

**UNIVERSITÉ Saad DAHLAB -BLIDA-**

**Faculté des sciences Agrovétérinaires**

Département d'Agronomie

## **MÉMOIRE DE MAGISTER**

En Sciences Agronomiques

Spécialité : Nutrition et Transformation des aliments

**ESSAI DE FABRICATION D'UN ALIMENT, ALICAMENT À BASE  
D'ANTIOXYDANTS NATURELS : POLYPHENOLS**

Par

**Zoheir AMROUCHE**

Devant le jury composé de :

A. BOUTEKRABT	Pr., U. S. D. Blida	Président
D. ELHADI	MCA., U. S. D. Blida	Examineur
A. BADIS	MCA., U. S. D. Blida	Examineur
M. BENCHABANE	MCA., U. S. D. Blida	Examineur
A. BITAM	MCA., U. S. D. Blida	Rapporteur

Blida, Décembre 2011

## ملخص

البوليفينول الكلي المستخرجة : ركزت الدراسة على إعداد غذاء ذو خاصية طبية محضر على أساس من المضادات الأكسدة الطبيعية من الشاي الأخضر.

النتائج التحليلية لهذا المستخلص يتيح لنا التعرف على وجود جزيء يسمى العلاجية حيث سمحت هذه النتائج بتحديد وجود جزيء يدعى إبيغالوكتينين غلاتي بإضافة إلى ذلك أظهرت دراسة للنمو البكتيريا اللبنية مع وجود % حيث فاق HPLC 50 العلاجية بإستعمال مادة البوليفينول الكلي بعدم وجود أي تأثير كايح أو بشكل خاص على البكتيريا اللبنية.

سمحت تجارب الإختبار السمية لمادة البوليفينول على الفئران المخبرية حيث قمنا بتحديد الجرعة إلى 600 مع و الذي يضاف إلى الجبن الطازج.

كشفت نتائج إستقرار المعايير الميكروبيولوجية و الفيزيوكيماوية خلال 28 يوم من التخزين في درجة حرارة +06°م بإستقرار كامل. كذلك بينت نتائج الخواص الحسية للجبن الطازج المضاف إليه 1 ملل من البوليفينول الطبيعي المستخرج من الشاي الأخضر من قبل هيئة التدوق بالرفع.

**الكلمات الرئيسية :** البوليفينول الكلي ، الشاي الأخضر، الجبن الطازج ، إستخراج، غذاء ذو خاصية طبية.

## RESUME

L'étude a porté sur la préparation d'un alicament à base d'un antioxydant naturel : les polyphénols totaux extraits du thé vert.

Les résultats analytiques de cet extrait nous a permis d'identifier la présence de la molécule thérapeutique qu'est L'epigallocatechine gallate révélé par HPLC de l'ordre de 50%.

Par ailleurs, l'étude de la croissance des ferments lactiques en présence d'extrait phénoliques n'a montré aucun effet inhibiteur sur les bactéries lactiques mésophiles.

De plus, le test de toxicité de ces polyphénols sur des souris, nous a permis de situer la dose à 600mg à ajouter au fromage frais.

Enfin, l'addition de cet extrait naturel au fromage frais révèle une stabilité aussi bien microbiologique que physico-chimique durant les 28 jours de stockage à +6°C. Sur le plan organoleptique, l'incorporation des polyphénols totaux du thé vert à une dose de 1ml a été bien acceptée par le jury de dégustation.

Mots clés : Polyphénols totaux, thé vert, extraction, fromage frais, alicament.

## ABSTRACT

Our study is carried en preparation of nutraceutical food containing natural antioxidants: total polyphenols extract from green tea.

Analytical results of this extract allows us to identify the presence of therapeutic molecule so-called Epigallocatechine gallate revealed by HPLC ( Up to 50 %).

However, the presence of total polyphenols extracts from green tea didn't show any effect on lactic mesophiles bacteria's growth. Furthermore, toxicity assay leaded on mices of these polyphenols allowed to fixe 600 mg of polyphenols to add in fresh cheese.

Futhermore, the addition of this naturel extract in fresh cheese reveals a good stability either microbiological or physicochemical criteria during 28 days of storage at +6°C and organoleptic test.

In conclusion, Incorporation of total polyphenols extract from green tea in dose of 1ml is well-accepted by jury of degustation.

**Key – words! : Green tea – extraction-total polyphenols- fresh cheese-nutraceutic .**

## 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 ce mémoire a été favorisée par un homme exceptionnel, Dr. BITAM AREZKI, MCA à l'université Saad DAHLAB de Blida, qui a appris vite le plaisir au travail est un concept réel. Son 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, Mr. BOUTEKRABT A., Pr à l'université Saad DAHLAB de Blida, Mr. EL HADI D., MCA à l'université Saad DAHLAB de Blida, Mr M. BENCHABANE MCA à l'université Saad DAHLAB de Blida et Mr BADIS A, MCA à l'université Saad DAHLAB de Blida, pour leurs efforts, leur contribution et leurs commentaires précieux non seulement dans l'amélioration de mon mémoire, 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. THONART, directeur de laboratoire Agro-biotech université liège-Belgique, qui m'a ouvert une porte de lumière vers la science et la recherche, sans oublier le chercheur Dr NICOLAS pour son aide, et qui a également eu une grande disponibilité pour me faciliter pleins de taches favorisant ainsi la réalisation de mon mémoire.**

**Je remercie chaleureusement Mr. DJEBAÏRIA L., 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 il sait faire preuve. C'est à la fois un privilège et une expérience exceptionnelle d'avoir pu bénéficier de ses conseils.

Je n'oserai guère laisser passé inaperçue une personne qui m'a aidé tout au long de mon stage pratique au LCI, une personne qui n'a cessé une seconde à me faciliter le difficile, pour avoir été là dès qu'il le fallait malgré toutes ses responsabilités, et pour toute aide précieuse je vous remercie infiniment Mr. LAKHAL A. pour tout ce que vous m'avait autant apporté ; mes remerciements au laboratoire de physico-chimie et microbiologie, M<sup>me</sup> HAKIMA et SAMIRA B merci spéciale pour vos aide et vos conseils.

Je tiens à remercier le Directeur contrôle qualité Mr BENKHELATE de la laiterie de Beni Tamou, M<sup>me</sup> BOUARFITINE, qui m'ont toujours aidé activement dans les démarches administratives au sein de la laiterie. Leur intérêt porté au projet, leur humilité et ses connaissances ont été sincèrement très appréciées.

Ensuite, merci à toute l'équipe du laboratoire contrôle qualité de la laiterie de Beni Tamou. Votre générosité et votre sens de l'entraide m'ont beaucoup aidé. Je me dois également remercier très spécialement SAAD R de laboratoire physicochimie et Mr Djellatou Bachir de laboratoire de microbiologie, ainsi que le staff technique, qui savent répondre à nos nombreuses questions avec une telle intelligence et une telle patience!

Je souhaite également remercier Dr. BITAM I chef de service des maladies vectoriel de l'institut Pasteur d'Alger pour son aide précieuse, ses conseils judicieux et avisés relatifs aux analyses de toxicologie, qu'à la méthodologie de travail. Je le remercie également pour sa gentillesse et sa disponibilité lors des essais.

Je remercie mes enseignants de magister et en plus particulièrement Dr BENHADJA L, Dr DOUMANDJI et Dr ZAFOUR

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

## Dédicace

*Je dédie cet humable 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,*

*Ma grand-mère, et grand père*

*Mes tantes et mes oncles,*

*A mes cousins et cousines,*

*A mes amis : Nassim, Dr Sakhane, Sofiane, Dahmane, bilel.,*

*Zoheir*

# TABLE DES MATIERES

RESUME

REMERCIEMENTS

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ILLUSTRATIONS GRAPHIQUES ET TABLEAUX

<b>INTRODUCTION</b>	16
<b>1. LES ALICAMENTS</b>	19
1.1. Définition	19
1.2. Type d'alicament	20
1.2.1. Les alicaments naturels	20
1.2.2. Alicaments industriels (alicaments artificiels)	20
1.3. Nature des alicaments	20
1.4. Le concept d'alicaments	21
1.5. Fromage frais	22
1.5.1. Définition	22
1.5.2. Réglementation	22
1.5.3. Qualité nutritionnelle de fromage frais	22
1.5.4. Les ferments lactiques	23
1.5.4.1. Action des levains dans la fabrication du fromage	24
1.5.5. Processus de fabrication de l'alicament	25
1.5.5.1. Préparation de la pâte maigre	25
1.5.5.2. Préparation de la crème fraîche	27

<b>2. LE THE</b>	29
2.1. Présentation de <i>Camellia sinensis</i>	29
2.1.1. Historique	29
2.1.2. La culture du thé	31
2.1.2.1. Le théier	31
2.1.2.2. L'habitat	31
2.1.2.3. Le cycle végétal	32
2.1.3. Les procédés de traitement des feuilles de thé	33
2.2. Composition des feuilles de thé	34
2.2.1. La paroi cellulaire	35
2.2.1.1. Les celluloses	35
2.2.1.2. Les hémicelluloses	35
2.2.1.3. Les substances pectiques	35
2.3. Composition chimique des polyphénols du thé	38
2.4. Les vertus thérapeutiques du thé	38
<b>3. LES POLYPHENOLS</b>	40
3.1. La Biosynthèse	41
3.2. Classification	41
3.3. Les flavan-3-ols du thé	43
3.4. Les composés issus de l'oxydation des flavan-3-ols	44
3.5. Les alcaloïdes	48
3.6. Les composés volatils et les anions organiques	48
3.7. Techniques d'analyses	49
3.8. Les effets bénéfiques de l'epigallocatechine gallate (EGCG)	50
3.8.1. Effet protecteur contre le cancer	50
3.8.2. Préserve les cellules cérébrales	50
3.8.3. Prévient l'obésité et le diabète	51
3.8.4. Protège le système cardiovasculaire	51

3.9. Caractéristiques gustatives des polyphénols	52
3.9.1. Composés phénoliques simples	52
3.9.1.1. Amertume	53
3.9.1.2. Astringence	54
3.9.2. Influence du milieu	54
3.9.2.1. Effet de l'alcool	54
3.9.2.2. Effet de l'acidité	55
3.9.2.3. Sucres et viscosité	55
3.9.2.4. Phénomène d'interaction	56
<b>4. STRESS OXYDATIF</b>	<b>57</b>
4.1. Définition	57
4.2. Origine du stress	57
4.3. Les radicaux libres	57
4.3.1. Définition	57
4.3.2. Principaux radicaux libres	58
4.3.3. Origine des radicaux libres	58
4.4. Les conséquences du stress oxydant	59
4.5. Les antioxydants	60
4.5.1. Définition	60
4.5.2. Les antioxydants endogènes	61
4.5.3. Les antioxydants naturels	61
<b>5. MATERIEL ET METHODES</b>	<b>65</b>
5.1. Matériel	65
5.1.1. Matériel végétal	65
5.1.2. Matériel biologique	66
5.1.3. Appareillage	66
5.1.4. Réactifs et milieux de cultures	66

5.2. Méthodes d'analyses	66
5.2.1. Méthodes d'analyses de la partie analytique du thé vert	66
5.2.1.1. Dosage de la caféine	66
5.2.1.2. Méthode d'extraction des polyphénols totaux	68
5.2.1.3. Dosage des polyphénols totaux	71
5.2.1.4. Dosage des flavonoïdes	73
5.2.1.5. Méthode d'identification des polyphénols totaux	74
5.2.2. Méthodes des tests biologiques	75
5.2.2.1. Test d'activité antioxydante	75
5.2.2.2. Test d'activité antibactérienne	76
5.2.2.3. Test de toxicité sur model animal	78
5.2.3 Méthode d'étude de la cinétique de croissance des bactéries lactiques	78
5.2.4. Méthodes d'analyses physico-chimiques	79
5.2.4.1. Détermination de la teneur en eau	79
5.2.4.2. Détermination du pH	80
5.2.4.3. Détermination de l'acidité titrable	80
5.2.4.4. Détermination de la densité	81
5.2.4.5. Détermination de la matière grasse	82
5.2.4.6. Détermination d'extrait sec dégraissé (ESD)	83
5.2.4.7. Détermination de la teneur en cendres	83
5.2.4.8. Détermination de l'alcalinité (TA, TAC)	84
5.2.4.8.1. Titre alcalimétrique « TA »	84
5.2.4.8.2. Titre alcalimétrique complet ou « TAC»	85
5.2.4.9. Détermination du titre hydrométrique ou TH de l'eau	86
5.2.4.10. Dosage des chlorures	87

5.2.5. Méthodes d'analyses microbiologiques	89
5.2.5.1. Recherche des Germes Totaux	89
5.2.5.2. Recherche des coliformes totaux et coliformes fécaux	90
5.2.5.3. Recherche et dénombrement des streptocoques fécaux	92
5.2.5.4. Recherche des <i>Staphylococcus aureus</i>	94
5.2.5.5. Recherche et dénombrement des Clostridium sulfitoréducteurs	95
5.2.5.6. Recherche des salmonelles	96
5.2.5.7. Recherche et dénombrement des levures et moisissures	98
5.2.6. Méthodes d'analyses organoleptiques	99
5.3. Méthode de préparation de l'alicament (fromage frais enrichis en polyphénols)	100
<b>6. RESULTATS ET INTERPRETATION</b>	102
6.1. Résultats de la partie analytique du thé vert	102
6.1.1. Dosage de la caféine	102
6.1.2. Le choix de la méthode d'extraction des polyphénols totaux	103
6.1.3. Dosage des polyphénols totaux	104
6.1.4. Identification de la composition des polyphénols totaux	106
6.1.5. Dosage des flavonoïdes	107
6.2. Résultats des tests biologiques	108
6.2.1. Activité antioxydante	108
6.2.2. Tests d'activité antibactérienne	109
6.2.3. Test de toxicité sur modèle animal	110
6.3. Impact des polyphénols totaux sur la cinétique de croissance des bactéries lactiques	110
6.3.1. Cinétique de croissance de <i>Lactobacillus plantarum</i>	111
6.3.2. Cinétique de croissance de <i>Pediococcus acidilactici</i>	113
6.3.3. Cinétique de croissance de <i>Lactobacillus casei</i>	115
6.4. Résultats de la technologie de fabrication de fromage frais	117

6.4.1	Analyses physico-chimiques des matières premières	117
6.4.1.1.	Lait cru	117
6.4.1.2.	Poudre de lait	118
6.4.1.3.	Le thé	119
6.4.1.4.	Eau de process	129
6.4.2	Analyses microbiologiques des matières premières	121
6.4.2.1.	Lait cru	121
6.4.2.2.	Poudre de lait	123
6.4.2.3.	Le thé	123
6.4.2.4.	Eau de process	124
6.4.2.5.	Crème fraîche	125
6.4.3.	Analyses physico-chimiques des matières au cours de processus de Fabrication du fromage frais	126
6.4.3.1.	Lait reconstitué	126
6.4.3.2.	Crème fraîche	127
6.4.3.3.	Caillé maigre	128
6.4.4.	Analyses physico-chimiques de l'alicament au cours de la conservation à 6°C pendant 28 jours	129
6.4.5.	Analyses microbiologiques de l'alicament au cours de la conservation à 6°C pendant 28 jours	131
6.4.6.	Analyses organoleptiques de l'alicament au cours de la conservation à 6°C pendant 28 jours	133
	CONCLUSION GENERALE	136
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	
	APPENDICES	

## LISTE DES ILLUSTRATIONS GRAPHIQUES ET TABLEAUX

### Figures

Figure 2.1 : Répartition des plantations de thé dans le monde	30
Figure 2.2 : Répartition de la production mondiale du thé en 2005	30
Figure 2.3 : Principales étapes du traitement des feuilles de théier après récolte	34
Figure 2.4 : Représentation schématique de la structure d'une macromolécule	
Pectique	37
Figure 3.1 : Structure de la flavone	42
Figure 3.2 : Première étape de l'oxydation des flavan-3-ols par la polyphénoloxydase et exemple dans le cas de l'EGC	44
Figure 3.3 : Mécanisme de passage de l'orthoquinone aux théaflavines	45
Figure 3.4 : Les théaflavines	46
Figure 3.5 : Passage des orthoquinones aux théasinensines	46
Figure 3.6 : Groupements chromophores susceptibles de se former au sein des Théarubigines	47
Figure 3.7 : Structure de la caféine, la théobromine et la théophylline	48
Figure 5.1 : Thé vert ( <i>Camellia sinensis</i> )	65
Figure 5.2 : Extraction des polyphénols du thé par l'eau	68
Figure 5.3 : Diagramme d'extraction des polyphénols du thé par solvant organique à température ambiante	69
Figure 5.4 : Diagramme d'extraction des polyphénols du thé vert par reflux de Chaleur	70
Figure 5.5 : Extraction des polyphénols du thé vert par ultra-son	71
Figure 5.6 : L'acide gallique (Acide 3,4,5 hydroxybenzoïque)	72
Figure 5.7 : Forme libre et réduite du DPPH	75
Figure 5.8 : Diagramme de préparation de la crème fraîche	100
Figure 5.9 : Diagramme de fabrication de fromage frais enrichis de polyphénols	101
Figure 6.1 : Rendement en extrait sec du thé vert	103
Figure 6.2 : Identification de la composition des polyphénols du thé vert	106
Figure 6.3 : Courbe de l'activité antioxydante des polyphénols totaux	108
Figure 6.4 : test de toxicité des polyphénols totaux sur souris	110
Figure 6.5 : Courbe de croissance <i>Lactobacillus plantarum</i> en présence de polyphénols totaux du thé vert	112
Figure 6.6 : Courbe de croissance <i>Pediococcus acidilactici</i> en présence de polyphénols totaux du thé vert	114
Figure 6.7 : Courbe de croissance <i>Lactobacillus casei</i> en présence de polyphénols totaux du thé vert	116

## Tableaux

Tableau 1.1 : Composition moyenne du fromage frais pour 100g de produit Frais	23
Tableau 2.1 : Cycle naturel du théier	32
Tableau 2.2 : Composition chimique des polyphénols des feuilles de thé vert	38
Tableau 3.1 : Les principales sous-classes de la famille des flavonoïdes	42
Tableau 3.2 : Noms usuels, abréviations, formules et pKa des principales catéchines du thé	43
Tableau 6.1 : Teneur des polyphénols totaux en mg EAG/g du thé vert	105
Tableau 6.2 : Teneur en flavonoïdes en mg EQ/g du thé vert	107
Tableau 6.3 : Evaluation des zone d'inhibition des microorganismes par les polyphénols totaux du thé vert	109
Tableau 6.4 : Evaluation de la DL50 de différentes doses de polyphénols	110
Tableau 6.5 : Inhibition de <i>Lactobacillus plantarum</i> par les polyphénols totaux du thé vert.	111
Tableau 6.6 : Inhibition de <i>Pediococcus acidilactici</i> par les polyphénols totaux du thé vert.	113
Tableau 6.7 : Inhibition de <i>Lactobacillus casei</i> par les polyphénols totaux du thé vert	115
Tableau 6.8 : Analyses physico-chimiques du lait cru	117
Tableau 6.9 : Analyses physico-chimiques de la poudre de lait	118
Tableau 6.10 : les caractères physico-chimique du thé	119
Tableau 6.11 : Analyses physico-chimiques de l'eau	120
Tableau 6.12 : Analyses microbiologiques du lait cru	121
Tableau 6.13 : Analyses microbiologiques de la poudre de lait	122
Tableau 6.14 : Analyses microbiologiques de l'extrait du thé	123
Tableau 6.15 : Analyses microbiologiques de l'eau de process	124
Tableau 6.16 : Analyses microbiologiques de la crème fraîche	125
Tableau 6.17 : Résultat d'analyses physico-chimiques du lait écrémé Reconstitué	126
Tableau 6.18 : Analyses physico-chimiques de la crème fraîche	127
Tableau 6.19 : Analyses physico-chimiques du caillé maigre	128

Tableau 6.20 : Analyse physico-chimie de fromage frais enrichis des polyphénols Totaux au cours de stockage à 6°C pendant 28 jours	130
Tableau 6.21 : Analyses microbiologiques du fromage frais enrichis en polyphénols du thé vert	132
Tableau 6.22 : Résultats des analyses sensorielles du 1 <sup>er</sup> essai	133
Tableau 6.23 : Résultats des analyses sensorielles du 2 <sup>eme</sup> Essai	134
Tableau 6.24 : Résultats des analyses sensorielles du 3 <sup>eme</sup> Essai	135

## INTRODUCTION

Tout au long du XXe siècle, la science nutritionnelle a découvert les nutriments et elle a établi les standards nutritionnels formulant des recommandations et proposant des directives dans le but de prévenir les déficiences et de supporter la croissance, le maintien et le développement du corps [1]. Sur ce chemin, en direction d'une nutrition optimisée qui représente un objectif ambitieux et à long terme, l'alicament apparaît, à coté d'autres approches comme un concept intéressant et stimulant pour autant qu'il soit et reste soutenu par une recherche scientifique de qualité, qui dans le contexte récemment défini de la « science des aliments fonctionnels », aura pour objectif de contribuer à l'amélioration des directives nutritionnelles en intégrant, en permanence, toutes les connaissances nouvelles relatives aux interactions entre composants alimentaires, fonction de l'organisme et/ou processus pathologiques [1] [2].

L'alicament est une invention de l'industrie agro-alimentaire née de la combinaison des mots «aliment» et «médicament». Les alicaments sont donc des aliments de consommation courante destinés à soigner ou à prévenir certaines maladies. Il est censé réduire les risques ou prévenir l'apparition de certaines maladies, à l'aide de substances contenues dans un aliment de consommation courante [2]. Dans les industries agro-alimentaires, la concurrence est rude avec le développement des procédés technologiques. L'envie d'offrir des aliments plus nutritifs a augmenté.

Les polyphénols constituent aujourd'hui un vaste sujet de recherches et intéressent non seulement le chimiste, mais aussi les industries agroalimentaires par leurs implications, en particulier sur la flaveur des aliments. Leur incidence sur la conservation des produits retient également l'attention dans le secteur alimentaire, mais aussi dans celui des cosmétiques et de la pharmacologie [3]. Les propriétés

antioxydantes ou anti-inflammatoires des polyphénols suscitent également beaucoup d'intérêt dans le domaine médical par leur caractère préventif à l'égard de diverses pathologies, comme les maladies cardiovasculaires ou dégénératives...etc [4].

Ce vaste champ d'investigation nécessitait de tenter une synthèse des acquis sur cette grande famille de constituants naturels des végétaux, qui comprend plusieurs milliers de molécules. Les polyphénols du thé 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 [4] [3].

Le thé vert est considéré comme la boisson la plus consommée après l'eau. Il a toujours fait partie de la médecine orientale depuis des millénaires et devient de plus en plus populaire en occident [5]. Les récentes recherche sur les bienfaits du thé mettent surtout en avant l'activité antioxydante des polyphénols qui préviendraient certains cancers (prostate, pancréas, colon, et rectum) par inhibition d'une enzyme, l'urokinase, nécessaire à la progression des tumeurs [6].

Les produits laitiers fermentés jouent un rôle important dans l'alimentation humaine. Le fromage frais est l'un des produits laitier fermentés par les bactéries lactiques mésophiles présentent des vertus thérapeutiques et nutritives [7].

L'objectif de ce travail est de préparer un fromage frais enrichi par les polyphénols du thé après leur extraction et d'évaluer la dose administrée en utilisant :

- Le choix de la méthode d'extraction des polyphénols du thé ;
- Un dosage des polyphénols dans le liqueur de thé ;
- Une identification des polyphénols du thé par HPLC ;
- Une quantification des polyphénols du thé ;
- Une cinétique de la croissance des bactéries lactiques mésophiles en présence des polyphénols du thé ;

- Un test de toxicité sur souris pour les différentes doses, ainsi que la comparaison avec la DJA « dose journalière admise » des polyphénols recommandés;
- Un contrôle physicochimique et microbiologique du fromage frais enrichi en polyphénols, ainsi le test de stabilité pendant 28 jours ;
- Et enfin, un contrôle de la qualité organoleptique de l'alicament (fromage frais aux polyphénols) préparé pour le jury de dégustation durant leur conservation pendant 28 jours à 6°C, dont le but d'évaluer la date limite de conservation.

## Chapitre1

### LES ALICAMENTS

Les termes d'alicaments ou de nutraceutiques ont été introduits à la fin du XXe siècle pour désigner des aliments ou composants alimentaires ayant des propriétés curatives de certaines maladies. Ces termes ne sont pas employés par les industriels de l'aliment ni du médicament qui de part et d'autre souhaitent garder une frontière nette entre les médicaments et l'aliment. En Europe, les allégations faisant état de prévention, traitement ou guérison de maladies humaines ne sont pas autorisées pour des aliments. Le terme d'aliments fonctionnels désigne des aliments ou produits alimentaires dont les propriétés spécifiques vont au-delà du simple effet nutritif associé aux éléments nutritifs qu'il contient et qui revendiquent des modifications physiologiques bénéfiques de l'organisme [1].

#### 1.1. Définition

Un alicament est un aliment combinant la notion d'aliment et de "médicament". Il s'agit d'un aliment de consommation courante contenant naturellement (alicaments naturels) ou artificiellement (alicaments artificiels) des nutriments pouvant réduire les risques ou prévenir l'apparition de certaines maladies [2].

Le mot alicament désigne un aliment qui contiendrait des vertus médicamenteuses. Les alicaments sont destinés à prévenir les risques de maladies à l'aide des composants actifs qu'ils recèlent. On cite également les termes de

"médicaliments" ou "nutraceutiques", abordant la nutrition pharmaceutique. On parle également d'aliments fonctionnels [2].

## 1.2. Type d'alicaments

### 1.2.1. Les alicaments naturels

Par opposition aux produits mis en vente par les groupes agro-alimentaires, il s'agit ici de végétaux qui pourraient être considérés comme des alicaments naturels. Ceci nous rapproche bien sur de la médecine par les plantes au sens large et de tous ses dérivés.

L'alicament serait un aliment « totum » doté d'une allégation scientifique globale reconnue par un organisme officiel de sécurité alimentaire ou sanitaire. [8] Ainsi l'AFSSA (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments) a reconnu en 2004 l'allégation concernant les effets bénéfiques du jus de canneberge sur les infections urinaires. [9]

### 1.2.2. Alicaments industriels (alicaments artificiels)

- Les aliments enrichis en oméga-3.
- Les aliments destinés à réguler le transit (« *Bifidus actif* » et autres).
- Certains laits fermentés à boire contiennent, en plus des deux ferments traditionnels du yaourt, un probiotique spécifique qui contribuerait au bon équilibre de la flore intestinale, Exemple *Actimel*.

Ces allégations santé provenant de l'industrie alimentaire, il est permis de douter de leur véracité, notamment concernant la supériorité de ces aliments sur d'autres plus classiques (un simple yaourt ou un fromage). Et, même si des études scientifiques aboutissant à la fabrication d'alicaments sont sérieuses et bien établies, les alicaments échappent à tous les contrôles que subit un médicament avant et après sa mise sur le marché [1].

## 1.3. Nature des alicaments

D'un point de vue concret, un alicament peut être :

- Un aliment naturel ;
- Un aliment auquel un composant a été ajouté ;
- Un aliment au sein duquel la concentration d'un composant est potentiellement délétère ;
- Un aliment au sein duquel un ou plusieurs composants ont été modifiés ;
- Un aliment au sein duquel la biodisponibilité d'un ou de plusieurs composants a été modifiée ;
- Toutes les combinaisons de ce qui précède [1].

#### 1.4. Le concept d'aliments

Les particularités des aliments « aliments fonctionnels » sont :

- D'être un produit alimentaire traditionnel et courant ;
- D'être consommé dans le cadre de l'alimentation normale et habituelle ;
- D'être composé de constituants naturels, parfois en concentration inhabituelle ou ajouté dans des produits alimentaires qui n'en contiennent pas naturellement ;
- D'avoir des effets bénéfiques sur des fonctions cibles, au-delà de ce qui peut être attendu de la valeur nutritive traditionnelle ;
- D'avoir la capacité de maintenir voire d'améliorer l'état de bien être ou de santé ou de réduire le risque d'une maladie ;
- D'avoir la capacité d'apporter un bénéfice physiologique qui se traduit par une amélioration de la qualité de la vie incluant en cela les performances physiques ou intellectuelles ou bien être psychologiques et comportemental [1].

## 1.5. Fromage frais

### 1.5.1. Définition

Le fromage frais est le produit issu de la simple transformation de lait, et additionné de la crème. C'est un produit non affiné, très humide et d'une assez courte durée de vie et qui doit être conservé à basse température, sa valeur énergétique est de 118 kcal par 100g [10].

La réglementation française précise que le fromage frais est un fromage à égouttage lent, n'ayant subi que la transformation lactique [11].

### 1.5.2. Réglementation

En Algérie, la législation distingue des fromages affinés et les fromages blancs, en précisant que ces derniers ne doivent pas avoir subi des fermentations autres que la fermentation lactique [12]. La dénomination fromage blanc est très vaste : elle s'applique à toutes sortes de pâtes issues d'un caillé lactique.

Parmi les fromages frais, il existe deux types définis [12] :

- Petit suisse : c'est un fromage cylindrique dont le poids est de 30 à 60g, il existe en version nature aromatisé et aux fruits.
- Le demis-sel : c'est un fromage de forme carré, pesant 75g et salé à 2%.

### 1.5.3. Qualité nutritionnelle de fromage frais

Le tableau 1.1 nous montre la composition nutritionnelle du fromage frais.

Tableau 1.1 : Composition moyenne du fromage frais pour 100g de produit frais [11].

Composition	Unité	Fromage frais
Eau	G	79
Energie	Kcal	118
Glucide	G	4
Lipide	G	7.50
Protéine	G	8.50
Calcium	mg	100
Phosphore	mg	10
Magnésium	mg	10
Potassium	mg	130
Sodium	mg	40
Zinc	mg	0.50
Vitamine A	UI	170
Thiamine	mg	0.03
Riboflavine	mg	0.15

#### 1.5.4. Les ferments lactiques

L'importance des ferments lactiques est grande dans l'industrie agro-alimentaire et en particulier dans l'industrie de transformation laitière [13]. Les ferments lactiques commerciaux sont généralement cultivés sous formes de levains servant à ensemercer les cuves de fabrication, une des techniques les plus récentes : les

ferments concentrés congelés ou lyophilisés permettant un ensemencement direct [13].

❖ Les caractères microbiologiques du genre Streptococcus : Morphologiquement, les streptocoques se présentent sous formes de sphères coccus de 0.6 à 1µm de diamètre, groupées en chaînes plus au moins longues. Ils sont saprophytes ou parasites [7].

❖ Les caractères microbiologiques du genre leuconostoc : C'est le genre Bétacoccus, morphologiquement, les espèces de ce genre se présentent normalement en diplocoques. Il se différencie des streptocoques par formation de CO<sub>2</sub> aux dépends de Glucose. Cultivées sur saccharose, certaines espèces produisent un mucilage abondant [7].

❖ Les caractères microbiologiques du genre lactobacillus : Morphologiquement, les espèces du genre lactobacillus sont des bâtonnets, souvent longs, gram positifs et catalase négatives [7].

#### 1.5.4.1. Action des levains dans la fabrication du fromage

Les ferments lactiques sont des cultures pures. Leur ensemencement dans le lait assure deux fonctions essentielles :

- L'abaissement du pH par transformation du lactose soit en acide lactique seulement, soit en acide lactique, acétique et éthanol, favorisant ainsi la coagulation du lait.
- La contribution aux caractères organoleptiques des produits en synthétisant des molécules aromatisantes [14].

Ces bactéries vont modifier la composition chimique du lait. Lorsqu'il y a une diminution du pH, il y aura une solubilisation du phosphate de calcium colloïdal, un

élément important dans la stabilité des micelles de caséines, ce qui provoque une dissociation en sous unités. Celles-ci s'associent par liaisons électrostatiques et hydrophobes pour former un gel lactique qui emprisonne toute l'eau.

Cependant, lorsque le pH atteint le point hydroélectrique de la caséine (pH 4.6), les liaisons de la structure sous micellaire affaiblissent le goût et l'arôme [14].

#### 1.5.5. Processus de fabrication de l'alicament (fromage frais enrichis en polyphénols)

##### 1.5.5.1. Préparation de la pâte maigre

Afin d'obtenir une bonne pâte, les transformations suivantes sont à préconiser :

- ❖ Reconstitution du lait : le lait utilisé pour la fabrication de la pâte maigre est un lait reconstitué à 0% de matière grasse.
- ❖ Filtration du lait : le lait reconstitué est ensuite envoyé par une pompe de capacité 30000 l/h à travers un double filtre tubulaire jusqu'au bac tampon de pasteurisation, où il est préchauffé à 62°C dans la section de récupération.
- ❖ Dégazage : le lait contient des composés volatils à odeurs fortes; ces composés seront éliminés par entraînement à la vapeur ou par traitement sous vide [15]. Le lait reconstitué est envoyé au deux homogénéisateurs en passant à travers un dégazeur de 450 l, sa principale action est d'éliminer le gaz à une température de 40 à 45 °C dans le lait (CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub> ; N<sub>2</sub>...), pour éviter un arrière goût indésirable, puis il retourne ensuite vers le pasteurisateur.
- ❖ Pré-pasteurisation : le produit est pré pasteurisé à 70°C – 75°C pendant 15 secondes dans le but de diminuer la charge microbienne. Cette température est contrôlée automatiquement par une régulation de température qui contrôle une

vanne de régulation de la vapeur. Dans le cas de non atteinte de cette température, une vanne de déviation du flux fait retourner le lait qui n'a pas été traité correctement, à la pasteurisation [15].

- ❖ Homogénéisation : cette opération a pour but principal de réduire le diamètre des globules gras dans le but d'éviter la remontée de la matière grasse, et réduire la perte de la matière grasse dans le sérum et limiter l'oxydation. Il semble que l'homogénéisation touche les macromolécules de caséine rendant le coagulum formé dans l'estomac plus facilement attaquant. Globalement, l'homogénéisation augmente la vitesse de la digestion du lait [15]
- ❖ Chambre de pasteurisation : Le lait passe par un tronçon de cambrages qui joue le rôle de régulateur de débit (2000 l/h) c'est le temps du passage lors de la pasteurisation. Elle se fait dans des circuits fermés et à l'abri de l'air. La pasteurisation a pour rôle la destruction de germes, elle désigne le procédé qui consiste à chauffer chaque particule du lait, de manière à obtenir ou à dépasser le ratio température/ durée requis 85°C / 15 sec [15].
- ❖ Le lait pasteurisé : le lait ainsi reconstitué est pasteurisé à une température de 82 à 90 °C au pasteurisateur d'une capacité de 10 000 l/h équipé de groupe de production d'eau chaude et d'une vanne de thermorégulation. Au moment du transfert vers d'autres tanks la température du lait est abaissée jusqu'à 22-24 °C [16].
- ❖ L'encemencement : la production du caillé à partir du lait 0 % est obtenue sous l'action combinée des ferments lactiques. A une température de coagulation d'environ 24°C, le temps nécessaire à cette coagulation étant de 16 à 18 h, il est nécessaire d'ajouter dans le tank, 7g de présure pour 10 000 l de lait. L'opération se faisant manuellement, on inocule la présure diluée dans l'eau distillée, deux sachets de ferments lactiques dont l'un contient CHN11 et l'autre du FLDAN qui sont des levains mésophiles. Le développement du procédé de

fermentation est influencé par la qualité et la quantité du levain inoculé ainsi que par la température de fermentation [16].

- ❖ La thermisation : lorsque le pH est atteint (<4.5), le coagulat est envoyé pour la thermisation au moyen d'une pompe, il est réchauffé à 60-65°C et refroidi à la température optimale de centrifugation de 48 à 38 °C et acheminé pour la dissociation du lait coagulé dans un séparateur centrifuge [16]. Avant la séparation, le caillé chauffé est filtré pour éviter les grumeaux qui peuvent être causés par une mauvaise thermisation [16].
- ❖ La séparation ou égouttage : après filtration, l'égouttage est réalisé par la séparation du caillé et du lactosérum. Le principe de l'égouttage centrifuge repose la différence de densité entre le lactosérum et le caillé maigre (0% MG). Le caillé est envoyé au refroidisseur, tandis que le sérum est évacué vers l'égout [16].

#### 1.5.5.2. Préparation de la crème fraîche

La préparation de la crème fraîche sans sucre comporte les étapes suivantes :

- ❖ La réfrigération du lait cru : Dès la traite, le lait recueilli est aussitôt réfrigéré à une température de 3 à 4°C afin de ralentir la prolifération des espèces bactériennes présentes, essentiellement la flore mésophile lactique et la flore pathogène. Le non respect de cette température entraînera la production des enzymes protéolytiques et /ou lipolytiques, induisant une altération du goût et des pertes de rendement. Au niveau des usines, le lait réceptionné est filtré afin d'éliminer les impuretés [16].
- ❖ L'écémage du lait cru : après pasteurisation, le lait est écémé à une température supérieure à 30°C dans un bol constitué d'un empilement d'assiette. La crème, séparée du lait maigre est immédiatement pasteurisée à

95°C, pendant 15 secondes puis homogénéisée par pression à 70°C. Elle est ensuite refroidie à une température comprise entre 4 et 6°C, puis stockée dans les tanks isothermes. La crème ainsi obtenue doit contenir la matière grasse présentant un pH inférieur à 6.6.

❖ Pasteurisation et homogénéisation de la crème fraîche :

La crème entre dans la pasteurisation à 45°C, elle est chauffée progressivement dans la section de récupération, lorsque la température de 62°C est atteinte, la crème est envoyée vers l'homogénéisateur pour y être homogénéiser, celle-ci est très importante pour la stabilité de l'émulsion de la crème car, elle induit une certaine désintégration des globules gras et évite toute séparation ultérieure entre la phase légère et la phase lourde. [16].

Après homogénéisation , la crème retourne au pasteurisateur dans la section de chauffage ou le fluide utilisé est l'eau cambreur pendant 15 à 20 secondes, le chambreur a pour but de maintenir la crème à une température de pasteurisation pendant la durée requise. Puis la crème est refroidie par récupération à 6-7°C. La crème fraîche ainsi préparée, est stockée dans les tanks à doubles parois à la température de 6-7°C.

Les étapes de fabrication de l'alicament sont décrites dans les figures 5.8 et 5.9 (matériel et méthodes).

## Chapitre 2

### LE THE

#### 2.1. Présentation du thé «*Camellia sinensis* »

##### 2.1.1. Historique

L'histoire du thé, boisson obtenue par infusion des feuilles du *Camellia sinensis*, littéralement « Camellia Chinois », remonterait au IIIème millénaire avant J.C. selon la légende chinoise. Le thé n'apparaît en Europe qu'au cours du XVIIème siècle, d'abord en Hollande puis en France et enfin en Angleterre [17].

A cette époque, les émigrants anglais et hollandais emportent également avec eux le thé vers le nouveau monde. L'enjeu économique est tel qu'il donne alors lieu à des courses de vitesse entre les *tea-clippers*, voiliers légers utilisés pour le transport du thé sur les grandes routes maritimes entre l'Europe et l'Amérique. En 1773, les colons installés à Boston décident de boycotter ces importations trop lourdement taxées et le 16 décembre, jettent à la mer une cargaison de thé venant d'Angleterre ; cet acte, appelé « *Boston tea party* », marque la première étape de la guerre d'indépendance.

Au milieu du XIXème siècle, pour faire face à une demande occidentale croissante, les Anglais développent des plantations en Inde puis dans l'île de Ceylan (Sri Lanka). A la fin du XIXèmesiècle, le thé est implanté dans de nombreux pays d'Asie, dans les pays d'Afrique Noire anglophones tel que le Kenya puis en Amérique du Sud (Figure 2.1).

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 [18], répartie principalement entre la Chine et l'Inde (Figure 2.2). Ces deux pays sont aussi les

premiers pays consommateurs ce qui rend le marché du thé assez singulier. En effet, le plus grand pays exportateur est le Kenya, 3ème pays producteur avec seulement 9 % de la production mondiale. Par ailleurs, les pays producteurs consomment en moyenne moins de thé par an et par habitant que les pays importateurs. À titre d'exemple, un habitant russe consomme 1,26 kg de thé, un britannique 2,20 kg contre 0,52 kg en Chine, 0,65 kg en Inde et 0,40 kg au Kenya [19]. En France, la consommation moyenne n'est que de 0,250 kg par an et par habitant mais est en constante augmentation depuis une dizaine d'années [19a].



Figure 2.1 : Répartition des plantations de thé dans le monde [17].

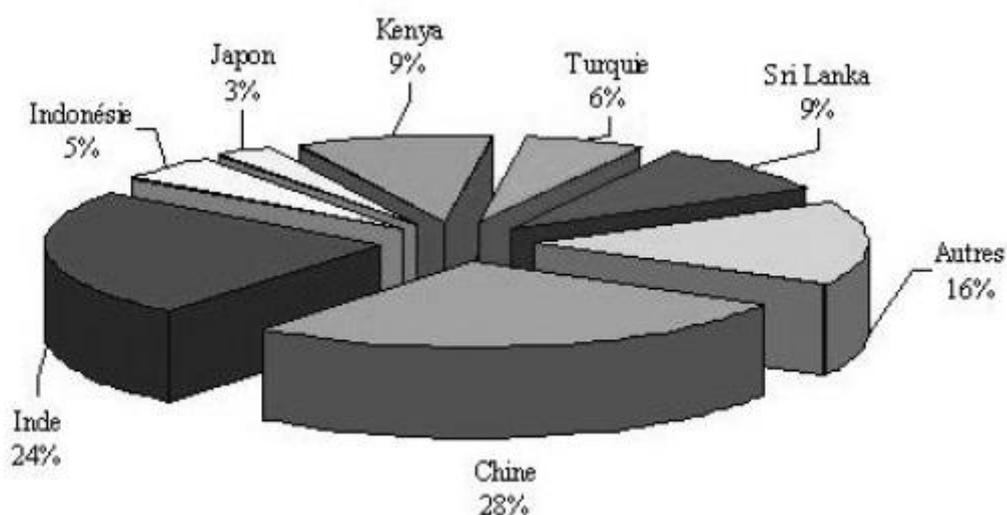


Figure 2.2 : Répartition de la production mondiale du thé en 2005 [18].

## 2.1.2. La culture du thé

### 2.1.2.1. Le théier

Le théier ou *Camellia (L.) O. Kuntze* (espèce) appartient au genre *Camellia L.* de la famille des *theaceae* de l'ordre des *Theales* (United States Department of Agriculture, 2007). Il existe deux variétés principales, la variété *sinensis* (de Chine) utilisée plus particulièrement pour la production de thés verts avec des feuilles petites et vert olive et la variété *assamica* (d'Assam) utilisée pour les thés noirs à la pousse large, claire et charnue. Le théier est un arbre à feuilles persistantes pouvant atteindre 10 à 15 m voire 30 m pour des arbres plusieurs fois centenaires. Dans les plantations appelées « *gardens* » (jardins) ou « *estates* » (propriétés), les arbres sont taillés à environ 1 m du sol pour former la « table de cueillette » qui facilite la récolte annuelle et favorise la croissance des bourgeons [20]. Grâce aux différentes méthodes d'hybridation comme le greffage ou le bouturage, de nombreux croisements, appelés « *jats* » ou « *clonal* » sont apparus.

### 2.1.2.2. L'habitat

Le théier croît entre le 42ème degré de latitude nord dans l'hémisphère nord et le 31ème degré de latitude sud dans l'hémisphère sud. Le sol des plantations a une influence sur la qualité des feuilles. Il ne doit être ni calcaire ni argileux mais de préférence alluvionnaire ou volcanique [20]. Le sol doit également être meuble pour permettre à la racine centrale de descendre jusqu'à 6 m de profondeur et plutôt acide (entre pH 3,9 et 7,1). Il doit être en pente car le théier ne supporte pas l'eau stagnante. Le deuxième élément important est le climat qui doit être sans nuage et offrir des nuits fraîches, des vents réguliers et secs. La température doit être comprise entre 10 et 30 °C. Si celle-ci passe en dessous de -5 °C, le théier meurt. Les besoins en eau sont de

l'ordre de 2000 à 3000 mm par an et de préférence la nuit. Une hygrométrie de l'air située entre 70 et 90 % et un ensoleillement de 5 h par jour sont recommandés [17].

La maladie la plus redoutée est une maladie touchant les feuilles : *Exobasidium vexans* (Massee) ou *Blister blight* (« cloque »). Elle est due à un champignon et est caractérisée par l'apparition de taches circulaires. Lorsque ces cloques éclatent des milliers de spores sont dispersés dans l'air, contaminant ainsi les plantes alentours [20].

### 2.1.2.3. Le cycle végétal

Le *Camellia sinensis* étant un arbre, sa pousse dépend des conditions climatiques. Les périodes de récolte, « *flush* », alternent avec des périodes de dormance (Tableau 2.1). Les périodes de récolte sont divisées en cycles durant entre 4 et 14 jours. Le plus souvent, ces cycles durent 7 jours. Dans certains pays comme l'Inde et l'Indonésie, les récoltes peuvent avoir lieu toute l'année.

Tableau 2.1 : Cycle naturel du théier [20].

Janv.	Fév.	Mar.	Avr.	Mai	Juin	Juil.	Août	Sept.	Oct.	Nov.	Déc.
Dormance	Première récolte			Récolte de printemps		Dormance			Récolte d'automne		Dormance

La cueillette s'effectue manuellement ou mécaniquement. Les feuilles récoltées à la main sont pincées entre le pouce et l'index puis envoyées dans une hotte tressée. La qualité du thé ou « *grade* » dépend du type de cueillettes. Elle est définie par ordre décroissant à partir du type de feuilles en partant de l'extrémité de la tige. Ainsi se trouve en premier lieu sur la table de cueillette un bourgeon appelé « *pekoe* » ou « *Flowery Orange Pekeo* », signifiant « duvet blanc ». Il s'agit en réalité d'une feuille non

développée. Puis, plus éloignées de l'extrémité de la tige, se trouvent des feuilles de plus en plus mûres qui portent des noms différents [20].

### 2.1.3. Les procédés de traitement des feuilles de thé

Les feuilles de thé sont commercialisées sous trois formes principales : les thés verts (25 % de la production mondiale en 2005), noirs (70 % de la production mondiale en 2005) et semifermentés ou *Oolong* (5 %). La différence est due aux traitements subis par les feuilles fraîchement cueillies (Figure 2.3).

- La torréfaction : consiste à chauffer les feuilles quelques minutes à 100 °C en atmosphère humide pour inhiber les enzymes responsables de l'oxydation. Cette phase dure entre 30 s et 5min pour les thés verts et *Oolong* et entre 15 et 20 min pour les thés noirs [20].
- Le flétrissage : qui dure entre 16 et 32 h suivant le procédé utilisé, les feuilles sont exposées à de l'air chauffé (< 35 °C) afin de les déshydrater pour les rendre plus souples et permettre de les rouler sans les briser. La teneur en eau des feuilles est réduite de 50 % environ.
- Le roulage : dans le cas des thés verts et *Oolong*, a pour but de donner une forme de bâtonnet aux feuilles. Dans le cas des thés noirs, les feuilles sont roulées afin de rompre la paroi cellulaire et permettre la libération des enzymes polyphénoloxydases et peroxydases qui vont oxyder les polyphénols [21].
- L'oxydation : Par la suite, les feuilles subissent l'étape d'oxydation qui est l'étape la plus importante pour l'obtention des thés noirs et semi-fermentés. Elle est souvent appelée à tort « fermentation » [21].

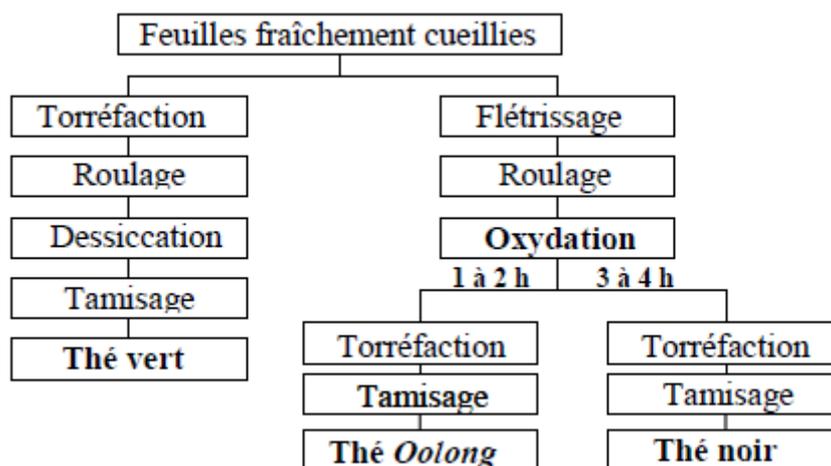


Figure 2.3 : Principales étapes du traitement des feuilles de théier après récolte [20].

Les feuilles des thés verts ne subissent pas cette étape d'oxydation et sont immédiatement séchées avec de l'air chaud pendant 2 à 3 min avec alternance de périodes de 30 min de repos pour atteindre 5 à 6 % d'eau. Concernant les thés noirs, la dessiccation consiste à stopper l'oxydation puis à ajuster la teneur en eau des feuilles à une valeur inférieure à 5 %. Les feuilles sont ensuite tamisées et classées en trois catégories : feuilles entières, brisées ou broyées. L'apparence des feuilles, leur type et le procédé subi déterminent le grade du thé [22].

## 2.2. 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 [23], 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 [24].

### 2.2.1. 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 [25].

#### 2.2.1.1. Les celluloses

Les celluloses regroupent un ensemble de polysaccharides de la série des  $\beta$ -D-glucanes. Les maillons D-glucopyranoses sont séparés entre eux par des liaisons glycosidiques de type  $\beta$  (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 [24].

#### 2.2.1.2. 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 [24].

#### 2.2.1.3. Les substances pectiques

Les pectines, découvertes en 1825 par Braconnot, représentent la troisième catégorie de polysaccharides pariétaux [26]. Elles tiennent leur nom du grec *Pectos* qui signifie coagulé.

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 :

- les homogalacturonanes (HG) : polymères linéaires constitués de molécules d'acide  $\alpha$ -D-galacturonique (GalA), en conformation chaise, liées en  $\alpha$  (1-4) ;
- les rhamnogalacturonanes I (RGI) : polymères constitués par la répétition du motif [(1→4)- $\alpha$ -D-GalA-(1→2)- $\alpha$ -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.

Jusqu'à récemment, les pectines étaient supposées être constituées d'un squelette principal formé par un enchaînement linéaire d'unités d'acides interrompues par une alternance d'unités L-rhamnopyranose. Une structure alternative a été proposée récemment selon laquelle, HG est une longue chaîne linéaire composée de RGI (Figure 2.4) [27]. Malgré ces différences, tous les avis s'accordent à dire que les acides galacturoniques dans la chaîne homogalacturonane peuvent être méthyl-estérifiés en C6 par du méthanol ou acétylés par de l'acide acétique en C2 et/ou C3 conduisant à définir les degrés de méthylation et d'acétylation.

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, les modes de gélification diffèrent : « sucre » et acide pour les pectines hautement méthylées, calcium pour les pectines faiblement méthylées par le processus de la « boîte à oeufs ». Ce processus est constitué de deux étapes : les chaînes de pectines se rapprochent deux à deux autour des ions calcium (dimérisation) du fait des interactions électrostatiques puis les dimères s'agrègent entre eux pour former un gel [28]. De plus, il semblerait que le calcium maintienne les pectines dans un état insoluble au niveau de la membrane cellulaire [29]. Hormis le seul critère du taux de méthylation, la répartition des groupements méthyles le long de la chaîne principale joue un rôle important dans les processus de gélification.

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, *i.e.* en fonction du pH notamment et de la présence de cations mono-, di- ou trivalents. Les feuilles de thé contiennent environ 10 % de pectines [24].

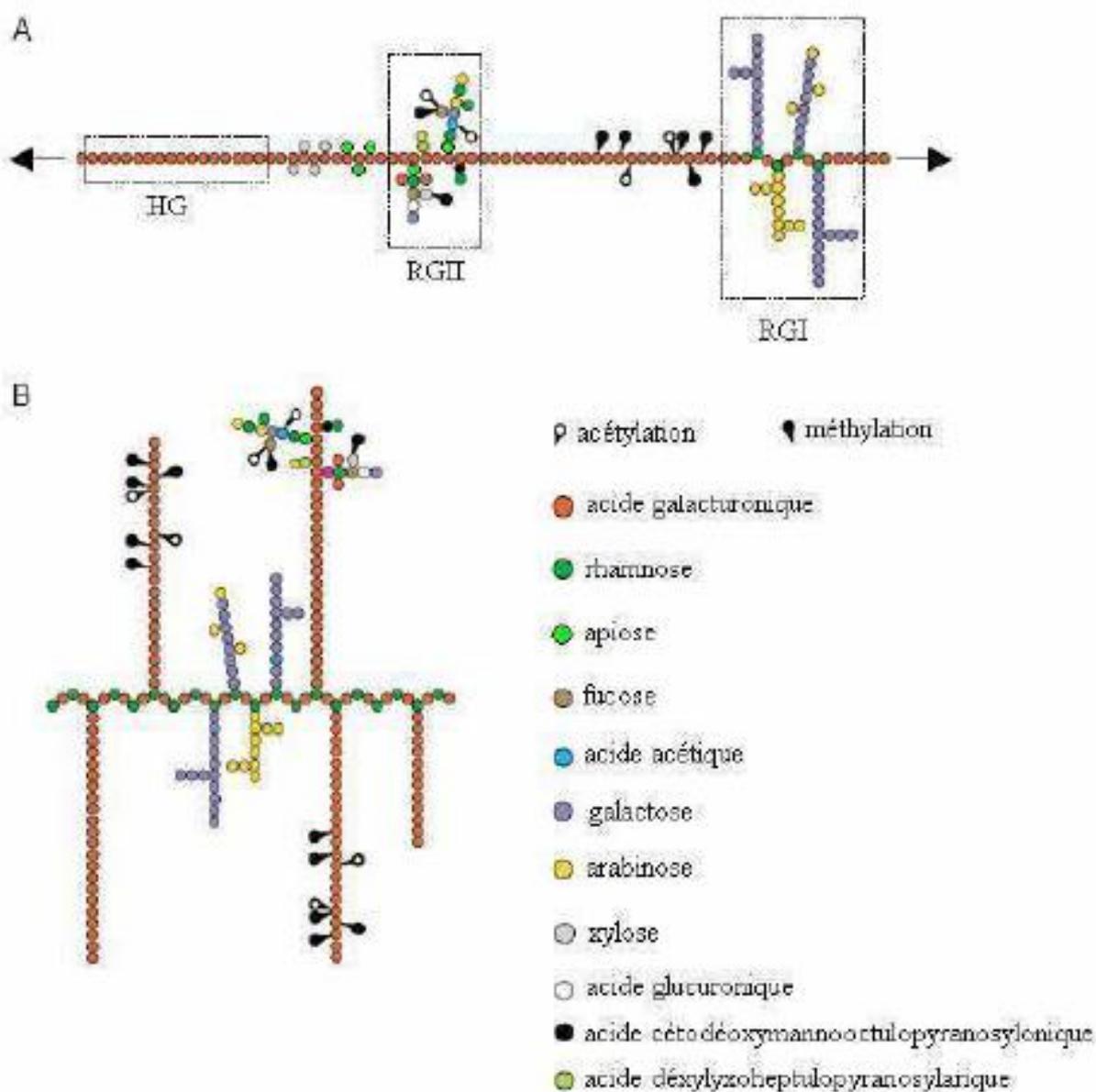


Figure 2.4 : Représentation schématique de la structure d'une macromolécule pectique

a) selon la représentation conventionnelle d'après Vincken *et al.*, (2003) [27]

b) selon le nouveau modèle proposé par Willats *et al.*, (2006) [30]

### 2.3. Composition chimique des polyphénols du thé

Le thé vert est un produit contenant des polyphénols, qui lui confèrent des propriétés particulières. Ces polyphénols sont répartis dans le thé vert voir tableau 2.2.

Tableau 2.2 : Composition chimique des polyphénols des feuilles de thé vert [31]

<b>Polyphénols</b>	<b>Pourcentage</b>
<b>Epicatechine (EC)</b>	<b>1.3%</b>
<b>Epicatechine gallate (ECG)</b>	<b>18.1%</b>
<b>Epigallocatechine (EGC)</b>	<b>12.0</b>
<b>Epigallocatechine gallate (EGCG)</b>	<b>58.1%</b>
<b>Autre</b>	<b>10%</b>

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 [31].

### 2.4. Les vertus thérapeutiques du thé

Les propriétés du thé vert sont multiples : riche en tanins, ce sont ces polyphénols 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 EPGC ou encore épigallocatechine-3-gallate (EGCG). L'EPGC est la substance qui lui confère des propriétés remarquables, propriétés bien plus puissante que celles d'un simple antioxydant. Pourquoi le thé vert et pas autres thés? Parce que le thé vert (vert car non fermenté) contient 10 fois plus d'EPGC que le thé noir et 2,5 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 thiamine, 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, un effet relaxant et augmente la production du rythme alpha dans le cerveau [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].

Une récente étude présentée le 11 janvier 2010 lors d'une conférence parrainée par l'American Association for Cancer Research (AACR) et l'International Association for the Study of Lung Cancer (IASLC) tendrait à démontrer que le thé vert, dans une certaine mesure, protégerait les fumeurs du cancer des poumons.

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 du sein chez la Canadienne) [41].

## Chapitre 3

### LES POLYPHENOLS

Ce sont des molécules aromatiques synthétisées par les végétaux et qui appartiennent à leur métabolisme secondaire. Ils participent à la défense des plantes contre les agressions environnementales; c'est pourquoi 80% des composés phénoliques sont essentiellement localisés dans les tissus épidermiques de la plante. Ce sont des phytoconstituants, généralement des pigments, responsables des tintes automnales des feuilles et des couleurs des fleurs et fruits (jaune, orange, rouge....). Ils sont associés à de nombreux processus physiologiques : croissance cellulaire, différenciation, organogenèse, dormance des bourgeons, floraison, tubérisation [42].

Ces composés jouent aussi un rôle important dans la qualité alimentaire des fruits et déterminent aussi leurs saveurs (les tannins sont à l'origine de la sensation d'astringence des fruits non mûrs, les flavones sont responsables de l'amertume des *Citrus* et peuvent donner naissance, par transformation chimique à des dihydrochalcones à saveur sucrée [43].

Les polyphénols sont présents partout dans les racines, les tiges, les fleurs, les feuilles des végétaux. Les principales sources du point de vue alimentaire sont les légumes à feuilles, les fruits et les boissons [44].

Les « polyphénols » sont définis comme ayant « tous en commun la présence d'un ou de plusieurs cycles benzéniques portant une ou plusieurs fonctions hydroxyles » [3]. Ces composés sont très répandus dans le monde végétal. Ils interviennent dans

différents domaines de la physiologie des plantes (organogenèse, croissance) et dans leurs relations avec l'environnement physicochimique et biologique. Ainsi, ils peuvent servir à favoriser la pollinisation en attirant certains insectes ou au contraire aider à lutter contre les insectes ou les micro-organismes pathogènes pour la plante. De plus, ils contribuent fortement aux qualités organoleptiques des végétaux comme la couleur et l'astringence [3].

### 3.1. La Biosynthèse

Se fait par deux voies principales :

- ❖ La voie de l'acide shikimique : Dans cette voie, les hydrates de carbones produisent lors de leur dégradation par la voie des pentoses-P et la glycolyse, l'érythrose 4-P et le phosphoenol pyruvate respectivement. Ces derniers sont à l'origine des composés phénoliques C<sub>6</sub>C<sub>1</sub> formant les tannins hydrolysables et de la chalcone qui est la molécule de base de tous les flavonoïdes et tannins condensés [45] [46] [47].
  
- ❖ La voie de l'acide malonique : La glycolyse ainsi que la  $\beta$ -oxydation aboutissent à la formation de l'acétyl CoA donnant le malonate. C'est à travers cette voie que s'effectue la cyclisation des chaînes polycétoniques, obtenues par condensation répétée d'unités "Acétate " qui se fait par carboxylation de l'acétyl-CoA. Cette réaction est catalysée par l'enzyme acétyl-CoA carboxylase [48] [45].

### 3.2. Classification

Les polyphénols peuvent être classés de différentes manières suivant la complexité du squelette de base et de son degré de modification (oxydation, hydroxylation). Les formes les plus simples, par opposition aux formes condensées (tannins) sont divisées en deux catégories :

- les acides phénoliques comprenant les acides hydroxybenzoïques (C6-C1) et les acides hydroxycinnamiques (C6-C3) ;
- les flavonoïdes ayant en commun la structure de la flavone qui est constituée de deux noyaux benzéniques reliés par une chaîne en C3 (Figure 3.1).

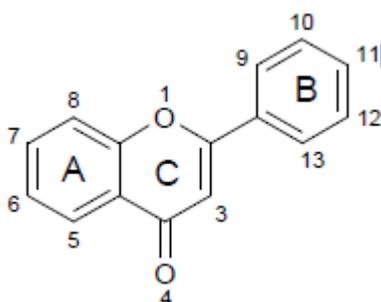


Figure 3.1 : Structure de la flavone [49].

Les différentes sous-classes des flavonoïdes sont définies suivant le degré d'oxydation des carbones dans le cycle C. Les principales sous-classes sont présentées dans le Tableau 3.1. Les composés y diffèrent par la présence de groupements hydroxyles. Dans le cas du thé, les flavonoïdes principaux sont les flavonols et les flavan-3-ols [50].

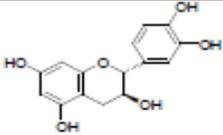
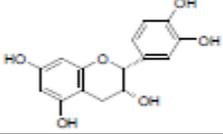
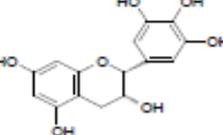
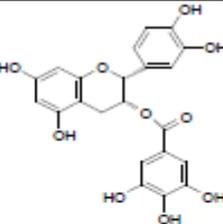
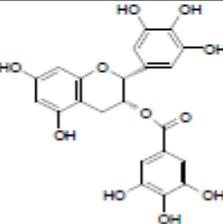
Tableau 3.1 : Les principales sous-classes de la famille des flavonoïdes [49].

N°	Nom	Structure	Exemples de composés et position des groupements hydroxyles
1	Flavone		Apigonine : 5, 7, 11 Lutéoline : 5, 7, 10, 11
2	Flavan-3-ols		Catéchine : 5, 7, 10, 11 Gallocatéchine : 5, 7, 10, 11, 12
3	Flavan-3,4-diols		Leucocyanidine : 5, 7, 10, 11 Leucodelphinidine : 5, 7, 10, 11, 12
4	Flavonols		Kaempferol : 5, 7, 11 Quercétine : 5, 7, 10, 11 Myricétine : 5, 7, 10, 11, 12
5	Flavanones		Naringénine : 5, 7, 11 Butine : 7, 10, 11 Eriodictoyl : 5, 7, 10, 11
6	Anthocyanidines		Pélagonidine : 5, 7, 11 Cyanidine : 5, 7, 10, 11 Delphinidine : 5, 7, 10, 11, 12

### 3.3. Les flavan-3-ols du thé

Les catéchines appartenant au groupe des flavan-3-ols représentent environ 30 % de la matière sèche des feuilles fraîchement cueillies, 10 à 25 % des feuilles de thé vert et 8 à 21 % des feuilles de thé noir [51]. Les principales catéchines du thé sont reportées dans le Tableau 3.2.

Tableau 3.2 : Noms usuels, abréviations, formules et pKa des principales catéchines du thé [51].

Nom	Abréviation	Formule développée	pK <sub>a1</sub>	pK <sub>a2</sub>	pK <sub>a3</sub>	pK <sub>a4</sub>	Réf.
Catéchine	C		8,64	9,41	11,26	13,26	(1)
Épicatéchine	EC		8,72	9,49	11,23	13,40	(1)
			8,68	9,31	11,28	13,78	(2)
Épigallocatechine	EGC		7,87	9,11	11,87	12,89	(2)
Épicatéchine gallate	ECG		7,74	9,11	11,12	13,15	(2)
Épigallocatechine gallate	EGCG		7,59	10,70			(2)
			7,75	8,0			(3)

(a): force ionique non précisée

(1) : (Kennedy *et al.*, 1984)

(2) : (Kumamoto *et al.*, 2001)

(3) : (Jovanovic *et al.*, 1995)

Parmi les catéchines, l'épigallocatechine gallate (EGCG), l'épigallocatechine (EGC) et l'épicatéchine gallate (ECG) sont considérées comme les principales molécules anticancéreuses présentes dans le thé [50]. Ces composés, comme tous les polyphénols, possèdent des propriétés acides du fait de la présence d'une fonction  $\text{-OH}$  sur le cycle benzénique [3]. Les valeurs des  $\text{pK}_a$  des flavan-3-ols du thé ont été déterminées (Tableau 3.2). Pour 4 catéchines sur 5, 4 fonctions acides ont été mises en évidence. La valeur des  $\text{pK}_a$  de première déprotonation varie entre 7,6 et 8,68 suivant les composés.

### 3.4. Les composés issus de l'oxydation des flavan-3-ols

Lors de la phase d'oxydation, les catéchines incolores, principalement l'EGC, l'EGCG et l'ECG [52], sont oxydées par les enzymes polyphénoloxydases et peroxydases pour former différents composés dont les plus connus sont les théaflavines (TF) et les théarubigines (TR) qui représentent respectivement jusqu'à 2 % et 20 % de la matière sèche des feuilles de thé noir [21]. Les quantités d'acide gallique et de catéchine semblent rester constantes durant cette phase car les réactions de dégallatation en produisent à partir de l'EGCG, l'ECG et l'EGC [52].

La formation des théaflavines et des théarubigines commence par une étape commune qui consiste en une oxydation du cycle B des flavan-3-ols en orthoquinone correspondante suivant le mécanisme présenté dans la Figure 3.2 [21] [53].

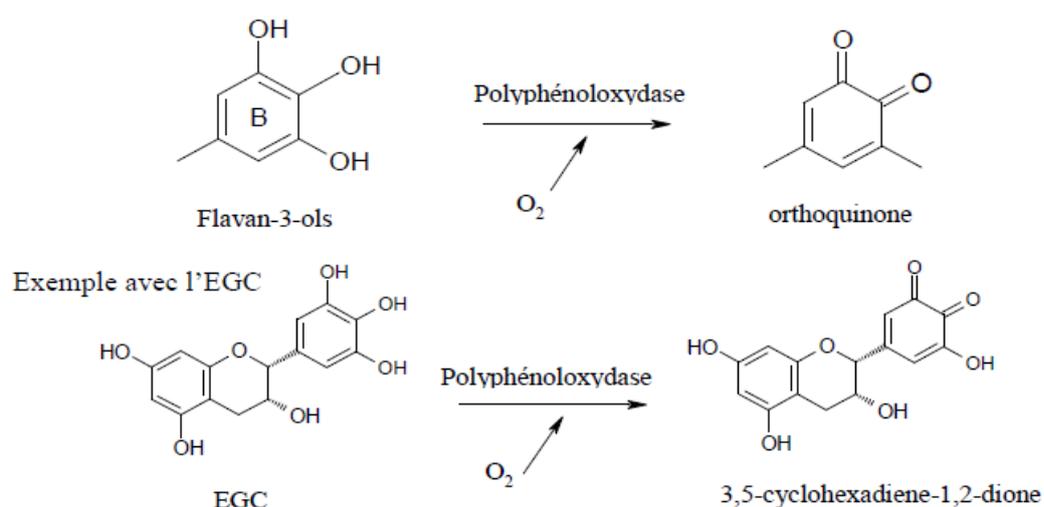


Figure 3.2 : Première étape de l'oxydation des flavan-3-ols par la polyphénoloxydase

et exemple dans le cas de l'EGC [21] [53].

Par la suite, ces dérivés d'orthoquinones peuvent réagir suivant trois voies différentes. La première conduit aux théaflavines par réaction entre le dérivé quinone et un composé possédant une liaison insaturée non substituée : la catéchine, l'épicatéchine ou l'épicatéchine gallate (Figure 3.3).

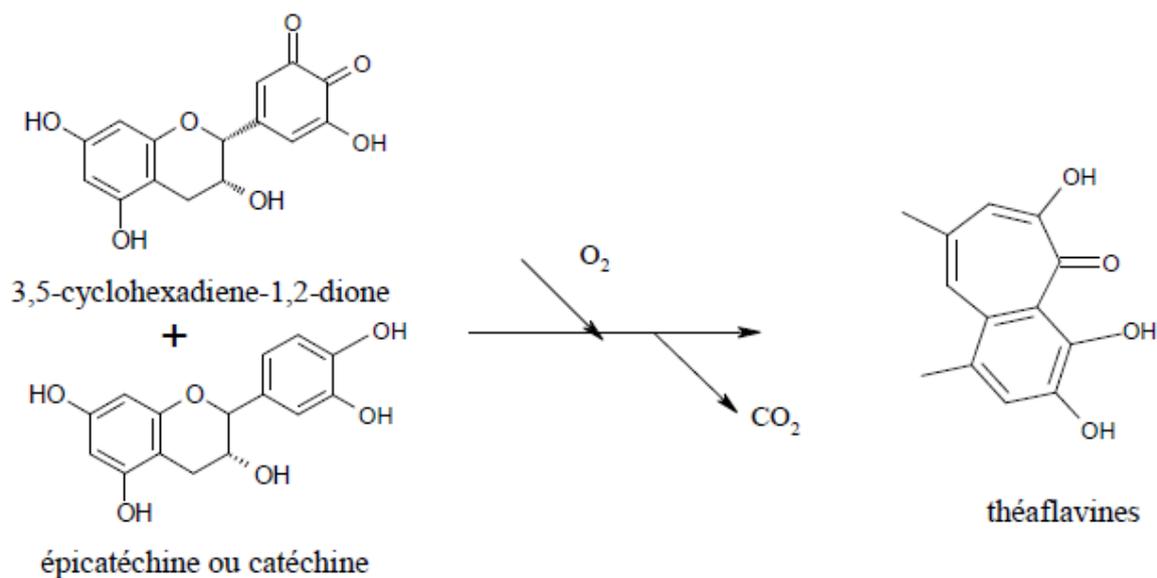


Figure 3.3 : Mécanisme de passage de l'orthoquinone aux théaflavines [21]

Les théaflavines regroupent la théaflavine (acide faible de  $pK_a$  proche de 8 [54], ainsi que les composés possédant un ou plusieurs groupes galloyl comme la théaflavine-3-gallate, théaflavine-3'-gallate et théaflavine-3,3'-digallate (Figure 3.4). Les théaflavines sont des composés de couleur rouge orangé.

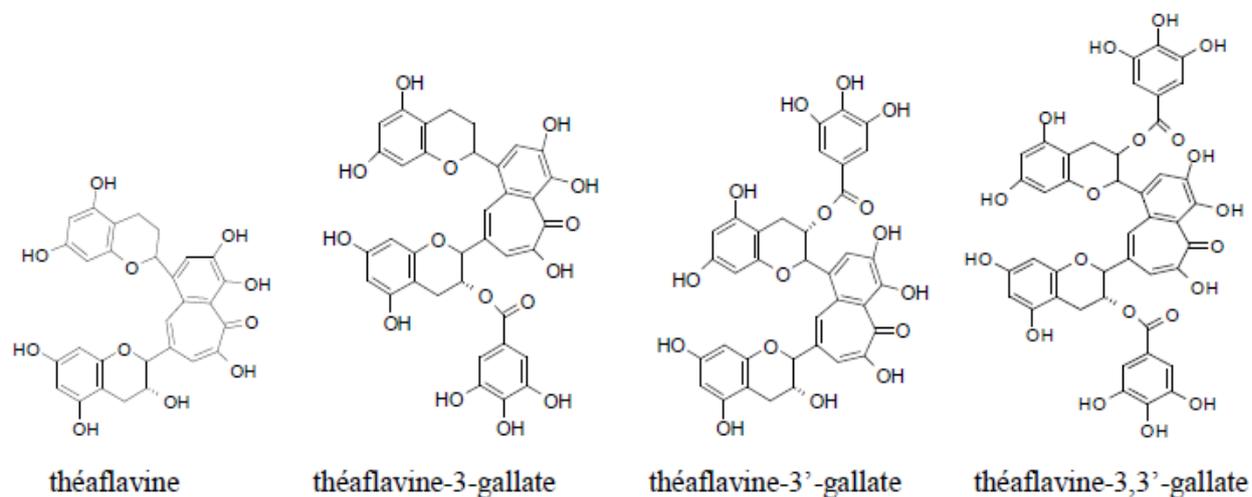


Figure 3.4 : Les théaflavines [55].

La seconde voie de réaction des dérivés d'orthoquinones conduit à la formation de théasinensines, molécules minoritaires (0,05 et 0,013 % de la matière sèche) découvertes par Nishioka et ses collaborateurs en 1983 [56]. Le mécanisme proposé est présenté dans la Figure 3.5.

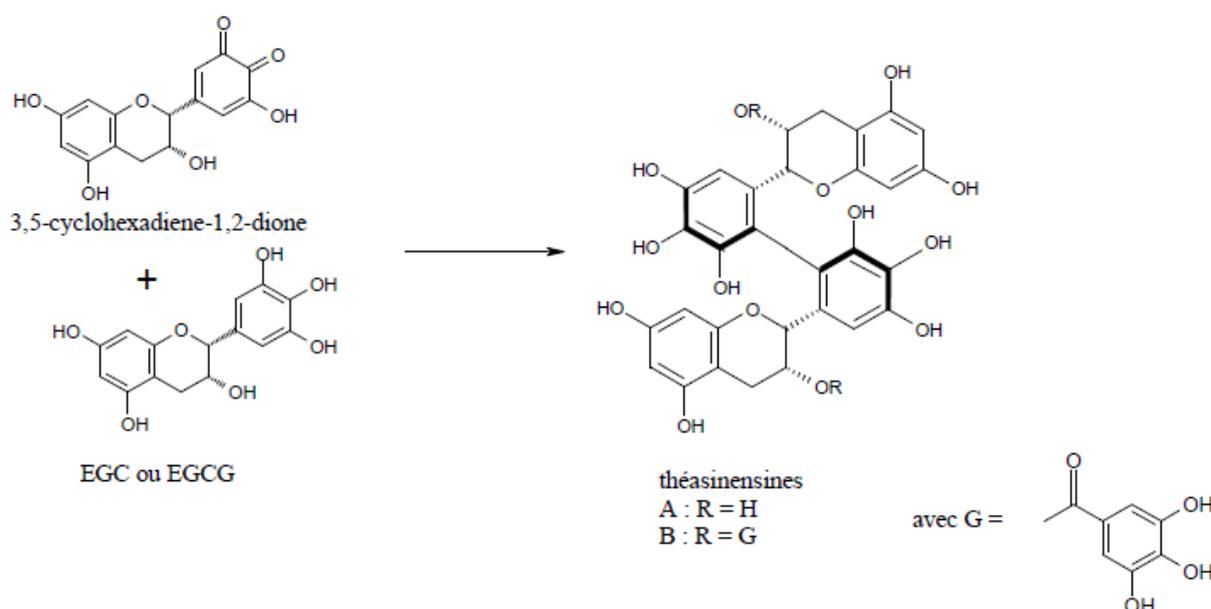


Figure 3.5 : Passage des orthoquinones aux théasinensines [21].

Les théasinensines sont produites plus facilement que les théaflavines. Leur concentration maximale est atteinte après seulement 2 h d'oxydation contre 4 h pour les théaflavines. À la suite de ces maxima, les concentrations diminuent car les théaflavines et théasinensines semblent être à nouveau oxydées pour produire les théarubigines.

Les théarubigines sont les composés les moins bien connus du thé au niveau de leur structure. Elles ont été définies pour la première fois en 1962 par Roberts [57]. Depuis, de nombreux auteurs ont tenté de les caractériser mais sans succès [21]. À l'heure actuelle, ces molécules sont décrites comme des polymères issus de la réaction des différents composés d'oxydation très solubles dans l'eau. Leur masse moléculaire varierait entre 700 et 2000 Da. Leur couleur, orange tirant sur le marron, serait due à la présence de groupements chromophores formés lors de l'oxydation (Figure 3.6).

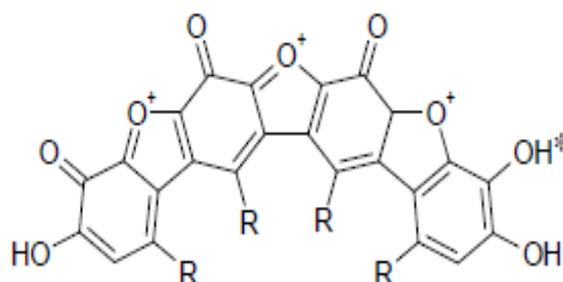


Figure 3.6 : Groupements chromophores susceptibles de se former au sein des théarubigines (R = cycles A ou C de EGC ou EGCG). Les groupements -OH\* représentent les sites ionisables des Groupements chromophores conférant des propriétés d'acides faibles aux théarubigines [21].

Cette hypothèse a été proposée par analogie avec l'apparition d'une coloration brune lors d'introduction du pyrogallol dans une solution basique. Enfin, les théarubigines auraient des propriétés acides grâce à l'ionisation possible des fonctions hydroxyles des groupements chromophores (Figure 3.6).

### 3.5. Les alcaloïdes

Les alcaloïdes ou méthylxanthines appartenant au groupe de la purine présents dans les feuilles de thé sont la caféine (CAF), la théobromine (TB) et la théophylline (TP) (Figure 3.7) [58]. La caféine découverte en 1819 et la théine découverte en 1837 ont été identifiées comme étant une seule et même molécule en 1838. La caféine représente entre 2 et 5 % de la matière sèche des feuilles de thé ; la théobromine entre 0,05 et 0,5 % et la théophylline est souvent inférieure à 0,5 %.

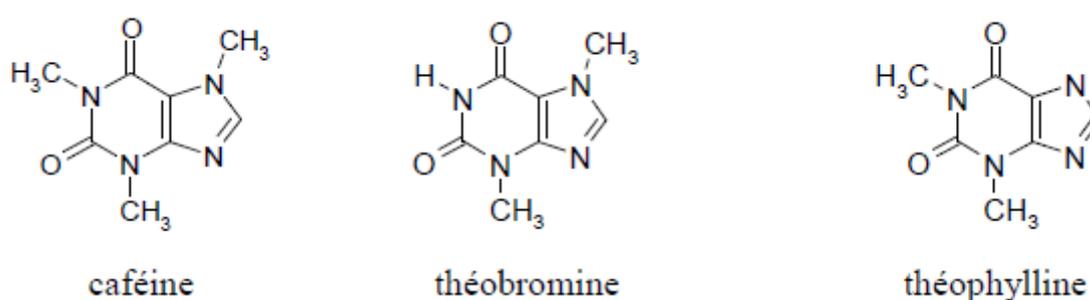


Figure 3.7 : Structure de la caféine, la théobromine [55] et la théophylline [51].

La caféine ou 3,7-dihydro-1,3,7-triméthyl-1H-purine-2,6-dione est la substance chimique de la famille des alcaloïdes la plus consommée dans le monde par le biais de nombreux aliments et boissons comme le café, les produits chocolatés, le thé ou certaines boissons manufacturées où elle est ajoutée. La caféine et la théophylline sont connues pour leurs effets stimulants au niveau du système nerveux central et du cœur. Leur consommation excessive peut entraîner des irritations des intestins et induire une dépendance physique (anxiété, fatigue) [59]. Les effets de la théobromine sont similaires aux précédents mais moins marqués sauf pour son caractère diurétique qui est plus important [58].

### 3.6. Les composés volatils et les anions organiques

Les feuilles de thé contiennent également des composés volatils aromatiques. L'étude de ces derniers a commencé il y a 60 ans avec l'identification du linalol, du géraniol et du (Z)-3-hexénol comme composés présents dans la fraction volatile des feuilles ou des liqueurs

[60]. Depuis, de nombreuses études ont permis de porter à plus de 600 le nombre de composés volatils identifiés [61] [62]. Les feuilles de thé contiennent également des anions organiques simples comme les formiates, acétates et oxalates [54].

### 3.7. Techniques d'analyses

La littérature fait état de divers modes opératoires pour permettre l'analyse des catéchines et alcaloïdes du thé par HPLC-UV-MS. Les colonnes les plus appropriées sont les colonnes en C18, désactivées, « endcapped » et monomériques. La désactivation permet de limiter les interactions indésirables entre les composés analysés et la partie silicatée de la phase stationnaire [63]. La phase mobile, quant à elle, ne peut pas uniquement être composée de méthanol en mode isocratique et doit contenir de l'acide, les plus utilisés étant le trifluoroacide (TFA), l'acide formique ou encore l'acide acétique. Cet ajout d'acide limite les interactions entre certains composés du thé (comme l'EGCG et l'ECG) et la phase stationnaire.

Il a été établi que les deux phases mobiles suivantes sont équivalentes quant à la qualité de la séparation des catéchines du thé [63] :

- eau + 0,05 % TFA et acétonitrile + 0,05 % TFA ;
- eau + 0,05% TFA et MeOH-ACN 60/40 + 0,05% TFA.

Le couplage de l'HPLC avec la spectrométrie de masse a été également beaucoup utilisé. Différentes études ont été conduites concernant la détection des catéchines et de la caféine dans les échantillons biologiques par spectrométrie de masse, résultats rassemblés dans un aperçu exhaustif de [64].

### 3.8. Les effets bénéfiques de l'epigallocatechine gallate (EGCG)

L'épigallocatechine gallate (EGCG) est la principale catéchine, un polyphénol, que l'on trouve dans le thé vert. c'est un puissant antioxydant capable de neutraliser les espèces réactives oxygénées et les radicaux libres lourdement impliqués dans le vieillissement et les maladies chroniques dégénératives. la recherche a montré que l'EGCG pourrait avoir des effets bénéfiques dans le cas de nombreuses maladies, incluant le cancer, l'athérosclérose, le diabète, les maladies neurodégénératives ou l'excès de poids [65] [66].

#### 3.8.1. Effet protecteur contre le cancer

Plusieurs études épidémiologiques suggèrent que les personnes buvant régulièrement du thé vert ont des cancers moins fréquents et moins graves. Des chercheurs ont examiné de quelle façon l'EGCG affectait la cyclooxygénase (cox-2) dans des cellules humaines de cancer de la prostate, la surexpression de la Cox-2 a été impliquée dans de nombreuses maladies incluant les cancers. Ils ont démontré que l'EGCG inhibe la Cox-2 sans affecter l'expression de la Cox-1 dans les cellules humaines de cancer de prostate, qu'ils soient ou non dépendantes des androgènes.

Dans une autre étude, l'EGCG de thé vert a affecté l'activité et l'expression du PSA (antigène spécifique de la prostate). Celui-ci est capable d'affecter la migration des cellules – les métastases – ou d'autres processus important du cancer [66].

#### 3.8.2. Préserve les cellules cérébrales

Le stress oxydant résultant de l'inflammation peut jouer un rôle crucial dans les maladies neurodégénératives. Chez l'animal, après une ischémie unilatérale cérébrales et de l'œdème cérébral [65].

La mort des cellules nerveuses qui se produit dans les maladies de Parkinson ou d'Alzheimer ou dans d'autres maladies neurodégénératives ne résulte pas

seulement de lésions oxydatives mais de toute une série de réaction neurochimique, l'excès de fer ou une accumulation de protéines dangereuses, comme les béta-amyloïdes. L'EGCG pourrait interrompre cette réaction en chaîne et représenter ainsi un agent préventif ou thérapeutique pour les maladies d'Alzheimer ou Parkinson [67].

### 3.8.3. Prévient l'obésité et le diabète

Les gens consommant du thé vert depuis de longues années ont souvent un plus faible pourcentage de masse grasse, un tour de taille plus petit. Des études d'intervention ont montré que la consommation de thé vert pouvait réduire le poids corporel et la masse grasse abdominale, ainsi qu'accroître l'oxydation des graisses et les dépenses d'énergie. L'EGCG régule les gènes impliqués dans l'oxydation et le stockage des graisses, ainsi que ceux de la signalisation de l'insuline et du métabolisme du glucose.

En abaissant la production de glucose dans les cellules du foie et en réduisant l'activité des gènes stimulant la production du glucose, l'EGCG imite l'insuline. Chez des sujets volontaires, l'absorption d'une dose d'un gramme et demi de thé vert au cours de tests de tolérance au glucose favorisait un métabolisme sain du glucose.

Chez les souris diabétiques le thé vert diminuait les niveaux de glucose sanguin, deux à six heures après son absorption, sans affecter les niveaux d'insuline sérique [68]. Des travaux indiquent également que l'EGCG diminue l'appétit, le poids corporel, le sucre sanguin et les niveaux d'insuline. Elle inhibe également l'activité de l'amylase, une enzyme digérant l'amidon étant dégradé plus lentement, l'augmentation du glucose sérique est limitée, réduisant les envies irrésistibles de grignoter entre les repas [69].

### 3.8.4. Protège le système cardiovasculaire

Grâce à son puissant pouvoir antioxydant, l'EGCG neutralise les radicaux libres et les espèces oxygénées réactives responsables de lésions cellulaires susceptibles de produire des maladies cardiaques.

L'EGCG améliore la fonction endothéliale et le flux sanguin chez les patients souffrant de maladies des artères coronaires. Elle exerce de nombreux effets vasculaires protecteurs à travers différents mécanismes, incluant des effets antioxydants, anti-inflammatoires, anti-thrombose, anti-proliférateurs et en abaissant les lipides. Elle est également capable de réguler le tonus vasculaire [70].

L'EGCG active la NO synthase endothéliale dans les cellules tapissant les vaisseaux sanguins ou les cellules endothéliales. Augmenter la libération de l'oxyde nitrique provoque la dilatation des parois des vaisseaux et améliorant le flux sanguin.

L'EGCG réduit également l'expression des cytokines cellulaires qui favorisent l'inflammation sous tendant l'athérosclérose et les maladies cardiovasculaires. Elle pourrait ainsi inhiber l'inflammation et la prolifération des cellules des muscles lisses dans la paroi des vaisseaux sanguins prévenant le blocage vasculaire [71].

Des chercheurs ont regardé si des polyphénols de thé vert pouvait influencer la prolifération et la migration des cellules vasculaires lisses. Des niveaux élevés de LDL stimulent la prolifération des cellules vasculaires musculaires lisses. Les chercheurs ont donc traité des cellules de muscles lisses vasculaires de rat avec des LDL en présence ou non de polyphénols de thé vert et ont ensuite déterminé le taux de prolifération. Par rapport aux cellules non traitées, l'inhibition par les polyphénols de thé vert de la prolifération des cellules des muscles lisses vasculaires induite par le LDL était dose dépendante [71].

### 3.9. Caractéristiques gustatives des polyphénols

#### 3.9.1. Composés phénoliques simples

La détermination des caractéristiques gustatives et olfactives des composés phénoliques et de leurs seuils de détection dans différents milieu a fait l'objet de nombreuses publications [72] [73] [74] [75] [76].

Le mélange de composés phénoliques peut produire des effets synergiques, antagonistes ou simplement additifs. Par exemple, les seuils de perception de mélanges d'acides phénols inférieurs à ceux de chacune des molécules indiquent un effet synergique

entre elle [75]. En revanche, la saveur sucrée vanillée des acides vanillique ou férulique masque l'amertume de la quercétine [72].

#### 3.9.1.1. Amertume

Les exemples les plus marquants des composés phénoliques amers, qui seront développés, sont certainement l'oléuropéine, dans l'olive, et les dérivés de la naringine, qui impliqués dans la saveur des agrumes. D'autres constituants phénoliques présentent aussi ce caractère mais il est généralement accompagné d'attributs sensoriels tels que l'astringence, l'acidité ou certains arômes, ce qui rend difficile l'interprétation des résultats.

L'épicatéchine est plus amère que son isomère la catéchine. Cette amertume supérieure, qui se traduit à la fois par une intensité maximale supérieure et une durée totale plus élevée, est probablement liée aux conformations différentes de l'hétérocycle dans les deux molécules [77]. En effet, la configuration plus plane du noyau C de l'épicatéchine [78], limite les possibilités d'interactions de l'hydroxyle en 3 avec le groupement CH<sub>2</sub> en position 4 et par conséquent induit un caractère lipophile plus marqué [79], qui pourrait être à l'origine de la plus forte amertume. L'épigallocatechine et les flavonols monomère galloylés, gallate d'épicatéchine et gallate d'épigallocatechine, sont également plus amers que les catéchines [80].

#### 3.9.1.2. Astringence

Bien que l'astringence soit théoriquement associée aux composés phénoliques portant plusieurs noyaux di-ou tri-hydroxyphénols, seuls capables de servir de "ponts" entre les molécules protéiques, de nombreuses expériences d'analyse sensorielle ont établi que des molécules plus simples, comme certains acides phénols les flavonols monomères ou les flavonols présentent aussi ce caractère.

Parmi les composés du thé, les théaflavines présentent, comme les catéchines, un caractère astringent et asséchant mais avec un seuil de perception dans l'eau nettement

inférieur (10 mg/l) [81]. dans cette même étude, la flavonols glycosides ont été décrits comme veloutés et asséchant à des doses extrêmement faibles (inférieures au mg/l pour certains). Ils pourraient donc de jouer un rôle essentiel dans les caractéristiques gustatives du thé. La présence de traces de flavonols pourrait aussi être à l'origine du caractère de "rondeur" attribué à une fraction anthocyanique [82], puisque ce résultat n'a pu être confirmé sur des anthocyanes purifiés [83]. Il convient cependant de remarquer que des contaminants apportés par les solvants utilisés pour l'isolement des fractions pourraient également contribuer à cette perception.

### 3.9.2. Influence du milieu

La perception des goûts et notamment celle de l'amertume et de l'astringence est profondément affectée par les autres constituants du milieu. De nombreuses expérimentations visant à préciser l'impact de la matrice et de l'environnement sur la perception des polyphénols ont été récemment réalisées. Parmi les facteurs qui interfèrent avec les polyphénols dans l'aliments, l'alcool, l'acidité et , d'une manière générale, la présence de substances susceptibles de modifier la viscosité ou former des complexes avec les composés phénoliques sont particulièrement importants.

#### 3.9.2.1. Effet de l'alcool

Le seuil de perception de la catéchine dans l'eau [73] est deux fois supérieur à celui mesuré dans l'alcool à 5% ou la bière [72]. L'amertume de la catéchine dans un vin blanc reconstitué augmente significativement lorsque la teneur en éthanol passe de 8 à 11 puis à 14 %. Le même effet est observé sur une fraction de tanins de raisin dégustée dans des solutions contenant 11, 13 et 15% d'éthanol [82]. La présence d'alcool renforce également cette sensation dans le cidre. Ces observations pourraient s'expliquer par un transport accru des molécules amères à travers la membrane des papilles gustatives, par suit d'une solubilisation par l'éthanol [84] ou d'une désorganisation de la bicouche lipidique des membranes. Elle pourrait aussi résulter d'une interaction directe de l'éthanol avec les protéines des récepteurs puisque ce dernier présente également une certaine amertume [85].

Par ailleurs, l'astringence du cidre diminue lorsque le degré alcoolique augmente [86] [87]. Cet effet pourrait résulter d'une stimulation de la salivation par l'alcool [88]. Cependant, la précipitation des tannins par séralbumine bovine [89], et par les gélatines et les peptides riches en proline [90] est également plus faible en présence d'éthanol. Une meilleure solubilité des complexes tanins-protéine en milieu hydroalcoolique a été invoquée pour expliquer ce phénomène [90] mais il est aussi possible que l'éthanol rompe les liaisons hydrogène, limitant ainsi les interactions entre tanins et protéine [84] [86]. Enfin la présence d'alcool pourrait aussi induire un "durcissement" de la sensation tannique, du fait de l'augmentation concomitante de l'amertume [91].

#### 3.9.2.2. Effet de l'acidité

L'abaissement du pH ne modifie pas l'amertume des polyphénols mais il se traduit par une augmentation significative de leur astringence en solution modèle et dans les vins [92] [93]. Ce phénomène n'est pas observé dans certains vins rouges, soit parce que les variations liées à l'acidité sont trop faibles en regard de l'intensité tannique, soit parce que la perception est limitée par la quantité de protéine salivaires disponible [92]. L'effet mesuré est indépendant de la nature de l'acide et semble strictement lié au pH de la solution. Il pourrait s'expliquer par la plus forte proportion de molécules sous forme d'ion phénolates, incapables d'établir des liaisons H avec les protéines aux pH les plus élevés. Cependant, les valeurs des pKa des groupements hydroxyles des polyphénols ( $\text{pH} < 8$ ) rendent ce mécanisme improbable dans la gamme de pH considérée (2.6 - 3.8) [94] [95] [96].

#### 3.9.2.3. Sucres et viscosité

La suppression des goût amers et sucrés l'un par l'autre est un phénomène bien connu des scientifiques [97] [98] [99].

Ce phénomène est réciproque mais asymétrique, le goût sucré étant plus efficace à masquer l'amertume [98] cette propriété, commune à toutes les molécules édulcorantes, est directement liée à leur caractère sucré.

La présence de molécules sucrantes diminue la sensation de dessèchement buccal et l'amertume de l'acide tannique [100] ainsi que l'astringence d'une solution d'alun [101]. L'impacte des composés sur l'astringence apparaît principalement lié à leur viscosité. Ces résultats suggèrent que l'augmentation de viscosité compense la perte du pouvoir lubrifiant de la salive induite par la présence de tanins. Cependant ils peuvent aussi résulter d'une complétion entre l'agent visqueux et les protéines salivaires vis-à-vis des tanins [91].

#### 3.9.2.4. Phénomène d'interaction

La perception gustative des tanins peut être modifiée par la présence de diverses molécules comme les polysaccharides, les protéines ou la caféine. La diminution d'astringence induite par ces substances peut être interprétée comme un phénomène de compétition avec les protéines salivaires pour la formation de complexes avec les tanins. Un phénomène, mis à profit par les techniques de collage protéique, se traduit par l'apparition d'un précipité mais il semble qu'une assez forte proportion des complexes formés reste en solution [102]. Un phénomène analogue se produit avec la caséine apportée par l'addition de lait au thé ou au café [80], les polyphénols dans ce cas inclus dans les micelles de caséine solubles [103]. Parallèlement, les tanins du thé forment avec la caféine des complexes à la fois moins amers que la caféine et moins astringents que les tanins, dont la fraction insoluble constitue "la crème du thé" [53] [104].

La suppression de l'astringence de l'acide gallique par les sels d'aluminium, pourtant également astringent, est aussi imputée à un phénomène de complexation, diminuant les possibilités d'interaction de chacun de ces partenaires avec les protéines salivaires [105]. De même, la diminution de l'astringence observée au cours de la maturation de certains fruits serait liée à l'accumulation de pectines solubles capables d'interagir avec les tanins [106]. Un effet des pectines sur l'astringence des vins ou des cidres peut de la même façon être envisagé [107].

## Chapitre 4

# LE STRESS OXYDATIF

### 4.1. Définition

Le stress oxydatif est le déséquilibre entre la génération des ERO (espèces réactives oxygénées) et la capacité du corps à les neutraliser et à préparer le dommage oxydatif [108]. Il correspond à une perturbation du statut oxydatif intracellulaire [109].

### 4.2. 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 » [110].

### 4.3. Les radicaux libres

#### 4.3.1. Définition

Un radical libre est une molécule ou un atome ayant un ou plusieurs électrons non appariés, ce qui le rend extrêmement réactif [111]. L'ensemble des radicaux libres et leurs précurseurs est souvent appelé *espèces réactives de l'oxygène* [110].

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 ( $ONOO^-$ ) [112].

#### 4.3.2. 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.
- 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 [113].

#### 4.3.3. 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 [110].

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 [110].

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 [110].

L'ingestion d'alcool est suivie de la formation de radicaux libre selon divers mécanismes, également des antibiotiques, des anticancéreux [113]. L'infection au VIH a pour effet d'accroître la production de radicaux libres dans l'organisme [114] (Hosein et Lytle, 2001).

#### 4.4. 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 [110].

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 [113]. Ils inhibent la sécrétion d'insuline [115], modifient les structures primaires, secondaires et tertiaires des protéines [116].

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 glycosoxydation est très important chez les diabétiques et contribue à la fragilité de leurs parois vasculaires et de leur rétine [110].

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 [110], maladie de parkinson, les inflammations gastro-intestinales, ulcères [117], les oedèmes et vieillissement prématurée de la peau [118].

#### 4.5. Les antioxydants

##### 4.5.1. Définition

Un antioxydant est défini comme étant substance qui peut retarder ou empêcher l'oxydation des substrats biologiques [108]. Ce sont des composés qui réagissent avec les radicaux libres et les rendent ainsi inoffensifs [111].

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 [108].

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 la 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 [111].

D'un point de vue biologique, les composés antioxydants peuvent protéger les systèmes cellulaires des effets des processus potentiellement nocifs qui causent l'oxydation

excessive, ils sont la stratégie préventive la plus prometteuse contre la formation des cataractes [119].

#### 4.5.2. 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 [116].

#### 4.5.3. 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 [120].

- ❖ La vitamine E est un antioxydant important qui protège les cellules contre les dommages associés aux radicaux libres [121] et par conséquent, prolonge la vie cellulaire tout en ralentissant le processus de vieillissement [122] et la diminution de l'athérosclérose [123].
  
- ❖ 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 junctions [124]. 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 [119].
  
- ❖ La vitamine C est largement répandue dans les fruits [111], 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 [125]. 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 [126]. Des études animales avec du  $\beta$ -carotène [127] et de l'acide  $\alpha$ -lipoïque [128] 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 [129]. L'acide lipoïque réduit la glycation et favorise le transfert du glucose sanguin aux cellules en stimulant l'activité insulinaire [130].

La prise des composés phénoliques a été largement rapportée pour protéger contre le développement de maladies coronariennes. De nombreuses preuves existent montrant que les composés phénoliques peuvent prévenir l'oxydation des LDL [131].

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 des par beaucoup 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 [132].

Des études en laboratoire présentées à une réunion de l'Américain Chémical Society en septembre 1997 ont démontré que le gallate d'epigallocatechine 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 [133].

Serafini et al, (2000) ont trouvé qu'à la fois le thé noire et le thé vert étaient capables d'inhiber l'oxydation des LDL. Mcanlis et al, (1998) ont échoué à trouver un effet significatif.

Ohran et al, (1990) ont examiné plusieurs composés naturels et synthétiques sur des caractères induits par du sélénite chez le rat, et ont montré que du dicloferae (60%), de la vitamine C (58%) et de quercétine (40%) sont protecteurs.

Il semble que la capacité antioxydante d'un flavonoïde dépend de son affinité pour les radicaux libres et donc de sa structure : la présence de deux hydroxyles en ortho sur le noyau B, la conjugaison du noyau B au groupe oxo en 4 via la double liaison en 2,3 sont des éléments favorables [134].

De récentes études ont suggéré que des suppléments glyconutritionnels (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 antioxydante accrue [108].

## Chapitre 5

### MATERIEL ET METHODES

Ce travail a été réalisé au niveau :

- Du laboratoire Agro-biotech de l'université de Liège- Belgique du 02/02/2011 au 25/02/2011;
- Du laboratoire central de l'intendance, durant une période 10/04/2011 au 25/09/2011;
- De l'industrie laitière de Beni tamou "LBT-Lactalis" du 02/05/2011 au 20/07/2011 ;
- ainsi qu'au niveau de l'animalerie de l'institut Pasteur d'Algérie, service d'Ecologie et de maladies vectorielles, du 05/06/2011 au 10/07/2011.

#### 5.1. Matériels

##### 5.1.1. Matériel végétal

Thé vert chinois de 1<sup>er</sup> choix (*Camellia sinensis*) vendu en Europe ramené de Belgique.



Figure 5.1 : Thé vert (*Camellia sinensis*)

### 5.1.2. Matériel biologique

#### ❖ Souches bactériennes utilisées

Les souches de bactéries lactiques utilisées pour étude de la cinétique de leur croissance en présence des polyphénols totaux extraits du thé vert, rentrant dans la préparation des ferments lactiques mésophiles sont :

*Lactobacillus casei* DN 114 001

*Lactobacillus plantarum* 229

*Pediococcus acidilactici* sp

#### ❖ Choix d'animaux

L'étude *in vivo* a été réalisé sur des souris blanches type Swiss dont le poids varie entre 18 et 25 g. L'objectif est de réaliser un test de toxicité des polyphénols totaux administré à une dose de 1ml à différentes concentrations (400 mg, 600mg, 800mg, et 2g) par gavage chaque jour aux souris.

### 5.1.3. Appareillage

(Voir appendice 1)

### 5.1.4. Réactifs et milieux de cultures

(Voir appendice 1)

## 5.2. Méthodes d'analyses

### 5.2.1. Méthodes d'analyses de la partie analytique du thé vert

#### 5.2.1.1. Méthode de dosage de la caféine :

#### ❖ Principe :

L'extraction de la caféine d'une prise d'essai avec de l'eau à 90°C en présence d'oxyde de magnésium, filtration puis détermination de la teneur en caféine par HPLC avec détection aux ultraviolets.

❖ Mode opératoire :

La détermination par HPLC selon le protocole du laboratoire central de l'intendance « ISO 1572 ».

- Peser 1g de thé vert dans un flacon de 500ml muni d'un bouchon ;
- Ajouter 4.5 g d'oxyde de Magnésium et 300ml H<sub>2</sub>O distillée (peser le tout) ;
- Mettre les flacons au bain marie à 90°C sous agitation continue pendant 20 min ;
- Après refroidissement, le poids doit être identique ;
- Filtrer sur membrane de 0.45µm ;
- Prendre 1ml de filtrat dans une fiole de 10ml et compléter à 10 ml et homogénéiser ;
- A l'aide d'une seringue HPLC prendre 25µl, et injecter dans l'HPLC, puis l'étalon de la caféine.

Solution mère de caféine : Dissoudre 0.125g de caféine dans 250 ml d'eau distillée (50 ml de solution étalon + 200 ml H<sub>2</sub>O).

Solution étalon : 0.05g/l (5 ml de la solution mère dans 50 ml d'eau distillée).

❖ Lecture : La teneur en caféine de l'échantillon, exprimée en % :

$$\frac{Ax}{Ac} \times Cb \times \frac{10 \times 300}{1 \times m^0 \times 100} \times \frac{100}{W} \times 100$$

Ax : aire du pic de l'échantillon.

Ac : aire du pic de la solution étalon.

m<sup>0</sup> : la masse en g de la prise d'essai

Cb : concentration de la solution étalon de caféine en g/l

W : la teneur en matière sèche, exprimée en % en masse de l'échantillon.

$w = Rs = 100 - H$
--------------------

W=Rs : matière sèche ; H : humidité

### 5.2.1.2. Méthode d'extraction des polyphénols totaux

Les composés phénoliques solubles sont généralement extraits en utilisant des solvants polaires tels que l'eau, le méthanol, l'éthanol ou l'acétone [135].

Il existe plusieurs méthodes d'extraction des polyphénols à partir des feuilles de thé, les plus utilisées sont celles par reflux de chaleur [136] [137], extraction à température ambiante [138], extraction par ultra-son [137] [139], et l'extraction par micro-ondes [139].

Dans notre étude, on a choisi 4 modes d'extraction : celles par l'eau, extraction par solvant organique à température ambiante, ainsi par reflux de chaleur, et l'extraction par ultra-son. Ces méthodes d'extraction ont été appliquées pour extraire les composés phénoliques du thé vert. Les diagrammes ci-dessous (Figures 5.2 ; 5.3 ; 5.4 ; 5.5) illustrent en détail les démarches principales de chaque type d'extraction :

#### ❖ *Extraction par l'eau*

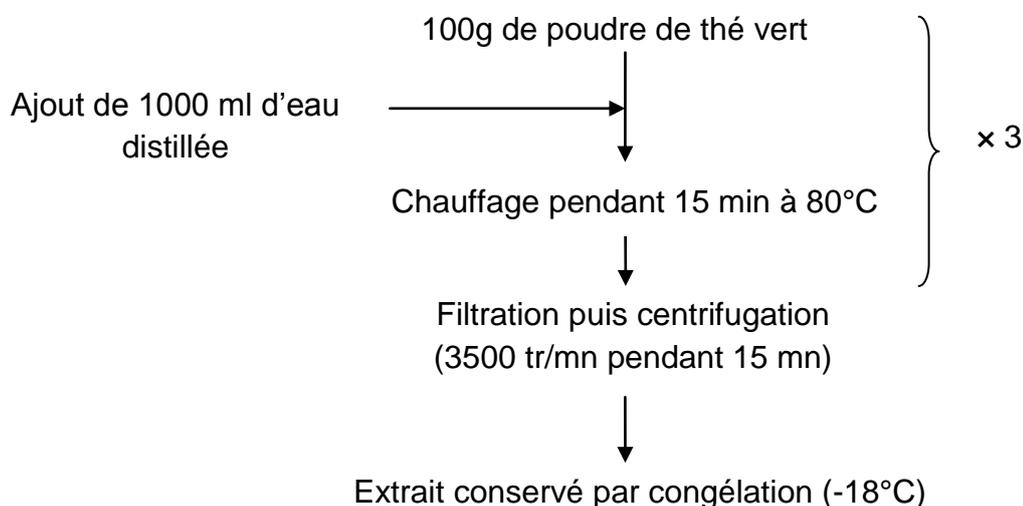


Figure 5.2 : Extraction des polyphénols du thé vert par l'eau [135] [139].

❖ Extraction par solvant organique à température ambiante

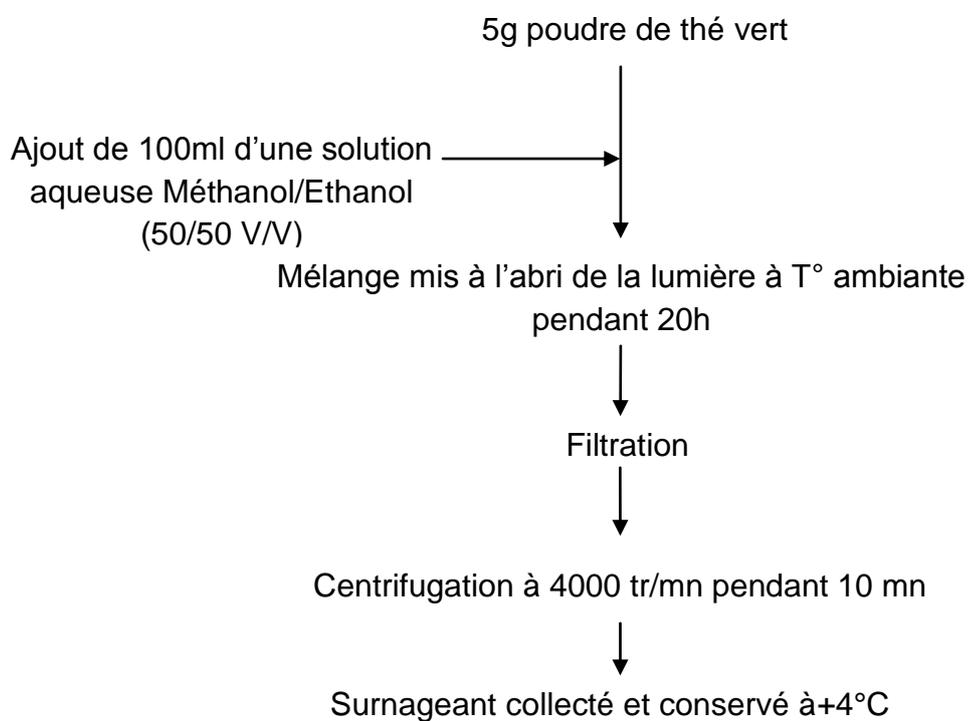


Figure 5.3 : Diagramme d'extraction des polyphénols du thé par solvant organique à température ambiante [138].

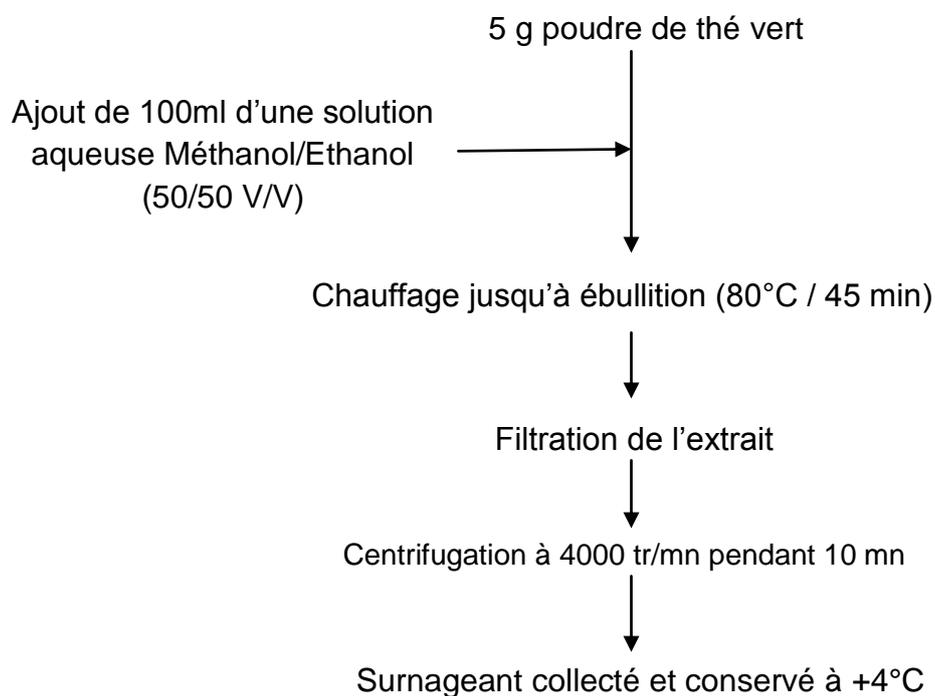
❖ Extraction par solvant organique à reflux de chaleur

Figure 5.4 : Diagramme d'extraction des polyphénols du thé vert par reflux de chaleur  
[136]

Le rendement d'extraction exprime le rapport entre le poids du résidu sec de l'extrait et le poids du produit à traiter [136]. Le rendement, exprimé en pourcentage, est calculé par la formule suivante pour les 4 procédés d'extraction :

$$R (\%) = \frac{\text{masse du résidu extrait}}{\text{masse de la prise traitée}} \times 100$$

❖ Extraction par ultra-son

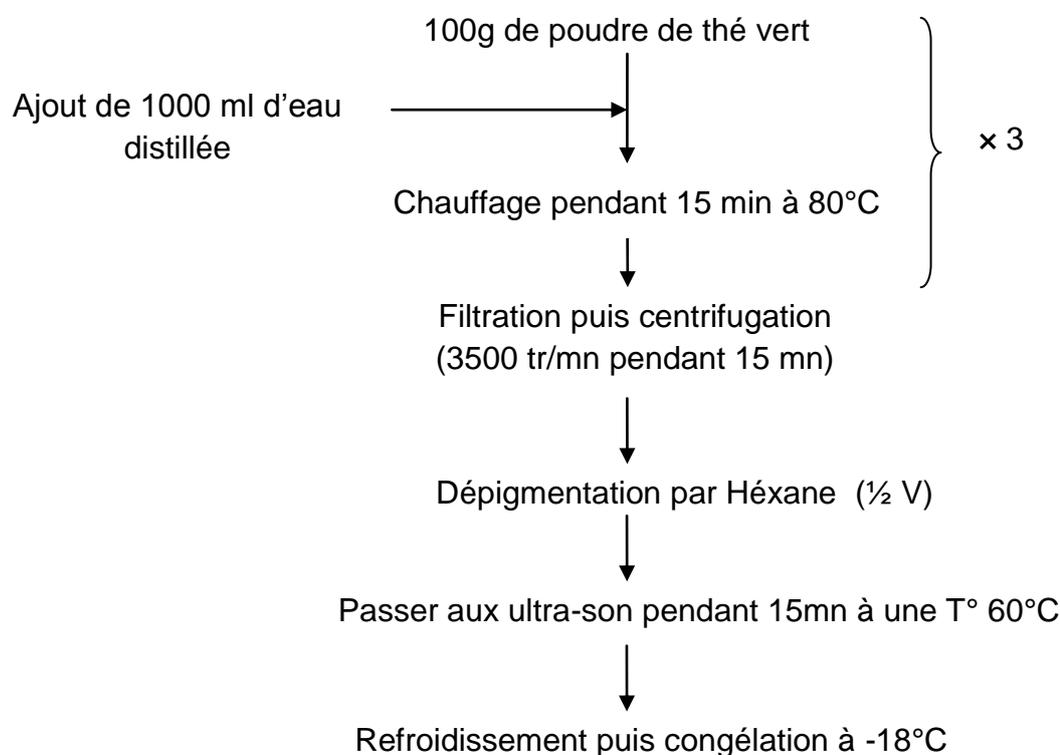


Figure 5.5 : Extraction des polyphénols du thé vert par ultra-son [137] [139].

5.2.1.3. Méthode de 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 présentes dans l'extrait analysé [140].

❖ Mode opératoire :

Les polyphénols totaux ont été déterminés par spectrophotométrie, suivant le protocole appliqué par Miliauskas (2004) [141] :

- ✓ 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 ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) 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 (Fig 5.6) en suivant les mêmes étapes du dosage.

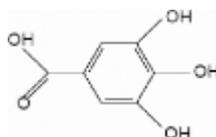


Figure 5.6 : L'acide gallique (Acide 3,4,5 hydroxybenzoïque).

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).

#### 5.2.1.4. Méthode de dosage des flavonoïdes

❖ Principe :

La quantification du contenu flavonoïque est estimée par la méthode d'AlCl<sub>3</sub>, selon le protocole modifié de: Kumaran et Karunakaran, (2005) [142].

❖ Mode opératoire :

- Introduire dans un tube, 1ml de l'extrait de thé vert dans lequel on ajoute 1 ml de la solution trichloride d'aluminium (AlCl<sub>3</sub>) 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.

A<sub>0</sub> : Absorbance de la solution quercétine.

m : masse de l'extrait de thé (mg).

m<sub>0</sub> : masse de la quercétine dans la solution.

#### 5.2.1.5. Méthode d'identification des polyphénols totaux

- ❖ Principe : L'identification de la composition des polyphénols totaux extrait du thé vert s'effectue par HPLC, en utilisant la catéchine comme étalon.
- ❖ Mode opératoire :
  - ✓ L'extrait des polyphénols totaux utilisé et celui de la méthode d'extraction par eau passé aux ultra-sons.
  - ✓ A l'aide d'une seringue d'HPLC, prendre 25µl, injecter successivement dans l'HPLC les polyphénols totaux extrait du thé vert, puis la catéchine comme étalon.

Les caractéristiques de l'HPLC :

- ✓ Colonne C18 150x4.6mm 3µm Hypersil® BDS C8;
  - ✓ Débit 0.4ml/mn;
  - ✓ Phase mobile 30% méthanol (CH<sub>3</sub>OH): 70% eau distillée (H<sub>2</sub>O) ;
  - ✓ Volume d'injection 25 µl ( polyphénols totaux extrait du thé vert ; catéchine).
- 
- ❖ Lecture : La composition des polyphénols totaux extrait du thé vert est exprimé par des pics et en %.

## 5.2.2. Méthodes des tests biologiques

### 5.2.2.1. Test d'activité antioxydante (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.

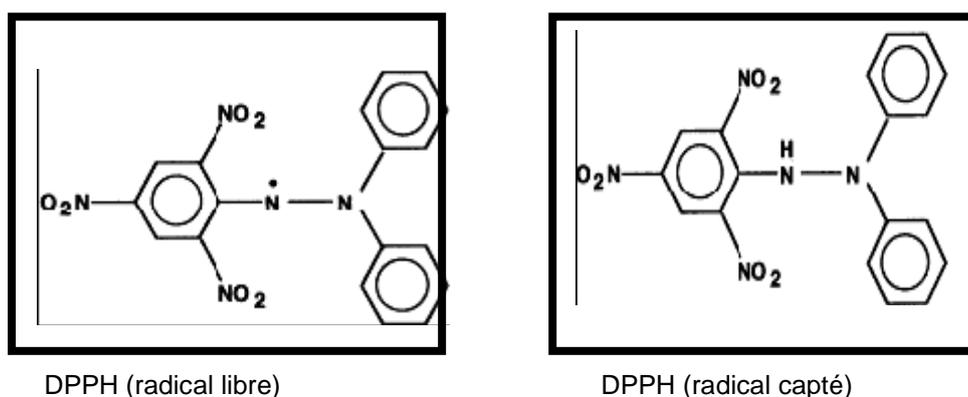


Figure 5.7 : Forme libre et réduite du DPPH [143].

#### ❖ Mode opératoire : [138]

- 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 :

$$\frac{A1 - A2}{A1} \times 100$$

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.

#### 5.2.2.2. Test d'activité antibactérienne

Les composés phénoliques sont doués d'un effet inhibiteur sur la croissance bactérienne. À partir de là, on a testé notre extrait de thé en présence de différentes souches bactériennes pathogènes, pour mettre en évidence et évaluer cette propriété [31].

##### ❖ 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.

L'antibiotique commence à diffuser dès son application sur le milieu de culture, et pour favoriser la croissance bactérienne, ces boîtes sont incubées dans l'étuve pendant 24 heures ou plus selon la bactérie. L'effet d'antibiotique sur la croissance bactérienne se traduit par la présence d'une zone appelée «

zone inhibition » dépourvue de bactéries. Le même principe est suivi dans notre étude.

❖ Mode opératoire : [144]

➤ Les souches testées :

On a choisi de travailler sur 4 espèces pathogènes que sont : le *Géobacillus stéarothermophilus*, *Bacillus subtilis*, *Aspergillus niger*, *Candida albicans*.

➤ Repiquage des bactéries :

- ✓ Les bactéries sont ensemencées sur des boîtes de pétri contenant les milieux spécifiques et incubées pendant 24 heures, afin d'obtenir une culture jeune des bactéries et des colonies isolées.
- ✓ A partir de ces boîtes, des colonies isolées des différentes bactéries sont incubées pendant 24 heures dans des bouillants 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 minutes à 120°C. Ces disques stériles sont plongés dans l'extrait du thé vert contenant des polyphénols totaux déjà identifiés.

➤ Application du test :

- ✓ Dans des boîtes de pétri stériles, les milieux de culture : trypticase de soja pour *Géobacillus stéarothermophilus* ; milieu pour rechercher des substances inhibitrices de *Bacillus subtilis* ; 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 100µl de la suspension bactérienne sont déposées et ensemencées à l'aide d'un râteau ;
- ✓ Imbiber les disques par l'extrait du thé vert obtenu par ultra-son contenant des polyphénols et déposé sur la surface de la gélose ;
- ✓ Incubées à 55°C pour *Géobacillus stéarothermophilus*, 37°C pour *Bacillus subtilis*, et 22°C pour *Aspergillus niger* et *Candida albicans* pendant 24 heures.

### 5.2.2.3. Test de toxicité sur modèle animal

#### ❖ Principe :

C'est le test de mortalité qui s'effectue par la mort de 50% de souris (DL<sub>50</sub>), exprimé par la dose létale qui tue 50% de souris.

#### ❖ Mode opératoire :

- ✓ Administrer par gavage aux souris la quantité de 1ml de chaque dose (400 mg, 600 mg, 800 mg, 2 g) des polyphénols totaux extrait du thé vert ;
- ✓ Administrer cet extrait (polyphénols totaux) chaque jour jusqu'à l'obtention la DL<sub>50</sub>

#### ❖ Lecture :

La dose létale exprimée par 50% de souris mortes (DL<sub>50</sub>).

### 5.2.3. Méthode d'étude de la cinétique de croissance des bactéries lactiques

#### ❖ Principe :

C'est le test d'inhibition des ferments lactiques mésophiles, en présence de différentes concentrations d'antioxydants (polyphénols du thé vert), qui se fait sur milieu liquide en utilisant la méthode spectrophotométrique.

#### ❖ Mode opératoire :

- ✓ Préparer 1L de milieu liquide MRS stérile, (bouillon MRS 800ml + 200ml Glucose, mélanger dans des conditions stériles).
- ✓ Répartir 100ml dans les fioles de 250ml aseptiquement.
- ✓ Ajouter la quantité de l'extrait du thé (polyphénols totaux du thé vert) dans les fioles.
- ✓ Inoculer le milieu de culture avec la quantité permettant d'augmenter la DO du milieu de 0.02.
- ✓ Incuber à 30°C.

❖ Lecture des résultats :

Lecture par spectrophotomètre (600 nm et 480nm) se fait après 1h d'incubation puis après chaque 2h durant la journée, et qui peut aller jusqu'à 18h (le jour d'après).

#### 5.2.4. Méthodes d'analyses physico-chimiques

##### 5.2.4.1. Détermination de la teneur en eau

➤ Principe :

La teneur en eau est déterminée sur une partie aliquotée de 1 g d'échantillon (poudre de lait, thé) étalé dans une capsule en porcelaine puis séchée dans une étuve, à la pression atmosphérique, à une température de  $103 \pm 2$  °C.

➤ Mode opératoire

Les échantillons ont été séchés à  $103 \pm 2$  °C pendant 3 heures, puis pesés et l'opération est répétée jusqu'à l'obtention d'un poids constant (en réduisant la durée de séchage à 30 mn).

➤ Lecture :

La teneur en eau est déterminée selon la formule suivante :

$$H\% = \frac{(M1 - M2)}{P} \cdot 100$$

Soit :

H % : Humidité.

M1 : Masse de la capsule + matière fraîche avant étuvage.

M2 : Masse de l'ensemble après étuvage.

P : Masse de la prise d'essai.

La teneur en matière sèche (extrait sec total) est calculée comme suit :

$$EST \% = 100 - H\%$$

#### 5.2.4.2. Détermination du pH (NF V 05-108, 1970)

➤ Principe :

Détermination en unité pH de la différence de potentiel existant entre deux électrodes en verre plongées dans une solution aqueuse de l'extrait de thé vert, et du fromage frais.

➤ Mode opératoire :

- ✓ rincer les électrodes de pH mètre avec l'eau distillée ;
- ✓ calibrer le pH mètre avec les étalons (pH 4, 7 et 14) ;
- ✓ rincer à nouveau avec l'eau distillée ;
- ✓ Plonger les électrodes dans la solution ;
- ✓ Rincer à nouveau les électrodes, les mettre dans une solution de KOH.

➤ Lecture :

Lire la valeur indiquée par le pH mètre.

#### 5.2.4.3. Détermination de l'acidité titrable [145]

➤ Principe :

Titration de l'acidité d'une solution aqueuse avec une solution d'hydroxyde de sodium NaOH (N/9) en présence d'un indicateur coloré de la phénolphtaléine.

➤ Mode opératoire :

- Peser 2 g de l'échantillon à analyser (lait cru, poudre de lait, crème fraîche, lait reconstitué, caillé maigre) ;
- Ajouter 18 ml d'eau distillée, puis mélanger jusqu'à l'obtention d'un liquide homogène ;
- Laisser au repos 2 mn ;
- Ajouter 5 gouttes de phénolphtaléine ;

- Titrer avec de la solution d'hydroxyde de sodium NaOH (N/9) en agitant jusqu'à l'apparition d'une couleur rose qui persiste pendant 30 secondes.

➤ Expression des résultats

L'acidité est exprimée en degré dornic (°D) qui correspond 0.1ml de la soude.

$$\text{Acidité (°D)} = V.10$$

#### 5.2.4.4. Détermination de la densité

➤ Principe :

La densité d'une substance à 20°C par rapport à l'eau à 4°C est le rapport de la masse volumique de ce corps à 20°C sur la masse volumique de l'eau à 4°C. Elle s'exprime par un nombre décimal sans dimension. La densité d'un liquide peut être déterminée par plusieurs méthodes, notamment la mesure de sa densité à l'aide d'un densimètre (lactodensimètre).

➤ Mode opératoire :

Pour la détermination de la densité de lait cru / lait reconstitué, on procède à la vérification de la température du produit qui doit être égale à 20°C, puis on remplit l'éprouvette de façon inclinée pour éviter la formation de la mousse qui peut fausser la lecture. On plonge le lactodensimètre dans le lait et on attend jusqu'à la stabilisation du dispositif.

➤ Expression des résultats :

La lecture est effectuée directement, c'est la valeur de l'intersection du lactodensimètre avec le lait. Elle est exprimée en g/cm<sup>3</sup> (Kg/m<sup>3</sup>).

#### 5.2.4.5. Détermination de la matière grasse [145]

- But : Détermination de la matière grasse par la méthode acido-butyrométrique dite de Gerber. La méthode dite Gerber est une Technique Conventiennelle permettant d'évaluer la teneur en matière grasse du lait ou le taux butyreux, qui est le nombre de gramme de substance de matière grasse (MG) dans un kilogramme ou un litre de lait (g/l).

- Principe :

La détermination de la matière grasse, se fait par la méthode acido-butyrométrique de Gerber, dont le principe est basé sur la séparation de matière grasse de l'échantillon, par centrifugation dans un butyromètre, après attaque des éléments du lait, matière grasse exceptée, par l'acide sulfurique, la séparation de la matière grasse est favorisée par l'addition d'une petite quantité d'alcool iso amylique.

Le butyromètre est gradué de manière à donner par lecture directe le pourcentage en masse de matière grasse.

- Mode opératoire :

Dans le butyromètre de Gerber, on introduit 10ml d'acide sulfurique, suivi de 11ml de l'échantillon (lait cru, lait reconstitué, crème fraîche), puis 1ml d'alcool isoamylique.

- Expression des résultats :

On maintien le butyromètre verticalement et on ajuste le bouchon pour amener la colonne de la matière grasse jaune et limpide qui se distingue bien du reste du mélange de couleur brune dans la partie graduée. Le résultat est exprimé en pourcentage massique selon l'expression suivante :

$$MG = n_0 - n_1$$

Avec :

MG : Matière grasse (%).

$n_0$ : Valeur atteinte par le niveau supérieur de la colonne grasse (%).

$n_1$ : Valeur atteinte par le niveau inférieur de la colonne grasse (%).

#### 5.2.4.6. Détermination d'extrait sec dégraissé « ESD »

➤ But :

La détermination de l'extrait sec dégraissé permet d'évaluer la matière sèche de lait exempte de matière grasse, elle est exprimée en g/l ou en pourcentage.

➤ Calcul et expression des résultats :

Le résultat est donné par la formule suivante :

$$\text{ESD} = \text{EST} - \text{MG}$$

ESD : Extrait sec dégraissé en %

EST : Extrait sec total en %

MG : Matière grasse en %

#### 5.2.4.7. Détermination de la teneur en cendres (NF V05-113, 1972)

➤ Principe :

Le Thé est calcinée à 550 °C dans un four à moufle jusqu'à obtention d'une cendre blanchâtre de poids constant.

➤ Mode opératoire :

- Dans des capsules en porcelaine, peser 2 g d'échantillon ;
- Placer les capsules dans un four réglé à  $550 \pm 15$  °C durant 5 heures jusqu'à l'obtention d'une couleur grise, claire ou blanchâtre;
- Retirer les capsules du four et les mettre à refroidir dans le dessiccateur, puis les peser.

➤ Expression des résultats

$$MO\% = \frac{(M1 - M2)}{P} \times 100$$

MO % : Matière organique.

M1 : Masse de la capsule + prise d'essai

M2 : Masse de la capsule + cendres.

P : Masse de la prise d'essai.

La teneur en cendres (Cd) est obtenue en appliquant :

$$Cd = 100 - MO\%$$

5.2.4.8. Détermination de l'alcalinité (TA, TAC) (NF T 90-036)

L'alcalinité d'une eau correspond à la présence de bicarbonate ( $HCO_3$ ) et d'hydroxyde (OH).

➤ Principe :

L'évaluation de l'alcalinité d'une eau est basée sur la neutralisation d'un volume d'eau par un acide minéral dilué en présence d'un indicateur coloré. Le virage a lieu quand un excès d'acide agit sur les bicarbonates pour donner l'acide carbonique.

5.2.4.8.1. Titre alcalimétrique « TA » :

➤ But :

La mesure du titre alcalimétrique ou TA permet de connaître la teneur en eau à analyser en hydroxydes libres et en carbonates. Il est exprimé par la formule :

$$TA = [OH^-] + [CO_3^{2-}]$$

➤ Mode opératoire :

- ✓ On prélève 100ml d'eau à analyser dans un bécher ;
- ✓ Ajouter 2 gouttes de phénolphthaléine, une coloration rose doit se développer si la réaction est positive ;
- ✓ Verser doucement l'acide sulfurique (0,02N) à l'aide d'une burette ;
- ✓ Agiter constamment et ceci jusqu'à décoloration complète de la solution. Dans le cas contraire où la solution est incolore (cas le plus fréquent pour les eaux d'alimentation), le titre alcalimétrique est nul et le pH est inférieur à 8 c'est-à-dire que l'eau est dépourvue de carbonate.

➤ Expression des résultats :

$$TA = V$$

**TA** : titre alcalimétrique en °F.

**V** : volume de l'acide sulfurique en ml pour obtenir le virage.

Avec : 1°F correspond à 10mg de carbonate de calcium.

5.2.4.8.2. Titre alcalimétrique complet ou « TAC » :

➤ But :

La mesure du titre alcalimétrique complet ou TAC permet de connaître la teneur totale en hydroxydes, carbonates, hydrogénocarbonates.

L'expression est donnée par la formule suivante :

$$TAC = [OH^-] + [CO_3^{2-}] + [HCO_3^-]$$

➤ Mode opératoire :

On utilise l'échantillon traité précédemment ou le prélèvement primitif s'il n'y a pas eu de coloration. On ajoute 2 gouttes de solution de méthyle orange et on titre de nouveau avec la même solution d'acide jusqu'au virage du jaune au jaune orange (pH = 4,3).

➤ Expression des résultats :

Le résultat du **TAC** est donné par la lecture directe sur la burette du volume de l'acide sulfurique utilisé pour le titrage.

$$\text{TAC} = V$$

Où :

TAC : titre alcalimétrique complet en °F.

V : volume de l'acide sulfurique en ml versé depuis le début du dosage.

#### 5.2.4.9. Détermination du titre hydrométrique ou TH de l'eau

➤ But :

Le titre hydrométrique indique la teneur totale de l'eau en sel de calcium et magnésium. La dureté d'une eau est proportionnelle au nombre total de calcium et de magnésium qu'elle renferme. Elle est définie par l'expression suivante :

$$\text{TH} = [\text{Ca}^{2+}] + [\text{Mg}^{2+}]$$

➤ Principe :

C'est une méthode qui consiste à doser un volume d'eau avec le sel disodique d'acide éthylène diamine tétra acétique (**EDTA**), en présence d'indicateur coloré : le Noir Eriochrome T (NET) à 0,5% et la solution tampon ammoniacal à pH = 10.

Lors du titrage, l'EDTA réagit d'abord avec les ions  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Mg}^{2+}$  libres en solution puis au point d'équivalence avec les ions  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Mg}^{2+}$  combinés. Ce dernier (EDTA) est libre et provoque un changement de couleur du violet au bleu.

➤ Mode opératoire :

Dans un bécher de 250ml, on introduit 100ml d'eau à analyser puis on ajoute 5ml de solution tampon (pH = 10) et 2 gouttes de l'indicateur coloré NET. La solution doit se colorer en violet, on titre ensuite avec l'EDTA (0,02N) tout en agitant constamment jusqu'au virage du violet au bleu. Le point final est atteint lorsque la dernière nuance violette a disparue.

➤ Expression des résultats :

La dureté hydrométrique totale s'exprime en degré français selon la formule suivante :

$$TH = V$$

Où :

TH : titre hydrométrique en °F.

V : volume de la solution **EDTA** utilisé pour titrage (ml).

#### 5.2.4.10. Dosage des chlorures : Méthode de Mhor (NF T 90 – 014)

➤ But :

Doser les chlorures qui sont l'ensemble du chlore sous forme  $Cl^-$  ou NaCl en solution.

➤ Principe :

Les chlorures sont dosés en milieu neutre, par la solution de nitrate d'argent ( $AgNO_3$ ). Ce titrage est fait en présence de Bichromate de potassium comme indicateur coloré. La fin de la réaction est indiquée par l'apparition de la teinte rouge caractéristique du chromate d'argent.

➤ Mode opératoire :

On introduit 100ml d'eau à analyser dans une fiole conique de 250ml. On ajoute 10 gouttes de bichromate de potassium ( $K_2CrO_4$ ) à 10%. On titre avec la solution de nitrate d'argent ( $AgNO_3$ ) à 0,1N jusqu'au virage du jaune au rouge brique. On effectue le même essai à blanc (avec l'eau distillée).

➤ Expression des résultats :

La teneur en chlorure exprimée en mg/l est donnée par la formule suivante :

$$[Cl^-](mg/l) = 35,5(a-b) \quad \text{où :}$$

[Cl<sup>-</sup>] : Concentration des ions de chlorure.

35,5 : la masse molaire de chlorure.

a : volume de la solution  $AgNO_3$  (0,1N) utilisé pour le titrage de l'échantillon.

b : volume de la solution  $AgNO_3$  (0,1N) nécessaire pour obtenir la même teinte dans un essai à blanc qui est égale à 0,9ml.

### 5.2.5. Méthodes d'analyses microbiologiques

#### 5.2.5.1. Recherche des Germes Totaux : (Norme AFNOR NF V08-050 Février 1999)

Les germes totaux sont des micro-organismes capables de se multiplier en aérobiose, à des températures optimales de croissance comprises entre 20 et 40 °C [146]. (Voir Appendice 2)

##### ➤ Technique :

- ✓ A partir des dilutions décimales allant de  $10^{-3}$  à  $10^{-1}$ .
- ✓ Porter aseptiquement 1ml dans une boîte de pétri vide.
- ✓ Compléter ensuite avec environ 15ml de Gélose « PCA » fondue puis la refroidir à 45 °C ;
- ✓ Faire ensuite des mouvements circulaires et de va et vient en forme de « 8 » pour permettre à l'inoculum de se mélanger avec la Gélose.
- ✓ Laisser solidifier les boîtes sur pailleasse, à la température ambiante [147].

##### ➤ Incubation:

Les boîtes seront incubées en couvercles en bas à 30°C pendant 72 h, dans le cas de l'eau, les boîtes sont incubées à 22°C et 37°C pendant 72h.

##### ➤ Lecture:

La lecture se fait par comptage des colonies lenticulaires, jaunes ou blanchâtres en masse compris entre 30 et 300. On multiplie le nombre trouvé par l'inverse de sa dilution. Les résultats finaux sont exprimés en général en germe/ml ou germe/g ou UFC/ml ou UFC/g de produit à analyser. Pour l'eau, le résultat est exprimé en nombre de colonie par millilitre d'eau de process analysée.

### 5.2.5.2. Recherche des coliformes totaux et coliformes fécaux

(AFNOR NF V08-050 Décembre 1992) (Voir Appendice 2)

Les coliformes sont des bacilles, gram<sup>-</sup>, non sporulés, oxydase<sup>-</sup>, aérobies ou anaérobies facultatifs, capables de se multiplier en présence de sels biliaires et fermenter le lactose avec Production d'acide et gaz en 48h à température de 37°C [148].

Le dénombrement des coliformes totaux et fécaux s'effectue :

- Sur milieu solide : (DCLA) qui renferme une faible teneur en sels biliaires et en citrates suffisante pour inhiber la majeure partie de la flore gram<sup>+</sup>, tout en préservant le développement des coliformes [149].
- Sur milieu liquide : par la technique du nombre le plus probable (NPP) sur le bouillon BCPL dans le cas de l'eau.

❖ Recherche et dénombrement sur un milieu solide: (poudre de lait, lait cru, lait reconstitué, crème fraîche, fromage frais).

➤ Technique : À partir des dilutions décimales allant de 10<sup>-1</sup> à 10<sup>-3</sup>, porter aseptiquement deux fois 1ml dans deux boîtes de pétri différentes et vides. compléter en suite chaque boîte avec 20ml de Gélose au désoxycholate fondue refroidie à 45 ± 1°C, faire en suite des mouvements circulaires et de va et vient en forme de « 8 » pour permettre à l'inoculum de bien se mélanger avec la gélose utilisée, et laisser se solidifier.

➤ Incubation :

Les boîtes sont incubées à 37°C, pendant 24 à 48 h pour les coliformes totaux, et à 44°C pendant 24-48 h pour les coliformes fécaux.

➤ Lecture :

Il s'agit de dénombrer toutes les colonies rouges bombées, ayant poussé en masse dont le nombre est compris entre 30 et 300 colonies, en suite multiplier le nombre trouvé par l'inverse de sa dilution. Le résultat est exprimé en UFC/g ou UFC/ml ou nombre de germes/ml.

- ❖ Recherche et dénombrement sur un milieu liquide : (l'eau) (Norme AFNOR NF V08-16) (voir Appendice 2)

Le dénombrement se fait sur milieu liquide BCPL, en faisant appel à deux tests consécutifs (Test de présomption et le test confirmation).

➤ le Test présomptif :

- ✓ Transférer 50ml d'échantillon à analyser dans un flacon contenant 50ml de BCPL (D/C) + cloche de durham, transférer 50ml d'échantillon à analyser ;
- ✓ Ajouter 10ml d'échantillon à analyser dans 5 tubes contenant chacun 10ml de BCPL (D/C) + cloche de durham ;
- ✓ Ajouter 1ml de l'échantillon à analyser dans 5 tubes contenant chacun 10ml de BCPL (S/C) + cloche de durham ;
- ✓ Après l'homogénéisation, incuber à 37°C pendant 24 à 48 h.

➤ Lecture :

Les tubes présentant à la fois un trouble microbien, un virage de la couleur du milieu de violet au jaune avec dégagement de gaz dans les cloches de Durham (1/10<sup>ème</sup> de volume total de la cloche) sont considérés comme positifs ; ce qui indique la présence de coliformes totaux. Les résultats sont exprimés en nombre de coliformes/100ml ou en UFC/ml selon la table de Mac Grady (Appendice 2).

➤ Test de confirmation (Test de Mac Kenzie) :

A partir de chaque bouillon BCPL positif, repiquer 2 à 3 gouttes dans un tube de milieu indole mannitol (milieu Schubert) muni d'une cloche de Durham. Après homogénéisation, les tubes sont incubés à 44 C° pendant 24 h.

➤ Lecture :

Sont considérés comme positifs, les tubes présentant à la fois un trouble microbien, un dégagement de gaz dans les cloches (volume au moins égale au 1/10<sup>ème</sup> du volume de la cloche), avec l'apparition d'un anneau rouge en surface après addition de 2 à 3 gouttes de réactif Kovac, témoin de la production d'indole par *E Coli*.

L'expression des résultats se fait selon la méthode de NPP, par référence à la table de Mac Grady (exprimés en germes /100ml d'eau analyser).

### 5.2.5.3. Recherche et dénombrement des streptocoques fécaux

La recherche des streptocoques fécaux du groupe D dans l'eau (voir Appendice 2 Figure n°5.5). Ce sont des streptocoques du groupe « D », cocci, Gram + de formes sphériques ou ovoïdes, non sporulés, aéro-anaérobies facultatifs catalase et oxydase-, homo fermentaires [150].

➤ Technique :

D'après Rodier (1996), la méthode de recherche de streptocoque du groupe « D » en milieu liquide est basée sur deux tests consécutifs à savoir [151] :

❖ Test présomptif : qui se fait sur milieu Roth (S/C et D/C) contenant de l'acide de sodium comme agent sélectif. On ensemence :

✓ un flacon contenant 50ml de bouillon Roth D/C avec 10ml d'eau à analyser.

✓ 5 tubes de 10ml de bouillon Roth D/C avec 10ml d'eau à analyser.

✓ 5 tubes de 10ml de bouillon Roth S/C avec 10ml d'eau à analyser.

✓ Incuber les tubes à 37°C pendant 24 à 48 h.

➤ Lecture : sont considérés comme positifs, les tubes présentant un trouble microbien.

❖ Test de confirmation : qui se fait sur milieu d'Eva Litsky contenant de l'azide de Sodium et l'éthyle violet comme agent sélectif. Chaque tube Rothe positif fera l'objet d'un repiquage à l'aide d'une pipette stérile (2 à 3 gouttes) sur milieu Eva Litsky. On homogénéise et on incube à 37C° pendant 24 h.

➤ Lecture :

Sont considérés comme positifs, les tubes d'Eva Litsky présentant à la fois un trouble microbien, une pastille blanchâtre ou violette au fond du tube. L'expression des résultats se fait selon la méthode de NPP par référence à la table de Mac-Grady. (Exprimés en germes /100ml d'eau).

#### 5.2.5.4. Recherche des *Staphylococcus aureus* :

(NORME AFNOR NF V 08-014 Nov 1994) (voir Appendice 2)

Les staphylocoques appartiennent au groupe *Staphylococcus*, ils sont des cocci à gram+ catalase+ [10], qui présentent comme caractéristique principale de pouvoir se développer sur aliments à une activité de l'eau (aw) relativement faible (jusqu'à 0,83), sa température optimale de croissance est de 37°C, son pH optimum est de 7 [152].

##### ➤ Technique :

Nous avons utilisé la méthode d'enrichissement sur GIOLITTI CONTONI, cette méthode est réalisée en deux étapes consécutives.

- ✓ la première consiste à l'enrichissement sur milieu GIOLITTI CONTONI qui permet une meilleure vérification des souches stressées.
- ✓ La deuxième, l'isolement sur la gélose chapman.

##### Enrichissement :

- ✓ Ouvrir aseptiquement le flacon contenant le milieu GIOLITTI CONTONI ;
  - ✓ Aajouter une ampoule de tellurite de potassium « additif », bien mélanger le milieu ;
  - ✓ répartir le milieu préparé (GC) à l'aide d'une pipette graduée dans des tubes à essai stériles, à raison de 15 ml ;
  - ✓ à partir des dilutions décimales  $10^{-3}$  à  $10^{-1}$  prélever 1ml de chaque dilution et l'introduire dans les tubes contenant le milieu d'enrichissement (GC) ;
  - ✓ L'incubation est réalisée à 37°C pendant 24 à 48 h.
- Lecture : sont considérés comme positifs, les tubes ayant viré au noir suite à la réduction du tellurite de potassium.

✚ Isolement :

A partir des tubes positifs, effectuer des isolements sur gélose Chapman préalablement fondue, refroidi puis coulée en boîte de pétri vides et stériles ; à l'aide d'une pipette pasteur, prélever 2 gouttes et faire un étalement à la surface du milieu par un râteau. L'incubation se fait à 37°C pendant 24 h à 48h.

➤ Lecture :

Seront considérées comme positives, les boîtes contenant des colonies qui apparaissent de taille moyenne, lisses, brillantes, légèrement bombées et pigmentées en jaune due à la fermentation du mannitol et la confirmation se fait par un test de catalase et coagulase. Dénombrer les boîtes contenant entre 30 et 300 colonies. Les résultats sont exprimés en UFC/ml ou UFC/g.

#### 5.2.5.5. Recherche et dénombrement des Clostridium sulfitoréducteurs

(Norme AFNOR NF V 08-052 Avril 1994) (Voir Appendice 2)

Ce sont des Bacilles à Gram +, anaérobies stricts, mobiles par ciliature péritriche, mais parfois immobiles et capsulés, possèdent des spores résistantes au moins 10 min à 80 °C, et sont capables de réduire les sulfites en sulfures par la sulfitoréductase, bactéries commensales de l'intestin ou saprophytes du sol [153].

➤ Technique :

Au moment de l'emploi faire fondre un flacon de gélose VF, le refroidir dans un bain d'eau à 45 °C puis ajouter une ampoule d'alun de fer et une ampoule de Sulfite de Sodium. Mélanger soigneusement et aseptiquement, prévoir une série des tubes stériles à raison de deux tubes par dilution, répartir aseptiquement 1ml de chaque dilution en double.

Les tubes sont soumis d'abord à un chauffage au bain marie à 80 °C pendant 10 min, puis refroidis immédiatement sous l'eau de robinet (choc thermique), afin d'éliminer toutes formes végétatives et ne laisser que les formes sporulées, puis ajouter 15 ml de gélose VF dans chaque tube, laisser solidifier les tubes sur pailleuse pendant 30 min.

- Incubation : les tubes seront incubés à 44 °C pendant 24 h.
- Lecture : les tubes considérés positifs sont ceux qui contiennent des colonies noires de spores d'anaérobies sulfito-réducteurs. Les résultats sont exprimés en nombre de spore par ml ou g de produit à analyser.

✚ Cas de l'eau : (Norme AFNOR EN 26461-1 et ISO 6461-1)

Concernant l'eau, on porte aseptiquement 5ml d'eau de process dans quatre tubes. On utilise la même technique décrite ci-dessus.

Le résultat est exprimé en nombre de spores par 20ml d'eau de process.

#### 5.2.5.6. Recherche des salmonelles

Norme NFV 08- 013. (Voir Appendice 2)

Le genre salmonelle fait parti de la famille des entérobacteriaceae, ce sont des bacilles gram(-) Anaérobies facultatifs mobiles grâce à une ciliature péritriche,

- Technique : La recherche des salmonelles nécessite une prise d'essai à part. Comme le nombre de salmonelles est en général faible dans le produit à analyser, il est nécessaire qu'on procède à un prè-enrichissement, ensuite à un enrichissement sur le milieu SFB. Enfin, on réalise leur isolement sur milieu sélectif : gèlose Hèktoen.

✚ Pré- enrichissement :

Introduire 25 g de produit à analyser dans un flacon stérile contenant 225ml de TSE , constituant ainsi la dilution  $10^{-1}$  ou 1/10 , bien mélanger et incuber à 37°C pendant 18h.

✚ Enrichissement primaire :

Ce test consiste à porter 1ml du milieu pré- enrichissement sur bouillon S F B (S/C) réparti à raison de 9ml par tube + additif sélénite azide de sodium ou disque S F B, on incube à 37°C pendant 24h.

- Lecture : le résultat positif se traduit par un virage de la couleur du milieu du jaune au rouge brique.

✚ Enrichissement secondaire et isolement :

Les tubes positifs feront l'objet :

- ✓ D'un enrichissement secondaire sur bouillon SFB en tube à raison de 0,1ml par tube.
- ✓ D'un isolement sur milieu gélose Hektoen (H1) préalablement coulé en boîtes. On incube à 37°C pendant 24h.

✚ Isolement et identification :

- ✓ D'une part le bouillon S F B fera l'objet d'un isolement sur gélose hektoen (H2).
- ✓ D'autre part la boîte de gélose hektoen (H1) subira une lecture.
- ✓ Les colonies de salmonelles apparaissent en gris bleu ou vert bleu avec ou sans centre noir.

#### 5.2.5.7. Recherche et dénombrement des levures et moisissures :

Norme NF 08-059, (1995). (Voir Appendice 2)

Les moisissures se sont des micro- organismes filamenteux qui sont disséminées par l'émission de spores [154]. Ils sont des hétérotrophes, aérobies, acidophiles (pH de développement compris entre 3 et 7) et mésophiles (Température de Croissance de 20-30°C). [155]. Les levures sont Typiquement unicellulaires, de formes rondes ou ovoïdes et se multiplient par bourgeonnement. Certaines sont cependant capables de former des pseudo mycéliums qui est un caractère d'identification du genre [156].

##### ➤ Technique :

Le dénombrement est effectué en milieu sélectif doté de propriétés antibactériennes [153]. Les milieux utilisés sont :

- ✓ OGA : additionné d'ATB : Oxytétracycline à raison de 0,1mg/ml.
- ✓ Sabouraud+ATB : chloramphénicol (ATB thermorésistant) à raison de 0,5mg/ml.

Ces milieux permettent la croissance des levures et des moisissures [157].

On transfère aseptiquement 4 gouttes de la suspension mère et des dilutions décimales à la surface du milieu sabouraud préalablement fondu et refroidi à 45°C. L'inoculum sera étalé à l'aide d'un râtelier stérile sur toute la surface de la boîte. L'incubation se fait à 22 °C pendant 5 jours, en position renversée.

- ##### ➤ Lecture :
- les colonies des levures sont brillantes, rondes et bombées, de couleurs blanches avec une texture crémeuse. Les moisissures sont épaisses, filamenteuses, pigmentées à aspect velouté. Les résultats sont exprimés en UFC/ml ou UFC/g de produit à analysé

### 5.2.6. Méthodes d'analyses organoleptiques

Par cette analyse, la qualité de notre produit (alicament : fromage frais enrichis en polyphénols) a été en partie évaluée, tout en sachant que la notion de qualité est à priori subjective puisque le principal moyen d'évaluation reste le consommateur.

Pour l'appréciation des caractères organoleptiques, plusieurs personnes du service laboratoire se sont associées pour l'évaluation analytique des propriétés organoleptiques des fromages frais expérimentaux. On a utilisé 5 échantillons pour chaque préparation. Les pots présentés ont été masqués et les dégustations sont faites anonymement.

#### La notation :

Le barème de dégustation est de 1 à 4, la distribution des notes est effectuée selon l'importance des différents caractères :

**1= Médiocre ; 2= Moyen ; 3= Bon ; 4= Très bon**

Les qualités organoleptiques à évaluer concernent : aspect, goût, Arôme et odeur, mouthfeel,

### 5.3. Méthode de préparation de l'alicament (fromage frais enrichis en polyphénols)

Les étapes de fabrication de l'alicament sont décrites dans les figures 5.8 et 5.9

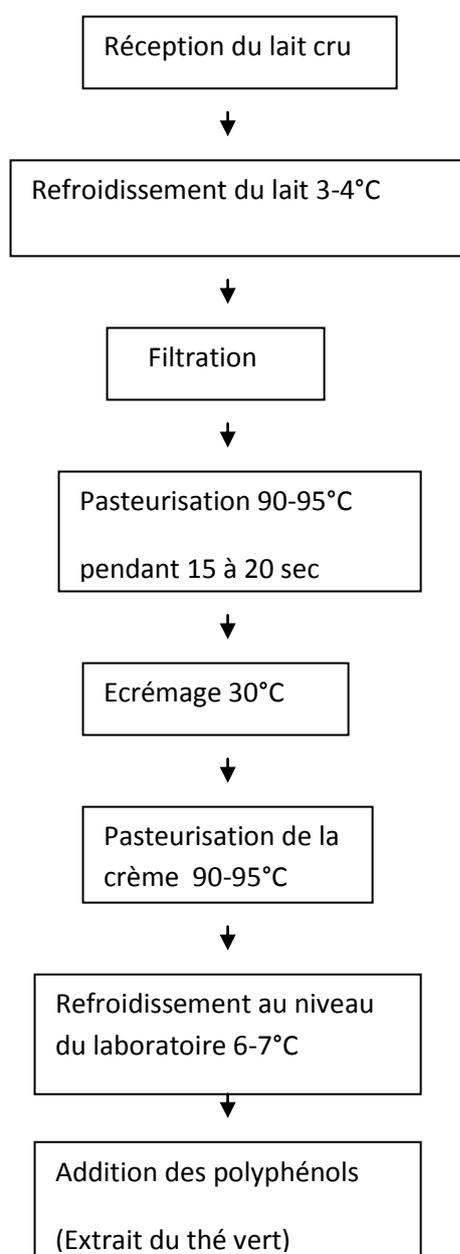


Figure 5.8 : Diagramme de préparation de la crème fraîche

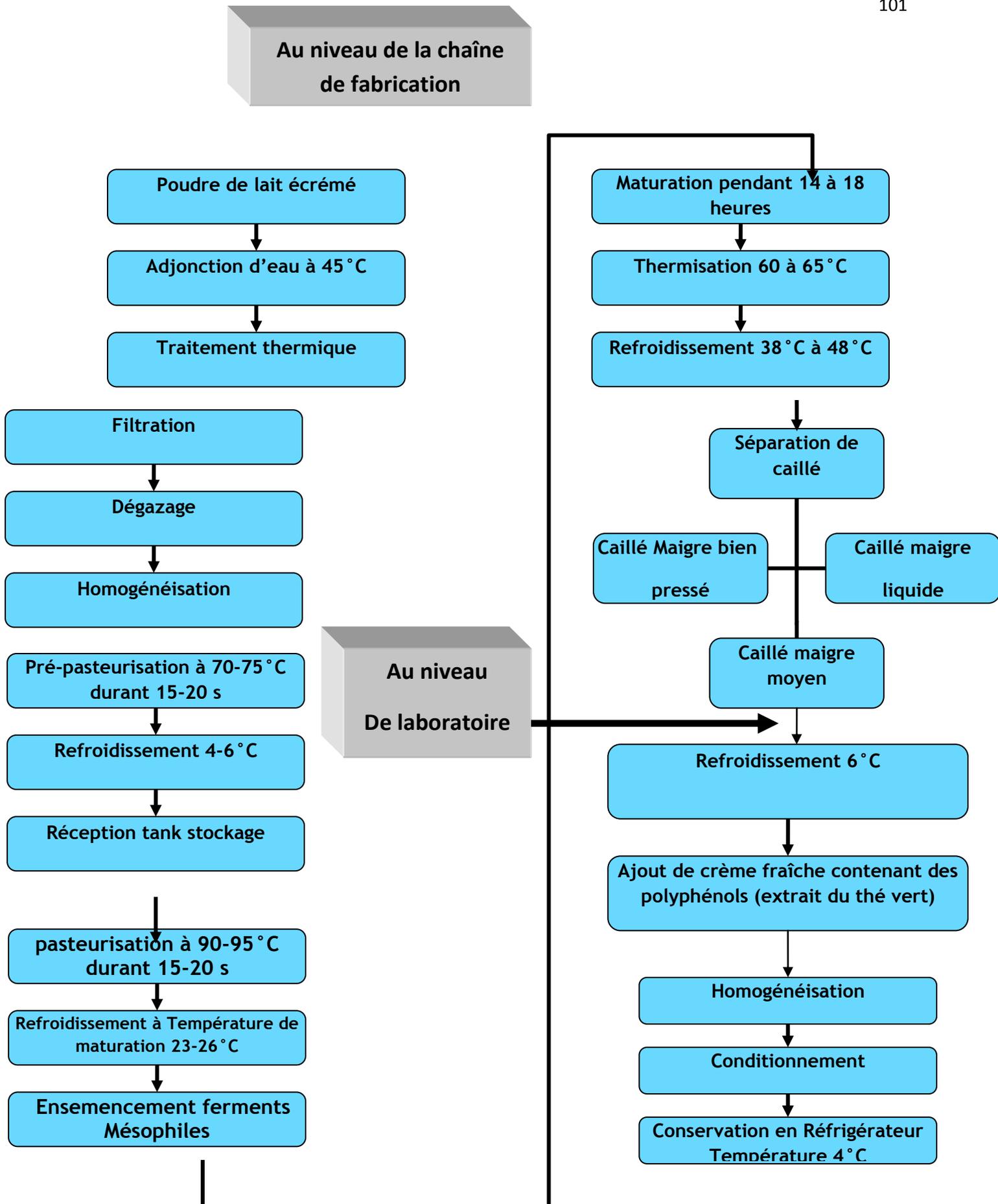


Figure 5.9 : Diagramme de fabrication de fromage frais enrichis de polyphénols

## Chapitre 6

### RESULTATS ET INTERPRETATION

#### 6.1. Résultats de la partie analytique du thé vert

##### 6.1.1. Dosage de la caféine

Le dosage de la caféine du thé a été déterminé, au cours de cette étude, par HPLC selon la norme ISO 10095.

Les chromatogrammes représentant les différents aires des pics obtenus pour l'échantillon du thé vert analysé ainsi que celui de la caféine étalon sont illustrés dans l'appendice 1. La teneur en caféine est de 1.89% (exprimé en % de matière sèche). Cette teneur est bien acceptable car, la norme recommandée par le laboratoire de l'intendance doit être aux environs  $1.8 \pm 0.2\%$ .

La caféine, étant une molécule hygroscopique, risque de se dégrader rapidement si le matériel végétal qui la renferme est conservé dans des conditions d'humidité relativement élevée. Cela peut expliquer la baisse de sa teneur dans l'échantillon du thé vert, qui doit, selon la littérature [158], en contenir jusqu'à 2%.

Cette molécule connue pour ses effets stimulants au niveau du système nerveux central et du cœur, est le plus souvent consommée par le biais des boissons obtenues à partir des grains de café et des feuilles de thé. Le café étant plus riche en caféine que le thé, d'où sa teneur en caféine qui est de 3,58 % d'après le résultat obtenus par Silabdi., (2010) [160].

### 6.1.2 Le choix de la méthode d'extraction des polyphénols totaux

L'extraction des polyphénols totaux à partir du thé vert a été effectuée selon différents modes. La figure 6.1 illustre le rendement des différents extraits de thé vert, selon les 4 modes d'extraction à savoir : par l'eau, solvants organiques à température ambiante et par reflux de chaleur et enfin extraction par ultra-son. Le méthanol a été recommandé et fréquemment employé pour l'extraction des composés phénoliques [161]. Le rendement d'extraction exprimé par le rapport entre le poids du résidu sec de l'extrait et le poids du thé (masse de la prise d'essai pour extraction).

On constate, que le rendement des extraits aqueux du thé vert par ultra-son est de 34,7%, celui extrait par eau est de 31,8 %. Cependant, l'extraction par solvant organique (méthanol/éthanol 50/50 V/V) par reflux de chaleur et à une température ambiante sont respectivement de 27,4% et de 23,5 sont significativement inférieurs à l'extraction par l'eau et ultra-son. Le mode d'extraction par ultra-son révèle un rendement supérieur par rapport aux autres modes d'extraction.

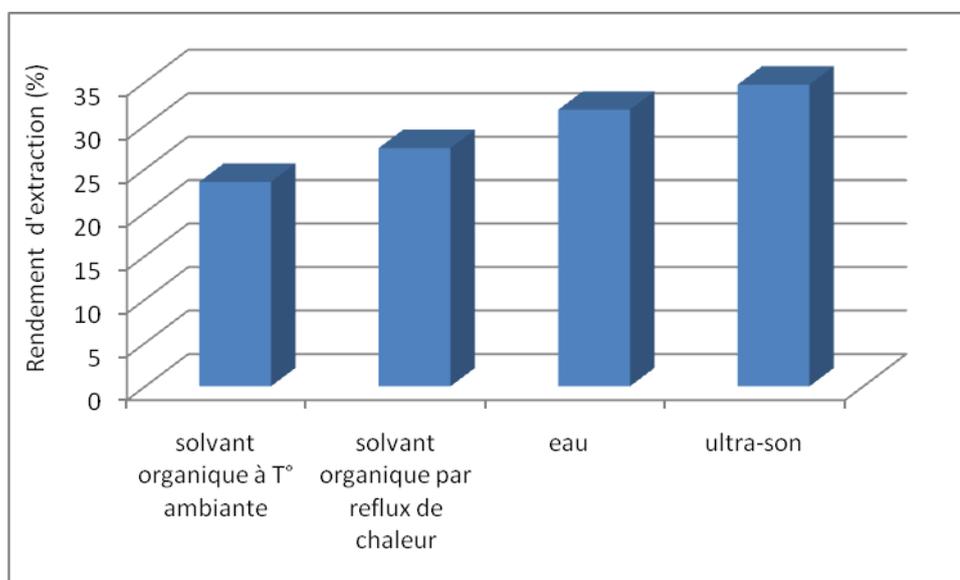


Figure 6.1 : Rendement en extrait sec du thé vert (en % de matière sèche).

Selon Sasazuki et al., (2008), le thé vert contient entre 30 et 40% de polyphénols extractibles dans l'eau, les quatre polyphénols primaires qui sont retrouvés dans les feuilles de thé vert fraîches sont : epigallocatechine gallate (EGCG), epicatechine gallate (ECG) , epigallocatechine (EGC), et epicatechine (EC) [162].

La solubilité des composés phénoliques semble être en fonction de leur degré de polymérisation, les interactions avec d'autres composés et la nature du solvant utilisé. Cette différence peut être attribuée aux différentes affinités des solvants d'extraction pour les constituants des feuilles du thé vert, ainsi que les différentes conditions d'extraction : la polarité du solvant et la température d'extraction [163].

L'objectif de l'extraction est de libérer les composés phénoliques présents dans des structures vacuolaires par rupture du tissu végétal et par diffusion. La présence d'un ou de plusieurs cycles benzoïques hydroxylés chez tous les composés phénoliques est responsable de certaines propriétés communes utilisées pour les extraire à partir du matériel végétal [164].

Le rendement d'extraction n'est que relatif et il dépend de la méthode et les conditions dans lesquelles l'extraction a été effectuée. Il faut bien noter que la méthode d'extraction affecte également le contenu total en polyphénols et les capacités antioxydantes [161].

### 6.1.3 Dosage des polyphénols totaux

La teneur des composés phénoliques des différents modes d'extraction ont été calculés à partir de la courbe d'étalonnage et exprimée en milligrammes équivalent acide gallique par gramme du thé vert (mg EAG/g), les résultats illustrés dans le tableau 6.1

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

Mode d'extraction	Eau	Solvant organique (méthanol/ ethanol 50/50 V/V)		Ultra-son
		T° ambiante	Reflue de chaleur	
Teneur (mg EAG/g de MS)	200	143	126,5	345

Les valeurs représentent la moyenne de 3 mesures

La teneur en polyphénols totaux diffèrent selon le procédé d'extraction. L'extraction par ultra-son offre le meilleur procédé avec une teneur en polyphénols de 345 mg EAG/g, suivie par l'extraction avec l'eau dont la teneur est de 200 mg EAG/g. Ceci nous permet de conclure que l'extraction par l'eau est meilleur par apport à l'utilisation de solvants organiques à température ambiante et par reflux de chaleur dont la teneur en polyphénols est respectivement de 143 mgEAG/g et 126,5 mg EAG/g du thé vert

Nos résultats sont supérieurs à ceux trouvé par Gervaise en 2004, qui estime que le thé vert renferme une teneur comprise entre 219 et 233 mg/g de matière sèche [165]. La composition des feuilles du thé vert varie en fonction du climat, de la variété et surtout de l'âge des feuilles [159].

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 [166].

Les résultats obtenus après dosage des composés phénoliques pour les 4 modes d'extraction, on note une différence remarquable pour l'extraction à ultra-son. Donc ce mode d'extraction sera utilisé afin de réaliser le test de toxicité sur modele animal et dont l'objectif de préparer notre alicament (Fromage frais enrichis en polyphénols).

#### 6.1.4 Identification de la composition des polyphénols totaux

L'identification par HPLC de la composition biochimique des polyphénols totaux extrait par ultra-son du thé vert se caractérise par 3 principaux pics illustrés dans la figure 6.2.

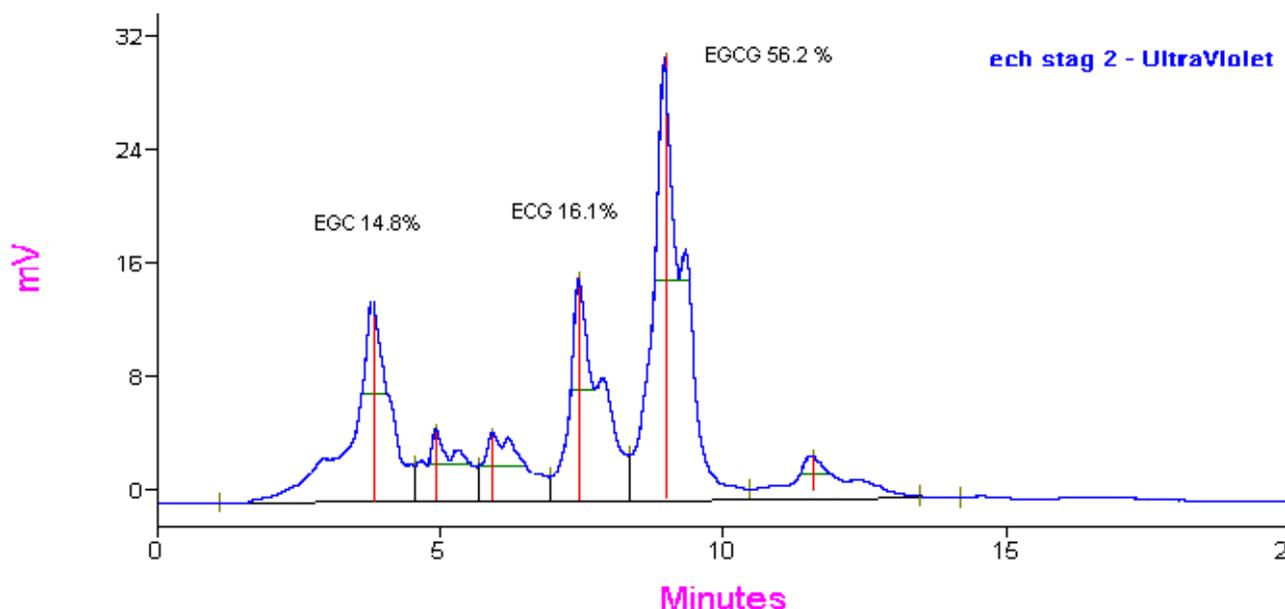


Figure 6.2 : Identification de la composition des polyphénols du thé vert

Les 3 pics correspondent aux épigallocatechines gallates (EGCG) qui représentent la majeure partie, avec une teneur de 56,2 % le reste est composé d'écatechines gallates (ECG) 16.1% et epigallocatechine (EGC) 14.8%. 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 [159].

Ces résultats correspondent aux travaux de Chandrakant *et al.*, (2011) 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.

### 6.1.5 Dosage des 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 [137]. Le dosage des flavonoïdes a été réalisé selon la méthode d'AlCl<sub>3</sub> en utilisant la Quercétine comme standard. Le tableau 6.2 représente les différentes valeurs obtenues pour chaque mode d'extraction, exprimées en mg équivalent quercétine / g de matière sèche de thé vert (mg EQ/ g) :

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

Mode d'extraction	Eau	Solvant organique (méthanol/ ethanol 50/50 V/V)		Ultra-son
		T° ambiante	Reflux de chaleur	
Teneur (mg EQ/g de MS)	245	176,8	270,88	290,5

Les valeurs représentent la moyenne de 3 mesures

Selon les données du tableau 6.2, le thé vert est riche en flavonoïdes. C'est la classe des polyphénols majoritaires des feuilles de thé vert. Il ressort de ce tableau, que l'extrait par solvant organique diffère selon la température d'extraction 176,8 mg EQ/g à température ambiante et 270,88 mg EQ/g par reflux de chaleur ; l'extraction par ultra-son contenant une dose de 290.5 mg EQ/g du thé vert séchée.

## 6.2. Résultats des tests biologiques

### 6.2.1. Activité antioxydante

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 6.2 illustre que l'extrait étudié possède un effet antioxydant à dose correspondante.

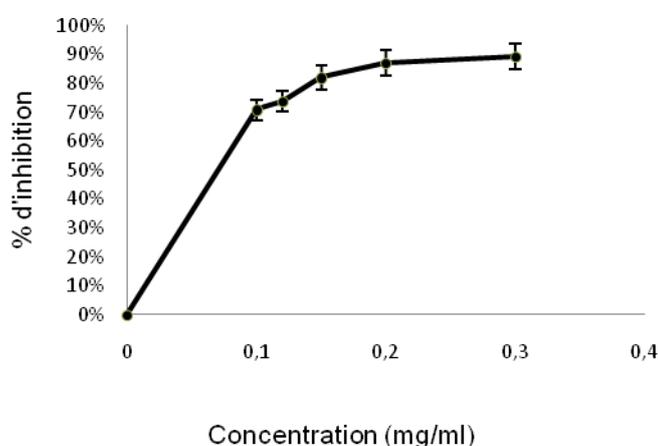


Figure 6.3 : courbe de l'activité antioxydante des polyphénols totaux

Cette augmentation exponentielle est montrée dans la courbe (Fig 6.3). 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 antiradicalaire des composés phénoliques.

En comparant nos résultats avec la courbe d'étalonnage du BHT (Appendice 1) il s'avère que l'extrait aqueux du thé vert obtenu par ultra-son, dont les composés phénoliques présentent une très bonne activité antioxydante.

Les polyphénols totaux du thé vert extrait par ultra-son présente 90,22 %, 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 ceux de l'antioxydant standard (BHT) (appendice 1), la liqueur du thé vert extrait par ultra-son semble avoir une activité anti- oxydante proche à celle du BHT (92%).

### 6.2.2. Tests d'activité antibactérienne

Les résultats obtenus pour les antibiogrammes et les antifongigrammes sont illustrés dans le tableau 6.3 pour l'ensemble des microorganismes ainsi que les disques d'antibiotiques et d'antifongiques.

Tableau 6.3 : Evaluation des zone d'inhibition des microorganismes par les polyphénols totaux du thé vert

Type d'inhibiteur Microorganismes	Extrait du thé (polyphénols totaux)	Antibiotique / Antifongique	
		Streptomycine (10µg)	kétoconazole
<i>Géobacillus stéarothermophilus</i>	20 mm	20 mm	***
<i>Bacillus subtilis</i>	6 mm	15 mm	***
<i>Aspergillus niger</i>	00 mm	***	3.3 mm
<i>Candida albicans</i>	00 mm	***	15.2 mm

\*\*\* : Non valable pour ce germe.

Les polyphénols totaux extraits du thé vert présentent des zones d'inhibition remarquables pour *Géobacillus stéarothermophilus* de 20 mm de diamètre durant son incubation à 55°C. le *Bacillus subtilis* présente une zone d'inhibition de 6 mm de diamètre à pH 8, l'antibiotique de référence pour cette souche est la streptomycine dont la zone d'inhibition est de 15mm.

L'activité antifongique n'a révélé aucune zone d'inhibition pour *Candida albicans* et *Aspergillus niger* en présence des polyphénols totaux du thé vert, ceci

confirme que les polyphénols extrait du thé vert n'agissent pas sur la croissance des levures et moisissures (voir Appendice 2).

### 6.2.3. Test de toxicité sur modèle animal

Le tableau 6.4 illustre la détermination de la DL<sub>50</sub> la dose qui permet la mort de 50% de souris en fonction du temps (jours)

Tableau 6.4 : Evaluation de la DL<sub>50</sub> de différentes doses de polyphénols

Dose	400 mg	600 mg	800 mg	2g
Jours (DL <sub>50</sub> )	10	09	07	05

Le test de toxicité sur modèle animal révèle qu'une dose létale permet de tuer 50% de souris est de 2g pendant 5 jours et 800mg pendant 7 jours. La dose choisie à ajouter est de 600mg. Cette dose de 600mg sera incorporée au fromage frais dont l'objectif est de préparer un alicament. L'incorporation de ces polyphénols sera respectivement de 0.5ml, 1ml et 2ml. Le choix de la quantité à ajouter sera fait par les analyses physicochimiques et microbiologiques, ainsi qu'une analyse organoleptique.

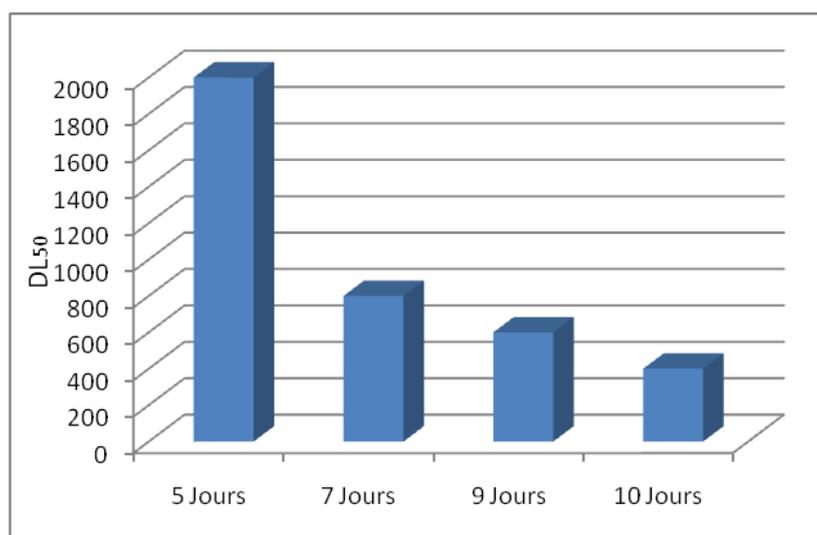


Figure 6.4 : Test de toxicité des polyphénols totaux sur souris

### 6.3. Impact des polyphénols totaux sur la cinétique de croissance des ferments

#### Lactiques mésophiles

#### 6.3.1. Cinétique de croissance de *Lactobacillus plantarum*

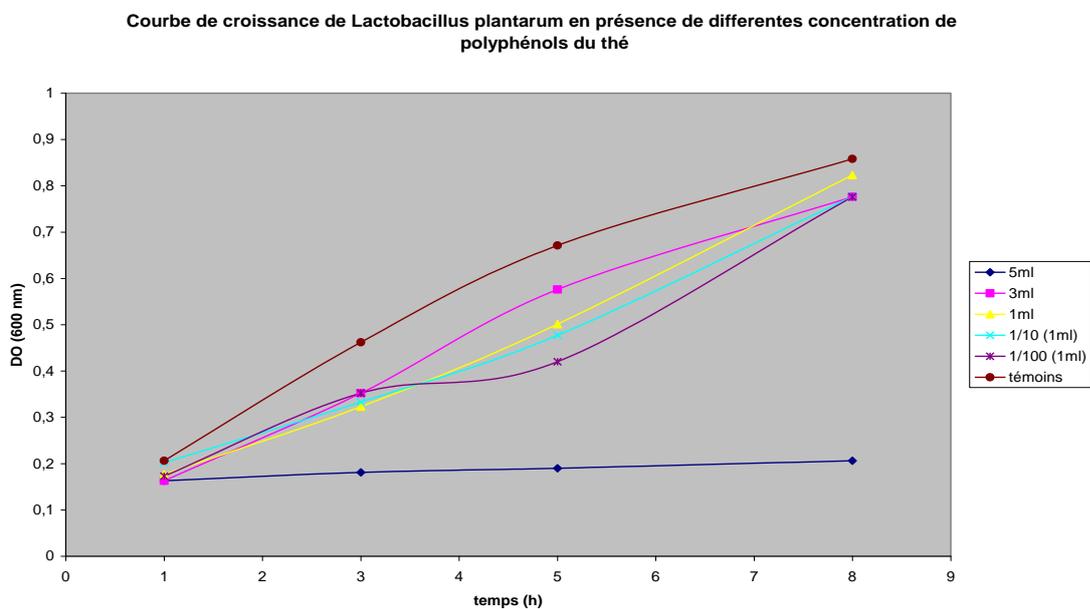
Tableau 6.5 : Inhibition de *Lactobacillus plantarum* par les polyphénols totaux du thé vert.

<i>Lactobacillus plantarum</i> avec l'extrait du thé	Inubation (h)	Après 1h		3h		5h		7h30	
	DO dillution	600nm	480nm	600nm	480nm	600nm	480nm	600nm	480nm
	5 ml	0.163	0.386	0.181	0.419	0.190	0.448	0.206	0.461
	3 ml	0.163	0.297	0.352	0.588	0.576	0.808	0.776	0.988
	1ml	0.177	0.341	0.323	0.521	0.501	0.752	0.823	1.130
	1 /10	0.202	0.349	0.333	0.500	0.477	0.753	0.777	1.011
	1/100	0.173	0.302	0.352	0.509	0.420	0.795	0.776	0.986
Temoins (milieu+ inoculum)		0.206	0.340	0.462	0.621	0.671	0.878	0.858	1.077

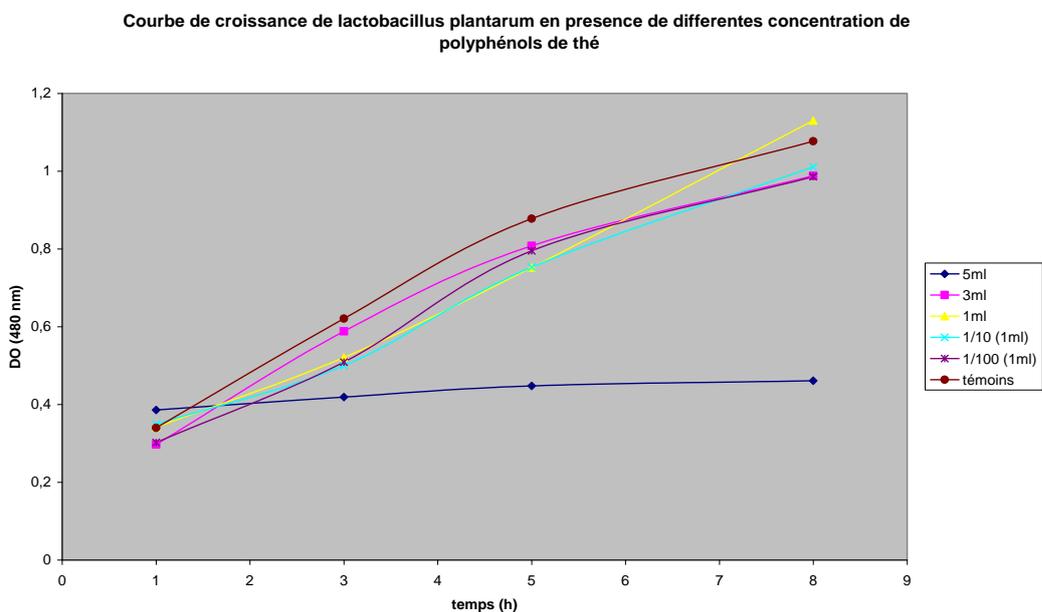
Les résultats obtenus pour la cinétique de croissance de *lactobacillus plantarum* en présence de différentes concentrations de l'extrait aqueux du thé vert sont consignés dans le tableau 6.5. La cinétique de croissance est identique par rapport aux témoins, et qu'à la dose de 5ml de polyphénols du thé présente un étalement de la phase de latence, et qui engendre un retard de celle-ci (Fig 6.5<sub>(a et b)</sub>).

Les résultats des tests d'inhibition de *lactobacillus plantarum* par les polyphénols du thé vert sont similaires aux travaux de Chandrakant *et al.*, 2011 pour qui pour la même espèce utilisée (*L plantarum*) la croissance de cette souche n'est pas influencé par les polyphénols du thé.

D'après ce résultat, la dose de polyphénols à ajouter sera de 3ml au moins, reste à savoir la qualité organoleptique et plus particulièrement le goût dans le fromage frais.



(a)



(b)

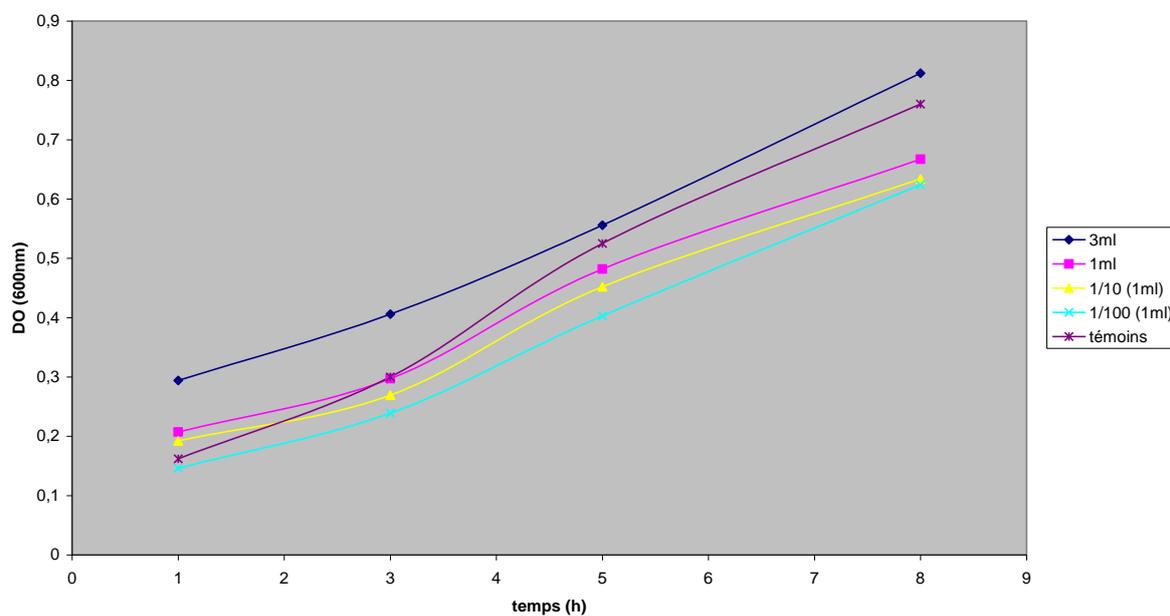
Figure 6.5 : Courbe de croissance *Lactobacillus plantarum* en présence de polyphénols totaux du thé vert à 600nm (a) et 400nm (b)

6.3.2. Cinétique de croissance de *Pediococcus acidilactici*Tableau 6.6 : Inhibition de *Pediococcus acidilactici* par les polyphénols totaux du thé vert.

<i>Pediococcus acidilactici</i> avec l'extrait du thé	Inubation (h)	Après 1h		3h		5h		7h30	
	DO Dillution	600nm	480nm	600nm	480nm	600nm	480nm	600nm	480nm
	3 ml	0.294	0.622	0.406	0.777	0.556	0.911	0.812	1.068
	1ml	0.207	0.448	0.297	0.564	0.482	0.742	0.667	0.940
	1 /10	0.192	0.393	0.269	0.506	0.452	0.692	0.634	0.920
	1/100	0.146	0.289	0.239	0.496	0.403	0.627	0.624	0.837
<b>Temoins (milieu+ inoculm)</b>		0.162	0.302	0.300	0.412	0.525	0.779	0.760	0.961

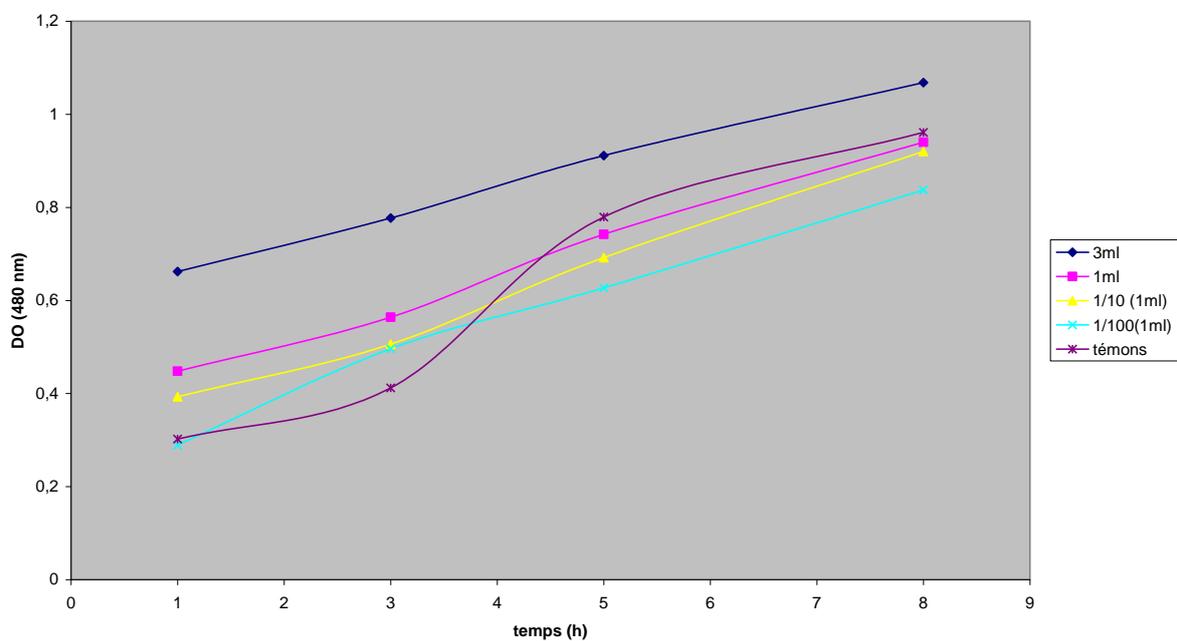
Les résultats obtenus pour la cinétique de croissance de *Pediococcus acidilactici* en présence des différentes concentrations de l'extrait aqueux du thé vert, sont présentés dans le tableau 6.6. Aucun effet n'est cependant observé. Ceci confirme que la croissance de *Pediococcus acidilactici* n'a pas été influencée par les polyphénols totaux extrait du thé vert voir (Fig 6.6<sub>(a et b)</sub>).

Courbe de de croissance de *Pédiococcus acidilactici* en presence de differente concentration de polyphénols de thé



(a)

Courbe de croissance *pediococcus acidilactici* en presence des polyphénols totaux du thé vert



(b)

Figure 6.6 : Courbe de croissance *Pediococcus acidilactici* en présence de polyphénols totaux du thé vert à 600nm (a) et 400nm (b)

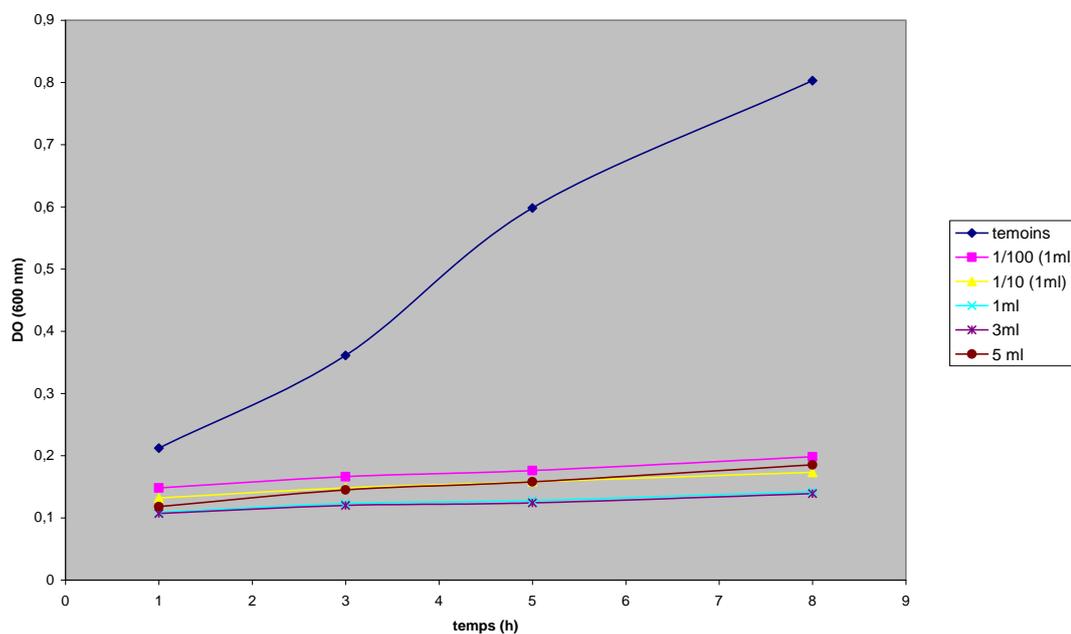
### 6.3.3. Cinétique de croissance de *Lactobacillus casei*

Tableau 6.7 : Inhibition de *Lactobacillus casei* par les polyphénols totaux du thé vert.

<i>Lactobacillus casei</i> avec l'extrait du thé	Inubation (h)	Après 1h		3h		5h		7h30	
	DO dillution	600nm	480nm	600nm	480nm	600nm	480nm	600nm	480nm
	5 ml	0.212	0.439	0.361	0.604	0.598	0.818	0.803	1.257
	3 ml	0.148	0.396	0.166	0.364	0.176	0.388	0.198	0.420
	1ml	0.132	0.291	0.148	0.318	0.158	0.334	0.173	0.360
	1 /10	0.109	0.219	0.123	0.244	0.128	0.251	0.142	0.268
	1/100	0.107	0.211	0.120	0.233	0.124	0.250	0.139	0.259
<b>Temoins (milieu+ inoculm)</b>		0.118	0.230	0.145	0.266	0.158	0.290	0.185	0.325

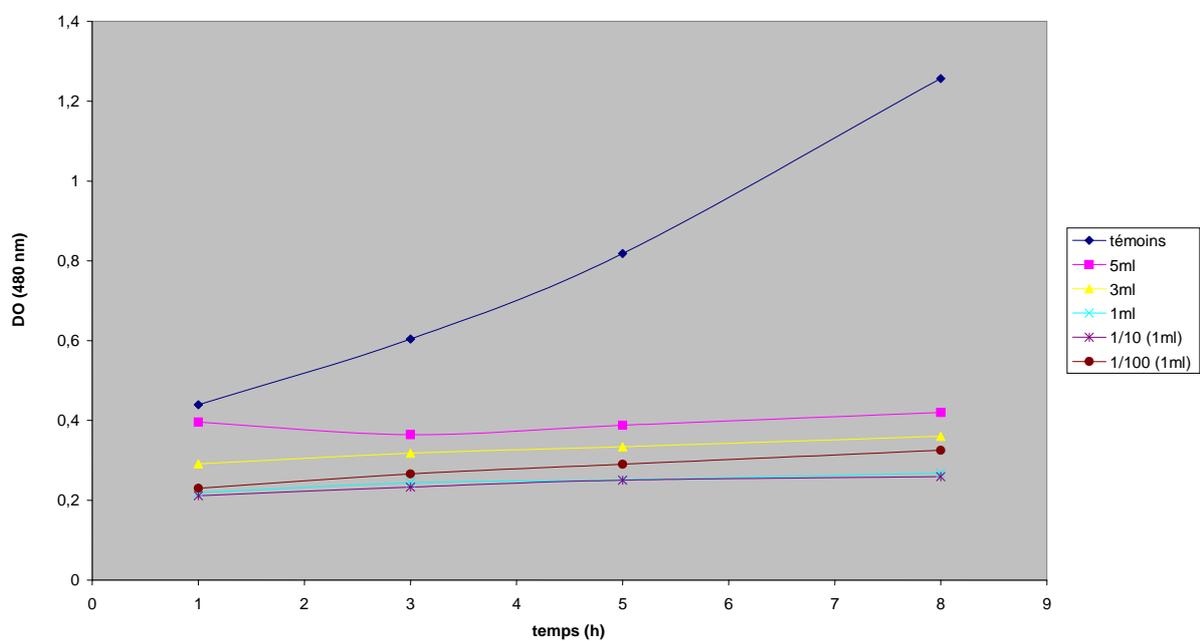
Les résultats obtenus pour la cinétique de croissance de *lactobacillus casei* en présence de différentes concentrations de l'extrait aqueux du thé vert, sont regroupés dans le tableau 6.7. On note une augmentation de la phase de latence, ceci indique que les polyphénols du thé vert influent sur la croissance de *lactobacillus casei* par un retard de 7h. Ceci confirme qu'il n'y a pas d'inhibition mais un retardement de la croissance Fig 6.7<sub>(a et b)</sub>

D'après les résultats obtenus dans le tableau ci-dessus, on peut d'ores et déjà fixer l'étape où l'on peut ajouter les polyphénols totaux extraits du thé vert lors du processus de fabrication du fromage frais. Cela se fera après la phase de fermentation.

courbe de croissance de *Lactobacillus casei* en présence de différente concentration du thé

(a)

Courbe de croissance de lactobacillus casei en présence de différentes concentration de thé



(b)

Figure 6.7 : Courbe de croissance *Lactobacillus casei* en présence de polyphénols totaux du thé vert à 600nm (a) et 400nm (b).

## 6.4. Résultat de la technologie de fabrication de l'alicament : Fromage frais

### 6.4.1. Résultat des analyses physico-chimiques des matières premières

#### 6.4.1.1. Lait cru

Les résultats obtenus lors des analyses physico-chimiques du lait cru utilisés dans la fabrication de la crème fraîche pour les 3 lots sont présentés dans le tableau 6.8.

Tableau 6.8 : Analyses physico-chimiques du lait cru

paramètres	Lots			Normes*
	1 <sup>er</sup> Lot	2 <sup>eme</sup> Lot	3 <sup>eme</sup> Lot	
L'acidité Dornic (°D)	17	18	16	14-18
La densité	1.030	1.030	1.030	1.028-1033
Teneur en MG (%)	3,5	3,5	3,6	3,5-4,0

\* : Source interne de la laiterie

Les résultats de l'acidité sont 17, 18, 16 °D pour le 1<sup>er</sup>, 2<sup>eme</sup>, 3<sup>eme</sup> lot respectivement ; ces valeurs sont conformes aux normes (14 et 18 °D).

L'acidité du lait est due à la présence de l'acide lactique dont 1°D=10 mg d'acide lactique dans 100g de lait [15].

Les résultats de la densité sont de 1.030 pour les trois lots du lait cru ; ces valeurs indiquent une conformité de la densité aux normes. Les résultats de la teneur en matière grasse du lait cru restent dans la norme recommandée (3,5-4,0%).

#### 6.4.1.2. Poudre de lait

Les résultats des analyses physico-chimiques de la poudre de lait maigre sont présentés dans le tableau 6.9.

Tableau 6.9: Analyses physico-chimiques de la poudre de lait

Paramètres	Lots			Normes*
	1 <sup>er</sup> Lot	2 <sup>eme</sup> Lot	3 <sup>eme</sup> Lot	
L'acidité Dornic (°D)	16.5	16	16	15-17
Humidité (%)	3.37	2.98	2.73	2.25 – 4
Teneur en MG (%)	Trace	Trace	Trace	0 – 0.5

\* : Source interne de la laiterie

Les résultats obtenus lors des analyses physico-chimiques de la poudre de lait montrent que tous les paramètres analysés pour les trois lots sont conformes aux normes, ce qui reflète que la poudre est stocké à l'abri de la lumière et elle est préparée dans de bonnes conditions en respectant toutes les propriétés de la poudre 0% de matière grasse.

### 6.4.1.3. Le thé

Les résultats obtenus lors des analyses physico-chimiques du thé vert sont illustrés dans le tableau 6.10.

Tableau 6.10 : les caractères physico-chimiques du thé

Paramètres \ Analyse	Thé vert	Norme*
Humidité	4%	5% maximum
Matière sèche	96%	95% minimum
Teneur en théine (caféine)	1.89	1.8 ± 0.2 %
Teneur en cendre	7.03	7%

*Norme\* : source interne de laboratoire de l'intendance*

Les résultats montrent que le taux d'humidité est de 4%, et que la teneur en matière sèche est de 96%. Ceci explique par le bon traitement des feuilles du théier après récolte (traitement à la chaleur, le roulage, suivi par le séchage jusqu'à humidité ≤ 3%) [20]. La bonne méthode de conservation du thé vert est exprimé par ce taux d'humidité.

Le thé vert présente des caractéristiques physico-chimiques dans les normes recommandées. Le thé doit être exempt de tout agent de conservation et de toute matière colorante étrangère [20].

### 6.4.1.4. L'eau de process

Les résultats obtenus lors des analyses physico-chimiques de l'eau de process sont présentés dans le tableau 6.11 suivant :

Tableau 6.11 : Analyses physico-chimiques de l'eau

Lot	1 <sup>er</sup> Lot	2 <sup>ème</sup> Lot	3 <sup>ème</sup> Lot	Normes*
Paramètres				
pH	7.51	7.60	7.49	7-8.5
Titre hydrométrique (TH) (°F)	22	19	21	25-35
Titre alcalimétrique simple (TA) (°F)	0	0	0	0
Titre alcalimétrique complet (TAC) (°F)	20	21	20	20-28
Taux de chlorure	35	35	35	35.5

\* : Source interne de la laiterie

Les résultats de pH varient entre 7.49 et 7.60. Ils indiquent une conformité du pH des eaux de process aux normes établies par la laiterie qui préconisent une valeur entre 7 et 8.5.

Le titre hydrométrique (TH) indique la teneur globale en sel de calcium et de magnésium qui sont responsables de la dureté de l'eau, dans la plupart des eaux naturelles, le calcium contribue au TH dans la proportion de 70 à 90%. [167]

La valeur du TH est entre 19 et 22°F sont en dessous de la norme interne de la laiterie ; cette non-conformité du TH est probablement due aux bases concentrations en calcium et en magnésium dans l'eau de process.

Le titre alcalimétrique TA qui dose la totalité des hydroxydes et la moitié des carbonates qui sont alors entièrement transformés en bicarbonates à un pH 8.3 [167]. Les résultats de TA sont égaux à 0°F. Ce qui indique une conformité de l'eau de process aux normes établies par la laiterie qui préconisent cette valeur.

Le titre alcalimétrique complet (TAC) correspond à la totalité des bicarbonates et des carbonates [167], elle correspond à la dureté qui peut être supprimée par ébullition. Les résultats de TAC sont 20°F pour le premier et le troisième lot et de 21°F

pour le deuxième ; ces valeurs indiquent une conformité du titre alcalimétrique complet aux normes établies par la laiterie qui préconisent une valeur entre 20 et 28°F.

## 6.4.2 Analyses microbiologiques des matières premières

### 6.4.2.1. Lait cru

Les résultats des analyses microbiologiques du lait cru sont résumés dans le tableau 6.12 suivant :

Tableau 6.12 : Analyses microbiologiques du lait cru

Lots Germes Recherchés	1 <sup>er</sup> Lot	2 <sup>eme</sup> Lot	3 <sup>eme</sup> Lot	Normes*
Germes aérobies mésophiles totaux	40000 UFC/ml	30000 UFC/ml	50000 UFC/ml	<10 <sup>5</sup> UFC/ml
Coliforme fécaux	Abs	Abs	Abs	<10 <sup>3</sup> UFC/ml
Staphylococcus aureus	Abs	Abs	Abs	Abs
Clostridium Sulfito réducteurs	Abs	Abs	Abs	50 UFC/ml
Streptocoque (D)	Abs	Abs	Abs	Abs
Salmonella	Abs	Abs	Abs	Abs

\* : Normes JORA. N°35 du 27 Mai 1998.

L'ensemble des résultats montre que le lait cru est d'une excellente qualité microbiologique par :

- L'absence de germes pathogènes dont : les *Clostridium Sulfito réducteurs*, les salmonelles et les *Staphylococcus auréus*.
- L'absence totale des Coliformes fécaux, Streptocoques fécaux indice de contamination fécale.

Ce qui explique que le lait cru a été traité dans de bonnes conditions, d'une vache en bon état de santé et qu'il a été stocké à basse température.

#### 6.4.2.2. Poudre de lait

Les résultats des analyses microbiologiques de la poudre de lait de 0% de MG (matière grasse) sont résumés dans le tableau 6.13 suivant :

Tableau 6.13: Analyses microbiologiques de la poudre de lait

Lots	1 <sup>er</sup> Lot	2 <sup>eme</sup> Lot	3 <sup>eme</sup> Lot	Normes*
Germes Recherchés				
Germes aérobies	90 UFC/ml	100 UFC/g	400 UFC/g	$< 2 \cdot 10^3$ UFC/g
Coliformes totaux	Abs	Abs	Abs	Abs
Coliformes fécaux	Abs	Abs	Abs	Abs
<i>Staphylococcus auréus</i>	Abs	Abs	Abs	Abs
<i>Clostridium Sulfito réducteurs</i>	Abs	Abs	Abs	Abs
Salmonella	Abs	Abs	Abs	Abs
Levures et moisissures	Abs	Abs	Abs	Abs

\* : source interne de la laiterie

D'après les résultats présentés dans le tableau ci-dessus, on remarque que la poudre utilisée est d'une bonne qualité microbiologique car :

- Présence des germes aérobies dans les 3 lots mais elle reste toujours inférieures aux normes  $< 2. 10^3$  UFC/g.
- Absence des coliformes indice de contamination fécale.
- Absence totale des germes pathogènes notamment les *Clostridium Sulfito-Réducteurs*.

Tout cela explique que la poudre de lait a été préparée et stockée dans des bonnes conditions.

#### 6.4.2.3. le thé

Les résultats obtenus lors des analyses microbiologiques du thé vert après extraction sont résumés dans le tableau 6.14 suivant :

Tableau 6.14 : Analyses microbiologiques de l'extrait du thé vert.

Analyse	Extrait du thé vert	Normes*
Germes recherché		
GAT 30°C	Abs	$< 10^4$ UFC/g
Coliforme fécaux	Abs	10 UFC/g
Clostridium sulfitoréducteur à 46°C	Abs	10 UFC/g
Salmonella	Abs	Abs
Moisissures	Abs	$10^3$ UFC/g

D'après les résultats présentés dans le tableau 6.14 ci-dessus, on a remarqué que l'extrait aqueux du thé vert (contenant des polyphénols totaux) est de bonne qualité microbiologique car on note :

- Absence des germes totaux malgré la norme tolérée de certains nombre germes ce qui s'explique par l'efficacité du traitement thermique durant l'extraction.
- Absence de germes de contamination fécale ;
- Absence totale de germes pathogènes dont : les Salmonelles, Clostridium sulfitoréducteurs et les moisissures.

#### 6.4.2.4. Eau de process

Les résultats obtenus lors des analyses microbiologiques de l'eau de process sont résumés dans le tableau 6.15 suivant

Tableaux 6.15 : Analyses microbiologiques de l'eau de process

Lots Germes Recherchés	1 <sup>er</sup> Lot	2 <sup>ème</sup> Lot	3 <sup>ème</sup> Lot	Normes* (UFC/ml)
Germes aérobies à 37°C	Abs	Abs	Abs	<10 / 100ml
Germe aérobies à 22°C	Abs	Abs	Abs	<10 / 100ml
Coliformes totaux	Abs	Abs	Abs	< 10 / 100ml
Coliformes fécaux	Abs	Abs	Abs	Abs / 100 ml
<i>Clostridium Sulfito réducteurs</i>	Abs	Abs	Abs	Abs < 50 ml
Streptocoques fécaux	Abs	Abs	Abs	Abs

\* : source interne de la laiterie

Les analyses microbiologiques de l'eau de process, provenant de leur tank de stockage, montre que l'eau utilisée pour la reconstitution du lait est d'une excellente qualité microbiologique par :

- L'absence de germes aérobies mésophiles totaux à 37 °C et à 22°C indicateur de la qualité hygiénique générale, car elle correspond aux normes recommandées.
- L'absence totale de tous les germes pathogènes notamment les *Clostridium Sulfito Réducteurs*.
- L'absence des coliformes totaux, les coliformes fécaux et les Streptocoques fécaux, indices de contaminations fécales.

Ainsi, il ressort de ces résultats, la bonne qualité microbiologique de l'eau de process, répondant ainsi aux critères microbiologiques d'une eau potable, ceci peut être expliqué par l'efficacité du traitement de chloration que subit l'eau de forage par addition d'eau de javel au niveau de l'unité.

#### 6.4.2.4. Crème fraîche

Les résultats lors des analyses microbiologiques de la crème fraîche sont présentés dans le tableau 6.16 suivant :

Tableau 6.16 : Analyses microbiologiques de la crème fraîche

Lots	1 <sup>er</sup> Lot	2 <sup>eme</sup> Lot	3 <sup>eme</sup> Lot	Normes* (UFC/ml)
Germes Recherchés				
Germes aérobies	130	150	100	<3. 10 <sup>3</sup>
Coliformes totaux	Abs	Abs	Abs	10
Coliformes fécaux	Abs	Abs	Abs	1-5
<i>Staphylococcus aureus</i>	Abs	Abs	Abs	5-10
Salmonella	Abs	Abs	Abs	Abs

\* : source interne de la laiterie

D'après les résultats présentés dans le tableau 6.16 ci-dessus, on a remarqué que la crème fraîche utilisée est d'une bonne qualité microbiologique car on note :

- Une présence de germes totaux mais avec des valeurs inférieures aux normes fixées qui s'explique par l'efficacité du traitement thermique.
- Absence des germes de contamination fécale ;
- Absence totale de germes pathogènes dont : les Salmonelles et les *Staphylococcus aureus*.

### 6.4.3. Analyses physico-chimiques des matières au cours de processus de Fabrication du fromage frais

#### 6.4.3.1. Lait reconstitué

Les résultats obtenus lors des analyses physico-chimiques du lait écrémé utilisé dans la fabrication des trois lots de fromage frais enrichis en polyphénols du thé vert sont présentés dans le tableau 6.17 suivant :

Tableau 6.17 : Résultats d'analyses physico-chimiques du lait écrémé reconstitué

Lot	1 <sup>er</sup> Lot	2 <sup>eme</sup> Lot	3 <sup>eme</sup> Lot	Normes*
Paramètres				
L'acidité Dornic (D°)	17	15	17	14-18
La teneur en matière sèche (%)	86.4	85.2	87.6	90
La teneur en matière grasse (%)	Trace	Trace	Trace	0-0.5
La densité	1.033	1.033	1.033	1.035

\* : *Source interne de la laiterie*

Les résultats de l'acidité sont de 17°D pour le premier et le troisième lot ; et de 15°D pour le deuxième lot ; ces valeurs sont conformes aux normes recommandées. Selon Vierling (2003), l'acidité du lait et du à la présence de l'acide lactique dont 1D° =10mg d'acide lactique dans 100g de lait [15].

Les résultats de la teneur en matière sèche sont de 86.4% pour le premier et 85.2 % pour le deuxième lot et de 87.6 pour le troisième lot. Ces valeurs sont inférieures aux normes établies par la laiterie qui préconise une valeur de 90% s'explique par le non respect de la recette avec addition d'eau en plus.

Les résultats de la teneur du lait écrémé en matière grasse (MG), indiquent la conformité du lait aux normes de la laiterie ; cela nous permet de déduire le bon déroulement du processus d'écémage de la poudre de lait.

Les résultats de la densité sont de 1.035 pour les trois lots des laits ; ces valeurs indiquent une conformité de la densité aux normes.

#### 6.4.3.2. Crème fraîche

Les résultats obtenus lors des analyses physico-chimiques de la crème fraîche utilisée dans la fabrication des trois lots de fromage frais enrichis en polyphénols extrait du thé vert sont présentés dans le tableau 6.18 suivant :

Tableau 6.18 : Analyses physico-chimiques de la crème fraîche

Lot	1 <sup>er</sup> Lot	2 <sup>ème</sup> Lot	3 <sup>ème</sup> Lot	Normes*
Paramètres				
L'acidité Dornic (D°)	14	14	14	13-15
La teneur en matière grasse MG (%)	38	37	39	34-40
La teneur en matière sèche (%)	42.34	41.21	43.86	40-45
La teneur en matière sèche dégraissé (%)	4.34	4.21	4.86	4-6

\* : Source interne de la laiterie

- L'acidité de la crème fraîche se situe dans les normes recommandées par la laiterie, car elle a une relation directe avec l'acidité du lait cru.
- La teneur en matières grasses indique la conformité du lait cru à normes fixées par l'entreprise, ainsi que pour l'efficacité de l'écémage du lait cru.

- La teneur en matière sèche de la crème fraîche indique la conformité aux normes d'entreprise.

#### 6.4.3.3. Caillé maigre

Les résultats obtenus lors des analyses physico-chimiques du caillé maigre utilisés dans la fabrication des trois lots du fromage frais enrichis en polyphénols extrait du thé vert sont présentés dans le tableau 6.19 suivant :

Tableau 6.19 : Analyses physico-chimiques du caillé maigre

Lot	1 <sup>er</sup> Lot	2 <sup>eme</sup> Lot	3 <sup>eme</sup> Lot	Normes*
Paramètres				
L'acidité Dornic (°D)	80	79	80	80-82
La teneur en matière sèche (%)	17.27	17.56	17	17-18

\* : Source interne de la laiterie

- L'acidité du caillé après maturation est parfois inférieure aux normes, ceci s'explique par une insuffisance de fermentation donc le non respect de temps de maturation.
- La teneur en matière sèche (EST) se situe dans l'intervalle des normes recommandées par l'entreprise, qui exprime une bonne conduite de séparation.

6.4.4. Analyses physico-chimiques de l'alicament au cours de la conservation à 6°C pendant 28 jours

La moyenne des résultats des 3 lots lors des analyses physico-chimiques du fromage frais enrichis en polyphénols du thé vert pour les 3 essais à savoir l'addition de 0.5ml, 1ml, et 2ml d'extrait de polyphénols totaux extrait sont présents dans le tableau 6.20.

Tableau 6.20 : Analyses physico-chimiques du fromage frais enrichis en polyphénols  
 totaux au cours de stockage à 6°C pendant 28 jours

Jours Paramètres	J0	J1	J7	J15	J21	J28
<b>1<sup>er</sup> Essai (0,5 ml de polyphénols totaux)</b>						
ES	19.22	19.04	19.55	19.72	20.14	20.17
MG	3.99	3.95	3.95	3.93	3.93	3.93
G/S	20.78	20.74	20.74	19.44	19.52	19.48
Taux de sel	1.46	0.87	0.86	0.85	0.79	0.79
Taux de protéine	9.45	11.58	11.68	11.63	12.85	12.85
<b>2<sup>ème</sup> Essai (1 ml de polyphénols totaux)</b>						
ES	18.74	19.20	19.55	20.23	20.32	20.32
MG	3.96	3.80	3.78	4.15	4.06	4.02
G/S	21.14	19.89	19.32	20.52	19.99	19.32
Taux de sel	1.41	0.79	0.77	0.88	0.87	0.88
Taux de protéine	9.51	12.39	12.36	12.42	12.30	12.36
<b>3<sup>ème</sup> Essai (2 ml de polyphénols totaux)</b>						
ES	18.98	18.87	19.04	19.70	20.01	20.01
MG	3.95	3.71	3.85	3.72	3.92	3.97
G/S	20.80	19.65	20.22	18.88	19.61	19.84
Taux de sel	1.50	0.78	0.82	0.89	0.82	0.85
Taux de protéine	8.93	12.04	11.86	11.46	11.68	11.70
<b>Temoins</b>						
ES	18.62	18.65	19.24	19.34	20.15	20.16
MG	3.98	3.97	3.98	3.97	4.01	4.0
G/S	20.47	20.50	20.67	20.20	19.90	19.84
Taux de sel	1.32	1.30	1.27	0.94	0.81	0.80
Taux de protéine	8.84	8.90	10.11	10.97	12.60	12.64

Norme : G/S 20 - 21,4 % MG: 3,55 – 4,2% ES : 17,7- 18,9%

Les résultats de l'EST au cours du stockage à 6°C révèlent une légère augmentation pour les 3 essais, ainsi que le témoin au cours de cette durée de conservation

Le MG reste dans les normes recommandées, or qu'il y a pas de diminution remarquable. Ceci indique l'absence des enzymes lipolytiques dus aux bactéries psychrotrophes.

Le taux de protéines augmente, ceci explique par l'enrichissement avec les protéines de thé. Les résultats physicochimiques au cours de la conservation reste stable pour les 3 essais élaborés pendant 28 jours. Ce qui permet d'évaluer la date limite de consommation qui est de 28 jours pour notre alicament (fromage frais enrichis en polyphénols)

#### 6.4.5. Analyses microbiologiques de l'aliment au cours de la conservation à 6°C pendant 28 jours

Les résultats microbiologiques du produit fini à savoir le fromage frais enrichis en polyphénols extrait du thé vert, ainsi qu'au cours du stockage sont consignés dans le tableau 6.21 suivant pour les 3 essais à différentes doses de polyphénols (0.5ml, 1ml, et 2ml) dont les résultats microbiologiques similaires ont été obtenus.

Tableau 6.21 : Analyses microbiologiques du fromage frais enrichis en polyphénols  
du thé vert

Germes recherchés  Jours	Germes aérobies	Coliformes Totaux	Coliformes fécaux	Levure	moisissure	S.auréus	Salmonella
J0	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs
J1	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs
J7	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs
J15	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs
J21	Abs	Abs	Abs	Abs	10	Abs	Abs
J28	Abs	Abs	Abs	Abs	40	Abs	Abs
Témoins	Abs	Abs	Abs	Abs	53	Abs	Abs
Normes* (UFC/ml)	$< 3.10^3$	10	1	$< 5.10^2$	$< 5.10^2$	10	Abs

\* : source interne de la laiterie

Les résultats microbiologiques du fromage frais enrichis en polyphénols totaux extrait du thé vert conservés à 6°C pendant 28 jours sont conformes aux normes, du fait qu'ils ont révélé l'absence totale de tous les germes recherchés, à l'exception des moisissures au 28<sup>ème</sup> jour, qui sont en développement à partir du 21<sup>ème</sup> jour, mais restant dans la norme autorisée par l'entreprise.

L'absence totale de germes aérobies mésophiles totaux, est due à la maîtrise de la qualité des matières premières, à la bonne pratique de fabrication ; éventuellement à la destruction de la microflore du produit fini [144].

L'absence de germes peut s'expliquer par le respect des règles d'hygiène [144] :

- La qualité des matières premières (lait cru, eau, poudre de lait et l'extrait du thé)
- L'état hygiénique des équipements utilisés (bacs, mélangeur ;...)

- Le prélèvement et l'analyse ont été réalisés dans des conditions d'asepties strictes.

#### 6.4.6. Analyses organoleptiques de l'alicament (Fromage frais enrichis en polyphénols)

##### 1<sup>er</sup> ESSAI :

D'après le tableau 6.22 relatif aux résultats de l'analyse sensorielle du premier essai, les membres de jury l'ont déclarés de bonne qualité organoleptique, caractérisée par une consistance assez marquée avec un goût doux. Les résultats montrent que 2 échantillons sur 5 présentent un bon goût, 2/5 un goût moyen, et 1/5 un très bon goût. L'arôme de thé est un peu masqué, avec une odeur fraîche caractéristique du fromage frais ,4/5 des échantillons ont une odeur et un arôme bons et 1/5 moyen.

La couleur est jugée très bonne pour 2 échantillons sur 5, bonne pour 2/5 et moyenne pour 1/5.

Tableau 6.22 : Résultats des analyses sensorielles du 1<sup>er</sup> essai

(0.5 ml extrait de thé)

Echantillons	Goût	Aspect	Mouthfeel (aspect en bouche)	Odeur Arome	Couleur
Echantillon 1	3	2	2	4	1
Echantillon 2	2	2	2	3	3
Echantillon 3	2	1	2	2	2
Echantillon 4	3	2	2	2	2
Echantillon 5	1	1	2	2	1

 2<sup>ème</sup> ESSAI :

L'évaluation sensorielle du deuxième essai présenté dans le tableau 6.23 pour les 5\_échantillons montre :

Une qualité organoleptique très bonne, avec un goût et odeur du thé qui masque un peu l'odeur de l'arome de la crème fraiche, de ce fait 2/5 et 2/5 des échantillons analysés présentent respectivement un goût et odeur très bon, et 2/5 présentent un bon goût et une odeur moyenne, , car parmi les membres des jury, certains ont aimé l'odeur et le goût du thé, l'aspect est un peu lisse , 3/5 des échantillons montrent un aspect bon , et 1/5 un aspect moyen et 1/5 médiocre, mais l'aspect en bouche est bon,1 échantillons sur 5 est très bon, 3/5 moyens, et 1/5 médiocre .

Tableau 6.23 : Résultats des analyses sensorielles du 2eme Essai (1ml extrait du thé).

Echantillons	Goût	Aspect	Mouthfeel (aspect en bouche)	Odeur Arome	Couleur
Echantillon 1	1	2	2	1	2
Echantillon 2	3	4	4	3	4
Echantillon 3	1	4	3	1	4
Echantillon 4	3	4	3	3	4
Echantillon 5	2	3	4	2	2

### 3<sup>ème</sup> Essai :

Les analyses sensorielles du 3eme essai dont les résultats sont mentionnés dans le tableau 6. , présentent un goût du thé, le goût est moyen pour 3 échantillons sur 5, bon pour 1/5, et médiocre pour 1/5.

L'aromatisation est masquée de fromage frais naturelle, car il y a la présence de l'arome du thé, elle est moyenne pour 2 échantillons sur 5, et médiocre pour 2/5, avec un aspect peu lisse et non homogène, il est médiocre pour 3 échantillons sur 5, moyen et bon pour 1/5. un Mouthfeel légèrement grincheux, il est moyen pour 2chantillons sur 5, médiocre pour 2/5, et bon pour 1/5. La coloration est médiocre pour 3 échantillons sur 5 et moyenne pour 2/5.

Le membre de jury a opté l'addition de 1ml d'extrait des polyphénols totaux du thé vert, sachant que 2ml d'extrait de thé est déclaré d'une odeur trop forte ; ainsi la présence du gout du thé.

Tableau 6.24 : Résultats des analyses sensorielles du 3<sup>ème</sup> Essai (2ml extrait du thé).

Echantillons	Goût	Aspect	Mouthfeel (aspect en bouche)	Odeur Arome	Couleur
Echantillon 1	4	4	3	4	2
Echantillon 2	2	2	3	3	2
Echantillon 3	3	2	3	1	2
Echantillon 4	2	3	4	2	2
Echantillon 5	2	2	2	3	2

## CONCLUSION GENERALE

Ce travail vise à la fois, l'extraction des polyphénols totaux du thé vert et la formulation d'un fromage frais enrichi en polyphénols. Les polyphénols du thé vert agissent comme des antioxydants et protègent les tissus contre les dommages causés par les radicaux libres, ce qui explique le choix de la plante *Camellia sinensis*.

Notre étude a porté sur la préparation d'un alicament à base d'un antioxydant naturel : les polyphénols totaux extraits du thé vert.

Les résultats analytiques de cet extrait nous a permis d'identifier la présence de la molécule thérapeutique qu'est L'epigallocatechine gallate révélé par HPLC de l'ordre de 50%.

Par ailleurs, l'étude de la croissance des ferments lactiques en présence d'extrait de polyphenols n'a montré aucun effet inhibiteur sur les bactéries lactiques mésophiles. Enfin, le test de toxicité de ces polyphénols sur des souris, nous a permis de situer la dose à 600mg à ajouter au fromage frais.

De plus, l'addition de cet extrait naturel au fromage frais révèle une stabilité aussi bien microbiologique que physico-chimique durant les 28 jours de stockage à +6°C. Sur le plan organoleptique, l'incorporation des polyhénols totaux du thé vert à une dose de 1ml a été bien acceptée par le jury de dégustation.

L'apport journalier en antioxydants non nutriments sont en fonction du type d'alimentation, certains nutritionnistes recommandent des apports alimentaires journaliers en composés phénoliques chez l'homme compris entre 100 et 1000 mg [1] [3].

Nous souhaitons que les travaux continus dans ce sens dont l'objectif de le commercialiser.

## Bibliographie

- [1] Marcel R., Veronique C., Delzenne N., « Aliment fonctionnels » ( 2008). Ed lavoisier , collection sciences et techniques agroalimentaire.
- [2] Lockwood B., “the quality of commercially available nutraceutical supplements and food Sources” (2011).
- [3] Sarni-Manchado, P. & Cheynier, V., « *Les polyphénols en agroalimentaire* ». (2006) Tec & Doc, Lavoisier, Paris, 398 p.
- [4] Wallace T.C, Guisti M.M., “determination of color, pigment, and phenolic stability” (2008). Dept. Of Food Science and technology, the Ohio State Univ., Columbus , U.S.A
- [5] Schontal A., “Department of Molecular Microbiology and Immunology, Keck school of Medicine” (2011). University of southern california, Los Angeles, CA, U.S.A
- [6] Branger A., Richer M., Roustel S., « microbiochimie et alimentation » (2007). Ed :Educagri Editionrn.343 pages.
- [7] Corieu G., Luquet F.M., « Bactérie lactiques et alicament » (2005). Ed lavoisier. Collection sciences et techniques agroalimentaire.
- [8] Luc Cynober., “Complement alimentaire, alicament, médicament : qui est qui”. Cahiers de nutrition et de diététique. Volume 43 Février (2008) page 15-21.

- [9] Desmettre T., Lecert J.M., “Aliments ou suppléments à doses nutritionnelles quel avenir de la micronutrition en ophtalmologie ?!” Journal Français d’ophtalmologie. Volume 35, issues 3, Mars (2005) page 239-242
- [10] Larpent J-P., « Microbiologie Alimentaire ; Technique de laboratoire ». (1997) Paris; technique et documentation- Lavoisier ; 1997. P; 1073.
- [11] Luquet F-M., « Lait et produit laitier . Vache; brebis; chevre » (1985). ed Techniques et documentation lavoisier. Paris. P; 367.
- [12] Jean claude G ., « le fromage » (1997); 3eme edition Lavoisier Tec et doc.
- [13] Leveau J.Y.,et Bouix M., « Microbiologie industrielle des microorganismes d’intérêt industriel » (1993), Technique et Documentation- Lavoisier, Paris, codex 08, p (170-172-187) ,612pages.
- [14] Mietton B .; Desmazeaud M .; et Webert F ., « Bactéries lactiques. Aspect fondamentaux et technologique ». (1994) Vol 2. ed. Loriga Uriage.
- [15] Vierling E., « Aliments et boisson ; Filiere et produits » (2003). ed Biosciences et techniques; Paris. P ; 271.
- [16] Anonyme "ministère de l’industrie. (Mars 2004). Direction de l’industrie Agroalimentaire".
- [17] Mariage Frères., “*L’Art du Thé*”, (2003) , 103 p.
- [18] FAO. (2007). Production / ProdStat / Crops. by Food and Agriculture Organisation of the United Nations from <http://faostat.fao.org/>.
- [19] FAO.” Situation actuelle du marché du thé et perspectives à moyen terme.Groupe Intergouvernemental sur le thé ”, Nairobi, (2006) 1-13 p.

- [19a] National Bureau of Statistics of China. China Statistical Year Book (2006).  
<http://www.stats.gov.cn/tjsj/ndsj/2006/indexeh.htm>.
- [20] Delmas, F.-X. & Minet, M. " *Le guide de dégustation de l'amateur de thé*. Les éditions du Chêne", (2007) Paris, 239 p.
- [21] Haslam, E..” Thoughts on thearubigins”. *Phytochem.* (2003) 64 (1): 61-73.
- [22] Goodsall, C. W., Hodges, R. C., Jones, T. G., Mawson, J. D. & Stabler, P. J. " Tea Manufacture". (1999) Application: WO, Unilever Plc, UK; Unilever N.V.; Hindustan Lever Limited.
- [23] Luczaj, W. & Skrzydlewska, E., “Antioxidative properties of black tea”. *Prev. Med.*, (2005) 40 (6): 910-918.
- [24] Selvendran, R. R. & Perera, B. P. M., “Chemical composition of tea leaf cell-wall”. *Chem. Ind.* (1971). (21): 577-578.
- [25] Jöbstl, E., Fairclough, J. P. A., Davies, A. P. & Williamson, M. P., “Creaming in black tea”. *J. Agric. Food Chem.*, (2005) 53 (20): 7997-8002.
- [26] Braconnot, H. " Recherche sur un nouvel acide universellement répandu dans tous les végétaux". *Annale de Chimie et de Physique*, (1825) 2 (28): 173-178.
- [27] 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.
- [28] Axelos, M. A. V. & Thibault, J. F. "The chemistry of low-methoxyl pectin gelation. *Chem. Technol.Pectin*" (1991): 109-118.
- [29] Keijbets, M. J., Pilnik, W. & Vaal, J. F. A., “ Model studies on behavior of pectic substances in the potato cell wall during boiling”. *Potato Res.*, (1976) 19: 289-303.

- [30] Willats, W. G. T., Knox, J. P. & Mikkelsen, J. D. "Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel". *Trends Food Sci. Technol.*, (2006) 17 (3): 97-104.
- [31] Chandrakant Ankolecar., David Johnson., Marcia Da Silva Pinto., Kevin Johnson., Ronald Labbe., and Kalidas Shetty., "Inhibitory potential of tea polyphenolics and influence of extraction time against *Helicobacter pylori* and lack of inhibition of beneficial lactic acid bacteria". *Journal of medicinal food*. J Med Food 00 (0) (2011),1-9
- [32] Edeas M., "Les secret de santé du thé". (2005) Ed : Alpen Edition s.a.m. 95p
- [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 responses". *Biol Psychol*, vol. (2007) 74, n°1, P. 39-45.

- [37] Kuriyama S, T Shimazu, K 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 a 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] Bohehm 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] UNUP., "The United nations university press (UNUP)" (1986). Food and Press nutrition bulletin.
- [43] Druyne T., " Condensed vegetable tannius :biodiversity in structure and biological Activities". Biochemical Systematics and ecology. : (1999) 27.(4): 445-459.

- [44] Résémy C., “Les légumes et fruits sources de micronutriments protecteurs ». (1998) Equation-Nutrition N°12. (APRIFEL). Inra.
- [45] Seigler SD., “Plant secondary metabolism” (1998) 245p.
- [46] Haslam E., “ Skikimic acid, metabolism et metabolites ”.Jhon wiley and sons (1993) 4:331-343.
- [47] Nakaniski K, Goto T, Itô S, Nabri S, Nozo S., “Natural products chemistry”. Academic Press (ed.) : (1975) 2:218.
- [48] Richter . « Métabolisme des végétaux ». (1993) Physiologie et Biochimie : 322-323.
- [49] Goodwin, T. W., “*Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments*”. (1965) Academic Press Inc., London, 583 p.
- [50] "Arce, L., Rios, A. & Valcarcel, M "Determination of anti-carcinogenic polyphenols present in green tea using capillary electrophoresis coupled to a flow injection system". *J. Chromatogr., A*, (1998) 827: 113-120.
- [51] Zhu, Q. Y., Zhang, A., Tsang, D., Huang, Y. & Chen, Z.-Y., “Stability of Green Tea Catechins”. *J. Agric. Food Chem.*, (1997). 45 (12): 4624-4628.
- [52] Muthumani, T. & Kumar, R. S. S., “Influence of fermentation time on the development of compounds responsible for quality in black tea”. *Food Chem.*, (2006) 101 (1): 98-102.

- [53] Haslam E, Lilley TH, Warminski E, Liao H, Cai Y, Martin R, Gaffney SH, Goulding PN, Luck G., "Polyphenols complexation". (1992), ACS Symposium Series. American Chemical Society, New York, 8-50.
- [54] Spiro, M. & Lam, P.-L. L., « Kinetics and equilibria of tea infusion. Part 12. Equilibrium and kinetic study of mineral ion extraction from black Assam Bukial and green Chun Mee teas". *Food Chem.*, (1995). 54 (4): 393-396.
- [55] Del Rio, D., Stewart, A. J., Mullen, W., Burns, J., Lean, M. E. J., Brighenti, F. & Crozier, A., "HPLCMS. Analysis of Phenolic Compounds and Purine Alkaloids in Green and Black Tea". *J. Agric. Food Chem.*, (2004) 52(10): 2807-2815.
- [56] Nonaka, G., Kawahara, O. & Nishioka, I., "Tannins and related compounds. XV. A new class of dimeric flavan-3-ol gallates, theasinensins A and B, and proanthocyanidin gallates from green tea leaf". *Chem. Pharm. Bull.*, (1983) 31 (11): 3906-3914.
- [57] Roberts, E. A. H., "Economic importance of flavonoid substances; tea fermentation in *The Chemistry of Flavonoid Compounds*. Ed. M. Co. T. A. Geissman", (1962) New York, 468-512 p.
- [58] Moreau, F." *Alcaloïdes et plantes alcaloïfères*", (1964) Puf, 3e éd., Paris, 158 p.
- [59] Trevisanato, S. I. & Kim, Y. I., "Tea and health". *Nutr. Rev.*, (2000) 58 (1): 1-10.
- [60] Yamanishi, T. & Kobayashi, A., "Progress of tea aroma chemistry in *Flavor Chemistry: Thirty Years of Progress*". (1999). Ed. R. Teranishi, E. L. Wick and I.

Horstein.Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York, 135-145 p.

- [61] Shimoda, M., Shigematsu, H., Shiratsuchi, H. & Osajima, Y. "Comparison of the odor concentrates by SDE and Adsorptive column method from green tea infusion". *J. Agric. Food Chem.*, (1995) 43: 1616-1620.
- [62] Schuh, C. & Schierberle, P., " Characterization of the key aroma compounds in the beverage prepared from Darjeeling black tea: Quantitative differences between tea leaves and infusion". *J. Agric. Food Chem.*, (2006)54 (3): 916-924.
- [63] Dalluge, J. J., Nelson, B. C., Brown Thomas, J. & Sander, L. C., " Selection of column and gradient elution system for the separation of catechins in green tea using high-performance liquid chromatography". *J Chromatogr., A*, (1998) 793 (2): 265-274.
- [64] Prasain, J. K., Wang, C.-C. & Barnes, S., "Mass spectrometric methods for the determination of flavonoids in biological samples". *Free radic. biol. med.*, (2004).31 (9): 1324-1350.
- [65] Lee H et ., "Protective effect of green tea polyphénol EGCG against neuronal damage and bain edema after unilateral cerebral ischemia in gerbils". *J. Neurosci: Res.*, (2004) Se-t 15, 77 (6) ; 892-900.
- [66] Hussain T et al-"Green tea constituent épigallocatechine-3-gallate selectively inhibits Cox-2 without affecting Cox-1 expression in human prostate cancer cells"; *Int. J. Cancer* ; (2004) Sept 28; e-pub ahead of print.
- [67] Guo S, et al.," Protective effect of green tea polyphénols in the 6 –OHDA rat model o f Parkinson's disease throught inhibition of ROS –NO pathway", *Biol, Psychiatry*, (2007) Dec 15, 62(12) ; 1353-62.

- [68] Tsuneki H, et al., "effect of green tea on blood glucose levels and serum proteomic in diabetic mice and on glucose metabolism in healthy human", *BMC Pharmacol.*, (2004) Aug 26, 4(1); 18.
- [69] Kreydiyyeh S.I. et al., Tea extract inhibits intestinal absorption of glucose and sodium in rat, *Comp. Biochem. Physiol.C. pharmacol. Toxicol. Endocrine*, (1994), 108; 359-65.
- [70] Widlansky M.E. et al., "Accut EGCG supplementation reverses endothelial dysfunction in patients with coronary artery disease, *Journal of American College of Nutrition*", (2010), Vol.26, n 2, 95 – 102.
- [71] Ouyang P. et al., "Green tea polyphenols inhibit low density lipoprotein induced proliferation of rat vascular smooth muscle cells", *Di Yi Xue Bao*, (2004) Sep, 24 (9) : 975-9.
- [72] Dacic M, Belleau G " polyphenols and beer flavor. In : *Proceedings American society of brewing chemists*" . American society of Brewing Chemists, (1973) 107-104.
- [73] Delcour JA, Vandenbergue MM, Corten PF, Dondeyne P , " Flavor thresholds of polyphenolics in water". *Am J Enol Vitic*, (1984) 35: 134-136.
- [74] Etievant PX., " Wine. In : *Maarse H. Volatile compounds in foods and Beverages*". (1991) Marcel Dekker, New York, 483-546.
- [75] Maga JA., "Simple phenol and phenolic compounds in food flavour". *Crit Rev Food Sci Nutr*, (1978) 10: 323-372.

- [76] Singleton VL, Noble AC., " Wine flavor and phenolic substances. In : Chichester CO. Advance in food Recherch", (1976) suppl. 3, ACS Symposium Series. American Chemical Society; Washington, DC, 47-70
- [77] Thorngate JH, Noble AC., " Sensory evaluation of bitterness and astringency of 3R(-) epicatechin and 3S(+) catechin". J Sci Food Agric, (1995) 67: 531-535.
- [78] Foo L, Porter L., "Synthesis and conformation of procyanidin diastereoisomers". (1983) J Chem Soc Perkin Trans I, 1535-1543.
- [79] Porter LJ., " Flavans and proanthocyanidins. In : Harborne JB. *The flavonoids : advances in research since 1980*". (1988) Chapman and Hall, New York, 21-60.
- [80] Sanderson GW, Ranadive AS, Eisenberg LS, Farrel FJ, Simons R, Manley CH, Coggon P. " contribution of polyphenolic compounds to the taste of tea . In : phenolic sulphur and nitrogen compounds in food flavours". (1976) ACS symposium series. American Chemical Society, Washington, DC, 14-46.
- [81] Scharbert S, Holzmann N, Hofmann T.," identification of the astringent taste compounds in black tea infusion by combining instrumental analysis and human bioresponse". J Agric Food Chem, (2004) 52 : 3498-3508.
- [82] Vidal S, Courcoux P, Francis L, Kwiatkowski M, Cheynier V, Waters EJ., " taste and mouth-feel proprieties of different type of tannin-like polyphenolic compounds and anthocyanins in wine". Anal Chim Acta, (2004) **513** : 57-65.

- [83] Vidal S, Francis L, Guyot S, Marnet N, Kwiatkowski M, Gawel R, Cheynier V, Waters EJ., “The mouth-feel properties of grape and apple proanthocyanidins in a wine-like medium”. *J Sci Food Agric*, (2003) **83** : 564-573.
- [84] Lea AGH ., “ Bitterness and astringency : the procyanidins of fermented apple ciders In: Rouseff RL. *Bitterness in foods and beverages*”. (1990) *Developments in food Science* 25, Elsevier, Amsterdam, 123-143.
- [85] Mattes RD.” Influences on acceptance of bitter foods and beverages ». *Physiol Behav*, (1994) **56** : 1229-1236.
- [86] Lea AGH, Arnold GM., “ The phenolics of ciders : bitterness and astringency”. *J Sci Food Agric*, (1978) **29** : 478-483.
- [87] Lea AGH, Timberlake CF., “ The phenolics of ciders.1. Procyanidins”. *J Sci Food Agric*, (1974) **25** : 1537-1545.
- [88] Martin S, Pangborn RM., “Taste interaction of ethyl alcohol with sweet, salty, sour, and bitter compounds”. *J Sci Food Agric*, (1970) **21**: 653-655.
- [89] Serafini M, Maiani G, Ferro-Luzzi A., “Effect of ethanol on red wine tannin protein (BSA) interaction”. *J Agric Food chem*, (1997) **45** : 3148-3151.
- [90] Yokotsuka K, Singleton VL., “Interactive precipitation between graded peptides from gelatine and specific grape tannin fractions in wine-like model solutions”. *Am J Enol Vitic*, (1987) **38** : 199-205.

- [91] Noble AC., "Bitterness and astringency in wine. In : Roussef R. *Bitterness in foods and beverages*". (1990) *Developments in Food Science* 25, Elsevier, Amsterdam, 145-158.
- [92] Guinard J-X, Pangborn RM, Lewis MJ., " the time –course of astringency in wine upon repeated ingestion". *Am J Enol vitic*, (1986) 37: 184-189.
- [93] Kallithraka S, Bakker J, Clifford MN., "Evaluation of bitterness and astringency of catechin and epicatechin in red wine and in model solutions". *J Sensory Studies*, (1997) **12** : 25-37.
- [94] Gawel R. Red wine astringency : a review. *Aust J Grape Wine Res*, (1998) 4: 74-95.
- [95] Veerman EC, Valentijn-Benz M, Nieuw Amerogen AV., "Viscosity of human salivary mucins: effect of pH and ionic strength and role of sialic acid". *J Biol Buccal*, (1989) 17: 297-306.
- [96] Nordbo H, Darwish S, Bhatnagar R., " Rate of viscosity change in five protein fraction following pH alterations". *Scandinavian J Dental Res*, (1984) 92: 302-305.
- [97] Bartoshuk LM." The biological basis of food perception and acceptance. *Food Qual Prefer*", (1993) 4: 21-32.
- [98] Clavino A, Garcia –Medina M, Cometto-Muniz J., " Interaction in caffeine-sucrose and coffee sucrose mixtures : evidence of taste and flavour suppression". *Chem. Senses*, (1990) **15**: 505-519.

- [99] Lawless HT. "Evidence for neural inhibition in bittersweet taste mixture".  
*J. comparative Physiology*, (1979) **93** : 538-547.
- [100] Lyman BJ, Green BG., "Oral astringency : effect of repeated exposure and interaction with sweeteners". *Chem Senses*, (1990) **15**: 151-164.
- [101] Breslin PA, Gilmore M, Beauchamp GK, Green BG. " Psychophysical evidence that oral astringency is a tactile sensation". *Chem Senses*, (1993) **18**: 405-417.
- [102] Maury A., « Etudes des phénomènes impliqués dans les collages protéiques en œnologie. Science et procédés Biologiques et industriels ». (2001) Montpellier II-ENSAM, 215.
- [103] Luck G, Liao H, Murray NJ, Grimmer HR, Warminski EE, Williamson MP, Lilly TH, Haslam E., "Polyphenols, astringency and prolin- rich proteins. *Phytochemistry* » , (1994) **37**: 357-371.
- [104] Powell C, Clifford MN, Opie SC, Ford MA, Robertson A, Gibson CL., " Tea cream formation : the contribution of black tea phenolic pigments determined by HPLC". *J Sci Food Agric*, (1992) **63**: 77-86.
- [105] Lawless HT, Corrigan CJ, Lee CB., " Interaction of astringent substances". *Chem Senses*, (1994) **19**: 141-157.
- [106] Haslam E et Lielly TH., " Natural astringency in foodstuffs. A molecular

- Interpretation". *Crit Rev Food Sci Nutr*, (1988) **27**: 1- 40.
- [107] Clifford MN., " Astringency. In : Tomas Barberan F, Robins R. *Phytochemistry*. Clarendon Press, Oxford, (1997) 87- 108.
- [108] Boyd B., Ford C., Koepke Michael C., Gary K., Horn E., McAnalley S, et McAnalley B. " Etude pilote ouverte de l'effet antioxydant d'Ambrotose AOTM sur des personnes en bonne santé", *GlycoScience & Nutrition*. (2003) 4(6), 7p.
- [109] Morel Y. et Barouki R., "Repression of gene expression by oxidative stress". *Biochem J*. (1999)342(3), 481-496.
- [110] Favier A. "Le stress oxydant. Interet conceptuel et experimental dans la comprehension des mecanismes des maladies et potentiel thérapeutique". *L'actualité chimique*. (2003) 108-115.
- [111] Vansant G., Radicaux libres et antioxydants ; principes de base. Symposium « Antioxydants et alimentation ». (2004) Institut Danone.
- [112] Novelli G.P., " Role of free radicals in septic shock". *J Physiol Pharmacol*. (1997) 48, 517-527.
- [113] 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.

- [114] Hossein S.R et Lytle M., “Les antioxydants. Traducteur : alain boutilier”. Catie feuilles d’information (2001) 5p.
- [115] Krippeit-Drews P., Lang F., Haussinger D. et Drews G., “H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced hyperpolarization of pancreatic B-cells”. *Pflugers Arch.* (1994) 426, 552-554.
- [116] Pincemail J., Meurisse M., Limet R. et Defraigne J.O., « Mesure et utilisation des antioxydant en médecine humain ». (1998) MS. 73.
- [117] Atawodie S.E., “Antioxidant potentiel of african journal of biotechnology (2005) 4(2), 128-133
- [118] Georgetti S.R., Casagrande R., Di Mambro V.M., Azzolini Ana ECS. Et Fonesca Maria. J.V., "Evaluation of the antioxidant Activity of Different Flavonoids by the Chemiluminescence Method". (2003) *AAPS PharmSci.* 5 (2), 5p.
- [119] Hale A.L.,” Screening potato Genotypes for Antioxidant Activity, Identification of the Responsible Compounds, and Differentiating Russet Norkotah Strains using Aflp and Microsatellite Marker Analysis”. (2003) Office Of graduate studies of texas A & M University –Genetics. 260p.
- [120] Svoboda K.P. et Hampson J.B., “Bioactivity of essential oils of selected temperate aromatic plants : antibacterial, antioxidant, antiinflammatory and other related pharmacological activities”. (1995). Plant Biology Department , SAC Auchincruive, Ayr, Scotland , UK., KA6 5HW.

- [121] Bruneton J. "Pharmacognosie, phytochimie, Plantes medicinales , 3ème éd .  
Paris : Edition Médicales internationnales", (1999) Edition Tec & Doc Lavoisier. 120p.
- [122] 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.
- [123] Maydani M., “Vitamine E and prevention of heart disease in high – risk patient”.  
Nutr Rev. (2000) 58, 278-281.
- [124] 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.
- [125] 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.
- [126] Panda K., Chattopadhyay R., Fhosh M. K et al., « Vitamin C prevents cigarette  
smoke induced oxidative damage of proteins and increased proteolysis”. Free Radical  
Biol Med. (1999)27, 1064 -10079.
- [127] 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.

- [128] Cakatay U., Telci A., Kayali R. "effet of  $\alpha$ -lipoic acid supplementation on oxidative protein damage in the streptozotocin –diabetic rat".( 2000) Res Exp Med. 199, 243-251.
- [129] Packer L. et al., “ Alpha-Loique Acid as a Biological Antioxidant Free Radical Biology and Medicine”. (1995) 19, 227-250.
- [130] 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.
- [131] 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.
- [132] Bassu Tapen K., Temple Norman J. et Garg Manohar L " Antioxidants in human health and disease" (1999), CAB International.
- [133] Hegarty V.M. “Tea Drinking and bone Mineral Density in Older Women”. Am J Clin Nutr. (2000) 71 (41) 3-7.
- [134] 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.

- [135] Escribano-Bailon, M.T., Santos-Buelga, C., Polyphenols extract from food In “Methods in polyphenols analysis”, Ed. Royal Society of Chemistry, (2003), 1-16.
- [136] Ge, Y.Z. et Jin, H., “New methods for extraction of tea polyphenols”. *Chin. Herbal Med.*, V. 25, (1994), 124–125.
- [ 137] Hu, Q.H., Jiang, M. et Zhu, J.C., Research on technology of extraction of tea caffeine and polyphenols. *Nat. Prod. Res. Dev. China*, V. 9, (1997), 63–66.
- [138] Lu, Y.R., *Chinese Medicine Chemistry*. Xueyuan Publishing House, Beijing, (1995), 10–11.
- [139] Gramza-Michalowska, A., et Regula, J., Use of tea extracts (*Camelia sinensis*) in jelly candies as polyphenols sources in human diet *,Asia Pac J Clin. Nutr.* V. 16 (2007),43-46.
- [140] 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.
- [141] Miliuskas. 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.
- [142] Kumaran A., et karunakaran R.J., « Antioxidant and free radical scavenging activity of an aqueous extract of *Coleus aromaticus*”. *Food chemistry.*, (2005) **97** : 109-114.

- [143] Loo A.Y., Jain K., Darah I., " Antioxydant activity of compound isolated from the pyroligneous acid", *Rhizophora apiculata. Food chemistry.*, (2008) **107** : 1151-1160.
- [144] Treki A., Effets biologiques de polyphénols extraits de plantes médicinales *Ranunculus repens* et *Thymus hirtus* sur l'activité de microorganismes responsables de certaines pathologies (2002). Thèse de magistère de l'université de Constantine.
- [145] AFNOR "Contrôle de la qualité des produit laitiers : Analyses physique et Chimiques", (1986) 3<sup>ème</sup> édition.
- [146] Leyral G., Bonnefoy C., Guillet F., et Verne-Boudais E., « Microbiologie et qualité dans les industries agro- alimentaires » . (2002) p120
- [147] Beerens H., "Microbiologie industrielle .Les bactéries lactiques .An elective and selective medium for Bifidobacterium ssp" .Lett.Appl .Bacteriol., (1987)11 :155-157.
- [148] Bourgeois C.M., MESCELE J.F., ZUCCA J., " Microbiologie alimentaire ; Tome 1 : aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments" (1996) , Ed Tec et Doc , 654p .
- [149] Joffin J.N., et Leyral G., « Microbiologie – technique : Dictionnaire des Techniques » (2001) ed. C.R.P d'Aquitaine, 3<sup>ème</sup> édition.

- [150] Bourgeois C.M., et Leveau J.Y., " Techniques d'analyses et de contrôle dans les IAA :le contrôle microbiologiques' , (1991) ed Tec et Doc – Lavoisier , 2<sup>ème</sup> édition ,  
Tome 3.
- [151] Roddier J., « L'analyse de l'eau : eaux naturelles, eaux résiduaires, eau de mer : chimie, physico-chimie, microbiologie, biologie, interprétation des résultats » (1996) ;  
8<sup>ème</sup> édition, Dunod, Paris.
- [152] Brulé G., Mahaut M., Romain J., et Schuck P., " Les produits industriels Laitiers", (2006) . Tec et Doc , Lavoisier .
- [153] Joffin C.,et Joffin J.N., « Microbiologie alimentaire » (2000) ; 5<sup>ème</sup> édition. Centre régionale de documentation.
- [154] Hermier J., Leroir J., et Weber F., « Les groupes microbiens d'intérêt laitier » , (1992) ed .CEPIL, Paris .
- [155] Guiraud J.P., " Microbiologie Alimentaire", (1998), ed Dunod, Paris.
- [156] Branger , "Fabrication de produits alimentaires par fermentation : les Ferments" (2003); Ed, Tec et Doc F3500.
- [157] Lebres M.,Chahed et Zouambi B., « Microbiologie et physico- chimie appliquées aux produits laitiers » (2004) ,Formation Colaital Birkhadem.

- [158] Vasconcelos, A. L. S., Franca A. S., et al. A comparative study of chemical attributes and levels of amines in defective green and roasted coffee beans. *Food Chemistry*, V.101, (2007), 26-32.
- [159] Sajilata M.G., Poonam R.B., Singhal R.S., "Tea polyphenols as nutraceuticals". *Comprehensive reviews in food science and food safety*". Vol 7 (2008) p 229-254.
- [160] Silabdi S., *Extraction, purification et caractérisation d'antioxydants naturels en vue d'une valorisation nutritionnelle. Mémoire de magistère (2010). Département d'agronomie université de Blida*
- [161] Bourgou, S., Ksouri, R., Bellila, A., Skandrani, I., Falleh, H., et Marzouk, B., Phenolic composition and biological activities of Tunisian *Nigella sativa* L. shoots and roots, *Comptes rendus Biologies*, V. 331, (2008), 48-55.
- [162] Sasazuki S.M., Inoue T., Miura M., Iwasaki S., "Plasma tea polyphenols and gastric cancer risk : a case-control study nested in large population-based prospective study in Japan. *Cancer epidemiology, biomarkers et prevention*". Volume 17, n° 2 (2008), p 343-351
- [163] Moure, A., Cruz, J. M., Franco, D., Dominguez, J. M., Sineiro, J. et Dominguez, H., Natural antioxidants from residual sources – a review. *Food Chemistry*, V.72, (2001), 145–171.
- [164] Stalikas C., « Extraction, separation and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *J sep sci* (2007) 30: 3268-3295
- [165] Gervaise Y., "Analyse des antioxydants naturels dans les matières premières et les produits » (2004). Euroforum, Paris. [WWW.sgs-multilab.com](http://WWW.sgs-multilab.com)

[166] 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.

[167] Anonyme.” La technologie des fromages à pâte fraîche” (2002), P235

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

**AFNOR** : Association Française de normalisation.

**BCPL** : Bouillon Lactosé au Pourpre de Bromocrésol

**BLBVB** : Bouillon Lactosé Bilié au Vert Brillant

**°D** : degré Dornic.

**D/C** : Double concentration.

**DCLA** : Désoxycholate

**EGC** : Épigallocatechine

**ECG** : Épicatéchine gallate

**EGCG**: Épigallocatechine gallate

**ERO** : Espèces réactives de l'oxygène

**ESD** : Extrait sec dégraissé

**EST** : Extrait sec total.

**FAO** : Food and agriculture organisation

**g** : gramme

**HPLC** : Hight Performance Liquide Chromatography

**ISO** : International Standards Organisation.

**J.O.R.A** : journal officiel de la république algérienne.

**MG** : Matière Grasse

**ml** : millilitre

**mn** : minute

**NPP** : Nombre le Plus Probable.

**OGA** : Oxytétracycline Glucose Agar.

**OMS** : Organisation Mondiale de la santé.

**PCA** : Plate Count Agar.

**S/C** : Simple Concentration.

**SFB** : Sélinite-cystéine

**TSE** : Tryptone- Sel-Eau

**UFC** : Unité Formant Clonie

**SOD**: Super-oxyde dismutase

**UV**: ultra-violet

## APPENDICES

-1-

### 1. Appareillage

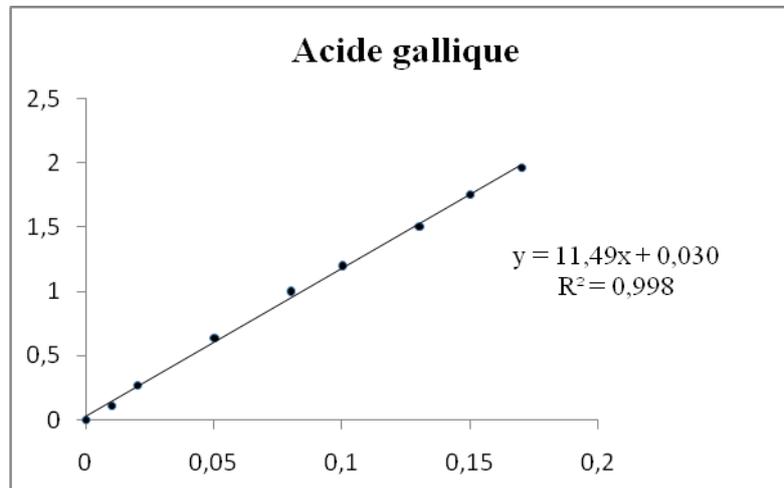
- HPLC (Termo Finnigan),  
Décteur UV (Termo Finnigan UV100) ;  
Colone C8 150×4.6mm 3μ Hypersil<sup>®</sup> BDS C8;  
Debit 0.4ml/mn;  
Phase mobile 30 méthanol (HCOH): 70 eau distillé (H2O) ;  
Volume d'injection 20 μl
- Centrifugeuse (SIGMA<sup>®</sup>)
- Spectrophotomètre (Termo Electron corporation)
- Agitateur magnétique + plaque chauffante (Wesestir<sup>®</sup> MSH-200D)
- Etuve (Memmert)
- Four pasteur (Memmert)
- Autoclave (Nuve/OT4060)
- Bain marie (Memmert ; Clifton Boiling BATN)
- Bain marie ultrat son (Decan)
- Rotavapeur (Heidolph)
- Balance analytique (Sartorius cp324-OCE)
- Haute microbiologique
- Foodscan

### 2. Réactifs et milieux de cultures

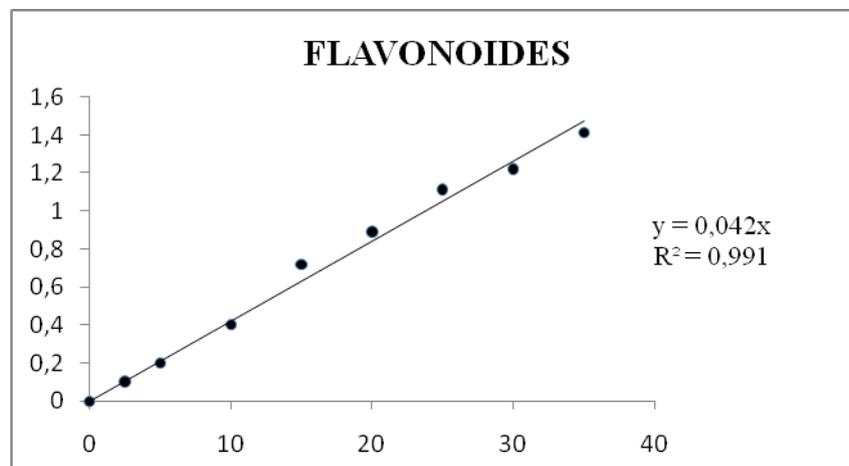
- Folin ciolcalteu
- DPPH (1,1-diphényl-pycryl-2-hydrazyl)
- carbonate de sodium
- acide gallique

- quercitine
- trichloride d'aluminium
- méthanol 90°
- éthanol 90°
- sabouraud à 1% de glucose et 1% de maltose
- trypticase de soja
- Milieu pour recherche des substances inhibitrices
- bouillon MRS
- DCLA
- PCA
- BCPL D/C ; S/C
- Rothe D/C ; S/C
- Eva litsky
- Chapman
- Viande foie (VF)
- Giolliti contoni
- Bouillon sélinite cystéine (SFB)
- OGA

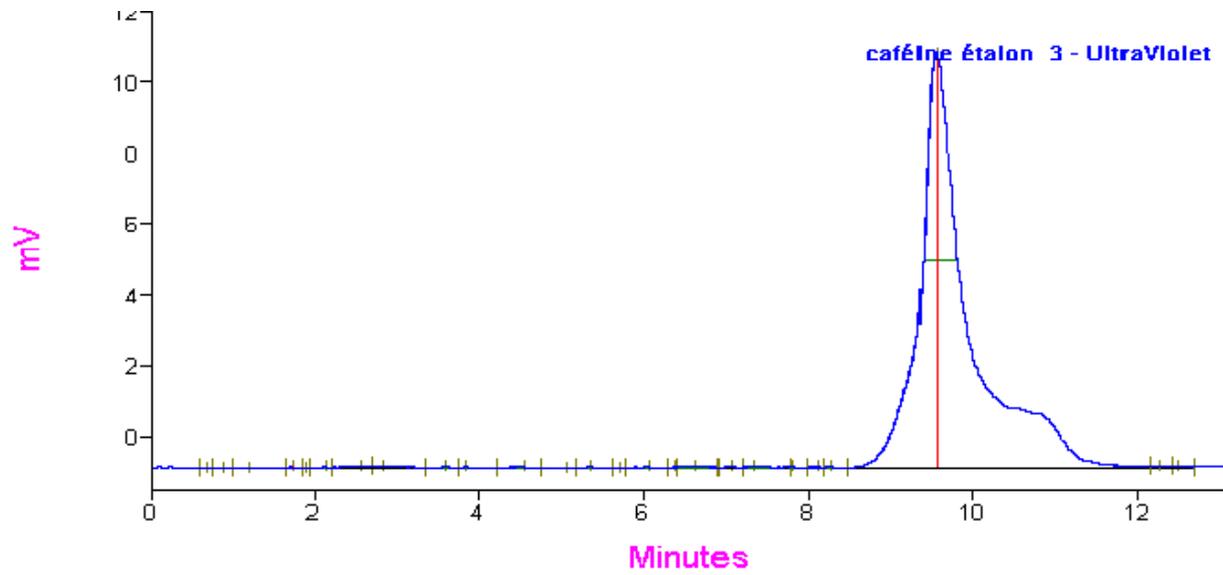
### Gamme d'étalonnage des polyphénols



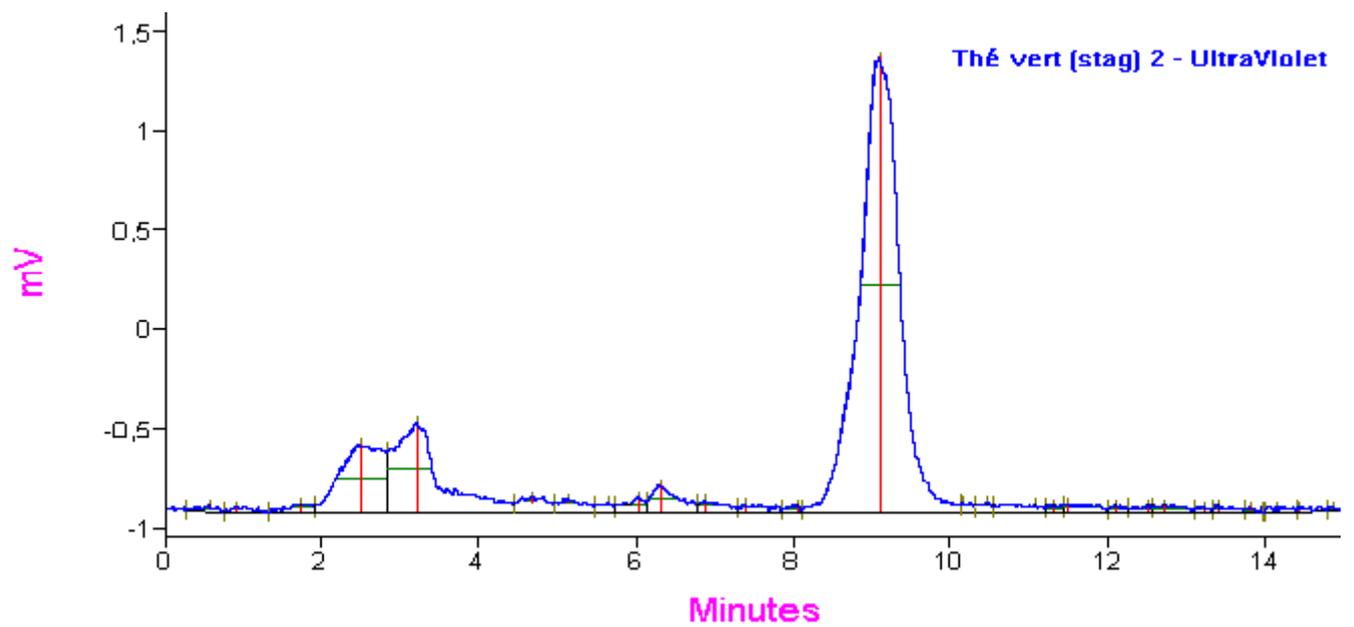
### Gamme d'étalonnage des flavonoïdes



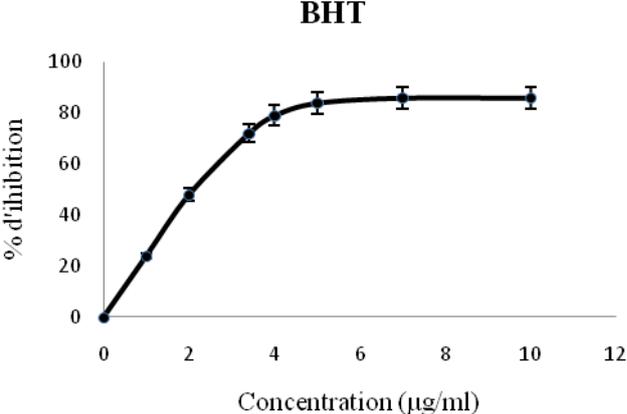
Chromatogramme de la caféine étalon (Standard).



Chromatogramme du thé vert.



Pouvoir d'inhibition du BHT



## AAPPENDICES

-2-

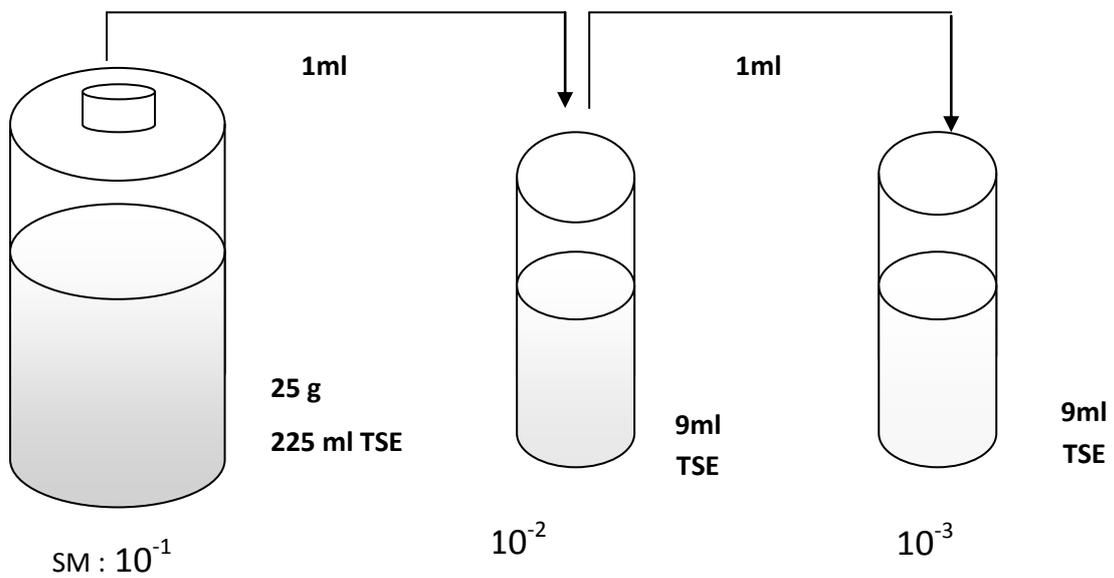


Figure 5.1 : préparation de la suspension mère et des dilutions décimales.

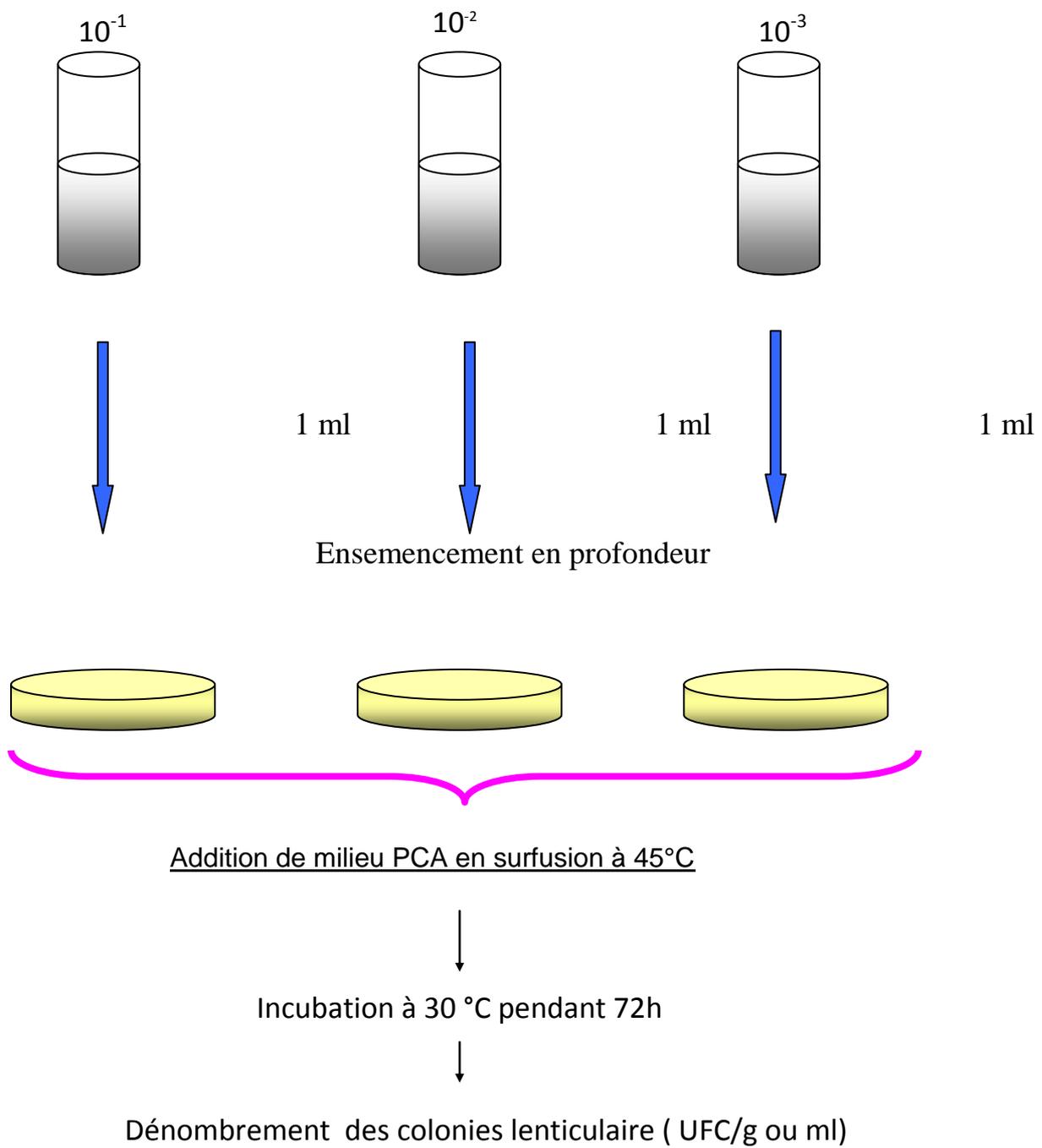


Figure 5.2: Recherche et dénombrement des germes aérobies mésophiles totaux.

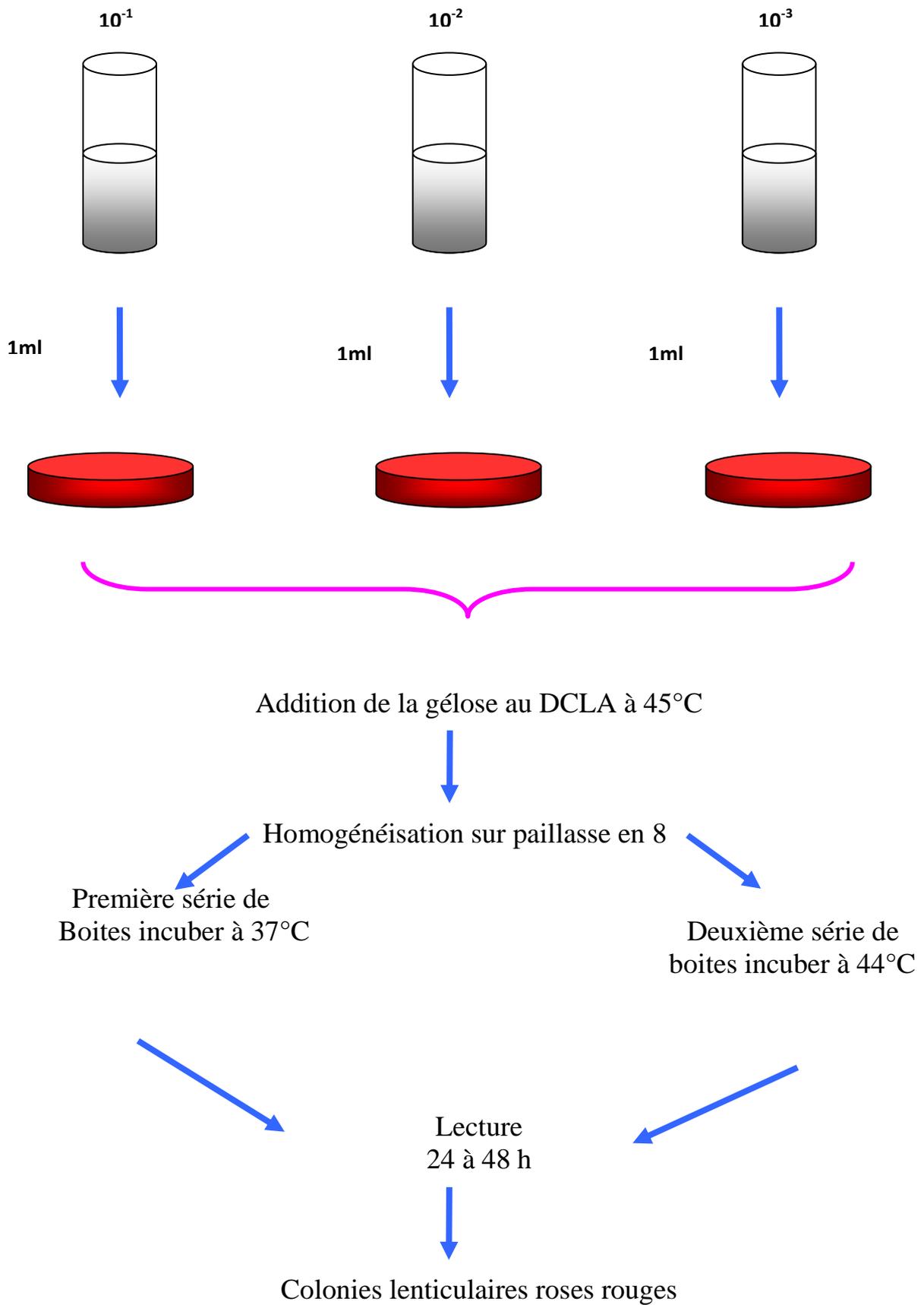


Figure 5.3 : Recherche et dénombrement des coliformes totaux et fécaux.

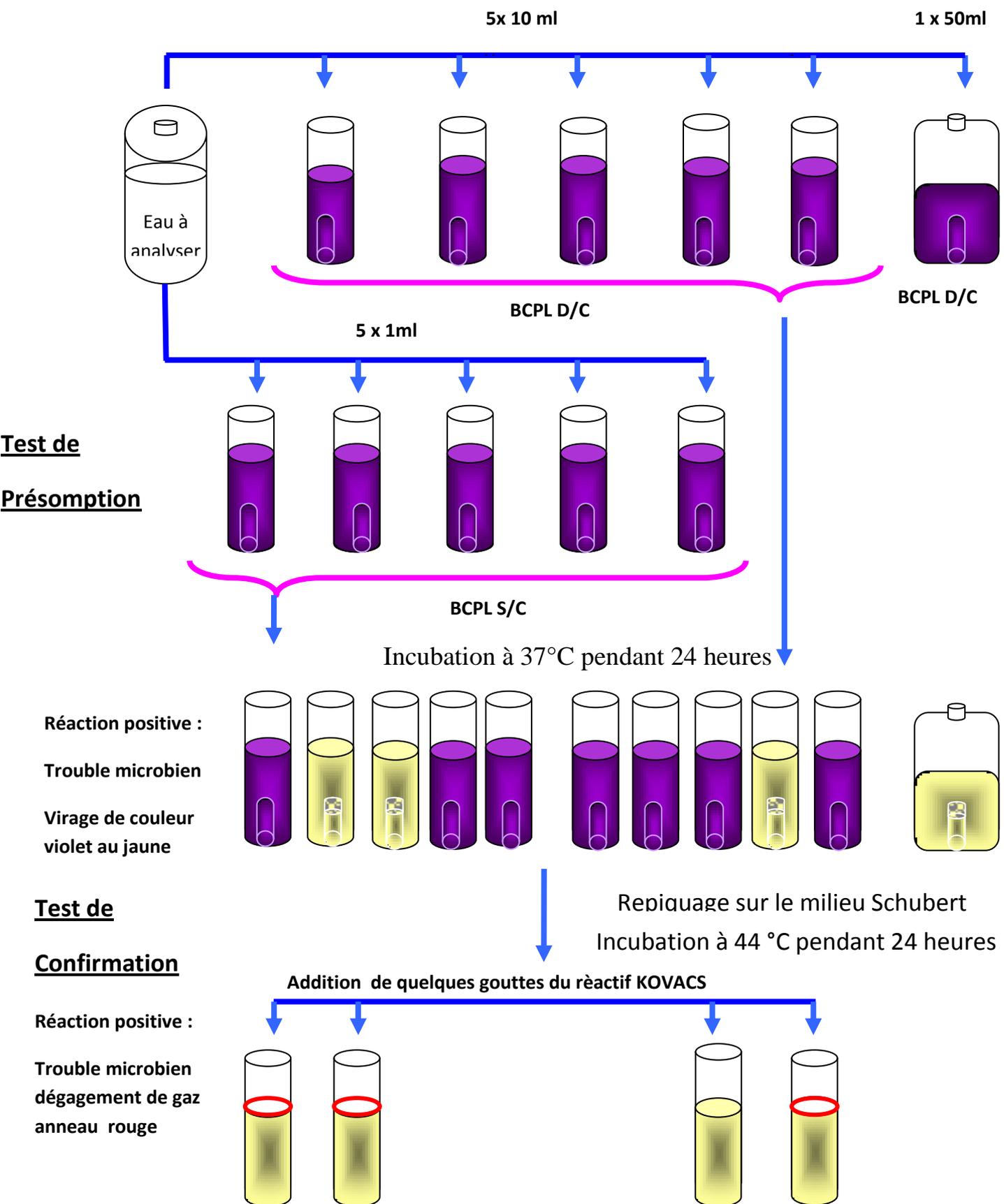


Figure 5.4 : Dénombrement des coliformes totaux et fécaux dans l'eau de process.

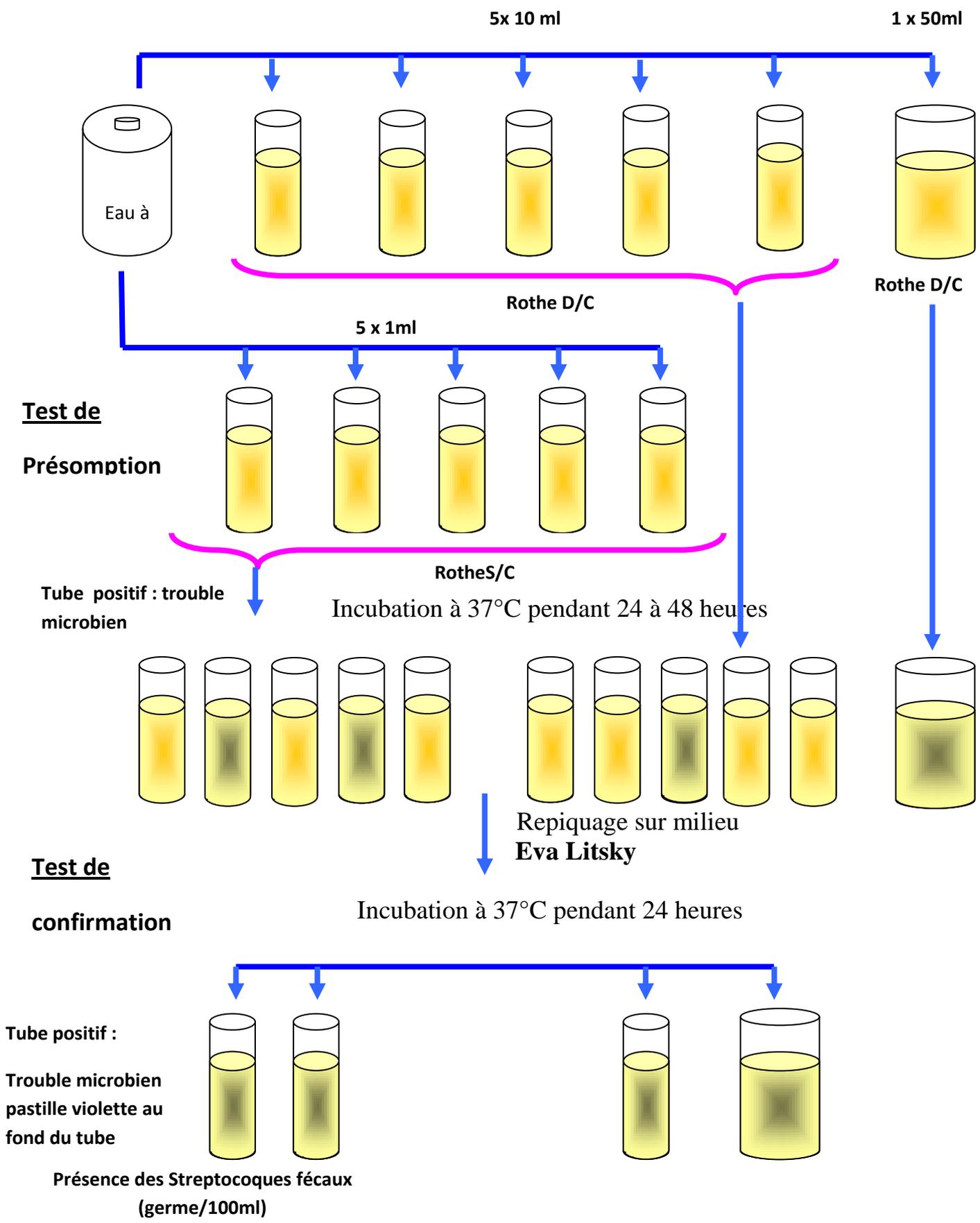
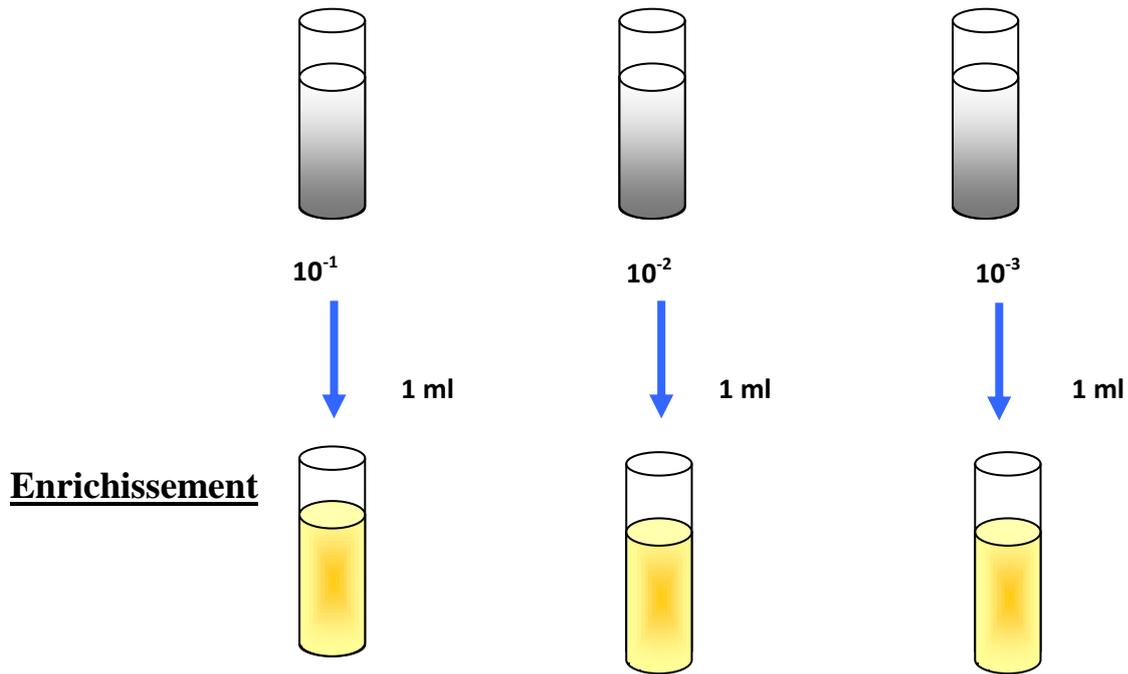


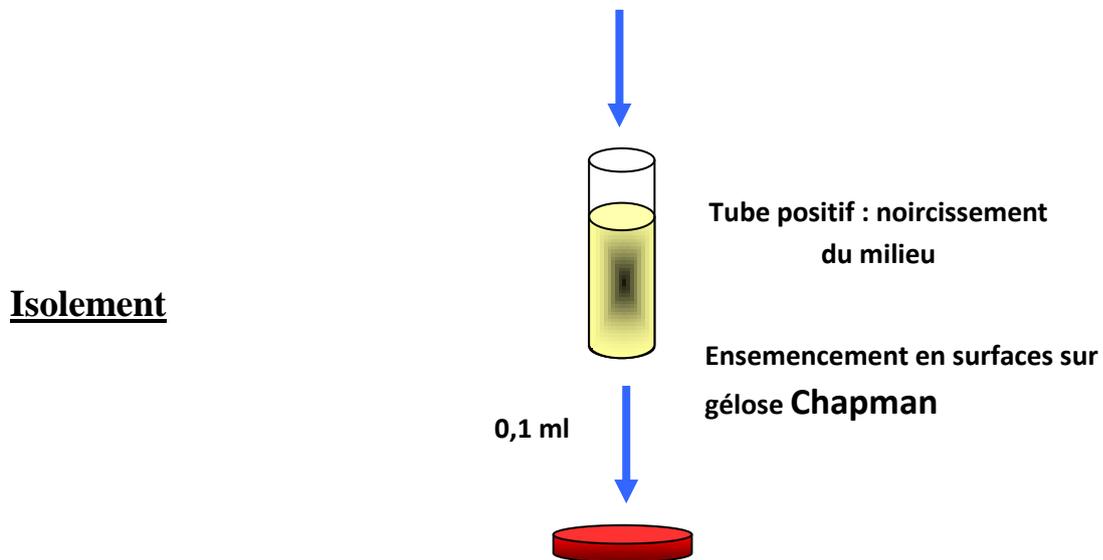
Figure 5.5 : Recherche et dénombrement des Streptocoques fécaux dans l'eau de process.

A partir des dilutions décimales



15 ml de milieu Giolliti Contoni  
Additionné de tellurite de potassium

Incubation à 30 °C pendant 24 à 48 h



Incubation à 37 °C pendant 24 à 48 h

Colonies lisses, brillantes, et pigmentées en jaune

Les colonies suspectes subiront un test de catalase et de coagulase

Figure 5.6 : Recherche et dénombrement de *Staphylococcus aureus*.

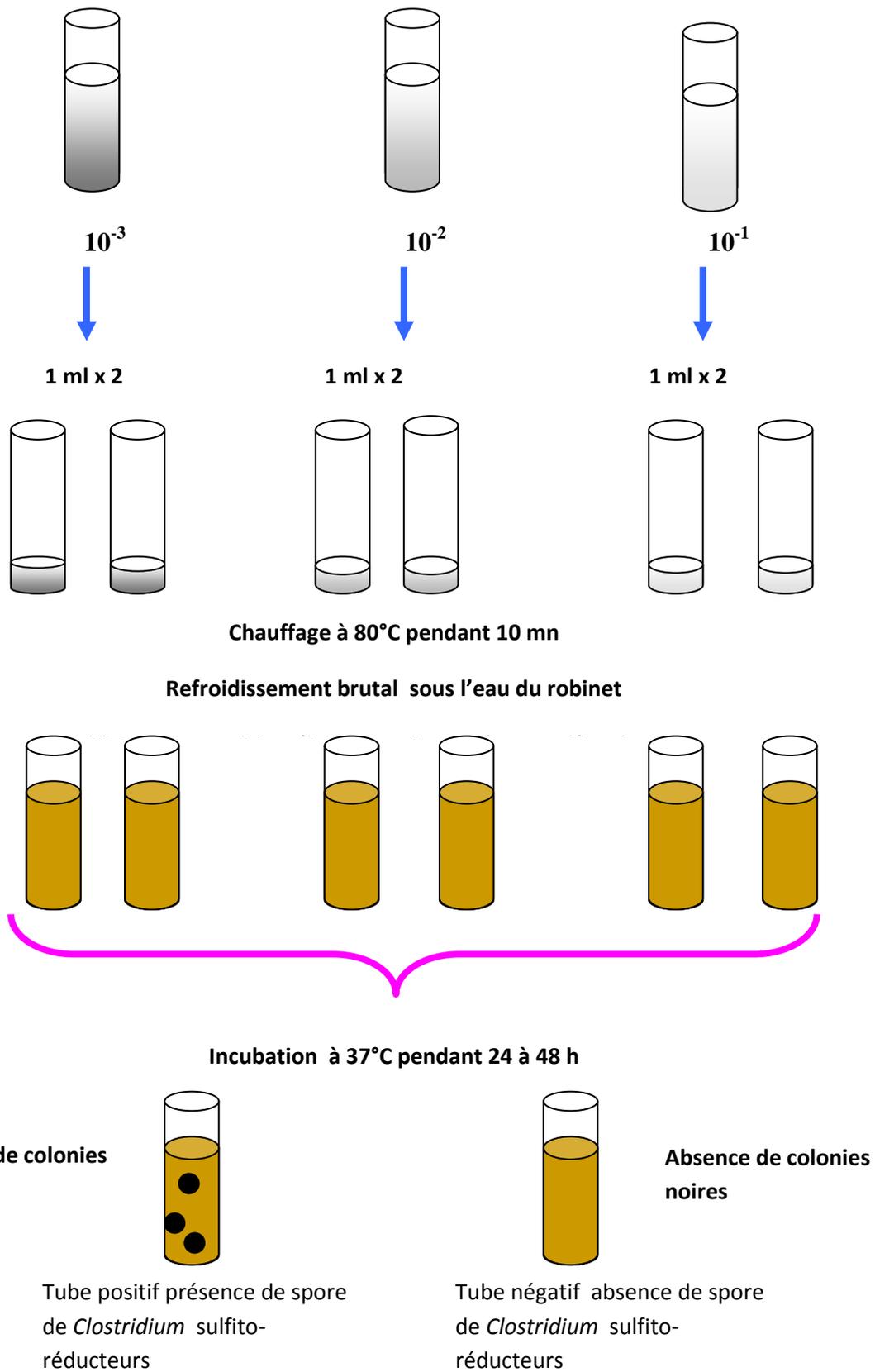


Figure 5.7 : Recherche et dénombrement des spores de *Clostridium* sulfite réducteurs.

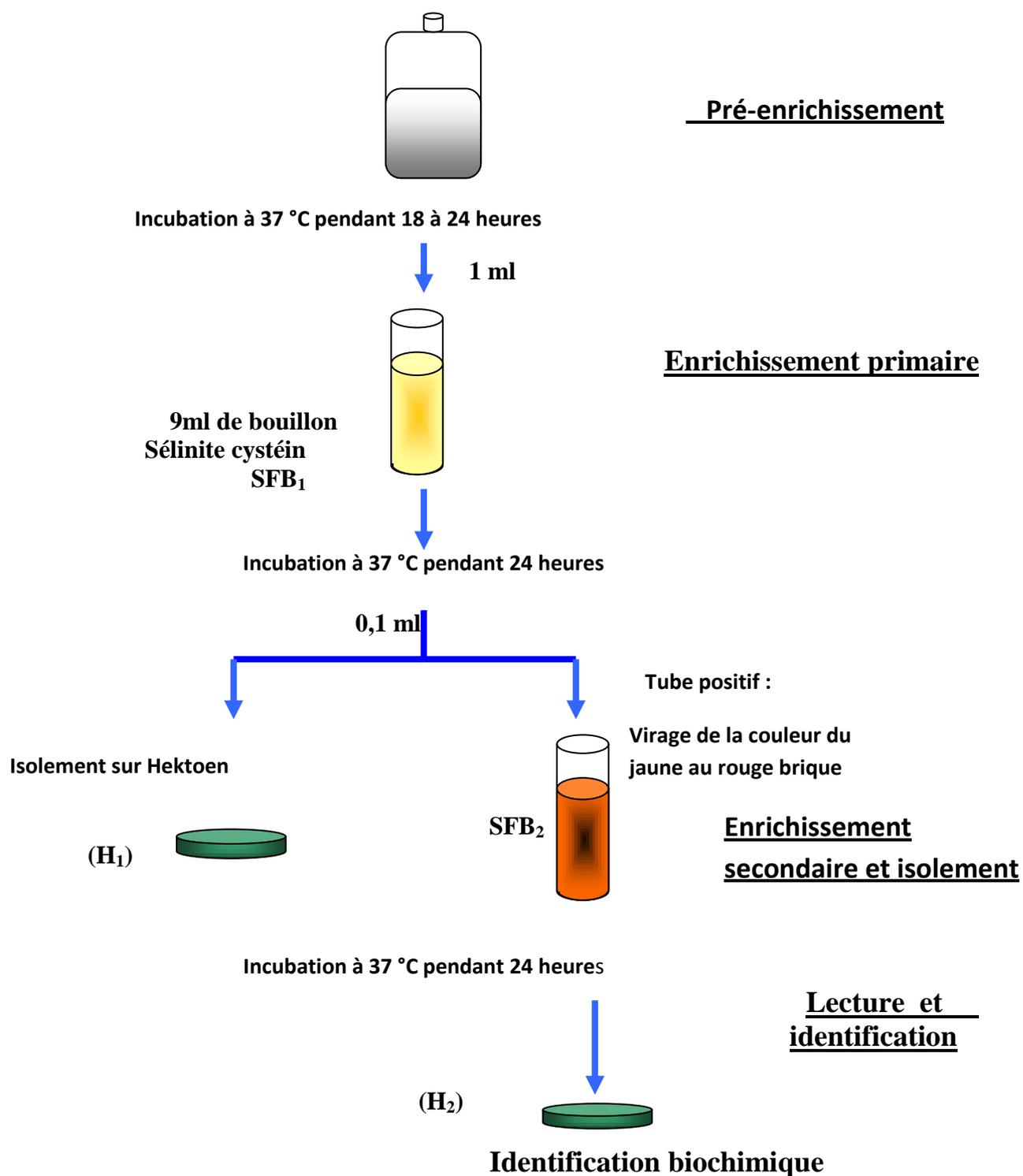


Figure 5.8 : Recherche et dénombrement des salmonelles

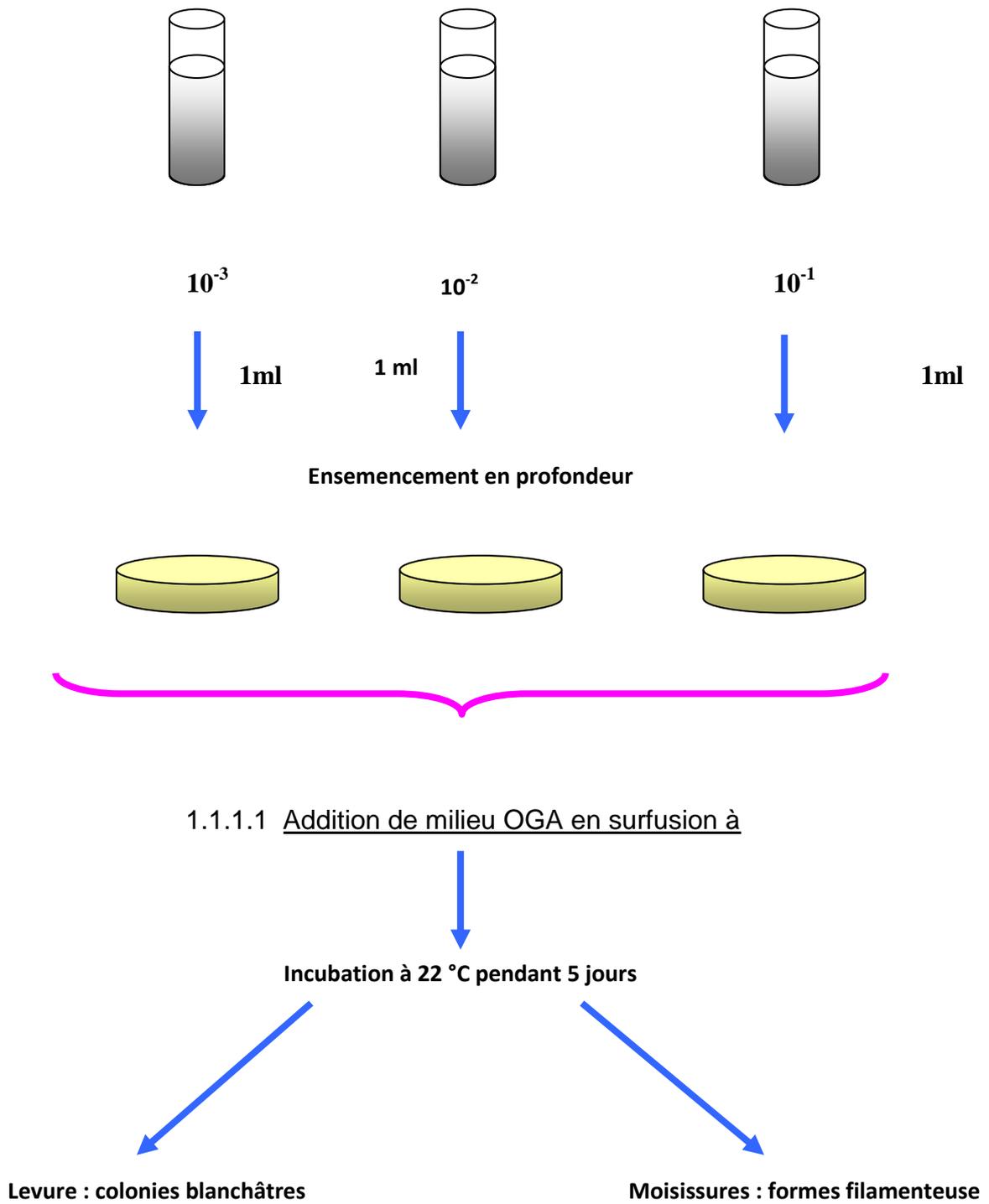


Figure 5.9 : Recherche et dénombrement des levures et moisissures

## Test d'activité antibactérienne



Figure : Inhibition de *Geobacillus thermophilus* par la streptomycine (Témoin) et les polyphénols totaux extrait du thé vert



Figure : Inhibition de *Bacillus subtilis* par la streptomycine (Témoin) et les polyphénols totaux extrait du thé vert



Figure : Inhibition de *Aspergillus niger* et *Candida albicans* par les polyphénols totaux extrait du thé vert

## APPENDICES

-3-

### 1. Composition des milieux de culture :

#### ❖ Trypticase de soja :

caseine peptone (pancreatique).....	15g
peptone de soja (papainique) .....	.5g
chloride de sodium .....	.5g
Agar .....	.15g
Eau distillée.....	qsp 1000ml.

pH 7.3 ± 0.2

#### ❖ Milieu pour recherche des substances inhibitrices :

Pepyone de caseine .....	3.6 g
Peptone de viande .....	3.60 g
Chloride de sodium .....	.5 g
Phosphate trisodium .....	0.80 g
Agar .....	.15 g
Eau distillée.....	qsp 1000ml

pH 7.2 ± 0.1

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

Peptone de caseine .....	.5 g
Peptone de viande .....	.5 g
Glucose D (+) .....	1
Maltose.....	1u 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 boites de milieu sont limpide et brunatre

❖ Bouillon lactosé au poudre de bromocrésol (BCPL) :

Peptone.....	5g
Extrait de viande.....	3g
Lactose.....	10g
Poudre de bromocrésol.....	25g
Eau distillée.....	qsp 1000ml.

PH=7± 0.1

❖ Gélose mannitol (CHAPMAN) :

Extrait de viande.....	1g
Peptone.....	10g
Chlorure de sodium.....	5g.
Mannitol.....	10g
Rouge de phénol.....	25mg
Agar .....	15mg
Eau distillée.....	qsp 1000ml.

PH=7,4± 0.1

❖ Désoxycholate (DCLA) :

Peptone.....	10g
Lactose.....	10g
Désoxycholate de sodium.....	1g
Chlorure de sodium.....	5g
Citrates de sodium.....	2g
Agar.....	12g
Rouge neutre.....	0,03g
Eau distillée.....	1000ml

PH=7,1± 0.2

❖ EVA-LITSKY (bouillon) :

Peptone.....	20g
Glucose.....	5g
Chlorure de sodium.....	5g
Phosphate dipotassique.....	2,7g.
Phosphate monopotassique.....	2,7g
Eau distillée.....	1000 ml

PH=6,8 à 7.

❖ ROTHER (bouillon) :

Peptone.....	20g
Glucose.....	5g
Chlorure dipotassique.....	5g
Phosphate dipotassique.....	2,7g
Phosphate monopotassique.....	2,7g
Azide de sodium .....	0,2g
Eau distillée.....	qsp 1000ml

PH=6,9 ± 0.1

❖ AGAR VIANDE FOIE (géluse) :

Extrait de viande foie.....	10g
Glucose.....	10g
Amidon.....	50g
Peptone.....	20g
Agar .....	15g
Eau distillée.....	qsp 1000ml

PH=7.4± 0.1

❖ Bouillon d'enrichissement au sélénite de sodium et à la cystéine (SFB) :

Peptone trypsine de caséine.....	5g
Cystéine.....	0,01g
Lactose.....	4g
Phosphore de sodium.....	10g
Sélénite de sodium.....	4g
Eau distillée.....	qsp 1000ml

PH= 7 ± 0.1

❖ Plat count agar (PCA) :

Peptone.....	5g
Extrait de levure.....	2,5g
Glucose.....	1g
Agar .....	18g
Eau distillée.....	qsp 1000ml

Autoclaver 20mn à 120°C.

PH=7± 0.1

❖ Eau physiologique :

Chlorure de sodium.....	9g.
Eau distillée .....	1000ml.
Répartir en tubes.	

Autoclaver 20mn à 120°C.

❖ Gélose glucose à l'oxytétracycline (OGA) :

Extrait de levure.....	5g
Glucose.....	10g
Agar.....	16g
Eau distillée.....	qsp 1000ml

PH=6,5± 0.2

❖ Giolitti Contoni :

Tryptone.....	10g
Extrait de levure.....	5g
Extrait de viande de boeuf.....	5g
Mannitol.....	20g
Chlorure de lithium.....	5g
Chlorure de sodium.....	5g
Glycine.....	1,2g
Pyruvate de sodium.....	3g
Eau distillée.....	qsp 1000ml

PH=6,9± 0.1

❖ Milieu MRS :

Glucose .....20g  
Eau distillée .....qsp 1000ml

Autoclavé à 121 °C pendant 15mn

Peptone de caseine ..... 10g  
Extrait de viande .....8g  
Extrait de levure .....4g  
Hydrogenophosphate dipotassique .....2g  
Hydrogénocitrate di-amonium .....2g  
Acétate de sodium .....5g  
Sulfate de magnésium .....0.2g  
Sulfate de manganèse .....0.04g  
Tween 80 .....1g  
Eau distillée .....qsp 1000ml

PH=6,5± 0.1

Autoclavé à 121 °C pendant 15mn, mélangé dans les conditions  
d'aseptie à raison 80% MRS et 20% de bouillon de Glucose

**Table de Mac Grady**

<b>Nombre caractéristique</b>	<b>Nombre de micro-organismes</b>
000	0,00
001	0,30
010	0,30
011	0,61
020	0,62
030	0,94
100	0,36
101	0,72
102	1,10
110	0,74
111	1,10
120	1,10
121	1,50
130	160
200	0,92
201	1,40
202	2,00
210	1,50
211	2,00
212	2,70
220	2,10
221	2,80
222	3,50
223	4,00
230	2,90
231	3,60
232	4,00
300	2,30
301	3,80
302	6,40
310	4,30
311	7,50
312	12,0
313	16,0
320	9,30
321	15,0
322	21,0
323	29,0
330	24,0
331	46,0
332	110,0
333	140,0

## Norme AFNOR

La plus part des normes françaises correspondent à des normes européennes ou à des normes internationales .Les normes AFNOR peuvent être obtenues à l'association Française de normalisation.

NF V08-16 (1996) 750 6887 : Microbiologie alimentaire –directives générales – dénombrement des coliformes Technique le nombre le plus probable (NPP).

NF V08 – 050 (1992) : Microbiologie alimentaire – Technique de contrôle de la qualité microbiologique des eaux et des aliments

NF V 08- 014 (1994) : Microbiologie alimentaire – Technique de directives dénombrement de *Staphylococcus aureus* –Methode par comptage des colonies .

NF V08 – 013 (1993) . Iso 7579 : Microbiologie alimentaire – directives générales – Méthode de recherche des Salmonella

NF V 08 – 059 (1995) Iso 7954 : Microbiologie alimentaire – directives générales dénombrement des levures et moisissures sur comptage des colonies.

NF V08-052 .(1997) .Technique de contrôle de la qualité microbiologiques .

NF T90 – 029 . Méthodes d'analyses microbiologiques JO de RF du 27 oct 1983