inducteur d'accumulation de lipides hépatiques) pour le test LipidTox [159].

5.2.9.3.2. Test MitoSox

But : C'est l'évaluation de la production d'anion superoxyde (O_2^-)

Principe : Le réactif MitoSox™ Rouge est un fluorochrome spécifique de l'anion superoxyde mitochondrial des cellules vivantes. Le réactif MitoSOX™ Rouge est spécifiquement oxydé par l'anion superoxyde O_2^- mitochondrial et produit une fluorescence rouge. Le produit d'oxydation peut se lier à l'ADN et produit une fluorescence d'autant plus intense [159].

Méthode : Une fois les protocoles 2 et 3 effectués, les hépatocytes ont été rincés avec du M2 et ont été incubées 20 minutes à 37°C avec 100 µL d'une solution de marquage contenant du MitoSox (concentration finale = 5 µM, Ex/Em = 510/580 nm) et du Hoechst 33342 (concentration finale = 2,5 µg/ml, Ex/Em = 365/515 nm). Le milieu de marquage a ensuite été enlevé, rincé puis remplacé avec du M2 sans traitement. La plaque a alors été placée dans l'appareil de mesure et une acquisition et une analyse des images de fluorescence ont été effectuées [159].

5.2.9.3.3. Test TMRE

But :

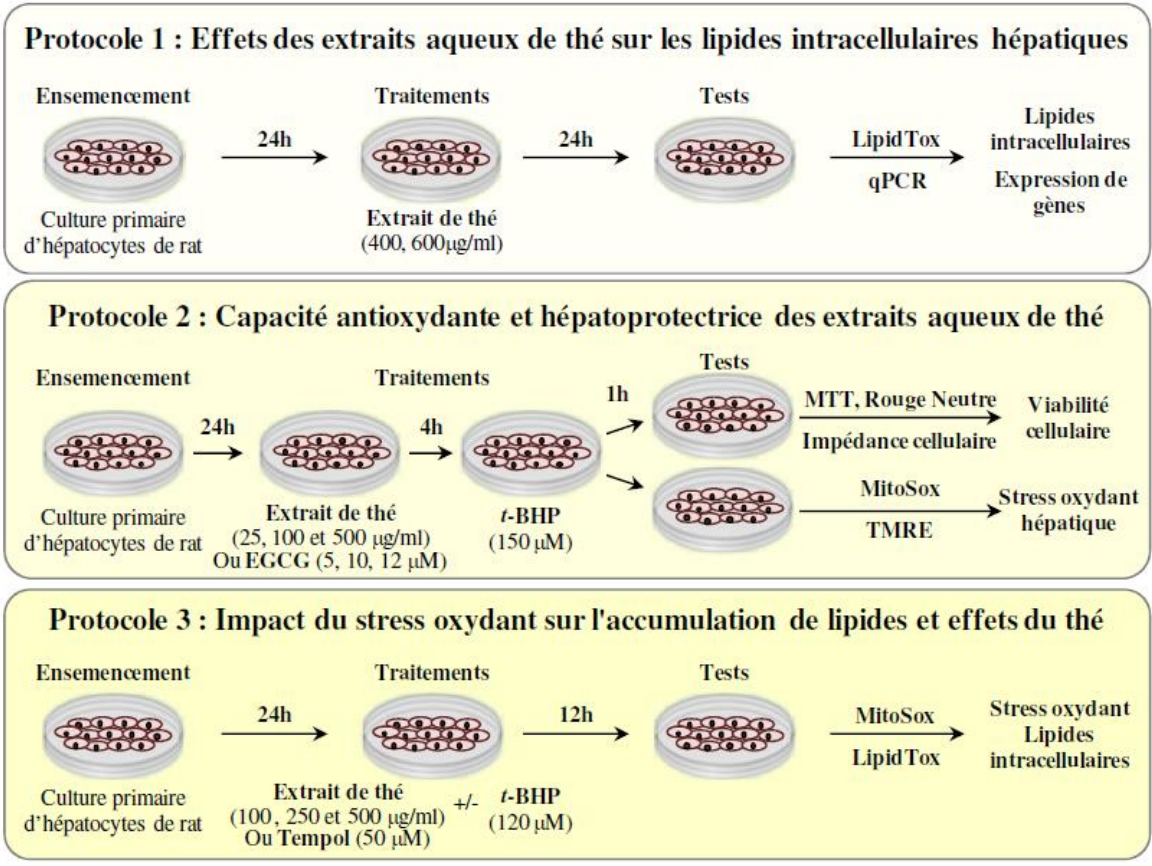
C'est l'évaluation du potentiel membranaire mitochondrial

Principe :

Le TMRE (Tetraméthyle Rhodamine Ethyl Ester) est une substance chargée positivement, de couleur rouge-orange, qui pénètre la cellule et s'accumule facilement dans les mitochondries en bon état de fonctionnement en raison de leur charge négative relative. Les mitochondries dépolarisés ou inactives ont un potentiel de membrane diminué et ne parviennent pas à séquestrer le TMRE ce qui donne une indication du potentiel membranaire mitochondrial de la cellule [159].

Méthode :

Une fois le protocole 2 effectué, les hépatocytes ont été rincés avec du M2 et ont été incubées 30 minutes à 37°C avec 100 µL d'une solution de marquage contenant du TMRE (concentration finale = 25 nM, Ex/Em = 535/587 nm) et du Hoechst 33342 (concentration finale = 2,5 µg/ml, Ex/Em = 365/515 nm). Le milieu de marquage a ensuite été enlevé, rincé puis remplacé avec du M2 sans traitement. La plaque a alors été placée dans l'appareil de mesure et une acquisition et une analyse des images de fluorescence ont été effectuées [159].



Tests effectués

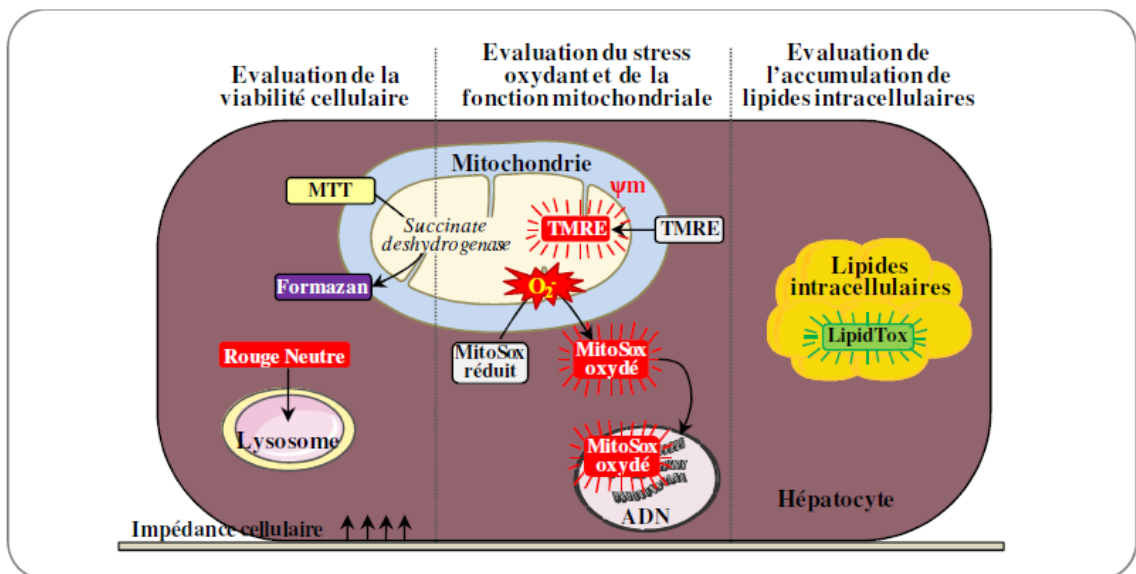


Figure 5.4 : Les expérimentations des études cellulaire [159]

5.2.10. Analyse statistique

Les résultats ont été présentés comme la moyenne \pm l'écart-type et sont représentatifs de trois expériences indépendantes. Les analyses statistiques ont été effectuées selon Minitab 1.7. $P < 0.05$ a été considérée comme statistiquement significatif.

Chapitre 6

RESULTATS ET DISCUSSION

6.1. Résultats d'analyses des extraits aqueux UE et MAE du thé vert

6.1.1. Les polyphénols totaux

La teneur en polyphénols a été mesurée avec la méthode de Folin-Ciocalteu (voir gamme d'étalonnage Appendices 1). L'extraction de polyphénols était généralement évaluée par le ratio d'extraction de poids acide/sec gallique (mg/g) [160]. Le contenu des composés phénoliques des différentes méthodes d'extraction a été tiré de la courbe d'étalonnage. La teneur des composés phénoliques de l'extraction par agitation mécanique (15 min, 95°C) et ultrasonique température (25, 60 et 95°C), temps (5, 10 et 15 min) ont été calculé à partir de la courbe d'étalonnage et exprimée en milligrammes équivalent acide gallique par gramme du thé vert (mg EAG/g), les résultats illustré dans le figure 6.1.

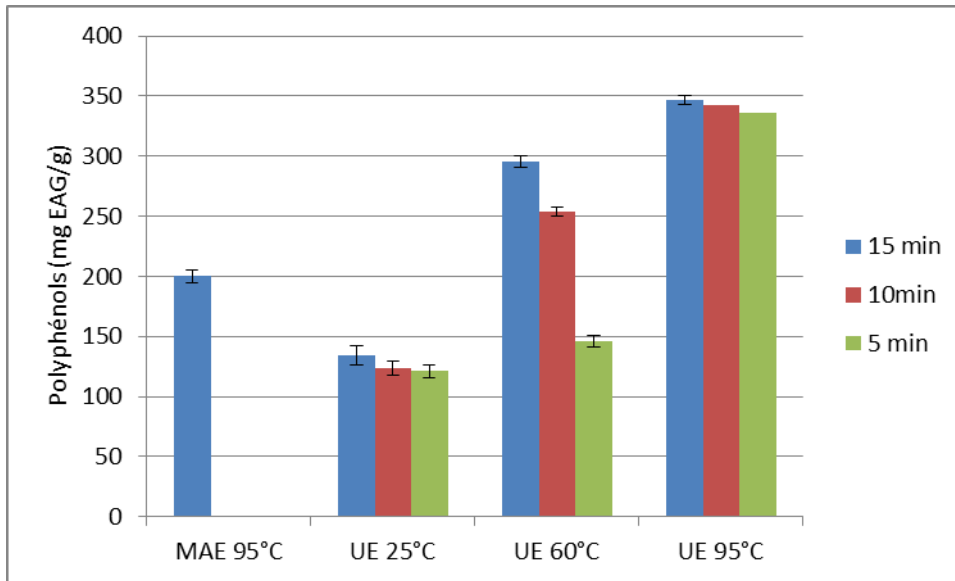


Figure 6.1: Teneur des polyphénols totaux en mg EAG/g du thé vert

Nos résultats montrent que le contenu des polyphénols totaux diffère selon le processus d'extraction. L'extraction par des ultrasons offre le meilleur processus UE (95°C, 15min) avec le contenu de polyphénol de 347 ± 4.34 mg GAE/g, or que par MAE le contenu est de 200 ± 5.56 mg EAG/g.

La composition des feuilles du thé vert varie en fonction du climat, de la variété et surtout de l'âge des feuilles [161]. Nos résultats sont supérieurs à ceux trouvés par Gervaise en 2004, qui estime que le thé vert renferme une teneur comprise entre 219 et 233 mg/g de matière sèche [162]. UE 95°C présente une différence significative ($p < 0.05$) par rapport aux autres types d'extraction UE 25°C, UE 60°C et MAE.

Selon Brewer (2011), qui a étudié les antioxydants naturels, au département des sciences des aliments et de la nutrition humaine, université l'illinois (USA), a affirmé que l'activité antioxydante du thé vert est linéairement liée à la teneur en polyphénols, qui est de 450 mg/g environ [163].

6.1.2. Les flavonoïdes

La raison pour laquelle le dosage des polyphénols a été suivi par un dosage des flavonoïdes s'explique par la grande importance de cette classe, comportant plus de 5000 composés déjà décrits [164]. Le dosage des flavonoïdes a été réalisé

selon la méthode d' AlCl_3 en utilisant la Quercétine comme standard (voir gamme d'étalonnage Appendices 1). La figure 6.2 représente les différentes valeurs obtenues pour l'extraction par agitation mécanique (15 min, 95°C) et ultrasonique extraction à température (25, 60 et 95°C), temps (5, 10 et 15 min), exprimées en mg équivalent quercétine / g de matière sèche de thé vert (mg EQ/ g) :

Le contenu de flavonoïde dans les feuilles du thé vert s'étend de 85 à 300 mg EQ/g la Figure 6.2. Le taux est faible en utilisant le model d'extraction par UE 25°C que dans UE 60°C et MAE. Pourtant, les flavonoïdes représentent une plus grande partie de contenu de polyphénol total dans UE 95°C, UE 60°C 270±2.08 mg EQ/g (80 %) que dans MAE et UE 25°C, 145±2 mg EQ/g (72 %) et 105±4.35 mg EQ/g (70 %), respectivement. Selon les données de la Figure 6.2, le thé vert est riche en flavonoïdes, un des composés majeurs de polyphénols. L'extraction du thé vert séché contient une dose de 290.5 mg EQ/g en utilisant des ultrasons UE (95°C, 15min). UE 95°C présente une différence significative ($p < 0.05$) par rapport aux autres types d'extraction UE 25°C, UE 60°C et MAE.

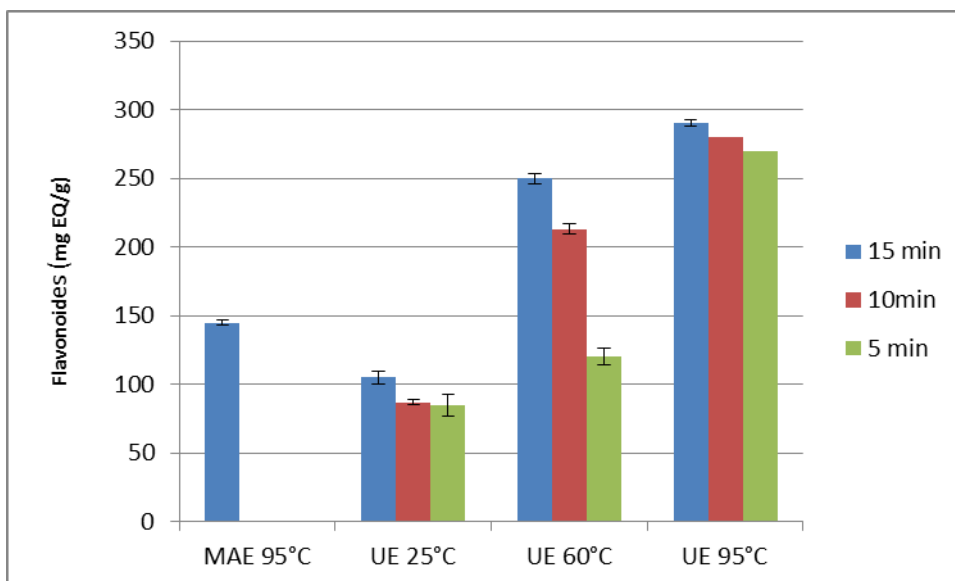


Figure 6.2: Teneur en flavonoïdes en mg EQ/g du thé vert

Remarque : Le rendement d'extraction présente une différence significative ($p < 0.05$) entre UE et MAE, 34,7±0,3 % et 31,8±0,5% respectivement, or que y a une différence non significative entre les différents procédés d'extraction ultrasonique (temps, température).

6.2. Résultats des tests biologiques

6.2.1. Activité antioxydante

6.2.1.1. Test de DPPH

Les profils d'activité anti-radicalaires obtenus par extraction en utilisant la méthode ultra-son est rapportée en courbe afin de pouvoir mieux caractériser cette activité. La figure 6.3 illustre que l'extrait étudié possède un effet antioxydant à dose correspondante.

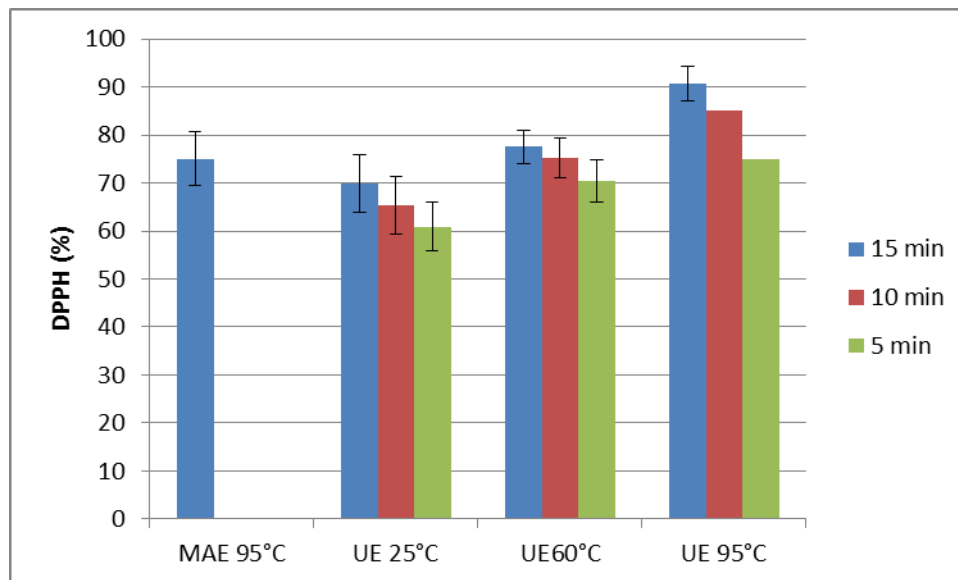


Figure 6.3 : L'activité antioxydante des catéchines extraite UE et MAE

Le meilleur procédé d'extraction ultrasonique est UE (95°C, 15min) qui présente une forte activité antioxydante avec une différence significative ($p < 0.05$), par rapport aux autres types d'extraction UE25°C, UE60°C et MAE.

Remarque : Le choix du meilleur procédé d'extraction UE (95°C, 15min) est comparé au BHT, puis confirmé cette activité antioxydants par le test FRAP, ainsi sera utilisé pour le reste de nos études de recherche.

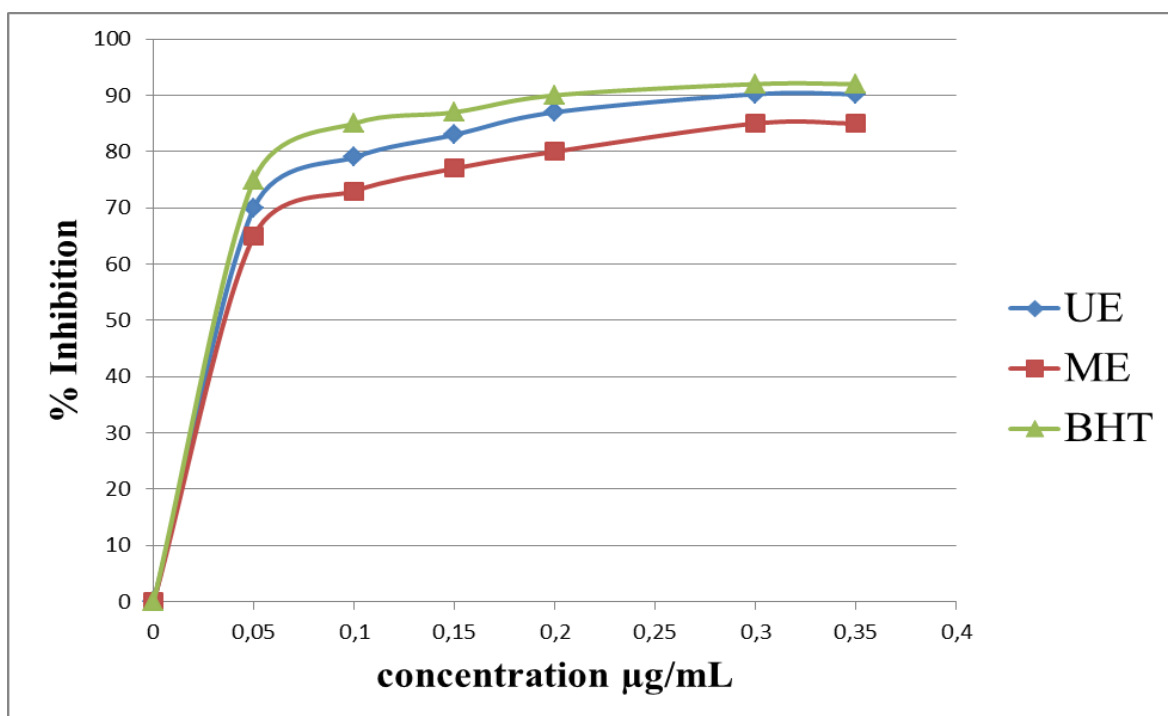


Figure 6.4 : Comparaison de l'activité antioxydante des catéchines UE (95°C, 15 min) avec BHT.

Cette augmentation exponentielle est montrée dans la courbe (Figure 6.4). Elle correspond à une cinétique qui traduit l'inhibition effective du radical DPPH, qui est suivie, pour chaque extrait, par la phase stationnaire, à partir de 0,2 mg/ml. Cette cinétique est observée, et elle est synonyme du fort pouvoir anti-radicalaire des composés phénoliques.

En comparant nos résultats avec la courbe d'étalonnage du BHT il s'avère que l'extrait aqueux du thé vert obtenu par ultrason UE (95°C, 15min), dont les composés phénoliques présentent une très bonne activité antioxydante.

Les polyphénols totaux du thé vert extrait par ultrason UE (95°C, 15min) présente 90,82 %, malgré la richesse du thé vert en composés antioxydants, cela nous renseigne sur l'efficacité des composés phénoliques, qui est, dans certains cas, non liée à leur taux élevé. En comparant nos résultats avec l'antioxydant standard (BHT), le liqueur du thé vert extrait par ultrason semble avoir une activité antioxydante proche à celle du BHT de 92%.

6.2.1.2. Test de FRAP

L'ensemble des extraits étudiés révèlent des propriétés anti-oxydantes intéressantes, ce qui se manifeste par des valeurs importantes de l'activité anti-oxydante. L'activité anti-oxydante de l'extrait éthanolique est de $9,89 \pm 0,05$ mg VEE/g MS (mg de la vitamine E / g de matière sèche).

Aussi, comme montre la figure 6.5 plus la concentration de l'extrait des polyphénols du thé vert *Camellia sinensis* augmente, plus le pouvoir réducteur n'accroît et donc, l'activité antioxydante est plus importante.

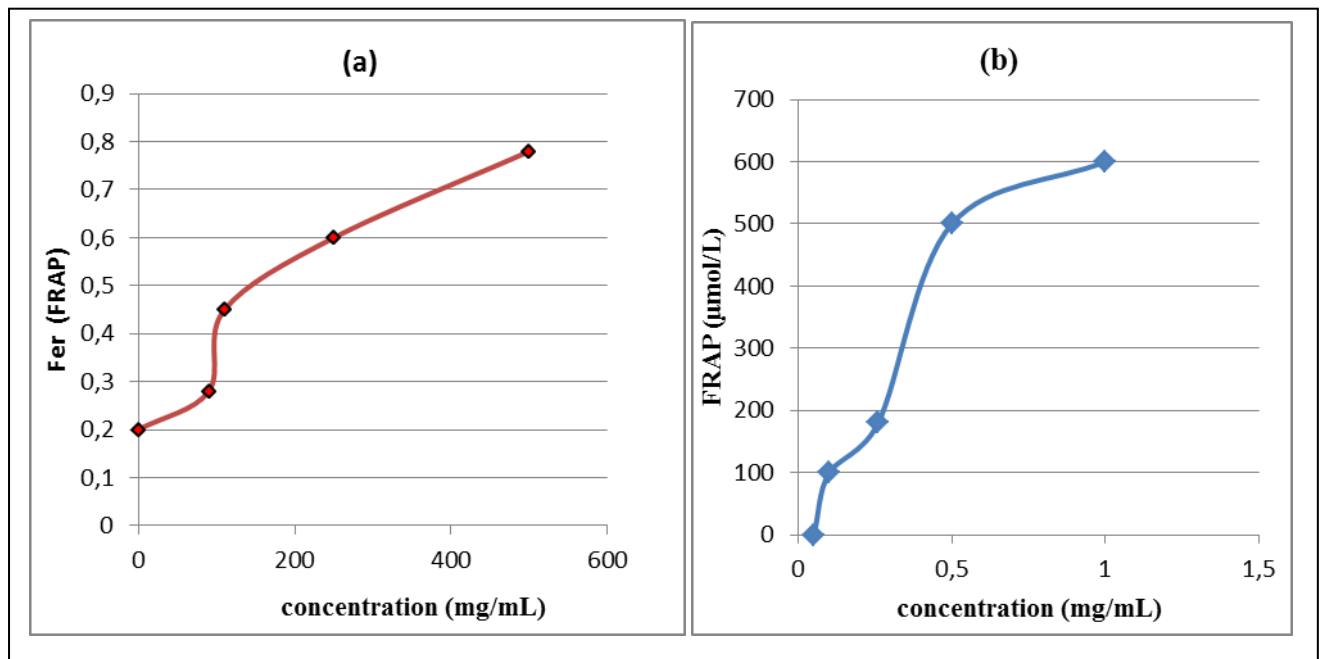


Figure 6.5 : Activité antioxydante FRAP

- (a) le pouvoir réducteur du fer (FRAP) de l'extrait éthanolique des catéchines du thé *Camellia sinensis* L par rapport à l'absorbance à 700nm.
 (b) Les valeurs de FRAP par rapport à la concentration de l'extrait éthanolique des catéchine de *Camellia sinensis* L.

La figure 6.5_a est une courbe montrant le pouvoir réducteur FRAP de l'extrait éthanolique des polyphénols du thé vert UE (95°C, 15min). La figure 6.5_b est une deuxième courbe montrant les valeurs de FRAP par rapport à la concentration de l'extrait éthanolique des polyphénols du thé *Camellia sinensis* (mg/mL). Ces deux représentations graphiques montrent que plus la concentration des polyphénols augmentent, plus l'absorbance à 700 nm augmente jusqu'à atteindre le 1 à 1000µg/mL de catéchines du thé vert dans la figure 6.5_a et que plus la concentration des catéchines s'élève jusqu'à atteindre 1mg/mL, plus les valeurs de FRAP s'élèvent à 600 µmol/L représenté dans la figure 6.5_b.

6.2.2. Activité antimicrobienne

Cette étude est effectuée pour montrer l'efficacité des catéchines UE (95°C, 15min) et leur effet protecteur contre les attaques bactériennes. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 6.1, nous montre que *Staphylococcus aureus* est extrêmement sensible aux catéchines UE (95°C, 15min) avec une zone d'inhibition de 20 ± 0.2 mm, or que *Pseudomonas aeruginosa* est très sensible présentant une zone d'inhibition de 18 ± 0.1 mm. Par contre *Bacillus subtilis* est une souche résistante vu qu'elle présente une zone d'inhibition 06 ± 0.1 mm qui est inférieure à 9mm de diamètre [143].

Les catéchines du thé vert UE (95°C, 15 min) ont une activité très efficace vis-à-vis *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus*, par contre aucune activité envers : *Escherichia coli*, *Aspergillus niger*, et *Candida albicans* vu l'absence des zones d'inhibition ce qui explique une forte résistance de ces souches envers les catéchines du thé vert. Les catéchines ont une activité antibactérienne

élevée contre divers micro-organismes tels que *Bacillus stearothermophilus* et *Clostridium thermoaceticum* [142].

Tableau 6.1 : Activité antimicrobienne des catéchines UE (95°C, 15min)

Bactérie		Zone d'inhibition (mm)	ATB de référence	Diamètre d'inhibition ATB (mm)
Gram -	<i>Escherichia coli</i>	0	Furane	24 ±0.1
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	18 ± 0.1	Gentamicine	13 ±0.1
Gram +	<i>Bacillus subtilis</i>	06 ±0.1	Streptomycine	15±0.1
	<i>Staphylococcus aureus</i>	20 ± 0.2	Gentamicine	24 ±0.1
L.M	<i>Aspergillus niger</i>	0	Ketoconazole	13 ±0.1
	<i>Candida albicans</i>	0	Ketoconazole	15±0.2

6.3. Résultat d'identification des catéchines par HPLC et LC-MS

L'identification par HPLC-DAD et LC-MS de la composition biochimique des polyphénols totaux extrait par ultrason (UE) et agitation mécanique (MAE) du thé vert se caractérise par 4 principaux pics illustrés dans la figure 6.3. Les 4 pics de UE (95°C, 15 min) correspondent aux épigallocatechines gallates (EGCG) qui représentent la majeure partie, avec une teneur de 60,1 % le reste est composé d'épicatchines gallates (ECG) 13%, epicatechine (EC) 5% et epigallocatechine (EGC) 12% (Table 6.1).. Ceci confirme les résultats retrouvés par Sajilata *et al.*, (2008) dans l'identification des polyphénols du thé vert qui représente un taux élevé en EGCG par rapport aux autres types de thé [161].

Ces résultats correspondent aux travaux de Yang et Hong, (2013) dont la teneur EGCG est de 58,1%, ECG 18,1% et EGC 12%. Donc l'EGCG représente la majeure partie des polyphénols du thé vert dont la teneur est supérieure à 50% [31], comme dans le cas de notre étude. Les composés phénoliques principaux dans le thé vert sont des catéchines, y compris (-) epigallocatechin-3-le gallate (EGCG), (-) epigallocatechin (EGC), (-) epicatechin-3-gallate (ECG) et (-)

epicatechin (la CE), avec EGCG étant les plus hauts représentant 60 % à 65 % du contenu de catéchine entier [165]. Le polyphénol extrait par agitation mécanique (MAE) contient un mélange relativement complexe contenant 72 % de catéchines. Les composants principaux sont epigallocatechin-3-gallate (EGCG) de 40.25 %, epicatechingallate (ECG) de 20.57 % et epigallocatechine (EGC) de 23.69 %. Des composants de catéchine mineurs sont epicatechingallate (ECG) de 16.44 % et epicatechine / catechine (EC/C) de 9.39 % (Table 6.2). L'extrait de thé vert contenant 60 % EGCG a été approuvé par l'Organe de certification des aliments et de médicaments d'Europe comme le premier médicament botanique [166].

Les résultats obtenus après l'HPLC-DAD et LC-MS de l'extrait commercial par des ultrasons confirment que EGCG constituent plus de 75%. EGCG est la catéchine majeure dans le thé vert et représente 50 % à 80 %. En outre, la modification chimique d'un EGCG pharmacophore peut modifier des activités thérapeutiques relatives pour que le supplément combinatoire puisse synergiquement pour améliorer et/ou augmenter des effets de santé [167].

Tableau 6.2. Les proportions Majeurs des Catéchines UE et MAE

Composé	MAE (%)	UE(%)
- Epigallocatechin (EGC)	23.69 ± 0.28	12 ± 0.25
- Epigallocatechin-3-gallate (EGCG)	40.25 ± 0.32	60.1 ± 0.17
- Epicatechin (EC)	9.39 ± 0.2	5 ± 0.2
- Epicatechin-3-gallate (ECG)	16.44 ± 0.52	13 ± 0.45
-- Autres	10.23 ± 0.64	9.89 ± 0.26

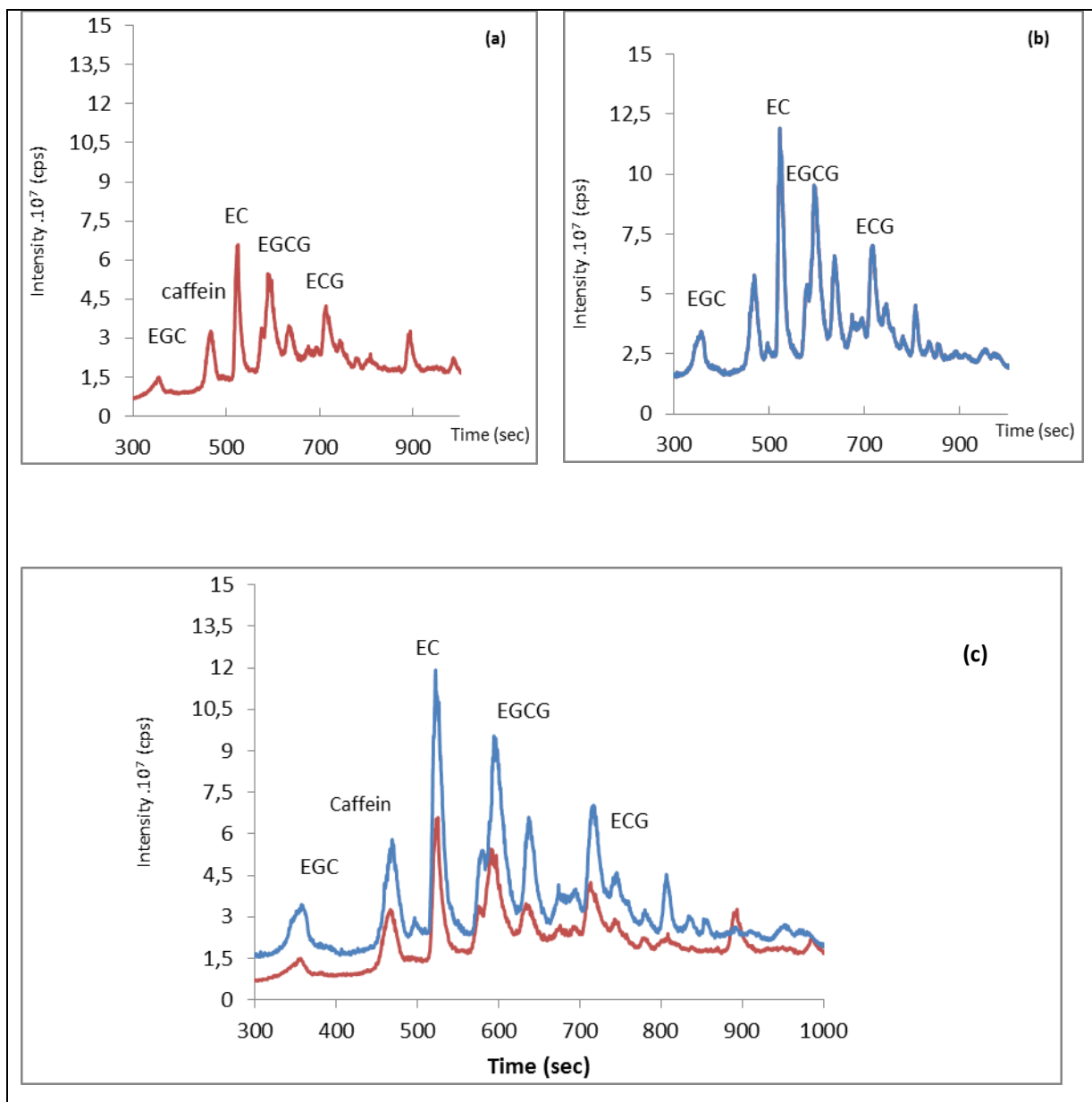


Figure 6.6. Chromatograms LC-MS de MAE et UE (95°C, 15 min).

(a) : MAE (95°C, 15 min) (---).

(b) : UE (95°C, 15 min) (---).

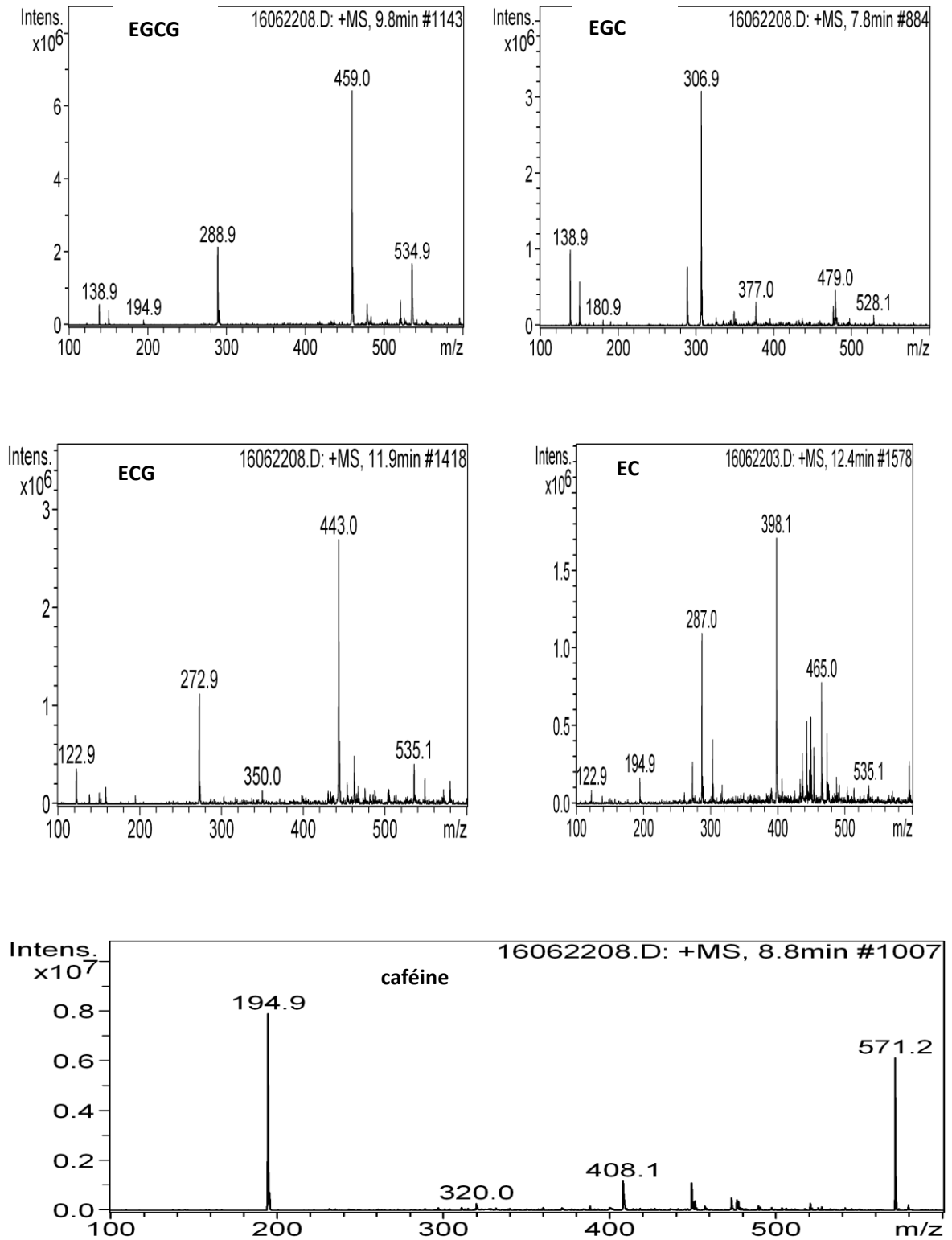


Figure 6.7 : Les spectres de masse des molécules obtenues par LC-MS

Les spectres de masse des différentes molécules de catéchines EGCG, ECG, EGC, EC ainsi la caféine sont représenté dans un chromatogramme de masse figure 6.7. Nous avons constaté que l'extraction ultrasonique (UE) augmente le taux d'EGCG vers 30 % comparés à l'agitation mécanique (MAE), qui correspond au travail de Wijngaard et al. (2012) [168], qui trouvé seulement 20 % de plus de catéchine qui pourrait être extraite de la pomme l'utilisation d'ultrasons. Des forces physiques et chimiques incluses dans l'extraction dissolvante conventionnelle diffèrent de ceux inclus dans l'extraction à ultrasons. Lorsqu'on modifié la température et la pression dans la bulle, stimulant le système pour produire l'énergie nécessaire pour des réactions chimiques. Les forces mécaniques que résultent cavitation participent à la démolition de murs de cellule végétale, renforçant en conséquence l'extraction de métabolites secondaire comme des catéchines. Il est évident que la compétence de l'opération est influencée par beaucoup de facteurs, comme l'intensité acoustique, le temps d'extraction, le type dissolvant et la température. Bien que, quelques études rapportent que testant pour la présence de composés phénoliques dans le thé dans des conditions d'infusion différentes n'ont été entrepris plus tôt, aucun détail d'étude les changements de la relation avec l'extension de temps d'infusion [109].

Nous avons notifié que l'extraction diverse conditionne l'efficacité d'influence, prenant en compte que l'extraction ultrasonique peut améliorer le rétablissement EGCG. La composition chimique de feuilles de thé varie avec l'espèce, la saison, l'âge de la feuille, et le climat [15].

6.4. Etude toxicologique

6.4.1. Test DL₅₀

Cette étude consiste à la recherche de la quantité des polyphénols UE (95°C, 15min) du thé vert, statistiquement établie, dont nous pouvons s'attendre à ce qu'elle provoque la mort de 50% des souris dans un temps donné, après administration par voie intraveineuse (IV). Le tableau 6.3 illustre la détermination de la DL₅₀ la dose qui permet la mort de 50% de souris en fonction du temps (jours)

Tableau 6.3 : Evaluation de la DL50 de différentes doses de catéchines UE (95°C, 15min)

Dose	400 µg	600 µg	800 µg
Jours (DL50)	12	10	05

Le test de toxicité sur modèle animal révèle qu'une dose létale permet de tuer 50% de souris est de 800µg pendant 5 jours, or que les doses de 400µg et 600µg leur résistance de mortalités dépasse une semaine 10 et 12 jours respectivement.

6.4.2. Test de toxicité

L'étude toxicologique réalisée sur un groupe de 20 souris dont le poids varie entre 17 et 20g après administration par voie orale de 2500 mg/kg de catéchines extraite UE (95°C, 15min) de thé vert par kg de souris, les résultats obtenus sont montrés dans le tableau 6.4. Le calcul de la dose injectée par voie orale à une souris pesant 19g est comme suite :

$$\begin{array}{l} 1 \text{ kg} \quad \longrightarrow \quad 2500 \text{ mg de catéchines} \\ 0,019 \text{ kg} \quad \longrightarrow \quad X \end{array}$$

Sachant que X représente la quantité de catéchines injectée.

$$X = (0,019 \times 2500) / 1$$

$$X = 47,5 \text{ mg de polyphénols.}$$

Les résultats obtenus montrent que tous les souris restent vivantes après 10 jours sauf 3 souris qui ont subis la mort. Le calcul de la toxicité :

$$\begin{array}{l} 20 \text{ souris} \quad \longrightarrow \quad 100\% \\ 3 \text{ souris} \quad \longrightarrow \quad T \end{array}$$

Le taux de mortalité est de 15% (T=15%). D'après les normes recommandées par la Pharmacopée Européenne 2008 [142], sur la dose des molécules testées sur animaux :

- ✓ Si la mortalité est supérieure à 50% (>50%), cela signifie que la dose administrée est mortelle ou létale.
- ✓ Si la mortalité est égale au niveau de survie (50% mortalité, 50% survie), la dose administrée est dite toxique ou plus ou moins toxique.

- ✓ Si la mortalité des animaux utilisés est moins de 50% (< 50%), cela signifie que la dose administrée n'est pas toxique et donc cette dose peut être intensifiée.

Dans notre cas, le niveau de mortalité est de 15% alors, d'après les normes de la Pharmacopée Européenne 2008, la dose appliquée (2500 mg/kg) n'est pas toxique et donc elle peut être augmentée.

Tableau 6.4 : Les résultats de l'étude toxicologique.

N°	Poids (g)	Dose administrée (mg) / jour	Réaction des souris après 10 jours
01	19	47,5	Aucune réaction
02	20	50	Aucune réaction
03	18	45	Souris morte
04	18	45	Aucune réaction
05	17	42,5	Aucune réaction
06	20	50	Aucune réaction
07	17	42,5	Aucune réaction
08	18	45	Aucune réaction
09	20	50	Aucune réaction
10	19	47,5	Aucune réaction
11	19	47,5	Aucune réaction
12	17	42,5	Souris morte
13	18	45	Souris morte
14	18	45	Aucune réaction
15	17	42,5	Aucune réaction
16	19	47,5	Aucune réaction
17	17	42,5	Aucune réaction
18	20	50	Aucune réaction
19	18	45	Aucune réaction
20	18	45	Aucune réaction

6.5. Etude cytotoxique des catéchines sur les paramètres lipidiques chez les rats femelles en croissance

Les résultats des effets de différentes doses de catéchines administrer par voie orale aux rats femelles en croissance sont représenté en en trois parties :

- Effet sur le poids corporel et le poids du foie.
- Effet sur quelque paramètre plasmatique lipidique.
- Effet sur la structure hépatique.

6.5.1. Effet des catéchines sur le poids

6.5.1.1. Poids corporel

L'expérimentation sur l'animal de laboratoire n'est jamais une opération simple. Chaque animal a sa propre réponse, sa propre résistance même dans élevage homogène. Les catéchines du thé vert UE (95°C, 15min) utilisé, en plus de leur effet antioxydant le plus puissant, possède d'autres propriétés différentes les unes des autres. L'effet des catéchines sur le poids corporel des rats femelles en croissance montre une diminution du poids dès le début de l'essai et quel que soit la dose des catéchines administré, car il y a une baisse plus importante chez le lot de rats ayant ingérés la doses de 800 mg/L durant 28 jours d'expérimentation, différence hautement significative ($p < 0.05$). On remarque qu'il y a pas un gain de poids durant la 1^{er} semaine on peut dire qu'il y a un arrêt de croissance jusqu'à la 2^{eme} semaine que les rats commence à gagnées leur poids soit pour les rats traitées par des concentrations de UE (95°C, 15min) de 400 et 600 mg/L (Figure 6.8), sachant que 2 rats traités par la dose de 800 mg/L ont été morte au cours de l'expérience au 20^{eme} jour.

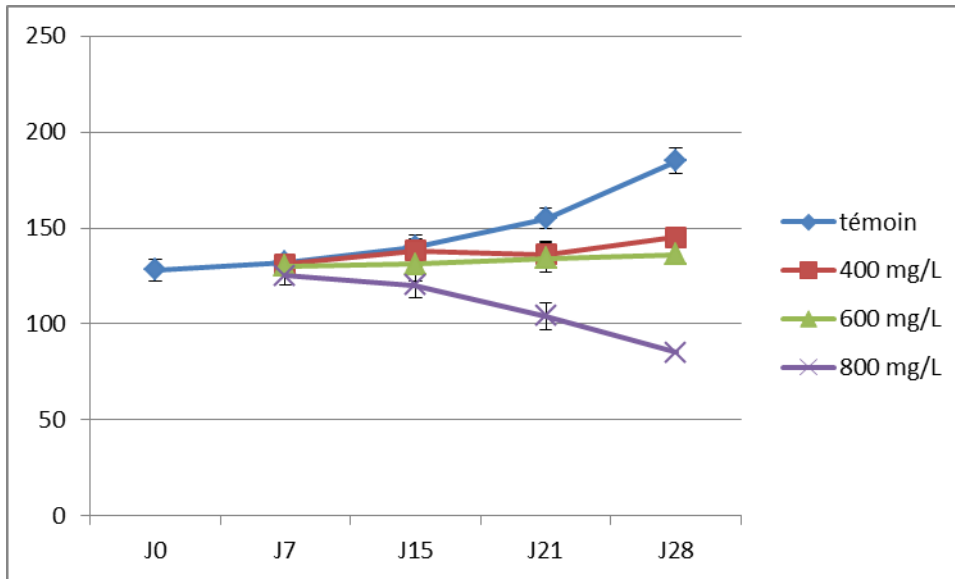


Figure 6.8 : Evolution de poids corporel en fonction des doses de catéchines

6.5.1.2. Poids du foie

Après sacrifices des rats aux 28 jours on remarque que la couleur de foie des rats traitées par 800mg/L de catéchine UE (95°, 15min) diffèrent par rapport aux autres traitements de 400 et 600 mg/L ainsi pour les témoins (figure 6.9a).

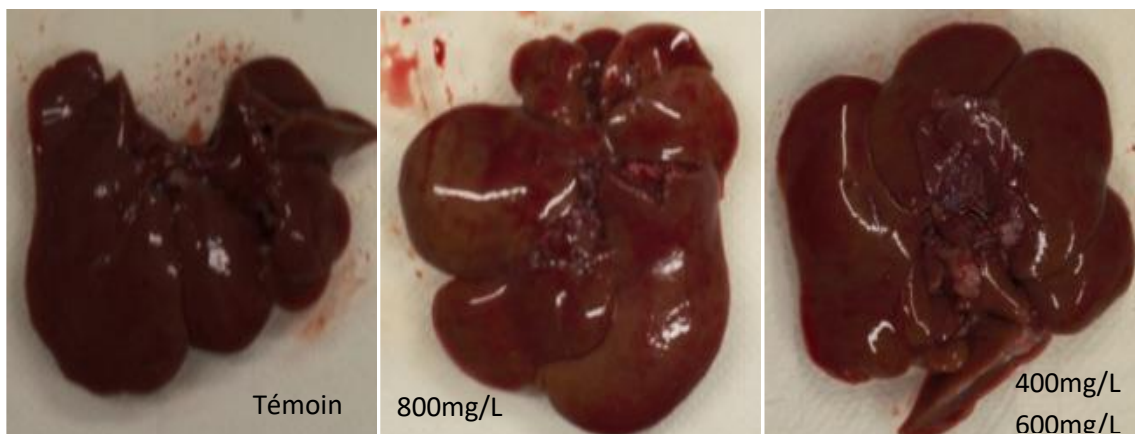


Figure 6.9a : Foie des rats après 28 jours de traitement

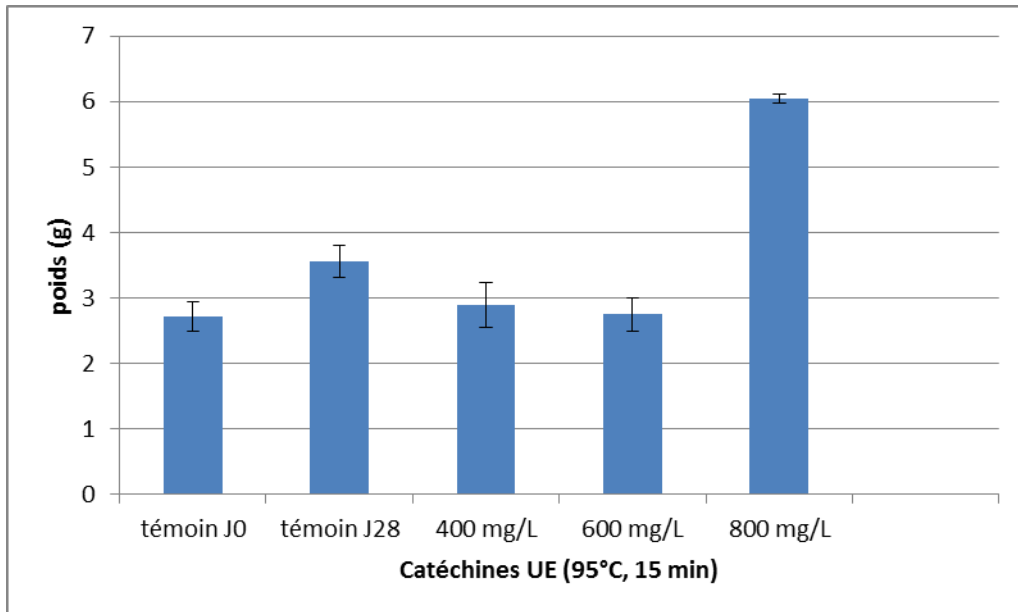


Figure 6.9_b : Evolution de poids du foie en fonction des doses de catéchines.

Les résultats obtenus pour le poids de foie est hautement significative ($p < 0.05$) pour la dose de 800 mg/L, or que non significative pour le traitement par les doses de 400mg/L et 600 mg/L par rapport aux témoins (Figure 6.9_b). L'effet pro-oxydant peut être existé à la dose de 800mg/L vu le changement macroscopique du foie. Les résultats obtenus montrent que le poids relatifs au foie ne présente aucune variation significative entre les lots de rats témoin J₀, J₂₈ et les lots traités par 400mg/L et 600 mg/L de catéchine UE (95°, 15min).

6.5.1.3. Indice hépato-somatique (IHS)

L'effet sur l'indice hépato-somatique calculé sur la base du poids du foie. Chez les rats ayant ingérés les différentes doses des polyphénols en constate une augmentation de l'indice hépato-somatique. On relève une augmentation plus importantes chez le lot des rats ayant ingérés une dose de 800 mg/L (figure 6.10). L'augmentation de l'indice hépato-somatique témoigne d'une hypertrophie du foie, car de nombreux auteurs ont constaté une augmentation de l'indice hépato-somatique au cours de l'expérimentation [169].

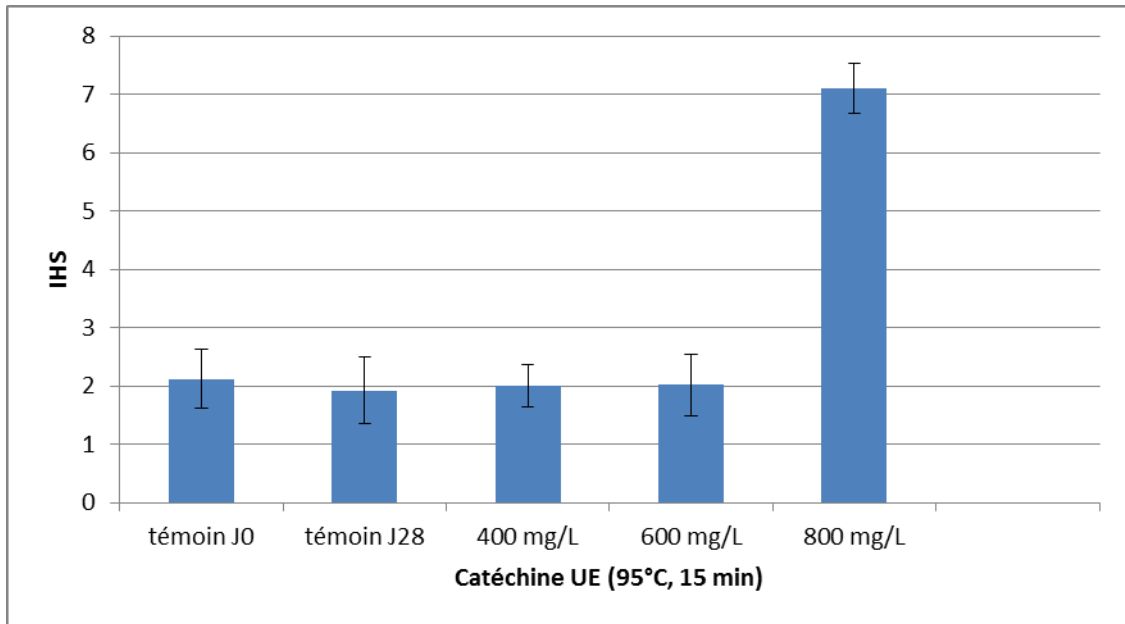


Figure 6.10 : Evolution de l'IHS en fonction des doses des catéchines.

6.5.2. Effet des catéchines sur les paramètres biochimiques lipidiques

6.5.2.1. Cholestérol total

La figure 6.11 illustre la concentration de cholestérol chez les rats témoins et les rats traité par différents doses de catéchines extraite du thé vert pendant 28 jours.

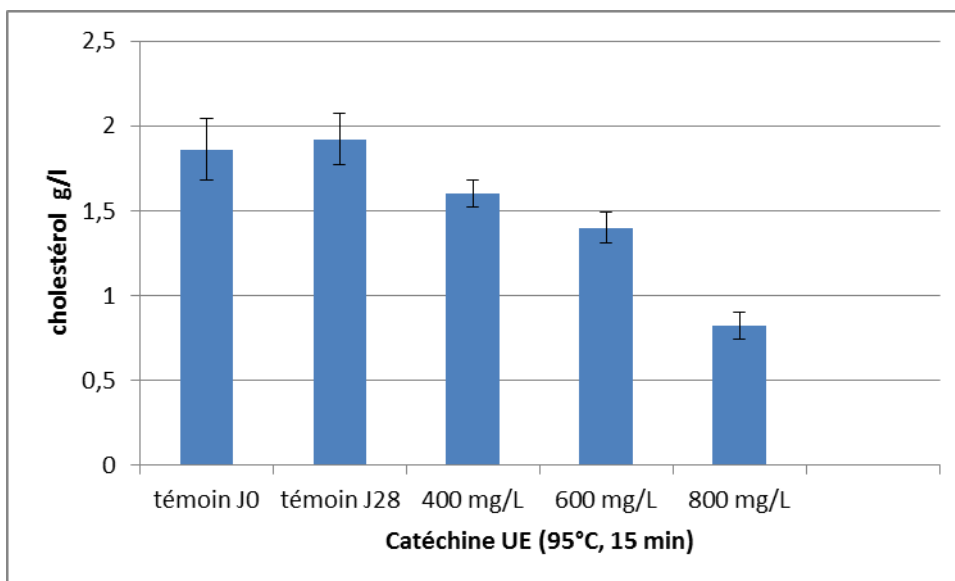


Figure 6.11 : Concentration plasmatique en cholestérol chez les rats traités par les catéchines UE (95°C, 15min) pendant 28 jours.

Nos résultats montrent que le traitement par les polyphénols UE (95°C, 15min) chez les rats femelles en croissance entraîne une diminution très hautement significative ($p < 0.05$) de la concentration plasmatique de cholestérol, et plus importante de la cholestérolémie dans le lot des rats ayant ingérés la dose de 800 mg/L. par contre une diminution non significative pour les rats traitées des doses de 400 mg/L et 600 mg/L.

Selon Sanchez Muniz et al. (1996) [169], la diminution de la concentration en cholestérol serait due à une réduction de l'activité de la lécithine cholestérol acyle transférase (LCAT), elle-même due à une réduction de la biosynthèse des VLDL au niveau hépatique. D'autre part, Holloway et Rivers en (1981) [170], expliquent que la baisse du cholestérol n'est le fait que l'activation de la 7 - α -hydrolase, enzyme responsable de la transformation du cholestérol en acides biliaire.

Le même phénomène a été remarqué par Nawoaboot et al. (2009) [171], l'extrait aqueux des feuilles de nigra (Flavonoïde) à 40 mg/kg chez les rats femelles Wister entraîne une diminution de cholestérol et des lipoprotéines à haute densité (HDL). Ces résultats ont prouvées que les polyphénols possèdent un effet hypolipidimique et induit un ralentissement des dommages chronique chez les rats.

6.5.2.2. Triglycérides

La figure 6.12 illustre la concentration des triglycérides chez les rats témoins et les rats traités par différents doses de catéchines UE (95°, 15min) pendant 28 jours.

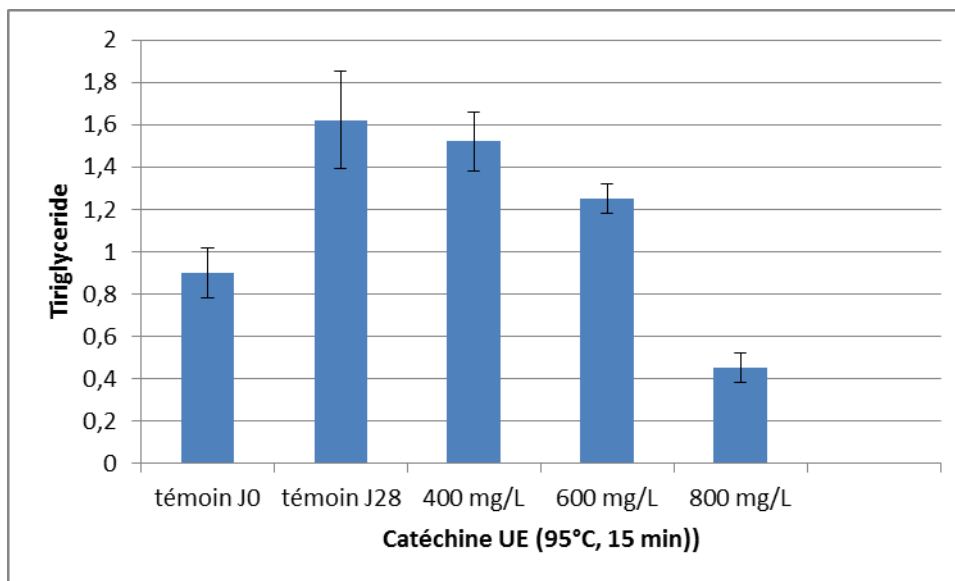


Figure 6.12 : Concentration plasmatique en triglycérides chez les rats traités par les catéchines UE (95°C, 15min) pendant 28 jours

Notre étude montre aussi une diminution de la concentration des triglycérides chez les rats femelles ayant ingérés des doses de 600 mg/L et 800 mg/L de catéchines UE (95°C, 15min). Le même phénomène a été prouvé chez d'autre auteur [171]. On relève une diminution très hautement significative ($p < 0.05$) de la concentration plasmatique de triglycérides chez les rats ayant ingérés des doses de 600 mg/L et 800 mg/L des catéchines UE (95°C, 15 min) par apport aux témoins J₂₈.

Par contre les rats traités par une concentration de 400 mg/L, on obtient une augmentation de la teneur plasmatique en triglycéride non significative ($p > 0.05$). L'augmentation de la teneur en triglycéride a été rapportée par Yuan et saint-Kitts en (2003) [172]. Ils ont émis l'hypothèse que la supplémentation de 130g d'extraits phénoliques dans la nourriture des rats non jeun favorise l'augmentation de la concentration des triglycérides car les extraits phénoliques ont tendance à augmenter la concentration des triglycérides en comparaison avec les témoins. Cet effet n'a pas été prévu, et ils ont supposé que les extraits phénoliques ralenti la cinétique de l'absorption des lipides, ou s'exposées une action lipotrope sur le foie.

6.5.2.3. Lipides totaux

La figure 6.13 illustre la concentration plasmatique des lipides totaux chez les rats témoins et les rats traités par différentes doses de catéchines.

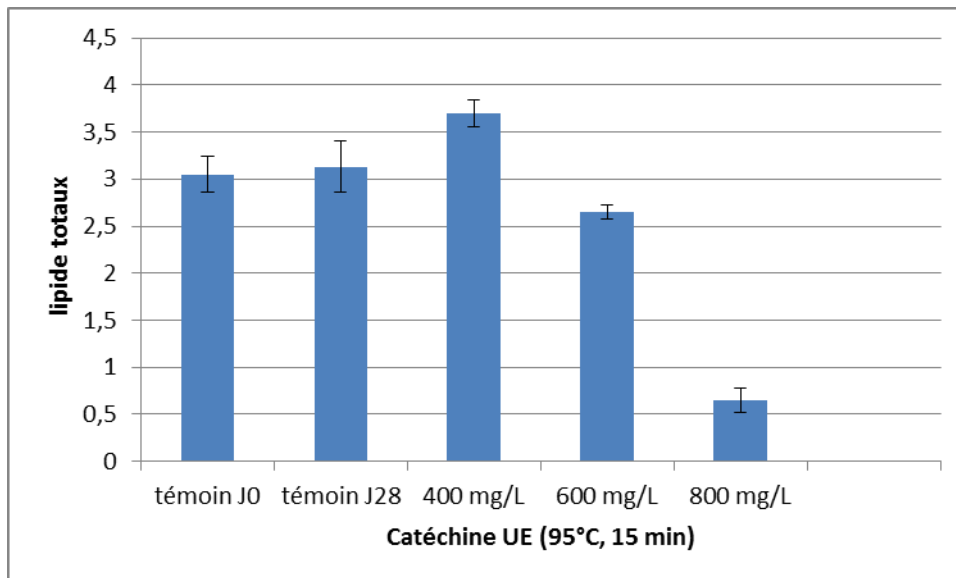


Figure 6.13 : Concentration plasmatique en lipides chez les rats traités par les catéchines UE (95°C, 15min) pendant 28 jours.

L'effet des catéchines UE (95°C, 15min) sur le bilan lipidique, les résultats obtenus montrent une augmentation de la teneur en lipide hautement significative ($p < 0.05$) que les témoins pour les rats traités par la dose de 400 mg/L, ceci peut être dû à la perturbation du foie et du métabolisme lipidique. Les rats traités par la dose de 600 mg/L présentent une diminution hautement significative ($p < 0.05$), ceci est dû à l'effet amaigrissant des rats ou à une croissance ralentie. Par contre, les rats traités par une dose de 800 mg/L présentent aussi une diminution hautement significative ($p < 0.05$), ceci est dû à l'effet amaigrissant et toxique sur les rats, sachant qu'il y a eu la mort de 2 rats à cette dose qui peut s'expliquer par l'effet pro-oxydant, sans oublier la couleur du foie qui était différente des témoins.

Selon ces résultats obtenus, on a effectué le test de l'activité amincissante (amaigrissante) chez le lapin pour voir réellement la perte de poids sera présentée dans la partie 6.7.

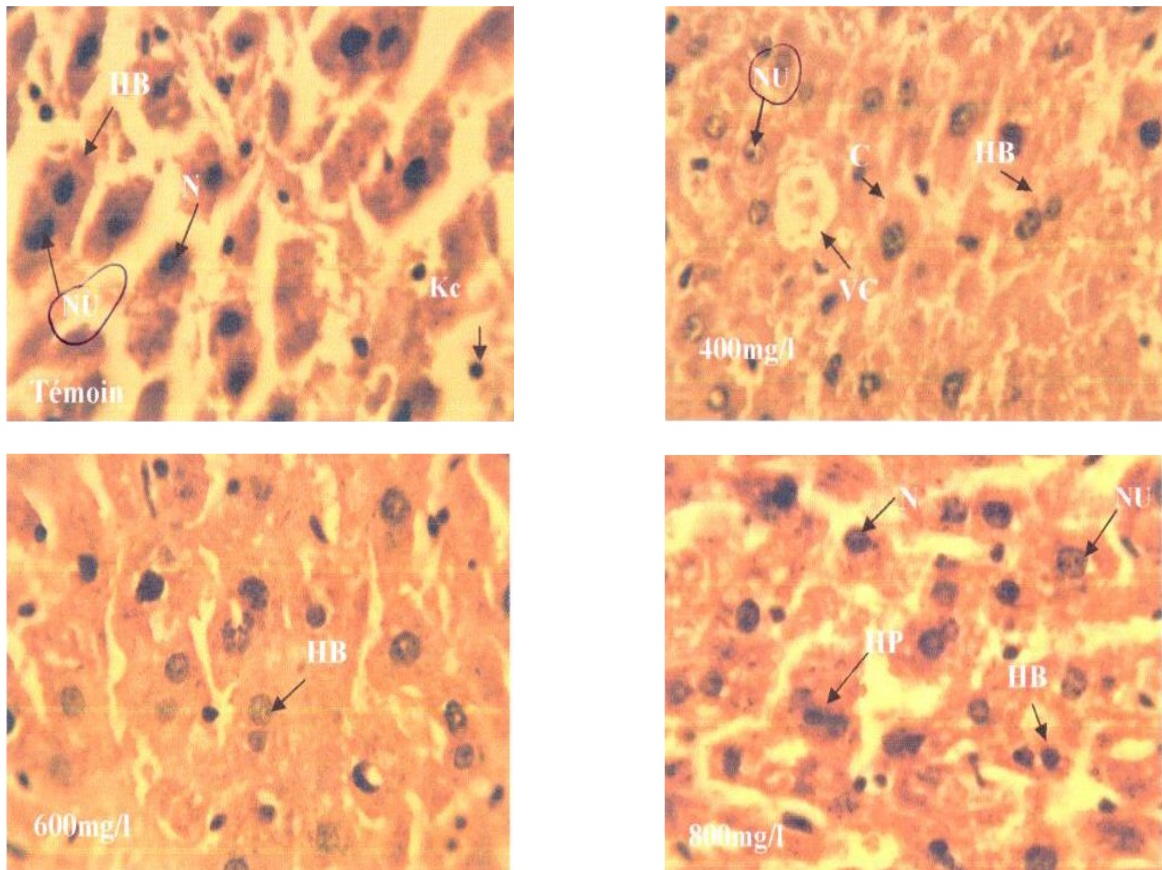
6.5.3. Effet des catéchines sur les tissus hépatiques

L'observation au microscope optique d'une coupe transversale d'un foie des souris blanches témoins ont montré un parenchyme hépatique constitué de plusieurs lobules et hépatocytes polygonales a cytoplasme granuleux organisé en *travées de Remak* tout autour d'une veine centralobulaire de grand diamètre. Les hépatocytes sont petites et possèdent un seul noyau tandis que, les plus grands possèdent deux noyaux. Les noyaux sont arrondis de taille variable et présentent un à deux nucléoles et une chromatine dispersée. On observe aussi des capillaires sinusoïdes bordés par les cellules endothéliales et l'espace de disse. Les cellules de kupffer dispersées entre les cellules endothéliales et l'espace de kierman (Figure 6.14).

L'étude histologique montre un parenchyme hépatique siégé de lésion de souffrance cellulaire avec des hépatocytes polynucléaire surtout chez les souris traités par la dose de 800 µg/mL de catéchines par rapport au souris traités par 600 µg/mL et 400 µg/mL, car on observe aussi :

- ✓ des hépatocytes binucléés ;
- ✓ dilatation vasculaire ;
- ✓ dilatation des canaux biliaires ;
- ✓ lésion de portite associée.

La structure du foie est aussi influencée par les polyphénols, car l'analyse des coupes histologique, révèle des altérations structurales plus au moins importantes au niveau des parenchymes hépatique qui sont siégés de lésion de souffrance cellulaire et au niveau des hépatocytes qui sont parfois binucléaires ou polynucléaires. Le foie est un organe régulateur et que et que le traitement par les catéchines extrait du thé vert (EGCG 60%) entraine des changements histologiques au niveau du foie. Le même phénomène a été signalé par Lin et al. (2008) [173] après l'administration de l'extrait de polyphénol à des doses de 400 mg/kg, 600mg/kg et 800 mg/kg chez des rats 2 fois par semaine pendant 8 semaine qui induit la formation des espèces réactive oxygènes et réduire l'activité enzymatique antioxydants. Le tétrachlorure de carbone capable d'induire le stress oxydative qui est un facteur important des dommages chroniques du foie.



VC : veine centrolobulaire, NU : nucléole, C : hépatocyte, N : noyau, HB : hépatocyte binucléaires, HP : hépatocyte polynucléaires. Coloration Hématoxyline – éosine ; grossissement : Gr 100. (Photo originale).

Figure 6.14 : Histologie des foies des rats femelles en croissance traités par les catéchines UE (95°C, 15 min)

6.6. Etude des Catéchines UE (95°C, 15min) sur les paramètres du stress oxydatif chez les rats femelles en croissance

C'est l'évaluation des paramètres de stress oxydant tissulaire au niveau du foie

6.6.1. Concentration de malondialdéhyde (MDA)

Les concentrations tissulaires de Malondialdéhyde (MDA) chez les groupes témoins et les groupes Traités pendant 28 jours représenté dans la figure 6.15. Nos résultats montrent une augmentation très hautement significative ($p < 0.05$) pour la dose de 800mg/L de catéchines UE (95°C, 15min). Par contre, cette concentration de MDA est diminuée au niveau de foie d'une façon non significative

pour les rats traités par les doses de 400mg/L, 600mg/L et le témoin (0 mg/L) de catéchines.

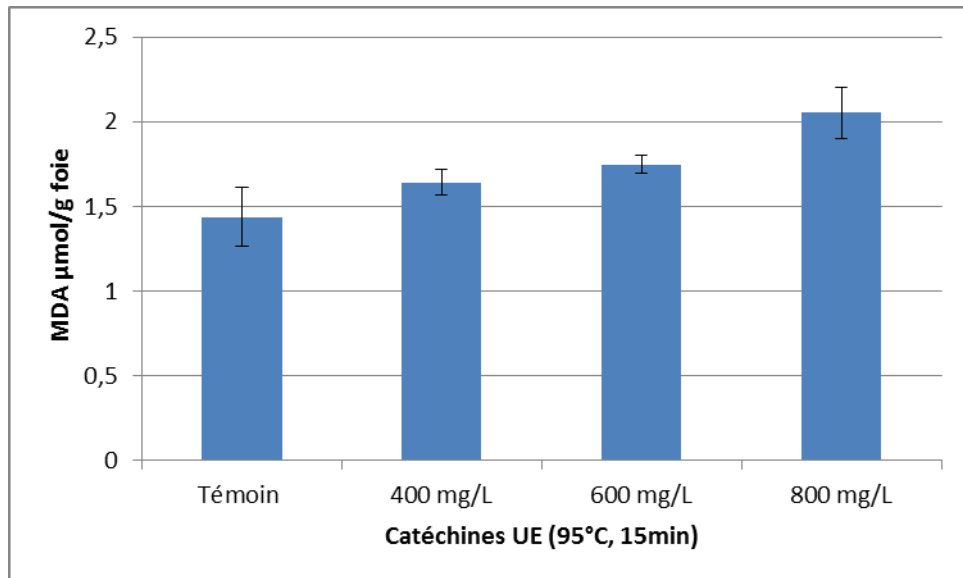


Figure 6.15 : Concentrations de Malondialdéhyde (MDA) chez les rats traités pendant 28 jours

6.6.2. Concentration de glutathion réduit (GSH)

La concentration de glutathion réduit (GSH) tissulaire chez les groupes témoins et les groupes Traités pendant 28 jours, illustré dans la figure 6.16. Les résultats obtenus révèlent que la concentration de GSH diminue de façon très hautement significative ($p < 0.05$) pour une dose de catéchines de 800mg/L. Néanmoins, le traitement par les dose de catéchines 400 et 600 mg/L augmente la teneur en GSH de façon significative ($p < 0.05$).

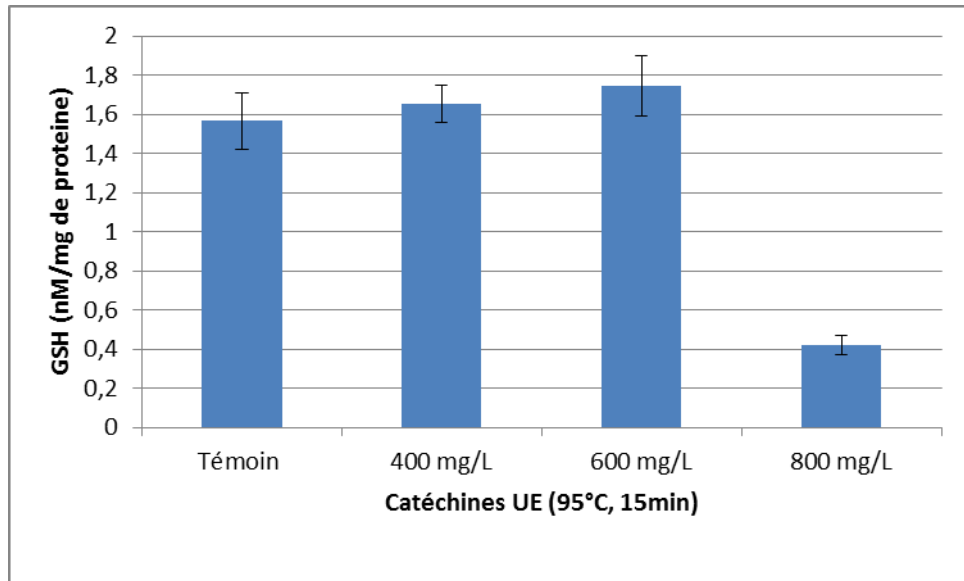


Figure 6.16 : Concentrations de glutathion réduit (GSH) chez les rats traités pendant 28 jours

6.6.3. Activité du glutathion peroxydase (GPx)

L'activité tissulaires de glutathion peroxydase (GPx) chez les groupes témoins et les groupes Traités pendant 28 jours illustré dans la figure 6.17. D'après les résultats obtenus, on marque une diminution de l'activité tissulaire de glutathion peroxydase (GPx) de façon hautement significative ($p < 0.05$) au niveau de foie pour une dose de 800 mg/L. De même, nos résultats montrent une augmentation de l'activité de GPx de façon non significative ($p > 0.05$) au niveau de foie pour les doses de 400 et 600mg/L.

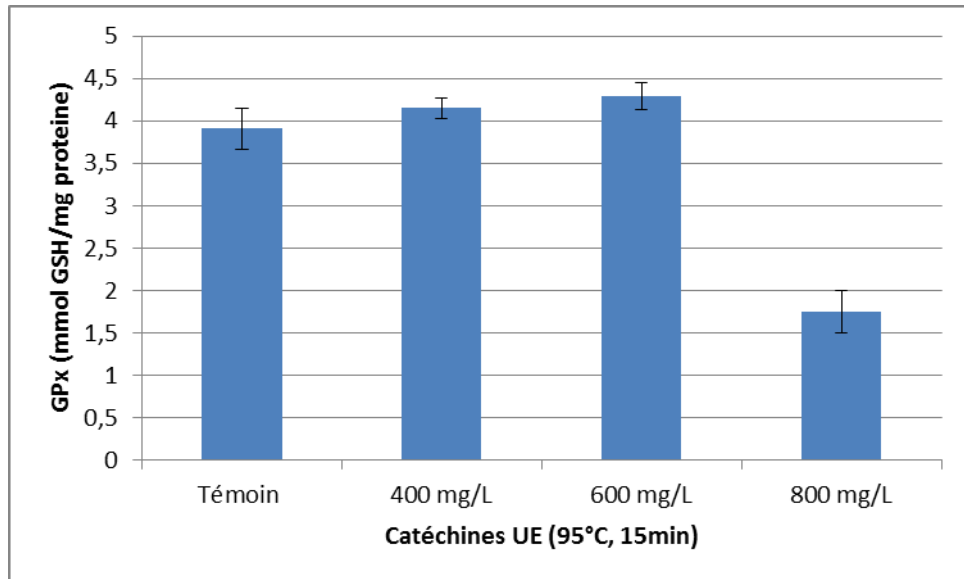


Figure 6.17 : Activité du glutathion peroxydase chez les rats traités pendant 28 jours

6.7. Etude des Catéchines sur l'activité amincissante chez les lapins

Les résultats obtenus montrent la diminution du poids corporel qui est important pour les 5 lots de lapins traité par les catéchines UE (95°C, 15min), mais varie d'un lapin à l'autre (voir Appendices 3).

- ✓ Lot N° 1 : La diminution du poids est de 613g dans les 13 semaines de l'expérience. Nous remarquons que parfois le poids du lapin s'élève au lieu de diminuer. Cette augmentation atteint 2g à deux semaines successives et donc le poids s'évalue de 4g.
- ✓ Lot N° 2 : La diminution du poids est de 471g dans les 13 semaines de l'expérience. Nous remarquons que parfois le poids du lapin ne change pas donc, il n'y a plus de diminution du poids. Cette stabilisation du poids reste pour 5 semaines successives.
- ✓ Lot N°3 : La diminution du poids est de 563g dans les 13 semaines de l'expérience. Nous remarquons que le poids du lapin s'élève de 22g d'un seul coup dans la troisième semaine au lieu de diminuer.

- ✓ Lot N°4 : La diminution du poids est de 345g dans les 13 semaines de l'expérience. Le poids corporel de ce lapin a augmenté plusieurs fois mais à période séparées. Cette diminution varie entre 1 et 2g.
- ✓ Lot N°5 : La diminution du poids est de 335g dans les 13 semaines de l'expérience. Le poids s'élève une fois par 1g dans la 8^{ème} semaine.

Les résultats obtenus sont représentés dans figure 6.1

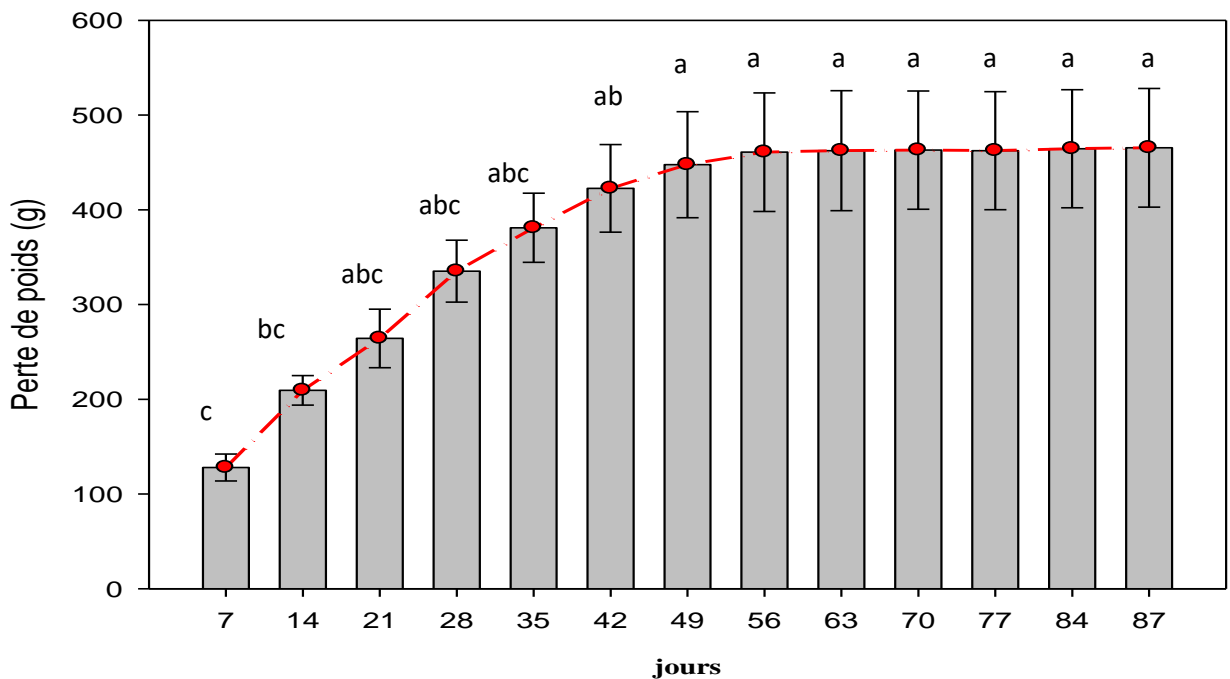


Figure 6.18 : La perte du poids des lapins en fonction temps.

Les résultats de la perte de poids des lapins par la consommation par jour de 390 mg de catéchines UE (95°C, 15min) ont été illustrés dans la figure 6.15 la diminution du poids physique comptant aux lapins entre 14.30-18.60 %, dont la perte de poids est de 460 ± 125.19 g pendant 56 jours, la perte de poids de lapin maximale est de 613g. Ces résultats sont représentés par moyenne de trois expériences différentes, son significativement différents ($p < 0.05$).

Shen et al. en (2012) [174] sont les premiers chercheurs qui ont évalué *in-vivo* l'efficacité de la forme concentrée du thé vert sur l'obésité sur le modèle animal et ont prouvé que le thé vert empêche de manière significative le gain de poids.

Les catéchines réduisent considérablement ou empêchent l'augmentation du poids corporel chez les sujets minces et obèses mâles et femelles. Sur la base des effets *in-vivo*, les composants du thé vert tels que l'EGCG pourraient être utile pour le traitement de l'obésité [175].

6.8. Etudes des catéchines sur culture cellulaire d'hépatocyte de rat

6.8.1. Effet des catéchines sur les lipides intra cellulaire hépatique

Les hépatocytes de rat en culture primaire ont été traités durant 24h avec différentes doses d'extrait de thé UE (95°C, 15min) 400 et 600 µg/mL, et d'EGCG seul (30 et 100 µM) afin de comparer ses effets aux catéchines extrait du thé UE (95°C, 15min), puis les lipides intracellulaires hépatiques ont été dosés par marquage fluorescent des lipides neutres avec le fluorochrome LipidTox. Afin de déterminer quels pouvaient être certains des mécanismes impliqués dans la diminution des lipides hépatiques par les catéchines du thé.

Les catéchines du thé UE (95°C, 15min) diminuent le taux de lipides intracellulaires dans les hépatocytes de rat en culture primaire. Un traitement de 24h avec deux concentrations différentes de composé d'extrait aqueux de thé 400 et 600 µg/mL de milieu de culture ont permis de mettre en évidence une diminution significative des lipides intracellulaires dans les hépatocytes de (-51% et -56%) en comparaison avec les hépatocytes non traités (Figure 6.19). Le traitement par l'EGCG, principale catéchine présente dans notre extrait de thé, à 30 µM n'a eu aucun effet significatif sur le taux de lipides intracellulaires, en revanche, la plus forte concentration d'EGCG (100 µM) a permis une diminution significative des lipides (-19%) (Figure 6.19). Cependant, cette baisse est significativement moins importante que celle observée lors du traitement avec l'extrait global de thé aux deux concentrations alors que ces dernières contiennent beaucoup moins d'EGCG. Un mélange global natif des catéchines de thé est donc plus efficace.

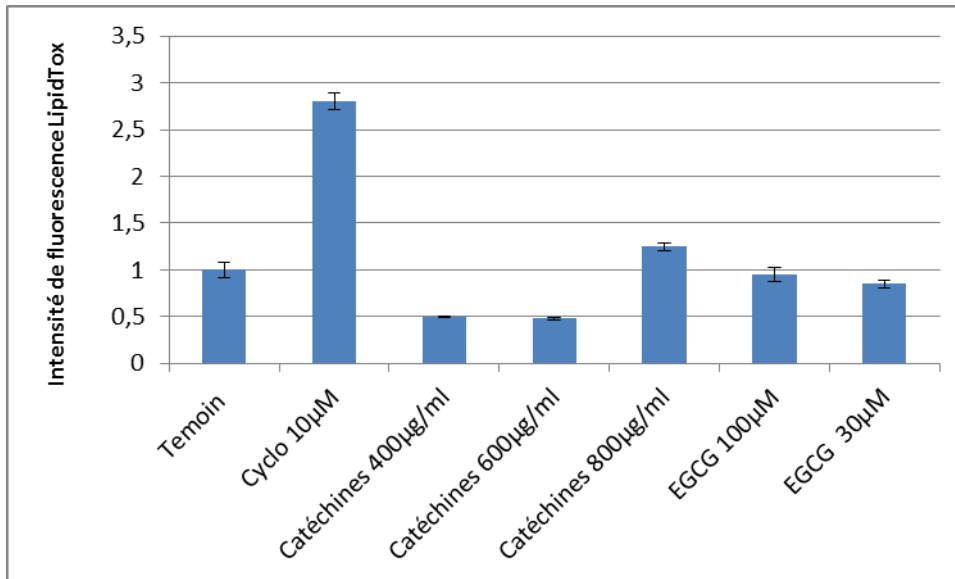


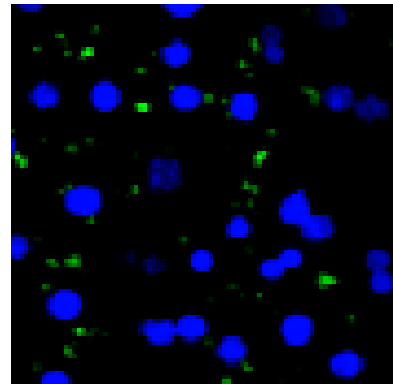
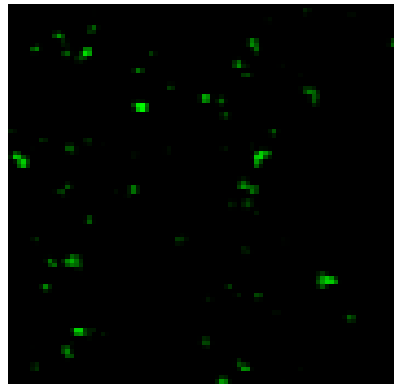
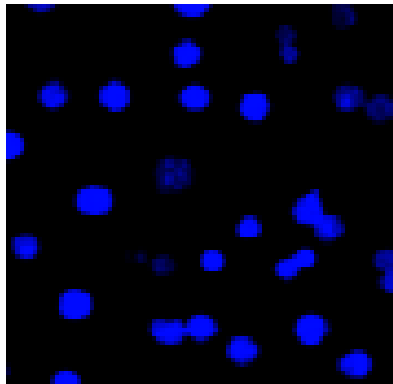
Figure 6.19 : La diminution de l'accumulation de lipides dans les hépatocytes isolés de rat

L'approche en culture primaire d'hépatocytes de rat et l'étude *in vivo* chez le modèle de rat syndrome métabolique apportent des informations qui convergent vers un effet bénéfique de notre extrait aqueux de thé UE (95°C, 15min) sur les lipides hépatiques. En effet, le contenu total en lipides du foie diminue de 56 % sur modèle cellulaire et de 14 % dans le modèle animal. Dans l'étude animale, nous avons également pu montrer une diminution des triglycérides, et de 40 % du cholestérol dans le foie suite au traitement par 600 mg/L par l'extrait du thé. Un autre mécanisme pouvant expliquer la diminution des lipides hépatiques par le thé est l'augmentation de la β oxydation des acides gras dans le foie.

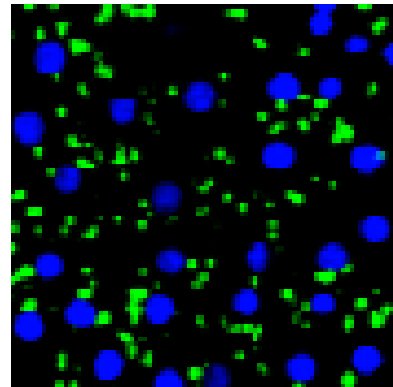
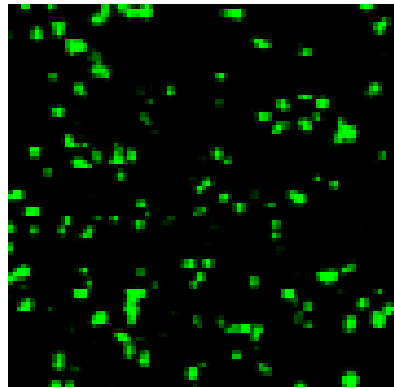
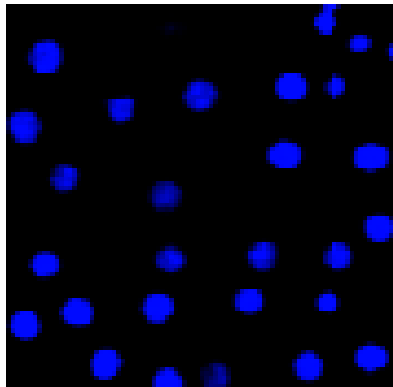
L'ensemble de nos résultats prouve que les doses 400 et 600 mg/L de catéchines du thé régule le métabolisme lipidique, impliqués dans la lipogenèse hépatique et stimule l'élimination biliaire du cholestérol, favorisant ainsi la diminution du taux de lipides hépatiques.

Hoechst LipidTox Merge

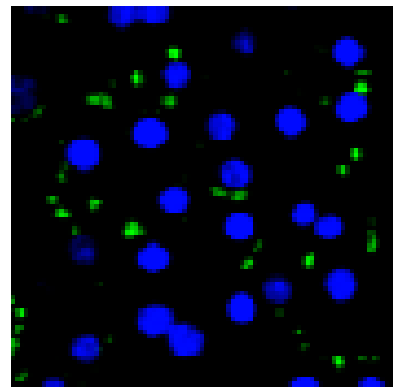
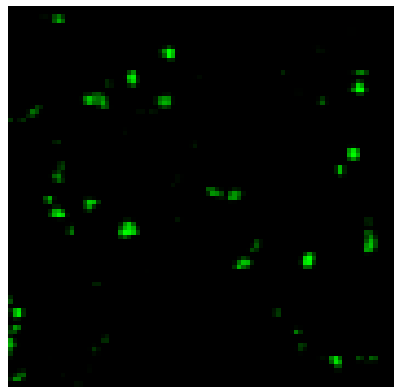
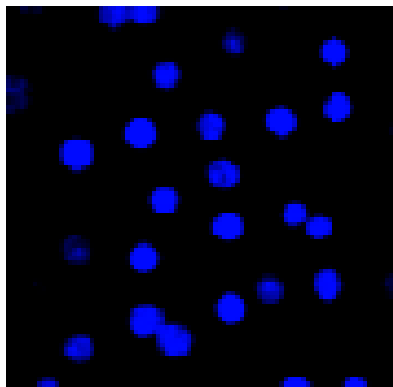
Témoin



CycloA10 μ M



EGCG 100 μ M



Catéchines 600 μ g/mL

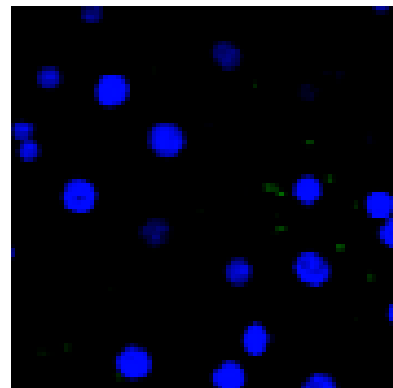
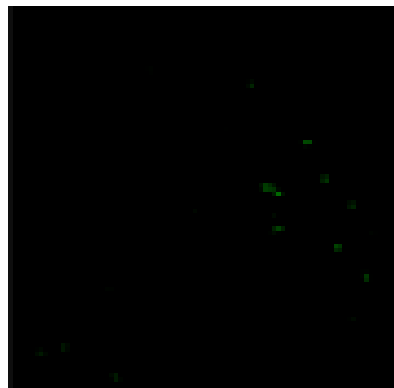
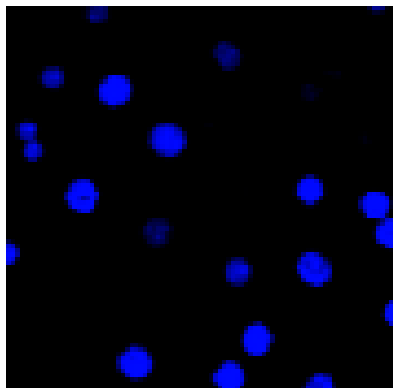


Figure 6.20 : Analyse micrographique Lipid Tox des hépatocytes de rat

6.8.2. Capacité antioxydante et hépatoprotéctrice des catéchines du thé

Dans cette partie nous a permis de mesurer les effets antioxydants et hépato-protecteurs des catéchines. Pour cela, nous avons tout d'abord évalué les effets d'un prétraitement de thé sur des hépatocytes de rat en culture primaire exposés au *t*-BHP, un puissant inducteur de stress oxydant. Le *t*-BHP est connu pour augmenter le stress oxydant et provoquer la mort cellulaire par stimulation de la production de ROS au sein de la cellule, ce que nous avons effectivement observé. Ces deux phénomènes ont été enrayés par un pré-traitement avec les doses de 400 et 600 µg/mL notre extrait de thé et mettant en évidence des effets hépatoprotecteurs via les propriétés antioxydantes des constituants qui le composent (Figure 6.21, 6.22). Ces résultats sont en accord avec une précédente étude, elle aussi réalisée *in vitro*, soulignant l'impact bénéfique de l'acide gallique et des polyphénols de thé sur la viabilité des hépatocytes humains exposés à de l'hydrogène peroxyde [182]. En parallèle de la surproduction de ROS, nous avons montré que le *t*-BHP entraînait une dysfonction mitochondriale caractérisée par une diminution de l'intégrité du potentiel membranaire mitochondrial (par mesure indirecte). Il a de plus été rapporté que la diminution du potentiel mitochondrial associé à une forte augmentation de ROS intracellulaires conduisait au déclenchement des voies de signalisation apoptotiques mitochondriales et à la mort cellulaire pouvant ainsi expliquer la mortalité induite par le *t*-BHP. Nous avons pu observer que cette perturbation de la fonction mitochondriale induite par le *t*-BHP était prévenue par un pré-traitement d'extrait de thé (Figure 6.23, 6.24).

Les résultats majeurs de cette étude sont la mise en évidence des effets hépato-protecteurs et antioxydants des catéchines extraite du thé sur les hépatocytes de rat en culture primaire soumis à un stress oxydant exogène, le *t*-BHP. En effet, les pré-traitements de 4h avec différentes concentrations de catéchines extrait du thé vert ont permis de prévenir la mortalité cellulaire induite par le traitement de 1h au *t*-BHP. Les prétraitements de catéchines du thé ont permis de prévenir l'augmentation de la production d'anions superoxydes mesurés par fluorescence du marquage MitoSox.

Nous avons mis en évidence que le *t*-BHP perturbait l'intégrité de la fonction mitochondriale des hépatocytes, évaluée à l'aide du test TMRE. Cette perturbation a été prévenue par les traitements de différentes doses de catéchines UE (95°C, 15min) de thé vert. L'ensemble de ces résultats démontre que les propriétés antioxydantes que possède le thé entraînent des actions hépato-protectrices en partie dues à une amélioration de la fonction mitochondriale et notamment du potentiel membranaire mitochondrial.

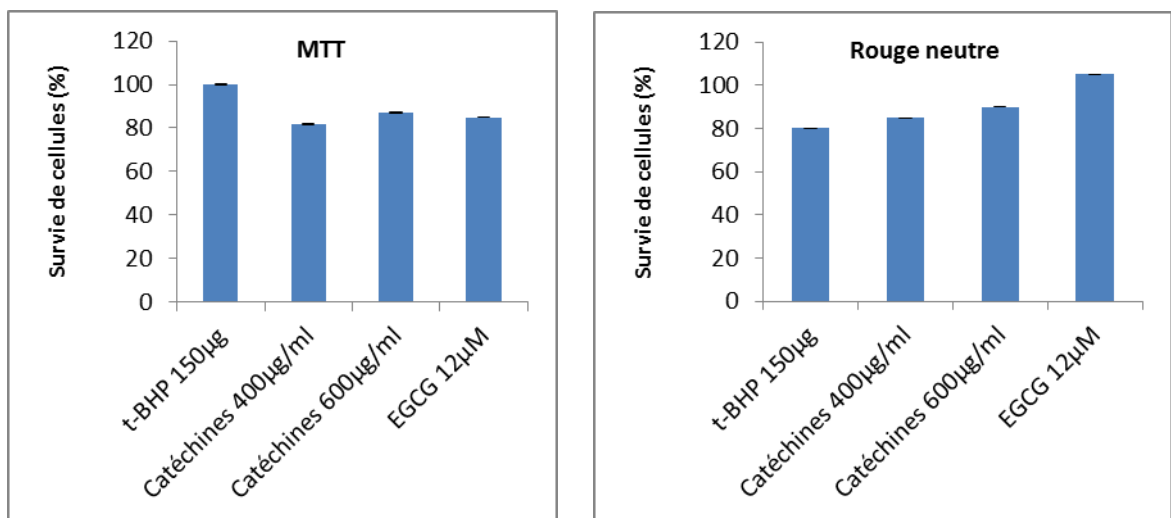
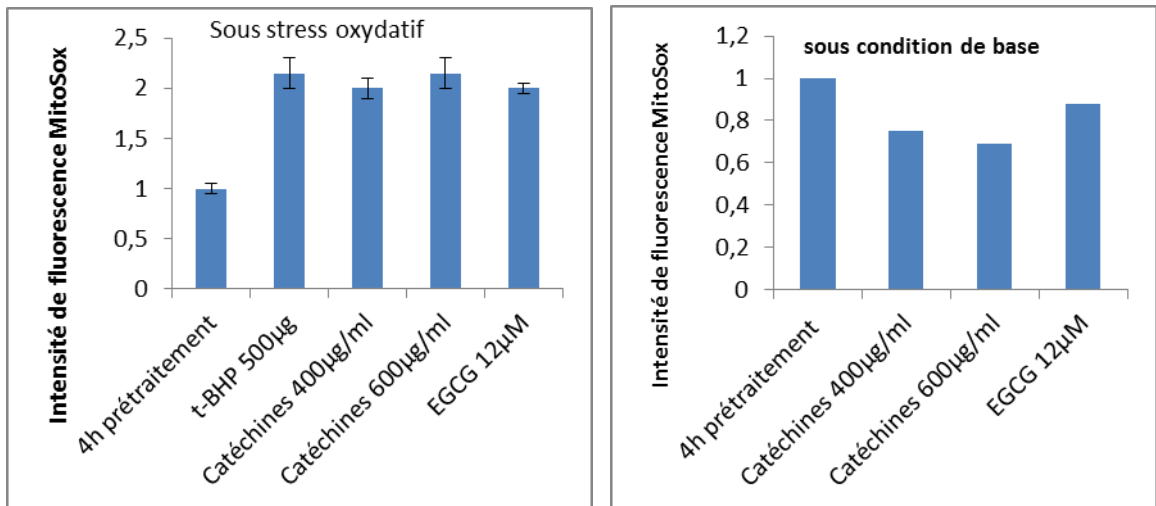
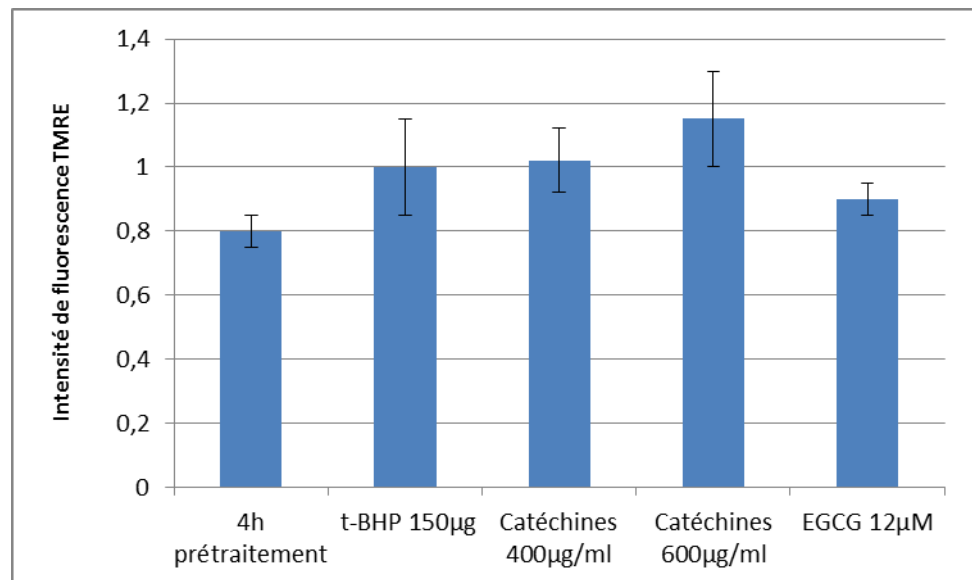


Figure 6.21 : Test de viabilité cellulaire



La production de ROS mitochondrial



La fonctionnalité mitochondrial sous stress oxydatif

Figure 6.22 : La fonctionnalité mitochondrial

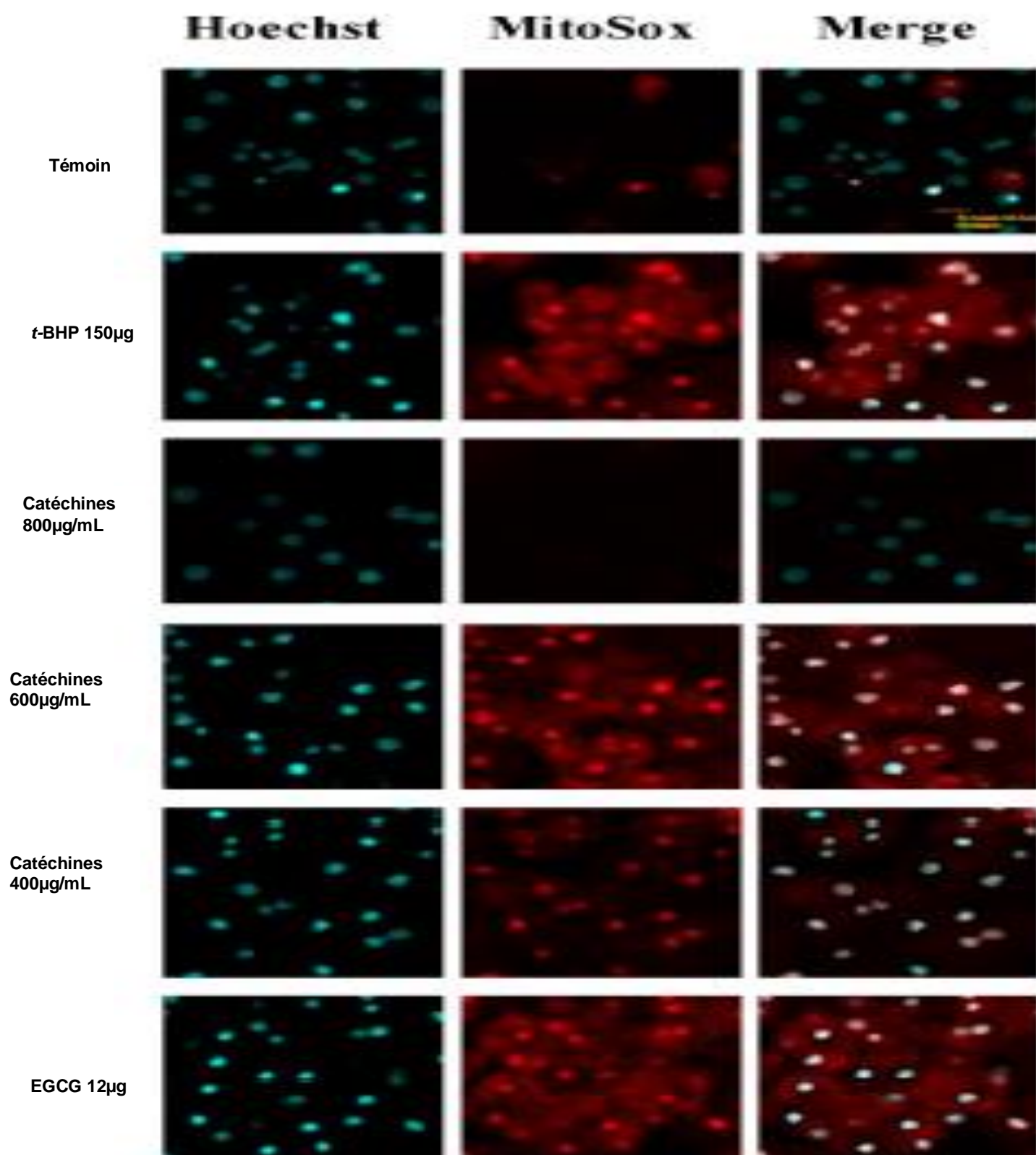


Figure 6.23 : Analyse micrographique MitoSox des hépatocytes de rat

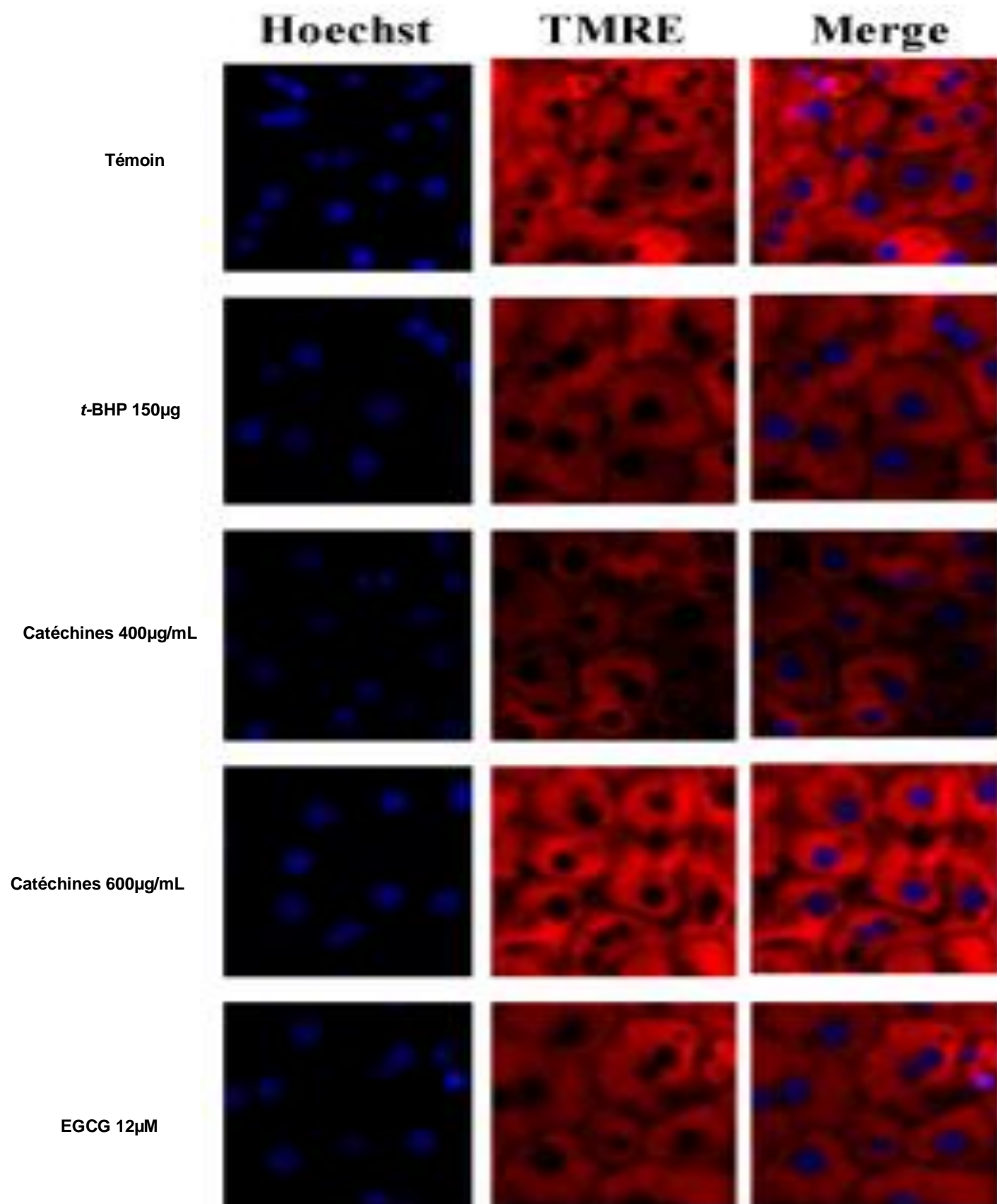


Figure 6. 24 : L'effet de catéchines sur la production de l'anion superd'oxyde mitochondrial (O_2^-), ainsi sur la fonctionnalité mitochondriale.

6.9. Discussion Générale

L'oxygène indispensable à notre vie est capable de produire en grande quantité dans notre organisme des dérivés toxiques, dont les fameux radicaux libres qui induisent des modifications oxydatives au niveau des lipides, l'ADN et les protéines. À des degrés variables, celles-ci sont impliquées dans le développement des maladies cardiovasculaires, des cancers, des complications du diabète ou encore des affections neurologiques dégénératives. Pour se protéger contre cet oxygène toxique, notre organisme dispose d'un réseau antioxydant très complexe composé d'enzymes, de protéines transporteuses du fer et du cuivre, de vitamines, de caroténoïdes, de flavonoïdes, d'oligo-éléments et d'autres molécules de petite taille (glutathion, ubiquinone) [176].

La concentration plasmatique de ces antioxydants dépend de leur biodisponibilité, c'est-à-dire de la façon dont ils sont absorbés notamment au niveau gastro-intestinal. À titre d'exemple, une dose orale de 30 mg/jour de vitamine C conduit à une biodisponibilité moyenne de 87 %. L'organisme produit plusieurs antioxydants qui cherchent les radicaux libres et les neutralisent en fournissant l'électron qui leur manque. Les antioxydants provenant de l'alimentation agissent de la même manière, contribuant à renforcer cette fonction importante pour le maintien d'une bonne santé. Les antioxydants sont capables de neutraliser la production accrue des radicaux libres. Dans les situations d'agression, un déséquilibre résulte d'une production fortement accrue et d'une déplétion dans les antioxydants par perte-redistribution. Ceci provoque une propagation des réactions d'oxydation et contribue à l'aggravation des pathologies aiguës et, delà, aux défaillances d'organes. Alors, des données épidémiologiques et les preuves obtenues *in-vitro* ou d'études animales *in-vivo* suggèrent que la consommation élevée des polyphénols peut réduire le risque de développer plusieurs maladies. Les catéchines sont sous surveillance intense pour leurs effets bénéfiques potentiels sur la santé humaine [177, 178].

Dans notre étude on a opté pour une extraction ultrasonique UE (95°C, 15min) du thé vert *Camellia sinensis*, dû à la présence d'une activité antioxydante plus forte, ainsi que ce type d'extraction à dévoiler la présence de la molécule bioactive et thérapeutique l'epigallocatechine gallate (EGCG) de l'ordre de 60%, ceci nous a

permis d'étudier quelques effets thérapeutiques de ces catéchines en passant par une étude toxicologique.

- Extraction des polyphénols du thé vert : Des études ont montré que les feuilles du thé vert *Camellia sinensis* représentent un excellent conteneur de polyphénols parmi tous les autres types de thé. Il a été démontré que les polyphénols sont le groupe le plus abondant des constituants dans les feuilles du thé vert [179]. Parmi ceux-ci, les catéchines qui constituent les principales composantes, qui ont été identifiées comme les principaux ingrédients actifs du thé vert [180].

Au cours de l'extraction, la modification des paramètres physico-chimiques (les conditions d'extraction) abaisse le rendement de l'extraction comme la température, le pH, la disponibilité de l'oxygène, la présence d'ions métalliques ainsi que les ingrédients ajoutés. Aussi, ces modifications influent très gravement sur la stabilité des catéchines du thé vert [181].

- Etude toxicologique & DL₅₀ : L'étude toxicologique fournit la mesure de sécurité nécessaire pour poursuivre la suite des essais. La DL₅₀ est une façon de mesurer le potentiel toxique à court terme (toxicité aiguë) d'une matière. Les effets médicaux du thé vert s'étendent à des risques autres que le cancer, y compris le vieillissement, les maladies neuro-dégénératives, les pathologies cardio-vasculaires, l'inflammation, l'appétit, la perte de poids et le diabète. Pour cela, l'objectif de la présente expérience effectuée sur des souris est d'évaluer l'innocuité des catéchines extraites du thé vert en utilisant un paradigme d'exposition aiguë. La dose sans effet nocif observé pour l'extrait des polyphénols du thé vert *Camellia sinensis* provenant des résultats de notre étude est de 2500 mg/kg de poids de souris. Ces mêmes résultats ont été obtenus par Hsu en 2011 [146]. Dans l'étude de toxicité aiguë, selon certains auteurs la DL₅₀ par voie orale doit être supérieure à 12,0 g/kg de poids corporel [182].

Pour cet effet, la Division de la Prévention du Cancer de l'Institut National du Cancer des Etats Unies évalue cette substance en tant que partie de l'initiative de santé publique [183].

- **Activité anti-oxydante :** Le test de DPPH et le test de FRAP qui mesure l'effet antioxydant de toute substance dans le milieu réactionnel. La réduction de la capacité est considérée comme la capacité d'un antioxydant naturel de donner des électrons. Les polyphénols du thé vert sont bien connus comme une sorte d'antioxydant parfait [180, 184].

Des études antérieures ont montré que la capacité anti-oxydante du thé vert diminue lorsque le fer est présent avant la digestion. Des changements importants des polyphénols du thé vert se produisent à la suite de changements de pH semblables à ceux trouvés dans le tractus gastro-intestinal notant que les effets thérapeutiques des polyphénols n'apparaissent qu'après digestion car cette dernière permet la libération des composants alimentaires bioactifs. Il est important de considérer que les composants du thé vert sont largement métabolisés en différentes métabolites circulant dans le sang et qui peuvent atteindre les différents sites d'action [167].

- **Etude thérapeutique :** Puisque le stress oxydatif constitue un mécanisme d'unification de la blessure de plusieurs types de processus de la maladie, il faut s'attendre à ce que les catéchines sont des molécules bioactives et antioxydantes comptent de cet effet bénéfique. Néanmoins, au-delà des propriétés antioxydantes bien connues de ces composés, ils peuvent exercer plusieurs autres mécanismes de protection. En effet, l'effet protecteur des catéchines globale est due à leur large éventail d'actions biologiques, tels que la libre chélation anti-radicalaire, métal, modulation enzyme, la modulation des voies de signalisation cellulaire et des effets de l'expression des gènes [185]. Il est important de signaler que les antioxydants ne peuvent pas guérir une maladie installée mais ils peuvent empêcher sa promotion et limiter son extension en cours [53].

Le stress oxydatif peut progresser aux dommages oxydatifs impliquant des protéines cellulaires, des lipides, l'ADN et d'autres molécules d'une manière qui pourrait conduire à la fonction cellulaire anormale. Les résultats obtenus dans notre étude concernant la partie du stress oxydatif montrent une élévation bien définie de la concentration du MDA tissulaires du foie chez les rats traités par la dose de catéchine UE (95°C, 15 min) de 800 mg/L par rapport aux rats traités par 400 et 600 mg/L et normaux. Le malondialdéhyde (MDA)

est le paramètre le plus largement utilisé pour évaluer les dommages oxydatifs aux lipides, même si on sait que les dommages oxydatifs des acides aminés, des protéines et de l'ADN provoquent également la libération du MDA [187]. Ces résultats suggèrent que le surdosage d'un antioxydant est un facteur important de l'augmentation du stress oxydatif, dont il devient pro oxydant. Les catéchines jouent un rôle important sur les paramètres du stress oxydatif (MDA, GSH et GPx)

- **Activité amincissante :** Il a été rapporté que les catéchines du thé vert ont des propriétés thermogéniques et favorise l'oxydation des graisses. Il a été démontré que les catéchines UE (95°C, 15 min) pourraient jouer un rôle dans le contrôle de la composition du corps via l'activation sympathique de la thermogénèse, l'oxydation des graisses, ou les deux. Les propriétés thermogéniques du thé vert pourraient résider principalement dans l'interaction entre sa haute teneur en catéchines et la présence de caféine avec la noradrénaline, depuis les catéchines (EGCG) sont connus pour être capables d'inhiber la catéchol-o-méthyl-transférase, et la caféine inhibant la phospho-di-estérase [108].

Shen et al. (2012) sont les premiers chercheurs qui ont évalué *in-vivo* l'efficacité de la forme concentrée du thé vert sur l'obésité sur le modèle animal et ont prouvé que le thé vert empêche de manière significative le gain de poids [174]. Les catéchines réduisent considérablement ou empêchent l'augmentation du poids corporel chez les sujets minces et obèses mâles et femelles. Sur la base des effets *in-vivo*, les composants du thé vert tels que l'EGCG pourraient être utile pour le traitement de l'obésité [175]. Une expérience avec du thé vert décaféiné et avec une dose de 200mg 2 fois par jour pendant 3 semaines a montré son effet amaigrissant. Donc, le pouvoir amincissant est attribué aux catéchines et non pas à la caféine comme le déclare certains éditeurs [54].

Certaines maladies sont liées à l'obésité donc, il est important de signaler que les catéchines du thé vert sont capable d'inhiber la biosynthèse du cholestérol [186], et qu'elles présentent un effet antidiabétique. Le traitement par voie orale quotidienne d'extrait de thé vert (300 mg/kg de poids

corporel) à des rats diabétiques pendant 30 jours a entraîné une réduction significative de glucose dans le plasma, d'hémoglobine glycosylée (HbA1c) et l'augmentation du taux d'insuline et de l'hémoglobine [187]. L'extrait de thé vert a été approuvé par les organes de certifications des aliments et des médicaments comme le premier médicament botanique [188].

- **Activité antibactérienne :** Etant donné que l'évolution des modes de maladies infectieuses et de l'émergence de souches microbiennes résistantes aux antibiotiques actuels, il y a un besoin urgent de trouver de nouveaux agents antimicrobiens puissants comme adjuvants à la thérapie antibiotique. Les catéchines ont une activité antibactérienne élevée contre divers micro-organismes [142, 189]. Le même résultat a été trouvé avec Yi et al. (2010) qui ont montré que les polyphénols du thé vert ont une grande action antibactérienne envers *Pseudomonas aeruginosa* [190], or que d'autre auteur ont démontré une grande efficacité inhibitrice, avec un pouvoir modificateur de morphologie et de structure très puissant atteignant la composition protéique membranaire [191].

D'autres érudits ont montré que les polyphénols n'ont aucun effet sur *Escherichia coli* même après incubation de 48h mais ce résultat est totalement changé lorsque les bactéries étaient exposées au NaCl 4% puis aux polyphénols du thé vert donc pour cette bactérie, le traitement aux polyphénols du thé vert demande une thérapeutique combinée [142].

- **Effet cytotoxique des catéchines sur paramètres lipidiques et sur tissus hépatiques :** L'évaluation de l'effet cytotoxique des catéchines du thé vert UE (95°C, 15min), et discuté l'hypothèse d'un effet pro-oxydant sur la croissance corporelle, le foie et les lipides sériques chez les rats femelles en croissance. Un retard de croissance constaté chez tous les lots de rats souris traités par les polyphénols par rapport aux témoins quel que soit la dose des catéchines (400 mg/L, 600mg/L et 800 mg/L).

Par ailleurs, nous avons aussi constaté une augmentation de l'indice hépatosomatique notamment chez les rats ayant ingérés la dose de 800mg/L de catéchines UE (95°C, 15min). Une coupe histologique au niveau du foie

montre un parenchyme hépatique siégé de lésions de souffrance cellulaire surtout chez les rats traités par la dose 800 mg/L. Pour les paramètres sériques on suppose que les polyphénols aient un effet pro-oxydant pour les rats ayant ingérés les doses de 800 mg/L par rapport aux souris ayant ingérés les doses de 400 mg/L et 600mg/L qui ont signalé un effet antioxydant.

Les études réalisées chez le rongeur mettent en évidence une diminution de l'accumulation lipidique hépatique et plus particulièrement des triglycérides et du cholestérol suite à la consommation de thé [192]. Cependant, les mécanismes impliqués dans cette baisse des lipides hépatiques sont encore loin d'être élucidés. En effet, il a été montré que le thé permettait de diminuer les gènes impliqués dans la lipogenèse hépatique et d'augmenter ceux impliqués dans l'oxydation mais les mécanismes précis mis en jeu dans cette régulation ne sont pas clairement décrits. Au niveau cellulaire, plusieurs études se sont penchées sur l'effet lipotrope des catéchines du thé vert et plus particulièrement de l'EGCG mais peu d'études ont recherché les effets lipotropes d'un extrait global de thé, et encore moins d'un mélange de plusieurs thés [193, 194].

- Culture cellulaire d'hépatocyte de rat : Les résultats obtenus de la capacité antioxydant et hépato protectrice des catéchine du thé vert UE (95°C, 15min) et leur effet sur les lipides intracellulaire hépatique étaient satisfaisantes, sachant que peu d'étude ont réalisé sur culture cellulaire d'hépatocyte de rat. Les causes de l'augmentation du stress oxydant, en dehors de l'implication de la stéatose hépatique, ne sont pas encore clairement comprises. Parmi les origines possibles de développement du stress oxydant, de nombreuses études tendent à penser que le dénominateur commun est les dysfonctions mitochondriales [71, 83, 84].

Les dysfonctions mitochondriales sont principalement caractérisées par une diminution de l'activité de la chaîne respiratoire, une diminution de la capacité de phosphorylation, d'une production d'ATP altérée, d'une diminution du potentiel membranaire mitochondrial, d'une quantité d'ADN mitochondrial plus faible et d'une structure anormale de la mitochondrie. Ces dysfonctions

conduisent à une augmentation du flux d'électrons de la chaîne respiratoire qui va réagir d'avantage avec l'O₂ et produire une quantité plus importante d'O₂⁻ et de H₂O₂ [85, 86]. Peu d'études ont été réalisées sur culture cellulaire d'hépatocytes de rat.

Le thé est une source importante de molécules antioxydants en particulier les catéchines. Parmi les catéchines, l'EGCG majoritaire, qu'a été particulièrement étudiée pour ses effets antioxydants. Il a d'ailleurs été montré que le thé était bénéfique pour lutter contre le stress oxydant impliqué dans de nombreuses pathologies et notamment dans le stress oxydatif [195]. Les catéchines en petite concentration jouent un rôle d'un antioxydant, alors qu'à des concentrations élevées elles deviennent pro-oxydantes.

Nos résultats révèlent donc l'impact bénéfique des catéchines du thé sur la fonction mitochondriale et contribuent à renforcer de précédents travaux montrant que les polyphénols (catéchines) de thé sont de bons candidats pour protéger la fonction mitochondriale en diminuant notamment le déclin du potentiel membranaire mitochondrial et en améliorant les performances de la chaîne respiratoire [195]. Nos résultats suggèrent également que les effets hépato-protecteurs du thé sont dus à l'effet bénéfique sur la fonction mitochondriale empêchant la cascade d'évènements apoptotiques [196].

Cependant, le mécanisme par lequel le thé permet de lutter contre l'augmentation du stress oxydant n'est pas clairement établi. Dans ce contexte, il était donc important de s'intéresser aux effets antioxydants et hépato-protecteurs des catéchines du thé.

Conclusion

Ce travail vise à la fois, le choix du model d'extraction des catéchines du thé vert par la méthode ultrasonique (temps et température) et agitation mécanique. Les catéchines présente une forte activité antioxydant et protègent les tissus contre les dommages causés par les radicaux libres. Ce qui explique le choix de la plante *Camellia sinensis*.

Les résultats obtenus indiquent que l'extraction des catéchines par le procédé ultrasonique UE (95°C, 15min) présente une forte activité antioxydants. L'identification de la composition chimique par HPLC-DAD et LC-MS ont permis d'identifier plusieurs composants de catéchines et que l'EGCG est le plus abondant ~ 60.1 %.

La mise en évidence de la dose létale des catéchine extraite et lyophilisé, la DL₅₀ a prouvé que ce produit n'est pas toxique à la dose utilisée de 2500 mg/kg de souris. Le test de DPPH et le test de FRAP ont révélé que l'extrait du thé vert présente une puissante activité anti-oxydante.

Les résultats des paramètres thérapeutiques étudiés et obtenu *in-vivo*, dévoilent une bonne efficacité des catéchines extraites du thé vert UE (95°C, 15min). L'effet amincissant (amaigrissant) chez les lapins, dont la perte du poids de 14.30 à 18.60% représenté par 460 ± 125.19g était remarquable, et atteint une diminution du poids de 613g durant 87 jours. Les résultats de l'activité antimicrobienne ont montré un effet inhibiteur pour les germes étudiés, or que reste discutable pour les autres espèces.

Les résultats obtenus *in-vitro* de culture cellulaire d'hépatocyte de rat nous a montré une capacité antioxydante et hépato-protectrice, ainsi un bon effet des catéchines UE (95°C, 15min) sur les lipides intracellulaire hépatique, avec un impact du stress oxydant sur l'accumulation de lipide hépatique.

D'après les résultats obtenus de ces études, nous concluons que les catéchines du thé vert sont très bons pour la santé et qu'ils méritent l'engouement scientifique observé de nos jours. Cependant, nous retenons que les catéchines soupçonnent de jouer un rôle important dans la biologie des vivants et qu'ils sont en grande partie responsables de la promotion de santé offerte par le thé vert.

Enfin, et d'après les résultats obtenus de notre travail, nous pouvons signaler que les catéchines présentent un projet d'un remède polyvalent pour le bien-être. Dans nos perspective, nous souhaitons que les travaux continuerons dans ce sens, dont l'objectif d'utiliser le model d'extraction optimiser afin de préparer un complément alimentaire et/ou conservateur naturel, et après avoir effectué d'autres études supplémentaires, puis nous recommandons de le commercialiser comme complément alimentaire.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1]. Lobo V., Patil A., Phatak A, & Chandra N. (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods : Impact on human health. *Pharmacogn Rev.* 4(8) : 118–126.
- [2] Haleng J, Pincemail J, Defraigne J.O, Charlier C, Chapelle J.P. (2007). Le stress oxydant. *Rev Med Liege*, 62 (10) : 628-638
- [3] Sarni-Manchado, P. & Cheynier, V., « *Les polyphénols en agroalimentaire* ». (2006) Tec & Doc, Lavoisier, Paris, 398 p.
- [4]. Park, H.J., DiNatale, D.A., Chung, M.-Y., Park, Y.-K., Lee, J.-Y., Koo, S.I., O'Connor, M., Manautou, J.E., Bruno, R.S. Green tea extract attenuates hepatic steatosis by decreasing adipose lipogenesis and enhancing hepatic antioxidant defenses in ob/ob mice. *J. Nutr. Biochem.* (2011) 22, 393–400.
doi:10.1016/j.jnutbio.2010.03.009
- [5]. Siddiqui IA, Asim M, Hafeez BB, Adhami VM, Tarapore RS, Mukhtar H (2010) Green tea polyphenol EGCG blunts androgen receptor function in prostate cancer. *The FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology.*
- [6]. Adity B. Interaction of tea polyphenols with serum albumins: A fluorescence spectroscopic analysis. *Journal of Luminescence.* (2016) 169: 220–226.
- [7]. Kumazoe M., Yamashita M., Nakamura Y., Takamatsu K., Bae J., Yamashita S., Yamada S., Onda H., Nojiri T., Kangawa K. & Tachibana H. (2017). Green Tea Polyphenol EGCG Upregulates Tollip Expression by Suppressing Elf-1 Expression. *J Immunol*, September 27, j1601822; DOI: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1601822>
- [8]. Zhu A., Wang X. et Guo Z. (2001). « Study of tea polyphenol as a reversal agent for carcinoma cell lines' multidrug resistance (study of TP as a MDR reversal agent) ». *Nuclear Medicine and Biology.* 28. pp : 735 – 740.
- [9]. Boudet A.M. (2007). Evolution and current status of research in phenolic compounds. *Phytochemistry.* 68 : 2722 – 2735.

- [10]. Delmas, F.-X. & Minet, M. " *Le guide de dégustation de l'amateur de thé*. Les Editions du Chêne", (2007) Paris, 239 p.
- [11]. National Bureau of Statistics of China. China Statistical Year Book (2006).
<http://www.stats.gov.cn/tjsj/ndsj/2006/indexeh.htm>.
- [12]. FAO. (2012). Production / ProdStat / Crops. by Food and Agriculture Organisation of the United Nations from <http://faostat.fao.org/>.
- [13]. FAO. (2017). [Les principaux pays producteurs de thé dans le monde • Colors of Tea](https://www.colorsoftea.fr/pays-producteurs-de-the/). <https://www.colorsoftea.fr/pays-producteurs-de-the/> 14 nov. 2017
- [14]. Roberts, E.A.H., Wood, D.J., 1950. The fermentation process in tea Manufacture . 11, Oxidation of substrates by tea oxidase. *Biochem. J.* 47, 175–186.
- [15]. Lin LZ., Chen P. & Harnly J.M. (2008). New phenolic components and chromatographic profiles of green and fermented teas. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56(17), p. 8130–8140.
- [16]. Selvendran, R. R. & Perera, B. P. M., "Chemical composition of tea leaf cell-wall". *Chem. Ind.* (1971). (21): 577-578.
- [17]. Tomas-Barberan F.A. & Andres-Lacueva C. (2012). Polyphenols and health: current state and progress. *J. Agric. Food Chem.* 60 : 8773–8775.
- [18]. Vincken, J.-P., Schols, H. A., Oomen, R. J. F. J., McCann, M. C., Ulvskov, P., Voragen, A. G. J. & Visser, R. G.F « If homogalacturonan were a side chain of rhamnogalacturonan I. Implications for cell wall architecture". *Plant Physiol.*, (2003) 132 (4) : 1781-1789.
- [19]. Axelos, M. A. V. & Thibault, J. F. "The chemistry of low-methoxyl pectin gelation. *Chem. Technol.Pectin*" (1991): 109-118.
- [20]. Dong L., Zhu J., Li X. et Li J. « Effect of tea polyphenols on the physical and chemical characteristics of dried-seasoned squid (*Dosidicus gigas*) during storage ». *Food Control.* (2013), 31 : 586 – 592.
- [21]. Singh R., Akhtar N. et Haqqi T. « Green tea polyphenol epigallocatechi3-gallate: Inflammation and arthritis ». *Life Sciences.* (2010). 86 : 907 – 918.
- [22]. Yang C.S, Wang X, Lu G, Picinich SC (2009) Cancer prevention by tea: animal studies, molecular mechanisms and human relevance. *Nat Rev Cancer* 9: 429–39.

- [23]. Sakakibara H., Honda Y., Nakagawa S., Ashida H. et Kanazawa K.
 «Simultaneous determination of all polyphenols in vegetables, fruits, and teas ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. (2003) 51: 571 – 581.
- [24]. Dubick M. et Omaye S. « Grape wine and tea polyphenols in the modulation of atherosclerosis and heart disease ». (2007). In R. E. C. Wildman (Ed.), *handbook of nutraceuticals and functional foods*. 2nd edition. Boca Raton: CRC Press.
- [25]. Shen C., Yeh J., Cao J. et Wang J. « Green tea and bone metabolism ». *Nutrition Research*. (2009) 29 : 437 – 456.
- [26]. Deka A. et Vita J. « Tea and cardiovascular disease ». *Pharmacological Research*. (2011) 64 : 136 – 145.
- [27]. Jiang H., Shii T., Matsuo Y., Tanaka T., Jiang Z. et Kouno I. « A new catechin oxidation product and polymeric polyphenols of post-fermented tea ». *Food Chemistry*. (2011), 129 : 830 – 836.
- [28]. Henning S., Niu Y., Liu Y., Lee N., Hara Y., Thames G., Minutti R., Carpenter C., Wang H. et Heber D. « Bioavailability and antioxidant effect of epigallocatechin gallate administered in purified form versus as green tea extract in healthy individuals ». *Journal of Nutritional Biochemistry*. (2005) 16 : 610 – 616.
- [29]. Osanai K., Landis-Piwowar K., Dou Q. et Chan T. « A para-amino substituent on the D-ring of green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate as a novel proteasome inhibitor and cancer cell apoptosis inducer ». *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. (2007) : 5076 – 5082.
- [30]. Azam S., Hadi N., Khan N. et Hadi S. « Prooxidant property of green tea polyphenols epicatechin and epigallocatechin-3-gallate: implications for anticancer properties ». *Toxicology in-vitro*. (2004) 18 : 555 – 561.
- [31]. Peters C., Green R., Janle E. et Ferruzzi M. « Formulation with ascorbic acid and Sucrose modulates catechin bioavailability from green tea ». *Food Research International*. (2010) 43 : 95 -102.
- [32]. Ananingsih V., Sharma A. et Zhou W. « Green tea catechins during food processing and storage: A review on stability and detection ». *Food Research International*. (2013) 50 : 469-479.
- [33]. Kaneko S, K Kumazawa, H Masuda, A Henze and T Hofman “ Moléculaire and sensory studies on the Umami taste of Japanese Green Tea”. *J. Agric. Food chem...*, (2006) 54 (7), 2688-2694.
- [34]. Lu K, Gray M, Oliver C, liley D, Harisson B, Bartholomeusz C, Phan K, Nathan P, “The acute effects of L-theanine in comparison with alprazolam on

- Anticipatory anxiety in humans ». *Hum Psychopharmacol*, (2004) vol. 19, n°7, p. 457. PMID 15378679
- [35]. Gomez-Ramirez M., "The deployment of intersensory selective Attention : A High-density Electrical Mapping Study of the Effects of Theanine", dans *Clin Neuropharmacol*, (2009) vol. 30, n°1, p25-38 PMID 17272967
- [36]. Kimura K, Ozek M, Juneja L, Ohira H., " L-Theanine reduces psychological and physiological stress reponses". *Biol Psychol*, vol. (2007) 74, n°1, P. 39-45.
- [37]. Kuriyama S, Shimazu T, Ohmori N, Kikuchi N, Nakaya Y, Nishino Y, Tsubono I, Tsuji., "Green Tea consumption and Mortality due to Cardiovascular Disease, Cancer, and All causes" . *JAMA*. (2006) 296: 1255-1265
- [38]. Maron DJ, Lu GP, Cai NS, Wu ZG, Li YH, Chen H., « Cholesterol-lowering effect of theaflavin-enriched green tea extract : a randomized controlled trial. *Arch Int Med*, (2003) 163 : 1448-53
- [39]. Syed DN. Green tea polyphenol EGCG supresses cigarette smoke condensate induced NF-kappaB activation in normal human bronchial epithelial cells. *Oncogene*; (2007) 26 (5) : 673-82
- [40]. Boehm K, Borrelli F, Ernest E, Habacher G, Hung SK, Millazo S, Horneber M, "Green tea (*Camellia sinensis*) for the prevention of cancer. *Cochrane Database of Systematic*" Reviews, (2009) issue 3. Art. N°: CD005004. pub2
- [41]. Boon HS, Olatunde F, Zick, SM, "Trend in complementary/alternative medicine use by breast cancer survivors: comparing survey data from 1998 and 2005. *BioMed Central Womens Health*", (2007) 7: 1-7
- [42]. Boyd B., Ford C., Koepke Michael C., Gary K., Horn E., McAnalley S, et McAnalley B. " Etude pilote ouverte de l'effet antioxidant d'Ambrotose AOTM sur des personnes en bonne santé", *GlycoScience & Nutrition*. (2003) 4(6), 7p.
- [43]. Morel Y. et Barouki R., "Repression of gene expression by oxidative stress". *Biochem J*. (1999)342(3), 481-496.

- [44]. Favier A. "Le stress oxydant. Interet conceptuel et experimental dans la comprehension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique". L'actualité chimique. (2003) 108-115.
- [45]. Vansant G., Radicaux libres et antioxydants ; principes de base. Symposium « Antioxydants et alimentation ». (2004) Institut Danone.
- [46]. Novelli G.P. Role of free radicals in septic shock. J Physiol Pharmacol. (1997) 48, 517-527.
- [47]. Hadi M « La quercétine et ses derives : molecules à caractère pro-oxydant ou capteurs de radicaux libres ; étude et application thérapeutique ». (2004) Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de Docteur en Sciences de l'université Louis Pasteur Domaine : Pharmacochimie . 155p.
- [48]. Hossein S.R et Lytle M., "Les antioxydants. Traducteur : alain boutillier". Catie feuillez d'information (2001) 5p.
- [49]. Krippeit-Drews P., Lang F., Haussinger D. et Drews G., "H₂O₂ induced hyperpolarization of pancreatic B-cells". Pflugers Arch. (1994) 426, 552-554.
- [50]. Pincemail J., Meurisse M., Limet R. et Defraigne J.O., « Mesure et utilisation des antioxydant en médecine humain ». (1998) MS. 73.
- [51]. Atawodie S.E., "Antioxidant potentiel of african journal of biotechnology (2005) 4(2) : 128-133
- [52]. Georgetti S.R., Casagrande R., Di Mambro V.M., Azzolini Ana ECS. Et Fonesca Maria. JV., "Evaluation of the antioxidant Activity of Different Flavonoids by the Chemiluminescence Method". (2003) AAPS PharmSci. 5 (2), 5p.
- [53]. Berger M. « Manipulations nutritionnelles du stress oxydant : état des connaissances ». *Nutrition clinique et métabolisme*. (2006) 20 : 48 – 53.
- [54]. Basu A., Betts N., Mulugeta A., Tong C., Newman E. et Lyons T. « Green tea supplementation increases glutathione and plasma antioxidant capacity in adults with the metabolic syndrome ». *Nutrition Research*. (2013) 33 (3) : 180-197.

- [55]. Yagoubi N., Ballet A., Pellerin F. et Baylocq D. « Etude par chromatographie liquide haute performance des antioxydants phénoliques présents dans les matériaux plastiques. Comparaison de trois méthodes de détection : spectrophotométrie dans l'ultra-violet, électrochimique, et évaporative à diffusion de la lumière ». *Journal of Chromatography*. (1990) 522 : 131 – 141.
- [56] Svoboda K.P. et Hampson J.B., "Bioactivity of essential oils of selected Temperat aromatic plants : antibacterial, antioxidant, antiinflammatory and other related pharmacological activities". (1995). Plant Biology Department , SAC Auchincruive, Ayr, Scotland , UK., KA6 5HW.
- [57] Bruneton J. "Pharmacognosie, phytochimie, Plantes medicinales , 3ème éd . Paris : Edition Médicales internationales", (1999) Edition Tec & Doc Lavoisier. 120p.
- [58] Maydani M., " Effet of functional food ingredients : vitamin E modulation of cardiovascular diseases and immune status in the elderly". *Am J Clin Nutr*. (2000) 71 (suppl) 1665S- 1668S.
- [59] Maydani M., "Vitamine E and prevention of heart disease in high – risk patient". *Nutr Rev*. (2000) 58, 278-281.
- [60] Pieroni A., Janiak V., Durr C.M., Ludeke S., Trachel E. Heinrich M., " In vitro antioxidant Activity of Non-cultivated Vegetables of Ethnic Albanian in southern Italy". *Phytother. Res*. (2002) 16, 467-473.
- [61] Carty J.L, Bevan R., Waller H. "The effect of vitamin C supplementation on protein oxidation in healthy volunteers. *Biochem Biophys*".(2000) *Res Com* . 273, 729-735.
- [62] Panda K., Chattopadhyay R., Fhosh M. K et al., « Vitamin C prevents cigarette smoke induced oxidative damage of proteins and increased proteolysis". *ree Radical Biol Med*. (1999)27, 1064 -10079.
- [63]. Sarkar A ., Bishayee M et Chatterjee I.B., "Beta –carotene prevents lipid peroxidation and red blood cell membrane protein damage in experimental hepato carcinogenesis". *Cancer Biochem Biophys*. (1995) 15, 111-125.

- [64]. Cakatay U., Telci A., Kayali R. "effet of α -lipoic acid supplementation on oxidative protein damage in the streptozotocin –diabetic rat". (2000) Res Exp Med. 199, 243-251.
- [65]. Packer L. et al., " Alpha-Loique Acid as a Biological Antioxidant Free Radical Biology and Medicine". (1995) 19, 227-250.
- [66]. Kahler W. et al.," Diabetes Mellitus- A Free Radical-Associated Disease, Results of Adjuvant Antioxydant Suppementation" . Z Gesamt Inn Med. (1993) 48 (5), 223-32.
- [67]. Meyer AS., Yi O.S., Person .D.A. et al., " Inhibition of humain low –density lipoprotein oxidation in relation to composition of phenolique antioxidants in grapes". J. Agricult food chem. (1997) 45, 1638-1643.
- [68]. Bassu Tapen K., Temple Norman J. et Garg Manohar L " Antioxidants in human health and disease" (1999), CAB International.
- [69]. Hegarty V.M. "Tea Drinking and bone Mineral Density in Older Women". Am J Clin Nutr. (2000) 71 (41) 3-7.
- [70]. Burton G. W., Traber M.G., Acuff R.V " Human plasma and tissue alpha-Tocopherol concentrationsin reponse to supplementation with deuterated Natural and synthetic vitamin E". Am J Clin Nutr. (1998) 67, 669-684.
- [71]. Browning, J.D., Horton, J.D. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury.J. Clin. Invest. (2004) 114, 147–152. doi:10.1172/JCI200422422
- [72]. Abdelmegeed, M.A., Banerjee, A., Yoo, S.-H., Jang, S., Gonzalez, F.J., Song, B.-J Critical role of cytochrome P450 2E1 (CYP2E1) in the development of high fat-induced non-alcoholic steatohepatitis. J. Hepatol. (2012) 57 : 860–866. doi:10.1016/j.jhep.2012.05.019
- [73]. Leclercq, I.A., Farrell, G.C., Field, J., Bell, D.R., Gonzalez, F.J., Robertson, G.R. CYP2E1 and CYP4A as microsomal catalysts of lipid peroxides in murine Nonalcoholic steatohepatitis. J. Clin. Invest. (2000) 105: 1067–1075.

doi:10.1172/JCI8814

- [74]. Pan, M., Cederbaum, A.I., Zhang, Y.-L., Ginsberg, H.N., Williams, K.J., Fisher, E.A. Lipid peroxidation and oxidant stress regulate hepatic apolipoprotein B Degradation and VLDL production. *J. Clin. Invest.* (2004) 113 :1277–1287.
doi:10.1172/JCI200419197
- [75]. Marnett, L.J. Lipid peroxidation—DNA damage by malondialdehyde. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* (1999) 424 : 83–95. doi:10.1016/S0027-5107(99)00010-X
- [76]. Bertola, A., Bonnafous, S., Anty, R., Patouraux, S., Saint-Paul, M.-C., Iannelli, A., Gugenheim, J., Barr, J., Mato, J.M., Le Marchand-Brustel, Y., Tran, A., Gual, P. Hepatic Expression Patterns of Inflammatory and Immune Response Genes Associated with Obesity and NASH in Morbidly Obese Patients. (2010) *PLoS ONE* 5, e13577. doi:10.1371/journal.pone.0013577
- [77]. [Rodolphe Anty.](#), [Clémence M Canivet.](#), [Philippe Gual.](#), [Albert Tran.](#) Stéatoses hépatiques métabolique. *Hépto-Gastro & Oncologie Digestive.* (2017) 24(7) : 702-18. doi : [10.1684/hpg.2017.1490](https://doi.org/10.1684/hpg.2017.1490)
- [78]. Tosello-Tramont, A.-C., Landes, S.G., Nguyen, V., Novobrantseva, T.I., Hahn, Y.S. Kupffer Cells Trigger Nonalcoholic Steatohepatitis Development in Diet-Induced Mouse Model through Tumor Necrosis Factor- α Production. *J. Biol. Chem.* (2012) 287, 40161–40172. doi:10.1074/jbc.M112.417014
- [79]. Moreira, R.K. Hepatic stellate cells and liver fibrosis. *Arch. Pathol. Lab. Med.* (2007)131 :1728–1734. doi:10.1043/15432165
- [80]. Stojisavljevic, S., Gomercic Palcic, M., Virovic Jukic, L., Smircic Duvnjak, L., Duvnjak, M. Adipokines and proinflammatory cytokines, the key mediators in The pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *World J. Gastroenterol.* *WJG* (2014) 20, 18070–18091. doi:10.3748/wjg.v20.i48.18070
- [81]. Maury, E., Brichard, S.M. Adipokine dysregulation, adipose tissue inflammation And metabolic syndrome. *Mol. Cell. Endocrinol.* (2010) 314, 1–16.

doi:10.1016/j.mce.2009.07.031

- [82]. Seo, Y.Y., Cho, Y.K., Bae, J.-C., Seo, M.H., Park, S.E., Rhee, E.-J., Park, C.-Y., Oh, K.-W., Park, S.-W., Lee, W.-Y. Tumor Necrosis Factor- α as a Predictor for the Development of Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A 4-Year Follow-Up Study. *Endocrinol. Metab.* (2013) 28, 41–45. doi:10.3803/EnM.2013.28.1.41
- [83]. Tariq, Z., Green, C.J., Hodson, L. Are oxidative stress mechanisms the common denominator in the progression from hepatic steatosis towards non-alcoholic steatohepatitis (NASH)? *Liver Int. Off. J. Int. Assoc. Study Liver.* (2014) 34 :180–190. doi:10.1111/liv.12523
- [84]. Rector, R.S., Thyfault, J.P., Uptergrove, G.M., Morris, E.M., Naples, S.P., Borengasser, S.J., Mikus, C.R., Laye, M.J., Laughlin, M.H., Booth, F.W., Ibdah, J.A. Mitochondrial dysfunction precedes insulin resistance and hepatic steatosis and contributes to the natural history of non-alcoholic fatty liver disease in an obese rodent model. *J. Hepatol.* (2010) 52, 727–736. doi: 10.1016/j.jhep. 2009. 11.030
- [85]. Forbes-Hernández, T.Y., Giampieri, F., Gasparrini, M., Mazzoni, L., Quiles, J.L., Alvarez-Suarez, J.M., Battino, M. The effects of bioactive compounds from plant foods on mitochondrial function: A focus on apoptotic mechanisms. *Food Chem. Toxicol.* (2014) 68 : 154–182. doi:10.1016/j.fct.2014.03.017
- [86]. Begriche, K., Igoudjil, A., Pessayre, D., Fromenty, B. Mitochondrial dysfunction In NASH: Causes, consequences and possible means to prevent it. *Mitochondrion.* (2006) 6, 1–28. doi:10.1016/j.mito.2005.10.004
- [87]. García-Ruiz, C., Colell, A., Morales, A., Kaplowitz, N., Fernández-Checa, J.C. Role of oxidative stress generated from the mitochondrial electron transport chain and mitochondrial glutathione status in loss of mitochondrial function and activation of transcription factor nuclear factor-kappa B: studies with isolated mitochondria and rat hepatocytes. *Mol. Pharmacol.* (1995) 48, 825–834.

- [88]. Aubert, J., Begriche, K., Knockaert, L., Robin, M.A., Fromenty, B. Increased expression of cytochrome P450 2E1 in nonalcoholic fatty liver disease: mechanisms and pathophysiological role. *Clin. Res. Hepatol. Gastroenterol.* (2011) 35 : 630–637. doi:10.1016/j.clinre.2011.04.015
- [89]. Leung, T.-M., Nieto, N. CYP2E1 and oxidant stress in alcoholic and non Alcoholic fatty liver disease. *J.Hepatol.* (2013)58, 395–398. doi:10.1016/j.jhep.2012.08.018
- [90]. Peters C., Green R., Janle E. et Ferruzzi M. « Formulation with ascorbic acid and sucrose modulates catechin bioavailability from green tea ». *Food Research International.* (2010) 43 : 95 – 102.
- [91]. Green R., Murphy A., Schulz B., Watkins B. et Ferruzzi M. « Common tea formulations modulate in vitro digestive recovery of green tea catechins ». *Molecular Nutrition & Food Research..* (2007) : 51(9) : 1152 – 1162.
- [92]. Neilson A., Hopf A., Cooper B., Pereira M., Bomser J. et Ferruzzi M. « Catechin degradation with concurrent formation of homo and heterocatechin dimers during in vitro digestion ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* (2007) 55(22) : 8941 –8949.
- [93]. Vaidyanathan J. et Walle T. « Transport and metabolism of the tea flavonoid Epicatechin by the human intestinal cell line Caco-2 ». *Pharmaceutical Research.* (2001) 18(10) : 1420- 1425.
- [94]. Zhang L., Zheng Y., Chow M. et Zuo Z. « Investigation of intestinal absorption And disposition of green tea catechins by Caco-2 monolayer model ». *International Journal of Pharmaceutics.* (2004) 287(1-2) : 1 -12.
- [95]. Clifford, M.N., van der Hooft, J.J.J., Crozier, A. Human studies on the absorption, distribution, metabolism, and excretion of tea polyphenols. *Am. J. Clin. Nutr.* (2013) 98 : 1619S–1630S. doi:10.3945/ajcn.113.058958

- [96]. Sang, S., Lambert, J.D., Ho, C.-T., Yang, C.S. The chemistry and Biotransformation of tea constituents. *Pharmacol. Res.* (2011) 64, 87–99. doi:10.1016/j.phrs.
- [97]. Scalbert, A., Williamson, G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J. Nutr.* (2000) 130, 2073S–85S.
- [98]. Williamson, G., Manach, C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans.II. Review of 93 intervention studies. *Am. J. Clin. Nutr.* (2005) 81, 243S– 255S.
- [99]. Mulder, T.P.J., van Platerink, C.J., Wijnand Schuyf, P.J., van Amelsvoort, J.M.M. Analysis of theaflavins in biological fluids using liquid chromatography– Electro spray mass spectrometry. *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. App.* (2001) 760 : 271–279. doi:10.1016/S0378-4347(01)00285-7
- [100]. Lambert, J.D., Lee, M.-J., Diamond, L., Ju, J., Hong, J., Bose, M., Newmark, H.L., Yang, C.S. Dose-dependent levels of epigallocatechin-3-gallate in human Colon Cancer cells and mouse plasma and tissues. *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.* (2006) 34 : 8–11. doi:10.1124/dmd.104.003434
- [101]. Kim, S., Lee, M.-J., Hong, J., Li, C., Smith, T.J., Yang, G.-Y., Seril, D.N., Yang, C.S. Plasma and Tissue Levels of Tea Catechins in Rats and Mice During Chronic Consumption of Green Tea Polyphenols. *Nutr. Cancer.* (2000) 37 : 41– 48. doi:10.1207/S15327914NC3701_5
- [102]. Henning, S.M., Aronson, W., Niu, Y., Conde, F., Lee, N.H., Seeram, N.P., Lee, R.-P., Lu, J., Harris, D.M., Moro, A., Hong, J., Pak-Shan, L., Barnard, R.J., Ziaee, H.G., Csathy, G., Go, V.L.W., Wang, H., Heber, D. Tea polyphenols and theaflavins are present in prostate tissue of humans and mice after green and black tea consumption. *J. Nutr.* (2006) 136 : 1839–1843.
- [103]. Liang, J., Xu, F., Zhang, Y.-Z., Zang, X.-Y., Wang, D., Shang, M.-Y., Wang, X., Chui, D.-H., Cai, S.-Q. The profiling and identification of the metabolites

of (+)-catechin and study on their distribution in rats by HPLC-DAD-ESI-IT-TOF-MS(n) technique. *Biomed. Chromatogr. BMC.* (2014) 28: 401–411.
doi:10.1002/bmc.3034

- [104]. Thawonsuwan J, Kiron V, Satoh S, Panigrahi A, Verlhac V. Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) affects the antioxidant and immune defense of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Fish physiology and biochemistry.* (2010)36: 687–97. [PubMed: 19680766]
- [105]. Higdon JV, Frei B. Tea catechins and polyphenols: health effects, metabolism, And antioxidant functions. *Critical reviews in food science and nutrition.* (2003) 43: 89–143. [PubMed: 12587987]
- [106]. Mukhtar H, Ahmad N. Tea polyphenols: prevention of cancer and optimizing health. *The American journal of clinical nutrition.* (2000) 71:1698S–702S. [PubMed: 10837321]
- [107]. Ahmed S, Wang N, Lalonde M, Goldberg VM, Haqqi TM. Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate (EGCG) differentially inhibits interleukin-1 beta-induced expression of matrix metalloproteinase-1 and -13 in human chondrocytes. *J Pharmacol Exp Ther.* (2004) 308: 767–73.
- [108]. Khan N, Afaq F, Saleem M, Ahmad N, Mukhtar H. Targeting multiple signaling pathways by green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate. *Cancer Res.* (2006) 66: 2500–5. [PubMed:16510563]
- [109]. Yang CS, Lambert JD, Ju J, Lu G, Sang S. Tea and cancer prevention: Molecular mechanisms and human relevance. *Toxicology and applied pharmacology.* (2007) 224: 265–73. [PubMed: 17234229]
- [110]. Lee AH, Fraser ML, Binns CW. Possible role for green tea in ovarian cancer prevention. *Future oncology.* (2005) 1: 771–7. [PubMed: 16556056]
- [111]. Abe I, Seki T, Umehara K, Miyase T, Noguchi H, Sakakibara J, et al. Green tea polyphenols: novel and potent inhibitors of squalene epoxidase. *Biochem*

- Biophys Res Commun. (2000) 268: 767–71. [PubMed: 10679280]
- [112]. Srivastava RK, Kurzrock R, Shankar S. MS-275 sensitizes TRAIL-resistant Breast cancer cells, inhibits angiogenesis and metastasis, and reverses epithelial-mesenchymal transition in vivo. *Molecular cancer therapeutics*. (2010) 9 : 3254–66. [PubMed: 21041383]
- [113]. Shankar S, Chen Q, Srivastava RK. Inhibition of PI3K/AKT and MEK/ERK pathways act synergistically to enhance antiangiogenic effects of EGCG through activation of FOXO transcription factor. *J Mol Signal*. (2008) 3:7. [PubMed: 18355401]
- [114]. Brahma N. Singh a, Sharmila Shankar b, Rakesh K. Srivastava. Green tea catechin, epigallocatechin-3-gallate (EGCG): Mechanisms, perspectives and clinical applications. *Biochemical Pharmacology*. (2011) 82 : 1807–1821
- [115]. Bartholome A, Kampkotter A, Tanner S, Sies H, Klotz LO. Epigallocatechin-gallate induced modulation of FoxO signaling in mammalian cells and *C. elegans*: FoxO stimulation is masked via PI3K/Akt activation by hydrogen peroxide formed in cell culture. *Arch Biochem Biophys* (2010) 501:58–64.
- [116]. Reiter CE, Kim JA, Quon MJ. Green tea polyphenol epigallocatechin gallate Reduces endothelin-1 expression and secretion in vascular endothelial cells: roles for AMP- activated protein kinase, Akt, and FOXO1. *Endocrinology* (2010)151:103–14.
- [117]. Croce CM, Calin GA. miRNAs, cancer, and stem cell division. *Cell* (2005) 122: 6–7.
- [118]. Tsang WP, Kwok TT. Epigallocatechin gallate up-regulation of miR-16 and Induction of apoptosis in human cancer cells. *J Nutr Biochem* (2010) 21: 140–6.
- [119]. Rusak G., Komes D., Likic S., Horzic D. et Kovac M. « Phenolic content and antioxidative capacity of green and white tea extracts depending on extraction conditions and the solvent used ». *Food Chemistry*. (2008) 110 : 852 – 858.

- [120]. Ramirez-Mares M., Chandra S. et Gonzalez de Mejia E. « *In vitro* Chemopreventive activity of *Camellia sinensis*, *Ilex paraguariensis* and *Ardisia compressa* tea extracts and selected polyphenols ». *Mutation Research*. (2004) 554 : 53 – 65.
- [121]. Peng Z., Xu Z., Wen W. et Wang R. « Tea polyphenols protect against irradiation-induced injury in submandibular glands' cells : A preliminary study ». *Archives for oral biology*. (2011) 56 : 738 – 743.
- [122]. Islam M. et Ebihara M. « Elemental characterization of Japanese green tea b leaves and tea infusion residue by neutron-induced prompt and delayed gamma-ray analysis ». *Arabian Journal of Chemistry*. (2017) 10 (1) : S677-S682.
- [123]. Lucchesi. Extraction Sans Solvant Assistée par Micro-ondes. Conception et Application à l'extraction des huiles essentielles. (2005) p 17- 52.
- [124]. Boutekdjiret C., Belabbes R., Bentahar F., Bessière J. M., et Rezzoug S. A. Isolation of rosemary oils by different processes. *J. Essent. Oil Res.* (2004) 16 : 195–199.
- [125]. Wijesekara R.O.B., Ratnatunga C.M., Durbeck K. The distillation of essential oils. *Manufacturing and plant Construction Handbook*. (1997) Eschborn, Federal Republic of Germany, Protrade, Department of foodstuffs & Agriculturak Products.
- [126]. Richter B. E., Jones B. A., Ezzell J.L., Porter N.L., Avadovic N., Pohl C. Accelerated solvent extraction : a technique for sample preparation. *Analytical Chemistry*. (1996) 68 (6) : 1033-1039.
- [127]. Anizon J-Y., Lemaire B., Surbled M. Extraction assistée par micro-ondes. *Téchniques de l'ingénieur*. (2003) Réf : F3060 v1.
www.techniques-ingenieur.fr

- [128]. Kim W.J., Kim J.D., Kim J., Oh S.G., Lee Y.W. Selective caffeine Removal from green tea using supercritical carbon dioxide extraction. *Journal of Food Engineering*. (2008) 89 (3) : 303-309.
- [129]. Bnaissi Karima. Le CO₂ supercritique appliqué à l'extraction végétale. *Techniques de l'ingénieur*. (2013) Réf : CHV4015 v1.
www.techniques-ingenieur.fr
- [130]. Pétrier, C., Gondrexon N., Boldo P. Ultrasons et sonochimie. *Techniques de l'ingénieur*. (2008) AF6310. 1-14.
- [131]. Veillet S., Tomao V., Chemat F. Ultrasound Assisted Extraction of aromas and Antioxydants. (2009). *Handbook New Delhi Inde*.
- [132]. Chemat F. Eco-extraction du végétal Procédés innovants et solvants alternatifs. *Collection Technique et Ingénierie*. Dunod. (2011), 90-118.
- [133]. Chemat F., Tomao V., Virot M. Ultrasound-assisted extraction in food analysis. *Handbook of Food analysis Instruments*. (2008) p : 85-103.
- [134]. Almajano M., Carbo R., Jiménez J. et Gordon M. « Antioxidant and antimicrobial activities of tea infusions ». *Food Chemistry*. (2008) 108 : 55 – 63.
- [135]. Kessemi N., " Relation entre un insecte phytophage et sa principale plante hôte : cas de la bruche du haricot (*Acanthoscelides obtectus*), (*Coleoptera Bruchidae*) ». (2006) Thèse de Magistère de l'université Abou Bakr Belkaid de Tlemcen.
- [136] Miliauskas. G., Venskutonis P.R., et Van Beek T.A., " Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extract". *Food chemistry*., (2004) **85** : 231-237.
- [137]. Kumaran A., et karunakaran R.J., « Antioxidant and free radical scavenging activity of an aqueous extract of *Coleus aromaticus*". *Food chemistry*., (2006) **97** : 109-114.
- [138]. Molyneux P. The use of the stable free radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarinn. Journal of Science and*

- Technology*. (2004) **26**(2): 211-219.
- [139]. Benzie I. et Strain J. « The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay ». *Analytical Biochemistry*. (1996) **239** : 70 - 76.
- [140]. Roginsky V. et Lissi E. « Review of methods to determine chain-breaking Antioxidant activity in food ». *Food Chemistry*. (2005) **92** : 235 - 254.
- [141]. Oyaizu M. « Studies on products of browning reactions: antioxidative activities Of browning products of browning reaction prepared from glucosamine ». *Japan Journal of Nutrition*. (1986) **307** : 15 – 44.
- [142]. Nakayama M., Shimatani K., Ozawa T., Shigemune N., Tsugukuni T., Tomiyama D., Kurahachi M., Nonaka A. & Miyamoto T. A study of the antibacterial mechanism of catechins: Isolation and identification of Escherichia coli cell surface proteins that interact with epigallocatechin gallate. *Food Control*. (2013) **33** : 433 - 439.
- [143]. Ponce A.G., Fritz R.R, Del Valle C.E., Roura S.L. Antimicrobial activity of Essential oils on native microbial population of organic Swiss Chard. *Food Science and Technology* (2003), **36** (7): 679-684.
- [144]. Anonyme 1. Pharmacopée Européenne. (2008).
- [145]. Schmidt M., Schmitz H., Baumgart A., Guédon D., Netsch M., Kreuter M., Schmidlin C. et Schrenk D. « Toxicity of green tea extracts and their constituents in rat hepatocytes in primary culture ». *Food and Chemical Toxicology*. (2005) **43** : 307 – 314.
- [146]. Hsu Y., Tsai C., Chen W., Huang C. et Yen C. « A subacute toxicity evaluation Of green tea (*Camellia sinensis*) extract in mice ». *Food and Chemical Toxicology*. (2011) **49** : 2624 – 2630.

- [147]. Lopez Varela S., Sánchez-Muniz FJ., Cuesta C. Decreased food efficiency ratio, growth retardation and changes in liver fatty acid composition in rats consuming thermally oxidized and polymerized sunflower oil used for frying. [Food and Chemical Toxicology](#). (1995) 33(3) : 181-189.
- [148]. Charles C. Allain, Lucy S. Poon, Cicely S. G. Chan, W. Richmond, Paul C. Fu. Enzymatic Determination of Total Serum Cholesterol. *Clinical chemistry*. (1974) **20** (4) : 470-475
- [149]. Buccolo G., David M. Estimation of lipids by enzymatic method. *Clin Chim Acta*. (1973) vol.19. p 476
- [150]. Canal, J., Delattre, J., & Girard, M. L. Acquisitions nouvelles dans le dosage des lipides totaux de serum: description d'une methode nephelometrique.1. Technique manuelle. *Ann. Biol. Clin*, (1972) 30, 325-332.
- [151]. Martodja R., Martodja M. Initiation aux Techniques de l'histologie Animale. (1967). Ed. Masson et CIE. <https://www.chapitre.com/BOOK/martodja-r-martodja-m/initiation-aux-techniques-de-l-histologie-animale,55740127.aspx>
- [152]. Yagi K. Simple fluorimetric essay for lipoperoxide in blood plasma. *Biochem. Med.* (1976) Vol. **15**: 212-216.
- [153]. Weckbercker G., Cory J.G. Ribonucleotide reductase activity and growth of glutathione-depleted mouse leukemia L1210 cells in vitro. *Cancer Letters*. (1988) Vol. **40**(3): 257- 264.
- [154]. Flohé L., Gunzler WA. Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol*. (1984) Vol. **105**: 114-121.
- [155]. Diepvens K., Kovacs E., Vogels N. et Westerterp-Plantenga M. « Metabolic effects of green tea and of phases of weight loss ». *Physiology & Behavior*. (2006) **87** :185 – 191.
- [156]. Derbré S. Tour d'horizon des compléments alimentaires à base de plantes. *Actualités pharmaceutiques*. (2010) **496** : 20 – 31.
- [157]. Willebrords, Joost, Isabel Veloso Alves Pereira, Michaël Maes, Sara Crespo Yanguas, Isabelle Colle, Bert Van Den Bossche, Tereza Cristina Da Silva.

- «Strategies, models and biomarkers in experimental non-alcoholic fatty liver disease research ». *Progress in Lipid Research*. (2015) 59 : 106-25.
doi:10.1016/j.plipres.2015.05.002.
- [158]. Fautrel, A., Chesné, C., Guillouzo, A., de Sousa, G., Placidi, M., Rahmani, R., Braut, F., Pichon, J., Hoellinger, H., Vintézou, P., Diarte, I., Melcion, C., Cordier, A., Lorenzon, G., Benicourt, M., Vannier, B., Fournex, R., Peloux, A.F., Bichet, N., Gouy, D., Cano, J.P., Lounes, R. A multicentre study of acute in vitro cytotoxicity in rat liver cells. *Toxicol. In Vitro*. (1991) **5** : 543–547.
doi:10.1016/0887-2333(91)90090-Z
- [159]. Peyre, L., de Sousa, G., Barcellini-Couget, S., Luzy, A.-P., Zucchini-Pascal, N., Rahmani, R., High-content screening imaging and real-time cellular impedance monitoring for the assessment of chemical's bio-activation with regards hepatotoxicity. *Toxicol. Vitro Int. J. Publ. Assoc. BIBRA* (2015) **29** : 1916–1931.
doi:10.1016/j.tiv.2015.07.024
- [160]. Zhao Y.X., L., Yu-bing, L., Feng, Z., Wei-fa, Aqueous Two- phase Systems With Ultrasonic Extraction Used for Extracting Phenolic Compounds from *Inonotus obliquus*, Chinese Herbal Medicines. (2013) **5**(1) : 67-72.
- [161]. Sajilata M.G., Poonam R.B., Singhal R.S., "Tea polyphenols as nutraceuticals". *Comprehensive reviews in food science and food safety*". (2008). Vol 7 p 229-254.
- [162]. Gervaise Y., "Analyse des antioxydants naturels dans les matières première et les produits » (2004). Euroforum, paris. WWW.sgs-multilab.com
- [163]. Brewer M.S., "naturel antioxidant : Source, compounds mechanisms of action, And potential application. Dept of food science and human nutrition", (2011), 202 ABL, 1302 W. Univ, of Illinois, urbana USA.
- [164]. Hu, Q.H., Jiang, M. et Zhu, J.C., Research on technology of extraction of tea Caffeine and polyphenols. *Nat. Prod. Res. Dev. China*. (1997) Vol. 9, 63–66.
- [165]. Yang C.S. & Hong J. Prevention of chronic diseases by tea: possible

- mechanisms and human relevance. *Annu Rev Nutr.* (2013) **33**: 161–242.
- [166]. Wu K.M., Ghantous H., Birnkrant D.B. Current regulatory toxicology perspectives on the development of herbal medicines to prescription drug products in United States, *Food Chem. Toxicol.* (2008) **46** : 2606– 2610.
- [167]. Tantoush Z., Apostolovic D., Kravic B., Prodic I., Mihajlovic L., Stanic-Vucinic D. et Velickovic T. « Green tea catechins of food supplements facilitate pepsin digestion of major food allergens, but hampers their digestion if oxidized by phenol oxidase ». *Journal of Functional Foods.* (2012) 4 : 650 – 660.
- [168]. Wijngaard H., Hossain M.B., Rai D.K., Brunton N. Techniques to extract Bioactive compounds from food by-products of plant origin, *Food Research International.* (2012) 46 : 505–513.
- [169]. Sanchez-Muniz F.J, Cava F, Viejo J.M, Batisda S, Higon E, Marces A. Olive oil Fried sardines in the prevention of dietary hypercholesterolemia in rats. Effect on some serum lipids and cell damage marker enzymes. *Nutr. Res.* (1996) 16 (1) : 111-121.
- [170]. Holloway D.E., Rivers J.M.. Influence of chronic ingestion ascorbic acid intake on bile acide metabolisme and bile composition in the guinea pigs. *J. Nutr.* (1981) 112 : 416- 425.
- [171]. Naowaboot J, Pannangpetch P, Kukongviriyapon V, Kongyinyoes B, Kukongviriyapon U. Antihyperglycemic, antioxydant and antiglycation activities of mulberry leaf ewtract in streptozotocin-induced chronic diabetic rats. *Plant Food for Human Nutrition.* (2009) 64, 116-12.
- [172]. Yuan Y, Saint-Kitts. Dietetique (n-3) gras et en cholesterol alter enzymes antioxydantes des tissus et la susceptibilité à l'oxydation chez les rats SHR et WKY. *J.Nutr.* (2003) 133, 679-688
- [173]. Lin S., Liu E. et Mau J.. « Effect of different brewing methods on antioxidant properties of steaming green tea » *LWT - Food Science and Technology.* (2008) 41 : 1616 - 1623.
- [174]. Shen C., Smith B., Lo D., Chyu M., Dunn D., Chen C. & Kwun I. Dietary polyphenols and mechanisms of osteoarthritis». *Journal of Nutritional Biochemistry.* (2012) 23 : 1367 – 1377.
- [175]. Bogdanski P., Suliburska J., Szulinska M., Stepien M., Pupek-Musialik D. & Jablecka A. Green tea extract reduces blood pressure, inflammatory biomarkers, and oxidative stress and improves parameters associated with insulin resistance in obese, hypertensive patients. *Nutrition Research.* (2012) 32 : 421 – 427.
- [176]. Pincemail J., Degrune F., Voussure S., Malherbe C., Paquot N. et Defraigne J.

- « Effet d'une alimentation riche en fruits et légumes sur les taux plasmatiques en antioxydants et des marqueurs des dommages oxydatifs ». *Nutrition clinique et métabolisme*. (2007) n° : 21. pp : 66 – 75.
- [177]. Oak M., El Bedoui J. et Schini-Kerth V. « Antiangiogenic properties of natural polyphenols from red wine and green tea ». *Journal of Nutritional Biochemistry*. (2005) 16 : 1 – 8.
- [178]. Krook M. et Hagerman A.. « Stability of polyphenols epigallocatechin gallate and pentagalloyl glucose in a simulated digestive system ». *Food Research International*. (2012) 49 : 112 – 116.
- [179]. Gil D., Falé P., Serralheiro M. et Rebelo M. « Herbal infusions bioelectrochemical polyphenolic index: Green tea – The gallic acid interference ». *Food Chemistry*. (2011) 129 : 1537 – 1543.
- [180]. Wang Y., Huang S., Shao S., Qian L. et Xu P. « Studies on bioactivities of tea (*Camellia sinensis* L.) fruit peel extracts: Antioxidant activity and inhibitory Potential against -glucosidase and α -amylase *in-vitro* ». *Industrial Crops and Products*. (2012) 37 : 520 – 526.
- [181]. Pirker K., Baratto M., Basosi R. et Goodman B. « Influence of pH on the speciation of copper (II) in reactions with the green tea polyphenols, epigallocatechin gallate and gallic acid ». *Journal of Inorganic Biochemistry*. (2012) 112 : 10 – 16.
- [182]. Li B., Jin Y., Xu Y., Wu Y., Xu J. et Tu Y. « Safety evaluation of tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) flower extract: Assessment of mutagenicity, and acute and subchronic toxicity in rats ». *Journal of Ethnopharmacology*. (2011) 133 : 583 – 590.
- [183]. Kapetanovic I., Crowell J., Krishnaraj R., Zakharov A., Lindeblad M. et Lyubimov A. « Exposure and toxicity of green tea polyphenols in fasted and non-fasted dogs ». *Toxicology*. (2009) 260 : 28 – 36.
- [184]. Shim S., Yoo S., Ra C., Kim Y., Chung J. et Lee S. (2012) « Digestive stability and absorption of green tea polyphenols: Influence of acid and xylitol addition ». *Food Research International*. (2012) 45 : 204 – 210.
- [185]. Rodrigo R., Miranda A. et Vergara L. « Modulation of endogenous antioxidant system by wine polyphenols in human disease ». *Clinica Chimica Acta*. (2011) 412 : 410 – 424.
- [186]. Lu C. et Hwang L. « Polyphenol contents of Pu-Erh teas and their abilities to inhibit cholesterol biosynthesis in Hep G2 cell line ». *Food Chemistry*. (2008) 111: 67 – 71.
- [187]. Sundaram R., Naresh R., Shanthy P. et Sachdanandam P. « Modulatory effect of green tea extract on hepatic key enzymes of glucose metabolism in streptozotocin and high fat diet induced diabetic rats ». *Phytomedicine*. (2013)

- [188]. Kumazoe M., Yamashita M., Nakamura Y., Takamatsu K., Bae J., Yamashita S., Yamada S., Onda H., Nojiri T., Kangawa K. & Tachibana H. Green Tea Polyphenol EGCG Upregulates Tollip Expression by Suppressing Elf-1 Expression. *J Immunol*, (2017) 199 (9): 3261-3269. DOI : <https://doi.org/10.4049/jimmunol.16.01822>
- [189]. Bansal S., Choudhary S., Sharma M., Kumar S., Lohan S., Bhardwaj V., Syan N. et Jyoti S. « Tea: A native source of antimicrobial agents ». *Food Research International*. (2013) 53 (2) : 568-584.
- [190]. Yi S., Zhu J., Fu L. et Li J. « Tea polyphenols inhibit *Pseudomonas aeruginosa* through damage to the cell membrane ». *International Journal of Food Microbiology*. (2010) 144 : 111 - 117.
- [191]. Cui Y., Oh Y., Lim J., Youn M., Lee I., Pak H., Park W., Jo W. et Park S. « AFM study of the differential inhibitory effects of the green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate (EGCG) against Gram-positive and Gram-negative bacteria ». *Food Microbiology*.. (2012) 29: 80 - 87.
- [192]. Axling, U., Olsson, C., Xu, J., Fernandez, C., Larsson, S., Ström, K., Ahrné, S., Holm, C., Molin, G., Berger, K., Green tea powder and *Lactobacillus plantarum* affect gut microbiota, lipid metabolism and inflammation in high-fat fed C57BL/6J mice. *Nutr. Metab.* (2012) 9, 105. doi:10.1186/1743-7075-9-105
- [193]. Goto, T., Saito, Y., Morikawa, K., Kanamaru, Y., Nagaoka, S. Epigallocatechin gallate changes mRNA expression level of genes involved in cholesterol metabolism in hepatocytes. *Br. J. Nutr.* (2012) 107 : 769–773.
doi:10.1017/S0007114511003758
- [194]. Kim, J.J.Y., Tan, Y., Xiao, L., Sun, Y.-L., Qu, X. Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate enhance glycogen synthesis and inhibit lipogenesis in hepatocytes. *BioMed Res. Int.* (2013), 920128. doi:10.1155/2013/920128
- [195]. Park, H.J., Lee, J.-Y., Chung, M.-Y., Park, Y.-K., Bower, A.M., Koo, S.I., Giardina, C., Bruno, R.S. Green tea extract suppresses NF_̢ activation and inflammatory responses in diet-induced obese rats with nonalcoholic steatohepatitis. *J. Nutr.* (2012) 142 : 57-63. doi:10.3945/jn.111.148544
- [196]. Forbes-Hernández, T.Y., Giampieri, F., Gasparrini, M., Mazzoni, L., Quiles, J.L., Alvarez-Suarez, J.M., Battino, M. The effects of bioactive compounds from plant foods On mitochondrial function: A focus on apoptotic mechanisms. *Food Chem. Toxicol.* (2014) 68, 154–182. doi:10.1016/j.fct.2014.03.017

LISTE DES ABRÉVIATIONS

BHT : hydroxytoluène butylé

°C : degré Celsius

EC : Épicatéchine

EGC : Épigallocatechine

ECG : Épicatéchine gallate

EGCG: Épigallocatechine gallate

g : Gramme

GPx : Glutathion peroxydase

GSH : Glutathion réduit

GSSH : Glutathion oxydé

HPLC-DAD : Chromatographie en phase liquide à haute performance- détecteurs à barettes de diodes

ISO : International Standards Organisation.

IV : Intraveineuse

LC-MS : Chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse

MAE : Extraction par agitation mécanique

MDA : Malondialdéhyde

mL : millilitre

min : minute

µg : Microgramme

OMS : Organisation Mondiale de la santé.

Prot : Protéine

ROS : Espèces réactives de l'oxygène

S : Seconde

SD : succinate déshydrogénase

SOD: Super-oxyde dismutase

TG : Triglycéride

UFC : Unité Formant Clonie

UI : Unité international

UE : Extraction ultrasonique

UV: ultra-violet

APPENDICES

-1-

1. Appareillage

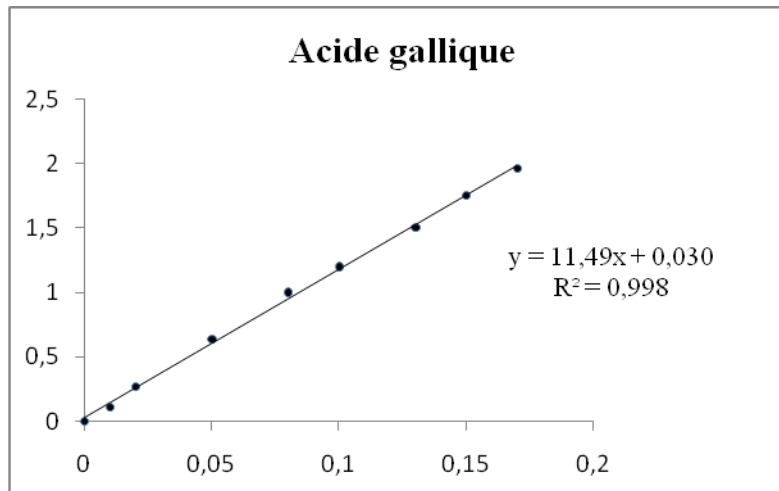
- HPLC (Termo Finnigan),
DéTECTEUR UV (Termo Finnigan UV100) ;
Colonne C8 150x4.6mm 3µ Hypersil® BDS C8;
Débit 0.4ml/mn;
Phase mobile 30 méthanol (HCOH): 70 eau distillé (H2O) ;
Volume d'injection 20 µl
- Centrifugeuse (SIGMA®)
- LC-MS, Agilent 1100 series HPLC, Mass detection was performed on ESI esquire HCT (ion trap BRUKER daltonics Germany) couple au système de chromatographic; Column EC/3 NUCLEODUR 100-3 C18 ec (MACHEREY-NAGEL Germany)
- Ultrason (CPX750, 750w, 20kHz, Julabo Cole Parmer ultrasonic processor, Germany)
- Lyophilisateur type CHRIST Gamma 2-16 LSCplus.
- HPLC-DAD, équipé de diode array detector (DAD) (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Colonne Halo C18 column (4.6 x 75 mm, 2.7µm) (advanced materials technology, USA)
- Spectrophotomètre (Termo Electron corporation)
- Spectrophotomètre d'absorption moléculaire de type SHIMATZU
- Microscope optique Leica
- Photo-microscope Leica
- Microscopie à fluorescence ArrayScan™ High-Content Systems (HCS)
- Agitateur magnétique + plaque chauffante (Wesestir® MSH-200D)
- Etuve (Mettler)
- plaques XCelligence

- Four pasteur (Memmert)
- Autoclave (Nuve/OT4060)
- Bain marie (Memmert ; Clifton Boiling BATN)
- Balance analytique (Sartorius cp324-OCE)
- Haute microbiologique

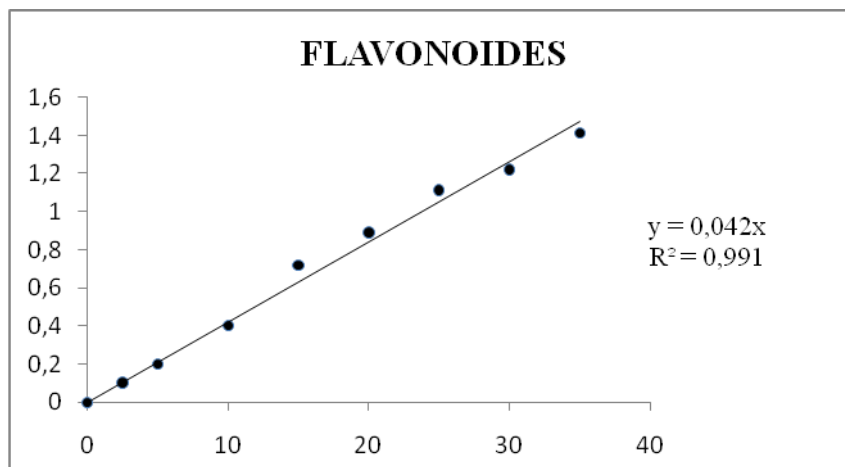
2. Réactifs et milieux de cultures

- Le réactif MitoSOX™ Rouge
- Le Hoechst 33342 (marqueur fluorescent bleu)
- Folin ciolcalteu
- DPPH (1,1-diphényl-picryl-2-hydrazyl)
- AlCl₃ (trichloride d'aluminium)
- carbonate de sodium
- acide gallique
- quercitine
- trichloride d'aluminium
- méthanol 90°
- éthanol 90°
- Alcool éthylique 75°
- Alcool éthylique 90°
- bleu de Comassie
- sabouraud à 1% de glucose et 1% de maltose
- Milieu pour recherche des substances inhibitrices
- Hématoxiline
- Eosine
- Acide chlorhydrique concentré
- Acide acétique
- *t*-BHP

3. Gamme d'étalonnage des polyphénols



4. Gamme d'étalonnage des flavonoïdes



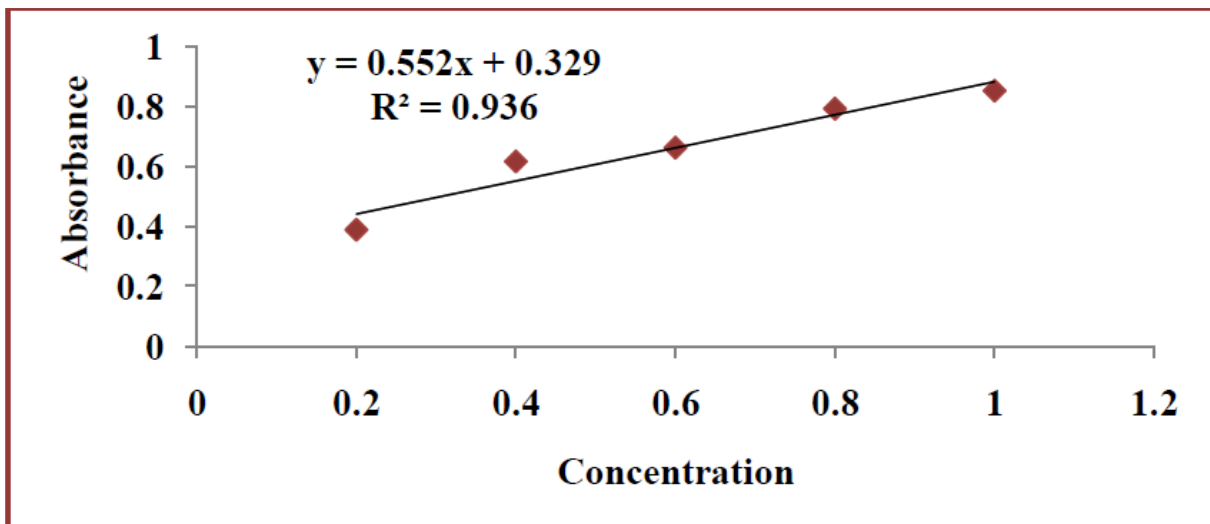
5. Préparation hématoxyline-Eosine

Coloration des coupe histologique du foie de rat apres traitement par les catéchine UE (95°C, 15 min)

Alcool éthylique 75°	1000mL
Acide chlorhydrique concentré	5 mL
Ammoniaque	2 mL
Eosine solution aqueuse	125 mL
Alcool éthylique 90°	125 mL
Acide acétique	2 gouttes
Eau distillé	375 mL

6. Dosage des proteine de foie des rats.

Le dosage est effectué selon la méthode de (BRADFORD., 1976). Courbe d'étalonnage utilisée (BSA 1mg/ml) pour le dosage des protéines tissulaire de foie.



APPENDICES

-2-

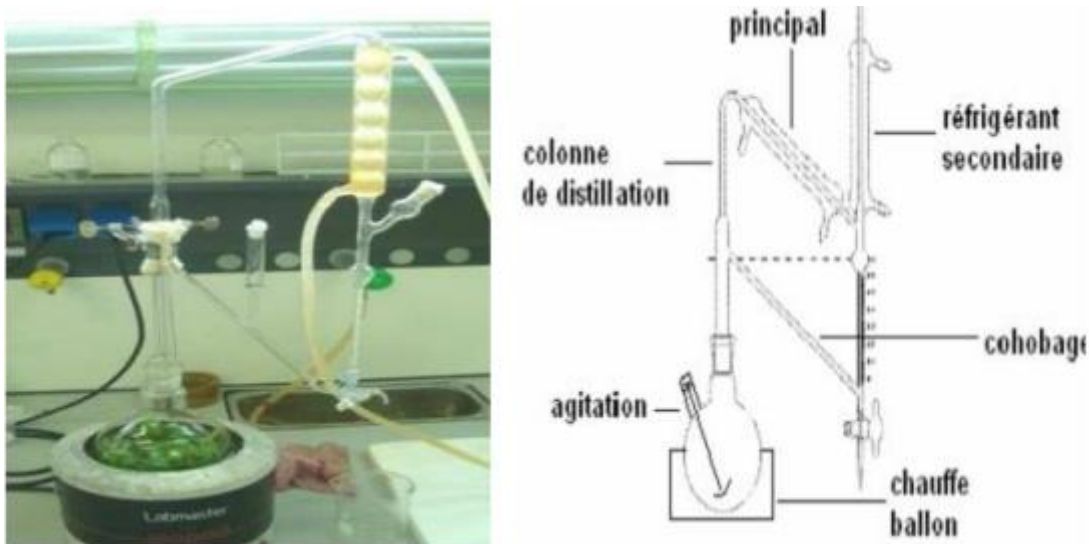


Figure 1 : Le distillateur à la vapeur, ou hydrodistillateur

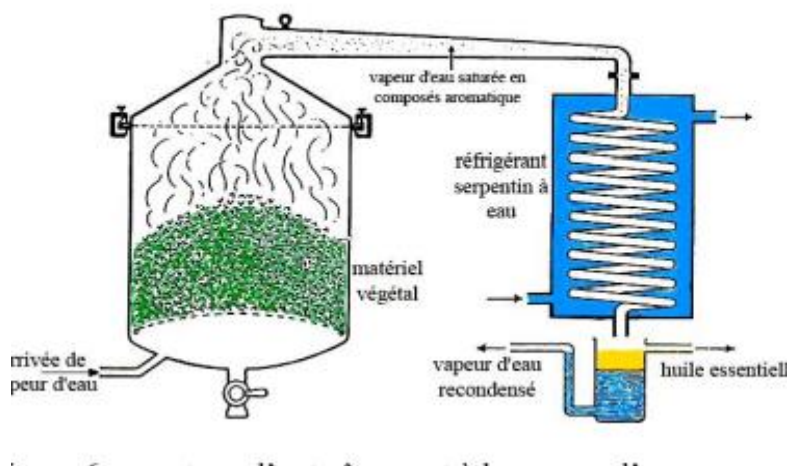


Figure 2 : Le distillateur à la vapeur saturée (Entraînement à la vapeur d'eau)

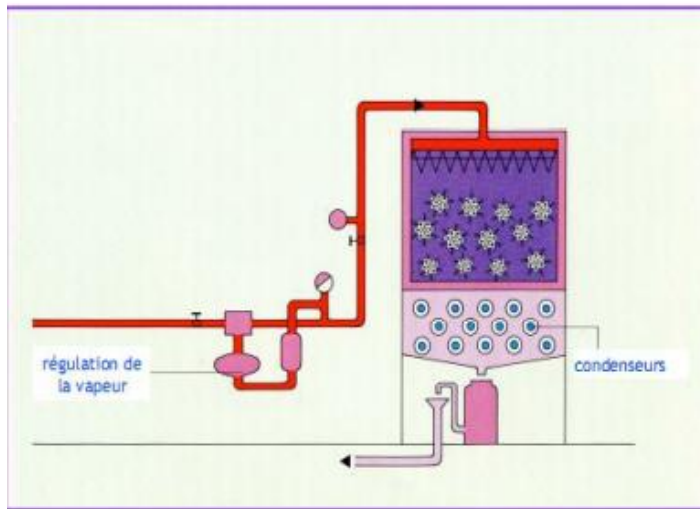
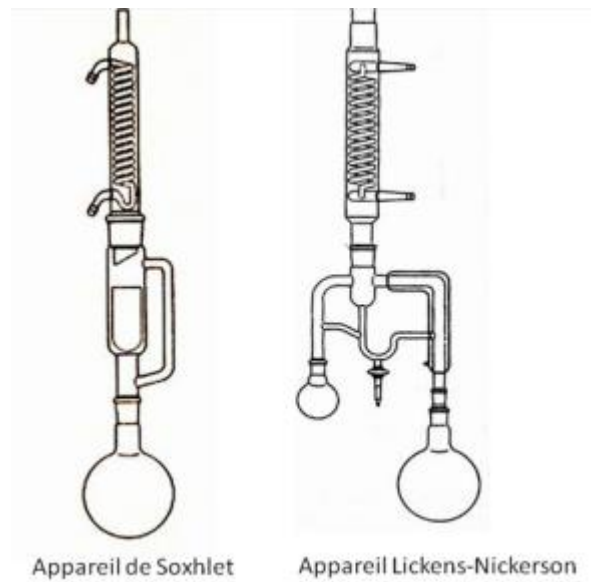


Figure 3 : Hydrodiffuseure



Appareil de Soxhlet

Appareil Lickens-Nickerson

Figure 4 : Le Soxhlet et l'appareil de Lickens-Nickerson

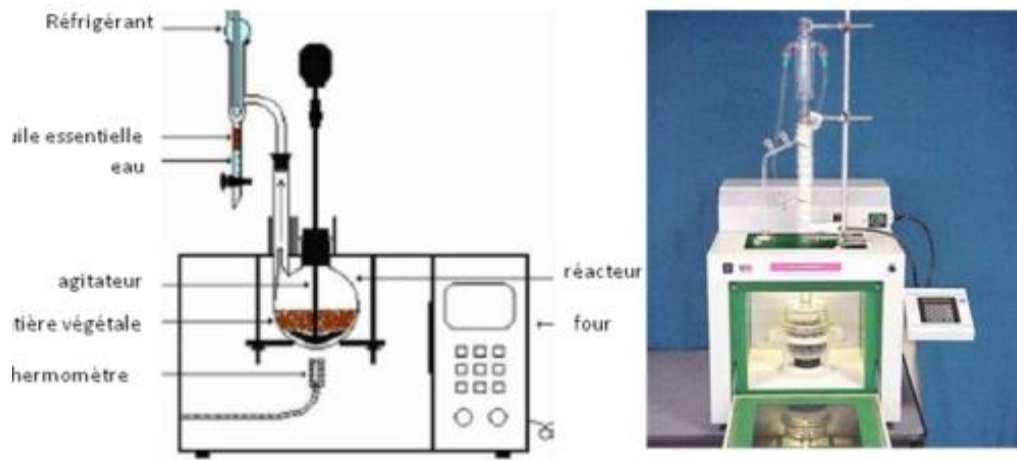


Figure 5 : Micro-ondes

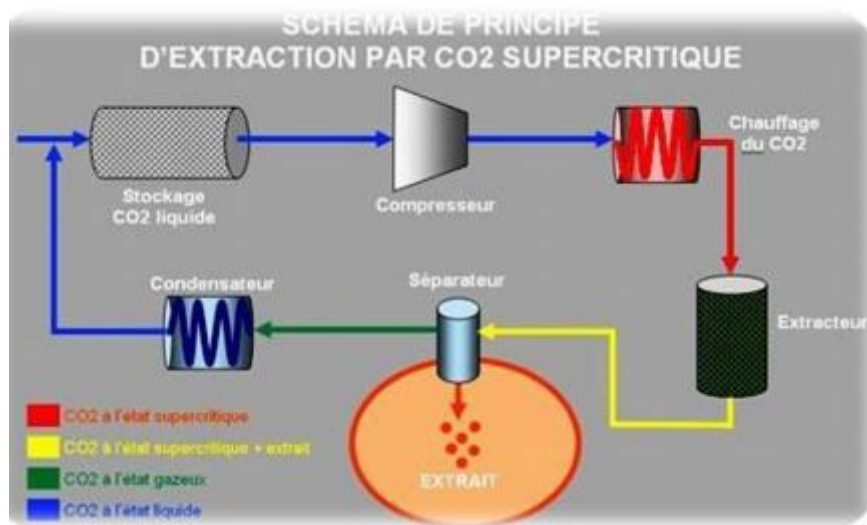


Figure 6 : Principe d'extraction par CO₂ supercritique

APPENDICES

-3-

Tableau 1 : Le poids moyen des lapins traité par des catéchines UE (95°C, 5 min)

Poids moyen des lapins de lot (g)	Lot 1	Lot 2	Lot 3	Lot 4	Lot 5
Poids initial	3702	2587	3025	2344	2343
Poids après 7 jours	3557	2450	2865	2236	2253
Poids après 14 jours	3485	2362	2776	2162	2169
Poids après 21 jours	3389	2257	2798	2073	2163
Poids après 28 jours	3304	2179	2742	2015	2082
Poids après 35 jours	3228	2148	2673	2002	2045
Poids après 42 jours	3156	2118	2591	1999	2024
Poids après 49 jours	3116	2117	2511	2000	2019
Poids après 56 jours	3093	2116	2471	1997	2020
Poids après 63 jours	3091	2116	2467	1999	2018
Poids après 70 jours	3093	2116	2465	1997	2015
Poids après 77 jours	3095	2116	2465	1999	2014
Poids après 84 jours	3092	2116	2463	1998	2010
Poids après 87 jours	3089	2116	2462	1999	2008

Tableau 2 : La moyenne du poids perdus chez les lapins

Perte de poids des lapins (g)	Lot 1	Lot 2	Lot 3	Lot 4	Lot 5
Après 7 jours	145	137	160	108	90
Après 14 jours	72	88	89	74	84
Après 21 jours	96	105	-22	89	6
Après 28 jours	85	78	56	58	81
Après 35 jours	76	31	69	13	37
Après 42 jours	72	30	82	3	21
Après 49 jours	40	1	80	-1	5
Après 56 jours	23	1	40	3	-1
Après 63 jours	2	0	6	-2	2
Après 70 jours	-2	0	0	2	3
Après 77 jours	-2	0	0	-2	1
Après 84 jours	3	0	2	1	4
Après 87 jours	3	0	1	-1	2
Somme des variations du poids	613	471	563	345	335

1. Composition des milieux de culture :

❖ Gélose Muller Hinton :

Hydrolysate acide de caseine (peptone).....	17.5 g
Extrait de bœuf.....	3 g
Amidon	5 g
Agar	17 g
Eau distillée.....	qsp 1000ml.

pH 7.3 ± 0.2

❖ Sabouraud à 1% de glucose et 1% de maltose :

Peptone de caseine	5 g
Peptone de viande	5 g
Glucose D (+)	10 g
Maltose.....	10 g
Agar –agar	15 g
Eau distillée.....	qsp 1000ml

pH 5.4 ± 0.1

Dissoudre 45 g/l, autoclaver 15 mn à 121 °C, ne pas surchauffé. Les boîtes de milieu sont limpide et brunâtre

APPENDICES

-4-

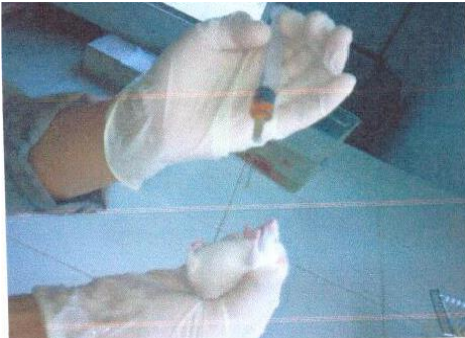


Figure 1: Gavage des polyphénols au rats



Figure 2 : Sacrifice des rats

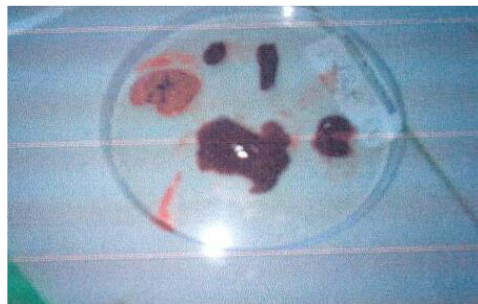


Figure 3 : prélèvement des organes (photos originales)

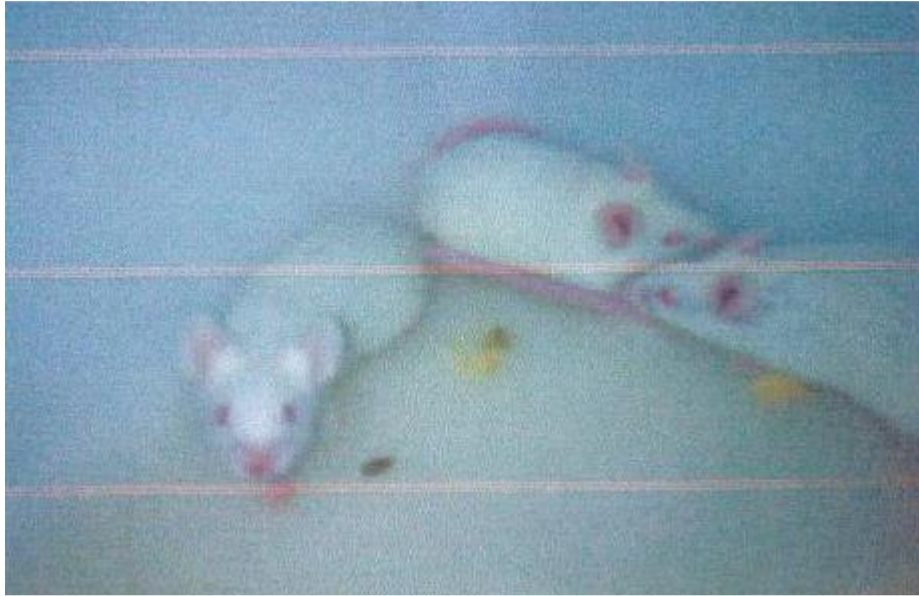


Figure 4 : souris blanche (photo originale)

Valeur non prise en compte car plus de 10% d'écart

Graphique de la droite de standardisation

Graphique représentant l'extinction en fonction de la concentration en lipides totaux

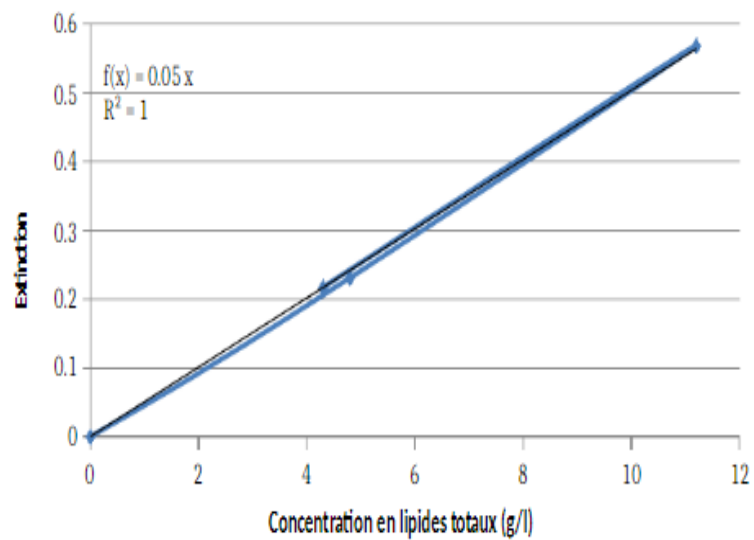
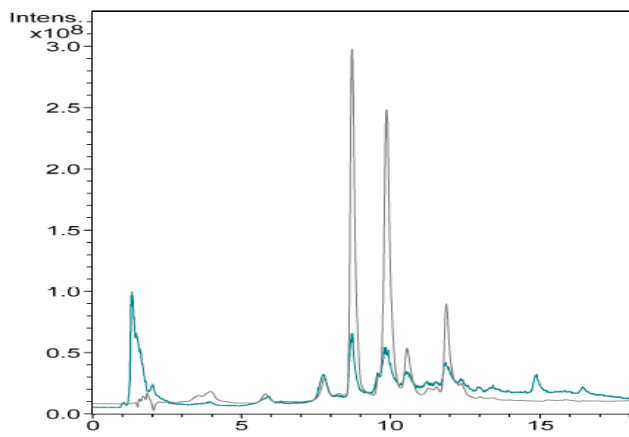
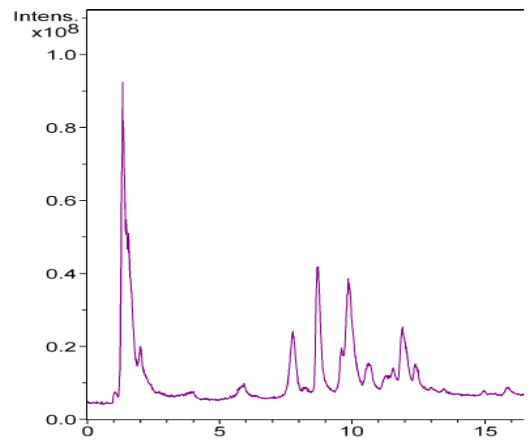


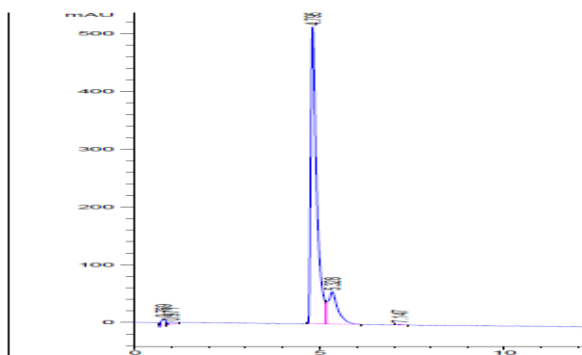
Figure 5 : Graphique de la droite de standardisation



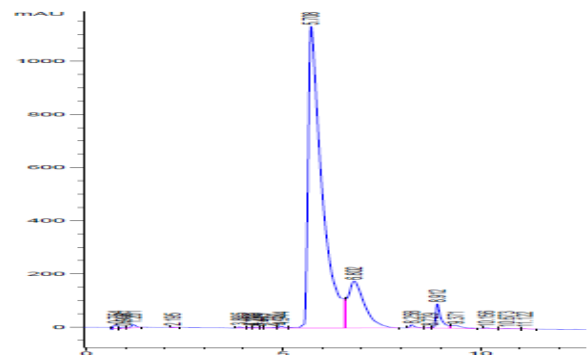
Chromatogramme UE (95°C, 15 min) et MAE



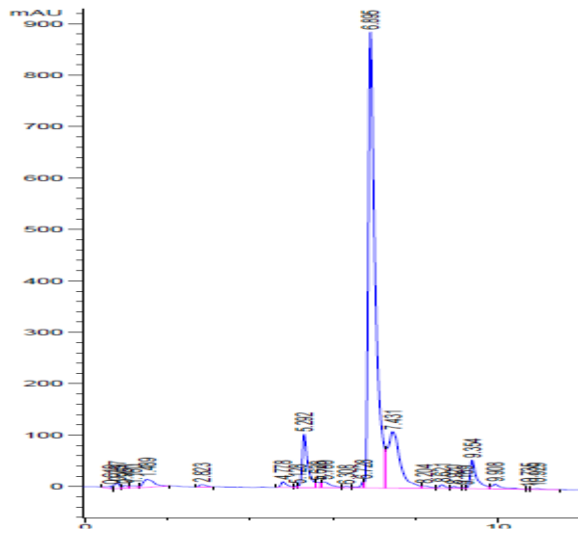
MAE



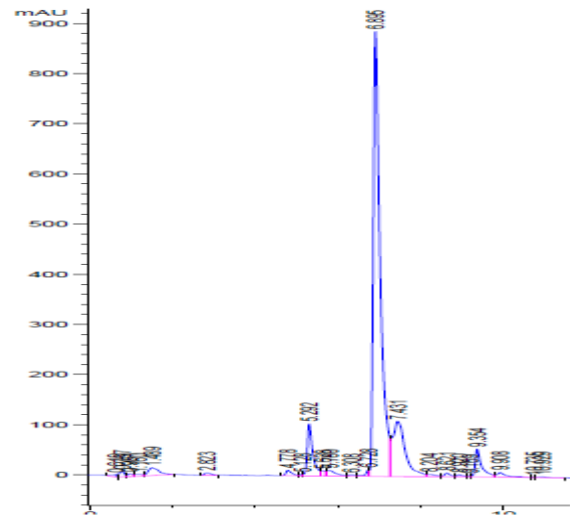
EC (standard)



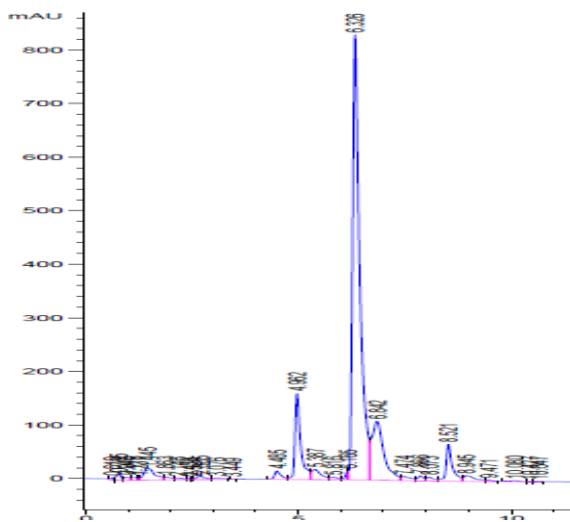
ECG (standard)



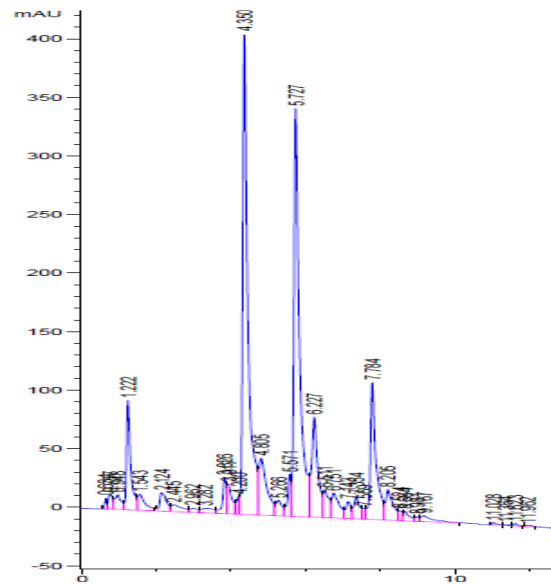
EGCG (standard)



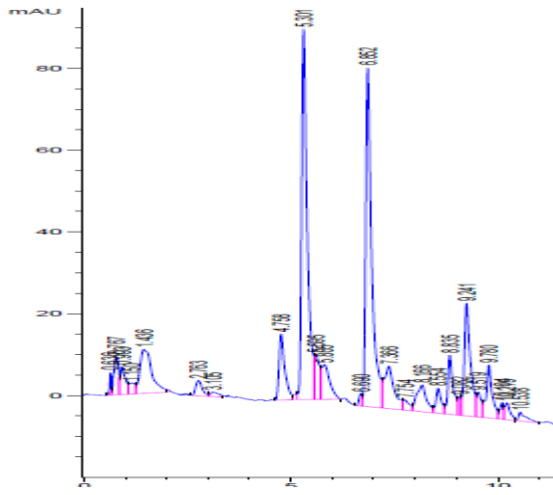
EGC (standard)



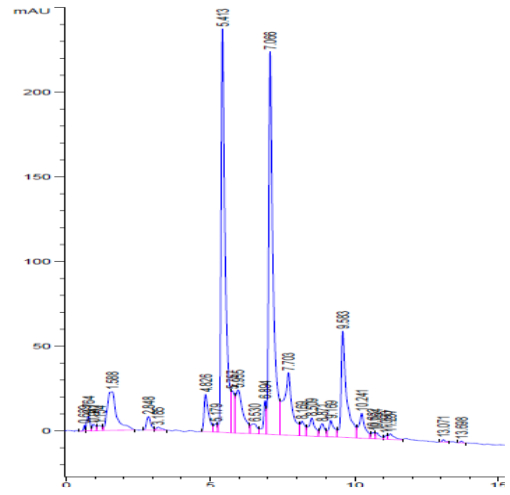
UE (25°C, 5min)



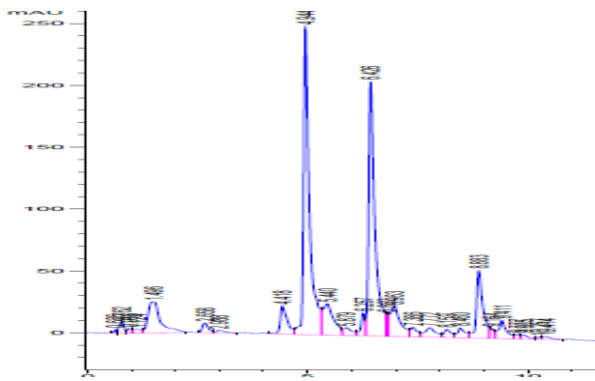
UE (25°C, 15min)



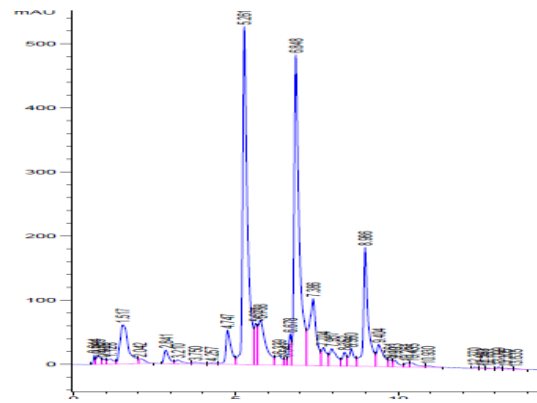
UE (95°C, 5min)



UE (60°C, 10min)



UE (60°C, 15min)



UE (95°C, 10min)