UNIVERSITÉ DU BURUNDI
GRENIER DU SAVOIR DU BURUNDI
Dépôt institutionnel officiel
https://repository.ub.edu.bi

Contribution à la détermination de la teneur en théophylline et en caféine du thé noir produit au Burundi

NDAYIRUKIYE, Alice; Sous la direction de : Prof. Godefroid GAHUNGU; Co-directeur: Dr. Ferdinand NDIKURYAYO

2023-04
UB
https://repository.ub.edu.bi/handle/123456789/499

Document téléchargé depuis le **Grenier du Savoir du Burundi** — https://repository.ub.edu.bi

UNIVERSITE DU BURUNDI

FACULTE DES SCIENCES

DEPARTEMENT DE CHIMIE

CONTRIBUTION A LA DETERMINATION DE LA TENEUR EN THEOPHYLLINE ET EN CAFEINE DU THE NOIR PRODUIT AU BURUNDI

Par

NDAYIRUKIYE Alice

MEMOIRE

Présenté en vue de l'obtention

du diplôme de Master en Sciences Chimiques

ORIENTATION: Contrôle et Analyses Chimiques

Sous la direction de : **Prof. Godefroid GAHUNGU**

Co-directeur : **Dr. Ferdinand NDIKURYAYO**

Bujumbura, Avril, 2023

MEMBRES DU JURY

Président : Dr. Samuel BUNANI

Directeur : Prof. Godefroid GAHUNGU

Co-directeur : Dr. Ferdinand NDIKURYAYO

Secrétaire : Dr. Christophe NIYUNGEKO

Membre : Dr. Pierre Claver MPAWENAYO

DEDICACE

A mes regrettés parents;

A mon époux;

A mes chers enfants;

A tous ceux qui me sont chers.

REMERCIEMENTS

Au terme du présent travail, je tiens à exprimer mes remerciements et ma profonde gratitude avant tout à Dieu tout puissant qui m'a donné la volonté, la force et le courage afin de réaliser ce mémoire.

Je tiens ensuite à remercier les membres du jury qui me font l'honneur d'évaluer mon mémoire. J'adresse mes remerciements particuliers au Prof. Godefroid GAHUNGU, directeur de ce mémoire et au Dr. Ferdinand NDIKURYAYO co-directeur, pour avoir accepté mon encadrement tout au long de ce travail. Je vous prie de trouver en ces quelques mots, l'expression de mes plus sincères remerciements et de mon profond respect. Vos orientations, conseils judicieux ainsi que votre rigueur scientifique m'ont été d'une importance capitale.

J'adresse aussi mes remerciements au Centre de Recherche en Sciences Naturelles et de l'Environnement (CRSNE), l'Office du Thé du Burundi (OTB) et la Promotion de la Théiculture à Mwaro (PROTHEM) pour leur contribution matérielle.

Je tiens également à remercier Prof. Sévérin SINDAYIKENGERA, Directeur Général du Bureau Burundais de Normalisation et Contrôle de la Qualité (BBN) pour m'avoir donné l'accès au Laboratoire de cette institution en collaboration avec le Laboratoire de Chimie de l'Université du Burundi afin de réaliser ce travail.

Mes remerciements vont également à l'endroit des analystes du Laboratoire de Chimie du Bureau Burundais de Normalisation pour leur collaboration et spécialement à l'analyste Jean Claude NDAYISHIMIYE pour l'accompagnement dans mes analyses.

Mes remerciements s'adressent aussi au Prof. Vestine NTAKARUTIMANA, responsable du programme de Mastère en Sciences Chimiques pour sa bonne collaboration.
A tous les professeurs du programme de Mastère en Contrôle et Analyses Chimiques, j'adresse mes vifs remerciements pour la formation solide dont vous m'avez fait bénéficier.
Enfin, que tous ceux qui ont contribué d'une manière ou d'une autre à la réalisation de ce travail, trouvent ici mes sentiments de reconnaissance.

RESUME

Les feuilles de thé contiennent des méthylxanthines, telles que la caféine, la théophylline et la théobromine, qui ont divers effets physiologiques et pharmacologiques in vivo. La caféine et la théophylline ont été analysées dans différents grades de thé noir produits au Burundi afin d'en déterminer la teneur.

La méthode de dosage de la caféine (ISO 20481: 2008) basée sur la Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC) a été utilisée. L'analyse a porté sur 41 échantillons de thé noir en provenance des six régions théicoles du Burundi produits par les entreprises OTB et PROTHEM sur la période de Juin à Août 2022.

Les résultats de cette étude ont montré que la teneur en théophylline du thé noir (0,145 - 0,279%) est supérieure à celle de la littérature (0 – 0,04%) en théophylline dans les feuilles de thé. La teneur la plus faible (0,145±0,009%) a été observée pour le thé noir du grade PF1 de GISOZI tandis que la plus élevée (0,279±0,017%) a été obtenue pour celui du grade PD de MABAYI. Les mêmes résultats révèlent que la teneur en caféine du thé noir produit au Burundi se situe entre 1,979 et 3,331%, en accord avec les valeurs disponibles dans la littérature scientifique (1-5%) pour les feuilles de thé. La teneur la plus faible (1,979±0,015%) a été observée pour le thé noir du grade BMF de la région théicole de MABAYI, tandis que la plus élevée (3,331±0,055%) a été obtenue pour celui du grade PD de la même région. L'analyse de la variance a montré une différence significative de la teneur en théophylline et en caféine entre les différents grades de thé noir d'une même région théicole. La même observation a été faite pour le même grade de thé noir dans toutes les régions théicoles (p-value < 0,05). Néanmoins, le test de Duncan a montré que les teneurs moyennes en théophylline sont statistiquement identiques pour les grades PD et D1 dans toutes les régions theicoles, sauf dans celle de MABAYI. Le même test a révélé que la teneur moyenne en théophylline du thé noir des grades D1 et PF1 est statistiquement identique sauf à GISOZI (pour D1) et RWEGURA et GISOZI (pour PF1). Ce même test a montré que certaines teneurs en caféine sont statistiquement identiques pour différents grades au sein d'une région et d'un même grade dans toutes les régions théicoles.

De façon générale, notre étude a révélé des teneurs en théophylline plus élevées pour les produits de l'OTB que ceux de PROTHEM. Les résultats de cette étude devraient aider les consommateurs à contrôler la quantité de ces méthylxanthines en fonction des besoins nutritionnels, tandis que les entreprises du thé noir Burundais pourraient s'en servir pour mieux faire connaître ce produit et mieux se positionner sur le marché international.

Mots clés: Teneur en Théophylline et en Caféine, Thé noir, Régions théicoles, Burundi.

ABSTRACT

Tea leaves contain methylxanthines, such as caffeine and theophylline, which have various physiological and pharmacological effects in vivo. Caffeine and theophylline were analyzed in different grades of black tea produced in Burundi to determine their content.

The High Performance Liquid Chromatography (HPLC) method for the determination of caffeine (ISO 20481: 2008) was used. The analysis involved 41 samples of black tea from the six tea growing regions of Burundi produced by OTB and PROTHEM over the period of June to August 2022.

The results of this study showed that the theophylline content of black tea (0.145 - 0.279%) is higher than the literature (0 - 0.04%) of theophylline in tea leaves. The lowest content (0.145±0.009%) was observed for GISOZI PF1 grade black tea while the highest (0.279±0.017%) was obtained for MABAYI PD grade. The same results show that the caffeine content of black tea produced in Burundi ranged from 1.979 to 3.331%, in agreement with the values available in the scientific literature (1-5%) for tea leaves. The lowest content (1.979±0.015%) was observed for black tea of the BMF grade from the MABAYI tea-growing region, while the highest (3.331±0.055%) was obtained for that of the PD grade from the same region. The analysis of variance showed a significant difference in theophylline and caffeine content between different grades of black tea from the same tea growing region. The same observation was made for the same grade of black tea in all tea-growing regions (p-value < 0.05). Nevertheless, Duncan's test showed that the average theophylline contents were statistically identical for PD and D1 grades in all tea growing regions except MABAYI. The same test revealed that the mean theophylline content of black tea grades D1 and PF1 are statistically identical except in GISOZI (for D1) and RWEGURA and GISOZI (for PF1). The same test showed that some statistically identical caffeine contents for different grades within a region and within a grade in all tea growing regions.

In general, our study revealed higher theophylline levels in OTB products than in PROTHEM products. The results of this study should help consumers to control the amount of these methylxanthines according to their nutritional needs, while Burundian black tea companies could use them to better promote this product and better position themselves on the international market.

Key words: Theophylline and caffeine content, black tea, tea growing regions, Burundi.

TABLES DES MATIERES

MEMBRES DU JURY i

DEDICACE ii

REMERCIEMENTS iii

RESUME iv

ABSTRACT v

TABLES DES MATIERES vi

LISTE DES TABLEAUX ix

LISTE DES FIGURES x

LISTE DES SIGLES ET ABREVIATIONS xi

AVANT- PROPOS xiii

0. INTRODUCTION GENERALE 1

1. Contexte et problématique 1

2. Hypothèses 3

3. Objectif global 3

4. Objectifs spécifiques 3

5. Intérêts de la recherche 4

CHAPITRE I. GENERALITES SUR LE THE 5

I.1. INTRODUCTION 5

I.2. BOTANIQUE DU THEIER 6

I.2.1. Classification botanique 6

I.2.2. Description de la plante 7

I.3. OBTENTION DES THES 7

I.3.1. Conditions de culture 7

I.3.2. Facteurs déterminants pour la récolte 7

I.3.3. Technique de cueillette 8

I.3.4. Procédés d'obtention du thé 8

I.3.5. Temps et température d'infusion de quelques exemples de thé.....11
I.4. COMPOSITION CHIMIQUE DU THEIER.....12
I.5. PHARMACOLOGIE DU THE.....12
I.5.1. Effets synergiques des bases pyriques, des polyphénols et des flavonoïdes.....13
I.5.2. Activité anticancéreuse du thé.....14
CHAPITRE II: MATERIEL ET METHODES.....15
II.1. Echantillonnage.....15
II.2. Choix de la méthode.....17
II.3. Préparation des solutions.....18
II.3.1. Préparation de la gamme étalon.....18
II.3.2. Préparation de la phase mobile.....18
II.4. Détermination du temps d'extraction solide-liquide de la théophylline.....20
II.5. Préparation des échantillons.....21
II.6. Préparation d'un échantillon de thé selon la méthode de l'OTB.....22
II.7. Analyse par la méthode de Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC).....22
II.8. Traitement statistique des résultats.....23
CHAPITRE III: PRESENTATION ET DISCUSSION DES RESULTATS.....24
III.1. Présentation des résultats.....24
III.1.1. Teneur moyenne en théophylline.....24
III.1.2. Teneur moyenne en caféine.....30
III.1.3. Teneur en théophylline et caféine d'une infusion de thé.....32
III.2. Discussion des résultats.....34
III.2.1. Théophylline.....34
III.2.2. Caféine.....36
CONCLUSION GENERALE ET SUGGESTIONS.....39
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....41

ANNEXES 49

Annexe 1: Chromatogrammes des solutions étalons de théophylline/caféine (32/200ppm)....49

Annexe 2: Données brutes des échantillons analysés.....50

Annexe 3: Protocole de préparation du thé selon l'OTB.....56

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I: Intervalle de température et temps d'infusion des différentes thé (Klegou, 2005)..... 11

Tableau II: Puissances pharmacologiques respectives des méthyl xanthines naturelles 13

Tableau III: Répartition des échantillons selon les usines de transformation. 16

Tableau IV: Paramètres et conditions d'analyses par HPLC. 18

Tableau V: Valeurs de la concentration (Conc. en mg/l) et du volume (V en µl) des solutions-mères utilisées pour la préparation de 25 ml de chacune des solutions filles. 18

Tableau VI: Valeurs de la concentration (en mg/l) et de l'aire des pics (mAU) pour les solutions étalons. 19

Tableau VII: Valeur de la concentration (Conc) de la théophylline dans l'extrait et de sa teneur au temps d'extraction (T) pour le thé de grade D1 d'IJENDA utilisé.* 21

Tableau VIII: Valeurs moyennes de la teneur (en % m/m) en théophylline des différents grades de thés d'une même région. 25

Tableau IX: Valeurs moyennes de la teneur (en % m/m) en théophylline d'un même grade de thé noir. ..... 25.

Tableau X: Valeurs moyennes de la teneur (en % m/m) en caféine des différents grades d'une même région 31

Tableau XI: Valeurs moyennes de la teneur (en % m/m) en caféine d'un même grade de thé noir. 31

Tableau XII: Valeurs de la teneur (% m/m) en théophylline et en caféine des infusions de 250 ml de thé préparées suivant le protocole OTB. 31

Tableau XIII: Valeur moyenne de la teneur (% m/m) en théophylline et en caféine déterminée à partir de l'infusion de thé selon le protocole OTB.* 33

Tableau XIV: Concentrations (mg/l) en théophylline et en caféine des infusions de thé préparées suivant le protocole OTB et leur quantité (masse en mg) dans une tasse de 250 ml. ... 33

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Structures chimiques des trois xanthines: théophylline(a), caféine(b) et théobromine(c). 1

Figure 2: Régions théicoles: (a) Selon les superficies de l'OTB et (b) selon les plantations paysannes en 2011(Ndayisaba, 2016). 5

Figure 3: Photo du *Camellia sinensis var. assamica* cultivé au Burundi. 6

Figure 4: Carte de la localisation des usines de transformation du thé au Burundi (FAO, 2016) modifiée. 15

Figure 5: Photos de quelques échantillons en provenance des différentes usines de transformations du thé au Burundi. 16

Figure 6: Courbes de calibration (a) de la théophylline et (b) de la caféine. 20

Figure 7: Les étapes de préparation des échantillons. 22

Figure 8: Evolution de la teneur en théophilline (bleue) et en caféine (verte) des différents grades de thé en provenance de TORA et TEZA. 26

Figure 9: Evolution de la teneur en théophilline (bleue) et en caféine (verte) des différents grades de thé en provenance d'IJENDA et MABAYI. 27

Figure 10: Evolution de la teneur en théophilline (bleue) et en caféine (verte) des différents grades de thé de RWEGURA et GISOZI. 28

Figure 11: Comparaison de la teneur en théophylline des grades analysés. 29

Figure 12: Comparaison de la teneur en caféine par grade de thé analysé. 32

LISTE DES SIGLES ET ABREVIATIONS

% : Pourcentage

AFD : Agence Française de Développement

ANOVA : Analysis of Variance

BEI : Banque Européenne d'Investissement

BMF : Broken Mixed Fung

BP1 : Broken Pekoe One

CCEE : Caisse Centrale de Coopération Economique

CTC : Crush-Tear and Curl(Broyer-Déchiqueter-Enrouler)

D : Dust

D1 : Dust One

Dr : Docteur

EATA : East Africa Tea

F1 : Fannings One avec beaucoup de fibres

FAO : Food and Agriculture Organization

FS : Fannings

FS1 : Fannings One avec peu de fibres

H0 : Hypothèse nulle

H1 : Hypothèse alternative

HPLC : High Performance Liquid Chromatography

ISTEEBU : Institut de Statistiques et d'Etude Economique du Burundi

ISO : International Organization for Standardization

LTP : Lawrie Tea Processor

OTB : Office du Thé du Burundi

PD : Pekoe Dust

PF1 : Pekoe Fannings One

PIB : Produit Intérieur Brut

ppm : parties par millions

Prof : Professeur

PROTHEM : Promotion de la Théiculture à Mwaro

SPSS : Statistical Package for the Social Sciences

T : Teneur

V : Volume

AVANT- PROPOS

Ce travail rentre dans le cadre des travaux de recherche encours dans le centre de recherche en sciences naturelles et de l'environnement, en vue de connaître et de faire connaître la composition chimique des certains espèces de la flore Burundaise.

La teneur en théophylline et en caféine des différents grades de thé noir produits au Burundi par l'Office du Thé du Burundi (OTB) et la Promotion de la Théiculture à Mwaro (PROTHEM) a été déterminée.

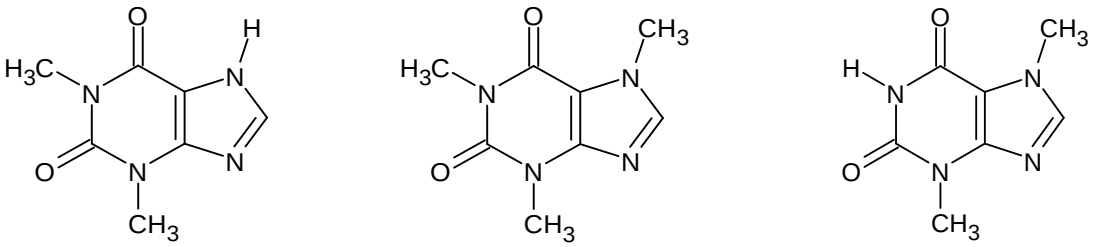
La recherche a été guidée par le fait que la teneur en théophylline dans le thé noir produit au Burundi n'est pas encore connue et que même la seule étude récemment réalisée sur la caféine n'a concernée que des échantillons de thé produits en saison pluvieuse, alors que ladite teneur dépend de la saison de cueillette. La présente étude a été réalisée sur les grades de thé noir issus des régions théicoles du Burundi produits sur la période de Juin à Août 2022.

Selon la littérature, la théophylline et caféine présentent des effets positifs ou négatifs sur la santé humaine selon la dose consommée et leur teneur varier suivant différents facteurs déterminant la récolte du thé. Les résultats de ce travail devraient donc contribuer à éclairer l'OTB et PROTHEM ainsi qu'aux consommateurs du thé noir produit au Burundi sur la composition chimique particulièrement la teneur en théophylline et en caféine des différents grades de thé noir produits au Burundi. Les résultats de ce travail devraient aider les consommateurs à pouvoir modérer la consommation selon les besoins et aux institutions de transformation de ce produit à maintenir ou améliorer la production de qualité et se positionner au rang des autres producteurs**.**

0. INTRODUCTION GENERALE

1. Contexte et problématique

Le thé est l'une des trois boissons non alcoolisées les plus consommées au monde *(*Rahman *et al*., 2013), et sa consommation mondiale a considérablement augmenté depuis des années. Considéré plus sain que le café et le cacao, le thé est fortement recommandé par l'Organisation Mondiale de la Santé (Dutta, 2017) et est une boisson la moins chère (Hicks, 2009). Le thé issu des feuilles du théier ou *Camellia sinensis*, est la boisson mondialement la plus consommée après l'eau (Sajilata *et al*., 2008). Les molécules chimiques connues de méthylxanthines (figure 1) dont fait partie la théophylline et la caféine, jouent un rôle important dans la santé humaine, et proviennent principalement de cette plante *(*Fernández *et al*., 2002).



(a) (b) (c)

Figure 1: Structures chimiques des trois xanthines: théophylline(a), caféine(b) et théobromine(c).

Ces trois structures chimiques de méthylxanthines sont très similaires (Rodriguez *et al*., 2015), et ils partagent des effets stimulants sur le système nerveux central ainsi que sur d'autres systèmes tels que le système gastro-intestinal, cardiovasculaire, rénal et respiratoire (de Sena *et al*., 2011). La méthylxantine est l'un des composés alcaloïdes présents dans les aliments (Zhu *et al*., 2004; Martínez-López *et al*., 2014), naturellement produits par les animaux et les plantes (Monteiro *et al*., 2016). La caféine, la théobromine et la théophylline étant les plus fréquemment étudiées, ces composés se trouvent principalement dans les aliments tels que les grains de café, les fèves de cacao et les feuilles de thé (Srdjenovic *et al*., 2008).

La théophylline (1,3-diméthyxanthine) est un médicament utilisé depuis des années dans le traitement des maladies respiratoires chroniques comme l'asthme en tant que bronchodilatateur (Jafari *et al.*, 2011). Dans l'organisme, elle présente des effets anti-inflammatoires très notables en cas de ces maladies, même à faibles concentrations. Très récemment, la théophylline, par des mécanismes bronchodilatateurs, immunomodulateurs et potentiellement antiviraux, a été proposée comme adjuvant dans le traitement des patients du COVID-19 (Montaño *et al*., 2022). Des effets secondaires tels que les nausées, les maux de tête, les étourdissements et les vomissements peuvent néanmois surgir, d'où la nécessité de modérer la dose (Zhu *et al*., 2015).

Quant à la caféine, elle a été isolée du thé pour la première fois au début des années 1820 (Ashihara *et al.*, 2008). Régulièrement ingérée, la caféine est une substance pharmacologiquement très active. On la trouve dans les boissons courantes (café, thé, boissons gazeuses), dans les produits contenant du cacao ou du chocolat et dans certains médicaments (Turkmen & Velioglu, 2007). Selon la dose, il peut agir comme un stimulant léger du système nerveux central, généralement excrété quelques heures après la consommation sans s'accumuler dans l'organisme au fil du temps (Barone & Roberts, 1996). Elle est métabolisée dans le foie en paraxanthine (80 %), théobromine (11 %) et théophylline (4 %) (Londzin *et al*., 2021).

Au cours des dernières années, plusieurs études se sont concentrées sur les ingrédients biologiquement actifs , en particulier les alcaloïdes dans les boissons (café, thé…) pour leurs éventuels effets bénéfiques sur la santé humaine (Horžić *et al*., 2009).

Au Burundi, des tests organoleptiques sont réalisés au sein de l'OTB et PROTHEM pour apprécier la qualité du thé noir produit avant la commercialisation. La première étude sur la détermination de la teneur en caféine des catégories (grades) de thé noir produits au Burundi a été réalisée sur des échantillons en provenance des cinq régions théicoles de l'OTB. Les résultats de cette étude ont montré que la teneur en caféine variait entre 1,675 et 2,549% (Cishahayo, 2022).

Etant donné que chaque type de thé possède un niveau d'alcaloïdes varié pouvant avoir des effets positifs ou négatifs selon la dose consommée, la variation de la teneur en ces méthylxanthines dépend de plusieurs facteurs dont le sol, le climat, la saison de cueillette, la méthode de traitement (Dubuis *et al*., 2014; Yun *et al*., 2015; Turkmen & Velioglu, 2007; Baek *et al*., 2022). La teneur en théophylline dans le thé Burundais n'a jamais fait objet

d'étude et reste inconnue jusqu'aujourd'hui. La teneur en caféine a été récemment déterminée sur certains grades de thé noir produits au Burundi durant la saison pluvieuse (période de Mars à Juin 2021) par une méthode d'analyse spéctrométrique UV visible (Cishahayo, 2022). Alors qu'il est établi que la teneur de cette dernière varie avec la saison de cueillette (Turkmen & Velioglu, 2007) et la méthode d'analyse, sa détermination sur la production de la saison sèche par la méthode Chromatographie Liquide Haute Performance serait une plus-value.

C'est dans ce cadre qu' une étude a été menée sur différents grades de thé noir produits par l'OTB et l'usine privée PROTHEM sous le thème «CONTRIBUTION A LA DETERMINATION DE LA TENEUR EN THEOPHYLLINE ET EN CAFEINE DU THE NOIR PRODUIT AU BURUNDI» afin de donner une contribution dans la connaissance de certaines substances naturelles contenues dans cette culture industrielle du Burundi.

2. Hypothèses

Dans cette étude, trois hypothèses ont été formulées à savoir:

- la teneur en théophylline et caféine est différente dans les différents grades de thé noir d'une même région théicole;
- la teneur en théophylline et caféine d'un même grade de thé noir diffère d'une région à une autre;
- la teneur en théophylline et en caféine des produits de l'OTB diffère de celle des produits de PROTHEM.

3. Objectif global

L'objectif global de notre travail est de déterminer la teneur en théophylline et caféine des différents grades de thé noir produits au Burundi.

4. Objectifs spécifiques

Les objectifs spécifiques de cette étude sont:

- déterminer et comparer la teneur en théophylline et caféine du thé noir en fonction des grades;
- déterminer et comparer la teneur en théophylline et caféine du thé noir en fonction des régions théicoles;

- déterminer et comparer la teneur en théophylline et caféine des grades de thé entre l'OTB et PROTHEM;
- informer les consommateurs et les industriels en particulier sur la qualité du thé noir produit au Burundi en fonction des teneurs de ces substances bioactives sous analyse.

Pour atteindre ces objectifs, il a fallu une méthode de dosage de la caféine par chromatographie liquide haute performance (NTC-ISO 20481, 2008) avec modification.

5. Intérêts de la recherche

Cette étude va aider à classer les régions théicoles sur base de la qualité du thé noir produit au Burundi en fonction de leur teneur en théophylline et en caféine.

Le potentiel montré par les méthylxanthines dans un si large éventail de conditions devrait justifier de nombreuses autres initiatives scientifiques et médicales qui pourraient mettre en évidence leur adéquation en tant qu'agents thérapeutiques adjuvant comme la théophylline dans le traitement de l'asthme afin de contribuer à l'avènement des aliments fonctionnels.

Les Burundais en général, les théiculteurs, les industriels et particulièrement les amateurs du thé noir produit au Burundi doivent bénéficier de l'intérêt de la recherche par la connaissance de la teneur en ces deux méthyl xanthines sous étude afin de donner une place de choix à cette plante riche de noblesse.

A la lumière des résultats de ce travail, la sensibilisation, les mesures de régulation pour la consommation ainsi que la place du thé noir Burundais sur base de la teneur en théophylline et en caféine seront fournies**.**

CHAPITRE I. GENERALITES SUR LE THE

I.1. INTRODUCTION

Le thé est une plante originaire d'Asie du Sud–Est, principalement cultivée et consommée en Chine et au Japon, et utilisée dans la médecine traditionnelle (Yashin *et al*., 2011). Consommé moyennement à 120ml/jour et par habitant dans le monde (Gramza-Michalowska & Bajerska-Jarzebowska, 2007), le thé a été découvert pour la première fois vers 3000 av. J.- C en Chine (Vuong, 2014). Cette culture s'est propagée dans le monde et introduite en Afrique pendant la période coloniale (Bitama, 2021).

Au Burundi, le théier a été introduit à la station de recherche agronomique de GISOZI en 1931. Ce n'est qu à partir de 1963, que la théiculture fut diffusée en dehors de la station expérimentale et les premières plantations de l'Etat dites « Blocs industriels » furent installées. Les blocs dits « thé villageois » ont été mis en place sous l'appui de la Banque Européenne d'Investissement (BEI), la Caisse Centrale de Coopération Economique (CCEE) et l'Agence Française de Développement (AFD) (Ndayisaba, 2019). L'Office du Thé du Burundi fut créé en 1971 pour promouvoir la théiculture au Burundi, coordonner les activités des projets théicoles et assurer la supervision des régions théicoles créées après la phase projet.

Depuis son introduction en 1963, la théiculture a une importance capitale dans la vie socio-économique pour plus de 60.000 exploitants-théiculteurs. Elle a créé de l'emploi et procuré des devises pour le pays (Bitama, 2021). La figure 2 montre les différentes régions théicoles en fonctions des superficies totales de l'OTB et en fonction des plantations paysannes en 2011.

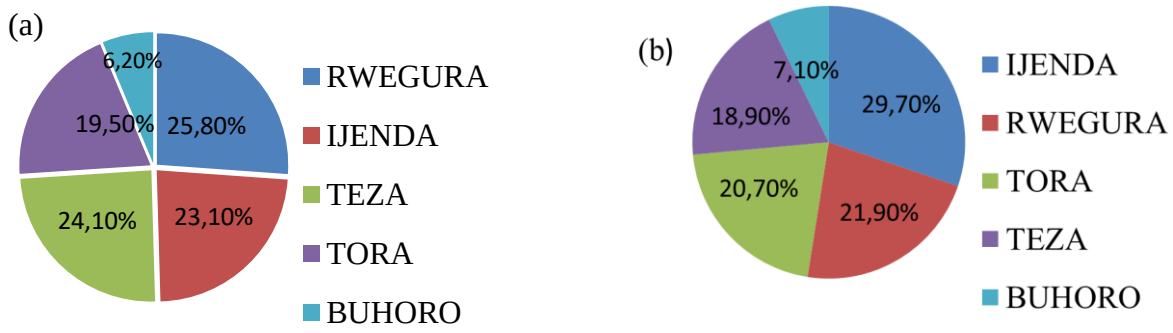


Figure 2: Régions théicoles: (a) Selon les superficies de l'OTB et (b) selon les plantations paysannes en 2011(Ndayisaba, 2016).

La contribution du PROTHEM dans la production de la feuille verte s'est manifestée à partir de 2011 et le coût de la feuille verte a considérablement augmenté grâce à la production de ces deux institutions (ISEEBU, 2017). Exporté à plus de 90% de sa production, le thé burundais a remporté la 3ème place par sa qualité à l'échelon mondial en 2009 après le Kenya et le Rwanda. En 2015, il fut classé premier aux enchères de Mombassa (Ndayisaba, 2019).

Dans les pays de la Communauté de l'Afrique de l'Est (EAC), une large gamme de produits à base de thé continue d'être développée et les marchés du thé sont devenus de plus en plus sophistiqués (Ndayitwayeko & Ndimanya, 2015). Le commerce régional du thé s'est accentué depuis la vente aux enchères régie par l'East Africa Tea (EATA) basée à Mombasa (Kenya).

I.2. BOTANIQUE DU THEIER

I.2.1. Classification botanique

Le genre Camellia comprend 82 espèces qui sont pour la plupart indigènes des hautes terres du sud-est de l'Inde (Sealy, 1958). Deux variétés principales de *Camellia sinensis* sont à distinguer. La première est la *Camellia sinensis* var. *sinensis* ou théier de Chine, cultivée essentiellement en Chine et au Japon pour la production de thé vert. La deuxième variété est *Camellia sinensis* var. *assamica* ou théier d'Assam, cultivée et utilisée essentiellement pour la production de thé noir en Inde, à Ceylan (ou SriLanka), en Indonésie et en Afrique. La figure 3 illustre la variété du thé *Camellia sinensis var. assamica* cultivé au Burundi.



Figure 3: Photo du *Camellia sinensis var. assamica* cultivé au Burundi.

I.2.2. Description de la plante

Le théier est un arbuste de la famille des Theaceae, originaire du Sud-Est d'Asie. Il atteint en moyenne 10 à 15 m de haut, mais peut mesurer jusqu'à 30 m. Il pousse dans les régions tropicales humides de notre planète qui sont soumises à un régime de pluviométrie régulier nécessaire à cette espèce. Comme beaucoup d'arbres et d'arbustes, c'est une espèce qui peut vivre très longtemps quand on la laisse pousser. C'est un cousin des Camélias, que l'on plante pour ornementer les parcs et jardins (Huetz de Lemps, 1991)

I.3. OBTENTION DES THES

I.3.1. Conditions de culture

La culture du thé exige un sol acide dont le pH peut varier de 4,5 à 7 pour assurer son épanouissement optimal. De plus, un sol meuble, plus ou moins riche en sable, potassium et acide phosphorique lui est favorable. Par contre, la présence du calcaire et d'argile sont défavorables à cette culture. Le drainage du sol et la couche humifère doivent être suffisante.

La température comprise entre 10 et 30 degrés Celsius (°C) avec une moyenne de 19 °C, la météorologie des journées ensoleillées pendant 5 heures en moyenne, des nuits fraîches ainsi que des précipitations nocturnes supérieures à 1500 mm par an ou 200 mm par mois sont nécessaires pour obtenir un thé de qualité optimale. Les conditions ainsi générées emprisonneraient la chlorophylle au sein des chloroplastes de la feuille, conférant un arôme plus intense au futur infusé.

A noter que les régions tropicales et subtropicales répondent à ces conditions de température précédemment citées; des latitudes rassemblant un maximum de ces conditions climatiques situées entre 43°C Nord et 27°C Sud ainsi qu' une altitude optimale de 1000 à 1500 mètres pour la culture des théiers (Marthe, 2009).

I.3.2. Facteurs déterminants pour la récolte

Il existe de multiples facteurs déterminant la qualité d'une plantation de thé. L'âge du théier, le climat et le relief dans lequel il se développe, le sol dans lequel il plonge ses racines sont autant d'éléments qui vont influencer la qualité du thé obtenue (Dubuis *et al*., 2014).

I.3.3. Technique de cueillette

La récolte manuelle des feuilles de thé les unes après les autres et non pas par poignées assure une qualité supérieure au thé. On récolte uniquement le bourgeon terminal non épanoui, et les premières jeunes feuilles souples, juste au-dessus du rétrécissement pétiolaire. La première cueillette a lieu sur un théier âgé de 3 à 5 ans. La production de certains thés verts et thés blancs nécessite une cueillette manuelle pour obtenir le bourgeon, la sommité et la deuxième feuille (Ho *et al.*, 2018). C'est ainsi que trois types de cueillettes sont à distinguer en fonction du nombre de feuilles accompagnant le bourgeon (pekoe):

- la cueillette « impériale » ou P+1 lors de laquelle on prélève le bourgeon terminal à peine déployé, ainsi que la première feuille qui suit (la qualité est excellente);
- la cueillette fine ou P+2 lors de laquelle on prélève le bourgeon terminal non épanoui, et les deux premières feuilles;
- la cueillette « grossière » ou P+3 constituée du bourgeon terminal et des 3 premières feuilles. Il s'agit du thé de qualité nettement inférieure, composé de la première pousse et des trois feuilles suivantes, voire plus.

Le thé «souchong» est composé des quatrième et cinquième feuilles. C'est le thé le plus fréquemment vendu, à cause de son rendement de cueillette élevé (Marthe , 2009).

I.3.4. Procédés d'obtention du thé

Les feuilles de thé fraîches de Camellia sinensis ((L.) O. Kuntze) sont traitées par diverses techniques pour produire différents types de thé. Selon le degré et la nature de la fermentation, les feuilles de thé transformées peuvent être classées en cinq types de thé principaux qui comprennent le thé blanc, vert, oolong, noir et pu-erh (Ho *et al*., 2018). Les modifications chimiques sont conditionnées par le degré et la nature de la fermentation (Wong *et al*., 2022).
En effet, lors du processus de traitement, le thé est principalement divisé en trois types de thé en fonction du degré de fermentation, à savoir le thé vert non fermenté, le thé noir totalement fermenté et le thé oolong partiellement fermenté. Ces derniers diffèrent en termes de caractéristiques physiques, de propriétés organoleptiques et de teneur en polyphénols en raison des modifications chimiques apportées aux polyphénols du thé pendant le traitement. Chaque type de thé a sa propre méthode de traitement, ce qui les différencie par des caractéristiques de qualité telles que l'apparence, la couleur, l'arôme et la saveur (Jiao *et al*., 2016).

I.3.4.1. Procédés d'obtention du thé noir

Le traitement du thé noir implique généralement le flétrissement des feuilles de thé à température ambiante, ce qui diminue la teneur en humidité (Lee *et al*., 2019). Le flétrissement rend également les feuilles de thé plus flexibles où elles peuvent être tordues et roulées facilement sans se casser (Deb & Jolvis Pou, 2016). Les feuilles de thé sont ensuite roulées ou macérées, perturbant les structures cellulaires végétales, ce qui facilite l'étape de fermentation ultérieure où le contact physique entre les catéchines, la polyphénol oxydase et la peroxydase est activé (Graham, 1992). Les feuilles de thé peuvent être roulées par roulage orthodoxe, être traitées plus durement en utilisant un Lawrie Tea Processor (LTP), ou en utilisant des machines CTC (Crush-Tear-Curl): on parle thé noir orthodoxe ou thés noirs CTC (Caffin *et al*., 2004; Das *et al.*, 2019). La fermentation a ensuite lieu lorsque la plupart des catéchines des feuilles de thé sont oxydées en théaflavines et théarubigines (Koch *et al*., 2018).

La fermentation se fait généralement à température ambiante et le temps de fermentation varie de 45 min à 3 h, où les feuilles de thé roulées sont fermentées plus longtemps que les feuilles de thé macérées pour oxyder les catéchines, atteignant le niveau souhaité de théaflavines (Das *et al.*, 2019). Le processus de fermentation se termine par le séchage où la chaleur inhibe l'activité enzymatique, donnant le produit final de thé noir séché (Turkmen *et al*., 2009).

I.3.4.2. Procédés d'obtention du thé vert

Le thé vert est transformé en chauffant les feuilles de thé, ce qui rend les enzymes oxydatives inactive, la polyphénol oxydase et les peroxydases omniprésentes dans les feuilles de thé (Gramza-Michalowska & Bajerska-Jarzebowska, 2007). Les feuilles de thé sont ensuite roulées ou façonnées, ce qui libère les jus des cellules végétales et recouvre la surface des feuilles. Ensuite, les feuilles sont séchées pour réduire la teneur en humidité afin de créer un produit de thé séché (Ye *et al*., 2018). L'étape de chauffage est généralement effectuée par cuisson à la vapeur à environ 100°C pour le thé vert de style japonais comme le Sencha, et par torréfaction ou cuisson à la poêle à environ 300-350°C pour le thé vert de style chinois (Hilal, 2017). Cependant, la cuisson à la poêle peut également être utilisée pour produire du thé vert de style japonais tel que le Kamari-cha, un thé vert japonais de qualité supérieure (Friedman *et al*., 2009). Les styles de thés verts diffèrent par la phase de roulage, ce qui fait que les thés verts de style chinois sont roulés de manière unidirectionnelle, tandis que les thés de style japonais sont roulés de manière bidirectionnelle (Sharma *et al*., 2005).

I.3.4.3. Procédés d'obtention du thé oolong

Le traitement typique du thé oolong implique l'ensoleillement ou le flétrissement, la fermentation, le panoramique, le roulage et la cuisson. Le processus de flétrissement réduit la teneur en humidité par la lumière directe du soleil, facilitant ensuite le mouvement des catéchines des vacuoles cellulaires vers le cytoplasme cellulaire (Lin *et al*., 2016). Par agitation et mise en place, les feuilles de thé sont secouées trois à quatre fois à intervalles pour meurtrir les bords des feuilles de thé. Cela décloisonne davantage les catéchines et les oxydases dans les cellules des feuilles de thé et initie la fermentation. Cependant, la fermentation partielle est caractérisée par le degré de fermentation, allant de 10 % à 80 % selon la variété et le style de production (Ho *et al*., 2018). Le moment, l'intensité et la durée de l'agitation sont déterminés par le maître du thé en surveillant les changements d'arôme des feuilles de thé tout au long du processus d'agitation et de mise en place (Lin *et al*., 2016). L'étape de paning est une étape de fixation à la chaleur qui met fin à la fermentation et élimine également toute odeur d'herbe dans les feuilles de thé (Sheibani *et al*., 2016). Les feuilles de thé sont ensuite roulées et cuites pour donner un produit séché. Le thé oolong est un thé partiellement fermenté. Il a une saveur parfumée et un arôme fruité doux avec un faible niveau de caféine.

I.3.4.4. Grades du thé noir

Les différents types de cueillettes et les procédés d'obtention ont amené les Britanniques à établir une classification du thé noir, en fonction de la finesse de la cueillette et de la taille des feuilles et des fragments de feuilles. Outre le type de cueillette, la classification britannique est basée sur quatre tailles des feuilles et des fragments de feuilles tel que les feuilles entières, les feuilles brisées (renfermant plusieurs grades suivant les qualités définies) et leurs résidus de tamisage, les fannings et dusts (Marthe, 2009).

Il existe aussi des classements pour les feuilles broyées, appelées Fannings (F) qui sont des morceaux d'environ 1,5 mm ou le Dust (D), constituants des morceaux inférieurs à 1 mm mais ceux-ci sont rarement employés.

Au Burundi, la séparation des grades est réalisée après séchage par des trieurs en fonction de la dimension des particules. Dans la chaîne de triage, un pré-trieur sépare d'abord le thé séché en deux catégories en fonction de la contenance en fibres ou non dont le thé de première ligne et celui de deuxième ligne. Ces catégories sont ensuite triées séparément pour donner les grades de première et de deuxième ligne. Ainsi, dans la gamme des tamis, le calibrage

granulométrique est tel que BP1 (mench10-16), PF1 (mench18-28), PD (mench30-40), D1 (mench45-60) (Nkeshimana, 2021). Les grades de première ligne sont séparés suivant la granulométrie dont les unités sont connues de mench selon l'OTB et les grades de deuxième ligne sont récupérés par des trieurs électriques.

Ainsi, on en distingue:

- ceux dits de première ligne ne possédant pas de fibres et qui sont distingués de façon croissante selon la taille des grains tel que Dust One (D1), Pekoe Dust (PD), Pekoe Fannings One (PF1) et Broken Pekoe One (BP1) ;
- ceux dits de deuxième ligne possèdant des fibres dont Dust (D) avec peu de fibres et grains de petite taille, Fannings One (FS1) avec peu de fibres et taille moyenne des grains, Fannings One (F1) avec beaucoup de fibres et taille moyenne des grains, Fannings (FS ou F) avec fibres et grande taille des grains et Broken Mixed Fung (BMF) constituée uniquement par de fibres.

I.3.5. Temps et température d'infusion de quelques exemples de thé

Le temps et la température sont des paramètres très importants pour l'extraction des différents constituants du thé. Le thé noir a montré sa meilleure activité antioxydante dans la méthode d'extraction à l'eau chaude de courte durée tandis que le thé vert et le thé blanc ont montré une sensibilité à la température et une dépendance au temps pour la déteriation des propriétés antioxydantes (Hajiaghaalipour *et al*., 2016). Le tableau I montre les différences de température et de temps d'infusion des différents types de thé.

Tableau I: Intervalle de température et temps d'infusion des différentes thé (Klegou, 2005).

Couleur du thé	Température	Temps
Noir	90-95°C	3-5 min
Vert	70-85°C	1-4 min
Blanc	70-85°C	5-10min
Vert	70-85°C	1-4 min
Jaune	70-75°C	2-6 min
Bleu-Noir ou Wulong	95°C	40 sec – 7 min

La température et le temps d'infusion de différents grades de thé sont bien déterminés par un dégustateur professionnel et a un intérêt sur les propriétés des différents produits pharmacologiquement actifs (Klegou, 2005).

I.4. COMPOSITION CHIMIQUE DU THEIER

La feuille du théier est constituée principalement par les polyphénols (30%), les glucides (25%), les protéines (15%), les alcaloïdes (3%), les éléments minéraux (3%), les pigments (0,5%) et les huiles essentielles (0,1%) de la matière sèche (Marthe, 2009)**.**

Les principaux principes actifs constituant la feuille du théier sont les polyphénols appelés tanins, d'une plus grande famille des flavonoïdes représentés par des catéchines. Ces derniers comprenent l'épicatéchine, l'épigallocatéchine, l'épicatéchine gallate, l'épigallocatéchine gallateet la catéchine gallate. Les polyphénols du thé comprennent également l'acide gallique dans les thés verts et blancs, les théaflavines et les théarubigines ainsi que d'autres polymères de catéchine dans les thés noirs et oolong (Li *et al*., 2013). Les attributs organoleptiques et sensoriels des différentes infusions de thé sont liés aux différents composants présents dans le thé. La variation de la couleur et du goût de l'infusion est fonction des composants solubilisés (Harbowy *et al*., 1997; (Chaturvedula & Prakash, s. d.).

I.5. PHARMACOLOGIE DU THE

Le thé fait partie des plantes médicinales les plus largement connues. Ce sont des éléments essentiels de la médecine traditionnelle en raison de leurs constituants phytochimiques ayant des valeurs pharmacologiques et applications thérapeutiques *(*Naveed *et al*., 2018). Etant une boisson largement consommée dans le monde, le thé suscite de plus en plus d'intérêt en raison des niveaux élevés de polyphénols constituant une source potentielle d'antioxydants (Muriuki *et al*., 2022).

En effet, l'activité pharmacologique du thé est intimement liée à la présence des composés phénoliques et des flavonoïdes montrant des teneurs élevées dans les infusions de thé qui leur confèrent une excellente activité antioxydante (Hajiaghaalipour *et al*., 2016). La température de l'eau plus élevée et une durée d'infusion plus courte constituent les meilleures conditions pour l'extraction des échantillons de thé mais l'ajout du lait diminue l'activité antioxydante (Zargar *et al.*, 2018). Les variables d'infusion telles que, la température (100°C) et le temps (10 min) dans l'eau minérale naturelle sont optimales pour l'extraction des composés phénoliques du thé noir et du thé vert (Vinci *et al*., 2022). Le thé noir est indiqué comme antidote des poisons d'origine végétale, remède contre le gonflement et les abcès de la tête et inhibiteur du sommeil (Zhen, 2002). Le thé vert peut-être utilisé pour le traitement du diabète, de la maladie d'Alzheimer, du cancer de la bouche et de la dermatite, mais des effets néfastes de son extrait et de ses principaux ingrédients comme l'hépatotoxicité et les dommages à

l'ADN ont été rapportés (Zhao *et al*., 2022). Les polyphénols du thé ont des effets anti-inflammatoires dans la prévention du cancer et la régulation du métabolisme des lipides (Fridja & Zitouni, 2021).

Grâce à la présence de divers composés biologiquement actifs, le thé noir a de nombreux effets bénéfiques sur la santé, notamment des propriétés antivirales, antibactériennes, anticancéreuses et protectrices contre diverses maladies, notamment les troubles cardiovasculaires et les troubles de la mémoire (Monteiro *et al*., 2016). La consommation régulière d'une quantité modérée du thé vert ou du thé noir peut moduler les activités antioxydantes des fluides corporels chez les personnes soumis aux stress oxydatif et améliorer le métabolisme du glucose, des lipides et de l'acide urique (Kim *et al*., 2015). D'autres effets bénifiques à la santé liés à la présence des méthylxanthines telles que la caféine et la théophylline sont décrits dans le tableau II**.**

Tableau II: Puissances pharmacologiques respectives des méthyl xanthines naturelles (Monteiro *et al*., 2016; Cabrera *et al*., 2003).

Effet systématique	**Caféine**	**Théophylline**
Stimulation du système nerveu central	+++	++
Stimulation respiratoire	+++	++
Diurèse	++	+++
Dilatation coronarienne	+	+++
stimulation cardiaque	+	+++
Stimulation des muscles squelettiques	+++	++
Relaxation des muscles lisses (broncodilatation)	+	+++

(+++) : de plus puissant ; (+) : à moins puissant.

I.5.1. Effets synergiques des bases pyriques, des polyphénols et des flavonoïdes

L'activité pharmacologique du thé est intimement liée à la présence des composés phénoliques et des flavonoïdes montrant des teneurs élevées dans les infusions de thé qui leur confèrent une excellente activité antioxydante (Hajiaghaalipour *et al*., 2016). Cette activité dépend de la structure, en particulier du nombre et de la position des groupes hydroxyles et de la nature des substitutions sur les anneaux aromatiques des ces composés phénoliques. Diverses actions physiologiques ont été attribuées à la présence des alcaloïdes dans les maladies neurogénératives, les maladies respiratoires, le cancer et le diabète (Mourya *et al*., 2019).

Bien que le département américain de l'Agriculture et l'Autorité Européenne de Sécurité des aliments considèrent que la consommation quotidienne de café contenant 400 mg de caféine

est sans danger pour santé, elle provoque différentes interactions pharmacocinétiques cliniquement significatives avec de nombreux médicaments (Belayneh & Molla, 2020).
La théophylline inhibe la toux induite par la capsaïcine dans des conditions physioloques normales et pathologiques en diminuant l'excitabilité des nerfs sensoriels par l'activation de canaux potassiques activés par le calcium à conductance petite et intermédiaire (Dubuis *et al*., 2014).

I.5.2. Activité anticancéreuse du thé

La prévention du stress oxydatif, la modulation du métabolisme cancérogène et la prévention des dommages à l'ADN ont été suggérées comme mécanismes de prévention du cancer possibles pour le thé et les polyphénols du thé (Yang *et al*., 2009). L'épigallocatéchine-3-gallate étant le plus abondant dans le thé vert (Balentine *et al*., 1997), celui-ci possède une activité anticancéreuse la plus forte (Wang & Tian, 2001). Elle perturbe la croissance d'un grand nombre de cellules cancéreuses et bloque la capacité des tumeurs en provoquant l'angiogenèse (Salsabil & Nechoua, 2021). Le thé vert est principalement étudié pour ses propriétés de chimioprévention et de la chimiothérapie des cancers.

L'étude réalisée par Shankar et ses collaborateurs sur les souris traitées avec l'épigallocatéchinegallate a montré son effet préventif et peut aussi être utile dans le traitement du cancer du pancréas par son inhibition dans la croissance des tumeurs orthotopiques du cancer du pancréas, l'angiogenèse et la métastase (Shankar *et al*., 2013). L'épigallocatéchine gallate inhibe la migration et l'invasion des cellules tumorales (Khan & Mukhtar, 2013). D'autres études menées ont montré que le thé vert, grâce à sa molécule d'épigallocatéchine-3-gallate (EGCG) possède un effet préventif sur les cancers du sein, de la prostate, du poumon et de la peau (Zaveri, 2006). L'EGCG inhibe la cancérogénèse à tous les stades d'initiation, promotion et progression (Chung *et al*., 2003). Cette inhibition est attribuée à une combinaison de plusieurs propriétés comme une activité anti-oxydante, anti-inflammatoire, antiprolifération et proapoptotique (Gouni-Berthold & Sachinidis, 2004).

La consommation d'agents alimentaires capables d'inhiber ou de retarder la croissance et la prolifération des cellules cancéreuses sans affecter de manière significative les cellules normales pourrait constituer une stratégie efficace pour le développement d'approches préventives/thérapeutiques du cancer.

CHAPITRE II: MATERIEL ET METHODES

II.1. Echantillonnage

L'échantillonnage a été réalisé au sein de l'Office du Thé du Burundi (OTB) et de la Promotion de la Théiculture à Mwaro (PROTHEM) dont la localisation des usines de transformation est montrée sur la carte de la figure 4 pour les régions théicoles existantes au Burundi. Il s'agit du Nord vers le Sud, de BUHORO, RWEGURA, TEZA, IJENDA, GISOZI et TORA.

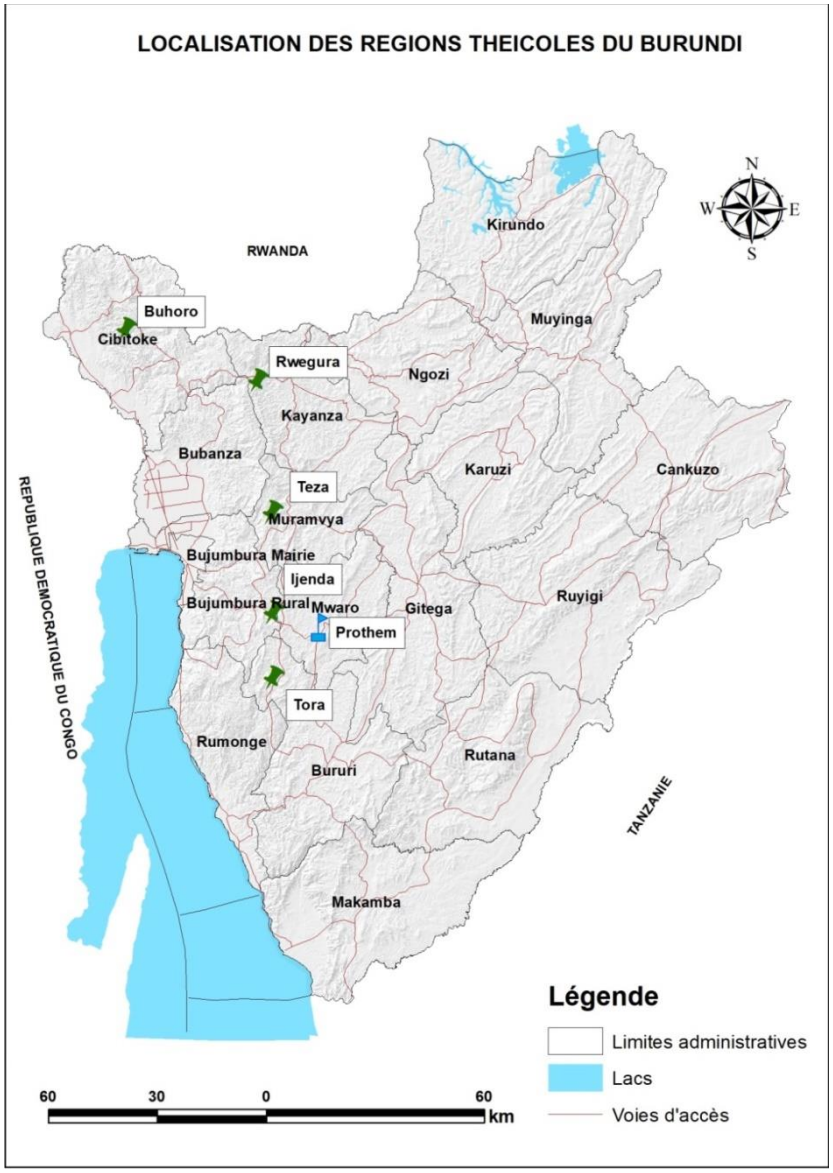


Figure 4: Carte de la localisation des usines de transformation du thé au Burundi (FAO, 2016) modifiée. Les épinglés verts indiquent la localisation des cinq usines de l'Office du Thé du Burundi (OTB), tandisque l'épinglé bleu est utilisé pour la localisation de l'usine du projet Promotion de la Théiculture à Mwaro (PROTHEM).

Cette étude a porté sur 41 échantillons produits par l'OTB et PROTHEM entre Juin et Août 2022 dans les six usines précitées. Les échantillons des grades de thé noir ont été collectés en fonction de leur disponibilité à l'usine au moment de notre échantillonnage. La répartition des 41 échantillons collectés se présente comme suit:

- usine de TORA: 7 échantillons (BP1, PF1, PD, D1, FS, FS1 et BMF);
- usine de TEZA: 7 échantillons (BP1, PF1, PD, D1, D, FS et BMF);
- usine d'IJENDA: 7 échantillons (BP1, PF1, PD, D1, D, F1 et BMF) ;
- usine de BUHORO: 8 échantillons (BP1, PF1, PD, D1, D, F1, FS et BMF);
- usine de RWEGURA: 6 échantillons (BP1, PF1, PD, D1, F1 et BMF);
- usine de GISOZI: 6 échantillons (BP1, PF1, PD, D1, D et F1).

Le tableau III en donne la synthèse, tandis que la figure 5 montre des photos pour quelques échantillons.



Figure 5: Photos de quelques échantillons en provenance des différentes usines de transformations du thé au Burundi.

Tableau III: Répartition des échantillons selon les usines de transformation.

Echantillons	TORA	TEZA	IJENDA	MABAYI	RWEGURA	GISOZI
PF1	+	+	+	+	+	+
BP1	+	+	+	+	+	+
PD	+	+	+	+	+	+
D1	+	+	+	+	+	+
D	-	+	+	+	-	+
F1	-	-	+	+	+	+
FS1	+	-	-	-	-	-
FS	+	+	-	+	-	-
BMF	+	+	+	+	+	-

Les signes + et – signifient (respectivement) l'existance et l'absence du grade de thé à l'usine au moment de l'échantillonnage.

II.2. Choix de la méthode

Le choix de la méthode a été guidé par le fait que l' étude consistait à analyser simultanément la théophylline et la caféine. Sur base de certaines études déjà réalisées, il a été constaté que la théophylline n'est présente qu'en faible quantité (Baek *et al*., 2022) ou à l'état de trace, d'où la nécessité d'une méthode très sensible. La méthode de dosage de la caféine (ISO 20481, 2008) par la Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC) a été choisie, mais avec une legère modification en faisant référence aux résultats disponibles dans la litérature (Hicks *et al*., 1996; Zhu *et al*., 2004; López-Martínez *et al.*, 2003).

II.2.1. Matériels

Les produits chimiques utilisés comprenaient :

- la théophylline pure (purété >99%) (SIGMA, T1633-50G),
- la caféine pure (Merck 2584, Germany),
- le méthanol (analytique),
- l'acide acétique glacial (analytique)

Le matériel utilisé était constitué par :

- un système HPLC (Agilent 1260 infinity II UV) pour la séparation et la quantification,
- un bain à ultrason (Bransonic CPX3800, CPX-952-818R) pour le dégazage,
- une balance analytique (SARTORIUS, QUINTIX35-1S, ®)
- une centrifugeuse (Eppendorf 5810R),
- un agitateur magnétique chauffant,
- des tubes à centrifugation,
- des ballons rodés, des erlenmeyers, des fioles jaugés (500ml, 50ml, 10ml) en verre,
- des micropipettes, des microfiltres (0,20µl), des vials et un crimper.

II.2.2. Les conditions de travail

Le tableau IV montre les conditions de réalisation de l'analyse avec le système HPLC; les paramètres et les conditions nécessaires qui ont été mis en place.

Tableau IV: Paramètres et conditions d'analyses par HPLC.

Paramètre	Condition
Colonne	Poroshell 120 EC-C18; 4,6 x 100 mm
Mobile phase	Méthanol: acide acétique glacial: eau=20:1:79 (v/v/v)
Température de la colonne	40°C
Longueur d'onde d'absorption	272nm
Volume d'injection	10 µL
Débit	1,0 mL/min
Temps	8min

II.3. Préparation des solutions

II.3.1. Préparation de la gamme étalon

A partir des solutions mères étalon de théophylline et de caféine de concentration 1000 ppm (mg/l) préparées respectivement en dissolvant 0,10030g dans 100ml et 0,10067g dans100ml, une série de cinq solutions diluées a été préparée dans des fioles jaugées de 25ml numérotées de 1 à 5. Le tableau V en donne les détails. Pour des concentrations connues de théophylline et caféine, un volume était prélevé des deux solutions mères, mis dans une fiole de 25 ml avant de compléter avec le solvant jusqu'au trait de jauge.

Tableau V: Valeurs de la concentration (Conc. en mg/l) et du volume (V en µl) des solutions-mères utilisées pour la préparation de 25 ml de chacune des solutions filles.

	Théophylline		Caféine	
Numéro	Conc.[a]	V. [b]	Conc. [a]	V. [b]
1	2	50	10	250
2	8	200	50	1,250
3	16	400	100	2,500
4	32	800	200	5,000
5	64	1600	400	10,000

[a] Concentration; [b] Volume prélévé

II.3.2. Préparation de la phase mobile

La phase mobile utilisée était constituée du mélange Eau/Méthanol/Acide acétique glacial dans un rapport de 79/20/1 (V/V/V). Pour un litre de solvant, un volume de 790 ml d'eau ultra-pure a été mesuré, auquel 200 ml de méthanol pur a été ajouté puis mélangé.

Par la suite, un volume de 10 ml d'acide acétique glacial était ajouté sous hotte et mélangé soigneusement. La bouteille contenant le solvant était ensuite introduit dans le branson pour le dégazage pendant 15min. Les solutions de la gamme étalon (tableau V) ont ensuite été analysées par HPLC afin d'établir la courbe d'étalonnage. Le tableau VI montre la valeur de l'aire du pic pour chacune des concentrations des solutions filles, les courbes de calibration établies sur base de ces dernières étant montrées par la figure 6.

Tableau VI: Valeurs de la concentration (en mg/l) et de l'aire des pics (mAU) pour les solutions étalons.

Théophylline		Caféine	
Conc.[a]	Aire [b]	Conc.[a]	Aire [b]
2,384	32,017	9,371	153,22
7,888	99,561	50,361	766,393
15,999	199,087	100,897	1522,386
31,966	394,997	201,235	3023,389
64,022	788,343	399,141	5983,951

[a] concentration (en mg/l); [b] Aire du pic en (mAU)

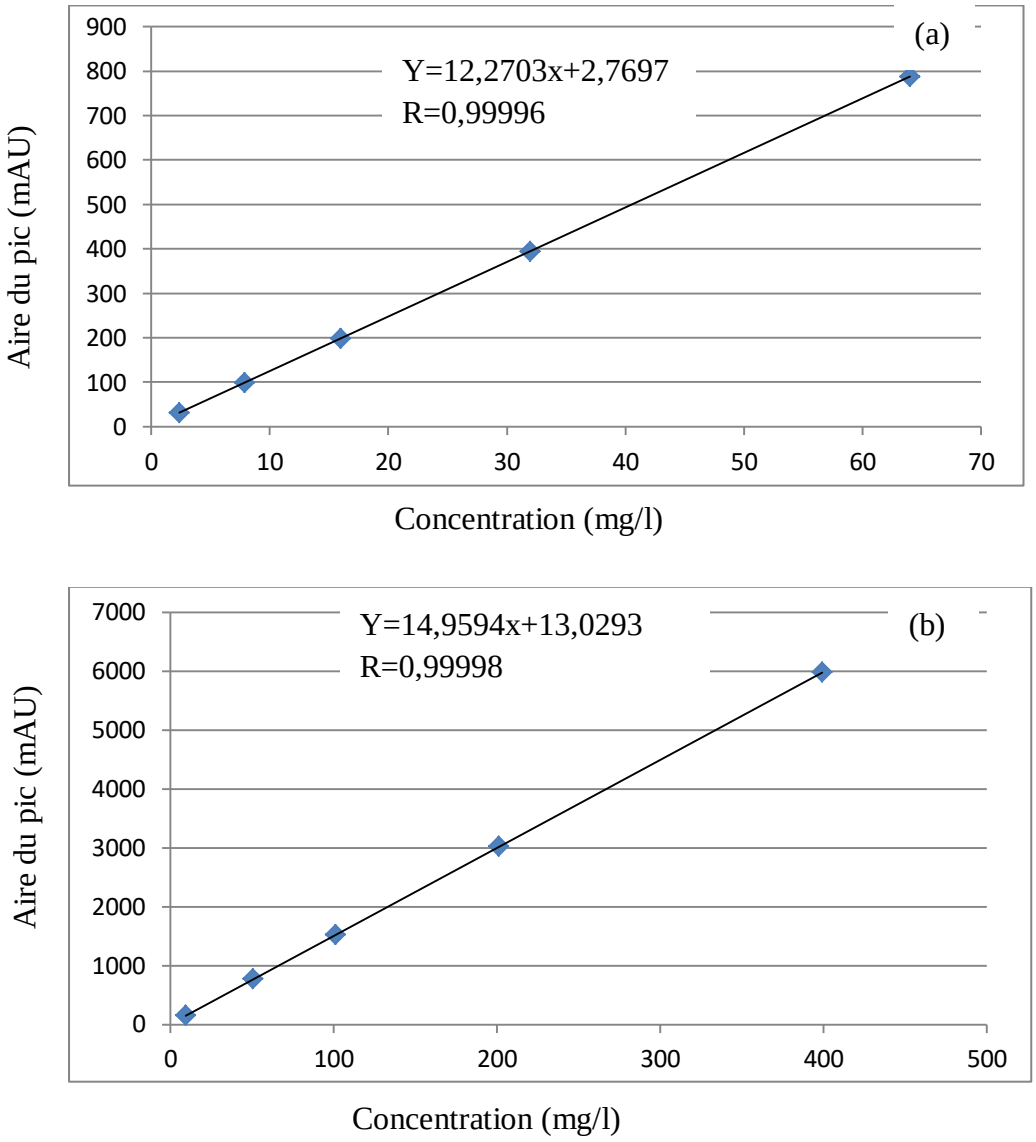


Figure 6: Courbes de calibration (a) de la théophylline et (b) de la caféine.

II.4. Détermination du temps d'extraction solide-liquide de la théophylline

La détermination du temps d'extraction a été réalisée en utilisant la méthode de dosage de la caféine (ISO 20481, 2008) par Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC) modifiée voir (II.2). Dans un ballon d'un litre, 500ml d'eau distillée ont été introduits. Une masse de 5g de l'échantillon de grade D1 d'IJENDA testé (pesée à 0,01mg près) et 5g d'oxyde de magnésium y ont été ajoutés avant de chauffer à reflux ce mélange pendant 30, 45 et 60 minutes correspondant respectivement aux trois essais différents. On a laissé reposer la solution obtenue à température ambiante et, après refroidissement, une petite quantité a été prélevée dans un tube pour centrifugation pendant 15 minutes à raison de 1510 rpm.

A l'aide d'une seringue stérile, le surnageant a été prélevé, puis rempli dans le vial en filtrant sur un microfiltre de 0,20µl tout en laissant couler la première goutte. La longueur d'onde était réglée à 272nm, la colonne maintenue à 40°C, la pression inférieure à 190bar et la durée d'une injection était fixée à 8 minutes. Le volume d'injection était de 0,9ml/min. Les résultats de ce test préliminaire sont consignés dans le tableau VII. Les valeur de la teneur en théophylline issues de l'extraction pendant 30; 45 et 60 minutes respectivement par l'analyse HPLC, suggère que la théophylline est extraite au maximun au même temps que la caféine.
Ce testé a permis de confirmer que l'on peut doser simultanément la théophylline et la caféine en se référant au temps d'extraction maximale de la caféine dans l'étude réalisée par Mourya et ses Collaborateurs (Mourya *et al*., 2019). Ainsi, dans la suite du travail, un temps d'extraction d'une heure (60 minites) a été maintenu.

Tableau VII: Valeur de la concentration (Conc.) de la théophylline dans l'extrait et de sa teneur au temps d'extraction (T) pour le thé de grade D1 d'IJENDA utilisé.

T (min)	Masse (g)	Conc. (mg/l)	Teneur (% m/m)
30	5,00239	27,011	0,270
45	5,00269	27,189	0,272
60	5,00570	28,245	0,282

La concentration en théophylline (et en caféine) étant directement déduite de la courbe d'étalonnage, la teneur est donnée par la relation suivante :

$$\text{Teneur} = \left[\frac{\text{conc. (mg/l)} \times \text{V(l)}}{\text{m (g)} \times 1000\ \text{(mg)}}\right] \times 100$$

Dans cette relation ;

- Conc: est la concentration en théophylline ou en caféine ;
- V : est le volume d'eau utilisé pour l'extraction solide-liquide ;
- m : est la masse de l'échantillon.

II.5. Préparation des échantillons

Après avoir confirmé que la théophylline et la caféine peuvent être dosées simultanément, la préparation des échantillons sous étude a été réalisée suivant le protocle décrit précédemment (I.4), en maintenant le temps d'extraction solide-liquide d'une heure. Les étapes importantes de préparation des échantillons sont résumées dans le schéma de la figure 7 du début jusqu'à l'analyse.

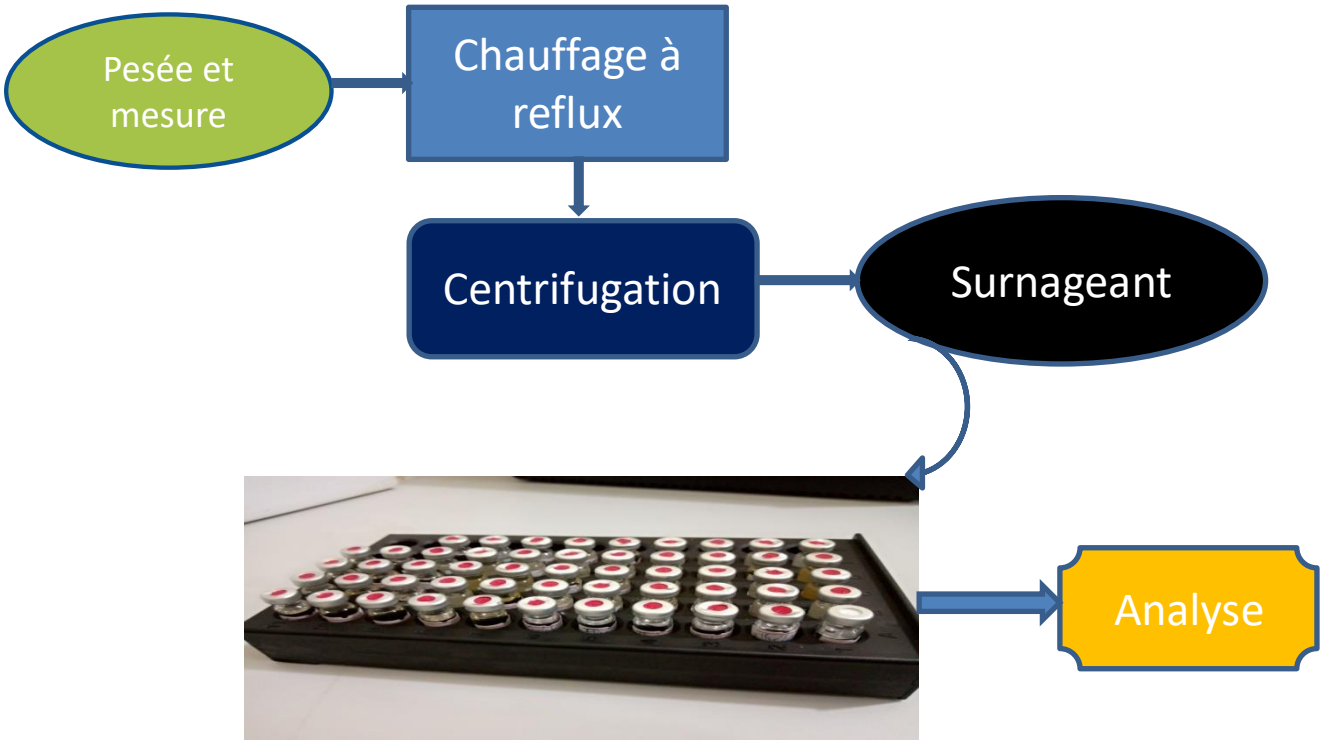


Figure 7: Les étapes de préparation des échantillons.

II.6. Préparation d'un échantillon de thé selon la méthode de l'OTB

La préparation d'un échantillon pour l'infusion de thé noir à boire a été réalisée en faisant bouillir l'eau de robinet juqu'à l'ébillution.Une masse équivalente à une cuillère à soupe de thé noir a été pesée et ajoutée à un volume de 250 ml (volume approximatif d'une tasse de thé à notre disposition) de cette eau bouillante contenu dans un erlenmeyer de 300 ml. Ce mélange réalisé a été couvert pendant trois minutes. La solution ainsi obtenue a été soumise à une dépigmentation afin de préserver la colonne. A partir du stade de centrifuguation, la préparation suit le même protocole décrit dans (II.4).

II.7. Analyse par la méthode de Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC)

Après avoir préparé tous les échantillons, ils ont été soumis à l'analyse. Cette dernière a été effectuée trois fois (trois séquences) tout en respectant les règles d'analyse HPLC.

II.8. Traitement statistique des résultats

Toutes les données ont été saisies à l'aide du Microsoft Excel 2010. Le traitement des résultats des échantillons a été réalisé avec le logiciel SPSS version 22. Une analyse de la variance (ANOVA) pour évaluer la significativité des résultats suivi d'un test de Duncan pour définir les groupes hommogènes ont été mis en œuvre.

Deux hypothèses ont été formulées pour cette analyse: l'hypothèse nulle (H0) et l'hypothèse alternative (H1)

- H0: la teneur en théophylline et/ou en caféine est la même dans tous les échantillons.
- H1: au moins un échantillon possède une teneur en théophylline et/ou en caféine différente des autres.

Selon la valeur statistique obtenue pour un échantillon considéré, une conclusion peut-être tirée. Si p-value < 0,05; H0 est rejetée et dans le cas contraire elle est maintenue. En cas de rejet de l'hypothèse nulle, le test de Duncan est nécessaire.

CHAPITRE III: PRESENTATION ET DISCUSSION DES RESULTATS

III.1. Présentation des résultats

Les teneurs moyennes en théophylline et en caféine pour les 41 échantillons de thé noir analysés ainsi que les résultats du test de Duncan sont présentés dans les tableaux VIII, IX , X et XI. Pour en faciliter la comparaison, l'évolution de la teneur en théophylline et en caféine des différents grades de thé noir analysés pour toutes les régions théicoles est montrée dans les figures 8-10.

III.1.1. Teneur moyenne en théophylline

Les résultats consignés dans les tableaux VIII et IX montrent les valeurs moyennes des teneurs en théophylline des différents grades de thé noir produit au Burundi. Y est aussi consignée dans ces tableaux, la p- value tenant compte des teneurs des différents grades d'une même région théicole et celle tenant compte d'un même grade de thé noir pris dans toutes les régions théicoles. Ces résultats montrent que le grade de thé noir PD de MABAYI possède la teneur (0,279±0,017%) en théophylline la plus élevée tandis que la plus faible (0,145±0,009%) étant celle du grade de thé noir PF1 de GISOZI. Une différence très significative est observée au sein des valeurs moyennes des différents grades de thé d'une même région. Egalement une différence significative est observée aux sein des valeurs moyennes de la teneur d'un même grade de thé dans toutes les régions théicoles. De façon générale, les valeurs de la teneur moyenne en théophylline des différents grades de thé en provenance des six régions théicoles sont dans l'ordre croissant:

- PF1 < FS < BP1 < PD < BMF < FS1 < D1 pour le thé produit à TORA, dont la teneur varie de 0,196±0,011% pour le grade PF1 à 0,216±0,002% pour le grade D1;
- BP1 < BMF < PF1 < D < D1 < PD < FS pour le thé de TEZA, la teneur varie de 0,204±0,005% pour le grade BP1 à 0,241±0,006% pour le grade FS;
- BP1 < D < D1 < PF1 < F1 < PD < BMF pour le thé d'IJENDA, dont la teneur varie de 0,189±0,001% pour le grade BP1 à 0,218±0,001% pour le grade BMF;
- BMF < PF1 < D1 < F1 < BP1 < FS < D < PD pour le thé de MABAYI dont la teneur varie de 0,170±0,002% pour le grade BMF à 0,279±0,017% pour le grade PD;
- BMF< PF1< F1< BP1< D1< PD pour le thé de RWEGURA dont la teneur varie de 0,174±0,003% pour le grade BMF à 0,238±0,014% pour le grade PD;
- PF1< F1< BP1< PD < D < D1 pour le thé de GISOZI, la teneur varie de 0,145±0,009% pour le grade PF1 à 0,177±0,004% pour le grade D1.

Tableau VIII: Valeurs moyennes de la teneur (en % m/m) en théophylline des différents grades de thés d'une même région.

Grade	TORA	TEZA	IJENDA	MABAYI	RWEGURA	GISOZI
PF1	0,196±0,011^{b}	0,207±0,003^{c}	0,205±0,007^{bc}	0,203±0,003^{d}	0,188±0,003^{c}	0,145±0,009^{c}
BP1	0,201±0,006^{b}	0,204±0,005^{c}	0,189±0,001^{d}	0,227±0,003^{d}	0,206±0,013^{b}	0,165±0,003^{ab}
PD	0,202±0,003^{ab}	0,230±0,011^{ab}	0,214±0,013^{ab}	0,279±0,017^{a}	0,238±0,014^{a}	0,169±0,009^{ab}
D1	0,216±0,002^{a}	0,220±0,002^{b}	0,204±0,003^{bc}	0,219±0,021^{cd}	0,233±0,004^{a}	0,177±0,004^{a}
D	-	0,220±0,011^{b}	0,199±0,003^{cd}	0,257±0,010^{b}	-	0,173±0,003^{ab}
F1	-	-	0,206±0,004^{bc}	0,220±0,007^{cd}	0,203±0,004^{b}	0,161±0,009^{b}
FS	0,198±0,003^{b}	0,241±0,006^{a}	-	0,231±0,002^{c}	-	-
FS1	*0,213±0,001*	-	-	-	-	-
BMF	0,212±0,006^{a}	0,205±0,001^{c}	0,218±0,001^{a}	0,170±0,002^{e}	0,174±0,003^{c}	-
P-Value$^{\phi}$	0,002	0,000	0,001	0,000	0,000	0,001

Le signe – indique que le grade n'est pas produit. $^{\phi}$ Désigne la p-value d'une analyse statistique des teneurs moyennes des grades d'une même région théicole; Dans une même colonne, les mêmes exposants pour les grades d'une même région indiquent que les teneurs en théophylline sont statistiquement identiques. *Pas de comparaison.

Tableau IX: Valeurs moyennes de la teneur (en % m/m) en théophylline d'un même grade de thé noir.

Grade	TORA	TEZA	IJENDA	MABAYI	RWEGURA	GISOZI	P-Value$^{\&}$
PF1	0,196±0,011^{a}	0,207±0,003^{a}	0,205±0,007^{a}	0,203±0,003^{a}	0,188±0,003^{b}	0,145±0,009^{c}	0,000
BP1	0,201±0,006^{b}	0,204±0,005^{b}	0,189±0,001^{c}	0,227±0,003^{a}	0,206±0,013^{b}	0,165±0,003^{d}	0,000
PD	0,202±0,003^{d}	0,230±0,011^{bc}	0,214±0,013^{cd}	0,279±0,017^{a}	0,238±0,014^{b}	0,169±0,009^{e}	0,000
D1	0,216±0,002^{ab}	0,220±0,002^{ab}	0,204±0,003^{b}	0,219±0,021^{ab}	0,233±0,004^{a}	0,177±0,004^{c}	0,000
D	-	0,220±0,011^{b}	0,199±0,003^{c}	0,257±0,010^{a}	-	0,173±0,003^{d}	0,000
F1	-	-	0,206±0,004^{b}	0,220±0,007^{a}	0,203±0,004^{b}	0,161±0,009^{c}	0,000
FS	0,198±0,003^{c}	0,241±0,006^{a}	-	0,231±0,002^{b}	-	-	0,000
FS1	*0,213±0,001*	-	-	-	-	-	-
BMF	0,212±0,006^{a}	0,205±0,001^{b}	0,218±0,001^{a}	0,170±0,002^{c}	0,174±0,003^{c}	-	0,000

Le signe – indique que le grade n'est pas produit. $^{\&}$Désigne la p-value d'une analyse statistique des teneurs moyennes d'un même grade dans toutes les régions théicoles. Dans une même ligne, les mêmes exposants pour les grades dans toutes les régions indiquent que les teneurs en théophylline sont statistiquement identiques. *Pas de comparaison.

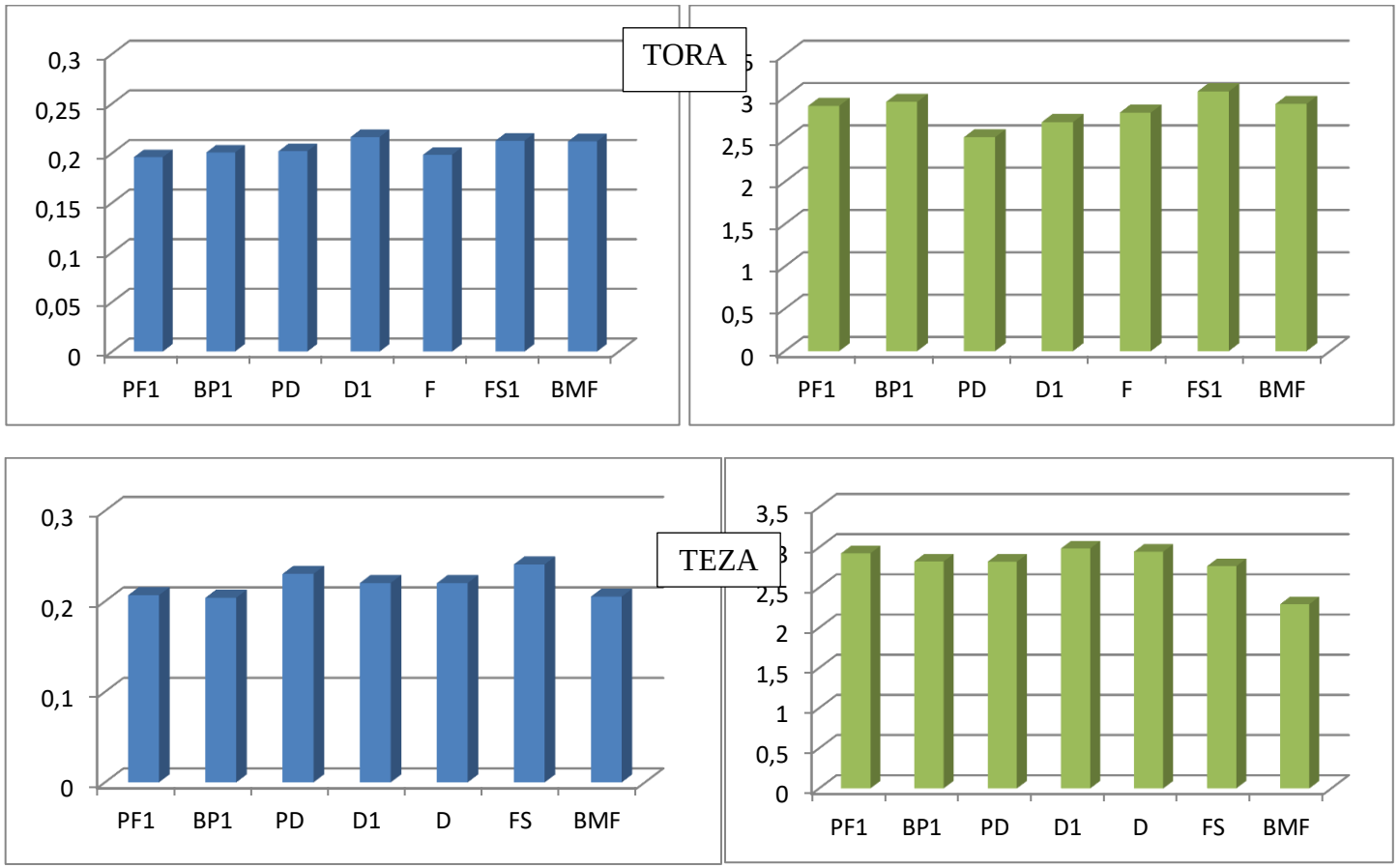


Figure 8: Evolution de la teneur en théophilline (bleue) et en caféine (verte) des différents grades de thé en provenance de TORA et TEZA.

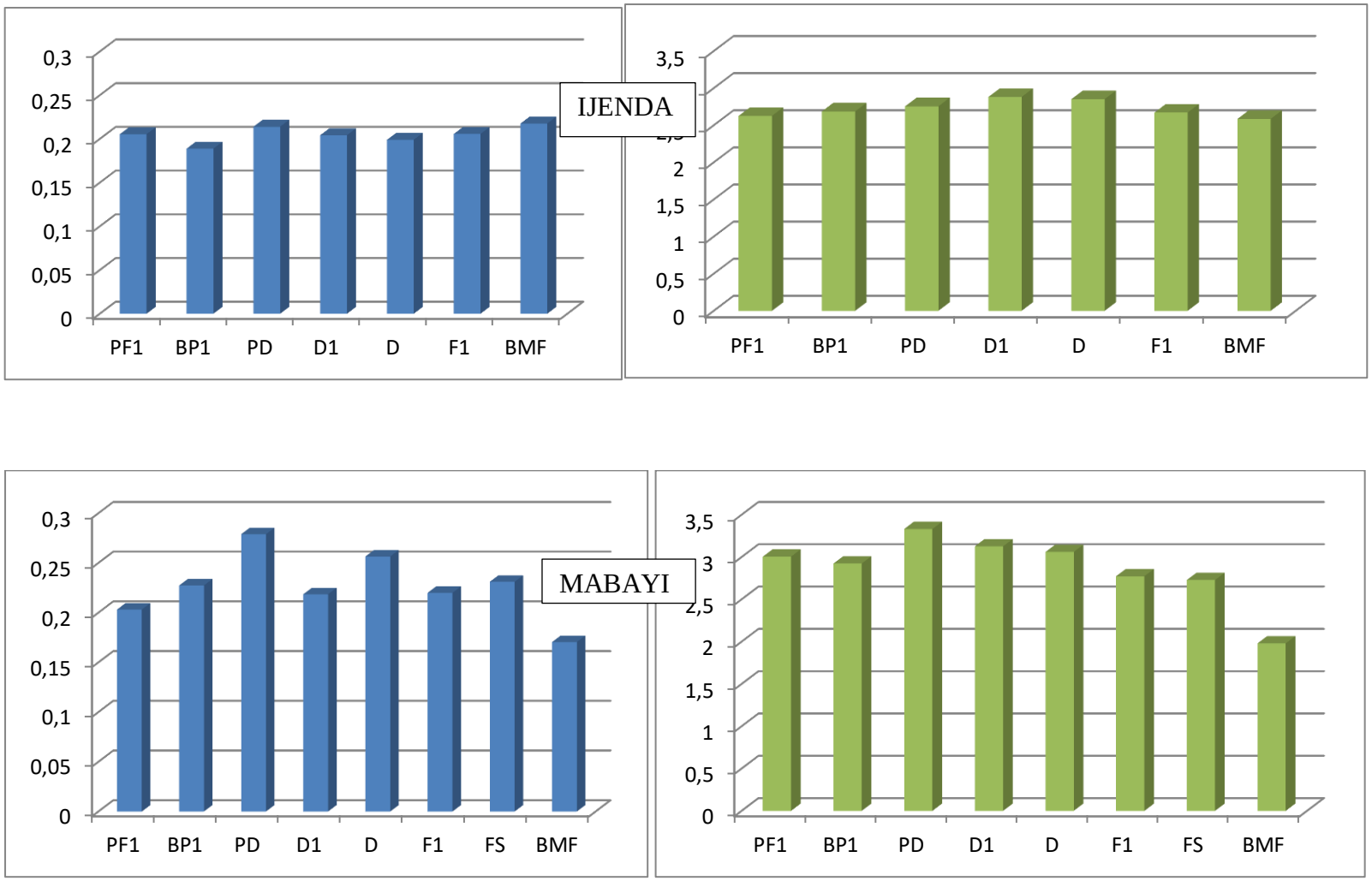


Figure 9: Evolution de la teneur en théophilline (bleue) et en caféine (verte) des différents grades de thé en provenance d'IJENDA et MABAYI.

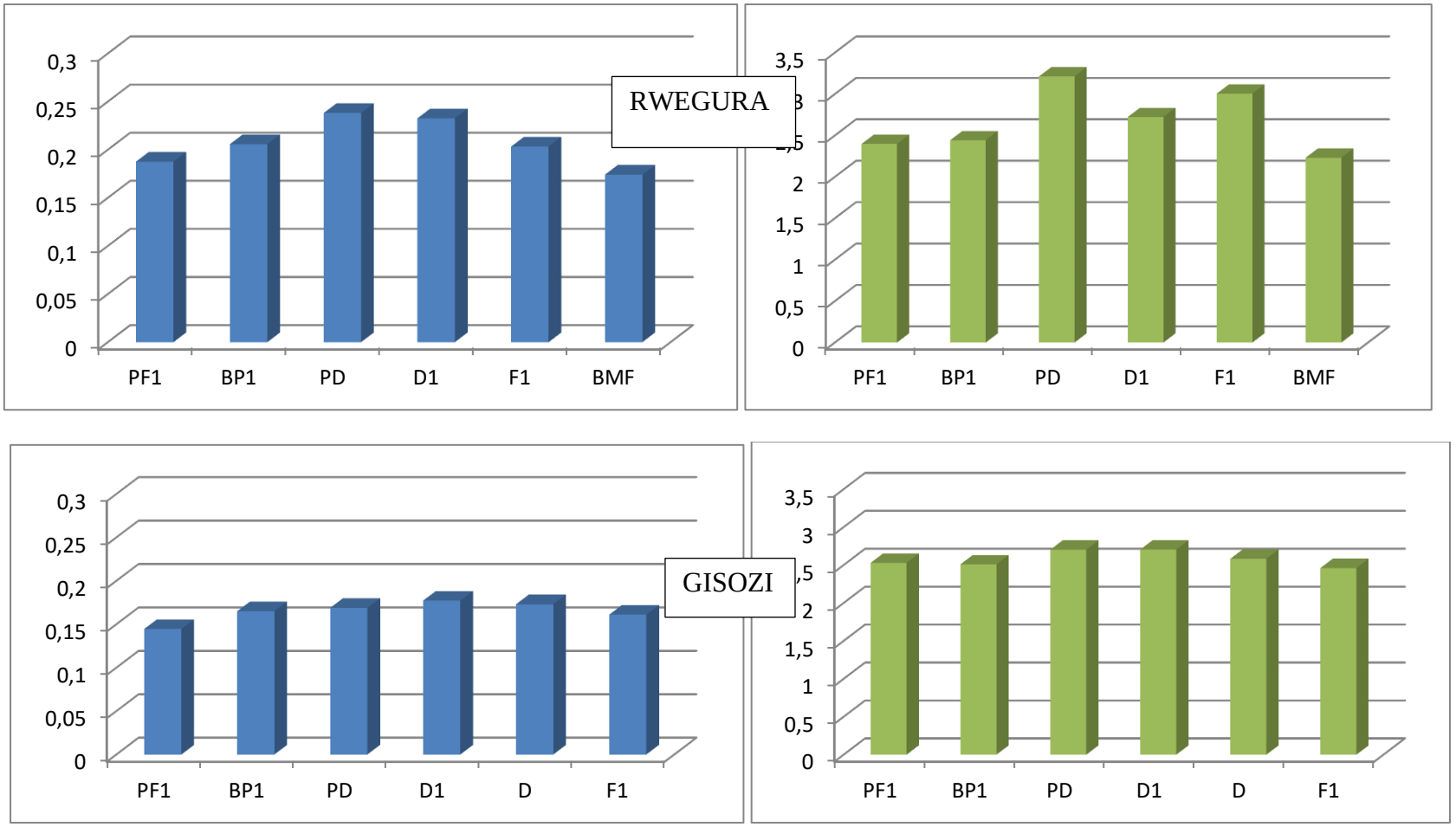


Figure 10: Evolution de la teneur en théophilline (bleue) et en caféine (verte) des différents grades de thé de RWEGURA et GISOZI.

L'analyse des résultats sur la théophylline dans leur globalité est résumée dans la figure 11. On peut en déduire que les grades de première ligne dits sans fibres, qui se retrouvent dans toutes les régions théicoles sont en général riches en théophylline. On remarque aussi que seul le grade BMF parmis ceux de deuxième ligne dits avec fibres, qu'on retrouve également dans toutes les régions théicoles est aussi riche en théophylline.

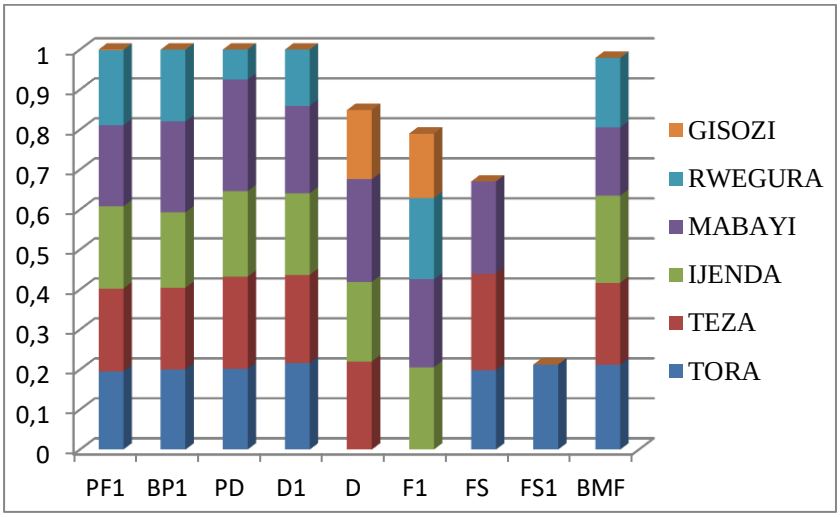


Figure 11: Comparaison de la teneur en théophylline des grades analysés.

Le résultat de l'analyse de la variance (tableau VIII) a montré que la valeur de p-value est partout très inférieure à 0,05; ce qui permet de conclure que la teneur en théophylline des différents grades d'une même région est statistiquement différente. Cependant, le test de Duncan montre que les grades PD et D1 ont des teneurs statistiquement identiques dans toutes les régions théicoles sauf à MABAYI.

Concernant le même grade de thé noir analysé (tableau IX) considéré dans toutes les régions théicoles, les résultats de l'analyse statistique montrent que pour tous les grades de thé noir analysés, la valeur de p-value est inférieure à 0,05, donc une différence très significative. Ceci permet de conclure aussi que dans les six régions théicoles, la teneur en théophylline d'un même grade est statistiquement différente. Le test de Duncan montre que le grade D1 possède des teneurs statistiquement identiques dans toutes les régions théicoles excepté à GISOZI. Pour le grade PF1, les teneurs sont statistiquement identiques, sauf à RWEGURA et GISOZI.

III.1.2. Teneur moyenne en caféine

Les valeurs moyennes des teneurs en caféine des différents grades de thé noir produits au Burundi sont repris dans les tableaux X et XI. La p-value tenant compte des teneurs des différents grades de thé noir d'une même région théicole et celle tenant compte d'un même grade de thé noir pris dans toutes les régions théicoles y sont aussi consignées. L'analyse de ces résultats révèle que le thé noir de grade PD de MABAYI présente la teneur en caféine (3,331±0,055%) la plus élevée comparativement aux autres grades de thé noir analysés en provenance de toutes les régions théicoles, la plus faible teneur (1,979±0,015 %) étant observée dans cette même région pour le grade BMF.

En général, selon ces résultats, les valeurs de la teneur moyenne en caféine des différents grades de thé noir en provenance des six régions théicoles augmentent dans l'ordre :

- PF1< FS< BP1 < PD < BMF< FS1< D1 dans région théicole de TORA, ou la teneur varie de 0,196±0,011% pour le grade PF1 à 0,216±0,002% pour le grade D1;
- BP1< BMF< PF1 < D < D1 < PD < FS dans région théicole de TEZA ou la teneur varie 0,204±0,005% pour le grade BP1 à 0,241±0,006% pour le grade FS;
- BP1< D < D1< PF1< F1< PD < BMF pour les echantillons d'IJENDA dont la teneur varie de 0,189±0,001% pour le grade BP1 à 0,218±0,001% pour le grade BM;
- BMF< PF1< D1< F1< BP1< FS < D < PD pour le thé de MABAYI dont la teneur varie entre 0,170±0,002% pour le grade BMF et 0,279±0,017% pour le grade PD;
- BMF< PF1< F1< BP1< D1< PD pour le thé de RWEGURA dont la teneur varie entre 0,174±0,003% pour le grade BMF et 0,238±0,014% pour le grade PD;
- PF1< F1< BP1< PD < D < D1 pour le thé de GISOZI dont la teneur varie entre 0,145±0,009% pour le grade PF1 et 0,177±0,004% pour le grade D1.

La figure 12 résume l'analyse de ces résultats sur la caféine. Il apparaît clairement que les grades PD et D1 sont très riches en caféine et que, comparativement aux grades de thé avec fibres, les grades de thé sans fibres qui sont par ailleurs produits dans toutes les régions théicoles sont plus riches en caféine.

Tableau X: Valeurs moyennes de la teneur (en % m/m) en caféine des différents grades d'une même région.

Grade	TORA	TEZA	IJENDA	MABAYI	RWEGURA	GISOZI
PF1	2,898±0,022^{c}	2,926±0,012^{ab}	2,627±0,018^{d}	3,004±0,026^{d}	2,397±0,017^{e}	2,528±0,021^{bc}
BP1	2,944±0,020^{b}	2,825±0,031^{bc}	2,687±0,018^{c}	2,923±0,039^{e}	2,443±0,023^{d}	2,509±0,021^{c}
PD	2,527±0,018^{f}	2,822±0,024^{bc}	2,756±0,021^{b}	3,331±0,055^{a}	3,213±0,034^{a}	2,703±0,023^{a}
D1	2,706±0,018^{e}	2,987±0,025^{a}	2,881±0,016a	3,126±0,015^{b}	2,724±0,019^{c}	2,705±0,021^{a}
D	-	2,947±0,152^{a}	2,853±0,015^{a}	3,059±0,017^{c}	-	2,583±0,030^{b}
F1	-	-	2,672±0,019^{c}	2,774±0,026^{f}	3,006±0,020^{b}	2,460±0,014^{d}
FS	2,817±0,018^{d}	2,766±0,015^{c}	-	2,729±0,016^{f}	-	-
FS1	*3,068±0,021*	-	-	-	-	-
BMF	2,921±0,018^{bc}	2,293±0,023^{d}	2,586±0,023^{e}	1,979±0,015^{g}	2,232±0,018^{f}	-
P-Value $^{\phi}$	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000

Le signe – indique que le grade n'est pas produit. $^{\phi}$ Désigne la p-value d'une analyse statistique des teneurs moyennes des grades d'une même région théicole; Dans une même colonne, les mêmes exposants pour les grades d'une même région indiquent que les teneurs en caféine sont statistiquement identiques. *Pas de comparaison.

Tableau XI: Valeurs moyennes de la teneur (en % m/m) en caféine d'un même grade de thé noir.

Grade	TORA	TEZA	IJENDA	MABAYI	RWEGURA	GISOZI	P-Value $^{\&}$
PF1	2,898±0,022^{b}	2,926±0,012^{b}	2,627±0,018^{c}	3,004±0,026^{a}	2,397±0,017^{e}	2,528±0,021^{d}	0,000
BP1	2,944±0,020^{a}	2,825±0,031^{b}	2,687±0,018^{c}	2,923±0,039^{a}	2,443±0,023^{e}	2,509±0,021^{d}	0,000
PD	2,527±0,018^{e}	2,822±0,024^{c}	2,756±0,021^{d}	3,331±0,055^{a}	3,213±0,034^{b}	2,703±0,023^{d}	0,000
D1	2,706±0,018^{d}	2,987±0,025^{b}	2,881±0,016^{c}	3,126±0,015^{a}	2,724±0,019^{d}	2,705±0,021^{d}	0,000
D	-	2,947±0,152^{ab}	2,853±0,015^{b}	3,059±0,017^{a}	-	2,583±0,030^{c}	0,000
F1	-	-	2,672±0,019^{c}	2,774±0,026^{b}	3,006±0,020^{a}	2,460±0,014^{d}	0,000
FS	2,817±0,018^{a}	2,766±0,015^{b}	-	2,729±0,016^{c}	-	-	0,002
FS1	*3,068±0,021*	-	-	-	-	-	-
BMF	2,921±0,018^{a}	2,293±0,023^{c}	2,586±0,023^{b}	1,979±0,015^{e}	2,232±0,018^{d}	-	0,000

Le signe – indique que le grade n'est pas produit. $^{\&}$Désigne la p-value d'une analyse statistique des teneurs moyennes d'un même grade dans toutes les régions théicoles. Dans une même ligne, les mêmes exposants pour les grades dans toutes les régions indiquent que les teneurs en caféine sont statistiquement identiques. *Pas de comparaison.

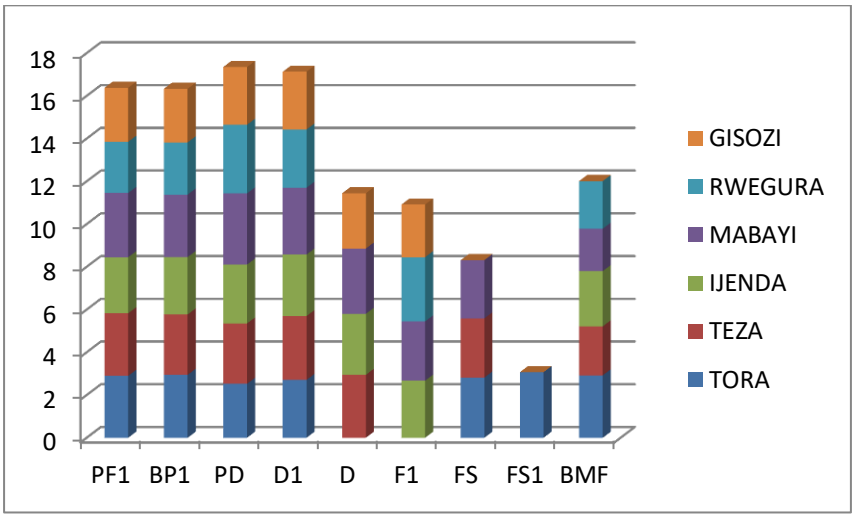


Figure 12: Comparaison de la teneur en caféine par grade de thé analysé.

Les résultats du tableau X sur l'analyse de la variance montrent un p-value qui est partout très inférieur à 0,05, ce qui signifie que la teneur en caféine dans tous les grades d'une même région est statistiquement différente. Néanmoins, le test de Duncan montre que les grades BP1 et PF1 ont des teneurs statistiquement identiques, exclusivement dans les régions théicoles de TEZA et GISOZI.

Pour un même grade de thé, les résultats ont une valeur de p-value inférieure à 0,05. Cela signifie que la teneur en caféine du même grade dans toutes les régions theicoles est statistiquement différente. Le test de Duncan montre certaines teneurs statistiquement identiques comme pour les grades PF1, BP1, PD, D1 et D respectivement dans les régions TORA et TEZA, TORA et MABAYI, IJENDA et GISOZI, TORA, RWEGURA et GISOZI et enfin TEZA et IJENDA.

III.1.3. Teneur en théophylline et caféine d'une infusion de thé

En vue d'évaluer la quantité de chacune des deux molécules dans une tasse de thé, les échantillons PD de MABAYI et PF1 de GISOZI ont été choisis pour leurs teneurs en théophylline la plus élevée dans le premier cas, et la plus faible dans le second. Les valeurs des teneurs en théophylline et en caféine pour les deux échantillons sont consignées dans le tableau XII. Le tableau XIII en compare les valeurs moyennes issues du protocole OTB et celles des solutions issues du chauffage à reflux.

Tableau XII : Valeurs de la teneur (% m/m) en théophylline et en caféine des infusions de 250 ml de thé préparées suivant le protocole OTB.*

		Théophylline		Caféine	
Echantillon	M(g) [a]	Conc. (mg/l) [b]	Teneur	Conc. (mg/l) [b]	Teneur
PD MABAYI	3,88074	47,711	0,307	236,859	3,052
	3,88074	46,403	0,299	234,172	3,017
	3,88074	49,020	0,316	235,515	3,034
PF1 GISOZI	3,31152	27,879	0,211	154,530	2,333
	3,31152	27,370	0,207	154,640	2,335
	3,31152	28,388	0,214	154,580	2,334

* VoirAnnexe 3, [a] Masse de l'échantillon; [b] Concentration (mg/l).

Tableau XIII: Valeur moyenne de la teneur (% m/m) en théophylline et en caféine déterminée à partir de l'infusion de thé selon le protocole OTB.*

Echantillon	Théophylline	Caféine
PD MABAYI	0,307±0,008 *(0,279±0,017)*[a]	3,034±0,017 *(3,331±0,055)*[b]
PF1 GISOZI	0,211±0,004 *(0,145±0,009)*[a]	2,334±0,001 *(2,528±0,021)*[b]

* VoirAnnexe3, [a]Tableau VIII et [b] Tableau X.

Tableau XIV: Concentrations (mg/l) en théophylline et en caféine des infusions de thé préparées suivant le protocole OTB et leur quantité (masse en mg) dans une tasse de 250 ml.

	Théophylline		Caféine	
Echantillon	Conc (mg/l)	Masse (mg)	conc (mg/l)	Masse (mg/)
PD MABAYI	47,711	11,928	235,515	58,879
PF1 GISOZI	27,879	6,970	154,583	38,646

Pour la théophylline, les résultats des tableaux XII et XIII montrent des valeurs de la teneur plus élevées pour l'infusion de thé préparée selon le protocole OTB que pour les solutions issues du chauffage à reflux. Par contre, les valeurs de la teneur en caféine sont plus élevées pour les solutions issues du chauffage à reflux.

III.2. Discussion des résultats

La figure 5 montre une très bonne linéarité des droites d'étalonnage, et donc une très bonne corrélation entre l'aire du pic et la concentration des solutions étalons avec R= 0,99996 et R=0,99998 respectivement pour la théophylline et la caféine. Dans une étude (Mourya et al., 2019), il a été montré que le temps d'extraction maximale de la caféine par l'eau est d'une heure. Les résultats du test de l'extraction de la théophylline ont donné des teneurs de 0,27 0%; 0,272% et 0,282% (respectivement) pour 30,45 et 60 minutes d'extraction. Ce résultat a montré que les deux xanthines peuvent être extraites et dosées simultanément. Par ailleurs, les études (de Sena *et al*., 2011; Horžić *et al*., 2009), avaient aussi montré que les deux xanthines sont dosées simultanément par Chromatographie Liquide Haute Performance afin de déterminer leur teneur et cette méthode a été choisie comme mieux adaptée.

III.2.1. Théophylline

Le niveau de théophylline dans le thé noir produit au Burundi n'avait jamais fait objet d'une quelconque étude alors que cette molécule présente divers effets positifs sur la santé humaine.
Les résultats des tableaux VIII et IX montrent que la teneur moyenne en théophylline des différents grades de thé noir produits dans toutes les régions théicoles du pays varie entre 0,145% et 0,279%. L'analyse de la variance a révelé des différences très significatives entre les teneurs des grades de thé d'une même région. Ces résultats confirment la première hypothèse de ce travail selon laquelle la teneur en théophylline est différente dans les différents grades de thé noir d'une même région.
L'analyse de la variance a également révelé des différences très significatives entre les teneurs d'un même grade de thé considéré dans toutes les régions théicoles, un résultat qui confirme la deuxième hypothèse de cette étude selon laquelle la teneur en théophylline d'un même grade de thé noir diffère d'une région à une autre. Les tableaux VIII et IX ainsi que les figures 8 à 10 montrent que les teneurs en théophylline des différents grades de thé produits par OTB sont plus élevées comparativement à celles des produits de PROTHEM. L'analyse de la variance a aussi montré des différences significatives entre les teneurs des grades de thé de l'OTB comparés à ceux de PROTHEM. Ceci vient confirmer la troisième hypothèse de la présente étude selon laquelle la teneur en théophylline des produits des deux entreprises diffère.

Le niveau de théophylline du thé noir produit au Burundi (0,145% à 0,279%) révélé par cette étude est relativement plus élevé, comparativement aux données disponibles dans la littérature

scientifique. En effet, la théophylline est présente dans le thé noir (Camellia sinensis) à des niveaux très faibles; les valeurs citées dans la littérature varient considérablement, mais la fourchette la plus fiable est de 0,02-0,04% du poids sec (Jalal & Collin, 1976 ; Graham, 1984a).

Une autre étude réalisée sur différents types de thé en Corée du sud avait aussi révélé une très faible teneur moyenne en théophylline de 24,8 mg/kg soit 0,00248% (Baek et al., 2022). Très récemment, Szymański et ses coauteurs ont rapporté des valeurs de teneur moyenne en théophylline de 0,2331% (soit 2,331 mg/g), 0,0712% (soit 0,712 mg/g) et de 0,0109% (soit 0,109 mg/g) respectivement pour des échantillons de thé noir en provenance du Kenya, de Sri-Lanka et de Chine (Szymański *et al*., 2022). Les résultats du présent travail (0,145% à 0,279%) ne s'éloignent pas beaucoup de la teneur en théophylline (0,2331%) du thé noir cultivé au Kenya (Szymański *et al*., 2022).

Les résultats des tableaux XIII-XIV montrent que la teneur en théophylline du thé noir produit au Burundi se situe entre 0,145% et 0,279%. Les mêmes résultats montrent qu'en utilisant la solution issue du protocole OTB, la teneur en théophylline du thé noir de ce pays se situe entre 0,211% et 0,307%. Ce résultat signifie que la teneur en théophylline, déterminée via des solutions issues du protocole OTB est plus élevée que celle qui est déterminée, pour les mêmes échantillons, via des solutions issues du chauffage à reflux (voir méthode ISO). Cette différence pourrait probablement être expliquée par l'usage de l'eau du robinet pour la solution obtenue par la méthode OTB, à la place de l'eau distillée utilisée dans la méthode ISO. En effet, selon la littérature, l'extraction des alcaloïdes est basée sur la différence de leur solubilité en milieu acide (ou basique) d'une part, ou de la nature du solvant d'autre part: ils peuvent être sous forme de bases ou de sels en fonction du pH (Bruneton, 2009). L'analyse des résultats du tableau XIV a révélé que la quantité de théophylline par tasse (de 250 ml) d'infusion de thé (préparé suivant le protocole OTB) varie entre 6,970 mg et 11,928 mg. Ces quantités sont très faibles comparativement à la quantité de théophylline nécessaire pour un traitement médical établie par le guide de posologie médicale. En effet, la quantité journalière efficace de théophylline est de 13mg/kg/24h pour un adulte et à 24mg/kg/24h pour un enfant (Matte *et al*., 1982). Un calcul simple basé sur les résultats de ce travail montre qu'un homme adulte (70kg) qui devrait prendre 910mg par jour (soit 13mg/kg) consommerait entre 130 tasses (~32,5 litres) et 76 tasses (~19 litres) d'infusion de thé noir. Un enfant (15kg) pour lequel le même guide recommande 360mg par jour (24h) prendrait entre 51 (~12 litres) à 30 tasses (~7,5 litres) de thé noir. Bien que le niveau de théophylline dans le thé noir produit au

Burundi semble plus élevé que celui rapporté dans la littérature pour le thé noir d'ailleurs, cette quantité hypothétique d'infusion qu'il faudrait apporter à l'organisme à des fins thérapeutiques suggère que l'effet de la théophylline contenue dans une tasse de thé noir est très négligeable.

Le coût élevé des analyses et le temps matériel n'ont pas permis de pousser plus loin l'analyse de l'infusion de thé, afin de pouvoir expliquer pourquoi l'infusion de thé préparée selon le protole OTB (Annexe 3) contient plus de théophilline que la solution issue du chauffage à reflux. Bien que la présente étude donne une information sur la teneur en theophilline du thé noir produit au Burundi, les conditions de travail n'ont pas permis d'en étudier sa variabilité en fonction de la saison de cueillette.

III.2.2. Caféine

Cette étude est une deuxième du genre sur la quantification de la caféine du thé noir produit au Burundi. Elle a été effectuée sur des échantillons de thé noir produits pendant la saison sèche et vient donc compléter la première qui, avait concerné des échantillons produits en saison pluvieuse, et qui a montré que la teneur en caféine du thé noir produit par l'OTB varie de 1,675 à 2,549% (Cishahayo, 2022).

Les résultats des tableaux X et XI montrent que la teneur moyenne en caféine des différents grades de thé noir produits dans notre pays durant la période (Juin à Août) varie entre 1,979 et 3,331%. Des différences très significatives ont été révélées par l'analyse de la variance entre les teneurs des grades de thé d'une même région. Ces résultats confirment l'hypothèse selon laquelle la teneur en caféine des différents grades de thé noir d'une même région est différente. L'analyse de la variance entre les teneurs d'un même grade de thé pris dans toutes les régions théicoles a révelé également des différences très significatives, confirmant aussi l'hypothèse de cette étude selon laquelle, la teneur en caféine d'un même grade de thé noir est différente dans toutes les régions théicoles. Les teneurs en caféine des différents grades de thé noir produits par l'OTB et PROTHEM sont repris dans les tableaux X et XI et leurs évolutions dans les figures 8 à 10 montrent qu'elles sont plus élevées dans le premier cas comparativement au second. L'analyse de la variance a montré des différences aussi significatives en comparant les teneurs des grades du thé noir de l'OTB avec ceux de PROTHEM. Ceci conduit enfin à la confirmation d'une dernière hypothèse de ce travail selon laquelle la teneur en caféine diffère d'une entreprise à l'autre.

Le niveau de caféine du thé noir Burundais (1,979 et 3,331%) issu de cette étude est un peu plus élevé que celui (1,675 à 2,549%) rapporté précédemment sur les différents grades de thé noir produits en saison pluvieuse (Cishahayo, 2022). La période de cueillette et la méthode d'analyse ayant été rapportées parmi les facteurs influençant la variation de la teneur du thé en xanthines (Turkmen & Velioglu, 2007), la différence entre les valeurs rapportées sur les échantillons de la saison pluvieuse et celles du présent travail avec des échantillons de thé noir de différents grades de thé produits en saison sèche ne peut être attribuée à la méthode d'analyse que partiellement. En effet, la spectroscopie UV-Visible utilisée (Cishahayo, 2022) étant moins performante que la méthode HPLC (Hicks *et al.*, 1996; López-Martínez *et al*., 2003) exploitée dans la présente étude, le plus haut niveau de caféine ne pourrait être attribué qu'en partie à la méthode d'analyse, en attendant la mise en évidence de l'influence de la période de la cueillette. Les résultats de ce travail sont en accord avec ceux disponibles dans la littérature sur la teneur en caféine dans le thé noir produit ailleurs dans le monde. En effet, l'analyse de la même substance sur le thé noir consommé en Espagne, a par exemple révélé des valeurs de la teneur comprise entre 18 et 30 mg/g, soit1,8-3% (Sanchez, 2017). Une teneur en caféine se situant entre 1,753 et 3,49% de poids sec selon Zareef et ses collaborateurs, ayant aussi été déterminée pour différents échantillons (90) de thé noir pour la quantification de la caféine (Zareef *et al*., 2020). La teneur (22-28 mg/g soit 2,2-2,8% de matière sèche) en caféine des thés noirs en sachets achetés dans les supermarchés du Royaume-Uni ayant aussi été rapportée (Khokhar & Magnusdottir, 2002).

D'après les résultats des tableaux XIII-XIV, la teneur en caféine des différents grades de thé déterminée par la méthode ISO se situe entre 2,528% et 3,331%. Les résultats montrent qu'en utilisant la solution issue du protocole OTB, la teneur en caféine de ces mêmes grades de thé se situe entre 2,334% et 3,034%. Des valeurs de teneur moyenne en caféine de 3,3% (soit 33 mg/g), 3% (soit 30 mg/g) et de 2,37% (soit 23,7 mg/g) respectivement ont été rapportées dans une très récente étude sur des échantillons de thé noir en provenance du Kenya, de Sri-Lanka et de Chine (Szymański *et al*., 2022). Les valeurs de la teneur en caféine issues de cette étude (1,979 et 3,331%) ne s'éloignent pas de la teneur en caféine (3,3%) d'un échantillon de thé noir cultivé au Kenya (Szymański *et al*., 2022).

La quantité de caféine calculée varie entre 38,646 mg et 58,879mg par tasse de 250 ml selon le grade de thé, suivant les résultats du tableau XIV. D'après les résultats d'une étude publiée (Khokhar & Magnusdottir, 2002) sur des échantillons de thé noir en sachets achetés dans le supermarché au Royaume-Uni, il faut 92 et 146 mg/jour pour une prise de trois tasses de thé noir.

Cela signifie qu'il faudrait consommer entre 2,5 à 3,5 tasses en cas du premier grade et 1,5 à 2,5 tasses du second grade de thé noir Burundais pour maintenir le corps humain en bonne santé.

Comme pour la théophilline, le coût élevé des analyses par HPLC et le temps matériel ont limité notre recherche poussée vu que cette étude vient compléter une première sur une période de l'année. L'analyse de la teneur en caféine sur des échantillons de thé noir produits sur les autres périodes de l'année aurait donné une information plus ou moins complète sur la quantité de caféine dans le thé noir produit dans notre pays.

CONCLUSION GENERALE ET SUGGESTIONS

Le présent travail a été initié dans le but de contribuer à la détermination de la teneur en théophylline et en caféine des différents grades de thé noir produits au Burundi et d'en faire une comparaison, d'une part au niveau des régions théicoles, d'autre part au sein des grades.

Les résultats sur 41 échantillons de différents grades de thé noir produit au Burundi ont fait objet d'une analyse par Chromatographie Liquide Haute Performance, après une extraction liquide-liquide. Les résultats ont montré que le niveau de théophylline se situe entre 0,145% à 0,279% et celui de la caféine entre 1,979 et 3,331%. Ces mêmes résultats sur la teneur en théophylline et en caféine entre les différents grades de thé noir d'une même région théicole et d'un même grade de thé noir pris dans toutes les régions ont montré une différence très significative. Les grades de première ligne (sans fibres) ont une teneur élevée en théophylline et en caféine comparés à ceux de deuxième ligne (avec fibres). L'analyse des teneurs en ces substances a révélé qu'elles varient d'un fabricant à l'autre.

En ce qui est de l'infusion du thé noir analysée, les teneurs en théophylline et en caféine se comportement différemment par rapport à celles issues de la solution obtenue par chauffage à reflux. Celles de théophylline sont un peu supérieures dans l'infusion que dans la solution issue du chauffage à reflux tandis que celles de la caféine sont inférieures. Ces résultats ont montré que la teneur en caféine augmente avec le temps d'extraction.
La consommation des infusions de thé par rapport à la quantité en théophylline et en caféine doit être une précaution à prendre selon les critères d'âge, l'état de santé du consommateur afin de moduler la consommation.

Le thé étant une boisson très consommée et ayant des vertus pour la santé, nous suggérons:

- A la Direction de la Recherche et de l'innovation de l'Université du Burundi, en collaboration avec les entreprises de production du thé noir Burundais, de conjuguer les efforts pour trouver un financement efficace du projet de recherche sur le thé noir Burundais afin de pousser plus loin la recherche sur les différents constituants bioactifs de cette boisson;
- Aux autres chercheurs, de compléter ce travail, notamment en faisant une étude plus étendue sur toute la période de l'année afin de concrétiser sur la teneur en théophylline et en caféine dans sa globalité; de déterminer d'autres substances potentielles du thé

noir produit au Burundi comme les polyphénols, la théobromine, la théanine ayant des effets très réputés sur la santé.

- Aux entreprises OTB et PROTHEM, de faire l'étiquetage des produits commercialisés afin d'informer les consommateurs du thé noir produit au Burundi par rapport à la teneur en ces deux molécules, vue leur variabilité en fonction des différents paramètres, et les effets indésirables qu'elles peuvent entrainer en cas de surdose.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Ashihara, H., Sano, H., & Crozier, A. (2008). Caffeine and related purine alkaloids : Biosynthesis, catabolism, function and genetic engineering. *Phytochemistry*, *69*(4), 841-856. https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2007.10.029

2. Baek, G.-H., Yang, S.-W., Yun, C.-I., Lee, J.-G., & Kim, Y.-J. (2022). Determination of methylxanthine contents and risk characterisation for various types of tea in Korea. *Food Control*, *132*, 108543. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108543

3. Balentine, D. A., Wiseman, S. A., & Bouwens, L. C. M. (1997). The chemistry of tea flavonoids. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *37*(8), 693-704. https://doi.org/10.1080/10408399709527797

4. Barone, J. J., & Roberts, H. R. (1996). Caffeine consumption. *Food and Chemical Toxicology*, *34*(1), 119-129. https://doi.org/10.1016/0278-6915(95)00093-3

5. Belayneh, A., & Molla, F. (2020). The Effect of Coffee on Pharmacokinetic Properties of Drugs : A Review. *BioMed Research International*, *2020*, 1-11. https://doi.org/10.1155/2020/7909703

6. Bitama, P. (2021). *Le Rôle du théier dans les petites exploitations familiales au Burundi : Cas des complexes théicoles de Teza et d'Ijenda* [Thèse]. Université de Liège.

7. Bruneton, J. (2009). *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales* (4e éd.). 75008 Paris.

8. Cabrera, C., Giménez, R., & López, M. C. (2003). Determination of Tea Components with Antioxidant Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *51*(15), 4427-4435. https://doi.org/10.1021/jf0300801

9. Caffin, N., D'Arcy, B., Yao, L., & Rintoul, G. (2004). *Developing an index of quality for Australian tea*.

10. Chaturvedula, V. S. P., & Prakash, I. (s. d.). *The aroma, taste, color and bioactive constituents of tea.*

11. Chung, F.-L., Schwartz, J., Herzog, C. R., & Yang, Y.-M. (2003). Tea and Cancer Prevention : Studies in Animals and Humans. *The Journal of Nutrition*, *133*(10), 3268S-3274S. https://doi.org/10.1093/jn/133.10.3268S

12. Cishahayo, P. (2022). Détermination de la teneur en caféine des catégories de thé noir produites au Burundi.Université du Burundi, Bujumbura.

13. Das, S., Samanta, T., & Datta, A. K. (2019). Analysis and modeling of major polyphenols during oxidation in production of black tea. *Journal of Food Processing and Preservation*, *43*(12). https://doi.org/10.1111/jfpp.14283

14. Deb, S., & Jolvis Pou, K. R. (2016). A review of withering in the processing of black tea. *Journal of Biosystems Engineering*, *41*(4), 365-372.

15. de Sena, A. R., de Assis, S. A., & Branco, A. (2011). *Analysis of Theobromine and Related Compounds by Reversed Phase High-Performance Liquid Chromatography with Ultraviolet Detection : An Update (1992–2011)*.

16. Dubuis, E., Wortley, M. A., Grace, M. S., Maher, S. A., Adcock, J. J., Birrell, M. A., & Belvisi, M. G. (2014). Theophylline inhibits the cough reflex through a novel mechanism of action. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *133*(6), 1588-1598. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2013.11.017

17. Dutta, P. (2017, septembre 11). *WHO Encourages Tea Drinking for a New Generation*. World Tea News. https://www.worldteanews.com/Features/who-encourages-tea-drinking-new-generation

18. FAO. (2016). *Analyse des incitations par les prix pour le thé au Burundi,par Emera, W, Ntengeyabandi, A. et Ghins, L.Série de note techniques, SAPAA, Rome*.

19. Fernández, P. L., Pablos, F., Martín, M. J., & González, A. G. (2002). Study of Catechin and Xanthine Tea Profiles as Geographical Tracers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *50*(7), 1833-1839. https://doi.org/10.1021/jf0114435

20. Fridja, M., & Zitouni, M. (2021). *Effet santé des polyphénols du thé* [Thesis]. http://dspace.univ-tlemcen.dz/handle/112/dspace.univ-tlemcen.dz/handle/112/16562

21. Friedman, M., Levin, C. E., Choi, S.-H., Lee, S.-U., & Kozukue, N. (2009). Changes in the Composition of Raw Tea Leaves from the Korean Yabukida Plant during High-Temperature Processing to Pan-Fried Kamairi-Cha Green Tea. *Journal of Food Science*, *74*(5), C406-C412. https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2009.01185.x

22. Gouni-Berthold, I., & Sachinidis, A. (2004). Molecular Mechanisms Explaining the Preventive Effects of Catechins On the Development of Proliferative Diseases. *Current Pharmaceutical Design*, *10*(11), 1261-1271. https://doi.org/10.2174/1381612043452578

23. Graham, H. N. (1992). Green tea composition, consumption, and polyphenol chemistry. *Preventive Medicine*, *21*(3), 334-350. https://doi.org/10.1016/0091-7435(92)90041-F

24. Graham, H.N. (1984a). *Tea : The plant and its manufacture; chemistry and consumption of the beverage. In : Spiller, G.A., ed., The Methylxanthine Beverages and Foods : Chemistry, Consumption and Health Effects, New York, Alan R. Liss, pp. 29–74)*.

25. Gramza-Michalowska, A., & Bajerska-Jarzebowska, J. (s. d.). *Leaves of Camellia sinensis : Ordinary Brewing Plant or Super Antioxidant Source?*

26. Hajiaghaalipour, F., Sanusi, J., & Kanthimathi, M. S. (2016). Temperature and Time of Steeping Affect the Antioxidant Properties of White, Green, and Black Tea Infusions : Tea infusion and antioxidant properties…. *Journal of Food Science*, *81*(1), H246-H254. https://doi.org/10.1111/1750-3841.13149

27. Harbowy, M. E., Balentine, D. A., Davies, A. P., & Cai, Y. (1997). Tea chemistry. *Critical reviews in plant sciences*, *16*(5), 415-480.

28. Hicks, A. (2009). *Current Status and Future Development of Global Tea Production and Tea Products**.

29. Hicks, M. B., Hsieh, Y.-H. P., & Bell, L. N. (1996). Tea preparation and its influence on methylxanthine concentration. *Food Research International*, *29*(3-4), 325-330. https://doi.org/10.1016/0963-9969(96)00038-5

30. Hilal, Y. (2017). *Morphology, Manufacturing, Types, Composition and Medicinal Properties of Tea (Camellia sinensis)*. *1*(2).

31. Ho, K. K. H. Y., Haufe, T. C., Ferruzzi, M. G., & Neilson, A. P. (2018). Production and Polyphenolic Composition of Tea. *Nutrition Today*, *53*(6), 268-278. https://doi.org/10.1097/NT.0000000000000304

32. Horžić, D., Komes, D., Belščak, A., Ganić, K. K., Iveković, D., & Karlović, D. (2009). The composition of polyphenols and methylxanthines in teas and herbal infusions. *Food Chemistry*, *115*(2), 441-448. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.12.022

33. Huetz de Lemps, A. (1991). *Bonheure, D. - Le Théier. Le technicien d'agriculture tropicale, 1988* In *Cahiers d'outre-mer*. N° 175

34. ISEEBU. (2017). *Annuaire des statistiques Agricole du Burundi,Edition,2016*.

35. Jafari, M. T., Rezaei, B., & Javaheri, M. (2011). A new method based on electrospray ionisation ion mobility spectrometry (ESI-IMS) for simultaneous determination of caffeine and theophylline. *Food Chemistry*, *126*(4), 1964-1970. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.12.054

36. Jalal, M. A. F., & Collin, H. A. (1976). ESTIMATION OF CAFFEINE, THEOPHYLLINE AND THEOBROMINE IN PLANT MATERIAL. *New Phytologist*, *76*(2), 277-281. https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1976.tb01461.x

37. Jiao, R., Chen, J., Huang, Y., & Chen, Z.-Y. (2016). Teas (Green, Oolong, and Black). In *Handbook of Functional Beverages and Human Health*. CRC Press.

38. Khan, N., & Mukhtar, H. (2013). Modulation of signaling pathways in prostate cancer by green tea polyphenols. *Biochemical Pharmacology*, *85*(5), 667-672. https://doi.org/10.1016/j.bcp.2012.09.027

39. Khokhar, S., & Magnusdottir, S. G. M. (2002). Total Phenol, Catechin, and Caffeine Contents of Teas Commonly Consumed in the United Kingdom. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *50*(3), 565-570. https://doi.org/10.1021/jf0101531

40. Kim, H. Y., Lee, M. Y., Park, H. M., Park, Y. K., Shon, J. C., Liu, K.-H., & Lee, C. H. (2015). Urine and Serum Metabolite Profiling of Rats Fed a High-Fat Diet and the Anti-Obesity Effects of Caffeine Consumption. *Molecules*, *20*(2), Article 2. https://doi.org/10.3390/molecules20023107

41. KLEGOU Stéphane. Le théier, Camellia sinensis : Données pharmacologiques récentes, p. 2-162. Thèse : Pharmacie : Université Paris XI, Chatenay-Malabry : 2005.

42. Koch, W., Kukula-Koch, W., & Komsta, Ł. (2018). Black Tea Samples Origin Discrimination Using Analytical Investigations of Secondary Metabolites, Antiradical Scavenging Activity and Chemometric Approach. *Molecules*, *23*(3), 513. https://doi.org/10.3390/molecules23030513

43. Lee, M.-K., Kim, H.-W., Lee, S.-H., Kim, Y. J., Asamenew, G., Choi, J., Lee, J.-W., Jung, H.-A., Yoo, S. M., & Kim, J.-B. (2019). Characterization of catechins, theaflavins, and flavonols by leaf processing step in green and black teas (Camellia sinensis) using UPLC-DAD-QToF/MS. *European Food Research and Technology*, *245*(5), 997-1010. https://doi.org/10.1007/s00217-018-3201-6

44. Li, S., Lo, C.-Y., Pan, M.-H., Lai, C.-S., & Ho, C.-T. (2013). Black tea : Chemical analysis and stability. *Food & Function*, *4*(1), 10-18. https://doi.org/10.1039/C2FO30093A

45. Lin, S.-Y., Lo, L.-C., Chen, I.-Z., & Chen, P.-A. (2016). Effect of shaking process on correlations between catechins and volatiles in oolong tea. *Journal of Food and Drug Analysis*, *24*(3), 500-507. https://doi.org/10.1016/j.jfda.2016.01.011

46. Londzin, P., Zamora, M., Kąkol, B., Taborek, A., & Folwarczna, J. (2021). Potential of Caffeine in Alzheimer's Disease—A Review of Experimental Studies. *Nutrients*, *13*(2), 537. https://doi.org/10.3390/nu13020537

47. López-Martínez, L., López-de-Alba, P. L., García-Campos, R., & De León-Rodríguez, L. M. (2003). Simultaneous determination of methylxanthines in coffees and teas by UV-Vis spectrophotometry and partial least squares. *Analytica Chimica Acta*, *493*(1), 83-94. https://doi.org/10.1016/S0003-2670(03)00862-6

48. Marthe krieps. (2009). *[PDF] Le Thé : Origine, actualité et potentialités by Marthe Krieps · 3014953004 · OA.mg*. https://oa.mg/work/3014953004

49. Martínez-López, S., Sarriá, B., Gómez-Juaristi, M., Goya, L., Mateos, R., & Bravo-Clemente, L. (2014). Theobromine, caffeine, and theophylline metabolites in human plasma and urine after consumption of soluble cocoa products with different methylxanthine contents. *Food Research International*, *63*, 446-455. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.03.009

50. Matte, J., Lapointe, M., & LeBel, M. (1982). Guide posologique de la théophylline et ses sels. *Canadian Family Physician*, *28*, 111-115.

51. Montaño, L. M., Sommer, B., Gomez-Verjan, J. C., Morales-Paoli, G. S., Ramírez-Salinas, G. L., Solís-Chagoyán, H., Sanchez-Florentino, Z. A., Calixto, E., Pérez-Figueroa, G. E., Carter, R., Jaimez-Melgoza, R., Romero-Martínez, B. S., & Flores-Soto, E. (2022). Theophylline : Old Drug in a New Light, Application in COVID-19 through Computational Studies. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(8), Article 8. https://doi.org/10.3390/ijms23084167

52. Monteiro, J. P., Alves, M. G., Oliveira, P. F., & Silva, B. M. (2016). Structure-Bioactivity Relationships of Methylxanthines : Trying to Make Sense of All the Promises and the Drawbacks. *Molecules*, *21*(8), Article 8. https://doi.org/10.3390/molecules21080974

53. Mourya, S., Bodla, R., Taurean, R., & Sharma, A. (2019). Simultaneous estimation of xanthine alkaloids (Theophylline, Theobromine and Caffeine) by High-Performance Liquid Chromatography. *International Journal of Drug Regulatory Affairs*, *7*(2), 35-41. https://doi.org/10.22270/ijdra.v7i2.315

54. Muriuki, J., Adan, A., Maina, E., Mureithi, H., Lagat, N., Baliach, C., Lwembe, R., Ndemwa, P., & Irungu, B. (2022). *Analysis of Phytochemical Composition and Antioxidant Activities of Aqueous and Methanol Extracts of Black, Green, Purple, and White Teas Grown in Kenya* [Preprint]. In Review. https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-2144916/v1

55. Naveed, M., BiBi, J., Kamboh, A. A., Suheryani, I., Kakar, I., Fazlani, S. A., FangFang, X., kalhoro, S. A., Yunjuan, L., Kakar, M. U., Abd El-Hack, M. E., Noreldin, A. E., Zhixiang, S., LiXia, C., & XiaoHui, Z. (2018). Pharmacological values and therapeutic properties of black tea (Camellia sinensis) : A comprehensive overview. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *100*, 521-531. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.02.048

56. Ndayisaba, E. (2016). *Région théicole d'Ijenda(BURUNDI):Economie et société1965-2011*.

57. Ndayisaba, E. (2019). *Le thé au Burundi des années 1950 A 2018 : Politique publique de développement,rente et appropriations* [Thèse]. De Pau et des pays de l'Adour.

58. Ndayitwayeko, W.-M., & Ndimanya, P. (2015). *Dynamics of Tea Trade Competitiveness in EAC: Evidence from Tea Exports of Burundi*.

59. Nkeshimana, T. (2021). Manuel de formation en technologie de dégustation du thé à l'OTB. Bujumbura, Burundi.

60. NTC-ISO 20481. (2008). *Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación (ICONTEC) 2008 Café y Productos del Café Determinación del Contenido de Cafeína Usando Cromatografía Líquida de Alto Desempeño (HPLC), NTC-ISO 20481 (Colombia : Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación).*

61. Rahman, M. M., Kalam, M. A., Salam, M. A., & Rana, M. R. (2013). Aged leaves effect on essential components in green and oolong tea. *International Journal of Agricultural Research, Innovation and Technology*, *3*(2), Article 2. https://doi.org/10.3329/ijarit.v3i2.17845

62. Rodriguez, A., Costa-Bauza, A., Saez-Torres, C., Rodrigo, D., & Grases, F. (2015). HPLC method for urinary theobromine determination : Effect of consumption of cocoa products on theobromine urinary excretion in children. *Clinical Biochemistry*, *48*(16), 1138-1143. https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2015.06.022

63. Sajilata, M. g., Bajaj, P. R., & Singhal, R. s. (2008). Tea Polyphenols as Nutraceuticals. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *7*(3), 229-254. https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2008.00043.x

64. Salsabil, K., & Nechoua, B.(2021).*Etude sur les molécules anticancéreuses phytosynthétiques et leur mode d'action*. Université Frères Mentouri Constantine

65. Sanchez, J. (2017). Methylxanthine Content in Commonly Consumed Foods in Spain and Determination of Its Intake during Consumption. *Foods*, *6*(12), 109. https://doi.org/10.3390/foods6120109

66. Sealy, J. R. (1958). A Revision of the Genus Camellia. *A Revision of the Genus Camellia*. https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19640303248

67. Shankar, S., Marsh, L., & Srivastava, R. K. (2013). EGCG inhibits growth of human pancreatic tumors orthotopically implanted in Balb C nude mice through modulation of FKHRL1/FOXO3a and neuropilin. *Molecular and Cellular Biochemistry*, *372*(1), 83-94. https://doi.org/10.1007/s11010-012-1448-y

68. Sharma, V., Gulati, A., & Ravindranath, S. (2005). Extractability of tea catechins as a function of manufacture procedure and temperature of infusion. *Food Chemistry*, *93*(1), 141-148. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.10.016

69. Sheibani, E., Duncan, S. E., Kuhn, D. D., Dietrich, A. M., Newkirk, J. J., & O'Keefe, S. F. (2016). Changes in flavor volatile composition of oolong tea after panning during tea processing. *Food Science & Nutrition*, *4*(3), 456-468. https://doi.org/10.1002/fsn3.307

70. Srdjenovic, B., Djordjevic-Milic, V., Grujic, N., Injac, R., & Lepojevic, Z. (2008). Simultaneous HPLC Determination of Caffeine, Theobromine, and Theophylline in Food, Drinks, and Herbal Products. *Journal of Chromatographic Science*, *46*(2), 144-149. https://doi.org/10.1093/chromsci/46.2.144

71. Szymański, M., Korbas, J., & Szymański, A. (2022). Methylxanthines release from various teas during extraction with water. *Acta Poloniae Pharmaceutica*, *78*, 781-788. https://doi.org/10.32383/appdr/145572

72. Turkmen, N., Sarı, F., & Velioglu, Y. S. (2009). *Factors Affecting Polyphenol Content and Composition of Fresh and Processed Tea Leaves.*

73. Turkmen, N., & Velioglu, Y. S. (2007). Determination of alkaloids and phenolic compounds in black tea processed by two different methods in different plucking seasons. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *87*(7), 1408-1416. https://doi.org/10.1002/jsfa.2881

74. Vinci, G., D'Ascenzo, F., Maddaloni, L., Prencipe, S. A., & Tiradritti, M. (2022). The Influence of Green and Black Tea Infusion Parameters on Total Polyphenol Content and Antioxidant Activity by ABTS and DPPH Assays. *Beverages*, *8*(2), Article 2. https://doi.org/10.3390/beverages8020018

75. Vuong, Q. V. (2014). Epidemiological Evidence Linking Tea Consumption to Human Health : A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *54*(4), 523-536. https://doi.org/10.1080/10408398.2011.594184

76. Wang, X., & Tian, W. (2001). Green Tea Epigallocatechin Gallate : A Natural Inhibitor of Fatty-Acid Synthase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *288*(5), 1200-1206. https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.5923

77. Wong, M., Sirisena, S., & Ng, K. (2022). Phytochemical profile of differently processed tea : A review. *Journal of Food Science*, *87*(5), 1925-1942. https://doi.org/10.1111/1750-3841.16137

78. Yang, C. S., Lambert, J. D., & Sang, S. (2009). Antioxidative and anti-carcinogenic activities of tea polyphenols. *Archives of Toxicology*, *83*(1), 11-21. https://doi.org/10.1007/s00204-008-0372-0

79. Yashin, A., Yashin, Y., & Nemzer, B. (2011). Determination of Antioxidant Activity in Tea Extracts, and Their Total Antioxidant Content. *American Journal of Biomedical Sciences*, 322-335. https://doi.org/10.5099/aj110400322

80. Ye, Y., Yan, J., Cui, J., Mao, S., Li, M., Liao, X., & Tong, H. (2018). Dynamic changes in amino acids, catechins, caffeine and gallic acid in green tea during withering. *Journal of Food Composition and Analysis*, *66*, 98-108. https://doi.org/10.1016/j.jfca.2017.12.008

81. Yun, S.-S., Kim, H., Jang, S.-J., Lim, H.-S., Kim, S. H., & Kim, M. (2015). Simultaneous Determination of Caffeine, Theobromine and Theophylline in Tea Leaves by HPLC. *Korean Journal of Food Science and Technology*, *47*(5), 556-560. https://doi.org/10.9721/KJFST.2015.47.5.556

82. Zareef, M., Mehedi Hassan, M., Arslan, M., Ahmad, W., Ali, S., Ouyang, Q., Li, H., Wu, X., & Chen, Q. (2020). Rapid prediction of caffeine in tea based on surface-enhanced Raman spectroscopy coupled multivariate calibration. *Microchemical Journal, 159*, 105431. https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.105431

83. Zargar, B., Majeed, D., Ganai, S. A., Mir, S. A., & Dar, B. N. (2018). Effect of different processing parameters on antioxidant activity of tea. *Journal of Food Measurement and Characterization*, *12*(1), 527-534. https://doi.org/10.1007/s11694-017-9664-5

84. Zaveri, N. T. (2006). Green tea and its polyphenolic catechins : Medicinal uses in cancer and noncancer applications. *Life Sciences*, *78*(18), 2073-2080. https://doi.org/10.1016/j.lfs.2005.12.006

85. Zhao, T., Li, C., Wang, S., & Song, X. (2022). Green Tea (Camellia sinensis) : A Review of Its Phytochemistry, Pharmacology, and Toxicology. *Molecules*, *27*(12), Article 12. https://doi.org/10.3390/molecules27123909

86. Zhen, Y.-S. (2002). *Tea : Bioactivity and Therapeutic Potential*. CRC Press.

87. Zhu, B., Haghi, M., Goud, M., Young, P. M., & Traini, D. (2015). The formulation of a pressurized metered dose inhaler containing theophylline for inhalation. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, *76*, 68-72. https://doi.org/10.1016/j.ejps.2015.04.016

88. Zhu, X., Chen, B., Ma, M., Luo, X., Zhang, F., Yao, S., Wan, Z., Yang, D., & Hang, H. (2004). Simultaneous analysis of theanine, chlorogenic acid, purine alkaloids and catechins in tea samples with the help of multi-dimension information of on-line high performance liquid chromatography/electrospray–mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *34*(3), 695-704. https://doi.org/10.1016/S0731-7085(03)00605-8

ANNEXES

Annexe 1: Chromatogrammes des solutions étalons de théophylline/caféine (32/200ppm)

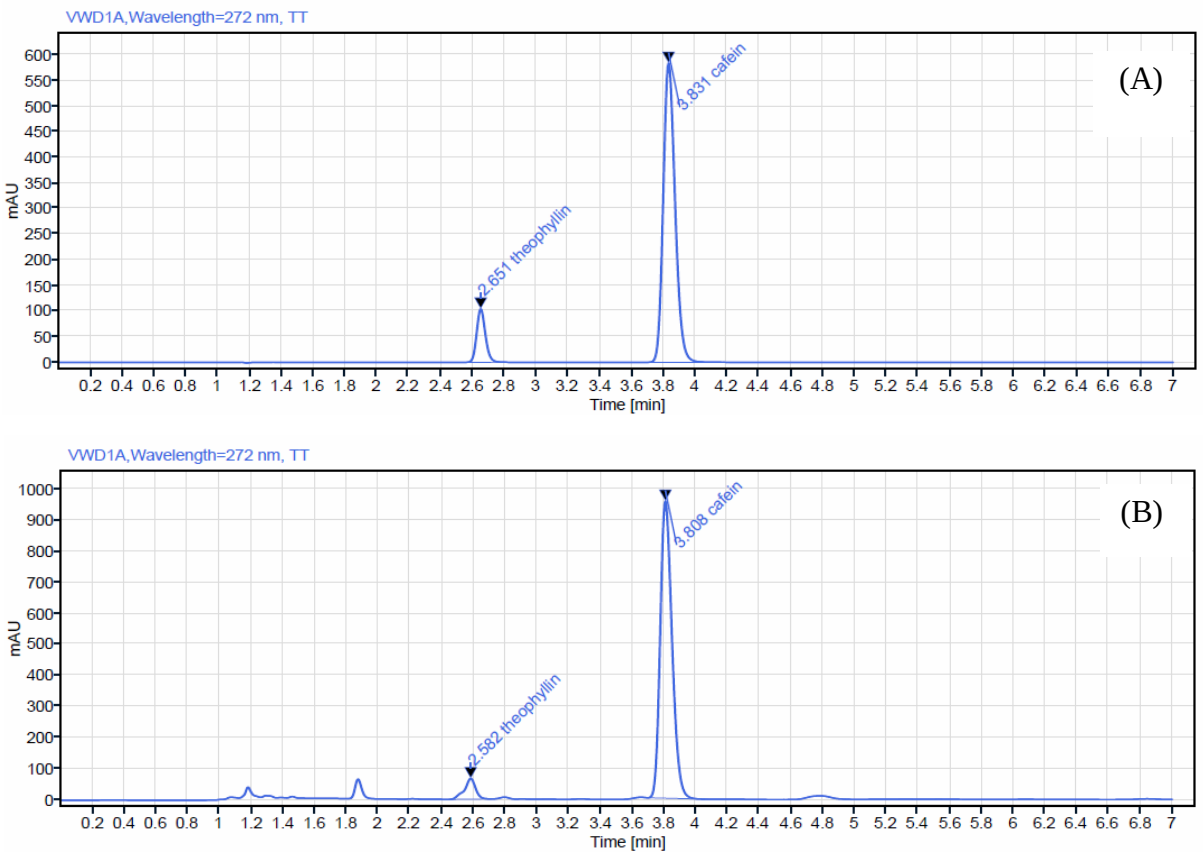


Figure 13 : Chromatogrammes des solutions étalons de théophylline/caféine (32/200ppm) en (A) et de l'échantillon de thé de grade PD de MABAYI en (B).

Annexe 2: Données brutes des échantillons analysés

Tableau Ia: Valeurs de la teneur (en % m/m) en théophylline et caféine des différents grades de thé noir de TORA.

		Théophylline		Caféine	
Grade	**M [a]**	**Conc. [b]**	**Teneur**	**Conc. [b]**	**Teneur**
PF1	5,00226	18,381	0,184	288,293	2,882
	5,00226	20,206	0,202	292,383	2,923
	5,00226	20,206	0,202	288,987	2,889
BP1	5,00206	19,483	0,195	293,478	2,934
	5,00206	20,667	0,207	296,761	2,966
	5,00206	20,043	0,200	293,205	2,931
PD	5,03534	20,414	0,203	253,515	2,517
	5,03534	20,615	0,205	256,642	2,548
	5,03534	19,979	0,198	253,33	2,516
D1	5,0119	21,489	0,214	269,879	2,692
	5,0119	21,823	0,218	273,278	2,726
	5,0119	21,738	0,217	270,5	2,699
FS	5,00684	19,744	0,197	281,156	2,808
	5,00684	20,171	0,201	284,141	2,838
	5,00684	19,687	0,197	280,966	2,806
FS1	5,00329	21,372	0,214	304,894	3,047
	5,00329	21,213	0,212	309,127	3,089
	5,00329	21,25	0,212	307,01	3,068
BMF	5,00494	20,606	0,206	290,95	2,907
	5,00494	21,166	0,211	294,384	2,941
	5,00494	21,859	0,218	291,884	2,916

[a] Masse pesée(en g); [b] Concentration en (mg/l)

Tableau IIa: Valeurs de la teneur (en %) en théophylline et caféine des différents grades de thé noir deTEZA

		Théophylline		Caféine	
Grade	**M [a]**	**Conc. [b]**	**Teneur**	**Conc. [b]**	**Teneur**
PF1	5,00242	20,817	0,208	292,525	2,924
	5,00242	20,865	0,209	294,139	2,940
	5,00242	20,384	0,204	291,604	2,914
BP1	5,00267	20,809	0,208	281,29	2,811
	5,00267	20,536	0,205	286,222	2,861
	5,00267	19,893	0,199	280,472	2,804
PD	5,00152	24,303	0,243	281,196	2,811
	5,00152	22,718	0,227	285,03	2,849
	5,00152	22,113	0,221	280,721	2,805
D1	5,00346	22,077	0,221	298,331	2,981
	5,00346	21,825	0,218	301,577	3,014
	5,00346	22,236	0,222	298,352	2,965
D	5,03104	22,571	0,224	286,08	2,843
	5,03104	20,883	0,208	289,299	2,875
	5,03104	23,031	0,229	312,334	3,121
FS	5,00355	24,722	0,247	275,574	2,754
	5,00355	23,551	0,235	278,515	2,783
	5,00355	24,045	0,240	276,816	2,762
BMF	5,01184	20,689	0,206	228,064	2,275
	5,01184	20,415	0,204	232,437	2,319
	5,01184	20,598	0,205	228,984	2,284

[a] Masse pesée(en g); **[b] Concentration en (mg/l)**

Tableau IIIa: Valeurs de la teneur (en % m/m) en théophylline et caféine des différents grades de thé noir d'IJENDA.

		Théophylline		**Caféine**	
Grade	**M [a]**	**Conc. [b]**	**Teneur**	**Conc. [b]**	**Teneur**
PF1	5,009	21,286	0,212	262,299	2,618
	5,009	20,498	0,205	265,243	2,648
	5,009	19,961	0,199	261,842	2,614
BP1	5,00133	18,989	0,190	267,96	2,679
	5,00133	18,773	0,188	270,89	2,708
	5,00133	18,936	0,189	267,574	2,675
PD	5,00903	22,897	0,229	275,147	2,747
	5,00903	20,35	0,203	278,52	2,780
	5,00903	21,08	0,210	274,596	2,741
D1	5,00552	20,851	0,208	287,401	2,871
	5,00552	20,294	0,203	290,302	2,900
	5,00552	20,222	0,202	287,679	2,874
D	5,005	20,283	0,203	285,129	2,848
	5,005	19,633	0,196	287,243	2,870
	5,005	19,839	0,198	284,281	2,840
F1	5,00016	20,813	0,208	266,161	2,662
	5,00016	20,135	0,201	269,411	2,694
	5,00016	20,762	0,208	265,931	2,659
BMF	5,00476	21,826	0,218	257,869	2,576
	5,00476	21,692	0,217	261,541	2,613
	5,00476	21,857	0,218	257,232	2,570

[a] Masse pesée(en g); **[b] Concentration en (mg/l)**

Tableau IVa: Valeurs de la teneur (en % m/m) en théophylline et caféine des différents grades de thé noir de MABAYI.

		Théophylline		Caféine	
Grade	**M [a]**	**Conc. [b]**	**Teneur**	**Conc. [b]**	**Teneur**
PF1	5,00258	20,173	0,202	299,25	2,991
	5,00258	20,661	0,207	303,571	3,034
	5,00258	20,121	0,201	298,843	2,987
BP1	5,00184	22,805	0,228	289,364	2,893
	5,00184	22,944	0,229	296,87	2,968
	5,00184	22,459	0,225	291,089	2,910
PD	5,00191	26,13	0,261	328,011	3,279
	5,00191	28,014	0,280	338,963	3,388
	5,00191	29,548	0,295	332,756	3,326
D1	5,00687	24,253	0,242	311,935	3,115
	5,00687	20,619	0,206	314,685	3,143
	5,00687	20,767	0,207	312,458	3,120
D	5,00548	26,771	0,267	304,708	3,044
	5,00548	24,92	0,249	308,165	3,078
	5,00548	25,342	0,253	305,953	3,056
F1	5,00458	22,786	0,228	276,03	2,758
	5,00458	21,604	0,216	280,636	2,804
	5,00458	21,649	0,216	276,18	2,759
FS	5,00304	23,358	0,233	272,087	2,719
	5,00304	22,901	0,229	274,837	2,747
	5,00304	23,085	0,231	272,183	2,720
BMF	5,01004	16,859	0,168	197,448	1,971
	5,01004	17,112	0,171	200,039	1,996
	5,01004	17,254	0,172	197,519	1,971

[a] Masse pesée(en g); [b] Concentration en (mg/l)

Tableau Va: Valeurs de la teneur (en % m/m) en théophylline et caféine des différents grades de thé noir de RWEGURA.

		Théophylline		**Caféine**	
Grade	**M [a]**	**Conc. [b]**	**Teneur**	**Conc. [b]**	**Teneur**
PF1	5,00102	19,035	0,190	238,165	2,381
	5,00102	18,88	0,189	241,615	2,416
	5,00102	18,373	0,184	239,49	2,394
BP1	5,04023	21,996	0,218	245,453	2,435
	5,04023	20,837	0,207	248,889	2,469
	5,04023	19,366	0,192	244,543	2,426
PD	5,0053	25,422	0,254	320,339	3,200
	5,0053	22,972	0,229	325,513	3,252
	5,0053	23,109	0,231	319,083	3,187
D1	5,00439	23,785	0,238	271,15	2,709
	5,00439	22,925	0,229	274,791	2,745
	5,00439	23,141	0,231	271,929	2,717
F1	5,00392	19,848	0,198	299,647	2,994
	5,00392	20,687	0,207	303,135	3,029
	5,00392	20,512	0,205	299,78	2,995
BMF	5,00871	17,196	0,172	222,137	2,218
	5,00871	17,329	0,173	225,605	2,252
	5,00871	17,777	0,177	223,112	2,227

[a] Masse pesée(en g); [b] Concentration en (mg/l)

Tableau VIa: Valeurs de la teneur (en %) en théophylline et caféine des différents grades de thé noir de GISOZI.

		Théophylline		**Caféine**	
Grade	**M [a]**	**Conc. [b]**	**Teneur**	**Conc. [b]**	**Teneur**
PF1	5,00194	13,491	0,135	251,689	2,516
	5,00194	14,736	0,147	255,347	2,552
	5,00194	15,162	0,152	251,75	2,517
BP1	5,00601	16,198	0,162	250,496	2,502
	5,00601	16,822	0,168	253,659	2,534
	5,00601	16,541	0,165	249,56	2,493
PD	5,01661	16,089	0,160	269,706	2,688
	5,01661	16,84	0,168	273,778	2,729
	5,01661	17,866	0,178	269,978	2,691
D1	5,00212	17,254	0,172	269,077	2,690
	5,00212	17,858	0,179	272,962	2,728
	5,00212	18,075	0,181	269,648	2,695
D	5,00916	17,549	0,175	257,062	2,566
	5,00916	16,943	0,169	262,265	2,618
	5,00916	17,538	0,175	256,944	2,565
F1	5,00327	15,045	0,150	245,524	2,454
	5,00327	16,831	0,168	247,856	2,477
	5,00327	16,444	0,164	245,208	2,450

[a] Masse pesée(en g); **[b] Concentration en (mg/l).**

Annexe 3: Protocole de préparation du thé selon l'OTB

Selon les démonstrations de l'ingénieur chargé de la fabrication et de la commercialisation du thé à l'OTB, Thomas Nkeshimana, pour préparer un bon jus de thé, on bouillit l'eau jusqu'à l'ébullition, On met une cuillère à soupe de thé dans une tasse de cette eau bouillie et on couvre la tasse de 2 à 5 minutes, Si on prépare le jus de thé pour plusieurs personnes, on bouillit autant de tasses d'eau que de personnes, Après avoir démis la casserole du braisier, on met autant de cuillères à soupe de thé que de tasses d'eau bouillie et on laisse le récipient couvert pendant 2 à 5 minutes (Source OTB).