



HAL
open science

Infusions de thés et santé: Dyslipidémie protocole d'étude du thé Hao Ling® chez des sujets atteints d'hypercholestérolémie. : Effet hypolipémiant de Camellia sinensis (Hao Ling® Tea) chez des sujets atteints d'hypercholestérolémie non traités par statine: protocole d'étude pour un essai randomisé, en double aveugle, contrôlé par placebo.

Olivier Pons

► **To cite this version:**

Olivier Pons. Infusions de thés et santé: Dyslipidémie protocole d'étude du thé Hao Ling® chez des sujets atteints d'hypercholestérolémie. : Effet hypolipémiant de Camellia sinensis (Hao Ling® Tea) chez des sujets atteints d'hypercholestérolémie non traités par statine: protocole d'étude pour un essai randomisé, en double aveugle, contrôlé par placebo.. Médecine humaine et pathologie. Université de Toulon, 2023. Français. NNT: 2023TOUL1001 . tel-04523385

HAL Id: tel-04523385

<https://theses.hal.science/tel-04523385>

Submitted on 27 Mar 2024

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITÉ DE TOULON

ÉCOLE DOCTORALE 548

THÈSE

Présentée par :

Olivier PONS

Soutenue le 18 décembre 2023

Pour l'obtention du Grade de

Docteur en Science de la vie et de la santé

Spécialité : **Physiologie**

Infusions de thés et santé

- Dyslipidémie : protocole d'étude du thé Hao Ling® chez des sujets atteints d'hypercholestérolémie

Effet hypolipémiant de Camellia sinensis (Hao Ling® Tea) chez des sujets atteints d'hypercholestérolémie non traités par statine : protocole d'étude pour un essai randomisé, en double aveugle, contrôlé par placebo.

Membres du jury :

Pr. Jean-Michel MAIXENT	PU, Université de Toulon	Directeur de thèse
Dr Monique BERNARD	Directrice CRMBM Marseille	Rapporteur
Pr. Franck PAGANELLI	PU-PH, Hôpital Nord, Marseille	Rapporteur
Pr Pascale DUCHÉ	Directrice l'unité (IAPS) Toulon	Examineur
Pr. Nematollah JAAFARI	PU PH, CHU de POITIERS	Examineur
Dr. Jean-Marc ZEIL	PDG société la pagode	Membre invité



Chant du thé

" La première tasse humecte mes lèvres et ma gorge.

La deuxième bannit ma solitude.

La troisième dissipe la lourdeur de mon esprit, rendu confus par tant de lecture.

La quatrième exhale une légère transpiration, dispersant par mes pores toutes afflictions de la vie.

La cinquième me purifie.

La sixième m'ouvre le royaume des immortels.

La septième, ah que ne puis-je en boire davantage !

Je ne perçois plus le souffle du vent qui enfle mes manches.

Transporté par cette douce brise, je gagne les cieux."

Lu tung

“ 第一杯湿润了我的嘴唇和喉咙。

第二条横幅我的寂寞。

第三个消除了我的思维沉重，被太多的阅读所迷惑。

第四次呼出一阵汗水，弥漫着我所有的痛苦。

第五净化我。

第六个向我打开了不朽的境界。

第七，啊，我还能喝点什么！

我再也感觉不到吹着袖子的风。

在微风轻拂下，我飞向天空。”

Engagement de non plagiat

Je soussigné PONS Olivier,

Déclare être pleinement conscient que le plagiat de documents ou d'une partie d'un document publié sur toutes formes de support, y compris l'internet, constitue une violation des droits d'auteur ainsi qu'une fraude caractérisée. En conséquence, je m'engage à citer toutes les sources que j'ai utilisées pour écrire cette thèse.

Signature

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'Olivier Pons', written in a cursive style.

Remerciements

Ce travail a été réalisé en collaboration avec le CEN centre d'investigation clinique à Dijon et avec le Laboratoire de génie chimique LGC UMR UPS/INPT/CNRS 5503 (Université Toulouse 3-Paul Sabatier).

Je voudrais témoigner ma reconnaissance au Professeur Jean Michel MAIXENT, pour avoir encadré cette thèse. Je le remercie particulièrement pour son exigence, sa disponibilité, ses encouragements et ses conseils très précieux ; je suis très reconnaissant de la confiance qu'il m'a témoignée.

J'adresse mes sincères remerciements au Dr Monique BERNARD, directrice de recherche au CNRS pour l'honneur qu'elle me fait en acceptant de juger mon travail et d'être mon rapporteur.

J'adresse mes sincères remerciements au Professeur Franck PAGANELLI pour l'honneur qu'il me fait en acceptant de juger mon travail et d'être mon rapporteur.

Je remercie vivement le Pr. Nematollah JAAFARI du CRC de l'hôpital Laborit à Poitiers pour sa participation à mon jury de thèse et pour l'honneur qu'il me fait en acceptant de juger ce travail, qu'il trouve ici l'expression de toute ma reconnaissance.

Je remercie Monsieur Jean-Marc Zeil pour m'avoir ouvert les portes de son entreprise et pour la confiance qu'il m'a accordée tout au long de ce projet.

Mes remerciements sincères vont également à la mémoire de notre professeur et ami le Docteur Thierry Coste qui ne peut qu'être cité pour que sa mémoire perdure.

À ma famille et mes deux amours, Maïté et Margaux ; et j'adresse aussi mes remerciements à ma nièce Eva Pons pour les conseils de rédaction en anglais.

Enfin, j'adresse mes remerciements à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à ce présent travail.

Sommaire

Engagement de non plagiat	3
Remerciements.....	4
Publications.....	7
Abréviations.....	8
Tableaux.....	10
Figures.....	11
Avant-propos et problématique.....	13
Partie 1 : Les dyslipidémies.....	15
Partie 2 : Prise en charge des dyslipidémies.....	35
Partie 3 : Les thés de la clinique aux allégations santé.....	48
Article 1 : Protocole dyslipidémie et thé Hao Ling®	75
Résumé de l'article.....	76
1. Introduction.....	82
2. Résultats.....	83
3. Discussion	84
4. Matériels et Méthodes	86
5. Conclusions.....	100
6. Références.....	101
Article 2 : le thé Qi Cha®	104
Résumé de l'article.....	105
1. Préambule.....	108
2. Matériels et méthodes	110
2.1. Produits chimiques, eau et appareils	110
2.2. Préparation du thé® Qi Cha par la méthode des actifs® bio concentrés (ABC).....	110
2.3. Préparation des produits d'infusion d'eau (WIP) et des produits d'extraction liquide sous pression (PLEP)	111

2.4. Analyses chromatographiques d’empreintes digitales par chromatographie liquide à haute performance couplée à une analyse par détecteur à barrettes de diodes (HPLC-DAD).....	111
2.5. Activité de piégeage des radicaux libres : test DPPH.....	111
2.6. Évaluation de la viabilité cellulaire.....	112
2.7. Analyse statistique	112
3. Résultats.....	112
3.1. Efficacité pour la préparation des produits WI (WIP) et des produits PLE (PLEP).....	113
3.2. Analyse HPLC-DAD	114
3.3. Capacité antioxydante et activité cytotoxique du thé® Qi Cha et de ses composants.....	115
3.3.1. Activité antioxydante	115
3.3.2. Activité cytotoxique.....	115
4. Discussion	117
5. Conclusions.....	119
6. Brevets	120
Conclusions et perspectives	121
Références.....	124
Bibliographie.....	128
Résumé.....	140
Summary	141

Publications

Articles publiés :

Sadrin S, Sennoune SR, Gout B, Marque S, Moreau J, Grillasca J, Pons O, Maixent JM. Lactobacillus acidophilus versus placebo in the symptomatic treatment of irritable bowel syndrome : the LAPIBSS randomized trial. *Cell Mol Biol (Noisy-le-Grand)* 2017 Sep 30;63(9):122-131.doi: 10.14715/cmb/2017.63.9.21. PMID : 28980935.

Sadrin S, Sennoune S, Gout B, Marque S, Moreau J, Zinoune K, Grillasca JP, Pons O, Maixent JM. A 2-strain mixture of Lactobacillus acidophilus in the treatment of irritable bowel syndrome: A placebo-controlled randomized clinical trial. *Dig Liver Dis.* 2020 May;52(5):534-540. doi: 10.1016/j.dld.2019.12.009. Epub 2020 Jan 15. PMID: 31952938.

Maixent JM, Pons O, Sennoune SR, Sadrin S, Clinical effects of Lactobacillus strains as probiotics in the treatment of irritable bowel syndrome. Results from the LAPIBSS trial: Future objectives. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 2020 Jun 5; 66(3):211-214. PMID: 32538776.

Maixent JM, Belaiba M, Pons O, Roulleau E, Bouajila J, Zeil JM. Biological Activities and Polyphenol Content of Qi Cha Tea[®], a Functional Beverage of White Tea Containing Botanicals and Dry Botanical Extracts with European Health Claims. *Plants (Basel)*. 2023 ; 12(18):3231. Published 2023 Sep 11.

Doi : 10.3390/plants12183231

Articles en cours de soumission à Plants : Protocole clinique du thé Hao Ling

Olivier Pons, Jean-Marc Zeil, Enora Rouleau, Linda Naji, Florent Herpin, Jean michel Maixent. Lipid-lowering effect of Camellia sinensis (Hao Ling[®] Tea) in subjects with hypercholesterolemia not treated with statin: study protocol for a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. Manuscrit en cours de soumission pour Plants.

Abréviations

Liste des abréviations

ACC	Acetyl-CoA carboxylase
ADN	Acide désoxyribonucléique
AGS	Acide gras synthase
AHA	Association américaine de cardiologie
AMP	Adénosine monophosphate
AMPC	Adénosine monophosphate cyclique
AMPK	Protéine kinase activée par l'adénosine monophosphate
ATP	Adénosine triphosphate
C/EBP α	Protéine alpha de liaison à l'activateur CCAAT
CDK	Kinases dépendantes des cyclines
CETP	Protéine transférant les esters de cholestérol
CRP	Protéine C-réactive
CTC	Crush, Tear, Curl
EC	Épicatéchine
ECG	Épicatéchine gallate
EGC	Épigallocatechine
EGCG	Épigallocatechine gallate
EGF	Facteur de croissance épidermique
EGFR	Récepteur au facteur de croissance épidermique
eNOS	NO synthase endothéliale
ERK	Kinase régulée par un signal extracellulaire
ET-1	Endothéline -1
GMPc	Guanosine monophosphate cyclique
HDL	Lipoprotéines de haute densité
HNF-4 α	Facteur nucléaire hépatocytaire alpha -4
HTA	Hypertension artérielle
IDL	Lipoprotéines de densité intermédiaire
IGF	Facteurs de croissance de type Insuline

IL	Interleukine
IMC	Indice de masse corporelle
IRS	Substrats du récepteur à l'insuline
JNK c-	Jun N-terminal kinase
Keap-1	Protéine Kelch de type ECH
LDL	Lipoprotéines de faible densité
LPL	Lipoprotéine lipase
NADH	Nicotinamide adénine dinucléotide
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NADPH	Oxydase Nicotinamide adénine di-nucléotide phosphate oxydase
NO	Monoxyde d'azote
OMS	Organisation mondiale de la santé
RCT	Essai randomisé contrôlé
SREBP	Protéine se liant à l'élément régulateur des stérols
TF1	Théaflavine
TF2a	Théaflavine-3-gallate
TF2b	Théaflavine-3'-gallate
TF3	Théaflavine-3,3'-digallate
VLDL	Lipoprotéines de très faible densité

Tableaux

1. Lipoprotéines propriétés et composition en Apolipoprotéines. Adapté et complété du chapitre Lipoprotéines Marieb (2016)	24
2. Apolipoprotéines impliquées dans le métabolisme des lipides : localisation tissulaire, distribution, fonction enzymatique ou récepteurs. (Adapté de Marieb 2016 et Von Eckarstein et al. 2023)	25
3. Classification des dyslipidémies selon Fredrickson (d'après Fricker et le Goff, 2017)	38
4. Modification du régime alimentaire lors d'une dyslipidémie proposée par Kirkpatrick et al. (2022)	41
5. Interventions recommandées pour la nutrition et le mode de vie pour diminuer le LDL et les TG proposées par Kirkpatrick et al. (2022).....	42
6. Composition chimique des feuilles de thé fraîches.....	53
7. Changements de la composition du thé vert utilisé pour la fermentation du thé Pu-erh (Deng et al. 2021)	61
8. Exemple de proposition d'allégations plantes (ID en attente) source EFSA	64,65
9. Allégations santé (en attente) EFSA	66,67
10. Méta-analyses pour le thé vert et noir (tableau préparé pour l'Article 2).....	69
11. Amélioration du profil lipidique par le thé	73

Figures

1 : Toutes causes de mortalité en fonction de la concentration plasmatique du HDL-cholestérol. Espérance de vie calculée dans la cohorte suédoise AMORIS selon le sexe suivi et un suivi pendant 25 ans (Von Eckardstein et al. 2023)	18
2 : Structure schématique d'une lipoprotéine. Source : Encyclopædia Universalis France	19
3 : Synthèse des caractéristiques principales des lipoprotéines (adaptée de Bruckert & Le Goff 2017, Raja et al. 2023)	21
4 : Illustration de la physiologie des échanges des lipoprotéines (réf. Marieb, 2016).....	27
5 : Compartimentation des circuits des lipoprotéines avec le cholestérol et les triglycérides (d'après Lutjohann et al. 2022)	28
6 : Transferts de cholestérol entre les lipoprotéines (Von Eckardstein et al. 2023)	29
7 : Physiologie des échanges du cholestérol libre ou estérifié, schéma simplifié (Duan et al. 2022)	32
8 : Métabolisme des lipides plasmatiques (cholestérol et TGs). (Berberich et Hegele, 2022)	33
9 : Les valeurs normales du bilan lipidique anormal	36
10 : Infographie proposée pour une approche moderne de la dyslipidémie (Berberich et al. 2022) .	44
11 : Mécanismes d'action des thérapeutiques inhibitrices de l'athérosclérose lors d'études cliniques d'intervention pour diminuer le cholestérol. (D'après Duan et al. 2022).....	45
12 : l'athérosclérose et la nouvelle place du non-HDL depuis son initiation jusqu'à sa progression (D'après Raja et al. 2023)	46
13 : Abstract graphique résumant les apolipoprotéines (lipides et protéines), les dysfonctions des HDLs (Von Eckardstein et al. 2023).....	47
14 : Usage du thé : infusion ou extraction chimique, quels composés et quels bénéfices ? d'après Brimson et al. 2022	50
15 : La plante Camellia sinensis	50
16 : Les principales étapes du traitement des feuilles de théiers après récolte	52
17 : Différents types de thé Pu-erh selon les procédés d'obtention (d'après Zhu et al. 2020)	55

18 : Fabrication actuelle du thé Pu-erh de la feuille de thé vert fraîche au cake compressé	57
19 : Structures des principales molécules des thés fermentés et non-fermentés.....	59
20 : Effets hypolipidémiques, anti-inflammatoires et anti-athérosclérotiques d'un thé fermenté : <i>Monascus purpureus</i> Pu-erh thé (MPT) d'après Deng et al. (2021).....	62

Avant-propos et problématique

La prévention des maladies cardiovasculaires reste un enjeu majeur de santé publique dans nos sociétés industrialisées. Selon la présentation générale de la haute autorité de santé (HAS, présentation générale) citant l’OMS, la prévention consiste à éviter l’apparition, le développement ou l’aggravation de maladies ou d’incapacités. Sont classiquement distinguées la prévention primaire qui agit en amont de la maladie (action sur les facteurs de risque), la prévention secondaire qui agit à un stade précoce afin de s’opposer à son évolution (traitement des premières atteintes), et la prévention tertiaire qui agit sur les complications et les risques de récurrence.

Les maladies cardiovasculaires regroupent la maladie coronaire, l’accident vasculaire cérébral ischémique et l’artériopathie oblitérante des membres inférieurs. Elles représentent la principale cause de handicap dans les pays développés et la deuxième cause de mortalité en France avec encore 139 000 décès en 2013, soit 25% de l’ensemble des décès (Aouba et al. 2011).

L’athérosclérose, processus à l’origine du développement de ce type de maladies, peut être causée par différents facteurs. Parmi les facteurs de risque cardiovasculaire, l’hypercholestérolémie est un facteur important que l’on peut potentiellement modifier. Le cholestérol LDL (LDL-C) est désigné comme la lipoprotéine la plus athérogène et l’amélioration du profil lipidique par la baisse du taux du LDL-C constitue un élément capital de la prévention cardiovasculaire (Grundy et al. 2018, Lecoffre et al. 2018).

La prise en charge des dyslipidémies est donc primordiale et concerne tous les médecins. Pour ce faire, différentes institutions scientifiques ont établi des lignes directrices de pratique clinique qui traitent et résument les preuves scientifiques disponibles et fournissent des recommandations en conformité avec les lignes directrices. En France, les recommandations françaises de l’HAS sont publiées en 2012 et 2015. En 2019, de nouvelles recommandations américaines font consensus aux Etats-Unis et ont relancé la controverse sur la meilleure approche de stratification du risque et de traitement (Arnett et al. 2019). Les recommandations Européennes et Américaines visent toutes les deux le même objectif de réduire le risque cardiovasculaire, mais l’examen critique et la comparaison de ces recommandations font apparaître deux approches différentes. L’approche européenne maximalise le gain individuel chez les patients à plus haut risque tandis que l’approche américaine propose d’étendre la prescription médicamenteuse à un plus large nombre d’individus. Les experts des pays européens sont conscients que les objectifs de LDL-C sont basés sur une extrapolation de données scientifiques observationnelles et qu’il n’existe pas d’essais cliniques visant des objectifs de LDL-C avec des statines.

Ces experts pensent que la stratégie américaine a également des défauts et ils recommandent donc, pour le moment, de ne pas modifier nos habitudes de prise en charge et de garder une stratégie suivant les recommandations européennes.

L'important est au final que l'attitude choisie pour corriger la dyslipidémie le soit en pleine connaissance et intelligence avec le patient. Il apparaît essentiel de lui parler des enjeux qu'implique chaque choix thérapeutique, tant au niveau des bénéfices qu'au niveau des contraintes et des éventuels effets indésirables (Grundy et al. 2018). Une synthèse des recommandations sur la prise en charge des dyslipidémies servira de point de départ à l'étude et sera développée. L'implication du patient est nécessaire et primordiale pour une meilleure prise en charge médicale. Étudier le phénomène d'observance thérapeutique nécessite de s'interroger sur le point de vue des patients et donc sur l'adhésion thérapeutique (Arnett et al. 2019). Un avis de l'HAS en 2021 fait le point avec l'utilisation des statines dans la dyslipidémie.

La finalité de ce travail est de proposer une solution singulière que représente le thé comme boisson chaude en infusion pour diminuer le risque cardiovasculaire en prévention primaire. Un protocole original de haute qualité méthodologique a été réalisé pour être publié (article 1) comme nous l'avons fait au cours de nos précédentes études du syndrome de l'intestin irritable avec une intervention de 2 probiotiques sous forme de complément alimentaire, et qui a conduit à 3 publications internationales référencées à Pub Med. Un complément alimentaire sous forme de gélule issu de l'extraction de l'infusion du thé Hao Ling a déjà été réalisé, il permettra de compléter le dosage limité dans une infusion aqueuse. Enfin un brevet européen déjà enregistré et appliqué à 10 préparations de thé est commercialisé pour répondre aux préoccupations des allégations européennes de santé. Nous avons pu analyser le processus produit par ce brevet et caractériser une nouvelle présentation de thé blanc enrichi avec d'autres extraits de plantes et d'extraits secs pour sa composition en alcaloïdes et polyphénols, et pour son activité biologique (article 2).

Ce travail permettra de déterminer les connaissances acquises et les lacunes des patients dans la globalité de la prise en charge des dyslipidémies afin de pouvoir leur proposer une meilleure information à la fois pour le patient et le médecin et un suivi adapté pour le thé (*Camellia sinensis*) et ses infusions.

Partie 1 : Les dyslipidémies

Introduction

Les dyslipidémies, généralités, état de l'art en 2023 et recommandations.

En France, les dyslipidémies concernent plus de 37% de la population adulte française âgée de 35 à 64 ans soit 9,1 millions de personnes (Lecoffre et al. 2018). Une description des lipides est nécessaire pour comprendre ces dyslipidémies. Communément appelés « graisses », les lipides constituent, avec les protéines et les glucides, une des trois grandes familles de macronutriments, c'est-à-dire l'un des constituants des aliments qui contribuent à l'apport énergétique (Vieux et al. 2022). Les lipides sont essentiels dans la structure des membranes cellulaires et des organites, mais aussi comme médiateurs lipidiques et comme précurseurs d'hormones stéroïdiennes.

En termes plus physiologiques puis physiopathologiques, les lipides sont des composés hydrophobes peu solubles en milieu aqueux, mais par leur caractère amphiphile peuvent être intégrés dans de structures complexes en contact avec un milieu aqueux. C'est le cas avec les lipoprotéines ou apolipoprotéines qui assurent leur solubilité et donc leur transport dans le sang et leur circulation (plasma, lymphe, liquide interstitiel) dans les organismes. Les apolipoprotéines stabilisent leur structure et déterminent leur devenir dans l'organisme en permettant leur transport vers les organes cibles. Une homéostasie des apports exogènes se fait au niveau du foie. Cependant, des apports excessifs en lipides ou par des mutations géniques sont néfastes pour la santé avec une hypercholestérolémie familiale. La part recommandée des lipides dans l'apport énergétique est de 30 à 35% Cette fourchette permet d'assurer la couverture des besoins en acides gras essentiels. Elle prend en compte les apports minima et les excès dans la prévention de pathologies. Etant donné que les lipides apportent près de deux fois et demie plus de calories que les glucides ou les protéines, la recommandation « une proportion de moins de 30 % des calories quotidiennes doit être issue des lipides » se traduit en fait par « les lipides doivent représenter moins de 15 % du poids des nutriments ingérés chaque jour. Les pathologies modernes viennent aussi d'apport excessif d'acides gras saturés et de cholestérol au détriment d'acides gras insaturés, auquel la transformation des aliments contribue au détriment de l'alimentation chasseur cueilleurs de nos ancêtres.

L'homéostasie lipidique est finement régulée pour la cellule. Puisque la cellule ne peut métaboliser le cholestérol en excès, une élimination du cholestérol endogène existe. Les marqueurs lipidiques plasmatiques ont très vite pris une place importante dans les sociétés occidentales où la nutrition ainsi que le mode de vie avec une activité physique diminuée et des apports caloriques excédentaires.

L'obésité en est l'exemple. La prise de conscience a permis le développement de méthodes d'évaluation des lipides circulants comme marqueurs de ces pathologies et a permis un contrôle de la dyslipidémie.

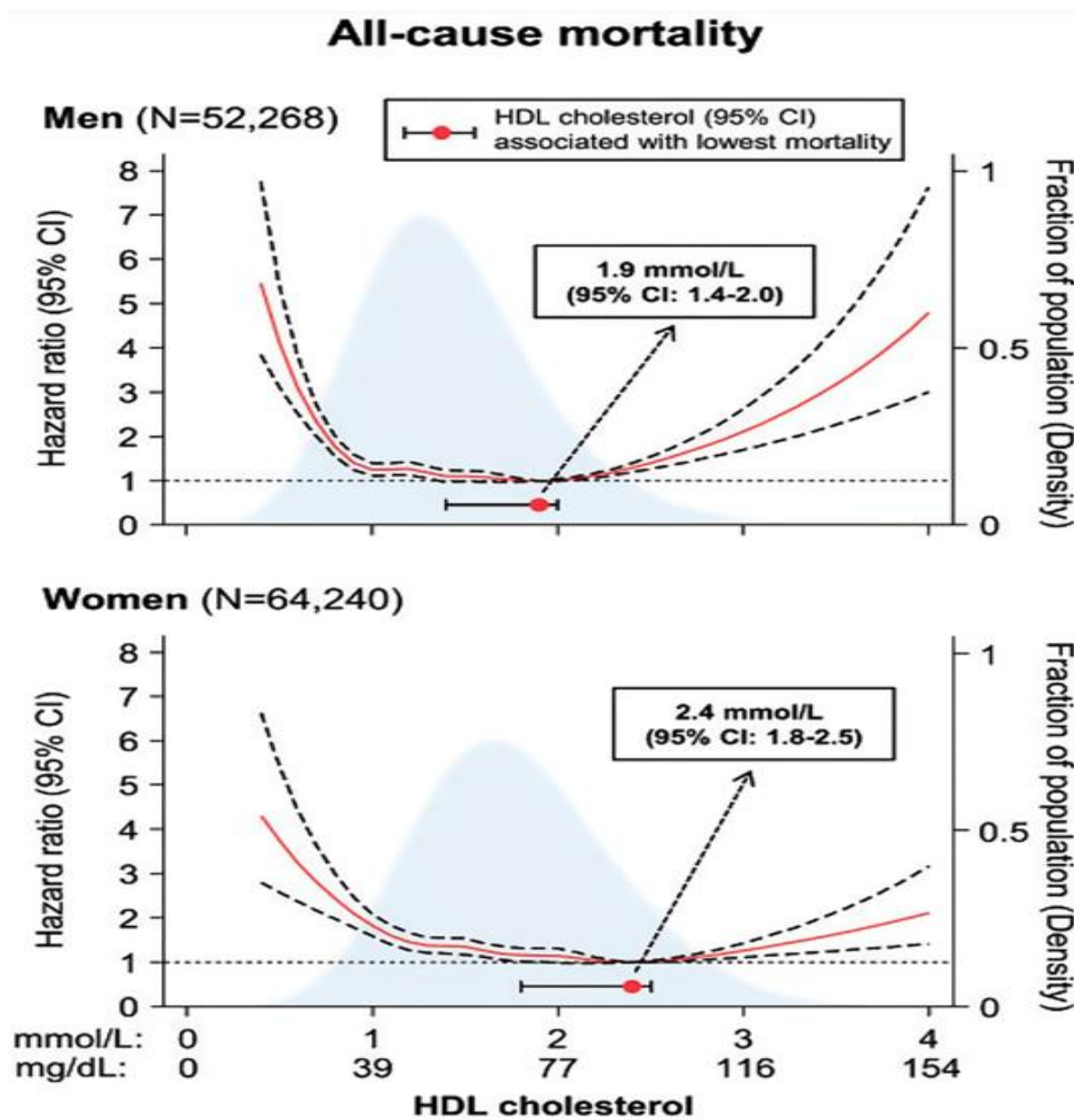
Une stratégie thérapeutique lors des 35 dernières années a consisté ainsi à diminuer le LDL-C avec un inhibiteur de la synthèse du cholestérol hépatique l'HMG-CoA avec des inhibiteurs spécifiques de la classe des statines, et l'objectif principal des essais cliniques. Cependant le risque de maladies cardiovasculaires dans la population générale n'a pas été éliminé et des effets indésirables sérieux sont apparus au cours du temps avec en particulier le traitement par les statines. Une approche nutritionnelle, anti-stress anti-anxiété a été vulgarisée et popularisée en France, avec notamment l'utilisation des acides gras polyinsaturés avec les oméga-3, qui maintenant est recommandée par les lignes directrices (Kirkpatrick et al. 2023).

Le contrôle de la dyslipidémie reposait sur la seule baisse des LDL circulantes. Peut-être un concept simpliste de linéarité dans les effets des statines avec « the lower is the best » pour les LDL, ou transposé en thérapeutique, « plus la dose de statine est élevée plus la dyslipidémie sera contrôlée et bénéfique ». Le contrôle de la dyslipidémie est ainsi facilement applicable. Ce concept s'appuie sur l'hypothèse que les taux sériques de LDL sont considérés comme continus, sans seuil entre les niveaux physiologique et physiopathologique, qui était toujours d'actualité dans les années 2010 (Ference et al. 2017). Une comparaison de la dyslipidémie entre différents pays et de son association aux pathologies cardiovasculaires pouvait le laisser croire. On pensait qu'il existait une relation linéaire entre les taux de lipides et les risques cardiovasculaires comme l'indiquait notre ami John Chapman (Paris) éminent scientifique dans ce domaine et avec qui nous avons collaboré dans le passé sur la relation entre la Na K-ATPase endothéliale et les lipides (cholestérol et lipoprotéine).

Or les analyses récentes d'espérance de vie dans les cohortes de patients soulignent que cette relation n'existe que pour les TG circulants. En effet, seuls les triglycérides circulants présentent une relation linéaire entre les taux faibles et les fortes concentrations sériques avec l'espérance de vie (Ding et al., 2021). L'analyse de la cohorte AMORIS sur 25 ans mais aussi les récentes interventions pharmacologiques augmentant très fortement le HDL inhibiteur de PCSK9 et ainsi une élimination du cholestérol cellulaire en excès (Von Eckardstein et al. 2023) ont montré une balance bénéfice-risque défavorable invalidant l'hypothèse « the lower LDL is the best ». Il semble à la lumière de ces résultats qu'il existe une « juste dose » courbe en U entre le risque et la dose de lipides. Le point d'inflexion de cette relation correspond à un risque minimal pour le cholestérol total les HDL et le LDL pour la mortalité cardiovasculaire et la mortalité toutes causes confondues (Ding et al. 2021). Ce point d'inflexion est aussi différent selon le sexe.

Ces justes doses étaient bien connues en nutrition pour les vitamines et la balance bénéfique/risque, en particulier avec les carences alimentaires et son risque pathologique (Maixent 2012). A ce jour avec la figure suivante, les concentrations circulantes d'HDL à maintenir chez l'homme soit 1,9 mM et chez la femme soit 2,4 mM représentent l'objectif du maintien du HDL pour une plus forte espérance de vie. Ces courbes expliquent l'échec des nouvelles thérapeutiques hypolipémiantes (Von Eckardstein et al. 2023). Ces nouvelles données n'ont pas été révisées dans les lignes directrices concernant les allégations de santé. En conclusion les lipides sont essentiels à la bonne santé avec des limites hautes et basses pour les principales lipoprotéines représentées par le LDL et le HDL.

Figure 1 : Toutes causes de mortalité en fonction de la concentration plasmatique du HDL-cholestérol. Espérance de vie calculée dans la cohorte suédoise AMORIS selon le sexe et un suivi pendant 25 ans (Von Eckardstein et al. 2023).

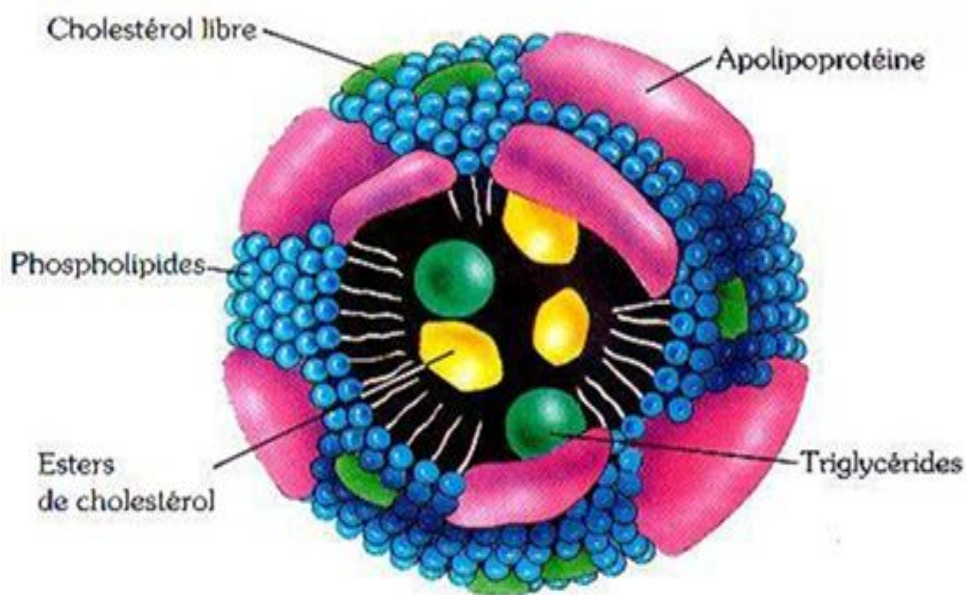


LE CHOLESTÉROL ET SES LIPOPROTÉINES

Rappelons ici que le cholestérol est un lipide de la famille des stérols qui reste indispensable à notre organisme : toutes les cellules de notre corps en contiennent et l'utilisent (Luo et al. 2020, Kolber et al. 2023). Si toutes les cellules de notre organisme sont capables de fabriquer du cholestérol, elles préfèrent utiliser celui qui est apporté par la circulation sanguine. Le foie en fabrique la plus grande partie (environ 70%, les 30% restant étant apportés directement par l'alimentation).

Comme le cholestérol n'est pas soluble dans l'eau ni le sang, il circule sous forme de particules de lipoprotéines. Celles-ci comportent un cœur hydrophobe constitué de lipides neutres (esters de cholestérol et triglycérides) recouvert d'une enveloppe amphiphile dont les constituants principaux sont les phospholipides, le cholestérol non estérifié et les apolipoprotéines (Figure 1).

Figure 2 : Structure schématique d'une lipoprotéine. *Source : Encyclopædia Universalis France*



Les principaux types de transporteurs appelés lipoprotéines sont les suivants :

- Les 2 premières LDL et HDL sont associées dans l'esprit du grand public au mauvais et bon cholestérol. Ces lipoprotéines de basse densité (les LDL-cholestérol) transportent le cholestérol dans le sang du foie vers les cellules de l'organisme.

En excès il favorise l'apparition de plaques d'athérome (dépôt de cholestérol sur la paroi des artères Duan et al. 2023) à l'origine des maladies cardiovasculaires.

- Les lipoprotéines de haute densité (les HDL-cholestérol) qui captent le cholestérol au niveau des tissus extra-hépatiques et le ramènent dans le foie où il est dégradé, favorisant l'élimination du cholestérol. Ce rôle est bénéfique.

- Les chylomicrons, et enfin les lipoprotéines de très basse densité (VLDL) qui participent au transport des lipides vers le foie. A ce jour, une nouvelle manière de mesurer les risques cardiovasculaires est d'utiliser le marqueur non-HDL-C plutôt que le LDL-C. Comme l'indique la figure 3, le dosage HDL-C et non-HDL-C couvre ainsi les chylomicrons jusqu'au Lp(a). Combinés ensemble HDL-C et NON-HDL-C couvrent les particules lipidiques circulantes (Raja et al. 2023). Les 2 premiers éléments (*Tableau II*), servant de support pédagogique pour les médecins illustre le changement d'attitude entre le LDL et aujourd'hui le non-HDL et la lipoprotéine apoA1.

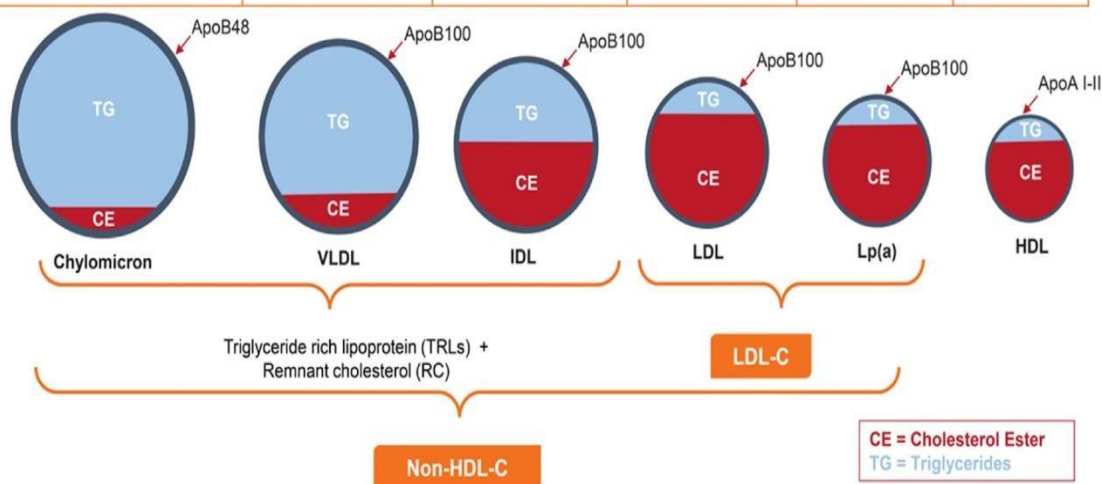
Figure 3 : Synthèse des caractéristiques principales des lipoprotéines (adaptée de Bruckert & Le Goff 2017, Raja et al. 2023).

Tableau II. Caractéristiques physico-chimiques des lipoprotéines humaines.

Lipoprotéine	Taille (nm)	Densité (g/mL)	Mobilité électrophorétique	Composition (% masse)	Principales apolipoprotéines (apo)
				TG/CE/CL/PL/Prot	
Chylomicrons	75-1 200	0,93	Aucune	90/2/1/5/2	B48, E, C
VLDL	30-80	0,93-1,006	préβ	54/13/7/16/10	B100, E, C
IDL	27-50	1,006-1,019	préβ	20/34/9/20/17	B100, E
LDL	18-27	1,019-1,063	β	4/41/11/21/23	B100
HDL	7-12	1,063-1,21	α	4/14/4/27/49	A-I, A-II
préβHDL	< 7	1,21-1,25	préβ	nd/ nd/4/10/86	A-I
Lp(a)	25	1,040-1,115			B100, (a)

VLDL : lipoprotéines de très basse densité ; IDL : lipoprotéines de densité intermédiaire ; LDL : lipoprotéines de basse densité ; HDL : lipoprotéines de haute densité ; Lp(a) : lipoprotéine (a) ; TG : triglycérides ; CE : cholestérol estérifié ; CL : cholestérol libre ; PL : phospholipides ; Prot : protéine. En rouge, l'espèce majoritaire. Nd : non détectable.

Parameters	Chylomicrons	VLDL	IDL	LDL	Lp(a)	HDL
Size (nm)	~75-1000	30-80	25-35	18- 25	~30	5-12
Density (g/ml)	<0.95	0.950- 1.006	1.006- 1.019	1.019- 1.063	1.055- 1.085	1.063- 1.210
TG Content (%)	~85-90	~50-65	~20-30	~5-10	~5	~5-10
Cholesterol Ester Content (%)	~3-5	~10-15	~30-35	~35-48	~35-40	~12-30
Major Apo-proteins	Apo B-48	Apo B-100	Apo B-100	Apo B-100	Apo (a); Apo B-100	Apo A I-II



Le premier tableau dit « *Tableau II* » résume les fondamentaux du métabolisme des lipoprotéines (présenté dans la revue Bruckert & Le Goff 2017) et utilisés pour une vision pédagogique et médicale des lipoprotéines.

La seconde figure résume l'état de l'art des lipoprotéines et en particulier une définition nouvelle remplaçant les LDL par les « non-HDL » en septembre 2023 (revue de Raja et al. 2023 publié à *Atherosclerosis*). De plus, les 2 tableaux de cette figure (Fig. 3) décrivent les caractéristiques physiques clés des particules lipidiques sanguines. La composition en pourcentage de masse est très détaillée dans le premier tableau pour ses 5 composants triglycérides, ester de cholestérol, cholestérol libre, phospholipides et protéines (Bruckert & Le Goff 2017). La figure plus pédagogique de la représentation schématique des lipoprotéines sanguines illustre la distribution respective des teneurs en esters de cholestérol (EC ou CE en anglais) et en triglycérides (TG), ainsi que les apolipoprotéines associées (figure issue de la revue de Raja et al. 2023).

On voit sur cette figure qu'en suivant le non-HDL et le HDL, on peut couvrir un plus grand nombre de lipoprotéines circulantes, en tout cas celles qui sont mesurées en « routine » médicale. D'autre part, cette figure 3 nous indique qu'une mesure des lipoprotéines majeures Apo-B100 et Apo-A1 renforcent les observations biochimiques de routine. Ceci pourra conduire à la disparition du seul LDL comme témoin unique du traitement des dyslipidémies. Ces lipoprotéines sont connues dans le domaine de la recherche depuis de nombreuses années. Cette transposition en clinique et pratique médicale sera plus longue certainement. L'enseignement médical présenté par Bruckert & Le Goff (2017) ne met pas en avant ces nouvelles avancées. Il laisse apparaître qu'il faut suivre les constituants biochimiques (CT+LDL+HDL) en même temps. Le taux de triglycérides circulants permet d'approfondir cette régulation complexe. Ce sera une des originalités que nous voulons mettre en place dans notre essai clinique d'intervention.

Le rapprochement de ces deux points de vue montre l'évolution des biomarqueurs de la dyslipidémie en une dizaine d'années. Il est utile de rappeler les caractéristiques générales des lipoprotéines. Les lipoprotéines peuvent être classées sur la base de leur densité hydratée, mobilité, taille et proportion cholestérol/triglycéride ainsi que les apolipoprotéines majoritaires (Figure 3). La densité hydratée est directement fonction des proportions de lipides et de protéines.

Six classes principales peuvent ainsi être individualisées : les chylomicrons, VLDL (Very Low Density Lipoprotein), les IDL (Intermédiaire Density Lipoprotein), les HDL (High Density Lipoprotein), les LDL (Low Density Lipoprotein) et les Lp(a) (Lipoprotein(a)). La proportion cholestérol forme ester (EC ou CE pour l'anglais) par rapport au contenu en TG est indiquée. Cette subdivision est importante. En effet, des études ont révélé la corrélation entre le risque d'apparition d'évènements cardio-vasculaires et certains types de lipoprotéines.

D'autres lipoprotéines existent comme le montre le tableau 1. Les différentes populations de lipoprotéines se distinguent par leur mobilité électrophorétique (utile en recherche et en clinique dans leur dosage circulant), par leur taille, leur densité mais aussi par la composition lipidique du cœur hydrophobe.

Les chylomicrons et VLDL contiennent principalement des triglycérides alors que les LDL et les HDL contiennent principalement des esters de cholestérol (Figure de Raja et al. 2023). Ce déséquilibre de composition du cœur hydrophobe constitue un véritable moteur dans le métabolisme des lipoprotéines. Le cœur hydrophobe est le principal réservoir lipidique des lipoprotéines. Les apolipoprotéines, situées à la surface, confèrent à chaque lipoprotéine son identité, ses propriétés fonctionnelles et son devenir métabolique.

La diversité structurale et fonctionnelle des apolipoprotéines est à l'origine de la multiplicité des sous-populations lipoprotéiques. L'identité de chaque lipoprotéine est le fruit de la combinaison d'un sujet d'intérêt croissant dans le développement de l'athérosclérose comme l'indique la récente revue de Li et al. (2023).

Ces apolipoprotéines (exogènes avec des peptides spécifiques ou endogènes avec par exemple des oligonucléotides anti sens Anti-apo) représentent des cibles d'intervention thérapeutique dans la prévention et le traitement de l'athérosclérose (Li et al. 2023). L'objectif est d'augmenter les quantités de cette protéine apoA1 et d'inhiber les apoB100. Ces stratégies peuvent s'appliquer à toutes les apolipoprotéines. En règle générale, un examen EAL ou Évaluation des Anomalies Lipidiques implique le cholestérol total, les LDL, HDL et TG s'opère en première intention et pratique médicale courante de médecine de ville.

Tableau 1 : Lipoprotéines ; propriétés et composition en Apolipoprotéines. Adapté et complété du chapitre Lipoprotéines Marieb (2016).

Lipoprotéine	Mobilité Électrophorétique	Densité (g/ml)	Taille (nm)	Proportion EC/TG	Principales Apolipoprotéines
Chylomicrons	Pas de migration	0,93	75-1200	1/19	B48, E
VLDL	préβ	0,93-1,006	30-80	1/3,3	B100, E
IDL	IDL Préβ lent	1,006 1,019	27-35	1/3,5	B100, E
LDL	β	1,019-1,063	18-27	1/0,23	B100
HDL2	α	1,063-1,125	9-12	1/0,22	A-I, A-II
HDL3	α	1,125-1,210	7-9	1/0,19	A-I, A-II
préβHDL	préβ	1,210-1,250	<7	Nd	A-I
Lp(a)		1,040-1,115	25	1/5	B100, (a)

Tableau 2 : Apolipoprotéines impliquées dans le métabolisme des lipides : localisation tissulaire, distribution, fonction enzymatique ou récepteurs. (Adapté de Marieb 2016 et Von Eckarstein et al. 2023).

Protéines	Tissu	Distribution dans particule lipoprotéique	Fonction Enzymatique-récepteurs
Apo A1 (majeure)	Foie intestin	Chylomicrons (CM), HDL	lécithine-cholestérol acyltransférase (LCAT)
Apo A2	Foie, intestin	HDL	(LCAT)
Apo A-IV	Foie, intestin	Chylomicrons, HDL	Transport reverse du cholestérol Activateur de la LCAT, Métabolisme des lipoprotéines riches en triglycérides
Apo A-V	Foie	Riches en TG	Metabolisme des lipoprotéines
Apo B-100	Foie	VLDL, IDL, LDL	Structurelle, synthèse et sécrétion des VLDL, ligand du récepteur LDLR
Apo B-48, Majeure CM	Intestin	Chylomicron CMR rémanent	Structurelle, synthèse et sécrétion des chylomicrons, ligand du récepteur B48R
Apo-CI	Foie, (intestin)	Chylomicron VLDL, HDL	-Inhibiteur physiologique de la CETP -Activateur de la LCAT -Inhibiteur de la liaison aux LDLR , LRP , VLDLR
Apo-CII	Foie (intestin)	Chylomicron VLDL, HDL	Activateur physiologique (cofacteur) de La LPL .
Apo-CIII	Foie (intestin)	Chylomicron VLDL, HDL	Idem à Apo-CII Inhibe la captation hépatique des lipoprotéines riches en TG
Apo-D (apo A3)	Foie, intestin, rate, pancréas, cerveau, surrénales, rein	HDL, LDL, VLDL	Transport reverse du cholestérol
Apo E	Cerveau Foie, macrophage,	ChylomicroVLDL, Remnants, IDL, HDL	Ligand des récepteurs LDL (LDLR) et LRP
Apo F	Foie	LDL (VLDL-HDL)	Inhibiteur de la CETP

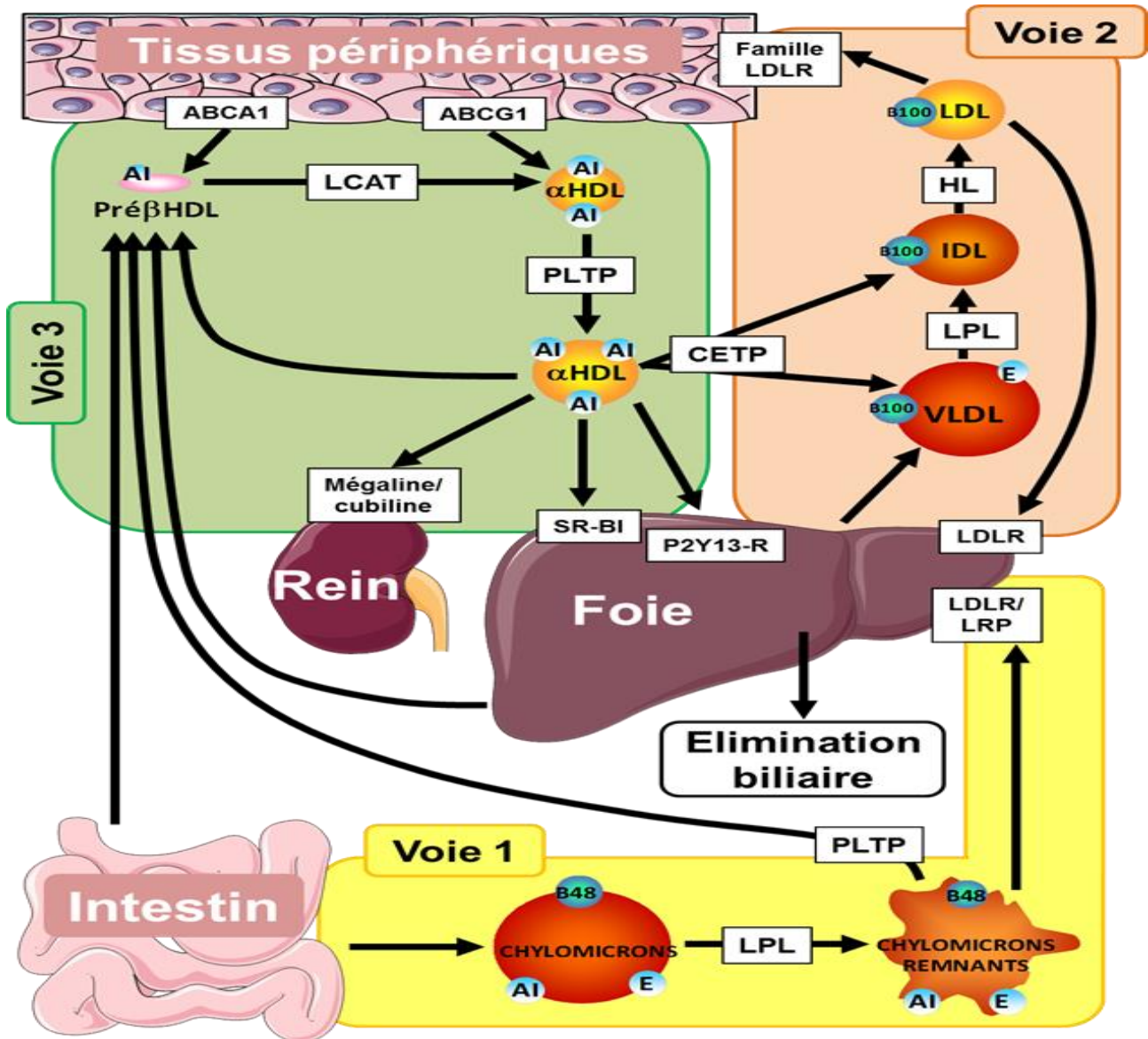
Apo G , Apo H		HDL	?
Apo J		HDL	Anti-inflammatoire
Apo L		HDL	Immunité innée
Apo M		HDL	Generations des pré-βHDL
Apo SAA		HDL+chylomicrons	Phase aiguë de l'inflammation
ABCA1	Endothelium	Pré-HDL, disque d'Hdl, HDL s	Famille des transporteurs ABC

CETP: Cholesteryl ester transfer protein; LRP: LDL receptor-related protein; LPL: Lipoprotein lipase; LCAT: Lécithine/cholesterol acyltransferase; HL: Hepatic lipase. La **lécithine-cholestérol acyltransférase (LCAT)** est une enzyme de type acyltransférase qui permet le transfert d'un acide gras à partir de la lécithine (phosphatidylcholine sur le cholestérol dans le cadre de la formation des stéroïdes. **CETP** (Transfert des Esters de Cholestérol des HDL vers VLDL). **LPL** : enzyme qui hydrolyse les triglycérides contenus dans les VLDL et les chylomicrons. ABCA1 protéine membranaire (ATP-binding cassette A1) intervenant dans les transports du cholestérol intracellulaire & membrane cellulaire.

Durant leur transit intravasculaire, les lipoprotéines subissent les remaniements constants par des enzymes, cofacteurs, ainsi que par des récepteurs membranaires (Lutjohann et al. 2023, Von Eckardstein 2023).

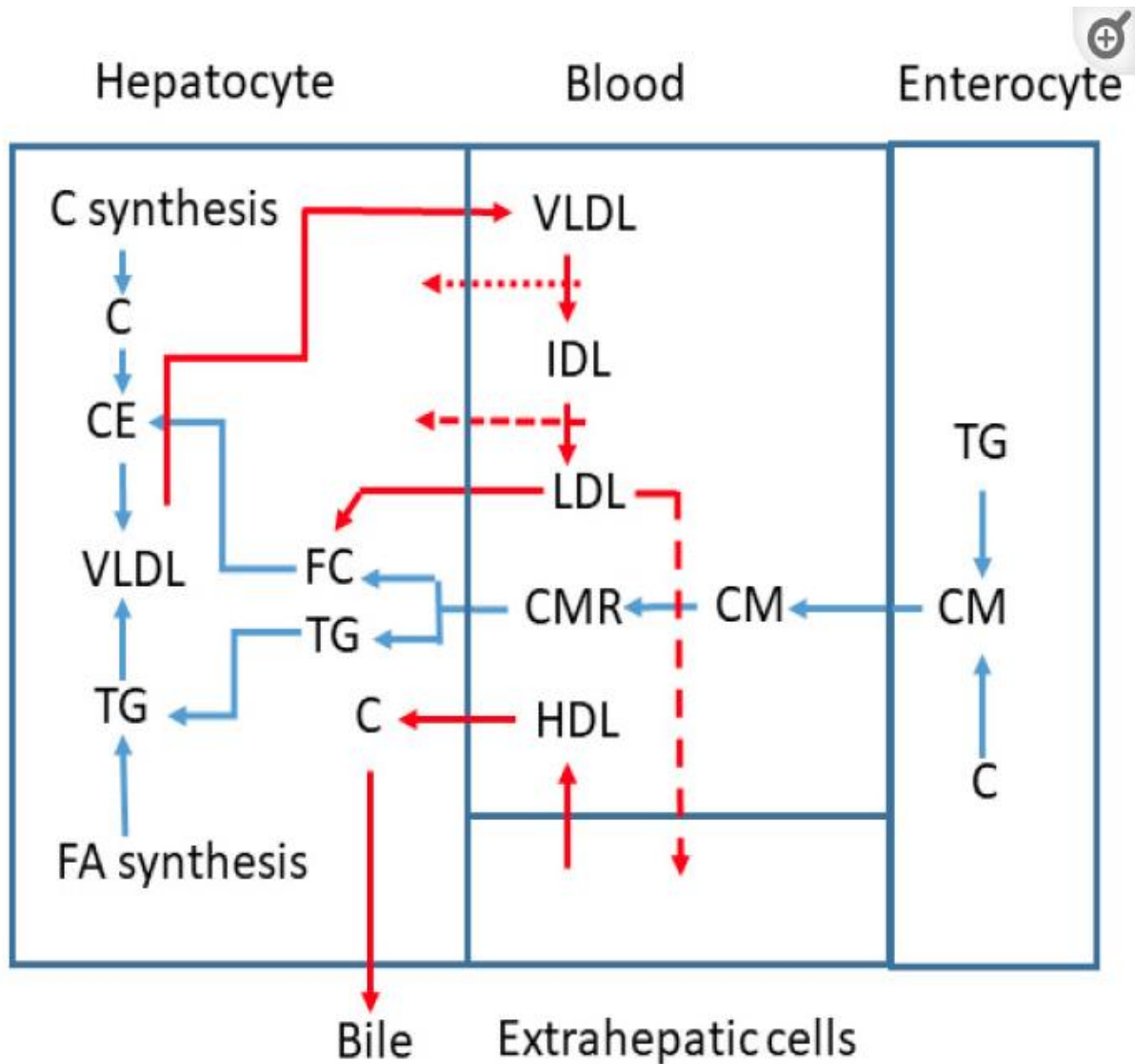
La figure 4 très pédagogique de Marieb (2016) nous illustre ces échanges dans l'organisme.

Figure 4 : Illustration de la physiologie des échanges des lipoprotéines (réf. Marieb 2016).



On peut modéliser à l'aide d'une compartimentation de ces échanges, comme l'illustre la figure 5 suivante. En conséquence, trois grands types de tissus jouent un rôle majeur dans le métabolisme des lipoprotéines comme le montre synthétiquement la figure 3 reprise du travail de Luthohan et al. (2022). La figure 3 spécifie les acteurs clés avec l'intestin, le foie et les tissus périphériques (le muscle squelettique est l'un des gros contributeurs), et définit 3 voies de métabolisme entre les différents tissus. Comme le montrent les figures 3 et 4, l'intestin avec ses entérocytes permet l'absorption du bol alimentaire riche en lipides (cholestérol) et une incorporation dans les chylomicrons. Les chylomicrons sont les premières lipoprotéines de très grande taille. Elles se sont enrichies en triglycérides.

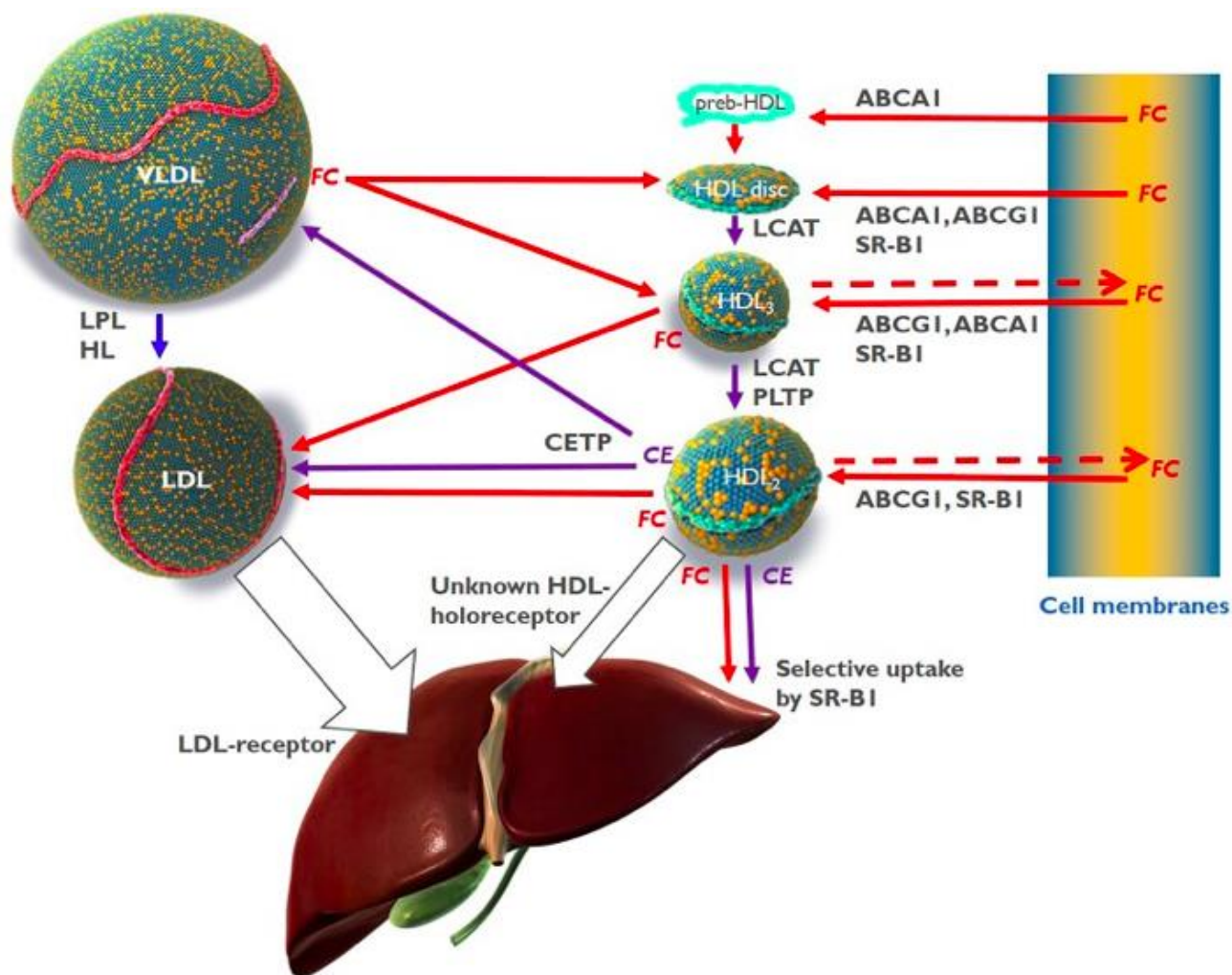
Figure 5 : Compartimentation des circuits des lipoprotéines avec le cholestérol et les triglycérides (d'après Lutjohann et al. 2022).



Les chylomicrons entérocytaires migrent dans le système lymphatique puis vasculaire, et se transforment en chylomicrons rémanents reconnus par le LDL récepteur et LRP hépatiques. (Gauthier et al. 2011, Lütjohann et al. 2023). Le foie a pour rôle central la redistribution vers les organes périphériques. Cette redistribution nécessite la synthèse de VLDL qui constitue l'organe central de gestion du métabolisme et du transport des lipides. Enfin, les tissus périphériques peuvent incorporer des lipides, par endocytose et hydrolyse de triglycérides soit venant de l'intestin soit issus du métabolisme hépatique.

La figure 5 la plus récente a été réalisée en 2023 et se focalise sur la voie des HDL en parallèle de celle des LDL. Elle intègre les récepteurs membranaires à ces lipoprotéines (HDL comme voie centrale) et souligne l'importance du foie et de ses récepteurs dans la maturation et le remodelage (passage d'une forme d'un disque à une sphère) des lipoprotéines plasmatiques.

Figure 6 : Transferts de cholestérol entre les lipoprotéines de haute densité les lipoprotéines de très basse densité, les lipoprotéines de basse densité et les cellules et le foie (Von Eckarstein et al. 2023).



ABCA1, ATP-binding cassette transporter A1 ; ABCG1, ATP-binding cassette transporter G1 ; CE, cholesteryl ester ; CETP, cholesteryl ester transfer protein ; FC, cholestérol libre, cholestérol non estérifié ; HDL, High-Density Lipoprotein ; HL, Hepatic lipase ; LCAT, lecithin : cholestérol acyltransférase ; LDL, lipoprotéine de basse densité ; LPL, lipoprotéine lipase ; PLTP, protéine de transfert des phospholipides ; SR-B1, scavenger receptor B1.

Il est intéressant de noter que ces sous-classes de HDL contiennent souvent des protéines spécialisées qui remplissent des fonctions connexes ou complémentaires. Elles ont une composition prédéfinie de protéines centrales qui reste relativement stable tout au long de leur cycle de vie.

En revanche, la composition lipidique des particules de HDL est très dynamique (Gautier et al. 2011, Madsen et al. 2017). ABCA1 fait circuler les glycérophospholipides et le cholestérol des membranes cellulaires, en particulier vers l'apoA-I dépourvue de lipides ainsi que vers les petites HDL pauvres en lipides. La LCAT génère des esters de cholestérol et des lysophosphatidylcholines par le transfert d'acides gras.

La lipase endothéliale et la lipase hépatique hydrolysent les triglycérides des HDL, générant des acides gras libres. La CETP échange les esters de cholestérol des HDL contre des triglycérides provenant de lipoprotéines contenant de l'apoB100. Le cholestérol non estérifié peut être facilement accepté par les HDL à partir des lipoprotéines riches en triglycérides lipolysées (TGRL) (Figure 6) ou par les membranes cellulaires, mais il est également transféré des HDL vers les LDL ou les cellules (figure 2). Les HDL exercent ces fonctions par le biais de trois mécanismes principaux dans le transport du cholestérol :

- La fonction la plus étudiée des HDL est le transport inverse du cholestérol (RCT). (Kontush 2020). Selon ce modèle, les HDL provoquent un efflux de cholestérol à partir des cellules spumeuses des plaques d'athérosclérose, soit de manière spécifique, par le biais d'interactions séquentielles avec ABCA1 (cholestérol et phospholipides et ApoA1) et ABCG1 (cholestérol seul sur les HDL sphériques (Ong et al. 2022, Matsuo et al. 2022).

- Le cholestérol libre est ensuite estérifié par la LCAT sur les HDL discoïdales pour devenir des HDL sphériques (Figure 5 et Zannis et al. 2006, Ong et al. 2022). Leur élimination par le foie se fait soit directement par absorption sélective via SR-BI, soit indirectement après transfert médié par la CETP vers des lipoprotéines contenant de l'apoB, et qui sont ensuite internalisées par le récepteur des LDL.

- Le transport inverse du cholestérol est particulièrement important pour l'élimination du cholestérol. Le doublement des taux de C-HDL lors de l'inhibition de la CETP indique que le blocage de cette voie indirecte n'est pas compensé par l'élimination directe des HDL et de leur « cargaison » de cholestérol. Ce transport est particulièrement important pour l'élimination du cholestérol des macrophages : suite à l'accumulation de cholestérol, les macrophages exercent plusieurs activités pro-inflammatoires qui sont atténuées par l'efflux de cholestérol médié par les HDL (Figure X Duan et al. 2022). De plus, les adipocytes sont enrichis en cholestérol pour former les biomembranes qui entourent les gouttelettes lipidiques. L'hydrolyse des triglycérides dans les adipocytes blancs en cas de jeûne ou dans les adipocytes bruns en cas de production de chaleur s'accompagne d'une rupture de ces membranes et de la libération de quantités considérables de cholestérol pour la RCT.

De plus, les HDL modulent l'action inflammatoire des cellules immunitaires innées et adaptatives, soutiennent l'intégrité et la fonctionnalité des barrières endothéliales, stimulent l'angiogenèse, et assurent l'homéostasie énergétique en stimulant la synthèse et la sécrétion d'insuline par les cellules bêta du pancréas ainsi que l'absorption du glucose par les adipocytes et les myocytes.

Les HDL acceptent également le cholestérol non estérifié des TGRL, un processus renforcé par

l'hydrolyse des triglycérides par la lipoprotéine lipase et indépendant des phospholipides (Franczyk et al. 2021).

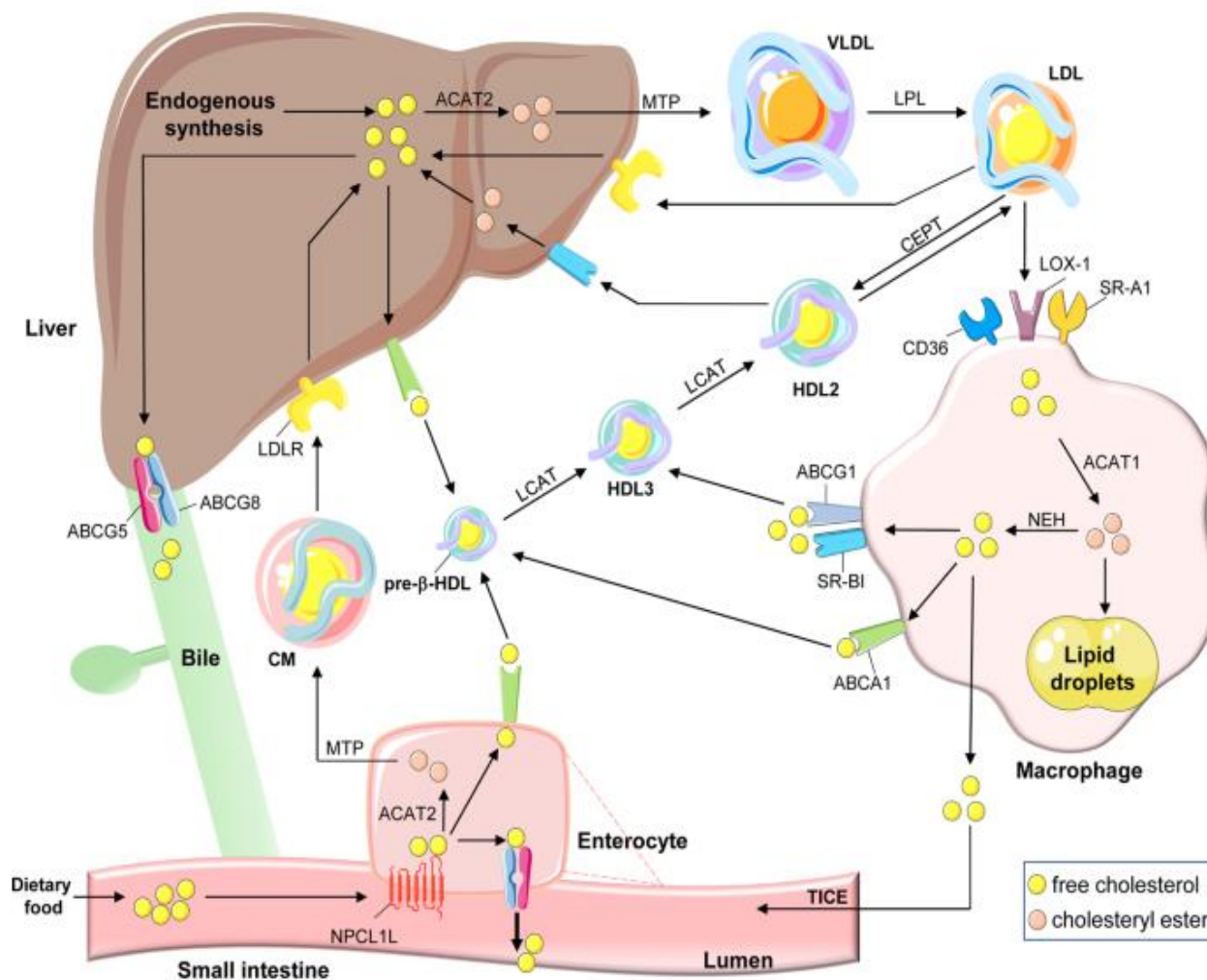
En résumé, les HDL suscitent de nombreuses réponses cellulaires en employant plusieurs modes de communication provoqués par plusieurs modes d'action. L'efflux de cholestérol modifie le contenu en cholestérol de domaines spécifiques de la membrane plasmique, appelés rafts. L'apoA-I avec ABCA1 induisent une transduction du signal via le recrutement de protéines intracellulaires. Les HDL transportent des agonistes de récepteurs de signalisation spécifiques et module également les effets inflammatoires sur les macrophages et une protection contre l'hypoxie cardiaque ou rénale.

Les HDL transportent aussi des micros ARN (miR). L'absorption des holoparticules de HDL dans le foie joue un rôle important dans le métabolisme des HDL (Figure 5).

Dans la figure 7 issue de la revue de Duan et al. (2022) qui schématise le transport du cholestérol libre et du cholestérol estérifié (rond jaune et rond rosé respectivement). Les transporteurs ABCG5 et ABCG8 (ATP-binding cassettes) sont impliqués dans l'excrétion du cholestérol par la bile au niveau hépatique mais aussi au niveau de l'entérocyte pour une excrétion intestinale. Le transporteur ABCA1 a un rôle ubiquitaire du retour du cholestérol libre vers la lipoprotéine pré-HDL. La protéine membranaire NCPL1L de la membrane entérocytaire permet le transport du cholestérol. Enfin le rôle du macrophage (riche en gouttelettes lipidiques) sera un élément important dans la genèse de l'athérosclérose en général.

Figure 7 : Physiologie des échanges du cholestérol libre ou estérifié, schéma simplifié (Reprise de la fig. 3 de la revue de Duan et al. 2022).

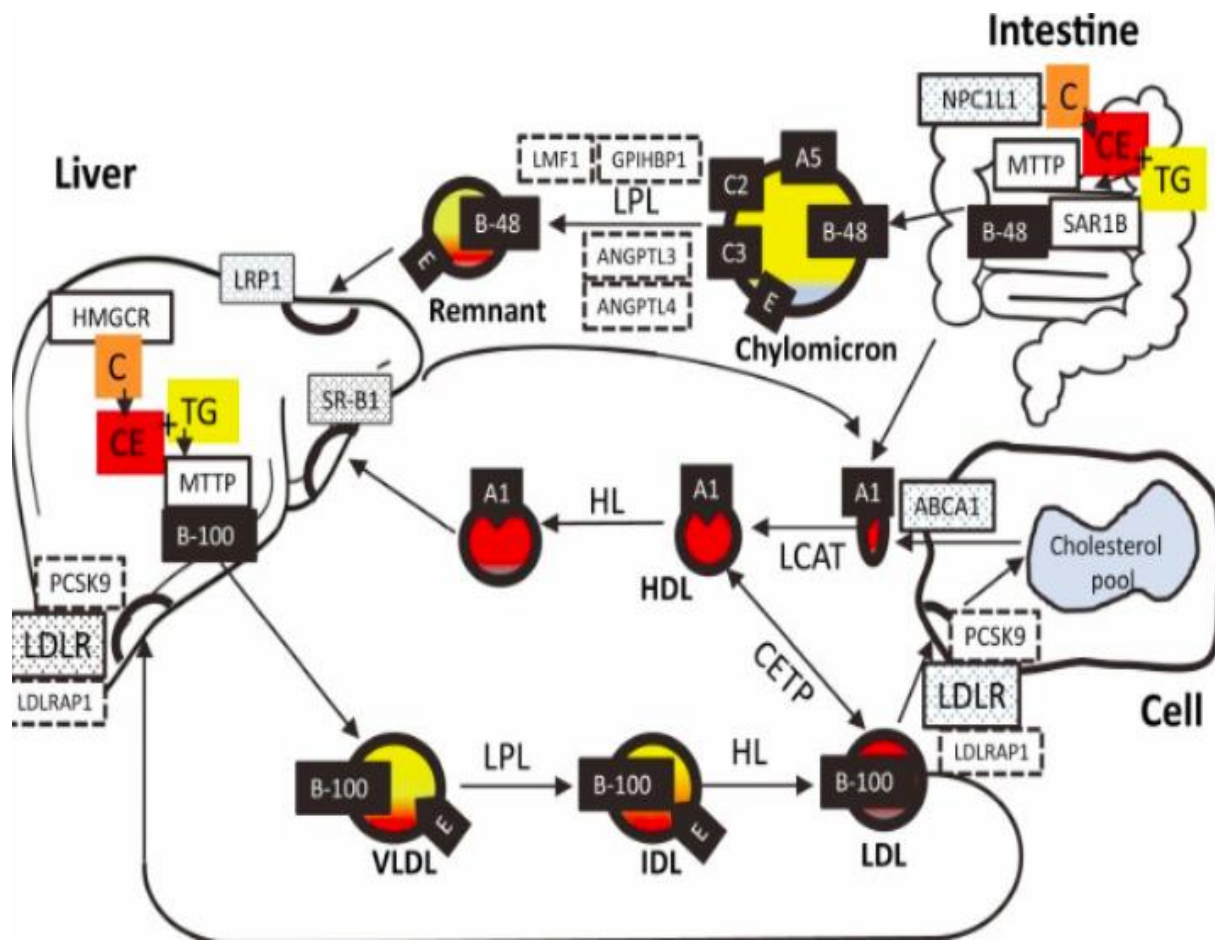
Fig. 3



La figure 8 issue de la revue de Kirkpatrick et al. (2023) intègre le métabolisme des triglycérides depuis les organes intestin et foie et les cellules. Les triglycérides représentés par la couleur jaune reprennent nos propos précédemment présentés pour les lipoprotéines. Ce schéma intègre les interventions pharmacologiques diverses suite aux succès des traitements par les statines. Il permet de distinguer l'importance de la voie chylomicrons-rémanent pour ce transport. La lipoprotéine Apo B48 est un marqueur caractéristique de cette voie. L'apo B100 permet de distinguer le transport de triglycérides dans les IDL et VLDL en plus des LDL. On voit aussi l'importance de la mesure des Apo-A1 spécifique des différents HDL. Cependant, de nouvelles investigations sont nécessaires pour confirmer ces données de façon plus spécifique, notamment pour l'apo A1 et l'apo B, et éventuellement étudier l'influence des thérapeutiques sur la mortalité totale des profils à risque.

L'approche dite moderne ou actuelle est d'incorporer le dosage des apolipoprotéines dans les études de la dyslipidémie comme le montre la figure schématisant ces dosages réalisables en relation avec la physiologie des lipides circulants (Berberich et Hegele, 2022). Comme nous nous proposons de faire une étude d'intervention, cette figure illustre les différentes cibles pharmacologiques ayant abouti à des nouveaux traitements ou en cours d'investigation. Les études d'intervention sur la dyslipidémie restent très actives et d'actualité malgré la place principale occupée par le traitement à l'aide de statines.

Fig. 8 : Métabolisme des lipides plasmatiques (cholestérol et TGs). (Berberich et Hegele, 2022).



Le cholestérol libre (orange), estérifié (rouge) triglycérides (jaune) et les lipoprotéines (symbolisées avec des boîtes noires). Les récepteurs (rectangles traits pleins) et transporteurs ainsi que les protéines accessoires (rectangles en pointillés).

En conclusion de cet aperçu sur la période 2000-2023 orienté vers l'application à notre protocole d'étude clinique, il est important de rappeler que l'étude de la cohorte suédoise [AMORIS] publiée dans « the Lancet » a montré dès 2001 que les taux élevés d'apoB sont fortement liés à l'augmentation du risque cardiovasculaire à la fois chez les hommes et les femmes, et ceci pour une étendue d'âge très large (Walldius et al. 2001).

Dans cette étude épidémiologique, l'apoB est un marqueur de risques cardiovasculaires beaucoup plus fort que le cholestérol LDL, et ce quel que soit le niveau de cholestérol. Le lien potentiel entre apoB et particules LDL petites et denses est très grand, surtout chez les patients diabétiques ou les sujets avec un syndrome métabolique qui ont des taux de cholestérol LDL autour de la médiane, mais un nombre de particules LDL petites et denses plus élevé, démontré par les taux élevés d'apoB. Ensuite le rapport apoB/apoA1 pourrait être plus prédictif que celui utilisé en routine LDL/HDL (Walldius et al. 2004). En 2012 cette même équipe associe les apolipoprotéines à toutes causes de mortalité (Ding et al. 2021).

De même cette année, le suivi de cette cohorte (Huang et al.2023, Xiao et al. 2023), soit après 30 ans de suivi, les biomarqueurs HDL, non-HDL (pour rappel estimé des mesures plasmatiques de la différence entre le cholestérol total et les HDL (soit TC-HDL)), sont associés avec différents cancers comme par exemple celui de la thyroïde. Ces différentes associations sont bien sûr individuelles et dépendantes de la concentration en biomarqueurs. L'association des triglycérides est la seule à dépendre linéairement de concentration pour apprécier l'espérance de vie.

Pour les autres marqueurs de la dyslipidémie, la juste dose (point bas sur une courbe en forme de U ou de J) permet la meilleure espérance de vie (Ding et al. 2021). L'apoA-I est aussi fortement corrélée avec le cholestérol des HDL.

Dans le cadre de notre étude pour le thé Hao Ling, après les incertitudes concernant la consommation de thés verts et noirs ainsi que les quantités consommées (Yang et al. 2022, étude chinoise), il est nécessaire d'ajouter d'autres marqueurs plasmatiques. Ainsi observer une diminution de l'apoB de 15 à 45% avec simultanément une augmentation des taux d'Apo A-I de 5 à 15% indiquerait une efficacité réelle du thé Pu-erh comme constituant majeur. Ces marqueurs pourraient donc aussi être très utiles dans le suivi thérapeutique (Ding et al. 2021). Ces marqueurs ont ainsi été retenus pour notre étude de la dyslipidémie avec le thé (Article 1 protocole d'étude du thé Hao Ling).

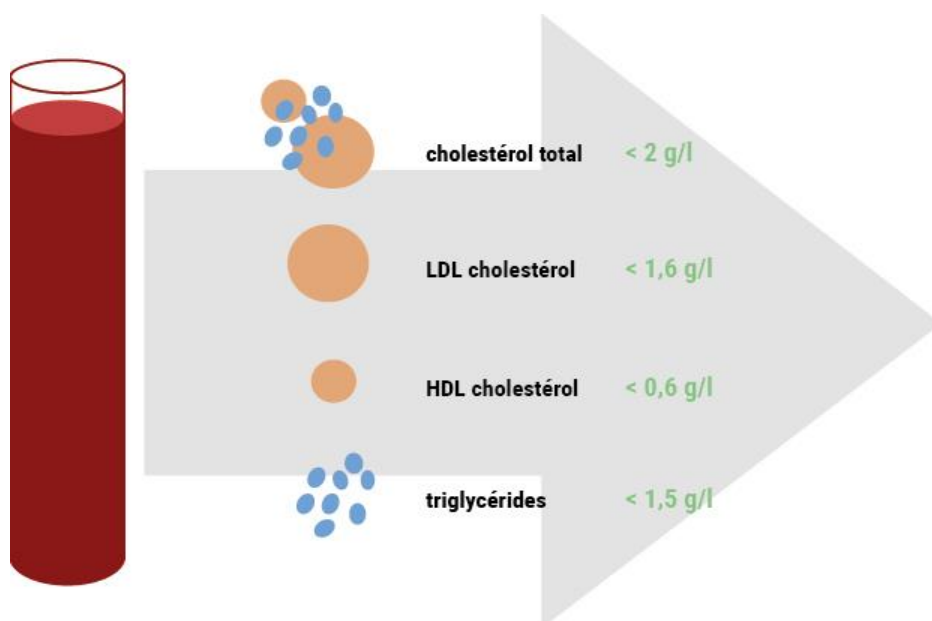
Partie 2 : Prise en charge des dyslipidémies

Les patients à risques élevés ne peuvent être inclus dans une étude nutritionnelle de prévention avec les hypercholestérolémies familiales. Dans certaines formes de dyslipidémie, notamment dans les hypercholestérolémies familiales, des taches sur la peau appelées « xanthomes » peuvent apparaître. (Berberich AJ et al. 2022). Ce sont des formations jaunes ou oranges, de petite taille, réalisant des petites protubérances sous-cutanées, et qui témoignent d'un excès de cholestérol sanguin. De même, les « xanthomes tendineux » correspondent à la formation de petits nodules, durs et mobiles, pouvant apparaître au niveau des tendons extenseurs des doigts, sur les poignets ou sur les tendons d'Achille principalement. Les « xanthélasmas » sont de petites tuméfactions jaunâtres, en relief, sur les paupières. Le dépôt de cholestérol LDL peut également se voir au niveau oculaire avec l'apparition d'un « arc cornéen ».

En dehors des xanthomes, xanthélasmas et arcs cornéens les dyslipidémies appartiennent au groupe des « maladies silencieuses ». Elles évoluent à bas bruit et peuvent, pendant de nombreuses années, ne provoquer aucun symptôme. Seules les conséquences cardiovasculaires (IDM, AVC, artériopathies périphériques) apparaissant le plus souvent de manière tardive, sont symptomatiques.

Le bilan lipidique anormal est l'élément central de l'inclusion.

Figure 9 : Les valeurs normales du bilan lipidique anormal



Le dépistage d'une dyslipidémie repose donc essentiellement sur la réalisation d'un bilan biologique (EAL = exploration d'une anomalie lipidique) qui détermine les concentrations de cholestérol total, de triglycérides et de HDL-C. Celui-ci doit être impérativement réalisé à jeun (au moins 12 heures de jeûne) pour être interprétable. Le diagnostic de l'hypercholestérolémie est posé lorsque le taux de LDL-C est supérieur ou égal à 1,60 g/L. Celui-ci est calculé grâce à la formule de FRIEDWALD, qui n'est valable que pour un taux de triglycérides inférieur strictement à 4g/L.

De même, une hypertriglycéridémie est définie par un taux de triglycéride supérieur ou égal à 1,50 g/L. A l'inverse, le HDL-C a un effet protecteur lorsqu'il est supérieur à 0,45 g/L chez l'homme et 0,55 g/L chez la femme. La formule suivante est couramment utilisée par les laboratoires de biochimie et les médecins généralistes en routine. Formule de FRIEDWALD :

$LDL-C \text{ (g/l)} = \text{cholestérol total} - HDL-C - (\text{triglycérides}/5)$ Soit en mmol/l $LDL-C \text{ (mmol/l)} = \text{cholestérol total} - HDL-C - (\text{triglycérides}/2,2)$ (Frickert et Le Goff, 2017).

Les dyslipidémies avec les dyslipidémies secondaires de type II a, B sont à retenir.

Elles représentent 40% des dyslipidémies et elles sont regroupées selon leurs causes secondaires à l'alcool à l'origine (le plus souvent associé à une hypertriglycéridémie) ou plus classiquement à un régime trop riche en graisses saturées ou en cholestérol.

Les autres causes sont iatrogènes (médicaments), ou liées avec une autre pathologie comme le diabète, thyroïde ou rénale (Von Eckardstein et al. 2023). On distingue selon la classification de FREDRICKSON 6 grands types de dyslipidémies en fonction du type de lipoprotéines le plus élevé. (Quarfordt et al. 1973).

Le tableau suivant présente cette classification (adapté de Fricker & Le Goff, 2017).

Tableau 3 : La classification des dyslipidémies selon Fredrickson (D’après Fricker et le Goff, 2017).

Tableau I. Classification des dyslipidémies de Fredrickson.

Classification internationale (Fredrickson)	Type	Lipoprotéines élevées	Principaux lipides augmentés
I	Hypertriglycériémie	Chylomicrons	TG
Ila	Hypercholestérolémie	LDL	Cholestérol
Ilb	Hyperlipidémie mixte	LDL, VLDL	Cholestérol
III	Hypertriglycériémie	Remnants de chylomicrons, IDL	TG, Cholestérol
IV	Hypertriglycériémie	VLDL	TG
V	Hypertriglycériémie	Chylomicrons, VLDL	TG

LDL : lipoprotéines de basse densité ; VLDL : lipoprotéines de très basse densité ; IDL : lipoprotéines de densité intermédiaire ; TG : triglycérides.

L’hypercholestérolémie pure est la plus fréquente des dyslipidémies puisqu’elle représente 75% des dyslipidémies rencontrées dans la population adulte française âgée de 35 à 64 ans (HAS 2021). Sa prévalence, en France, dans la population adulte non traitée pour une dyslipidémie est évaluée à 30%.

Etat des lieux des différentes recommandations : revue de la littérature

Il a été estimé dès 2005 dans la revue de référence “The Lancet” présentant une méta-analyse incluant 14 essais thérapeutiques randomisés, que l’abaissement du LDL d’1 mmol/L soit 0,39 g/l pendant 5 ans réduisait tout risque cardiovasculaire (Baigent et al. 2005, Ben H dia et al. 2022).

Ces recommandations ont 4 principaux messages concernant : la cible du profil lipidique avec le LDL-C, l’évaluation du risque cardiovasculaire global, le taux de LDL-C à atteindre et le traitement. Dans l’attente d’un outil d’évaluation validé du risque cardiovasculaire, en France la règle est d’additionner les facteurs de risques qui sont :

- 1) L’âge supérieur à 50 ans chez les hommes et 60 ans chez les femmes,
- 2) Les antécédents familiaux de maladie coronaire précoce,
- 3) Un tabagisme actif (en cours ou arrêté depuis moins de 3 ans),
- 4) L’hypertension artérielle,

5) Le diabète de type 2,

6) Un HDL-C inférieur ou égal à 0,40 g/L (0,5 pour les femmes).

Un taux de HDL-C supérieur ou égal à 0,60 g/L a été considéré comme un facteur protecteur. Ce dernier facteur est limité du fait des interventions thérapeutiques récentes discutées auparavant dans ce document.

Cette estimation du risque cardiovasculaire global permet de définir trois niveaux de risque : haut risque, risque intermédiaire et risque faible.

- Le haut risque est défini par une maladie cardiovasculaire connue, et/ou diabétique de type 2 à haut risque cardiovasculaire, et/ou des facteurs de risque multiples aboutissant à un risque coronarien supérieur ou égal à 20% à 10 ans.

- Le risque intermédiaire est défini par la présence d'au moins un des 6 facteurs de risque associé à la dyslipidémie.

- Le risque faible est défini par l'absence de facteur de risque associé à la dyslipidémie.

Dans les études, toutes les statines ont montré un bénéfice sur la morbi-mortalité cardiovasculaire avec le plus haut niveau de preuve. Un contrôle hépatique est impératif dans le trimestre suivant ainsi qu'un dosage des CPK pour de possibles atteintes musculaires.

Les lignes directrices internationales sur la gestion des dyslipidémies

Les lignes directrices conjointes de la Société européenne de cardiologie (ESC) et de la Société européenne d'athérosclérose (EAS) sur la gestion des dyslipidémies permettent la clarification des indications au traitement et l'amélioration de la prise en charge globale des patients (Cheeley et al. 2023). Cette revue précise aussi les intolérances et la conduite de la prise en charge dans les pays anglo-saxons et latins. Ces dernières comptent de nombreuses innovations (risques cardiovasculaires très élevés à modérés). Concernant l'évaluation du niveau de risque cardiovasculaire global du patient, les recommandations européennes sont basées sur le système SCORE (Systematic Coronary Risk Evaluation). Le non-HDL-C, défini par la soustraction cholestérol total moins le HDL-C, était une cible de deuxième intention ou cible substitut au LDL-C tout comme l'apolipoprotéine B (protéine de transport du LDL et du VLDL).

Le traitement du patient dyslipidémique par les statines a des effets indésirables

Sur le plan thérapeutique, les recommandations européennes mettent l'accent sur l'abaissement du taux de LDL-C qui reste l'objectif principal, et sur l'importance du style de vie, notamment sur l'alimentation et l'exercice. Les statines inhibitrices de l'hydroxyméthylglutaryl-COA réductase restent le médicament de choix pour abaisser le LDL-C. Ses effets indésirables sont essentiellement des myalgies et les sévères les rhabdomyolyses (HAS 2010). Cependant pour l'Agence Européenne des médicaments et l'Agence Américaine FDA cette augmentation de risque ne doit pas remettre en question le rapport bénéfice/risque des statines qui reste positif dans la prévention cardiovasculaire.

Suite à ces polémiques sur les effets indésirables, les patients craignent l'utilisation des statines en France. Aussi le rôle du praticien est de recommander les règles hygiéno-diététiques.

Hygiène de vie alimentation et nutrition

Pour abaisser le LDL-C et réduire le risque cardiovasculaire, un changement hygiéno-diététique combinant le régime hypolipémiant à l'exercice physique d'endurance régulière adaptée aux capacités du patient est obligatoire (Conroy et al. 2003). Chez un patient avec risque cardiovasculaire intermédiaire ou faible, le traitement médicamenteux hypolipémiant doit être introduit secondairement après une période de 4 mois. C'est dans ce cadre que l'intervention nutritionnelle avec la boisson constituée par le thé en infusion est possible (Article 1).

Le traitement diététique ou règles hygiéno-diététiques bien conduit doit pour cela être instauré avec une motivation suffisante du prescripteur et du patient. Les modifications du régime alimentaire ont pour but essentiellement la diminution de la consommation des graisses d'origine animale, (acides gras saturés), et la correction pondérale si nécessaire. Elles doivent être présentées sous forme positive.

Les modifications du régime alimentaire comprennent quatre catégories de mesures (Kirkpatrick et al. 2023). Il estime les bénéfices des interventions nutritionnelles sur la concentration plasmatique des LDL avec un effet bénéfique cumulatif escompté.

Tableau 4 : Modification du régime alimentaire lors d'une dyslipidémie proposée par Kirkpatrick et al. (2022).

Table 7 Estimated cumulative LDL-C lowering with selected nutrition interventions*

Nutrition Intervention	Estimated LDL-C ↓
Replacement of 5% energy from SFAs with unsaturated fatty acids	5% to 10%
7.5 g/day viscous fiber	6% to 9%
2 g/day plant sterols/stanols	5% to 8%
30 g/day plant protein [†]	3% to 5%
Loss of 5% of body weight, if excess adiposity is present	3% to 5%
Total expected effect	22% to 37%

*The sum of the cumulative effects of the selected nutrition interventions are theoretical based on the results from separate RCTs. Results from dietary intervention studies of free-living participants in which a portfolio of dietary interventions has been applied have shown up to a 30% LDL-C reduction in highly controlled settings and sustained reductions in the range of 12-15% in free-living participants¹³⁹⁻¹⁴¹.

[†]As a replacement for animal protein and/or carbohydrates.

Abbreviations: LDL-C=low-density lipoprotein cholesterol; SFAs=saturated fatty acids.

-Une limitation de l'apport en acides gras saturés (graisses d'origine animale), au profit des acides gras mono ou polyinsaturés avec une augmentation de la consommation en acides gras polyinsaturés oméga 3 (poissons).

-Une augmentation de la consommation de fibres et de micronutriments naturels (fruits, légumes et produits céréaliers).

-Une limitation du cholestérol alimentaire, voire l'utilisation d'aliments enrichis en stérols végétaux.

A ces recommandations, s'ajoute la nécessité de limiter la consommation d'alcool, de contrôler le poids et de corriger une sédentarité excessive.

La revue de Kirkpatrick et al. En 2023 dissocie ces recommandations selon l'objectif de contrôle des LDL ou des TG. La diminution de la consommation d'aliments transformés avec des sucres ajoutés comme la diminution des apports des AGPI oméga 3 à longue chaîne (EPA et DHA) sont recommandées pour une baisse des TG. Cette revue propose dans un second tableau rapporté ici les interventions avec une cible LDL ou TG. Des recommandations sont communes comme les apports protéiques issus de végétaux par exemple.

Tableau 5 : Interventions recommandées pour la nutrition et le mode de vie pour diminuer le LDL et les TG proposées par Kirkpatrick et al. (2022).

Interventions for Lowering LDL-C	Interventions for Lowering TG**
↓ SFAs, TFAs, and dietary cholesterol	↓ Added sugars and refined starches
↑ UFAs intake (5% TDE replacement for SFAs)	↓ Alcohol
↓ Body weight (5-10%), if overweight/obese	↓ Body weight (5-10%), if overweight/obese
↑ Protein, especially plant protein (3-5% TDE)	↑ Protein, especially plant protein (3-5% TDE)
↑ Viscous fiber intake (5-10 g/day)	↑ EPA+DHA intake (2-4 g/day)
↑ Plant stanols/sterols (2 g/day)	↑ Physical activity (≥150 minutes/week) [†]

*The dietary strategies summarized are within the context of an overall healthy lifestyle that includes a recommended dietary pattern, adequate physical activity, avoidance of tobacco products, adequate sleep quantity and quality, and psychosocial stress management.

**In addition to the interventions listed, individualize the macronutrient composition of the dietary pattern. Many patients will achieve TG reduction with dietary fat intake in the range of 20-40% TDE, whereas a lower fat diet (<20% TDE) may be needed in a small number of patients to maintain TG <750 mg/dL.

[†]≥150 min/week of moderate-intensity activity (e.g., brisk walking), ≥75 min/week of vigorous-intensity activity (e.g., jogging or running), or the equivalent combination, plus 2-3 days/week of muscle strengthening exercises.^{4,5,7,8,143}

Abbreviations: DHA=docosahexaenoic acid; EPA=eicosapentaenoic acid; LDL-C=low-density lipoprotein cholesterol; SFAs=saturated fatty acids; TDE=total daily energy; TG=triglyceride; TFAs=*trans* fatty acids; UFAs=unsaturated fatty acids.

Les modifications du régime alimentaire comprennent 4 catégories de mesures :

- Une limitation de l'apport en acides gras saturés (graisses d'origine animale), au profit des acides gras mono ou polyinsaturés.
- Une augmentation de la consommation en acides gras polyinsaturés oméga 3 (poissons).
- Une augmentation de la consommation de fibres et de micronutriments naturels (fruits, légumes et produits céréaliers).
- Une limitation du cholestérol alimentaire, voire l'utilisation d'aliments enrichis en stérols végétaux.

A ces recommandations, s'ajoute la nécessité de limiter la consommation d'alcool, de contrôler le poids et de corriger une sédentarité excessive. Le traitement diététique est proposé à tous les patients

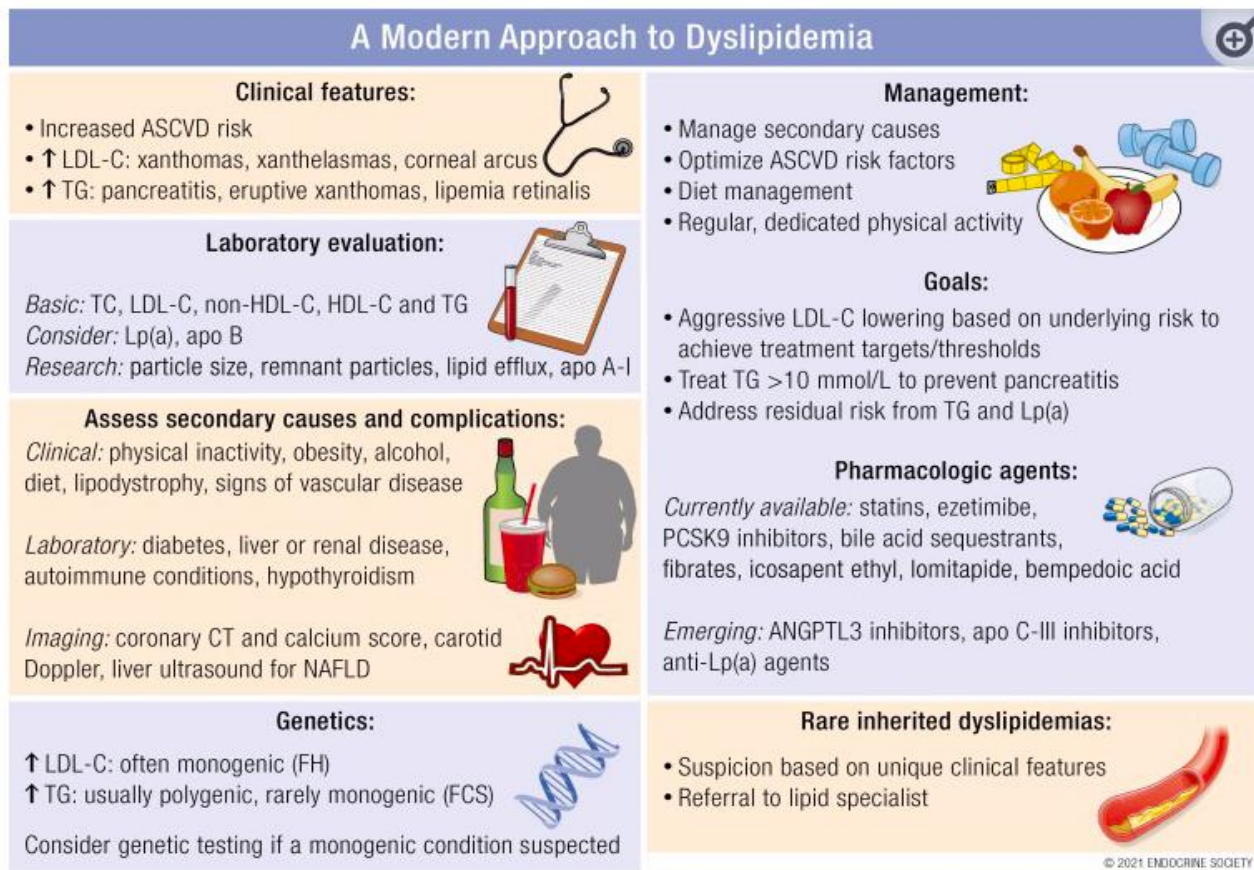
qui n'ont pas une concentration optimale, correspondant à l'objectif thérapeutique déterminé, et il sera poursuivi le plus longtemps possible.

Contrairement aux recommandations européennes, les auteurs des nouvelles recommandations américaines considèrent également que les autres traitements hypocholestérolémiants n'ont pas démontré d'efficacité sur le risque cardiovasculaire lié à l'athérosclérose. La diminution des apports en graisses saturées et trans (SFA +TFA) (beurre, fromages, viandes grasses, charcuterie) devient un objectif principal. Les graisses insaturées entraînant une diminution du CT et du LDL-cholestérol, sont donc autorisées dans le régime des sujets hypercholestérolémiques. Les graisses insaturées (UFAs) sont de deux types : polyinsaturées (huiles riches en oméga 3 de type acide alpha-linoléique, EPA et DHA) et mono insaturées (huiles d'olive et de colza).

Par ailleurs, les apports lipidiques ne doivent pas dépasser 30% de la ration calorique. Même si le cholestérol alimentaire représente une très faible proportion du cholestérol total présent dans l'organisme (10-15 %), il reste essentiel. Il convient donc de diminuer l'apport alimentaire de cholestérol exogène autour de 300 mg/j. Le cholestérol se trouve surtout dans le jaune d'œuf, le beurre, les abats ainsi que dans les viandes, charcuterie, et laitages non écrémés. C'est l'objectif diététique recommandé pour la France.

Notre objectif clinique dans la dyslipidémie concerne l'infarctus du myocarde, conséquence de l'athérosclérose schématisée et des résultats positifs de l'association statines et infarctus du myocarde. L'évaluation inclut les mesures basiques de la dyslipidémie mais nous considérons l'apoB et apoA1 en première intention. Les causes secondaires seront soit exclues (diabète, thyroïde, alcool, obésité), soit recommandées comme la pratique d'un exercice physique régulier avec des recommandations diététiques. Les thérapeutiques disponibles ne seront pas permises car nous privilégions la découverte d'une nouvelle dyslipidémie selon les données du laboratoire avec le LDL-C augmenté. L'approche dite moderne est synthétisée dans la revue de Berberich et al. (2022). Cette approche de la dyslipidémie dans la pratique médicale se focalise sur la diminution de risque cardiovasculaire (ASCVD).

Fig. 10 : Infographie proposée pour une approche moderne de la dyslipidémie (Berberich et al. 2022).

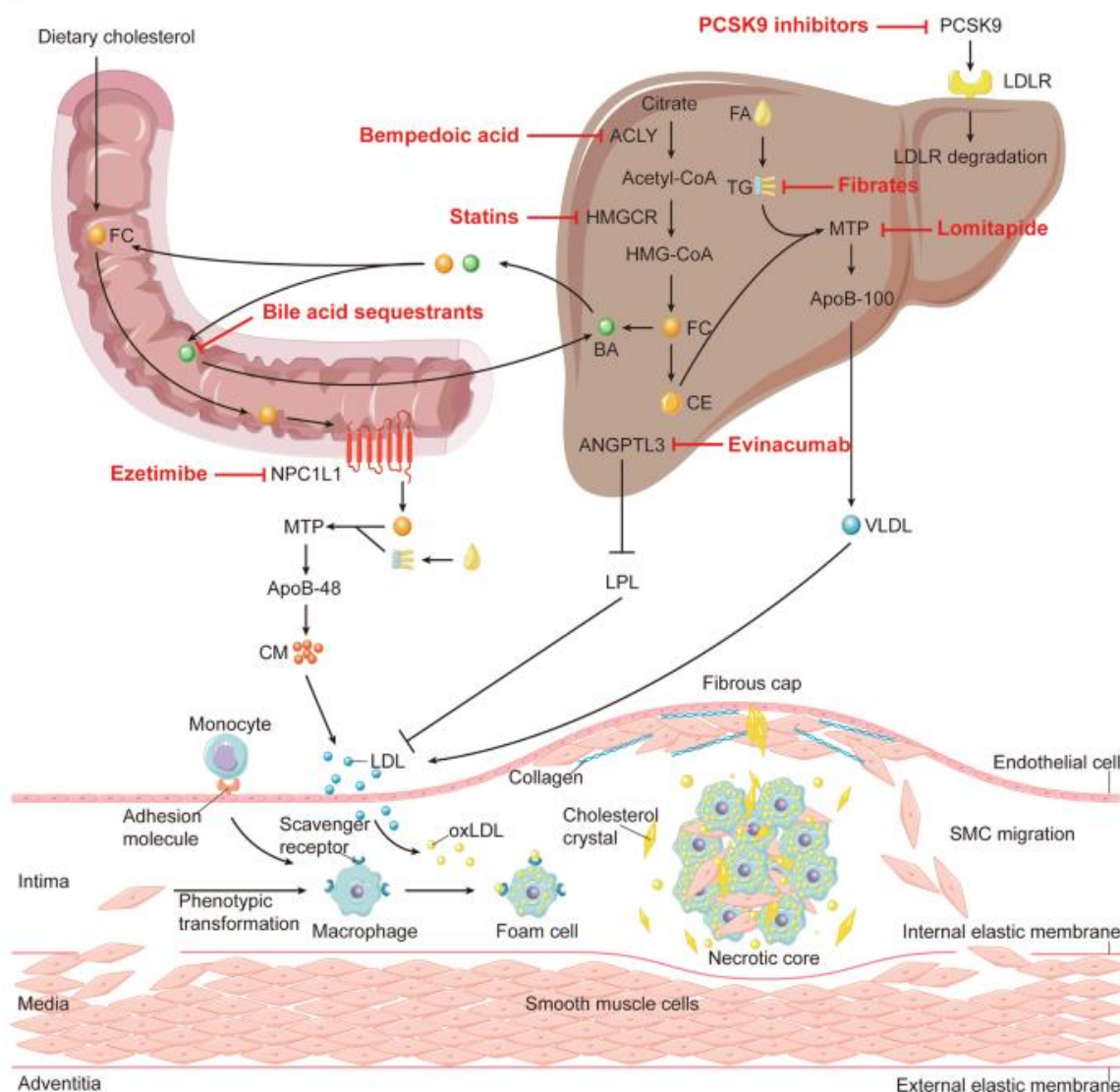


L'intégration des objectifs de l'étude clinique dans la physiopathologie des dyslipidémies

L'état des lieux pour cette intégration emprunte les illustrations des revues récentes disponibles en 2023 sur ce sujet. La figure 11 rappelle les possibilités pharmacologiques pour ralentir l'athérosclérose lors d'études cliniques d'intervention pour diminuer le cholestérol. (Duan et al. 2022). On constate que 2 organes concentrent les actions pharmacologiques visant à réguler le cholestérol avec l'intestin et le foie pour réguler le cholestérol circulant. Les vaisseaux sanguins avec l'infarctus du myocarde et l'accident vasculaire cérébral en sont les conséquences délétères pour le patient après plusieurs années d'un diagnostic de dyslipidémie. Un mécanisme d'action simplifié est schématisé nous semble utile pour comprendre notre étude d'intervention.

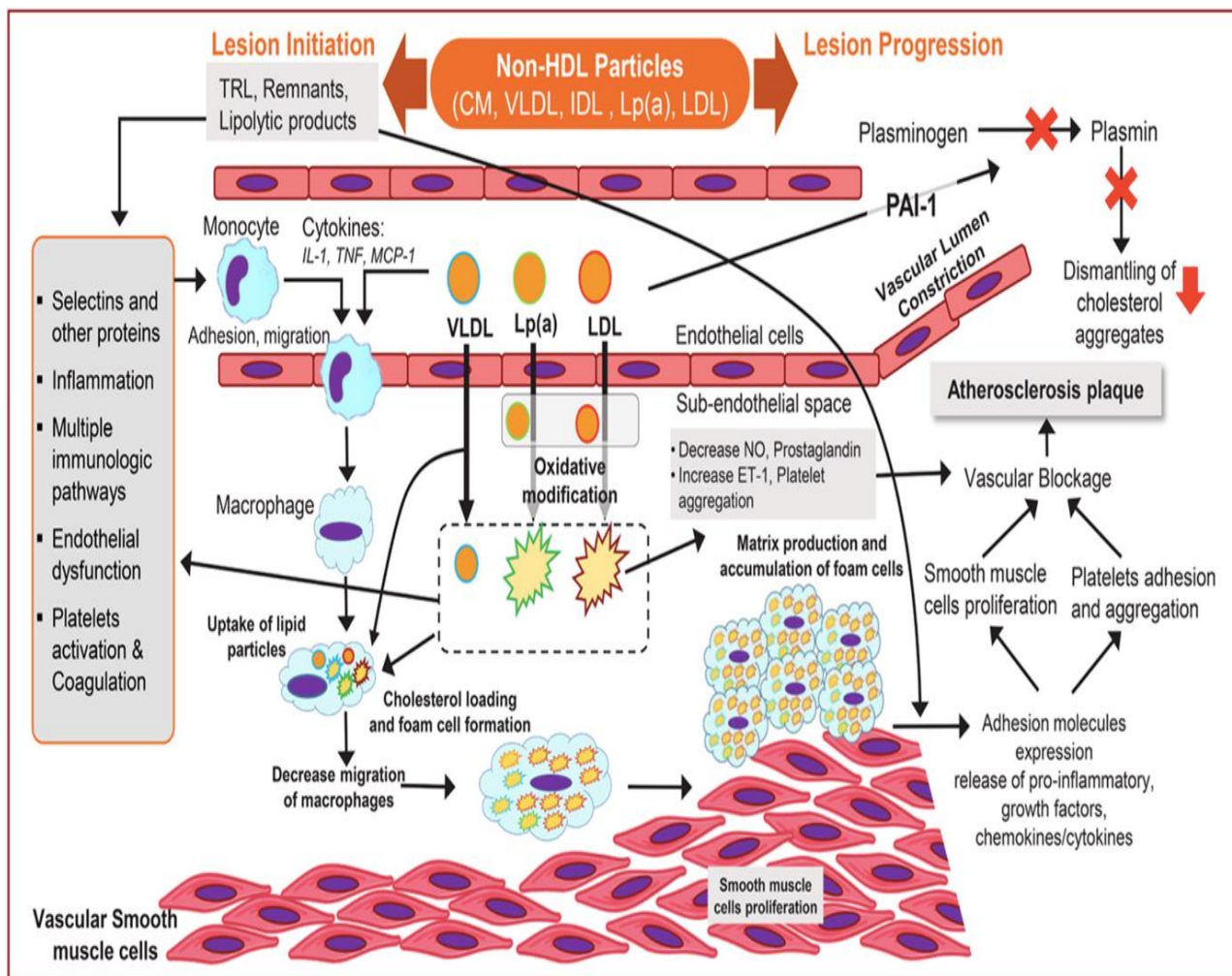
Figure 11 : Mécanismes d'action des thérapeutiques inhibitrices de l'athérosclérose lors d'études cliniques d'intervention pour diminuer le cholestérol. (D'après Duan et al. 2022).

Fig. 4



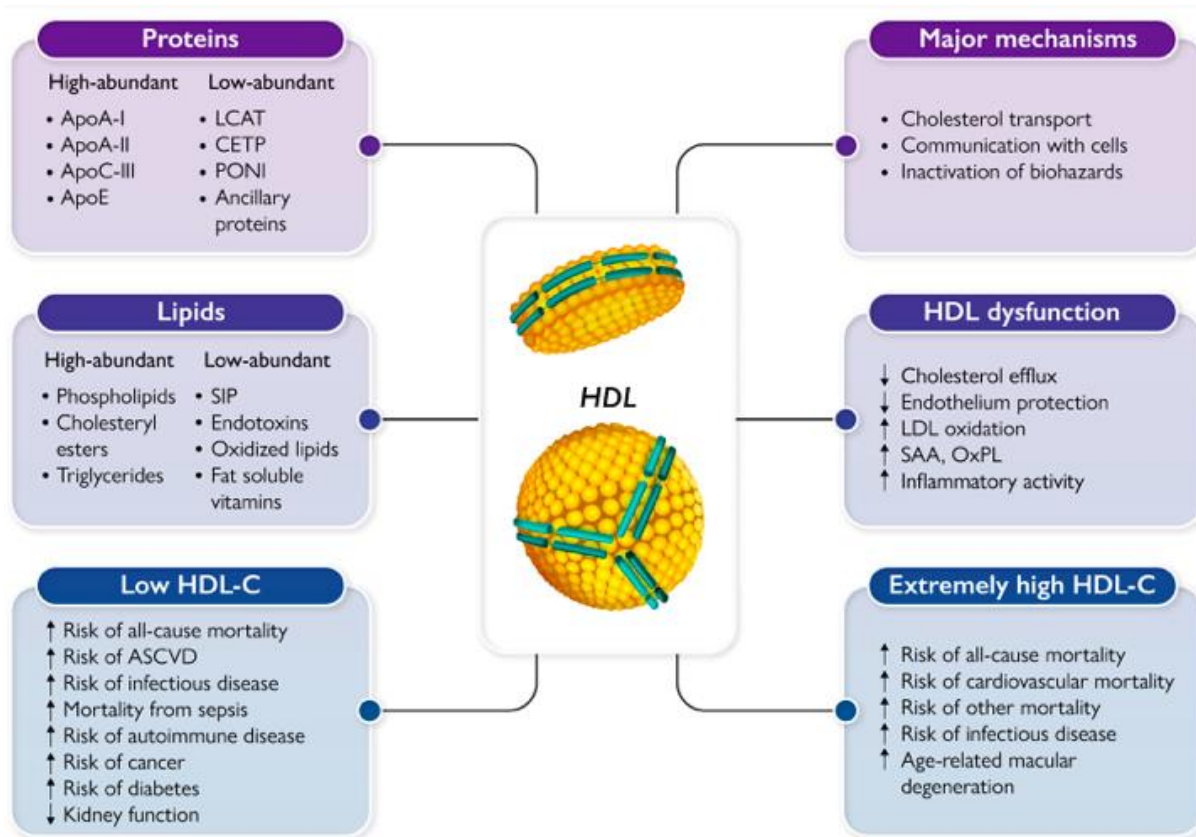
La figure 12 nous permet de se focaliser sur le non-HDL depuis son initiation jusqu'à sa progression dans l'athérosclérose. Cette figure pour un état de l'art le plus récent a été préparée par Raja et al. en 2023. Elle résume la physiopathologie de la dyslipidémie depuis la lésion vasculaire initiale jusqu'à l'accident coronarien. Elle souligne et propose la nouvelle place principale que l'on peut accorder aux particules dites Non-HDL.

Figure 12 : l'athérosclérose et la nouvelle place du non-HDL depuis son initiation jusqu'à sa progression (D'après Raja et al. 2023).



Contrairement aux recommandations européennes, les auteurs des nouvelles recommandations américaines considèrent également que les autres traitements hypocholestérolémiants n'ont pas démontré d'efficacité sur le risque cardiovasculaire dû à l'athérosclérose. L'état de l'art implique en plus du LDL, HDL, le non-HDL facilement calculable entre le cholestérol total diminué du HDL. Ce marqueur est semble-t-il un marqueur potentiel dans le futur (Raja et al. 2023) de par ses multiples implications physiologiques.

Figure 13. Abstract graphique résumant les apolipoprotéines (lipides et protéines), les dysfonctions des HDLs (Von Eckardstein et al. 2023).



LCAT, lécithine : cholestérol acyltransférase ; CETP, protéine de transfert d'ester de cholestérol ; PON1, paraoxonase 1 ; SIP, sphingosine-1-phosphate ; ASCVD, maladie cardiovasculaire athéroscléreuse ; LDL, lipoprotéine de basse densité ; SAA, sérum amyloïde A ; OxPL, phospholipides oxydés.

Cette dernière revue est postérieure aux échecs d'intervention thérapeutique des candidats médicaments aboutissant à une très forte augmentation des HDL circulantes mais avec une balance bénéfices-risques défavorable.

L'évolution que nous constatons est qu'il faut considérer les HDL au même titre que les LDL. Comme il a été observé dans notre équipe, on observe une augmentation du HDL dans un modèle expérimental de dyslipidémie avec le thé Hao Ling qui diffère du thé vert ou de ses extraits utilisés dans les compléments alimentaires (tableau 1 de l'article 1).

Aucune preuve clinique n'est cependant disponible pour ces variétés de thé Pu-erh.

Partie 3 :

Les thés de la clinique aux allégations santé

Le Thé, boisson la plus populaire au monde, est consommé principalement sous six formes de base ; thés blanc et vert (non fermenté), thé jaune (légèrement fermenté) thé Oolong (partiellement fermenté), thé noir et thé Pu-erh (fermenté) (Tang et al. 2019). Le thé jaune (Huangcha) avec le thé Pu-erh sont moins bien connus (Xu et al. 2018).

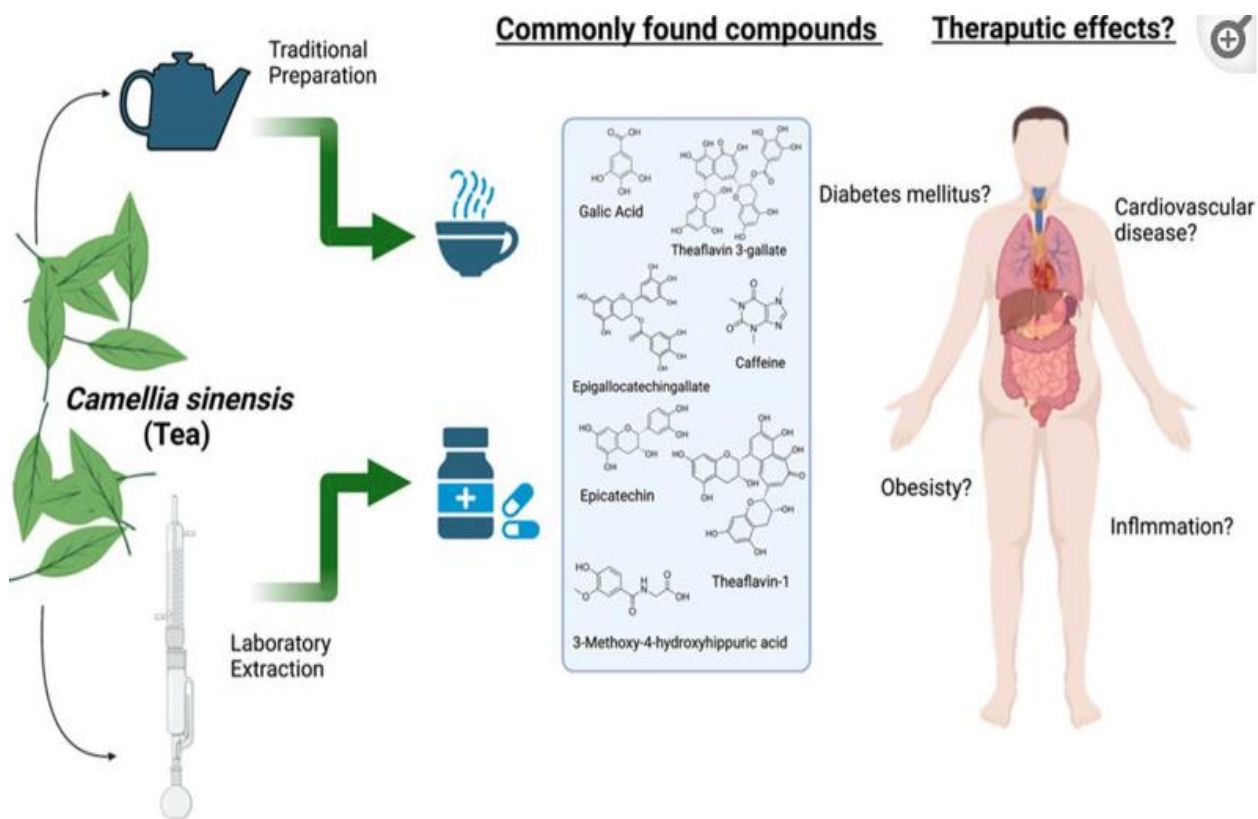
Ces dernières années il y a eu un intérêt croissant dans la compréhension des avantages cardiovasculaires et métaboliques de flavonoïdes polyphénoliques dans le thé, qui peut être utilisé comme un supplément chez les patients. Il concernait principalement le thé vert et son polyphénol d'intérêt, l'EGCG (épigallocatechine gallate). Divers effets cardioprotecteurs du thé ou de leurs polyphénols ont été décrits sur les conditions physiopathologiques, e.g. l'hypertension, le diabète, l'hypercholestérolémie, l'obésité, les lipides athérogènes et l'athérosclérose (Figure 14).

Les effets du thé en général sont attribués à des effets antioxydants, anti-thrombogènes, anti-inflammatoires, hypotenseurs, ainsi qu'aux propriétés hypocholestérolémiantes des polyphénols du thé (Tang et al. 2019, Brimson et al. 2022).

Nous nous sommes intéressés aux thés depuis une dizaine d'années à l'université de Toulon pour leurs effets hépato protecteurs ainsi que leurs mécanismes d'action dans cette indication.

Le thé (thé Hao Ling®) utilisé était un mélange de 3 thés, un thé vert, un thé Oolong et un thé Pu-erh (Braud et al. 2015, 2017 & thèse de doctorat, 2017). Notre choix était un apport naturel avec une infusion courte dans de l'eau chauffée (préparation naturelle). Une approche expérimentale, « in vitro » et chez l'animal, avait été développée. Toutes ces recherches ont permis en 2023 d'avoir à disposition un complément alimentaire extrait sec d'une infusion de Hao Ling® fabriqué à partir de ce mélange original des 3 thés et qui est disponible en France. L'usage de ce thé peut donc se faire de 2 manières, une infusion ou un complément alimentaire comme l'illustre la figure 14 dès 2022.

Figure 14 : Usage du thé : infusion ou extraction chimique, quels composés et quels bénéfices ? d'après Brimson et al. (2022).



Le thé est l'une des boissons les plus consommées dans le monde (le plus communément sous forme d'infusions de feuilles). Il est normalement produit à partir des feuilles de deux variétés de la plante *Camellia sinensis* : var. *sinensis* et var. *assamica* (Cai-Ning Zhao et al. 2019) représentée dans la Figure 15.

Figure 15 : La plante *Camellia sinensis*



Un même *Camellia sinensis* produira le thé Bian-Xiao au Sichuan et le thé Liu Bao au Guangxi selon les différentes zones de production et la technologie de traitement employées.

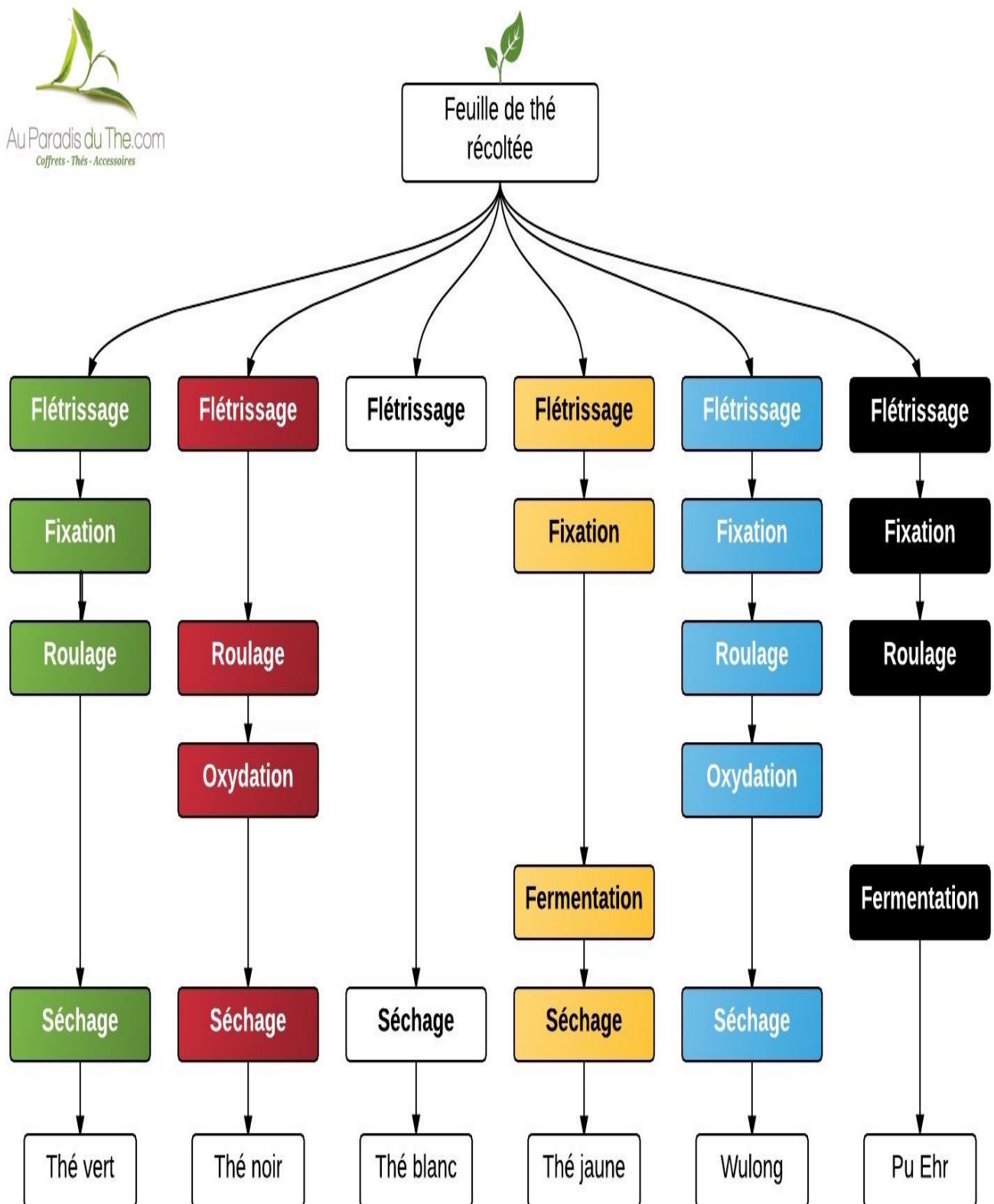
Parmi les thés, le thé Pu-erh est également le thé noir ou thé sombre chinois le plus représentatif. Ce thé a attiré de plus en plus d'attention dans le domaine récent de la science du thé.

Le théier (*Camellia sinensis*) est un arbuste de cinq à dix mètres de haut. Mais dans la plupart des plantations, il est taillé à environ 1,20 m pour faciliter la cueillette des feuilles. Les jeunes feuilles à l'extrémité des branches donnent les meilleurs thés, alors que les quatre ou cinq feuilles suivantes servent à la production courante. Les facteurs environnementaux comme le climat, le type de sol et l'altitude contribuent à la teneur en tanins (responsable de la couleur et de la saveur) et en théine (la caféine du thé). Les principales étapes du traitement des feuilles de théiers après récolte sont résumées dans la figure 16.

Selon les procédures de traitement utilisées, le thé peut être divisé en thé vert (non fermenté), thé Oolong (semi-fermenté), thé noir (entièrement fermenté par une enzyme oxydante) et thé noir (post-fermenté par bactérie, levures etc.). Contrairement au thé vert, au thé Oolong, le thé noir est un thé fermenté (à l'aide de bactéries) dont sa production est uniquement limitée aux régions de la Chine et du Japon (Yihong Ding et al. 2015).

En Chine, le thé noir est traditionnellement divisé en thé Yunnan Pu-erh, thé Hunan Fuzhuan, thé Hubei.

Figure 16 : Les principales étapes du traitement des feuilles de théiers après récolte.



La feuille de thé fraîche ne contient pas moins de 398 constituants. (Meng et al. 2019). Les différents composés classés selon leur composition chimique se répartissent en pourcentage de matière sèche. Les 2 principaux sont les polyphénols avec les flavonols. Les différents thés selon leur couleur sont issus d'une même feuille de thé comme le montre la figure représentant les étapes communes ou spécifiques de traitement.

Tableau 6 : Composition chimique des feuilles de thé fraîches.

COMPOSÉS	POURCENTAGES DE LA MATIÈRE SÈCHE
Polyphénols	20 - 36 %
Flavanols	20 - 30 %
Flavonols	3 %
Acides phénoliques	5 %
Méthyl-xanthines	3,5 %
Caféine	2 - 4 %
Théobromine	0,2 %
Théophylline	0,02 - 0,04 %
Protéines	15 %
Acides amines	4 %
Glucides	25 - 30 %
Lipides	2 - 16 %
Vitamines et minéraux	5 %
Acides organiques	0,5 - 1,5 %
Pigments liposolubles	< 0,5 %
Composés volatils	< 0,1 %

Le thé Pu-erh est un thé fermenté microbien unique produit à partir des feuilles séchées au soleil d'espèces de thé à grandes feuilles (*Camellia sinensis* Linn.) Var. *Assamica* (Masters) Kitamura) dans la province du Yunnan en Chine. Le thé Pu-erh est devenu de plus en plus populaire en Asie du Sud-est peut-être en raison de ses bénéfices pour la santé. Les caractéristiques sensorielles spéciales du thé Pu-erh proviennent des multiples changements chimiques et transformations des constituants

chimiques des feuilles de thé vert séchées au soleil qui se produisent pendant le processus de post-fermentation. De nombreux composants fonctionnels ont été isolés du thé Pu-erh (Yihong et al. 2015).

Actuellement, le thé Pu-erh est de plus en plus populaire, en particulier en Asie du Sud-est, principalement en raison de ses multiples effets bénéfiques pour la santé (Huang et al. 2011) ainsi que de sa saveur et de son goût particuliers (F Huang et al. 2019). La fermentation microbienne joue un rôle crucial dans la formation des caractéristiques spéciales du thé Pu-erh, qui résultent de changements importants dans les composants chimiques des feuilles de thé.

Cependant, sa technologie de traitement moderne et les types de thé Pu-erh sont peu connus en dehors de la Chine.

De plus, les rapports sur les composants chimiques du thé Pu-erh ainsi que d'autres types de thé noir restaient limités lorsque nous nous sommes intéressés à ce thé Pu-erh (Fan et al. 2013). La fermentation à l'état solide par des micro-organismes fournit les caractéristiques spéciales d'un goût moelleux, d'une saveur stable et de la couleur rouge brunâtre de l'infusion de thé Pu-erh (Yi Zhang et al. 2013). Cette voie a été connue plus tard sous le nom de célèbre route du thé chinois (Zhu et al. 2020).

Actuellement, le thé Pu-erh est un produit national d'indication géographique et les zones de production sont confinées à certaines régions de la province du Yunnan, y compris 11 villes, 75 comtés et 639 cantons (en particulier, entre les parallèles $21^{\circ} 10'$ et $26^{\circ} 22'$ de latitude nord, $97^{\circ} 31'$ et $105^{\circ} 38'$ de longitude est).

La technologie de traitement de la fermentation à l'état solide par des microorganismes est largement utilisée dans la fabrication moderne du thé Pu-erh, qui a amélioré son efficacité de fabrication de manière significative. D'une manière générale, les produits de thé Pu-erh sur le marché peuvent être classés en plusieurs types selon différentes normes (J Wang et al. 2000 & 2022) comme le montre la figure 17.

Figure 17 : Différents types de thé Pu-erh selon les procédés d'obtention (d'après Zhu et al. 2020).



Sun-dried green tea



Pu-erh raw tea (Compressed tea, cake tea)

Natural aging

Microbial Post-fermentation



Autoclaved, compressed and dried



Natural aging



Pu-erh ripen tea (Compressed tea, cake tea)

B



1 melon tea



2 melon tea



3 Tuocha tea



4 Mushroom-shaped tea



5 brick tea



6 column tea

Premièrement, le thé Pu-erh peut être divisé en thé cru Pu-erh et thé Pu-erh mûri selon la technologie de traitement et les caractéristiques de qualité (Figure 17).

Le premier, une sorte de thé vert, est fabriqué directement à partir du thé vert séché au soleil par un processus d'autoclavage et de compression supplémentaire ; ses constituants chimiques et sa qualité sont donc très similaires à ceux du thé vert séché au soleil.

Le thé Pu-erh mûri est normalement fabriqué à partir du thé vert séché au soleil par post-fermentation microbienne à une température plus élevée (environ 50 ° C) et dans des conditions d'humidité plus élevées.

De plus, le thé cru Pu-erh compressé peut être transformé en thé mûri Pu-erh après vieillissement naturel pendant la période de stockage à long terme, généralement connu sous le nom de thé de vieillissement Pu-erh.

Deuxièmement, le thé Pu-erh peut être divisé en thé en vrac et en thé compressé selon la forme. Après les processus d'autoclavage et de séchage, le thé comprimé peut être préparé en compressant le thé en vrac dans différents moules pour en faire différentes formes (Figure 17 partie B). Parmi les types de thé compressé Pu-erh, le thé au gâteau est le plus courant. D'autres formes souhaitées de thé comprimé peuvent être préparées selon les besoins, par exemple en forme de melon, en forme de Tuocha, en forme de champignon, en forme de brique et en forme de colonne (figure 17 partie B).

En raison de la domination de la production et de la consommation de l'industrie du thé Pu-erh, le thé Pu-erh dans cet article se réfère généralement au thé Pu-erh mûri fermenté microbien.

Figure 18 : Fabrication actuelle du thé Pu-erh de la feuille de thé verte et fraîche au cake compressé.



Le processus de fabrication moderne du thé Pu-erh est illustré sur la figure 18. Le matériau du thé vert séché au soleil est produit à partir des feuilles d'espèces de thé à grandes feuilles, *C. sinensis* (Linn.) Var. *assamica* (maîtres) Kitamura. Les feuilles de thé fraîches avec un bourgeon et deux ou trois feuilles sont couramment utilisées. Après cueillette, les feuilles de thé fraîches sont étalées sur des nattes en bambou pendant environ 8 h afin de les sécher partiellement. Les feuilles de thé sont ensuite soumises à un processus d'inactivation d'enzymes, par lequel elles sont fixées par chauffage dans un tambour pour inactiver la polyphénol oxydase endogène (PPO) (Liang et al. 2005).

La température pendant le processus de fixation du thé vert frais est bien inférieure à celle pour la fabrication de thés verts cuits à la vapeur, torréfiés et cuits au four. La température plus basse est considérée comme favorable au processus post-fermentaire ultérieur.

Parce que la désactivation des enzymes est incomplète (Ahmed et al. 2010) et que l'activité enzymatique partielle est donc conservée. En conséquence, des traces de théaflavines (TF) ont pu être détectées dans le thé vert séché au soleil obtenu par la polymérisation oxydative de catéchines catalysée par l'enzyme PPO. Le temps de laminage dans le processus de laminage du thé Pu-erh est

plus court que celui du thé vert, ce qui entraîne un taux de cassure cellulaire relativement plus faible et la production de feuilles roulées en vrac, ce qui facilite leur ventilation et la post-fermentation.

Avant l'étape de post-fermentation, les feuilles de thé roulées sont partiellement séchées pour donner une teneur en humidité d'environ 8% au soleil pendant 3 à 5 h à une température supérieure à 30° C.

Dans le processus de post-fermentation, les feuilles de thé séchées au soleil sont empilées pendant quelques semaines, conduisant à une série d'oxydations, de condensations et de dégradations des constituants chimiques du thé, catalysées par les enzymes extracellulaires produites par des micro-organismes, et donc à la production des caractéristiques sensorielles spéciales du thé Pu-erh.

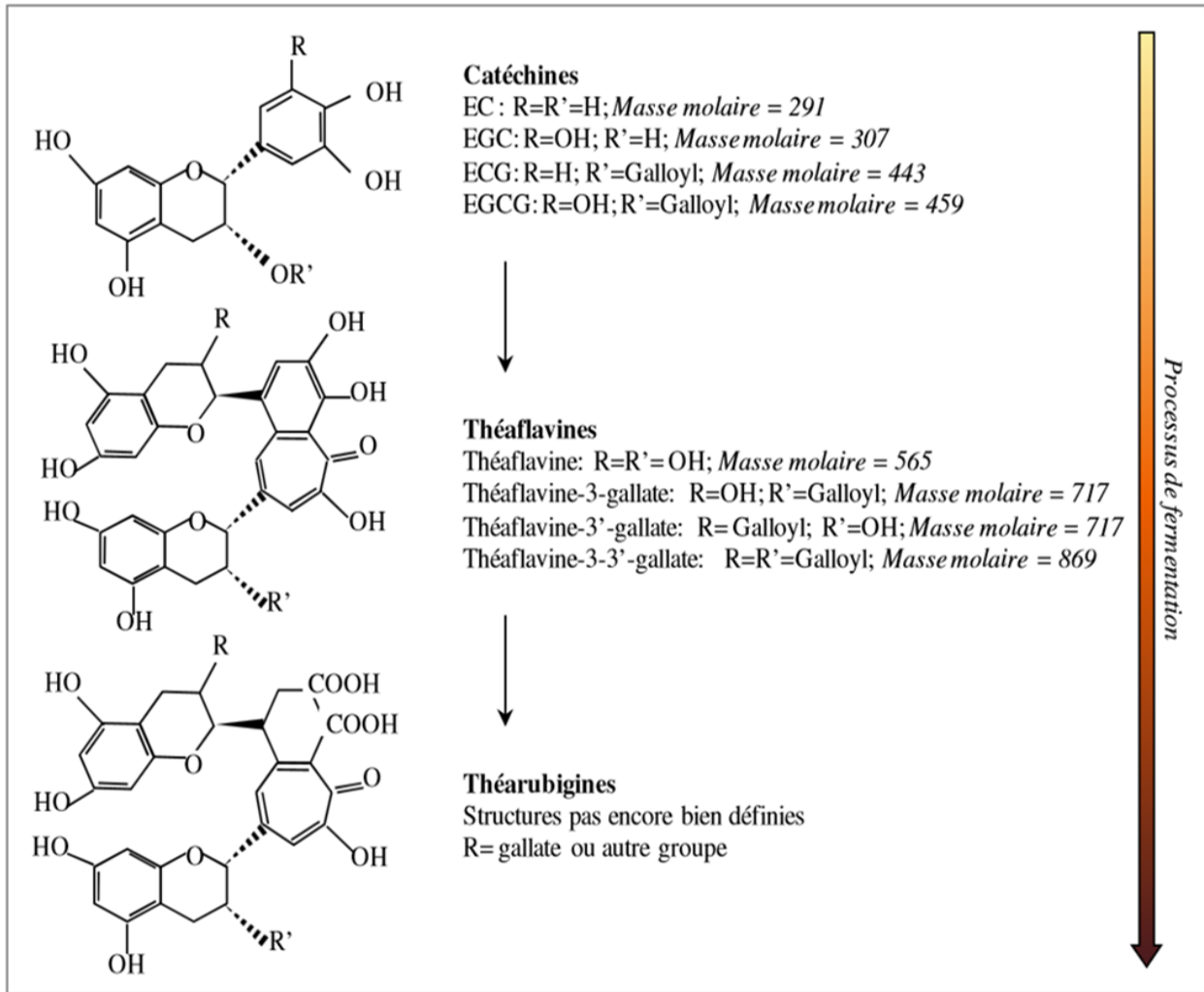
Pendant le processus de post-fermentation, les feuilles sont retournées tous les deux jours pour éviter l'augmentation excessive de la température. De nombreux micro-organismes sont impliqués dans la post-fermentation du thé Pu-erh (Zhu, Yang, Li et Zhang, 2008), notamment *Aspergillus niger*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Aspergillus glaucus*, *Saccharomyces*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus candidus* et *Bacterium*.

Ces micro-organismes jouent un rôle crucial dans la formation de qualité du thé Pu-erh (Abe et al. 2008). Le processus de fermentation naturelle prend normalement quelques semaines. Afin de raccourcir le temps de fermentation, les espèces dominantes de micro-organismes sont maintenant inoculées de manière externe dans la technologie de traitement moderne. La recherche a révélé que la formation à l'état solide inoculé par des champignons artificiels pourrait donner les principales caractéristiques sensorielles, spécifiques et excellentes du thé Pu-erh, y compris la couleur, le goût et l'arôme de l'infusion, qui sont comparables à la fermentation spontanée.

Cependant, différents micro-organismes ont des effets différents sur les compositions chimiques du thé Pu-erh, comme les concentrations de lovastatine (Zhu et al. 2008).

Les structures chimiques identifiées (figure 19) caractérisent le degré de fermentation des thés.

Figure 19. Structures des principales molécules des thés fermentés et non-fermentés.



Les composés peuvent être divisés en quatre catégories selon leurs différentes structures

1) Flavan-3-ols et leurs dérivés. Les principales catéchines du thé vert séché au soleil sont l'ECG (1), l'EGCG (2) et le C (3), dont la plus abondante est l'ECG (1) (Zhang, Li, Ma et Tu, 2011). En revanche, l'EGCG (2) est généralement la catéchine dominante dans les feuilles de thé de *C. sinensis* (Yang et al. 2007).

2) Flavones et leurs dérivés. Ces composés comprennent principalement le kaempférol, la quercétine et la myricétine (Zhao, Ma, et al. 2011). La teneur totale en flavone du thé cru Pu-erh était de 0,28 mg / g, tandis que la teneur totale en flavone O-glycosylée était de 11,75 mg / g. Les Flavones du thé cru Pu-erh sont également présentes de manière prédominante sous forme de glycosides plutôt que d'a glycosides. Les glycosides de quercétine constituent le principal groupe glycoside du thé cru Pu-erh.

3) Autres composés phénoliques. Ces composés comprennent principalement des acides phénoliques simples, dont l'acide gallique, l'acide caféique et l'acide p-coumarique et leurs dérivés d'acide quinique ainsi que des tanins hydrolysables. La teneur en tanins hydrolysables, dans le thé cru Pu-erh est beaucoup plus élevée que celle du thé vert ordinaire (Zhao, Ma, et al. 2011).

4) Alcaloïdes et leurs dérivés. Ces composés comprennent la caféine, la théobromine et la théophylline. En général, la teneur en caféine du thé cru Pu-erh a les valeurs les plus élevées de tous les alcaloïdes quantifiés (Ahmed et al. 2010). La théobromine et la teneur en théophylline du thé cru Pu-erh sont beaucoup plus élevées que celles du thé vert ordinaire, alors que la teneur en caféine s'avère beaucoup plus faible (Zhao, Ma, et al. 2011).

Très récemment, Deng et al. (2021) ont montré que la fermentation du thé vers un thé de type Pu-erh présentait des effets plus importants sur la dyslipidémie expérimentale en comparant un thé avant et après fermentation. Nous avons ici apporté les changements de la composition du thé vert utilisé pour la fermentation du thé Pu-erh dans le tableau 7.

La quantité de théabronines (pigments) est multipliée par 4 tandis que les 2 catéchines importantes du thé vert EGCG et EGC disparaissent du thé Pu-erh.

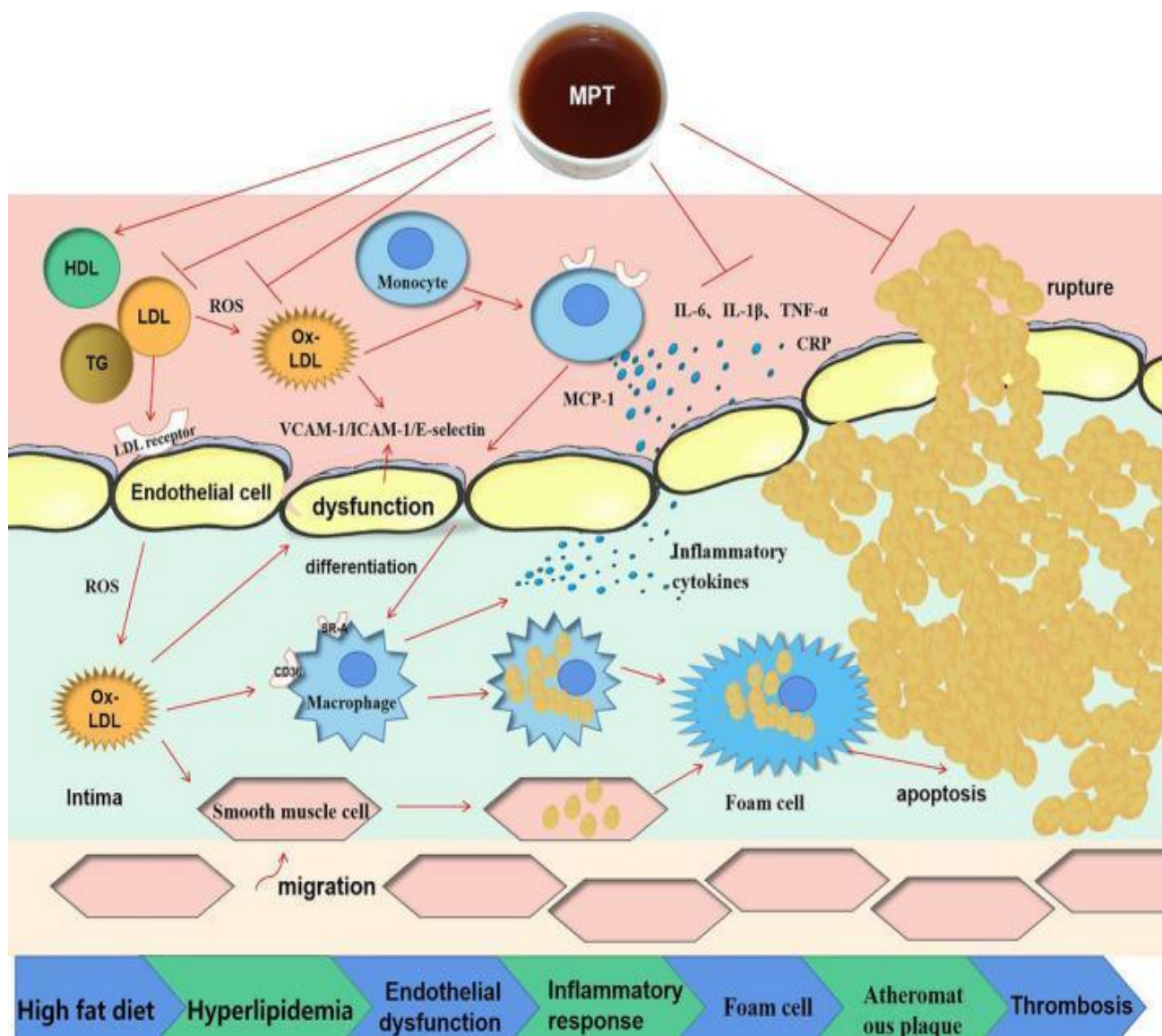
Ainsi la démonstration de son efficacité au cours de la dyslipidémie pourrait expliquer les possibles mécanismes d'action.

Tableau 7 : Changements de la composition du thé vert utilisé pour la fermentation du thé Pu-erh (Deng et al. 2021).

Constituents	SGT (%)	MPT (%)	Amplitude of variation
Free amino acids	2.71 ± 0.24	1.06 ± 0.02*	-60.89%
Flavonoids	2.21 ± 0.25	4.09 ± 0.05*	89.52%
Soluble sugar	12.96 ± 0.96	6.78 ± 0.62*	-47.69%
Theaflavins	4.97 ± 0.07	2.15 ± 0.10*	-56.74%
Thearubigins	3.87 ± 0.11	1.47 ± 0.21*	-62.02%
Theabrownins	1.71 ± 0.24	8.65 ± 0.11*	405.85%
Tea polyphenols	27.29 ± 1.49	11.47 ± 0.22*	-57.97%
Catechins	24.21 ± 0.46	5.16 ± 0.30*	-78.69%
(-)-epicatechin (EC)	1.38 ± 0.30	0.32 ± 0.50*	76.81%
(-)-epigallocatechin (EGC)	1.46 ± 0.10	0.43 ± 0.40*	-70.55%
(-)-epicatechin gallate (ECG)	3.64 ± 0.11	ND	-
(-)-epigallocatechin gallate (EGCG)	4.22 ± 0.24	ND	-
Gallic acid (GA)	0.12 ± 0.03	0.38 ± 0.08*	216.67%
Caffeine	3.70 ± 0.23	3.62 ± 0.20	-2.16%
Lovastatin	ND	0.011 ± 0.006	-

Dans la figure 20, il est montré les effets hypolipidémiques, anti-inflammatoires et anti-athérosclérotique du thé Pu-erh obtenu avec les *Monascus purpureus* (MPT). Les flèches indiquent l'activation ou l'induction, tandis que les lignes verticales indiquent l'inhibition ou l'obstruction. Ainsi la fermentation nécessaire pour le thé Pu-erh en utilisant des microorganismes (*Monascus purpureus*) modifie les fonctionnalités de ce thé ainsi obtenu. Cette démonstration reste cependant expérimentale.

Figure 20 : Effets hypolipidémiques, anti-inflammatoires et anti-athérosclérotique d'un thé fermenté : *Monascus purpureus* Pu-erh thé (MPT) d'après Deng et al. (2021).



Le thé cru Pu-erh contient un ensemble différent de substances chimiques que le thé vert ordinaire y compris les substances extractibles à l'eau et les polyphénols du thé, qui fournissent un matériau favorable base pour la transformation des constituants chimiques pendant le processus de post-fermentation et le processus de vieillissement naturel.

Il a été rapporté qu'une méthode d'identification des empreintes digitales pour le thé cru Pu-erh a été établie sur la base des profils HPLC, par laquelle le thé cru Pu-erh peut être distingué du thé vert ordinaire. De plus, les techniques de chromatographie liquide à ultra performance optimisée (UPLC) combinées avec analyse en composantes principales (ACP) ont également été signalés comme étant capables de classer et de distinguer le thé vert ordinaire et le thé cru Pu-erh (Zhao, Ma, et al. 2011). Les flavonoïdes et les tannins hydrolysables sont considérés comme les principaux constituants possédant de fortes propriétés.

L'infusion du thé est le processus naturel utilisé au cours de notre présent travail

Le mot infusion désigne à la fois le procédé d'extraction des composants de la feuille de thé et son résultat : Afin d'être consommés, les constituants du thé doivent être extraits des feuilles par un procédé nommé infusion. Il s'agit de verser de l'eau frémissante sur les feuilles, de laisser infuser pendant un temps précis, puis de filtrer.

On obtient ainsi une tisane appelée infusion. Les méthodes de préparation vont influencer la quantité et la qualité des polyphénols et autres composés hydrosolubles présents dans l'infusion. C'est donc l'ultime étape déterminant la qualité d'un thé et elle ne dépend que du consommateur. L'eau utilisée doit être à une température précise et infuser les feuilles durant un temps optimal. Afin de déterminer la meilleure association température-temps, tout est une question de mesure. En effet, si la quantité de molécules extraites augmente avec la température et le temps de contact, leur stabilité, quant à elle, diminue :

- une température élevée augmente l'agitation moléculaire et donc la collision des molécules. Une température trop haute créera ainsi des réactions de polymérisation et une dénaturation des molécules initiales ;
- une exposition prolongée à une eau chaude va également se suivre d'une dégradation des molécules.

Nous avons étudié l'influence de ces différents critères. Ainsi, la méthode de préparation optimale serait une infusion de 5 minutes dans une eau frémissante à 90°C après un passage par un four micro-onde à sa puissance maximale (Braud et al. 2015).

L'extraction des composants de la feuille de thé se faisant par l'eau chaude, ne seront présentes dans l'infusion que les molécules hydrosolubles. Les fibres glucidiques, les lipides, les pigments liposolubles et les enzymes, insolubles dans l'eau, ne peuvent être retrouvés qu'à l'état de trace. Ce type de préparation (infusion aqueuse) a été utilisé pour la caractérisation de la méthode brevetée (ABC) utilisée pour le thé Qi Cha issu d'un thé blanc (article N°1).

L'objectif de présenter des allégations santé est primordiale depuis 2005 avec un nouveau règlement européen (voir article 1 & 2). Un extrait du tableau des allégations plante "en attente" considérées comme acceptable par le grand public ne permet pas l'utilisation dans la dyslipidémie (Tableau 8). Seule l'allégation santé avec une "ID 2716" permet un positionnement santé dans le contrôle du poids dans les conditions indiquées par les allégations.

Tableau 8 : Exemple de proposition d'allégations plantes (ID en attente) source EFSA.

1273	Camellia sinensis (Common Name : Tea)	Immune health	Contributes to the natural defences of the body Support of the body's defence - Supports the immune system
2004	Camellia sinensis (Common Name : Tea)	Mental and cognitive health	Supports natural sleep /relaxing /promotes concentration /theanine from tea contributes to soothing effect
2005	Camellia sinensis (Common Name: Tea)	Cognitive Performance: Focussed attention	Tea helps you focus/ concentrate/ be less distracted/ helps you to be sharp/ helps you to be alert - Tea contains theanine/ Theanine stimulates alpha brainwaves which are associated with a relaxed but alert mental state; - Theanine helps relax your mind/helps you to be relaxed; promotes a restful, relaxed state; calms and clears the mind
1123	Camellia sinensis Tea (Green, Oolong and Black Tea)	Resting metabolic rate and thermogenesis	Camellia sinensis supports resting metabolic rate Camellia sinensis supports thermogenesis Camellia sinensis supports energy expenditure and fat oxidation
1276	Camellia sinensis Tea (Green, Oolong and Black Tea)	Antioxydant	Camellia sinensis has beneficial antioxidant properties

Numéro ID EFSA	Plante	Positionnement Santé	Allégation
2716	Camellia sinensis - common name : tea -	Control of weight	Traditionally used to facilitate the weight loss in addition to dietetic measures" / "Used to facilitate the weight loss in addition to dietetic measures" / "Helps to loose weight in addition to dietetic measures" / "Contributes to loose weight in addition to dietetic measures" / "Helps to maintain the weight" / "Contributes to maintain the weight" / "Stimulates the lipid degradation" / "Supports lipid metabolism" / "Support of metabolism and fat oxidation" / "Helps to enhance metabolism" / "Contributes to fat oxidation" / "Helps in weight control" / "Contributes to metabolism, which in turn helps weight control"

Le tableau 9 présente les allégations santé déposées à L'EFSA pour évaluation. L'allégation santé présentée par Unilever pour le thé noir pour le maintien de l'attention pour seulement la caféine a été acceptée en 2018. Celle demandée pour la l-theanine a été rejetée une fois de plus (EFSA NDA Panel 2018). Ce tableau rassemble aussi des allégations non permises et refusées par l'EFSA.

Tableau 9 : Allégations santé (selon Article 13 du règlement CE) évaluées par l'EFSA

Claim type	Nutrient, substance, food or food category	Claim	EFSA opinion reference	Entry Id
Art.13 (1)	Polyphenols from tea	Polyphenols contained in this product ensure antioxidant action, protective effect on the organism	2011;9(4):2082	1643
Art.13 (1)	Polyphenols from processed fruits and tea	Protects the cells, Antioxidant Properties, With Natural Fruit and Tea Antioxidants	2010;8(10):1752	1900
Art.13 (1)	Flavonoids from green tea, apple and onion	Exceptionally strong organic antioxidant	2010;8(2):1489	1805
Art.13 (1)	Flavonoids from green tea, apple and onion	Flavonoids, especially catechins from green tea, reduce the absorption of carbohydrates by 25% and reduce visceral fat	2011;9(6):2246	1806
Art.13 (1)	Caffeine (from tea / coffee / chocolate or added in pure form)	Contributes to the mobilisation/oxidation of fat stores , to the stimulation of fat release, to increase fat/calorie burning, to generate a negative energy balance	2011;9(4):2054	735
Art.13 (1)	Caffeine (from tea / coffee / chocolate or added in pure form)	Improves physical performance	2011;9(4):2053	737, 1486
Art.13 (1)	Theanine	It helps against nervous tension	2011;9(6):2238	1707

Art.13 (1)	Formula Immunox containing Probiotics (<i>Lactobacillus acidophilus</i> , Bifidobacterium breve, <i>Bifidobacterium longum</i> , Bifidobacterium infantis) & Antioxidants (Vitamin C, Green Tea , Grape Seed, Pine Bark Extracts)	Immunox Probiotic and Antioxidant supports digestive health and immunity	2009;7(9):1247	1096
Art.13 (5)	Black tea from <i>Camellia sinensis</i>	Black tea helps you to focus attention	Q-2008-434	N/A
Art.13 (5)	A combination of <i>Paullinia cupana</i> Kunth (guarana) and <i>Camellia sinensis</i> (L.) Kuntze (green tea) extracts	Helps to burn fat	Q-2012-00590	N/A
Art.13 (5)	Immune Balance Drink , containing vitamin C, green tea , grape skin, grape seed and shiitake mushroom extracts	The Immune Balance Drink activates body's defense	Q-2009-517	N/A

Le thé et les dyslipidémies : Intérêt de l'étude Hao Ling

Les études menées sur la relation entre la consommation de thé et l'évolution des lipoprotéïnémies précédant la dyslipidémie concluent à une réduction de la cholestérolémie totale, du taux de LDL uniquement pour le thé vert. La méta-analyse des méta-analyses (analyse dite

“Umbrella”) (Neyestani et al. 2022) confirme cette association pour le thé vert. Il convient de nuancer cette affirmation en fonction des thés utilisés, de leur mode d’administration avec des infusions ou des extraits de thé sous forme de compléments alimentaires. Nous avons préparé un tableau de synthèse des méta-analyses disponible sur Pub Med (article 2).

Tableau 10 : Méta-analyses pour le thé vert et noir (Tableau préparé pour l'Article 2)

Tea <i>Camellia sinensis</i>	Meta-analysis* Reference	Study design (n RCT) number of subjects + follow-up	Treatment (supplementation, compounds/dose, diet and lifestyle)	Conclusions
Green tea	Kim et al. 2011 [19] PMID : 22027055	(20 RCT), 1415 subjects (men and women), 3 to 24 weeks follow-up	green tea catechin, 145-3000 mg/d, Maintain normal diet; normal physical activity	∖TC, LDL No significant changes in HDL, TG
	Onakpoya et al.2014 [20] PMID : 24675010	(20 RCT) 1536 subjects (men and women), median study duration 12 weeks	Green tea extract, Maintain normal diet; normal physical activity	∖TC, LDL
	Momose et al. 2016 [21] PMID : 27324590	(17 RCT) 1356 subjects (men and women), 4 to 14 weeks follow-up	EGCG, 107-856 mg/d EGCG, Maintain normal diet; normal physical activity	∖LDL
	Xu et al. 2020 [22] PMID : 32434539	(31 RCTs) 3321 subjects (men and women), 321 patients 3 to 52 weeks follow-up	Green tea, Maintain normal diet; normal physical activity	∖LDL,TC No significant changes in HDL, TG
	Neyestani et al. 2022 [23] PMID : 35750605	(13 meta-analyses, umbrella review) 24482 subjects (men and women)	Green tea extract, Maintain normal diet; normal physical activity	∖ TC, LDL
Black Tea	Igho-Osagie et al. 2020 [24] PMID : 33188386	(14 RCT), 798 healthy or adults with risks (metabolic syndrome, hypercholesteriolema, prediabete), 7-24 weeks follow-up (median : 7.4)	Green tea or black tea, Maintain normal diet; normal physical activity	No significant results on lipidemic profile
	Zhao et al. 2014 [25] PMID : 24972454	(10 RCT), 411 subjects (men and women)	Black tea, Maintain normal diet; normal physical activity	∖ LDL

included reviews (meta-analyses of RCT) comparing the intake of green or black teas as beverage or supplement with placebo.

Pour les thés verts, les méta-analyses disponibles montrent que cela est vrai pour le thé vert alors que pour le thé noir les seules 2 méta-analyses montrent des résultats contradictoires. Celle d'Igho-Osagie et al. (2020) ne montre pas d'effet significatif sur les profils lipidiques, celle de Zhao et al. (2014) montre un effet significatif sur un seul critère, le LDL.

Pour les thés Oolong et Pu-erh aucune méta-analyse n'est disponible. En conséquence, pour appréhender les effets du thé Hao Ling sur les paramètres lipidiques circulants, une étude spécifique

pour le thé Hao Ling[®] qui est un assemblage de 3 théés: un thé Pu-erh, un thé Wūlóng (Oolong) et un thé vert est nécessaire.

Ce blend unique, qui présente la particularité d'être à la fois riche en théaflavines et en EGCG, en polyphénols ramifiés comme les théarubigines (spécificité du thé Pu-erh) est donc indispensable. En revanche, l'éventuelle variation du taux de HDL n'est pas clarifiée. Elle reste incertaine pour les théés verts. La méta analyse faite sous des standards Cochrane en 2013 sur les RCT's disponible pour le thé vert et noir le montrait déjà.

Quelles pourraient être les causes ? Les 3 études suivantes de type RCT prises à titre d'exemple nous montrent la disparité des résultats sur les dyslipidémies.

La première, Batista et al. (2009) ont suivi 33 patients, âgés de 21 à 71 ans et atteints d'hypercholestérolémie, pendant seize semaines. Après huit semaines de consommation quotidienne de 250 mg d'extrait de thé vert, la cholestérolémie moyenne des sujets a diminué de 3,9 % ($p=0,006$), le taux de LDL de 4,5 % ($p=0,026$), alors que les taux de HDL et de triglycérides n'ont pas significativement variés.

La seconde de Maron et al. (2021) a observé une baisse significative de 11,3 % de la cholestérolémie totale et de 16 % du taux de LDL, sans autre effet significatif sur les paramètres TG, HDL. L'étude a été menée sur douze semaines et comptait 240 participants hypercholestérolémiques supplémentés par un mélange de 75 mg de théaflavines, 150 mg de catéchines et 150 mg d'autres flavonoïdes de thé vert (Maron et al. 2021).

Enfin, Bahorun et al. ont étudié l'évolution des lipidémies chez 77 personnes de 25 à 60 ans, après quinze semaines de consommation quotidienne de trois tasses de thé noir, et rapporte une diminution de 38,6 % de la triglycéridémie masculine, contre 28,6 % chez les femmes ($p>0,01$) ; mais une baisse non significative du taux de LDL et une augmentation du taux de HDL non significative. On constate une hétérogénéité des résultats qui entraîne la difficulté des méta-analyses à prouver les bénéfices du thé en général sur les lipoprotéines naissantes ou établies. Cette dernière étude est non confirmée par une étude similaire plus récente pour les biomarqueurs lipidiques (Bohn et al. 2014)

Les résultats d'une étude clinique de qualité pourraient permettre de montrer que la consommation de thé Hao Ling[®] a un effet bénéfique sur les concentrations sériques de cholestérol total, LDL, TG. De plus, nos études précédentes chez l'animal ont montré un effet spécifique sur les concentrations sériques en HDL, lipoprotéine antiathérogène. Il nous a semblé important d'ajouter des analyses spécifiques des Apo-A1 et ApoB100 comme l'autorise la réglementation européenne sur la dyslipidémie. Considérés dans leur ensemble, ces résultats convergents pourraient mettre en avant l'effet protecteur du thé Hao Ling[®] qui est probablement à mettre en perspective avec son

processus de fabrication et de fermentation spécifique.

Le thé Hao Ling® constitue ainsi une boisson de consommation courante d'intérêt nutritionnel avéré dont les bénéfices suggérés par ces études expérimentales puis cliniques sont de maintenir un taux de HDL cholestérol optimal dans la population générale, c'est-à-dire chez les personnes avec ou sans risques cardiovasculaires. Ces résultats sont d'autant plus importants qu'un faible niveau de preuves pour les dyslipidémies concernant les spécialités nutraceutiques suivantes : Plant Stérols and Stanols, Red Yeast Rice Extract, Dietary Fibres, Soy, Policosanol, Berberine, Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids, Bergamot, Artichoke, rapporté par la revue de Casula et al. (2022). Une exception de conception française pourrait être le Limicol qui est un mélange de levure de riz rouge, policosanol et artichaut (Ogier et al. 2012, Barrat et al. 2013 Nov. & Dec.).

Nous avons identifié 3 mécanismes pour le thé Hao Ling qui pourraient expliquer leurs effets avec les influences sur la synthèse des VLDL, le catabolisme des HDL et le phénotype des LDL (Tableau 11). Les VLDL sont responsables du transport des triglycérides remaniés au niveau hépatique. Dans le syndrome métabolique, l'augmentation du taux de triglycérides circulants est due à l'accroissement de leur synthèse. De par ses actions sur le métabolisme lipidique et l'insulino-résistance, l'EGCG induit une carence en substrats essentiels à la formation des VLDL (Li et al. 2006). En effet, la diminution de l'absorption des lipides exogènes et la baisse du flux d'acides gras libres circulants induisent une réduction de la production hépatique des triglycérides et donc des VLDL. De plus, la récupération de l'insulino sensibilité hépatique permet le rétablissement de la régulation de la synthèse des VLDL : l'insuline étant inhibitrice de la synthèse et de la charge lipidique des lipoprotéines Apo-B100, ces lipoprotéines sont donc produites en de plus faibles quantités.

-Dans la dyslipidémie, l'accroissement des VLDL entraîne l'activation de la CETP afin de réguler la répartition des lipides entre toutes les lipoprotéines de l'organisme. Le catabolisme des HDL est augmenté en réponse à leur enrichissement en triglycérides. L'influence de l'EGCG sur le taux des HDL n'est pas encore éclaircie. Cependant, au vu des effets du thé sur la triglycéridémie, un mécanisme d'action théorique permet de soutenir l'hypothèse de l'élévation du taux. En permettant la normalisation de la composition des VLDL, l'EGCG rendrait la CETP moins active. De ce fait, les échanges de lipides entre les lipoprotéines seraient moins importants et la teneur en triglycérides au sein des HDL devrait être normalisée. Par ce mécanisme, la catéchine protégerait ces lipoprotéines d'un catabolisme excessif.

-Le phénotype des LDL retrouvé dans le syndrome métabolique est la conséquence de l'activation de la CETP : elles sont de petite taille et riches en triglycérides, ce qui les rend très athérogènes. De la même manière que pour les HDL, la normalisation de la composition des VLDL devrait rendre la CETP moins active et les échanges de lipides entre les lipoprotéines moins importantes. Ainsi, les

LDL devraient être moins denses, plus épaisses et perdre de leur pouvoir athérogène.

Ce travail permet de mieux comprendre les différents modes d'actions qui aboutissent aux bienfaits du thé. Il y est également mis en évidence que la biodisponibilité des catéchines du thé n'est pas parfaite. La consommation de trois tasses de thé par jour ne permet pas d'atteindre des concentrations plasmatiques suffisantes pour une action nucléaire. Mais l'efficacité est bien là ! Ces faits permettent d'envisager la portée préventive de l'infusion de thé sur le syndrome métabolique. Les effets de l'EGCG peuvent potentialiser ceux d'un mode de vie sain, alliant activité physique régulière et alimentation saine et équilibrée. « Mangez, bougez et buvez du thé ! » pourrait être un nouveau slogan du programme national nutrition-santé. Un mode de vie équilibré est également recommandé comme adjuvant aux traitements des anomalies du syndrome métabolique. Les effets de l'EGCG par la consommation d'infusions de thé ne permettent pas d'affirmer son efficacité en tant que traitement. Mais elle peut être considérée comme une prévention de l'aggravation des pathologies, comme une aide aux traitements. Un médicament à base de ces polyphénols issus de la formule du thé Hao Ling permettrait de diminuer les principes actifs utilisés et ainsi d'augmenter l'observance et de diminuer les interactions. Reste à optimiser sa structure tout en gardant à l'esprit l'importance de son groupement gallate, la consommation régulière de thé induirait l'amélioration du profil lipidique du sujet.

Tableau 11 : Amélioration du profil lipidique par le thé

↘ Triglycémie / VLDL	↗ HDL ?	↘ LDL
- Apports exogènes en lipides -Catabolisme		récepteurs
- Lipogénèse	- CETP	Triglycémie
- Insulino-résistance		+ Récepteurs à la LDL
- Lipolyse viscérale		- Insulino-résistance
- Obésité viscérale		+SREBP

En conclusion, il est vrai que les thés verts, Oolong et Pu-erh contiennent tous des composés bioactifs tels que les catéchines, les théaflavines et les théarubigines qui ont été associés à des effets bénéfiques sur la santé cardiovasculaire, notamment en réduisant les niveaux de cholestérol dans le sang.

Une stratégie thérapeutique anti-cholestérol efficace doit être globale et comprendre des changements de mode de vie tels qu'une alimentation équilibrée et une activité physique régulière, ainsi que la gestion du stress qui est un facteur aggravant. Les limitations dans l'étude des thés en général doivent être soulignées comme la qualité des études avec des incertitudes associées, la variation des effets bénéfiques des thés sur la santé cardiovasculaire fonction de la qualité du thé, du mode de présentation et préparation ainsi que de la quantité consommée par exemple.

Etude de la prise en charge de la dyslipidémie par le thé Hao Ling chez l'homme (Article 1)

L'objectif de notre précédent travail avec le thé Hao Ling était d'évaluer ses effets et ses mécanismes d'action sur le cholestérol et la dyslipidémie, à travers deux approches, l'une sur le modèle cellulaire et l'autre sur le modèle animal. Aussi, nos résultats ont montré que le thé Hao Ling réduit la lipogenèse hépatique in vitro et in vivo et atténue ainsi la stéatose induite par un régime riche en graisses et en saccharose dans un modèle de rat (Braud et al. 2021). Nous avons observé que ce thé dans la boisson améliore le profil lipidique sanguin en augmentant les taux plasmatiques de HDL. Nous avons également pu mettre en évidence que le thé possède des propriétés antioxydantes et hépato-protectrices pour contrer un inducteur de stress oxydatif in vitro et diminuer la peroxydation lipidique in vivo. Enfin, nous avons également montré que le stress oxydatif en soi entraînait une accumulation de lipides intracellulaires dans les hépatocytes isolés et que l'extrait de thé Hao Ling, en raison de ses propriétés antioxydantes, empêchait ce phénomène. Le thé Hao Ling est une bonne approche nutritionnelle pour maintenir le ratio LDL / HDL. (Braud et al. 2015). L'objectif de ce travail est de transposer les effets expérimentaux obtenus par une étude clinique d'intervention à l'aide d'infusions de thé Hao Ling chez le patient dyslipidémique.

Article 1 :
Protocole dyslipidémie et thé Hao Ling®

Résumé de l'article

Effet hypolipidémiant de Camellia sinensis (thé Hao Ling®) chez des sujets atteints d'hypercholestérolémie non traités par statines : protocole d'étude pour un essai randomisé, en double aveugle, contrôlé par placebo.

Olivier Pons ^{1†}, Jean-Marc Zeil ^{2†}, Enora Rousseau ^{2,3}, Linda Naji³, Florent Herpin ^{4,§}, Jean Michel Maixent ^{*1, 3, 5, §}.

Le but de cette étude clinique, réalisée en double-aveugle, était d'évaluer l'efficacité et l'innocuité du thé Hao Ling® dans le traitement de l'hyperlipidémie nouvellement diagnostiquée, et ce en accord avec les lignes directrices européennes concernant les allégations de santé liées à cette maladie. Celle-ci a été réalisée en respectant des procédures rigoureuses de mise en aveugle et de randomisation afin de garantir l'absence de biais potentiels et garantir ainsi la fiabilité des données recueillies. Le protocole d'étude a été divisé en quatre étapes principales.

Celles-ci comportant notamment la sélection, dépistage et inclusion des sujets, la randomisation des participants pour recevoir le produit de l'étude ou un placebo, suivi de 3 mois et analyse des données cliniques et biochimiques. Le paramètre testé comme objectif principal est le taux de lipoprotéines de basse densité (LDL). Les données seront ensuite collectées à différents temps de l'étude, à 4 et 12 semaines (fin de l'étude).

Dépistage et inclusion :

Le processus d'inclusion commence par la sélection des participants et la signature du consentement éclairé. Des informations médicales et chirurgicales seront ensuite collectées et les paramètres physiologiques mesurés. 30 participants doivent être inclus au cours de l'étude et répartis à part égale entre les deux groupes Hao Ling® et placebo. Parmi les critères d'inclusion préalablement définis, se trouvait notamment un taux de LDL-C supérieur à 1.6 g/L. Les paramètres classiques du profil lipidique des patients seront également mesurés, comprenant le cholestérol total (TC), les lipoprotéines de haute densité (HDL-C), le taux de triglycérides (TG). Deux lipoprotéines circulantes ApoA1 et ApoB100 seront aussi mesurées

Randomisation et gestion du traitement :

Une randomisation stratifiée s'est faite selon le ratio 1:1 entre le groupe consommant du thé Hao Ling® et le groupe prenant le placebo (infusion de tilleul). Durant l'expérience, les participants consommaient trois infusions par jour durant trois mois. Des examens réguliers étaient ensuite effectués, comprenant notamment la mesure du poids, le tour de taille, la tension artérielle ou le LDL. Cette étape garantit l'équité des résultats.

Intervention, suivi et évaluation :

Les participants répartis dans les groupes thé Hao Ling® ou placebo vont consommer la boisson de référence pendant 3 mois, à raison d'une quantité de 2,5 g infusées 5 min à 90°C. Des visites de suivi ont été prévues pour évaluer l'efficacité du traitement avec un suivi médical ainsi que l'aide de questionnaires sur le mode de vie.

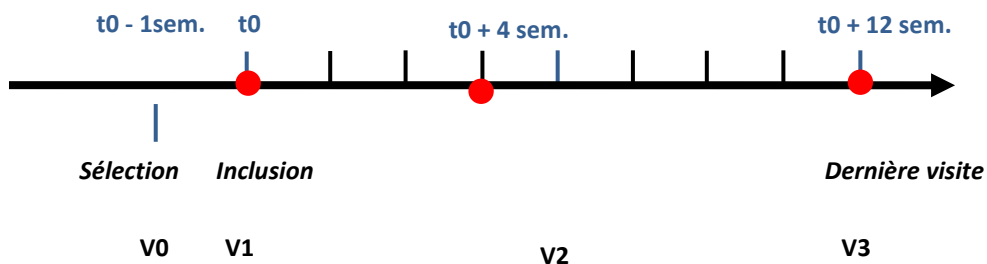
Analyses en laboratoire et statistiques :

Afin d'évaluer les profils lipidiques, des prélèvements et analyses de sang seront réalisées et les données extraites de celles-ci permettent de répondre aux objectifs de recherche dans ce protocole d'étude. L'analyse des données sera réalisée à l'aide des protocoles statistiques préalablement définis.

Tableau synoptique de l'essai

Phase de l'Etude	Sélection	Visite d'inclusion	Visite de suivi	Visite de fin d'étude
Nom de visite	V0	V1	V2	V3
- Jours relatifs au début de l'évaluation	J-7 à J-3	J0	J30+/- 3	J90+/-3
Sélection et Procédures Générales				
- Information et Consentement éclairé	X			
- Critères inclusion/exclusion	X	X		
- Age, sexe, taille	X			
- Poids, IMC	X			X
- Evaluation du risque cardio-vasculaire	X	X		
Questionnaire habitudes alimentaires et mode de vie		X	X	X
- Evaluation de la tolérance au produit			X	X
- Evaluation hédonique et satisfaction			X	X
Administration				
- Remise du produit à l'essai		X	X	
Evaluation de l'observance de la prise du produit			X	X
Paramètres biologiques				
Remise des ordonnances des bilans biologiques	X	X	X	
Report du profil lipidique (EAL : Evaluation cholestérol, HDL, LDL, TG, lipoprotéines,		X	X	X

Schéma de l'essai



- : Prélèvements sanguin

Discussion :

Le principal indicateur de succès de l'étude était le taux de LDL-C, dont l'objectif était la réduction significative grâce au thé Hao Ling®, le LDL-C étant un facteur de risque majeur dans le développement des maladies cardiovasculaires. L'objectif est une diminution significative du taux de LDL-C dans la comparaison des groupes de thé et tilleul. Il devra être confirmé pour indiquer le potentiel de l'infusion du thé Hao Ling® comme boisson chaude chez des personnes souffrant de nouvelle hyperlipidémie mais non traitées par statines. Le thé Hao Ling® permettrait de montrer un effet positif sur le profil lipidique des patients, soulignant ainsi l'importance de cette boisson dans l'équilibre de ce métabolisme lipidique, élément clé dans la santé cardiovasculaire des participants.

Sécurité et tolérance :

Les effets secondaires seront recherchés et leur absence pour une preuve de la sécurité du thé Hao Ling® chez les patients inclus. Un suivi minutieux des participants inclus dans l'étude a permis de surveiller la survenue d'éventuels événements indésirables. Ceci en plus du respect des procédures de mise en aveugle et de randomisation permet d'assurer la fiabilité des données collectées et de confiance dans l'interprétation de ces résultats, malgré la taille et le temps réduit de l'étude basée sur un objectif significatif de réduction du LDL. Les limitations concernent la nécessité d'études supplémentaires avec des échantillons de patients plus grands, sur de plus longues périodes d'études mais aussi avec des dosages différents. Cependant, cette étude fournit les premiers éléments de preuves pour une utilisation du thé Hao Ling® et de nutrition comme infusion dans le traitement d'une hyperlipidémie naissante.

Conclusion et perspectives :

Ce protocole accepté par le CPP et l'ANSM a été réalisé et a permis l'analyse finale de 27 patients. Cette analyse en cours suggère des résultats encourageants sur les niveaux de triglycérides et de l'apoprotéine A1. Elle confirme le travail expérimental effectué lors de la précédente thèse réalisée à l'Université de Toulon sur le thé Hao Ling®. Elle permet la poursuite d'une étude plus approfondie du thé Hao Ling® sur le HDL et l'apolipoprotéine A1.

Article; study protocol**Lipid-lowering effect of *Camellia sinensis* (Hao Ling® Tea) in subjects with hypercholesterolemia not treated with statin: study protocol for a randomized, double-blind, placebo-controlled trial.****Olivier Pons**^{1†}, **Jean-Marc Zeil**^{2†}, **Enora Rousseau**^{2,3}, **Linda Naji**³, **Florent Herpin**^{4,§}, **Jean Michel Maixent**^{*1,3,5,§}.

1 Laboratory Impact of Physical Activity, Health (I.A.P.S.) Toulon University, F-83000 Toulon, France; olivier.pons34310@gmail.com

2 Thés de la Pagode, 4, Avenue Bertie Albrecht, 75008 Paris, France ; jm.zeil@thedelapagode la pagode.fr

3 Pierre Deniker Clinical Research Unit, Henri Laborit University Hospital, University of Poitiers, F-86000 Poitiers, France; tessa.roulleau@gmail.com , linda.naji@outlook.fr

4 CEN Nutriment, Parc Mazen-Sully / Zone des biotechnologies. 18 rue Pauline Kergomard, 21000 Dijon, France ; florent.herpin@groupecen.com

5 School of Sciences, Poitiers University, F-86000 Poitiers, France; jmmaixent@gmail.com

† These authors contributed equally to this work.

§ Senior co-authors

* Correspondence: jmmaixent@gmail.com; Tel.: +33-(0)-663-9528-44

Abstract:

Dyslipidemia or hyperlipidemia is a major risk factor in the development of atherosclerosis. A first diagnosed hypercholesterolemia could be treated as lifestyle recommendation with tea before prescription drugs. The prevention effect of drinking Hao Ling® tea (a mixture of Pu-erh, green and Oolong teas) have been characterized in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) rat model. However, its effects on lipid profile changes as a beverage is unknown in newly diagnosed patients with dyslipidemia. The work presented in this article aims to design a study protocol with a double-blinded, randomized, placebo-controlled study to assess the efficacy and safety of Hao Ling® tea for hyperlipidemia. Design includes a monocentric study and two parallel groups. A total of thirty patients with newly hyperlipidemia will be randomized in two groups in equal proportion. Hao Ling® tea or placebo infusions will be taken for 3 months with a daily dose of three drinking infusions. This clinical trial will study the efficacy and safety of Hao Ling® tea in these patients. The primary outcome will be the change in blood LDL-C from baseline to month 3 and secondary outcomes the changes total cholesterol, HDL-C, triglycerides, apolipoproteins A1 and B. Adverse events and the safety of intervention will be evaluated.

Keywords: Clinical study protocol; Cholesterol; Low Density Lipoprotein (LDL); High Density Lipoprotein (HDL); Apo A1; ApoB100; Triglycerides; green Oolong Pu-erh Teas;

1. Introduction

It is well established that elevated blood cholesterol or LDL-C concentrations is independently associated with atherosclerosis and increased risk of coronary heart disease (CHD) or stroke. Reducing these blood concentrations as biomarkers of dyslipidemia (by drugs and/or dietary modification) would generally reduce the risk of development of CHD [1]. The discovery of dyslipidemia is a problem frequently encountered in primary medicine where prescription of drugs treating dyslipidemia in particular statins is initiated [2]. Before any drug intervention, French medical recommendations for prevention of hyperlipidemia are changes in diet and lifestyle during a period of 4-month period [3-4]. Hypercholesterolemia could be characterized by serum lipid measurements with abnormal elevation of total cholesterol (TC), LDL-C (low Density lipoprotein-cholesterol), triglyceride (TG) and decrease HDL-C (High Density lipoprotein)-cholesterol. Two principal types exist with first a pure hypercholesterolemia, characterized by circulating cholesterol levels of 2.4 g/l and TG levels of 1.2 g/l. and a second one defined by reduced levels of HDL-C: <0.4g / l in men and <0.5g / l in women associated to high concentrations of TG [5]. The use of serum lipoproteins such as apos (apoA1 and apoB/apoA1 ratio) is of relevance in the clinical practice in parallel to blood cholesterol measurements [6]. Furthermore, INTERHEART and interstroke studies also showed that the apoB/apoA1 ratio could be a better marker of myocardial infarction and cardiovascular disease and ischemic stroke than the TC/HDL-C ratio or LDL-C [7-9].

Consumption of green tea has been inversely associated with the development and progression of cardiovascular disease [10]. The cardiovascular beneficial effects of tea include many modes of action i.e. vasoprotective, antioxidant, antithrombogenic, anti-inflammatory and lipid-lowering properties of tea polyphenols and flavonoids [11]. Promising experimental data and clinical studies on the beneficial effects of green tea in cardiovascular diseases are available [12]. However, the same effects to fermented tea (Oolong, black and Pu-erh (Chinese dark) tea) evaluated in controlled clinical studies remain inconclusive [13].

Hao Ling® tea is composed of a dark tea from the Pu-erh family and green and Oolong teas in respective proportions of 6/2/2. The extract from a Hao Ling® tea infusion has been fully characterized as by MS/MS chromatography as well as potential biological of interest such as antioxidant properties [14]. A preclinical animal study demonstrated the efficacy of this particular tea infusion in an experimental model of dietary sugar and fat overload. This tea intake as beverage reduced blood markers of dyslipidemia (HDL-C and TG and LDL-C/HDL-C ratio) associated with multiple changes in gene expression [15]. The mechanisms of action of Hao-Ling tea in this animal model, demonstrated by transcription (mRNA) analysis, are multiple. A decrease in hepatic cholesterol can be explained by an increase in genes involved in biliary cholesterol excretion, namely CYP7A1 and ABCG5. These results suggest that increasing cholesterol excretion via the bile is a

mode of action of Hao-Ling tea®. The reduction in triglycerides by these teas, meanwhile, is explained by a decrease in lipogenesis in primary cultured hepatocytes and in rats by down-regulation of certain genes encoding key proteins involved in this process, namely SREBP1c and FAS [15]. Additional results (mRNAs, experimental design (with 4 parallel groups including a control group drinking Hao Ling® tea) are presented in this thesis [16].

Finally, a beneficial and direct change in the blood lipid profile must be evidenced by clinical randomized trials (RCTs) with a minimum period of observation of 8 weeks according to the EFSA Guidance for the scientific requirements for European health claims, [17-18] with a daily dose of 3 cups as the minimum drinking dose defined in human [12]. The aim of this study is to design a clinical trial (RCT) intervention of high quality with Hao Ling® tea water infusion by patients of newly diagnosed dyslipidemia.

2. Results

The Table 1 presents the characteristics of systematic reviews and meta-analyses of randomized clinical trials performed among healthy subjects investigating benefits of teas as green or black on lipid profile (TG, TC, LDL-C, HDL-C). No meta-analysis was found for Oolong tea. Relevant English language reviews were identified via searches in PubMed.

Tea <i>Camellia sinensis</i>	Meta-analysis* Reference	Study design (n) Number of subjects + follow-up	Treatment (supplementation, compounds/dose, diet and lifestyle)	Conclusions
Green tea	Kim et al. 2011 [21] PMID : 22027055	(20 RCTs), 1415 subjects (men and women), 3 to 24 weeks follow-up	green tea catechin, 145-3000 mg/d, Maintain normal diet; normal physical activity	∇TC, LDL No significant changes in HDL, TG
	Onakpoya et al.2014 [22] PMID : 24675010	(20 RCTs) 1536 subjects (men and women), median study duration 12 weeks	Green tea extract, Maintain normal diet; normal physical activity	∇TC, LDL
	Momose et al. 2016 [23] PMID : 27324590	(17 RCTs), 1356 subjects (men and women), 4 to 14 weeks follow-up	EGCG, 107-856 mg/d EGCG, Maintain normal diet; normal physical activity	∇LDL
	Xu et al. 2020 [24] PMID : 32434539	(31 RCTs) 3321 subjects (men and women, 3321 patients 3 to 52 weeks follow-up	Green tea, Maintain normal diet; normal physical activity	∇LDL, TC No significant changes in HDL, TG
	Neyestani et al. 2022 [25] PMID : 35750605	(13 meta-analyses, umbrella review) 24482 subjects (men and women)	Green tea extract, Maintain normal diet; normal physical activity	∇ TC, LDL
Black Tea	Igho-Osagie et al. 2020 [26] PMID : 33188386	(14 RCT), 798 healthy or adults with risks (metaboblic syndrom, hypercholesteriolema, prediabete), 7-24 weeks follow-up (median : 7.4)	Green tea or black tea, Maintain normal diet; normal physical activity	No signifcant results on lipidemic profile
	Zhao et al. 2014 [27] PMID : 24972454	(10 RCT's), 411 subjects (men and women)	Black tea, Maintain normal diet; normal physical activity	∇ LDL

* included reviews (RCT) comparing the intake of green or black teas as beverage or supplement with placebo

3. Discussion

The current article aims to design a protocol with a double-blinded, randomized, placebo-controlled study to assess the efficacy and safety of Hao Ling® tea for hyperlipidemia realized in France with French hypercholesterolemic patients newly discovered over a 12 weeks' period of intervention according to medical recommendations.

Tea is recognized as a beverage which, when administered in the right amount, confers health benefits on the host [19]. Knowledge of the chemical components and the mechanisms of action should be important for the choice of tea varieties [20]. The present study used a Hao Ling® tea which is an original mixture of 3 teas, green, Oolong and Pu-erh teas [14-16].

Little is known in European people with a particular western diet about the relation between tea consumption and dyslipidemia. In Europe, there are specific regulations with the EFSA Guidance for the scientific requirements for health claims for foods. These scientific requirements are described as beneficial changes in the blood lipid profile and are the objective of this specific RCT applied to teas [17-18]. The scientific evidence for the substantiation of health claims related to a beneficial change in the blood lipid profile can be obtained from human intervention studies showing a reduction in LDL-c concentrations and/or an increase in HDL-c concentrations with a reduction or no change in LDL-C concentrations and/or a reduction in blood TG concentrations as compared to an appropriate food/constituent. All blood measurements should be performed using well-accepted methods and following standardized conditions and protocols defined by (e.g. Catapano et al., 2016) [18]. In addition, this clinical evidence on the sustainability of the effect with continuous consumption of the food/constituent over longer periods of time (e.g. 8 weeks) should be provided. So we have used two periods of time 4 and 12 weeks around that of the European guideline at 8 weeks. Our study will recruit a total of 30 participants. A decrease of -10% in HDL-C served as the sample calculation with alpha risk of 5% and power of 80 % by using a two-sided test. The patients were enrolled after a newly diagnosed dyslipidemia without drug dyslipidemic treatment for a decrease of the unique primary outcome LDL-C after 12 weeks' duration.

Several clinical studies on the efficacy of Tea (*Camellia sinensis*) in modulating cholesterol or treating hypercholesterolemia have been published and presented in an umbrella review [19]. This clinical studies involved the intervention with green or black teas. For dark teas a bioconversion modified by a post fermentation the constituents of initial leaves [20]. As background for a mixture of 3 teas (green, Oolong and Pu-erh) it was important to review the meta-analyses for these varieties of teas. The Table 3 present on all meta-analyses indexed in PubMed with healthy participants. Only there are information's on the general efficacy of green tea on dyslipidemia. All the meta-analyses presented in Table 3 provide positive results for green teas or extracts on decrease LDL-C serum levels for healthy patient's prevention [21-24]. This was confirmed by an umbrella meta-analysis

study that is an analysis of available meta-analyses [25]. However, for black tea as fermented teas, the 3 meta-analyses provide inconclusive evidence as its efficacy on serum lipids markers since one study presents positive results for LDL-C whereas the two other are negative [26-28].

For the Pu-erh tea as post fermented tea or Chinese black tea, no systemic review with meta-analysis has been published today. Only 3 RCTs available studies have investigated the efficacy for the Pu-erh tea on dyslipidemia [29-31]. All these studies have enrolled Asiatic people. The Pu-erh tea was known and used as a traditional approach in the Chinese medicine and is the traditional beverage. The results for efficacy of Pu-erh tea on cholesterol (TC and LDL-C) are also divergent with inconclusive evidence on dyslipidemia [32, 33]. The only one study presents positive results with hypercholesterolemic patients [32, 33]. No European (RCT) study is available for the Pu-erh tea investigation in healthy or dyslipidemic patients. For Oolong tea there is no systematic review of RCT on the efficacy of Oolong tea on dyslipidemia, except one study with increased feces cholesterol following consumption of Oolong tea [34]. In conclusion and interest for the first Hao ling tea RCT, the polyphenols from green tea and Oolong tea as powerful antioxidants in addition to the chemical constituents such as theabrownins for Pu-erh tea, microbiota or l-theacrine may play a role in reduce the dyslipidemic risk [34-38]. The claim could be described by total cholesterol, LDL-C, HDL-C and TG. In our study, the blood lipid profile has been investigated with these interrelated variables (with the calculated Friedewald Formula for LDL-C) [39]. The underlying mechanism of action by a direct measure has also been investigated through lipoproteins Apo-A1 and apoB100 [39] in addition to HDL-C complexity [40]. The apolipoprotein assay can be used in conjunction with the lipid profile, i.e. the measurement of cholesterol and blood lipid levels, to help assess an individual's cardiovascular risk, which increases when apolipoprotein A1 levels fall and apolipoprotein B levels rise. According to the French Health Authority: - apolipoprotein A1 should be measured when HDL-cholesterol levels are below 0.35 g/L or above 0.80 g/L- apolipoprotein B should be measured when triglyceride levels are above 3.4 g/L. A drop in Apo-A1 blood levels (below 1.1 or 1.2 g/l) is a sign of risk of atherosclerosis [41]. Promise results for additional properties (cancer, diabetes Apolipoprotein A-I (ApoA I) is an anti-atherosclerotic protein with anti-inflammatory and antioxidant properties that promotes the well-known cholesterol efflux from tissues to the liver for excretion but is a promise circulating lipoprotein of interest. This has been reviewed recently [41].

Apolipoprotein B (ApoB) is a direct measure of the particle concentration of all atherogenic lipoproteins, including LDLs, Lp(a), and triglyceride-rich lipoproteins and their remnants, but does not differentiate between LDLs and very low-density lipoproteins (VLDL) [42]. Baca and Warnick have proposed a method for the estimation of LDL apolipoprotein B (LDLapoB) from total apoB [43]. Although LDLapoB represents the concentration of atherogenic LDL particles in all subclasses, it does not differentiate between small, dense LDL particles and larger and lighter subclasses. Our

working hypothesis was that an elevated ratio of LDLapoB to LDL-C (LDLapoB/LDL-C) has been associated with increased cardiovascular risk and that this ratio may be a measure of the concentration of small, dense LDLs) [44].

The trial design follows the French health authority guidelines allowing a window of 4 months before introducing dyslipidemic drugs and focused mainly on lifestyles recommendations. Therefore, the study protocol will have enrolled French people who received a reminder of the importance of a healthy diet (such as sodium restriction, reducing the intake of saturated fatty acids moderating alcohol consumption) and an increase physical activity through regular exercise (to avoid their sedentary lifestyle). The results obtained by using this study protocol are essential as a first scientific evidence toward European food health claims.

Future directions and challenges

If Hao Ling tea® is to be considered as a homology of medicine and food, it will be of importance to provide consumers with the recommended, minimum, and maximum daily doses in a hedonic way. In addition, the optimal duration of Hao Ling tea® intake to achieve significant preventive effects of dyslipidemia need to be studied.

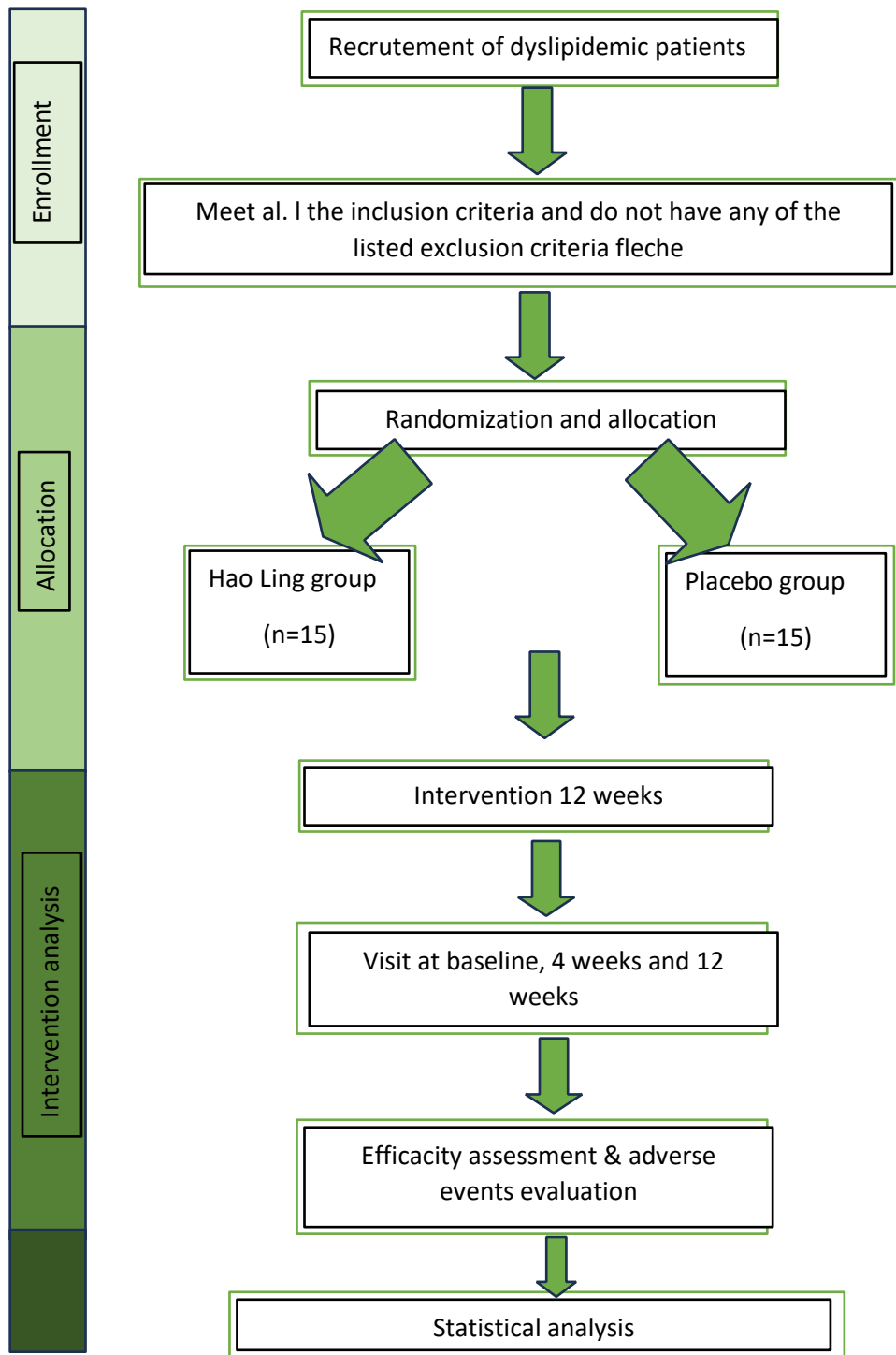
4. Materials and Methods

3.1. Study design

This study is a monocentric, double-blind, placebo-controlled, two-armed, parallel design, individually randomized trial, investigating the lipid-lowering effect and the safety of the Hao Ling® tea in subjects with hypercholesterolemia. The participation duration of each participant fits a maximum of 3 months with 4 visits planned at points corresponding to screening, baseline, and 2 control visits after 30 and 90 days of product consumption. After obtaining the informed consent from all participants, investigators checked the eligibility criteria including clinical examination and medical history. If the eligibility was confirmed within a maximum of 7 days from the date of the screening visit, participants were randomized into either the tea or the placebo group.

The flow diagram of the study design and the schedule of enrollment, interventions, and assessments are shown in Figs. 1. The study will be reported according to the Consolidated Standards for Reporting Trials (CONSORT) statement (<http://www.consort-statement.org>, accessed 14 April 2017).

Figure.1 Flow diagram of study protocol for dyslipidemia. RCT



3.1. Outcomes assessment

1. Primary objectives. The primary outcome will be the change in LDL-C from baseline to month 3.

2. Secondary objectives. Secondary outcomes will be the changes in other serum lipid markers. The secondary objectives were to assess in comparison with placebo:

the effect of the Hao Ling[®] tea on others lipid parameters: total cholesterol (TC), high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C), triglyceride (TG), apolipoproteins A1 (ApoA1) and B (ApoB) levels

3. The safety of the study product: the assessment of safety was carried out throughout the course of the trial by collecting patient-reported adverse events (AE) or found during the clinical examination by the investigator and recorded on the case report forms (CRF).

4. the study product compliance

5. the general satisfaction with the study products (Placebo or Hao Ling[®] tea)

3.2. Recruitment of participants

A total of 30 subjects who fulfilled the eligibility criteria were intended to be recruited in a Clinical Investigation Center (CEN Experimental, Dijon, France). Eligible participants were screened among healthy subjects already registered in the database owned by CEN Experimental which carried out the present trial.

3.3. Eligibility criteria

Inclusion criteria

Subjects will be eligible for the trial if they met all of the following criteria:

1/ Male or female subject aged between 18 and 65 years' old

2/ Subject with type IIa or IIb hyperlipoproteinemia who have never been treated characterized by an LDL-C level > 1.60 g / L and whose setting of hygiene and diet requirements for the primary prevention prior to any treatment with statin is in progress or to be initiated

3/ Subject having given his/her written consent (dated and signed) prior to any procedure related to the trial

Exclusion criteria

1/ Subjects will not be eligible for the trial if they met any of the following criteria:

Severe disease in progress or whose medical or surgical treatment is completed less than 3 months ago

2/ Moderate cardiovascular risk characterized by the existence of two others cardiovascular risk factors or significant cardiovascular risk characterized by history of cardiovascular disease or diabetes with renal involvement [2]

3/ Dyslipidemia that has already been treated or whose treatment is in progress either by medication, by dietary supplement or by fortified or functional foods

4/ Obesity characterized by a body mass index (BMI) > 30 Kg/m²

5/ Uncontrolled treated hypertension

6/ Uncontrolled treated diabetes characterized by a glycaemia > 1,5 g/L or glycated hemoglobin HbA1c > 7%

7/ Impaired hepatic functions characterized by a high transaminase levels (aspartate aminotransferase (AST) > 40 UI/L, alanine aminotransferase (ALT) > 45 UI/L), alkaline phosphatase > 100 UI/L, conjugated bilirubin > 5 µmol/L

8/ Renal impairment characterized by creatinine > 13 mg/L in men and 11 mg/L in women and creatinine clearance < 90 ml/min

9 / Thyroid disease

10/ A drug treatment likely to interfere according to the investigator with the lipid parameters assessed and in particular a recent change of contraceptive method

11/ Regular alcohol consumption > 3 units per day

12/ Use of psychotropic drugs/substances

13/ Special dietary requirements (vegetarian, vegetalian, gluten free, dairy free...)

14/ Intake of fortified foods with sterols and/or polyunsaturated fatty acids (PUFAs) of the n-3 series

15/ Intake of food supplements likely to have an effect on lipid metabolism in the last 3 months

16/ Subject who according to the investigator, is unlikely to comply with the instructions of the protocol and / or to be non-observing to the tested product

17/ Subject not liking tea or with tea intolerance

18/ Subject who participated in a trial during the preceding month or at the time of screening visit

19/ Subject unable to understand and/or sign the informed consent due to linguistic or psychological limitation

20/ Subject being deprived of liberty by administrative or judicial decision, or being under guardianship

21/ For non-menopausal women: Absence of effective contraception (oral contraceptive, intra-uterine device, tubal ligation, surgery)

22/ Pregnant or breastfeeding

23/ Postmenopausal women taking hormone replacement therapy

3.4. Test products

The study product was provided in the form of tea bag containing 2.5 g of Hao Ling[®] tea (*Camellia sinensis*) whose polyphenol composition is presented in Table 2.

The test product is consumed after infusion of the tea bag for 10 min, at a rate of 3 infusions of Hao Ling[®] tea per day. Each subject will drink 3 cups of 200 ml Hao Ling tea per day, equivalent to 2100mg of freeze-dried infusion (700mg of freeze-dried infusion corresponding to a 200ml cup of tea infused for 10 min). The quantity of catechins absorbed per day is therefore around 168 mg.

The control product (placebo) consisted of a tea bag containing 2.5 g of lime tree (*Tilia platiphyllos*) leaves identical in appearance to the study product. Lime tree was chosen as control product because it has an aroma and a color of infusion naturally similar to that of tea. No other component was therefore added to both products. Test products were manufactured for the study and provided by “Thés de la Pagode” (Paris, France).

Table 2. Catechins content of Hao Ling[®] tea.

Catechins content Hao Ling[®]	mg/100mg dried infusion
Gallic acid	1.40 ± 0.02
catechin	0.107 ± 0.003
epicatechin	0.85 ± 0.02
Epigallocatechin-3-O-gallate	4.3 ± 0.2
Epicatechin-3-O-gallate	1.3 ± 0.1
Catechin gallate	nd
Gallocatechin	nd
Gallocatechine-O-gallate	nd
Epigallocatechin	nd
Total catechins	7.957

Data are expressed as the mean ± SD. (n=3) n.d. not detected

3.5. Study schedule The study schedule is shown in Table 3.

Table 3. Study schedule of enrolment, interventions and assessments.

Study Period	Screening visit	Randomizati on visit	Follow-up study	End of study visit
Name of the visit	V0	V1	V2	V3
Days relative to the start of the evaluation	d-7 to d-3	d0	d30+/- 3	d90+/-3
Sélection and general procedures				
Information and informed consent	X			
inclusion/exclusion Criteria	X	X		
Age, sexe, height	X			
Weight, BMI	X			X
Cardiovascular Risk assessment	X	X		
Questionnaire on dietary habits and lifestyle		X	X	X
Assessment of product tolerance (safety)			X	X
Hedonic evaluation and satisfaction			X	X
Administration				
Bags of tea or placebo		X	X	
Assessment of compliance with product intake			X	X
Biological parameters				
Report of screening biological parameters §		X		
Report of lipid profile (EAL : Evaluation of cholesterol, HDL, LDL, TG, lipoproteins ApoA-1, ApoB100	X	X	X	X

§ Red blood cells, Blood glucos, Glycated hemoglobin (HbA₁C), Alat, Asat, Alkaline phosphatase, Conjugated bilirubin, Creatinemia, Creatinine clearance.

After signing the consent form, the subjects identified will undergo a V1 selection visit (inclusion and non-inclusion criteria).

V1: Screening - Informing the subject and signing the informed consent form in duplicate - Selection questionnaire, verification of inclusion and non-inclusion criteria - General clinical examination of the subject and measurement of systolic and diastolic blood pressure and heart rate - Age, measurement of weight, height, calculation of BMI - Measurement of abdominal circumference (BP) and waist circumference (WC) - Available lipid profile: Selection if a biological work-up is available and shows hypercholesterolemia and LDL-C > 1.60g/L- Questioning about medical and surgical history, associated pathologies, and current treatments- If the subject meets the selection criteria, prescription of a lipid work-up, a blood count, a glycemic work-up, a liver work-up and a renal work-up.

V2: Randomization (3 to 7 days after screening)- Confirmation of inclusion and exclusion criteria on the basis of the biological work-up -The subject will be randomized if he/she has an LDL-C level > 1.6g/L and no abnormalities in the blood count, glycemic, hepatic and renal parameters, Hepatic and renal parameters- Measurement of systolic and diastolic blood pressure and heart rate- Questionnaire on dietary and lifestyle habits (to control for study bias)- Cardiovascular lifestyle advice on the management of dyslipidemia- Provision of test product for half of the study (3 boxes of 30 infusettes) according to randomization list- Provision of a prescription for a second lipid test to be carried out within 3 days prior to the next consultation.

V3: after 4 weeks (+/-2 days) of consumption of the tested product. - Recording of lipid profile data - Questioning about any adverse events - Questioning about any concomitant treatments - Product evaluation questionnaire (general satisfaction, hedonic acceptability, etc.), product effect according to subject's opinion)- Dispensation of trial products for the second half of the study (3 boxes of 30 tea bags)- Return of cardboard boxes containing unused tea bags (compliance check)- Issue of prescription for a third lipid check-up to be carried out within 3 days of the next consultation.

V4: End-of-study visit after 12 weeks (+/-2 days) of consumption of the tested product. - Measurement of weight, abdominal circumference (BP), waist circumference (WC), calculation of BMI- Measurement of systolic and diastolic blood pressure and heart rate- Questionnaire on dietary and lifestyle habits (to control study bias)- Questionnaire on subject's evaluation of the product (general satisfaction-Questionnaire on the subject's evaluation of the product (general satisfaction, hedonic acceptability, effect of the product according to the subject's opinion) - Questionnaire on any adverse events - Questionnaire on any concomitant treatments - Collection of cardboard boxes containing unused tea bags (compliance check).

3.6. Interventions

Participants were randomized to receive either the study product or a placebo for 3 months. The type of randomization was the block randomization method. The trial daily dose was 3 water tea infusion taken orally morning, noon and evening after meals. At the baseline visit and V2, investigators provided for each included participant a tea box containing infusion tea bags to ensure 4 and 8 weeks of consecutive supplementation (56 ± 2 days) respectively.

3.7. Blinding and randomization

The study was a double-blind trial. Neither investigators nor patients were aware of product allocation until the end of the trial. A 30-case randomisation arrangement was performed by an independent statistician according to the sequence generated with SAS[®] software (SAS[®] 8.2 software (SAS[®], Cary, NC, USA)). The randomization was stratified with participants randomly allocated (1:1 basis) to either Hao Ling[®] tea or placebo. The generated sequence provides serial number lists from 01 to 30 corresponding to consecutive allocation.

Tested products provided by the sponsor were numbered with a label according to the randomisation schedule. Code breaking was allowed only in the case of serious adverse event (SAE) or a medical emergency, where knowledge of the treatment allocation was required for an appropriate treatment action.

The investigator was asked to immediately inform the sponsor if unbinding occurred. The investigator was indicated to report reasons of the unbinding on the CRF and on the envelope, together with the date and the investigator's stamp. All this information was transmitted by the sponsor of the study to ANSM (French drug medical agency).

3.8. Clinical and safety outcomes

A medical history, including the presence of chronic diseases and regular medication were recorded before inclusion. A physical examination was performed at each visit and vital signs (blood pressure, heart rate, body weight) were also monitored both at screening and final visits.

3.9. Clinical data-management

Case report forms (CRF) were used by investigators to record data for all participants. CRF were completed by the clinical research associate of the study who sent them to the data administrator to enter the data into the electronic data base using Capture System software (Clinsight[®], Cenon, France) according to the specifications for the present study (33).

3.10. Laboratory investigations

Blood samples (2x7 ml + 1x5 ml) of all participants will be collected after 12h of overnight fasting at the baseline V0, V1 and visit at the end of the study with dried tubes (BD ref. 367955, BD ref 367957 respectively). The samples will be collected into 3 different tubes (in the tube without anticoagulant and in the EDTA tube (5 ml, BD ref 368861) and centrifuged to obtain the serum. The serum samples (3 ml) will be stored at -80°C. The serum will be used for TC (Cholesterol oxidase/peroxidase method XX France), TG (XX), HDL-C (XY).

The following formula will be used to calculate VLDL and LDL-C

$VLDL = TG \text{ (mg/dl)}/5$ (the formula is only valid when $TG < 400 \text{ mg/dl}$)

$LDL-C = TC \text{ (mg/dl)} - TG \text{ (mg/dl)}/5$; Friedewald formula.

3.11. Safety assessment

An adverse event (AE) is defined as any adverse change of the patient condition, which means all unfavorable signs, symptoms or progressions of an associated disease already diagnosed at screening visit, whether or not considered related to the study product. This includes unintended signs, symptoms, diseases and initial biological parameters significant deviations from initial biological parameters. All biological parameters for which abnormal results are recorded after the start of the study product intake must be repeated until resolution or results are considered stable. Abnormal results are defined as those which go beyond the limits fixed by pre-determined organic standard and which are clinically significant. AE were monitored throughout the study through regular face-to-face visits and phone calls between visits. The participants were requested to report any AE to the research staff spontaneously. In all the cases of AE, their aetiology must be identified and it must be notified to the sponsor. Any AE recorded on CRF will describe nature (diagnosis, signs and symptoms), severity, starting date, termination date, actions undertaken and relation with the study product according to the investigator. The investigator was requested to state whether or not an AE was considered as a serious adverse event (SAE). The frequency of the AE was reported for each group during the trial according the MedDRA classification.

3.12. Serious adverse events

SAE includes, but is not limited to, any event that is fatal (for whatever reason), life-threatening, a persistent or considerable disability, or results in hospitalization or prolonged hospital stay, or results in malformation. Any SAE occurring during the trial observed by the investigator or noted above, whether or not attributed to study product, must be reported on the CRF, one being informed of the event. The investigator shall inform sponsor representatives and the ANSM within 24 hours. The

investigator was requested to follow up SAE until resolution or the event was considered stable. A procedure for a re-examination of informed consent and any SAE occurring 1 month after the last intake of the study product or at the end of the study must be notified to the sponsor.

3.13. Statistical analysis

The statistical analysis of this trial will be carried out by CEN. It will be carried out in accordance with the protocol and the statistical analysis plan. The efficacy analysis will be carried out successively on the intention-to-treat and per-protocol populations. The intention-to-treat study will be conducted on all subjects having taken the product at least once and having had at least one post-inclusion evaluation visit (modified ITT). In the event of missing data on evaluation parameters, analyses will be carried out with or without taking into account the last available evaluation, using the "Last Observation Carried Forward (LOCF)" technique. The per-protocol analysis will be carried out on subjects who have taken the product up to D90 and reviewed at D90, excluding subjects who have presented a major violation of the protocol. Violations will be assessed on a case-by-case basis during the blind review.

The safety analysis will cover the population including all subjects who have taken the product at least once.

The analysis will comprise the following steps:

1. Trial summary The following will be described: - the number of subjects included; - all the characteristics recorded at inclusion; - minor deviations or major violations of the protocol (subjects wrongly included, consumption of the product poorly monitored); - trial withdrawals and their reasons; - the number of subjects seen at each visit.
2. Comparability of groups at inclusion. The statistical analysis will describe and compare, at inclusion, between product groups: subjects' demographic and clinical characteristics, general clinical condition, cardiovascular risk, total cholesterol, HDL cholesterol, LDL cholesterol, triglycerides, fasting blood glucose. Quantitative data will be described in terms of numbers, mean, standard deviation, median, minimum and maximum. Qualitative data will be described by absolute and relative frequency and confidence intervals. Comparisons of means will be made using ANOVA (or the Kruskal Wallis test if distributions are not normal). Percentage comparisons are made using the Chi² test (or Fisher's Exact test if the conditions for applying the Chi² test are not possible).

The Efficacy analysis was done for the primary and secondary endpoints. For primary endpoint, the primary endpoint is defined as the reduction in LDL cholesterol. The evolution of LDL cholesterol will be assessed by an analysis of variance on a series matched to two factors: time and treatments with interaction. The reductions obtained will be calculated along with their 95% confidence intervals, and will be compared between groups using a Student's t test. These analyses can be

completed by an analysis of covariance adjusted on the initial values of the parameters studied. For secondary endpoints, an analysis of variance on repeated measures will be carried out for each of the secondary endpoint parameters, other lipid parameters (total cholesterol, HDL cholesterol, triglycerides, alipoproteins) and the compliance with the test product by recovery of unused infusion bag tea. The hedonic evaluation and satisfaction were done by the test product by self-questionnaire. For tolerance analysis, the percentages of subjects having experienced at least one adverse event will be compared between the two groups using a Chi² test or a Fisher's Exact test (if the conditions for application of the Chi² test are not met). The percentages of the most frequent local and general events will also be calculated and compared by a Chi² test or by a Fisher's Exact test if the conditions for applying the Chi² test are not met.

3.14. Sample size calculation

The sample size for this trial was calculated based on a reduction in LDL cholesterol (the primary outcome). Assuming a difference of 10% under the effect of the product versus placebo, with an estimated standard deviation of 0.2 g/l at risk alpha=0.05 and a power of 0.8 by using a two-sided test, the number of subjects to be included in each group is 26. This number was increased to 30 to take account of recruitment difficulties and subjects lost to follow-up. In total, 30 participants will be enrolled in this trial.

3.15. Analysis software

Data will be double-entered using Capture System software, allowing traceability of all actions in accordance with ICH recommendations. Statistical analysis will be carried out using SAS (version 9.3), with the statistical significance threshold set at alpha=0.05 (type 1 error of 5%). The number of subjects required was calculated using Nquery Advisor software (version 6.01).

Protocol modifications and amendments

No modification of this protocol may be made without the agreement of the sponsor and the coordinator. All amendments to the protocol prior to implementation must be sent to the ethics Committee (CPP EST I) for information and agreement. The study sponsor reserves the right to interrupt the trial at any time, for medical, administrative or other reasons.

3.16. Data collection and monitoring

All the data specified in the protocol and collected by the investigator must be included in the observation booklet. The notebooks will be filled in by the investigator and the staff designated for

the study, and signed by the investigator. Each correction must be dated and initiated by the investigator or a person duly authorized by him/her. The investigator is asked to note in the subject's medical file at least: - the subject's participation in the trial, with the trial code;- demographic data (date of birth, sex, name);- medical and surgical history;- concomitant treatments;- date of each trial visit;- diagnosis chosen;- side effects;- information on whether the subject is covered by a social security scheme. These data will be recorded in a specific file separate from the observation book, which will constitute the source data that can be consulted at any time by the sponsor.

3.17. Data control

3.17.1. Direct access to data source

By agreeing to participate, the investigator undertakes to comply strictly with the experimental protocol, "Good Clinical Practice" and the law of December 20, 1988. It guarantees the authenticity of the data collected as part of the trial and accepts the legal provisions authorizing the trial sponsor to set up monitoring. In accordance with Good Clinical Practice, the data will be checked at the investigation site by the Clinical Research Assistant. The investigator undertakes to be available to receive the Clinical Research Assistant and to keep all source documents available for comparison with the observation booklet.

3.18. Monitoring

Each visit will be the subject of a written report to be submitted to the Sponsor.

3.18.1. Set-up

The purpose of the set-up visit is to present the protocol to the investigator and his collaborators under cover of confidentiality, and to ensure that the human and material resources required to carry out the trial are adequate, as well as the skills and experience of the investigator and his collaborators. During the set-up visit, the Clinical Research Assistant will ensure that the CEN Experimental center has all the materials required to carry out the trial:- investigator's binder with : - experimental protocol and its appendices ; - volunteer information and consent form ; - coordinator's updated, dated and signed curriculum vitae ; - investigator's updated, dated and signed CV ; - confidentiality agreement (dated, signed) ; - protocol approval, investigator's undertaking to comply with its obligations ; - list of delegated tasks, signatures and initials (if applicable) ; - insurance certificate ; - favorable opinion of the CPP (initial and supplementary) ; - ANSM authorization (initial and supplementary) ; - signed research agreement ; - list of persons to be contacted during the study ; - list of investigators ; - product allocation/randomization procedure ; - implementation report ; - final research report. - observation books; - investigator's brochure; - product batches; - trial materials.

3.18.2. Follow-up/closure

The study follow-up visit will enable the Clinical Research Assistant to ensure adherence to the protocol and conformity of the data collected with the source data. Any necessary corrections will be made by the investigator, then dated and initialled. The original copy of the validated case report book will be collected by the Clinical Research Assistant. The closing visit (at the end of the trial) will enable the products, case report books, self-questionnaires and copies of consent forms to be collected, as well as verification that the trial data have been retained (archiving). If necessary, the sponsor may request deferred corrections from the investigator, who will sign them.

3.19. Regulatory obligations and administrative procedures

In accordance with the principles of the Declaration of Helsinki (1964), revised in Tokyo (1975), Venice (1983), Hong Kong (1989), Somerset West (1996) and Edinburgh (2000), this trial must be conducted in accordance with the rules of Good Clinical Practice, and with the procedures applicable to biomedical research as defined by European Directive 2001/20/EC, transposed by Decree no. 2005-477 of April 26, 2006. This may also include an on-site audit by the sponsor, the Scientific Committee and/or an inspection by representatives of the health authorities, at any time.

The investigator must agree to the inspection of trial source documents by the monitor, the health authority representative, the sponsor's representative and/or the Scientific Committee. In other countries where the trial will be conducted, the procedure will comply with the regulatory obligations and procedures in force.

3.20. Participants' withdrawal and dropouts

Participants may withdraw from the trial for any reason at any time, but must inform the investigator. In any case, the investigator shall review the participants who are withdrawn as soon as reasonably possible for a full assessment in order to:

- Report the reason on the CRF
- Assess the clinical status of the participant
- Take appropriate therapeutic measures if necessary

3.21. Premature termination of the study

The sponsor can stop the trial at any time, for the following reasons:

- Inability of research centers to include participants
- Deviation from Good Clinical Practices and/or clinical regulations
- Insufficient product safety
- Lack of efficacy or significant efficacy according to the results of the interim analysis
- Any new information (SAE) that could affect the safety of participants.

-The trial can also be stopped by the French competent authority (ANSM) if there is a doubt about the safety or the scientific validity of the study.

3.22. Definition of a protocol deviation

Will be considered as major deviation (participant excluded from per-protocol analysis) misdiagnosis (inclusion and exclusion criteria not met), premature termination of the trial or inability to follow-up, taking prohibited medications, lack of data related to the primary outcome. All other cases will be considered as minor deviation and in any cases, investigators shall report reasons of dropouts on the CRF.

3.23. Conventions concerning the product of missing or aberrant data.

Data entry will be carried out in double entry by two independent data entry operators, with secondary reconciliation of the 2 databases. This data entry will be accompanied by pre-programmed logical checks. Data discrepancies will be checked against the study form and reviewed by the investigator. If there are any queries about the information contained in the file, a request for information will be sent to the investigator.

3.24. Creation of new variables/ Calculation rules

$IMC = (\text{weight in kg} / (\text{height in m}^2));$

$Observance = (\text{actual consumption} / \text{theoretical consumption}) \times 100$ with actual consumption = $90 / 180 -$ number of bags reported at D30/J90 theoretical consumption = $(\text{time in days between D0 and D30/J30 and D90}) \times 3$

5. Conclusions

We designed a study protocol for a clinical trial of newly diagnosed hyperlipidemia management with Hao Ling® tea according to the European guidelines for health claims on dyslipidemia. The results of this trial will also present the first efficacy and safety of Hao Ling® tea in these patients.

Supplementary Materials: The CONSORT 2010 checklist of information to include when reporting a randomized trial.

Author Contributions: “Conceptualization, J.M.M.; O.P.; J.M.Z.; and Y.Y.; methodology, O.P.; F.H.; and J.M.M.; software, F.H.; validation, O.P., J.M.Z. and J.M.M. investigation, .; resources, F.H.;; data curation, O.P. J.M.M.Z.; F.H. and J.M.M.; writing—original draft preparation, O.P.; E.R.; and J.M.M.; writing—review and editing, O.P.; E.R.; and J.M.M. .; supervision, O.P. F.H.; and J.M.M.; project administration, F.H.; J.M.M.; funding acquisition, J.M.Z.. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.”

Funding: J-M.Z. as Thés de la Pagode and funder. J.M.M., O.P., J.B., M.B., and E.R. authors declare no conflicts of interest. J.M.Z. as funder had no role in the design of the analytical study and in the collection, analyses, or interpretation of data.

Acknowledgments: Acknowledgments: We are grateful to Sandrine Pierre (Marshall Institute for Interdisciplinary Research, Huntington, WV, USA) for providing insightful comments. We are also grateful to Susan Whiting (University of Saskatchewan, Canada) for editing and revisions and Souad Sennoune and Raul Martinez-Zaguilan (Texas Tech University, Health Sciences center, Lubbock, TX, USA) for their revisions. This work is also dedicated to Zijian Xie (Marshall Institute for Interdisciplinary Research, Huntington, WV, USA) for discussion on teas and to François-André Allaert (CEN, Dijon, France) for discussion on study design.

Conflicts of Interest: J.-M.Z. as Thés de la Pagode and funder. J.M.M., O.P., J.B., M.B., and E.R. authors declare no conflicts of interest. J.M.Z. as funder had no role in the design of the analytical study and in the collection, analyses, or interpretation of data or in the decision to publish the results”.

6. Références

1. Sandesara, Pratik B., Salim S. Virani, Sergio Fazio, et Michael D. Shapiro. « The Forgotten Lipids : Triglycerides, Remnant Cholesterol, and Atherosclerotic Cardiovascular Disease Risk ». *Endocrine Reviews* 40, no 2 (1 avril 2019): 537-57.
2. Wang, Helen H., Gabriella Garruti, Min Liu, Piero Portincasa, et David Q.-H. Wang. « Cholesterol and Lipoprotein Metabolism and Atherosclerosis: Recent Advances in Reverse Cholesterol Transport ». *Annals of Hepatology* 16, no Suppl. 1 : s3-105. (Novembre 2017): s27-42.
3. Décision n°2023.0121/DC/SEU du 23 mars 2023 du collège de la Haute Autorité de santé relative au droit d’alerte des associations Alliance Maladies Rares et Association Nationale des Hypercholestérolémies Familiales concernant la demande d’un dépistage précoce de l’hypercholestérolémie familiale
4. French National Authority for Health (HAS). Effectiveness and efficiency of lipid-lowering drugs: an analysis focused on statins. July 2010. Available from: https://www.has-sante.fr/jcms/c_969195/.
5. Capón Álvarez J, Díaz Rodríguez A, Méndez Rodríguez E, Crespo García N, Cuello Estrada C, Seco Calvo JA. Diagnóstico de la dislipidemia aterogénica por los médicos de atención primaria en España [Diagnosis of atherogenic dyslipidaemia by primary care physicians in Spain]. *Semergen*. 2021 ;47(2):99-105. doi: 10.1016/j.semerg.2020.07.008
6. Vernardis SI, Demichev V, Lemke O, et al. The Impact of Acute Nutritional Interventions on the Plasma Proteome. *J Clin Endocrinol Metab*. 2023 ;108(8):2087-2098. doi :10.1210/clinem/dgad031
7. S. Tsimikas, A Test in context: lipoprotein(a): diagnosis, prognosis, controversies, and emerging therapies, *J. Am. Coll. Cardiol.* 69 (6) (2017) 692–711..
8. M.C. Bodde, M.P.J. Hermans, J.W. Jukema, M.J. Schalijs, W.M. Lijfering, F. R. Rosendaal, et al., Apolipoproteins A1, B, and apoB/apoA1 ratio are associated with first ST-segment elevation myocardial infarction but not with recurrent events during long-term follow-up, *Clin. Res. Cardiol.* 108 (5) (2019) 520–538.
9. O'Donnell, M. J., McQueen, M., Sniderman, A., Pare, G., Wang, X., Hankey, G. J., Rangarajan, S., Chin, S. L., Rao-Melacini, P., Ferguson, J., Xavier, D., Lisheng, L., Zhang, H., Pais, P., Lopez-Jaramillo, P., Damasceno, A., Langhorne, P., Rosengren, A., Dans, A. L., Elsayed, A., ... INTERSTROKE Investigators (2022). Association of Lipids, Lipoproteins, and Apolipoproteins with Stroke Subtypes in an International Case Control Study (INTERSTROKE). *Journal of stroke*, 24(2), 224–235. <https://doi.org/10.5853/jos.2021.02152>
10. Babu PV, Liu D. Green tea catechins and cardiovascular health: an update. *Curr Med Chem*. 2008 ;15(18):1840-1850. Doi :10.2174/092986708785132979
11. Tang GY, Meng X, Gan RY, et al. Health Functions and Related Molecular Mechanisms of Tea Components: An Update Review. *Int J Mol Sci*. 2019 ;20(24):6196. Published 2019 Dec 8. Doi :10.3390/ijms20246196
12. Yang CS, Zhang J. Studies on the Prevention of Cancer and Cardiometabolic Diseases by Tea: Issues on Mechanisms, Effective Doses, and Toxicities. *J Agric Food Chem*. 2019;67(19):5446-5456. doi:10.1021/acs.jafc.8b05242

13. Pan H, Le M, He C, Yang CS, Ling T. Dark tea: A popular beverage with possible medicinal application. *Chin Herb Med.* 2022 ;15(1):33-36. Published 2022 Nov. 24. doi: 10.1016/j.chmed.2022.08.00
14. Braud L, Peyre L, de Sousa G, Armand M, Rahmani R, Maixent JM. Effect of Brewing Duration on the Antioxidant and Hepatoprotective Abilities of Tea Phenolic and Alkaloid Compounds in a t-BHP Oxidative Stress-Induced Rat Hepatocyte Model. *Molecules.* 2015 ;20(8):14985-15002. Published 2015 Aug 17. Doi :10.3390/molecules200814985
15. Braud L, Battault S, Meyer G, et al. Antioxidant properties of tea blunt ROS-dependent lipogenesis: beneficial effect on hepatic steatosis in a high fat-high sucrose diet NAFLD obese rat model. *J Nutr Biochem.* 2017; 40 :95-104. doi: 10.1016/j.jnutbio.2016.10.012
16. Laura Braud. Effets lipotropes des molécules antioxydantes du thé (*Camellia sinensis*). Alimentation et Nutrition. Doctoral thesis (Ph. D) Université de Toulon, 2015. Français. NNT : 2015TOUL0014. Tel-01405340.
17. EFSA Journal 2018;16(1):5136 Claims on a beneficial change in the blood lipid profile.
18. Catapano AL, Graham I, De Backer G, Wiklund O, Chapman MJ, Drexel H, Hoes AW, Jennings CS, Landmesser U, Pedersen TR, Reiner Z, Riccardi G, Taskinen MR, Tokgozoglul, Verschuren WM, Vlachopoulos C, Wood DA and Zamorano. JL, 2016. 2016 ESC/EAS Guidelines for the Management of Dyslipidaemias. *European Heart Journal*, 37, 2999–3058. Available online: <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehw272>
19. Keller A, Wallace TC. Tea intake and cardiovascular disease: an umbrella review. *Ann Med.* 2021 ;53(1):929-944. Doi :10.1080/07853890.2021.1933164
20. Zhu MZ, Li N, Zhou F, et al. Microbial bioconversion of the chemical components in dark tea. *Food Chem.* 2020 ;312 :126043. Doi : 10.1016/j.foodchem.2019.126043
21. Kim A, Chiu A, Barone MK, et al. Green tea catechins decrease total and low-density lipoprotein cholesterol: a systematic review and meta-analysis. *J Am Diet Assoc.* 2011;111(11):1720-1729. doi: 10.1016/j.jada.2011.08.009
22. Onakpoya I, Spencer E, Heneghan C, Thompson M. The effect of green tea on blood pressure and lipid profile: a systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2014 ;24(8):823-836. Doi : 10.1016/j.numecd.2014.01.016
23. Momose Y, Maeda-Yamamoto M, Nabetani H. Systematic review of green tea epigallocatechin gallate in reducing low-density lipoprotein cholesterol levels of humans. *Int J Food Sci Nutr.* 2016 ;67(6):606-613. Doi :10.1080/09637486.2016.1196655.
24. Xu R, Yang K, Li S, Dai M, Chen G. Effect of green tea consumption on blood lipids: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Nutr J.* 2020 ;19(1): 48. Published 2020 May 20. Doi :10.1186/s12937-020-00557-5
25. Neyestani TR, Nikooyeh B. A comprehensive overview on the effects of green tea on anthropometric measures, blood pressure, glycemic and lipidemic status: An umbrella review and meta meta-analysis study. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2022 ;32(9):2026-2040. doi : 10.1016/j.numecd.2022.05.021
26. Igho-Osagie E, Cara K, Wang D, et al. Short-Term Tea Consumption Is Not Associated with a Reduction in Blood Lipids or Pressure: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *J Nutr.* 2020 ; 150(12):3269-3279. doi : 10.1093/jn/nxaa295
27. Zhao Y, Asimi S, Wu K, Zheng J, Li D. Black tea consumption and serum cholesterol concentration: Systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Clin Nutr.* 2015;34(4):612-619. doi: 10.1016/j.clnu.2014.06.003

28. Kubota K, Sumi S, Tojo H, et al. Improvements of mean body mass index and body weight in preobese and overweight Japanese adults with black Chinese tea (Pu-erh) water extract [published correction appears in *Nutr Res.* 2012 Jun;32(6):470]. *Nutr Res.* 2011 ;31(6):421-428. doi : 10.1016/j.nutres.2011.05.004
29. Fujita H, Yamagami T. Antihypercholesterolemic effect of Chinese black tea extract in human subjects with borderline hypercholesterolemia. *Nutr Res.* 2008 ;28(7) :450-456. doi : 10.1016/j.nutres.2008.04.005
30. Chu SL, Fu H, Yang JX, et al. A randomized double-blind placebo-controlled study of Pu'er tea extract on the regulation of metabolic syndrome. *Chin J Integr Med.* 2011;17(7):492-498. doi:10.1007/s11655-011-0781-4
31. Jensen GS, Beaman JL, He Y, Guo Z, Sun H. Reduction of body fat and improved lipid profile associated with daily consumption of a Puer tea extract in a hyperlipidemic population: a randomized placebo-controlled trial. *Clin Interv Aging.* 2016 ;11: 367-376. Published 2016 Mar 24. doi:10.2147/CIA.S94881
32. Huang F, Zheng X, Ma X, et al. Theabrownin from Pu-erh tea attenuates hypercholesterolemia via modulation of gut microbiota and bile acid metabolism. *Nat Commun.* 2019 ;10(1):4971. Published 2019 Oct 31. doi:10.1038/s41467-019-12896-x
33. Hsu TF, Kusumoto A, Abe K, et al. Polyphenol-enriched Oolong tea increases fecal lipid excretion. *Eur J Clin Nutr.* 2006 ;60(11):1330-1336. doi: 10.1038/sj.ejcn.1602464
34. Fang WW, Wang KF, Zhou F, et al. Oolong tea of different years protects high-fat diet-fed mice against obesity by regulating lipid metabolism and modulating the gut microbiota. *Food Funct.* 2023 ;14(6):2668-2683. Published 2023 Mar 20. doi: 10.1039/d2fo03577d
35. Bond T, Derbyshire E. Tea Compounds and the Gut Microbiome: Findings from Trials and Mechanistic Studies. *Nutrients.* 2019 ;11(10):2364. Published 2019 Oct 3. Doi :10.3390/nu11102364
36. Wang S, Qiu Y, Gan RY, Zhu F. Chemical constituents and biological properties of Pu-erh tea. *Food Res Int.* 2022 ; 154 :110899. Doi : 10.1016/j.foodres.2021.110899
37. Zhang YH, Li YF, Wang Y, et al. Identification and characterization of N9-methyltransferase involved in converting caffeine into non-stimulatory theacrine in tea. *Nat Commun.* 2020 ;11(1):1473. Published 2020 Mar 19. Doi :10.1038/s41467-020-15324-7
38. Dybiec J, Baran W, Dąbek B, et al. Advances in Treatment of Dyslipidemia. *Int J Mol Sci.* 2023 ;24(17) :13288. Published 2023 Aug 27. Doi :10.3390/ijms241713288
39. Trusca VG. The Promise of Apolipoprotein AI-Based Therapy. *Austin J Mol & Cell Biol.* 2021; 4(1): 1009.
40. von Eckardstein A, Nordestgaard BG, Remaley AT, Catapano AL. High-density lipoprotein revisited: biological functions and clinical relevance. *Eur Heart J.* 2023 ;44(16) :1394-1407. doi:10.1093/eurheartj/ehac605
41. Silbernagel G, Scharnagl H, Saely CH, et al. The LDL Apolipoprotein B-to-LDL Cholesterol Ratio: Association with Cardiovascular Mortality and a Biomarker of Small, Dense LDLs. *Biomedicines.* 2022;10(6):1302. Published 2022 Jun 2. doi:10.3390/biomedicines10061302
42. Baca A.M., Warnick G.R. Estimation of LDL-associated apolipoprotein B from measurements of triglycerides and total apolipoprotein B. *Clin. Chem.* 2008;54:907–910. doi: 10.1373/clinchem.2007.100941.
43. von Knobelsdorff-Brenkenhoff F, Schulz-Menger J. Cardiovascular magnetic resonance in the guidelines of the European Society of Cardiology: a comprehensive summary and update. *J Cardiovasc Magn Reson.* 2023 ;25(1):42. Published 2023 Jul 24. doi:10.1186/s12968-023-00950-z

Article 2 :
Le thé Qi Cha[®]

Résumé de l'article

Activités biologiques et teneur en polyphénols du thé Qi Cha[®], une boisson brevetée (ABC) de thé blanc contenant des plantes ou leur extrait sec faisant l'objet d'allégations de santé européennes

Le but de cette étude était d'évaluer la teneur en polyphénols ainsi qu'en caféine présents dans le thé Qi Cha[®] de même que ses propriétés biochimiques ainsi que ses composants végétaux (sureau, basilic sacré, échinacée, zeste d'orange, citronnelle et gomme d'acacia).

La méthode brevetée Bio Concentrate Assets[®] (ABC), utilisant de la gomme d'acacia « bio » avec la décoction de feuilles de *Camellia sinensis* « bio » est utilisée afin d'enrichir les feuilles de thé avec des extraits secs concentrés. Cette infusion est connue pour ses effets bénéfiques pour la santé et, appliquée au thé blanc, cela a donné naissance au thé Qi Cha[®].

Cette étude a évalué la teneur en polyphénols, en caféine et de ses composants végétaux (sureau, basilic sacré, échinacée pourpre, zeste d'orange, citronnelle et gomme d'acacia) ainsi que les propriétés biologiques du Qi Cha Tea[®]. Cette étude évaluait également respectivement l'activité antioxydante ainsi que la viabilité cellulaire grâce aux tests DPPH et MTT avec de l'acide ascorbique ainsi que du tamoxifène comme standards. Les évaluations ont été réalisées sur des cellules Caco-2 et HCT-116 respectivement, celles-ci provenant de lignées humaines cancéreuses.

Les résultats ont montré que la composition en caféines et en polyphénol du thé Qi Cha[®] était différente de celle du thé blanc original, celui-ci entraînant une réduction significative du taux de caféine ainsi que d'acide gallique mais montrant une augmentation significative du taux mesuré d'épigallocatechine gallate (EGCG), puissant oxydant. Les plantes testées, dont le Qi Cha[®] ont présenté, à l'exception de l'échinacée pourpre, une activité mesurée antioxydante (DPPH) similaire lorsque la concentration de ceux-ci était de 50 µg/mL. Le thé Qi Cha[®] constituait le thé présentant la plus forte activité antioxydante (90 % à 50 µg/ml pour une extraction conventionnelle) en comparaison du thé blanc d'origine (61 % à 50 µg/ml pour une extraction liquide sous pression), ce qui représente une diminution par deux. Pour comparaison, la fraction massique de thé blanc présente dans le Qi Cha[®] est de 48.3%. Le maintien de l'activité antioxydante fait de la boisson Qi Cha[®] une boisson saine aux propriétés protectrices contre le stress oxydatif.

Concernant l'activité cytotoxique et la viabilité cellulaire (MTT), l'activité cytotoxique la plus faible a été mesurée pour le thé Qi Cha[®] si on se réfère à la viabilité mesurée des deux lignées cellulaires, ceci toujours en comparaison du thé blanc d'origine. Ceci fait du thé Qi Cha[®] une alternative plus sécuritaire et biocompatible que le thé blanc. La modification significative dans la composition du thé Qi Cha[®] par rapport au thé blanc d'origine est notamment possible grâce à l'addition d'écorce

d'orange suivant le processus ABC. Ces résultats tendent à démontrer que le potentiel bénéfique pour la santé est préservé et que cette formule de thé Qi Cha®.

Les implications de ces résultats sont très prometteuses puisqu'ils mettent en évidence le potentiel du thé pour mettre au point d'autres infusions de plantes à base de thé fonctionnelles possédant de nombreux bénéfices pour la santé, ceci en modifiant simplement la composition en plantes de base présentes dans les formules. Ces résultats mettent également en évidence une avancée concernant la recherche en industrie agroalimentaire puisque cette nouvelle méthode de production des infusions ouvre la voie à la mise au point de boissons répondant à la fois aux besoins nutritionnels ainsi qu'aux attentes des consommateurs concernant leur santé. Ces boissons fonctionnelles permettraient, suivant l'exemple du thé Qi Cha®, d'allier innovation technologique et science. Le thé Qi Cha® permettrait non seulement d'apporter une alternative innovante aux boissons traditionnelles mais également d'amener un meilleur bénéfice santé et de répondre aux allégations santé pour les plantes, démontré par cette étude par l'augmentation des concentrations d'EGCG ainsi que grâce à la modification des profils mesurés en polyphénols. De plus, l'utilisation de la méthode innovante ABC permettrait de pouvoir contrôler de manière précise la composition ainsi que la valeur nutritionnelle du thé Qi Cha® et donc de pouvoir concevoir des boissons fonctionnelles, tout en étudiant de manière plus approfondie les interactions complexes entre les composants médicinaux botaniques ainsi que les modes d'extraction.

L'approche innovante de cette étude permet de créer un solide cadre pour de futures recherches approfondies sur les mécanismes biochimiques sous-jacents afin de répondre à des besoins de santé spécifiques tout en permettant une optimisation des boissons fonctionnelles, ouvrant le pour des d'allégations santé pour le thé Qi Cha®.

Les changements dans la composition du thé Qi Cha® par rapport à la formule du thé blanc d'origine permettent également de souligner l'importance de prendre en compte le processus de fabrication dans la conception des boissons fonctionnelles. Cela permet de montrer l'influence importante des étapes de transformation des ingrédients sur les propriétés du produit final, ainsi que d'apporter une meilleure compréhension de ceux-ci pour l'industrie alimentaire, à la recherche de produits présentant des avantages spécifiques pour la santé et le plaisir des consommateurs. Les futures allégations santé ainsi que les bénéfices potentiels des infusions devront être étayées par des preuves scientifiques solides incluant une recherche clinique, ce qui permettra d'augmenter la confiance des consommateurs dans le produit, facilitant ainsi la prise de décision éclairée concernant leur nutrition et santé.

Pour conclure, cette étude a permis de mettre en évidence l'efficacité et le potentiel de la méthode brevetée ABC dans la mise au point du thé Qi Cha® pour répondre aux allégations de santé européennes. Ce procédé novateur permet donc de préserver toutes les propriétés biologiques des ingrédients sélectionnés, tout en faisant varier leur concentration et amener de nouvelles interactions entre eux. Ces découvertes permettent ainsi d'améliorer la compréhension des bienfaits nutritionnels du thé soumis au procédé ABC tout en renforçant leur place en tant que boisson essentielle à une alimentation et à un mode de vie sain et équilibré.

Biological Activities and Polyphenol Content of Qi Cha Tea[®], a Functional Beverage of White Tea Containing Botanicals and Dry Botanical Extracts with European Health Claims

Jean Michel Maixent^{1,2,3,*†}, Meriam Belaiba⁴ Olivier Pons^{2,†}, Enora Roulleau^{1,3,5}, Jalloul Bouajila⁴ and Jean-Marc Zeil⁵

¹ Pierre Deniker Clinical Research Unit, Henri Laborit University Hospital, University of Poitiers, F-86000 Poitiers, France; tessa.roulleau@gmail.com

² Laboratory Impact of Physical Activity, Health (I.A.P.S.) Toulon University, F-83000 Toulon, France; olivier.pons34310@gmail.com

³ School of Sciences, Poitiers University, F-86000 Poitiers, France

⁴ Laboratoire de Génie Chimique, University Paul Sabatier, CNRS, INPT, UPS, F-31100 Toulouse, France; belaibameriam@gmail.com (M.B.); jalloul.bouajila@univ-tlse3.fr (J.B.)

⁵ Thés de la Pagode, 4, Avenue Bertie Albrecht, 75008 Paris, France ; jm.zeil@thesdelapagode.fr

* Correspondence: jmmaixent@gmail.com; Tel.: +33-(0)-663-9528-44

† These authors contributed equally to this work.

Abstract: Infusions of *Camellia sinensis* leaves have been known for their health benefits. The Bio Concentrate Assets[®] (ABC) method is a method of enriching organic infusion leaves (from *Camellia sinensis*) with organic dry and concentrated extracts using organic acacia gum, and its application to white tea has provided Qi Cha tea[®]. In the present study, the content of tea polyphenols and caffeine, and the biochemical properties of Qi Cha tea[®] and its botanical constituents (elderberry, tulsi, *Echinacea purpurea*, orange peel, lemongrass, and acacia gum) were assessed. Antioxidant and cell viability activities were determined by the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) assay and MTT (3-(4,5-dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) assay in human Caco-2 and HCT-116 cell lines, and ascorbic acid and tamoxifen, respectively. The caffeine and polyphenol composition of Qi Cha tea[®] was modified with less caffeine and gallic acid and more epigallocatechin gallate (EGCG) than the original white tea. The majority of the tested botanical samples including Qi Cha tea[®] at 50 µg/mL show similar antioxidant activities, with the exception of *Echinacea purpurea*. The greatest effect was found for white tea. The antioxidant power of the Qi Cha tea[®] (90% at 50 µg/mL for pressurized liquid extraction (PLE) was divided by approximately a factor of two (61% at 50 µg/mL for pressurized liquid extraction products (PLEP)), which corresponds to the 48.3% (mass/mass) white tea original content in the Qi Cha tea[®]. Qi Cha tea[®] shows the lowest cytotoxic activity in the viability of the two cell lines when compared to white tea. The application of the ABC method to Qi Cha tea[®] using various botanicals and dry extract with acacia gum as blinder has allowed the development of a new innovative functional health beverage that complies with European health claims.

Keywords: *Camellia sinensis*; acacia gum; infusion beverages; organic; health claims

1. Introduction

Plant-based foods such as teas, coffee, spices, fruits, and others have been extensively studied for their potential health benefits [1]. Leaves from *Camellia sinensis* (*C. sinensis*) are used to make the second most widely consumed beverage in the world after water, and it is a good example of a beverage associated with health [2]. In China, water infusions of *C. sinensis* leaves have been known for their traditional benefits [3]. Daily tea consumption by generally healthy adults has been

associated, in a dose-dependent manner, with lower risk of mortality [4]. The bioactive components of the leaves and the teas brewed from them are the subject of intensive research for phytochemical content characterization [5,6]. The molecular mechanisms of tea's health function in the context of chronic diseases have been reported to include their alkaloids and catechins, epicatechin, and their metabolites [4–7] (Figure 1). For some diseases, a therapeutic approach has been achieved with traditional medicinal plants with the patented *Ginkgo biloba* extract (EGb 761) [8]. However, the use of plant-based foods for prevention of these human chronic diseases in the healthy population is not always possible, as the evidence provided is insufficient to establish a scientifically based substantiation needed for a therapeutic claim related to a food and/or its constituents [2,9].

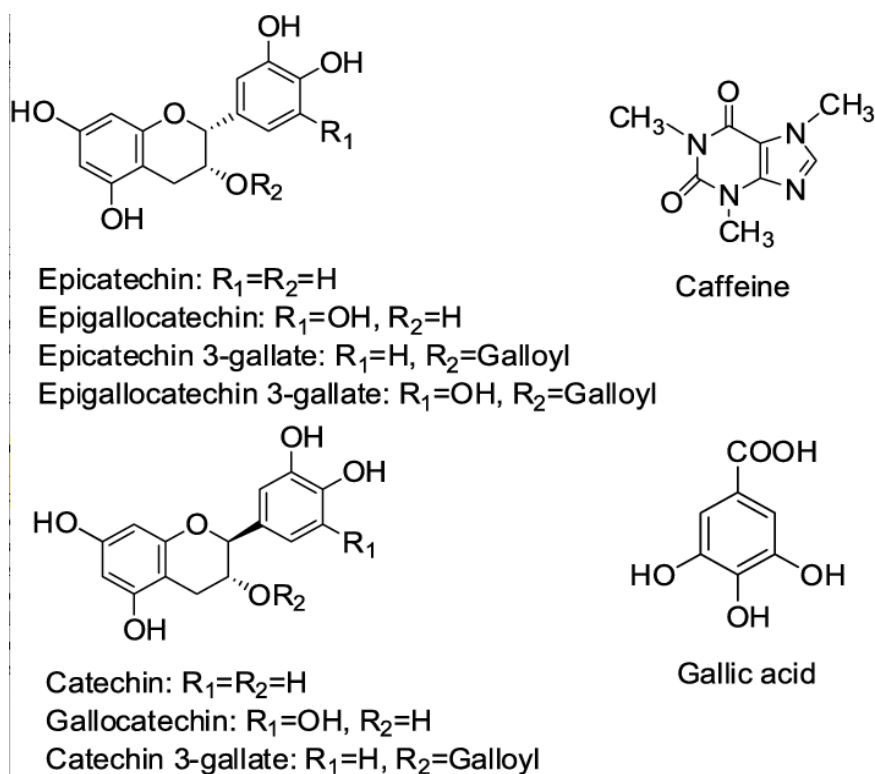


Figure 1. Chemical structures of major phytochemicals in green and white teas.

In 2006, the European Union (EU) adopted a regulation on the use of nutrition and health claims for foods (the Nutrition and Health Claims Regulation (EC) No 1924/2006) [10–12]. However, EU health claims (for health in relation to a function of the body (Article 13 claims)) for botanicals remain as “on hold” health claims [11,12]. An innovative method afforded by the Bio Concentrate Assets[®] (ABC) patent have been developed. The ABC process is an exclusive method of enriching organic infusion leaves with organic dry and concentrated extracts using organic acacia gum and its application of this method has provided us with nine new beverages, the first one being Qi Cha tea[®]. Qi Cha tea[®] is a mixture of white tea and elderberry, tulsi, *Echinacea purpurea purpurea*, orange peel, lemongrass and acacia gum. Since some steps of the ABC process could alter the biological activities of the new tea beverage, as there is adsorption of the active ingredients with the use of the hydroalcoholic solution with acacia gum and then evaporation of ethanol solution by drying. No information on the use of these processes with teas has been reported, to the best of our knowledge. This article aims to evaluate qualitatively and quantitatively the major constituents of the first beverage produced with the ABC process, i.e., Qi Cha tea[®], by comparing with commercially available chemicals. Antioxidant activity of *C. sinensis* is related to its phenolic compounds.

The preservation of the water-soluble phenolic compounds is essential for *C. sinensis* and for infusions issued from the ABC process. Therefore, the content of gallic acid, tea catechins, and caffeine was evaluated using high-performance liquid chromatography with diode-array detection (HPLC–DAD). These constituents were evaluated in two extracts obtained by water infusion (WI) and pressurized liquid extraction (PLE). As well, “in vitro” antioxidant and cytotoxic activities in two cell lines were determined by 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) assay and 3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2, 5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay, respectively. These two human

targets were chosen to evaluate the antioxidant potential of the extracts, which expresses the beneficial effect on health, and the anti-cancer potential against two lines of colon cancer, which is directly related to food consumption.

2. Materials and Methods

2.1. Chemicals, Water, and Devices

All chemicals used were purchased from Sigma-Aldrich-Fluka (Saint-Quentin, France) and stored under optimum conditions as indicated by the manufacturer.

For the device, the HPLC analysis was carried out using an ultimate 3000 pump-Dionex and Thermo Separation product detector DAD model (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Separation was performed with an RPC18 reversed-phase column (Phenomenex, Le Pecq, France). The samples were filtered through a Millex syringe filter (Sigma Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France).

Drinking water was used for the ABC process performed in France, where drinking water is defined as water that can be consumed without risk to health. This definition of drinking water is governed by strict standards that set limits for harmful substances that drinking water must not exceed. The quality criteria for water intended for human consumption are laid down in the French Public Health Code (CSP), which covers “all water used in food businesses for the manufacture, processing, preservation or marketing of products”.

Organic white tea, dried parts (elderflower, orange peel, tulsi, *Echinacea purpurea* dry extract, and lemongrass), and natural aromas of bergamot and orange were obtained from Thé de la Pagode, Paris, France.

2.2. Preparation of Qi Cha tea[®] by the Bio Concentrate Assets[®] (ABC) Method

A predetermined quantity of plant fragments or whole plants was introduced in a 2 L balloon as a carrier. These plants were then homogenized by rotation (using a rotavapor at room temperature). The desired quantity of dry extracts was then introduced and these solids were mixed by rotating the flask for at least 10 min. At the same time, a 3% acacia gum hydroalcoholic solution was prepared: water, 100% ethanol, and acacia gum were added to a beaker fitted with a magnetic rod. The solution was mixed for about 1 h until the acacia gum was perfectly dissolved. Part of the hydro-alcoholic solution thus obtained was removed and the various liquid flavors were introduced into the remaining solution. The solution was then thoroughly mixed. Part of the 3% acacia gum hydroalcoholic solution, containing the flavorings, was then introduced drop by drop (or sprayed) onto the initial carrier preparation contained in the 2 L flask. The solution was stirred by rotation as it was wetted. The mixing operations were repeated until all of the 3% acacia gum hydroalcoholic solution was introduced. The dry extract powder then adhered to the plant fragment support by the sticky effect of acacia gum. Part of the water and all the ethanol were then removed by drying to regain a standard moisture content for this type of infusion. Ethanol was also used to accelerate the drying process as a surface tension gradient. Drying was carried out by blowing dry air over the preparation in the oven at 40 °C, during which time it was continuously stirred.

Application of the ABC method to white tea with 5 organic phytochemicals and natural aromas produces a new infusion plant called Qi Cha tea[®].

The composition of Qi Cha tea[®] is shown in Table 1.

Table 1. Extract yields for Qi Cha Tea[®] and botanicals in preparation of water infusion (WI) and pressurized liquid extraction (PLE).

Sample	Yields (%)	
	WIP	PLEP
Qi Cha Tea [®]	21	16
Elderberry	11	27
Orange peel	29	24

The IC₅₀ is the concentration required for the test material to cause a 50% decrease in DPPH concentration. Ascorbic acid at 5.9 µg/mL was used as reference. All the measurements were performed in triplicate.

2.6. Cell Viability Evaluation

The cell viability was evaluated by MTT (3-(4, 5-dimethyl thiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide) assay. Briefly, MTT is a yellow tetrazolium salt. In the biological system, the succinate dehydrogenase, a mitochondrial enzyme of the viable cells, reduces the tetrazolium to dark blue formazan precipitate as previously described [13,14]. The quantity of this product is proportional to the quantity of active cells. The cell viability (cytotoxic activity) of each compound was determined in the human Caco-2 and HCT-116 cell lines (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA). In a 96-well microplate, cells were distributed at 13×10^3 cells/well for HCT116 and 12×10^3 cells/well for Caco-2 in 100 µL of a suitable culture medium. After 24 h of incubation at 37 °C, 100 µL of each extract diluted in the medium after being solubilized in DMSO was added to 100 µL of the corresponding culture medium; RPMI (RPMI 1640, Thermo Fisher Scientific, Illkirch, France) for HCT-116, or DMEM (Advanced DMEM, Thermo Fisher Scientific). The final concentration of the extract in each well was 50 µg/mL. The plate was then incubated for 48 h at 37 °C and the cytotoxic potential of the tested samples was evaluated by the MTT assay. After removing the supernatant, cells were treated with 50 µL of MTT solution, and the plate was incubated for 40 min at 37 °C; then, MTT was eliminated and 80 µL of DMSO was added. The absorbance was measured at 605 nm using a microplate reader (Multiskan Go, F1-01620, Thermo Fisher Scientific, Vantaa, Finland). The inhibition percentage of cell proliferation was calculated as follows: % inhibition = $100 \times (\text{A}_{\text{blank}} - \text{A}_{\text{sample}}) / \text{A}_{\text{blank}}$. The mitochondrial reduction of MTT to formazan was used to determine the cytotoxic effect of those compounds. Tested samples were suspended in the dimethyl sulfoxide (DMSO) and then diluted, so the concentration of DMSO did not exceed 1% in the mixture. Tamoxifen was used as a positive control. The test was performed in triplicate.

2.7. Statistical Analysis

All data were expressed as mean ± standard deviation of duplicate measurements. One-way analysis of variance (ANOVA) was used for the significance calculation using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) 20.1 (Version IBM. 20.0. 2004, San Francisco, CA, USA). Statistical differences between the solvents used in the study were estimated using Tukey's test. The confidence limits were set at $p \leq 0.05$.

3. Results

All the raw materials as well as the final tea were used to prepare extracts. These latter extracts were evaporated to dryness to estimate the yields, perform the chromatographic analyzes by HPLC–DAD, and evaluate the antioxidant and cytotoxic activities.

3.1. Efficacy for Preparing WI Products (WIP) and PLE Products (PLEP)

The typical chromatograms of Qi Cha tea[®] water extract obtained by both methods (water infusion WI or PLE water extraction) are shown in Figure 2. Extract yields from Qi Cha tea[®] and botanicals to prepare WIP and PLEP are listed in Table 1.

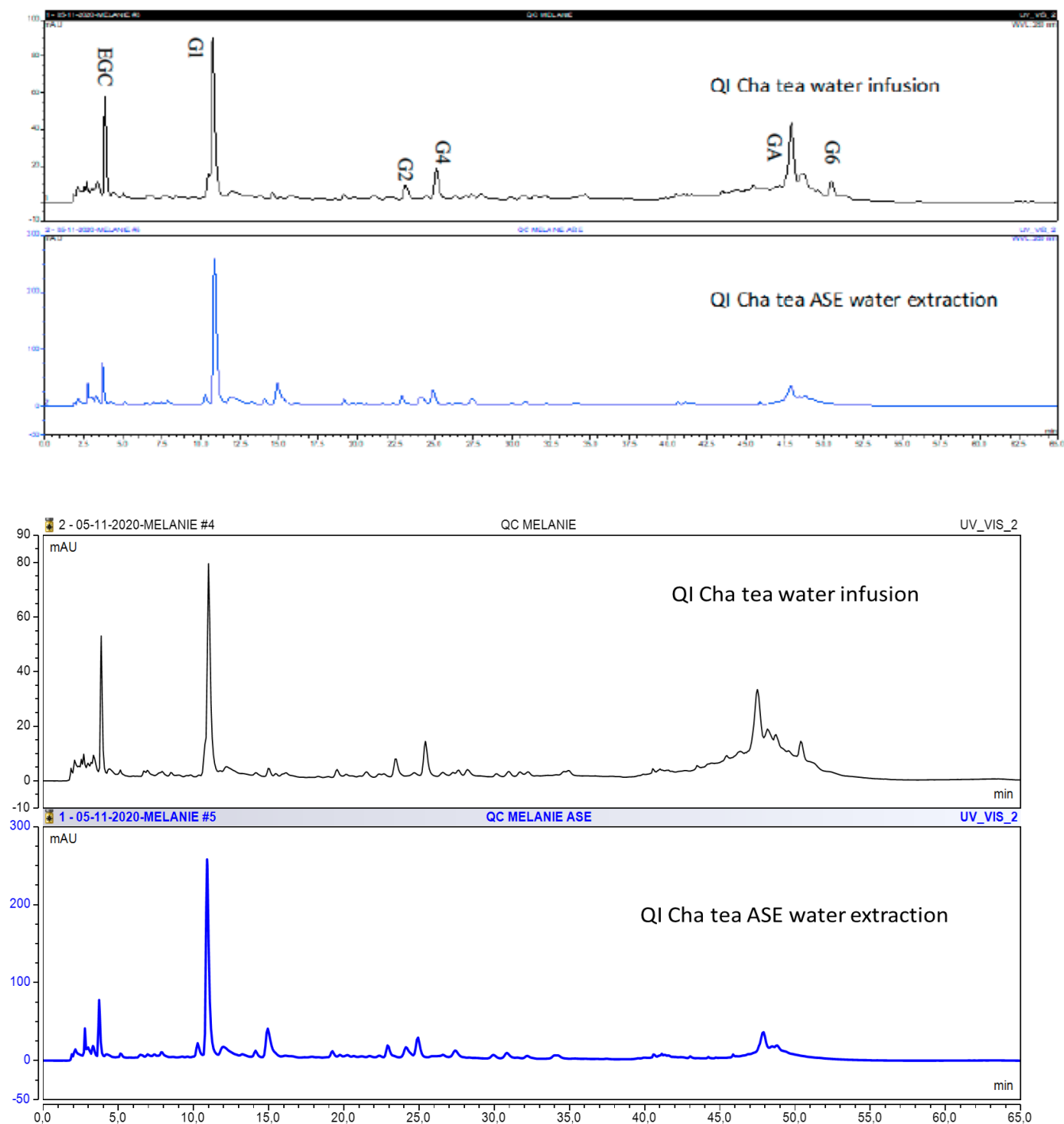


Figure 2. Typical HPLC chromatograms (280 nm) of WI products (WIP) and PLEP products (PLEP) from Qi Cha tea[®] water infusion (upper) and Qi Cha tea[®] PLE (ASE) water extraction (lower).

As compared to WIP, PLEP shows the improved extraction yields in the case of elderberry, tulsi, white tea, and lemongrass samples. For *Echinacea purpurea*, the extraction yield was about 100% because the sample was already a dried extract. The yields of WIP from Qi Cha Tea[®] and orange peel are higher than those of PLEP. This result may be due to the presence of terpenes from essential oils, for example, which are recovered in the infusion at the surface of the water phase (essential oil

extraction principle), whereas the PLEP preparation method does not allow extract of them under the effect of pressure given the large difference in polarity.

3.2. HPLC–DAD Analysis

Analysis of Qi Cha tea[®] and botanical samples using HPLC–DAD was conducted. All tests were performed in duplicate. The results for Qi Cha tea[®] and its constituents are shown in Table 2. The quantification of the following components (G1–G8): [caffeine (G1)— (–)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG, G2)— (+)-catechin (G3)— (–)-epicatechin (G4)— (–)-epicatechin-3-gallate (G5)— (–)-gallocatechin (G6)— (–)-gallocatechin-3-gallate (G7)— (–)-catechin-3-gallate (G8)], gallic acid (GA), and epigallocatechin (EGC) levels of the Qi Cha tea and botanicals were compared. A significant variation in the HPLC–DAD profiles of WIP and PLEP Qi Cha tea[®] was observed (Figure 2). In the analyzed samples, it is observed that the extracts obtained by PLE show an improvement of 113, 13, 1.7, 15, 4.6, and 3.6 times of GA, EGC, G1, G2, G4, and G6 for Qi Cha tea[®]. For other samples, the highest content of compounds from the catechin family are observed in samples of Qi Cha tea[®] and also in organic white tea, with amounts of 5173 mg/Kg for EGC and 9095 mg/Kg for G1 in Qi Cha tea[®], and 4089 mg/Kg for compound G3 in organic white tea. *Echinacea purpurea* also contained an important quantity of the component G4 (9653 mg/kg).

The most important difference is observed in Qi Cha tea[®] extract PLEP, when seven molecules are quantified, and this is strong evidence that PLE enhances the extraction and isolation of molecules compared to the classic direct infusion method. The Qi Cha tea[®] analysis obtained with further PLE reveals high levels of GA (1470 mg/kg), EGC (5173 mg/kg), and G1 (9095 mg/kg).

Table 2. Content of tea polyphenols and caffeine in water infusions products (WIP) and pressurized liquid extraction products (PLEP).

Sample	Content * (mg/kg)										
	GA	EGC	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	
$Y = ax + b$	a	0.2948	0.0614	0.1104	0.3085	0.0442	0.0966	0.0966	0.1659	0.1291	0.1727
	b	1.6153	-1.9181	-1.5389	-4.1037	-0.6985	-0.5171	-0.5171	-2.7357	-1.4601	2.5116
R2		0.9992	0.9987	0.9995	0.9946	0.9975	0.9991	0.9958	0.9955	0.9933	0.9973
Qi Cha tea [®] WIP		13	384	585	295	331	338	-	238	-	-
Qi Cha tea [®] PLEP		1470	5173	9095	1384	-	1813	1477	862	-	-
Elderberry WIP		-	-	384	-	-	-	-	-	-	-
Elderberry PLEP		-	-	-	-	1137	-	-	-	-	-
Orange peel WIP		-	-	-	-	-	-	1066	-	-	-
Orange peel PLEP		-	-	-	276	-	1454	1249	-	299	299
Tulsi WIP		-	1027	115	-	-	835	157	-	148	148
Tulsi PLEP		-	414	-	-	-	-	-	-	-	-
White tea WIP		1706	1370	3701	-	4089	1057	481	-	-	-
White tea PLEP		-	1054	439	-	-	-	-	279	-	-

<i>Echinacea purpurea</i> WIP	-	-	1012	-	-	-	-	-	-	-
<i>Echinacea purpurea</i> PLEP	-	-	-	-	-	9653	-	4339	-	-
Lemongrass WIP	-	255	-	-	-	-	77	140	-	-
Lemongrass PLEP	225	-	-	-	-	-	-	-	-	-

* A linear equation of the form ($Y = ax + b$) was used to define the slope a and b on the Y-axis. $R^2 > 0.9$ mean large positive linear association. Gallic acid (GA), epigallocatechin (EGC), caffeine (G1)—(–)-epigallocatechin 3-gallate (G2)—(+)-catechin (G3)—(–)-epicatechin (G4)—(–)-epicatechin-3-gallate (G5)—(–)-gallocatechin (G6), (–)-gallocatechin 3-gallate (G7), and (–)-catechin 3-gallate (G8) levels in Qicha tea[®], tea, and botanicals using HPLC–DAD. “-”: not determined.

The comparison of Qi Cha tea[®] WIP to the original WIP white tea polyphenols and caffeine shows that the composition of caffeine, catechin, and epicatechin is modified, resulting in less caffeine and gallic acid, and the presence of EGCG (G2). The EGCG (G2) was not detected in the white tea that was used.

3.3. Antioxidant Capacity and Cytotoxic Activity of Qi Cha tea[®] and Its Components

Antioxidant properties as determined by the method using DPPH and cytotoxic activity of Qi Cha tea[®] and botanicals in human Caco-2 and HCT-116 cell lines are shown in Table 3

3.3.1. Antioxidant Activity

Qi Cha tea[®] inhibition strength is increased in PLEP and doubles in percentage from 32 to 61% as compared to Qi Cha tea[®] WIP. This result indicates that the method to prepare PLEP enhances antioxidant activity and can ameliorate bioactive molecule isolation. The majority of Qi Cha tea[®] and botanicals tested at the concentration 50 $\mu\text{g/mL}$ show measurable antioxidant activity, with the exception of *Echinacea purpurea*. The greatest activity is found in white tea PLEP (90% of inhibition at 50 $\mu\text{g/mL}$ and an IC_{50} equal to 29 $\mu\text{g/mL}$). Tulsi PLEP was also considered to be a very potent antioxidant (82% of inhibition at 50 $\mu\text{g/mL}$).

The antioxidant power of the Qi Cha tea[®] (90% at 50 $\mu\text{g/mL}$ for PLEP) was divided by approximately a factor of two (61% at 50 $\mu\text{g/mL}$ for WIP), which corresponds to the 48.3% (mass/mass) white tea content in the Qi Cha tea[®].

Orange peel and *Echinacea purpurea* antioxidant activities are low: 7, 14, 6, and 21% for WI and PLE, respectively. The Qi Cha tea[®] presents an important antioxidant level towards DPPH. This is also observed for tulsi and white tea. Lemongrass has a medium level of antioxidant action: 40% at 50 $\mu\text{g/mL}$.

3.3.2. Cytotoxic Activity

The results for cytotoxic activity are shown in Table 3 for PLEP. Qi Cha tea[®] shows the lowest cytotoxic activity in both cell lines used when compared to white tea. The results demonstrate that the percentage of viability is high and varies from 63 to 80% at 50 $\mu\text{g/mL}$ in the Caco-2 cell line for the first six samples tested (Table 3). The viability of the lemongrass PLEP in Caco-2 cells is about

49%. In HCT-116 colon cancer cells, cytotoxicity (100% viability) of tested PLEP samples, including Qi Cha tea[®], vary from 12 to 28%.

Table 3

Antioxidant and cytotoxic activities of Qi Cha Tea[®] and botanicals (50 µg/mL).

Sample	Antioxidant Activity Cytotoxic Activity *		
	(DPPH Assay)	(MTT Assay)	
	DPPH	Caco-2	HC-T116
	Inhibition% (IC ₅₀ µg/mL)	Viability%	Viability%
Qi Cha tea [®] WIP	32 ± 2		
Qi Cha tea [®] PLEP	61 ± 2 (39)	77 ± 6	85 ± 3
Elderberry WIP	43 ± 3		
Elderberry PLEP	58 ± 2 (45)	64 ± 5	86 ± 1
Orange peel WIP	7 ± 2		
Orange peel PLEP	14 ± 2	80 ± 8	82 ± 2
Tulsi WIP	52 ± 2 (48)		
Tulsi PLEP	82 ± 4 (31)	72 ± 2	83 ± 2
White tea WIP	59 ± 3 (41)		
White tea PLEP	90 ± 2 (29)	63 ± 11	72 ± 1

Sample	Antioxidant Activity Cytotoxic Activity *		
	(DPPH Assay)	(MTT Assay)	
	DPPH	Caco-2	HC-T116
	Inhibition%	Viability% Viability%	
	(IC ₅₀ µg/mL)		
<i>Echinacea purpurea</i> WIP	6 ± 6		
<i>Echinacea purpurea</i> PLEP	21 ± 3	66 ± 2	72 ± 1
Lemongrass WIP	26 ± 1		
Lemongrass PLEP	40 ± 2	49 ± 8	88 ± 1

* Cytotoxic activity of WIP was not tested. Ascorbic acid was used as reference value with an inhibition of 80% at 5.9 µg/mL. Tamoxifen as anti-proliferation on the two lines of cancer cells was used as a positive control at 37 µg/mL.

4. Discussion

Many processes such as encapsulation nanoparticles have been published for tea catechin preservation [15–17]. A white tea formulation called Qi Cha tea[®] was created using the new process termed as the ABC process (Table 4) [18].

Table 4. The ABC method for preparation of Qi Cha tea[®].

ABC Process	Components of Qi Cha tea [®]	Amount (in %)
Support	White tea	48.3
	Tulsi	12.5
	Elderberry	10.0
	Lemongrass	10.0
	Orange peel	6.5
Active ingredient (dry extract)	<i>Echinacea purpurea</i>	10.0
Hydroalcoholic solution with binder	Organic acacia gum	2.5
Drying	Blowing dry air	ND
Flavors	Natural aromas of bergamot and	0.2

“ND” : not determined.

The technological advantages of the ABC method include the ability to adsorb the active ingredients more uniformly due to the use of the hydroalcoholic solution with added acacia gum, which could modify the new beverages in a way to reduce their biological activities and chemical composition. Therefore, in this study, we analysed the chemical composition, the antioxidant activity, and the cell viability or cytotoxicity activities of Qi Cha tea[®] and all botanical constituents of Qi Cha tea[®] (a mixture of white tea and elderberry, tulsi, *Echinacea purpurea*, orange peel, lemongrass, and acacia gum). Two methods of analysis were used. The data indicate that the PLE from Qi Cha tea[®] has higher levels of tea polyphenols and caffeine than Qi Cha tea[®] WI (Table 2). Other compounds were present only in either WIP or PLEP. This difference can be explained by a competition between all the substances present in the plant matrix and their affinities with respect to the solvent on the one hand and the influence of the extraction parameters (agitation, temperature and extraction time for infusion pressure, and temperature). Indeed, in addition to these tracked substances, there are other metabolites that are extracted. This competition generates variable extract yields and a risk of hydrolysis, oxidation, or reduction under the effect of temperature.

Caffeine is a major compound in tea [19]. Caffeine content from white tea WIP was found to be one of the most abundant compounds in our study according to a previous study of Pan et al. [20]. The catechins EGCG, EC, ECG, and EGC were the major polyphenol compounds, according to Pan et al. [20]. EGCG was not detected in the white tea WIP but detected in the Qi Cha tea[®] WIP. Using 6.5% orange peel for the process of Qi Cha tea[®] and only being detected in PLEP could not explain the presence of EGCG in the Qi Cha tea[®] WIP. Our results with undetectable EGCG in the white tea WIP are similar to results of AL Hafez et al. [21]. Thus, as the water infusion composition is close to that brewing tea beverages, the ABC process plays a role in polyphenol and caffeine concentrations of Qi Cha tea[®] by reducing caffeine content and increasing EGCG content.

EGC is present in Qi Cha tea[®] (WIP or PLEP) and comes mainly from white tea (1054–1370 mg/Kg) or tulsi (414–1027 mg/Kg), and, to a lesser extent, from lemongrass (255 mg/Kg). Its PLE extraction is the highest (5173 mg/Kg). This high recovery of PLEP can be explained by the influence of parameters (higher temperature and pressure) in the PLE.

Determination of the biochemical activity of Qi Cha tea[®] confirms an important antioxidant level in the DPPH assay. This was also observed for tulsi and white tea. High antioxidant power is likely related to high level of molecules present in each sample. There are several principles of methods for antioxidants methods. DPPH radical scavenging is an easy spectrophotometric method and a useful method with regard to measuring the radical scavenging capacity of food constituents and plant extracts [22]. Furthermore, using three antioxidant methods, scavenging DPPH ranked with the highest antioxidant activity among these three methods, according to total phenolic contents [23]. More specifically, DPPH radical scavenging activity was used to characterize different teas from green, white, Oolong, and black teas [24].

Evaluation of cytotoxic effects on HCT-116 and Caco-2 cells was comparable between the Qi Cha tea[®] and the original sample extracts. The evaluation of biological activity of Qi Cha tea[®] and its components are in good agreement with previous studies [25,26]. White tea and *Echinacea purpurea* show comparable cytotoxicity activity (28%). Hajiaghaalipour et al. [27] cited that an extract of white tea inhibited the proliferation of HT-29 cells with an IC₅₀ of 87 µg/mL. In another work, the IC₅₀ of white tea extract is 324 µg/mL against the MFC-7 cell line [28]. These results prove that our extracts are much more active against the two cell lines studied.

A previous study evaluated the anti-proliferative property of the white tea and demonstrated that white tea containing an important quantity of EGC seems to have the better anti-cancer effect than other teas [29]. It has been shown that one of the anti-cancer processes of growth inhibitory activity of tea may involve the catalytic regulation of the P450 enzymes and glucuronosyltransferase [30].

In the literature, catechins (flavan-3-ols), which are considered low-cost applicable phytochemicals, are the major green tea polyphenols [24]. EC, EGC, ECG, and EGCG are major components in little fermented teas such as white tea. EGCG from green teas is the most abundant and biologically active catechin [31,32]. Based on decades of research, EGCG has received considerable attention for its inhibitory activities against cancer initiation, promotion, and progression

[26]. Other catechins, such as ECG and EGC, have been shown to have similar, albeit lower, activities in numerous studies [3,4]. Concerning white teas, the levels were not considered to be very high in a previous study [20]. In another study conducted on aqueous methanol (70%) extracts, DPPH radical scavenging activity and antiproliferative effects of white tea against colorectal cancer cell line HCT-116 were most likely due to its catechin content [31,33]. The determination of antioxidant and others biochemical properties of these food formulations may lead to explanations for others health claims [2,11,34]. Table 5 presents the formulation of Qi Cha tea[®], and the function health claim wording for respiratory and immune systems (ID2466 and ID2366, respectively) with tulsi, elderberry, and *Echinacea purpurea* respectively (18). In this study, the formulation of Qi Cha tea[®], (a mixture of white tea and elderberry, tulsi, *Echinacea purpurea*, orange peel, lemongrass, and acacia gum) is presented. Its biological activities were characterized “in vitro” for its antioxidant activity and for its cytotoxicity with human cells and the associated health claims that result from an original and organic tea beverage processed according to the patented ABC method innovation. According to the “on hold” European botanical health claims, new health claims could be associated with botanical health claims. It will be of interest to explore its application to various botanicals from the European botanical list to improve human healthcare with the ABC method.

Table 5

Formulation of tea prepared by application of the Bio Concentrate Assets[®] (ABC) method and their associated health claims from the “on hold” European botanicals list.

ABC Process	Tea Amount (%)	Botanical Amount (%)	Dry Extract Amount (%)	Health Claims (Claim ID)
Qi Cha tea [®]	White tea (48.3)	<i>Ocimum sanctum</i> (tulsi) (12.5)	<i>Sambucus nigra</i> (elderberry) (10) <i>Echinacea purpurea</i> (10)	Respiratory health: has a beneficial effect on various respiratory tract problems (ID2466); immune system health: helps the function of the natural defensive system (ID2366)

Amounts of organic lemon grass, orange peel, acacia gum, and flavors were 10%, 6.5%, 2.5%, and 0.2%, respectively.

5. Conclusions

The Bio Concentrate Assets[®] (ABC) method has many advantages and offers a significant breakthrough in the production of teas and botanical infusions for health and wellness. Qi Cha tea[®] is the white-tea-based formulation produced by this innovative method. Qi Cha tea[®] maintains its antioxidant activity and shows the lowest cytotoxic activity in the viability of the two cell lines when compared to white tea. In conclusion, Qi Cha tea[®] (a mixture of white tea and elderberry, tulsi, *Echinacea purpurea*, orange peel, lemongrass, and acacia gum) has allowed the development a new innovative functional health beverage that complies with European health claims.

6. Patents

European patent EP 3501291, PROCÉDÉ DE FABRICATION D'INFUSIONS OU DE THÉS CONTENANT DES ACTIFS D'ORIGINE VÉGÉTALE, ANIMALE OU MINÉRALE. Owner of the patent: Thés de la Pagode, 4 Avenue Bertie Albrecht, 75008, Paris, France.

Author Contributions: Conceptualization, J.M.M. and J.-M.Z.; methodology, J.-M.Z., J.M.M., and J.B.; analysis, M.B., O.P., J.B., and J.M.M.; investigation, J.M.M., M.B., and J.-M.Z.; resources, J.-M.Z.; writing—original draft preparation, J.M.M.; writing—review and editing, J.M.M., M.B., O.P., E.R.J.B., and J.-M.Z. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: The commercial standard solution named G-016 and all botanicals and teas used for the ABC process were funded by Thés de la Pagode (France).

Data Availability Statement:

Acknowledgments: We are grateful to Mamoru Isemura (School of Nutritional and Environmental Sciences, University of Shizuoka, Suruga-ku, Shizuoka, Japan) for extensive revision and review, Sandrine Pierre (Marshall Institute for Interdisciplinary Research, Huntington, WV, USA) for providing insightful comments. We are also grateful to Susan Whiting (University of Saskatchewan, Canada) for editing and revisions and Souad Sennoune and Raul Martinez-Zaguilan (Texas Tech University, Health Sciences center, Lubbock, TX, USA) for their revisions. This work is also dedicated to Zijian Xie (Marshall Institute for Interdisciplinary Research, Huntington, WV, USA) for discussion on teas.

Conflicts of Interest: J.-M.Z. as Thés de la Pagode and funder. J.M.M., O.P., J.B., M.B., and E.R. authors declare no conflicts of interest. J.M.Z. as funder had no role in the design of the analytical study and in the collection, analyses, or interpretation of data.

Sample Availability: Samples of the compounds are available from the authors.

Conclusions et perspectives

Le travail présenté dans cette thèse fait suite aux travaux réalisés dans 2 précédentes thèses à l'Université de Toulon, l'une par Stéphane Sadrin (l'évaluation du bénéfice chez l'homme des probiotiques dans la prise en charge du syndrome de l'intestin irritable), la seconde par Laura Braud sur les bénéfices du thé Hao Ling dans la dyslipidémie avec une approche expérimentale moléculaire, cellulaire et animale.

En préalable de cette thèse, nous avons développé la méthodologie de l'essai contrôlé randomisé (Randomized Controlled Trial, RCT) dans le cadre de la nouvelle réglementation européenne relative aux allégations nutritionnelles et de santé pour les aliments. Comme investigateur principal avec la coordination de 7 centres médicaux, une étude clinique a été réalisée sur le syndrome de l'intestin irritable avec une intervention de probiotiques. Dans cette thèse, ce travail a été poursuivi et développé pour le thé Hao Ling. Le but est d'établir les preuves dans le domaine des essais cliniques pour une allégation nutritionnelle de santé. Pour la seconde partie de ce travail, nous nous sommes intéressés à définir des protocoles d'analyse de la composition et des propriétés biologiques pour le thé Qi Cha.

Le premier protocole "LAPIBSS" nous a enseigné beaucoup d'humilité pour l'obtention de résultats positifs (Sadrin et al. 2021). En effet, notre étude a présenté des résultats négatifs sur le critère de jugement principal de la douleur lié au syndrome de l'intestin irritable. Néanmoins plusieurs critères secondaires se sont révélés positifs et ainsi notre étude LAPIBSS a été reprise dans les méta-analyses publiées sur ce syndrome pour les probiotiques. Notre étude (Sadrin et al. 2020) a été retenue et incluse dans la récente méta-analyse préparée par l'équipe et son leader Alexander Ford dans la revue de référence (*Gastroenterology*). Notre étude était négative pour son critère principal avec la douleur et n'avait pas été retenue par *Gastroenterology*. Notre étude a été incluse dans cette méta-analyse et qualifiée de haute qualité méthodologique sans risque de biais selon les standards de Cochrane (Goodoory et al. 2023).

Pour le protocole clinique d'intervention impliquant le thé Hao ling, nous avons conservé l'exigence pour la meilleure qualité méthodologique de l'essai clinique randomisé, contrôlé par placebo, en groupe parallèle. L'objectif est d'évaluer l'efficacité, l'innocuité de 3 prises d'infusion par jour pendant 3 mois dans le cadre précis des recommandations de l'HAS, haute autorité de santé chez des personnes présentant une première dyslipidémie. Ce protocole d'étude est soumis pour publication à la revue *Plants*. Ce protocole a été réalisé et est en cours d'analyse.

Dans un second projet, nous avons utilisé le thé Qi Cha breveté par l'entreprise les thés de la pagode. Ce procédé permet d'enrichir des feuilles de thé blanc avec d'autres plantes ou tout extrait sec de plantes ou de substances. L'utilisation de la gomme arabique (additif alimentaire) permet cet enrichissement du thé blanc avec des plantes ou extraits de plantes. Lors d'une infusion aqueuse comme boisson chaude, leur dissolution est rapide dans la tasse du consommateur. Ce procédé a fait l'objet de l'obtention d'un brevet par l'entreprise les thés de la pagode. Nous avons préparé les objectifs d'analyse, la méthodologie d'analyse des polyphénols et al.calcoïdes contenus dans les plantes utilisées. A l'obtention des résultats obtenus, nous avons préparé la première publication pour le thé Qi Cha qui a été accepté dans la revue *Plants*. Ce procédé permet d'enrichir les feuilles de thé blanc en EGCG (polyphénol d'intérêt du thé vert) mais aussi de diminuer la présence de caféine sans diminuer les propriétés biologiques du nouveau thé issu de ce procédé breveté.

Les perspectives de ces travaux sont nombreuses avec la mise en place d'une seconde étude clinique pour le thé Hao Ling avec un objectif principal centré sur le bon cholestérol (HDL, Apolipoprotéine A1 ...). Pour le thé Qi Cha, il semble que la transformation du thé blanc implique un processus de « fermentation » comme c'est le cas pour les composants du thé Pu-erh et Oolong constituants principaux du thé Hao Ling. La caractérisation des théaflavines et théarubigines serait un élément de preuve. Enfin 10 nouveaux thés sont commercialisés avec le processus breveté ABC, ce qui ouvre le champ d'investigation pour ces thés comme nous l'avons initié avec le thé Qi Cha. D'autres propriétés pour ces thés peuvent être investiguées comme leurs effets sur la glycémie, l'obésité, etc. Une revue sur le thé est en préparation.

Références

1. Li, H.-Y.; Gan, R.-Y.; Shang, A.; Mao, Q.-Q.; Sun, Q.-C.; Wu, D.-T.; Geng, F.; He, X.-Q.; Li, H.-B. Plant-based foods and their bioactive compounds on fatty liver disease: Effects, mechanisms, and clinical application. *Oxid. Med. Cell Longev.* **2021**, *2021*, 6621644.
2. Prasanth, M.I.; Sivamaruthi, B.S.; Chaiyasut, C.; Tencomnao, T. A Review of the Role of Green Tea (*Camellia sinensis*) in Anti Photoaging, Stress Resistance, Neuroprotection, and Autophagy. *Nutrients* **2019**, *11*, 474. <https://doi.org/10.3390/nu11020474>.
3. Tang, G.Y.; Meng, X.; Gan, R.Y.; Zhao, C.N.; Liu, Q.; Feng, Y.B.; Li, S.; Wei, X.L.; Atanasov, A.G.; Corke, H.; et al. Health functions and related molecular mechanisms of tea components: An update review. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 6196.
4. Chung, M.; Zhao, N.; Wang, D.; Shams-White, M.; Karlsen, M.; Cassidy, A.; Ferruzzi, M.; Jacques, P.F.; Johnson, E.J.; Wallace, T.C. Dose-response relation between tea consumption and risk of cardiovascular disease and all-cause mortality: A systematic review and meta-analysis of population-based studies. *Adv. Nutr.* **2020**, *11*, 790–814.
5. Liu, J.Y.; He, D.; Xing, Y.F.; Zeng, W.; Ren, K.; Zhang, C.; Lu, Y.; Yang, S.; Ou, S.J.; Wang, Y.; et al. Effects of bioactive components of Pu-erh tea on gut microbiomes and health: A review. *Food Chem.* **2021**, *353*, 129439.
6. Guo, J., Li, K., Lin, Y., Liu, Y. Protective effects and molecular mechanisms of tea polyphenols on cardiovascular diseases. *Frontiers in nutrition.* **2023**, *10*, 1202378. <https://doi.org/10.3389/fnut.2023.1202378>
7. Zhou, J., Li, R., Jia, Y., Wang, Y., Liu, J., Panichayupakaranant, P., Chen, H. Recent Progress in Natural Anticancer Agents Discovery from Tea (*Camellia sinensis*): A Review. *Recent patents on anti-cancer drug discovery*, **2022**, *17*(4), 343–357. <https://doi.org/10.2174/1574892816666211208155811>
8. Pierre, S.; Lesnik, P.; Duran, M.J.; Moreau, M.; Paganelli, F.; Chapman, J.; George, F.; Sampol, J.; Maixent, J.M. Oxidized LDLs alter Na,K-ATPase activity in human endothelial cells. Prevention by Ginkgo biloba Extract (EGb 761). *Cell. Mol. Biol.* **2008**, *54*, 1032–1042.
9. Maixent, J.M. Opinion paper food supplements: The European regulation and its application in France. Thoughts on safety of food supplements. *Cell. Mol. Biol.* **2012**, *58*, OL1720-9.
10. Regulation (EC) No 1924/2006 of the European Parliament and of the Council of 20 December 2006 on Nutrition and Health Claims Made on Foods. (OJ L 404, 30.12.2006, p.9). Available online: <http://data.europa.eu/eli/reg/2006/1924/oj> (accessed on).
11. European Commission. *Evaluation (SWD (2020)95 Final-pt1) of the Regulation (EC) No 1924/2006 on Nutrition and Health Claims Made on Foods with Regard to Nutrient Profiles and Health Claims*

Made on Plants and Their Preparations and of the General Regulatory Framework for Their Use in Foods; European Commission: Brussels, Belgium, 2020.

12. Silano, V.; Coppens, P.; Larrañaga-Guetaria, A.; Minghetti, P.; Roth-Ehrang, R. Regulations applicable to plant food supplements and related products in the European Union. *Food Funct.* **2011**, *2*, 710–719.
13. Dawra, M.; Nehme, N.; El Beyrouthy, M.; Abi Rizk, A.; Taillandier, P.; Bouajila, J.; El Rayess, Y. Comparative Study of Phytochemistry, Antioxidant and Biological Activities of *Berberis libanotica* Fruit and Leaf Extracts. *Plants* **2023**, *12*, 2001. <https://doi.org/10.3390/plants12102001>.
14. Khelifi, I.; Hayouni, E.A.; Cazaux, S.; Ksouri, R.; Bouajila, J. Evaluation of in vitro biological activities: Antioxidant; anti-inflammatory; anti-cholinesterase; anti-xanthine oxidase, anti-superoxyde dismutase, anti- α -glucosidase and cytotoxic of 19 bioflavonoids. *Cell. Mol. Biol.* **2020**, *66*, 9–19.
15. Shi, M.; Sh, Y.L.; Li, X.M.; Yang, R.; Cai, Z.Y.; Li, Q.S.; Ma, S.C.; Ye, J.H.; Lu, J.L.; Liang, Y.R.; et al. Food-Grade Encapsulation Systems for (-)-Epigallocatechin Gallate. *Molecules* **2018**, *23*, 445–462.
16. Peres, I.; Rocha, S.; Gomes, J.; Morais, S.; Pereira, M.C.; Coelho, M. Preservation of catechin antioxidant properties loaded in carbohydrate nanoparticles. *Carbohydr. Polym.* **2011**, *86*, 147–153.
17. Rocha, S.; Generalov, R.; Pereira, M.d.o.C.; Peres, I.; Juzenas, P.; Coelho, M.A. Epigallocatechin gallate-loaded polysaccharide nanoparticles for prostate cancer chemoprevention. *Nanomedicine* **2011**, *6*, 79–87. <https://doi.org/10.2217/nnm.10.101>.
18. Maixent, J.M.; Zeil, J.M. ABC, a patented innovation in the infusion of teas and herbal plants: Enrichment of *Camellia sinensis* leaves with dry extracts from herbal plants. *Cell. Mol. Biol.* **2019**, *65*, 76–78.
19. Ramalho, S.A.; Nigam, N.; Oliveira, G.B.; Pa, O.; Tom, S.; Santos, A.G.P.; Narain, N. Effect of infusion time on phenolic compounds and caffeine content in black tea. *Food Res. Int.* **2013**, *51*, 155–161.
20. Pan, J.; Jiang, Y.; Lv, Y.; Li, M.; Zhang, S.; Liu, J.; Zhu, Y.; Zhang, H. Comparison of the main compounds in Fuding white tea infusions from various tea types. *Food Sci. Biotechnol.* **2018**, *27*, 1311–1318.
21. AlHafez, M.; Kheder, F.; AlJoubbeh, M. Polyphenols, flavonoids and (-)-epigallocatechin gallate in tea leaves and in their infusions under various conditions. *Nutr. Food Sci.* **2014**, *44*, 455–463.
22. Gulcin, İ. Antioxidants and antioxidant methods: An updated overview. *Arch. Toxicol.* **2020**, *94*, 651–715. <https://doi.org/10.1007/s00204-020-02689-3>.
23. Zheng, B.; Yuan, Y.; Xiang, J.W.; Jin, W.; Johnson, J.B.; Li, Z.; Wang, C.; Luo, D. Green extraction of phenolic compounds from foxtail millet bran by ultrasonic-assisted deep eutectic solvent

- extraction: Optimization, comparison and bioactivities. *LWT Food Sci. Technol.* **2022**, *154*, 112740. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112740>.
24. He, Y.; Lin, Y.; Li, Q.; Gu, Y. The contribution ratio of various characteristic tea compounds in antioxidant capacity by DPPH assay. *J. Food Biochem.* **2020**, *44*, e13270. <https://doi.org/10.1111/jfbc.13270>.
 25. Östlund, J.; Zlabek, V.; Zamaratskaia, G. In vitro inhibition of human CYP2E1 and CYP3A by quercetin and myricetin in hepatic microsomes is not gender dependent. *Toxicology* **2017**, *381*, 10–18.
 26. Yuan, J.M.; Gao, Y.T.; Yang, C.S.; Yu, M.C. Urinary biomarkers of tea polyphenols and risk of colorectal cancer in the shanghai cohort study. *Int. J. Cancer* **2007**, *120*, 1344–1350.
 27. Hajiaghaalipour, F.; Kanthimathi, M.S.; Sanus, J.; Rajarajeswaran, J. White tea (*Camellia sinensis*) inhibits proliferation of the colon cancer cell line, HT-29, activates caspases and protects DNA of normal cells against oxidative damage. *Food Chem.* **2015**, *169*, 401–410.
 28. Ronimara, A.S.; Andrade, E.D.S.; Monteiro, M.; Fialho, E.; Silva, J.L.; Daleprane, J.B.; Ferraz da Costa, D.C. Green tea (*Camellia sinensis*) extract induces p53-Mediated cytotoxicity and inhibits migration of breast cancer cells. *Foods* **2021**, *10*, 3154.
 29. Chen, X.Q.; Du, Y.L.; Wu, J.C.; Xie, X.L.; Chen, B.B.; Hu, Q.L. Effects of tea-polysaccharide conjugates and metal ions on precipitate formation by epigallocatechin gallate and caffeine, the key components of green tea infusion. *J. Agric. Food Chem.* **2019**, *67*, 3744–3751.
 30. Shirakami, Y.; Shimizu, M. Possible mechanisms of green tea and its constituents against cancer. *Molecules* **2018**, *23*, 2284.
 31. Fereydoon, B.; Ebrahimi, A.; Mahjoubi, F.; Hervan, E.M.; Gonbad, R.A. Evaluation of biochemical constituents and inhibitory effect of tea clone 100 on colorectal cancer cell line HCT-116. *Trop. J. Pharm. Res.* **2018**, *17*, 1033–1041.
 32. Seeram, N. P., Henning, S. M., Niu, Y., Lee, R., Scheuller, H. S., Heber, D. Catechin and caffeine content of green tea dietary supplements and correlation with antioxidant capacity. *Journal of agricultural and food chemistry*, **2006**, *54*(5), 1599–1603. <https://doi.org/10.1021/jf052857r>
 33. Qin, C.; Lian, L.; Xu, W.; Jiang, Z.; Wen, M.; Han, Z.; Zhang, L. Comparison of the chemical composition and antioxidant, anti-inflammatory, α -amylase and α -glycosidase inhibitory activities of the supernatant and cream from black tea infusion. *Food Funct.* **2022**, *13*, 6139–6151.
 34. Isemura, M. Catechin in Human Health and Disease. *Molecules*. **2019**, *24*(3):528. Published 2019 Feb 1. doi:10.3390/molecules24030528

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Bibliographie

Abe, M., Takaoka, N., Idemoto, Y., Takagi, C., Imai, T., & Nakasaki, K. (2008). Characteristic fungi observed in the fermentation process for Pu-erh tea. *International Journal of Food Microbiology*, 124, 199–203.

AFSSA. Summary of the report of the 2006/2007 Individual and National Survey on Food Consumption 2 (INCA 2) [Internet] 2009. Available from: <http://www.afssa.fr/Documents/PASER-Sy-INCA2EN.Pdf>

Aouba A, Eb M, Rey G, Pavillon G, Jouglu E. Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire, 2011, n°. 22, p. 249-55.

Arnett DK, Blumenthal RS, Albert MA, Buroker AB, Goldberger ZD, Hahn EJ, Himmelfarb CD, Khera A, Lloyd-Jones D, McEvoy JW, Michos ED, Miedema MD, Muñoz D, Smith SC Jr, Virani SS, Williams KA Sr, Yeboah J, Ziaeian B. 2019 ACC/AHA Guideline on the Primary Prevention of Cardiovascular Disease: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines. *Circulation*. XX

Arnett DK, Blumenthal RS, Albert MA, Buroker AB, Goldberger ZD, Hahn EJ, Himmelfarb CD, Khera A, Lloyd-Jones D, McEvoy JW, Michos ED, Miedema MD, Muñoz D, Smith SC Jr, Virani SS, Williams KA Sr, Yeboah J, Ziaeian B. 2019 ACC/AHA Guideline on the Primary Prevention of Cardiovascular Disease: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines. *Circulation*. 2019 Sep 10;140(11): e596-e646.doi: 10.1161/CIR.0000000000000678. Epub 2019 Mar 17. Erratum in: *Circulation*. 2019 Sep 10;140(11): e 649-e650. Erratum in: *Circulation*. 2020 Jan 28;141(4): e60. Erratum in: *Circulation*. 2020 Apr 21;141(16): e774. PMID: 30879355; PMCID: PMC7734661.

Bahorun T, Luximon-Ramma A, Neergheen-Bhujun VS, Gunness TK, Googoolye K, Auger C, Crozier A, Aruoma OI. The effect of black tea on risk factors of cardiovascular disease in a normal population. *Prev Med*. 2012 May;54 Suppl: S98-102. doi: 10.1016/j.ypmed.2011.12.009. Epub 2011 Dec 16. PMID: 22198621.

Baigent C, Keech A, Kearney PM, Blackwell L, Buck G, Pollicino C, Kirby A, Sourjina T, Peto R, Collins R, Simes R; Cholesterol Treatment Trialists' (CTT) Collaborators. Efficacy and safety of cholesterol-lowering treatment: prospective meta-analysis of data from 90,056 participants in 14

randomised trials of statins. *Lancet*. 2005 Oct 8;366(9493):1267-78. doi: 10.1016/S0140-6736(05)67394-1. Epub 2005 Sep 27. Erratum in: *Lancet*. 2005 Oct 15-21;366(9494):1358. Erratum in: *Lancet*. 2008 Jun 21;371(9630):2084. PMID: 16214597.

Barrat E, Zaïr Y, Ogier N, Housez B, Vergara C, Maudet C, Lescuyer JF, Bard JM, Carpentier YA, Cazaubiel M, Peltier SL. A combined natural supplement lowers LDL cholesterol in subjects with moderate untreated hypercholesterolemia: a randomized placebo-controlled trial. *Int J Food Sci Nutr*. 2013 Nov;64(7):882-9. doi: 10.3109/09637486.2013.809405. Epub 2013 Jul 2. PMID: 23815518.

Barrat E, Zaïr Y, Sirvent P, Chauveau P, Maudet C, Housez B, Derbord E, Lescuyer JF, Bard JM, Cazaubiel M, Peltier SL. Effect on LDL-cholesterol of a large dose of a dietary supplement with plant extracts in subjects with untreated moderate hypercholesterolaemia: a randomised, double-blind, placebo-controlled study. *Eur J Nutr*. 2013 Dec;52(8):1843-52. doi: 10.1007/s00394-012-0486-2. Epub 2012 Dec 25. PMID: 23266743.

Batista, G. de A.P., Cunha, C.L.P. da, Scartezini, M., von der Heyde, R., Bitencourt, M.G., and Melo, S.F. de (2009). Prospective double-blind crossover study of *Camellia sinensis* (green tea) in dyslipidemias. *Arq. Bras. Cardiol*. 93, 128–134.

Battault S, Whiting SJ, Peltier SL, Sadrin S, Gerber G, Maixent JM. Vitamin D metabolism, functions and needs: from science to health claims. *Eur J Nutr*, 2013, 52, 429-441.

Ben Hdia Z, Ben Abdelaziz A, Melki S, Ben Hassine D, Ben Rejeb N, Omezzine A, Bouslama A, Ben Abdelaziz A. Epidemiology of dyslipidemia in Tunisia, HSHS 3 study (Hammam Sousse Sahloul Heart Study). *Tunis Med*. 2022 avril;100(4):323-334. English. PMID: 36155904; PMCID: PMC9477151.

Berberich AJ, Hegele RA. A Modern Approach to Dyslipidemia. *Endocr Rev*. 2022 Jul 13 ;43(4):611-653. doi : 10.1210/endrev/bnab037. PMID : 34676866 ; PMCID : PMC9277652.

Bøhn SK, Croft KD, Burrows S, Puddey IB, Mulder TP, Fuchs D, Woodman RJ, Hodgson JM. Effects of black tea on body composition and metabolic outcomes related to cardiovascular disease risk: a randomized controlled trial. *Food Funct*. 2014 Jul 25;5(7):1613-20. doi: 10.1039/c4fo00209a. PMID: 24889137.

Braud, L.; Battault, S.; Meyer, G. et al. Antioxidant properties of tea blunt ROS-dependent

- lipogenesis: beneficial effect on hepatic steatosis in a high fat-high sucrose diet NAFLD obese rat model. *J Nutr Biochem*. 2017, 40:95-104. doi: 10.1016/j.jnutbio.2016.10.012
- Braud, L.; Peyre, L.; de, G.; Armand, M.; Rahmani, R.; Maixent, J.M. Effect of Brewing Duration on the Antioxidant and Hepatoprotective Abilities of Tea Phenolic and Alkaloid Compounds in a t-BHP Oxidative Stress-Induced Rat Hepatocyte Model. *Molecules*. 2015, 20(8) :14985-15002. doi :10.3390/molecules200814985
- Braud, Laura. Effets lipotropes des molécules antioxydantes du thé (*Camellia sinensis*). Alimentation et Nutrition. Doctoral thesis (Ph. D) Université de Toulon, 2015. Français. NNT : 2015TOUL0014. Tel-01405340
- Brimson JM, Prasanth MI, Kumaree KK, Thitilertdecha P, Malar DS, Tencomnao T, Prasansuklab A. Tea Plant (*Camellia sinensis*): A Current Update on Use in Diabetes, Obesity, and Cardiovascular Disease. *Nutrients*. 2022 Dec 21 ;15(1):37. doi: 10.3390/nu15010037. PMID : 36615695 ; PMCID : PMC9823498.
- Bruckert E, Le goff. Physiologie du métabolisme des lipoprotéines. Médecine des maladies métaboliques 2018 pp 51-61.
- Casula M, Catapano AL, Magni P. Nutraceuticals for Dyslipidaemia and Glucometabolic Diseases: What the Guidelines Tell Us (and Do Not Tell, Yet). *Nutrients*. 2022 Jan 30;14(3):606. doi: 10.3390/nu14030606. PMID: 35276964; PMCID: PMC8839347.
- Champeau, W Varenne O, Picard, F, Conort O. Nouveau parcours de prise en charge du patient atteint d'hypercholestérolémie impliquant le pharmacien clinicien en service de cardiologie. - *Le Pharmacien Clinicien*, 2023.
- Cheeley MK, Clegg K, Lockridge C, Schubert TJ, Jones LK. Statin Intolerance: an Overview of US and International Guidance. *Curr Atheroscler Rep*. 2023 Aug;25(8):517-526. doi: 10.1007/s11883-023-01124-z. Epub 2023 Jul 6. PMID: 37410332; PMCID: PMC10412662.
- Chen, C. S., Chan, H. C., Chang, Y. N., Liu, B. L., & Chen, Y. S. (2009). Effects of bacterial strains on sensory quality of Pu-erh tea in an improved pile-fermentation process. *Journal of Sensory Studies*, 24, 534–553.

Chen, Y. S., Liu, B. L., & Chang, Y. N. (2010). Bioactivities and sensory evaluation of Pu-erh teas made from three tea leaves in an improved pile fermentation process. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 109, 557–563.

Conroy RM, Pyörälä K, Fitzgerald AP, Sans S, Menotti A, De Backer G, De Bacquer D, Ducimetière P, Jousilahti P, Keil U, Njølstad I, Oganov RG, Thomsen T, Tunstall-Pedoe H, Tverdal A, Wedel H, Whincup P, Wilhelmsen L, Graham IM; SCORE project group. Estimation of ten-year risk of fatal cardiovascular disease in Europe: the SCORE project. *Eur Heart J*. 2003 Jun;24(11):987-1003. doi: 10.1016/s0195-668x (03)00114-3. PMID: 12788299.

Deng X, Hou Y, Zhou H, Li Y, Xue Z, Xue X, Huang G, Huang K, He X, Xu W. Hypolipidemic, anti-inflammatory, and anti-atherosclerotic effects of tea before and after microbial fermentation. *Food Sci Nutr*. 2021 Jan 4;9(2):1160-1170. doi: 10.1002/fsn3.2096. PMID: 33598200; PMCID: PMC7866600.

Descamps OS, De Backer G, Annemans L, Muls E, Scheen AJ; Belgian Atherosclerosis Society; Belgian Lipid Club. Les nouvelles recommandations Européennes pour le traitement des dyslipidémies en prévention cardiovasculaire [New European guidelines for the management of dyslipidaemia in cardiovascular prevention]. *Rev Med Liege*. 2012 Mar;67(3):118-27. French. PMID: 22611827.

Ding M, Wennberg A, Ek S, Santoni G, Gigante B, Walldius G, Hammar N, Modig K. The association of apolipoproteins with later-life all-cause and cardiovascular mortality: a population-based study stratified by age. *Sci Rep*. 2021 Dec 24;11(1):24440. doi: 10.1038/s41598-021-03959-5. PMID: 34952923; PMCID: PMC8709841.

Duan H, Song P, Li R, Su H, He L. Attenuating lipid metabolism in atherosclerosis: The potential role of Anti-oxidative effects on low-density lipoprotein of herbal medicines. *Front Pharmacol*. 2023 Mar 31; 14:1161657. doi: 10.3389/fphar.2023.1161657. PMID: 37063287; PMCID: PMC10102431.

EFSA NDA Panel (EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies), Turck, D, Bresson, J-L, Burlingame, B, Dean, T, Fairweather-Tait, S, Heinonen, M, Hirsch-Ernst, KI, Mangelsdorf, I, McArdle, HJ, Naska, A, Neuhäuser-Berthold, M, Nowicka, G, Pentieva, K, Sanz, Y, Sjödin, A, Stern, M, Tomé, D, Van Loveren, H, Vinceti, M, Willatts, P, Martin, A, Strain, SJJ and Siani,

A, 2018. Scientific Opinion on the black tea and improvement of attention: evaluation of a health claim pursuant to Article 13(5) of Regulation (EC) No 1924/2006. *EFSA Journal* 2018;16(5):5266, 17 pp. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5266>

European Commission Evaluation (SWD (2020)95 Final-pt1) of the Regulation (EC) No 1924/2006 on Nutrition and Health Claims Made on Foods with Regard to Nutrient Profiles and Health Claims Made on Plants and Their Preparations and of the General Regulatory Framework for Their Use in Foods. European Commission; Brussels, Belgium: 2020.

Ference BA, Ginsberg HN, Graham I, Ray KK, Packard CJ, Bruckert E, Hegele RA, Krauss RM, Raal FJ, Schunkert H, Watts GF, Borén J, Fazio S, Horton JD, Masana L, Nicholls SJ, Nordestgaard BG, van de Sluis B, Taskinen MR, Tokgözoğlu L, Landmesser U, Laufs U, Wiklund O, Stock JK, Chapman MJ, Catapano AL. Low-density lipoproteins cause atherosclerotic cardiovascular disease. 1. Evidence from genetic, epidemiologic, and clinical studies. A consensus statement from the European Atherosclerosis Society Consensus Panel. *Eur Heart J*. 2017 Aug 21;38(32):2459-2472. doi: 10.1093/eurheartj/ehx144. PMID: 28444290; PMCID: PMC5837225.

François C, Fares, M, Maixent JM. Safety of *Desmodium adsencendens* extract on hepatocyte and renal cells. Efficacy on oxidative stress. *J Intercult Ethnopharmacol*, 2015, 1, 1-5.

Gautier T, Masson D, Lagrost L Métabolisme des lipoprotéines de haute densité (HDL). *Arch. cardiovascular diseases supplements*. 20113, 267-272.

Goodoory VC, Khasawneh M, Black CJ, Quigley EMM, Moayyedi P, Ford AC. Efficacy of Probiotics in Irritable Bowel Syndrome: Systematic Review and Meta-analysis. *Gastroenterology*. 2023 Nov;165(5):1206-1218. doi: 10.1053/j.gastro.2023.07.018. Epub 2023 Aug 3. PMID: 37541528.

Gong, J. S., Zhou, H. J., Zhang, X. F., Song, S., & An, W. J. (2005). Changes of chemical components in Pu'er tea produced by solid state fermentation of sun-dried green tea. *Journal of Tea Science*, 25, 300–306 (in Chinese).

Grundy SM, Stone NJ, Bailey AL, Beam C, Birtcher KK, Blumenthal RS, Braun LT, de Ferranti S, Faiella-Tommasino J, Forman DE, Goldberg R, Heidenreich PA, Hlatky MA, Jones DW, Lloyd-Jones D, Lopez-Pajares N, Ndumele CE, Orringer CE, Peralta CA, Saseen JJ, Smith SC Jr, Sperling

L, Virani SS, Yeboah J. 2018 AHA/ACC/AACVPR/AAPA/ABC/ACPM/ADA/AGS/APhA/ASPC/NLA/PCNA Guideline on the Management of Blood Cholesterol: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines. *Circulation*. 2019 Jun 18;139(25):e1082-e1143. doi: 10.1161/CIR.0000000000000625. Epub 2018 Nov 10. Erratum in: *Circulation*. 2019 Jun 18;139(25):e1182-e1186. Erratum in: *Circulation*. 2023 Aug 15;148(7):e5. PMID: 30586774; PMCID: PMC7403606.

Hao, Z. J., Tong, H. R., Zhou, L., & Liu, Q. J. (2012). Analysis of lovastatin-producing ability of fungi in Pu-erh tea. *Journal of Food Science*, 33, 173–176 (in Chinese).

HAS 2021 Haute autorité de santé. Efficacité et efficacité des hypolipémiantes – Une étude centrée sur les statines. HAS, Septembre 2021.

HAS Présentation générale. <https://www.has.santé/Applications> Présentation générales. & Préambule à la Constitution de l'Organisation mondiale de la Santé, tel qu'adopté par la Conférence internationale sur la Santé, New York, 19-22 juin 1946 ; signé le 22 juillet 1946 par les représentants de 61 Etats. 1946 (Actes officiels de l'Organisation mondiale de la Santé, n° 2, p. 100) et entré en vigueur le 7 avril 1948.

Haute autorité de santé. Guide de bon usage des médicaments. Prévention cardiovasculaire : le choix de la statine la mieux adaptée dépend de son efficacité et de son efficacité. HAS, Février 2012.

Haute autorité de santé. Note de cadrage. Hypercholestérolémie pure et hyperlipidémie mixte : prise en charge. HAS, Juin 2015.

Huang Y, Xiao X, Sadeghi F, Feychting M, Hammar N, Fang F, Zhang Z, Liu Q. Blood metabolic biomarkers and the risk of head and neck cancer: An epidemiological study in the Swedish AMORIS Cohort. *Cancer Lett*. 2023 Mar 31; 557:216091. doi: 10.1016/j.canlet.2023.216091. Epub 2023 Feb 8. PMID: 36764441.

Igho-Osagie, E.; Cara, K.; Wang, D.; et al. Short-Term Tea Consumption Is Not Associated with a Reduction in Blood Lipids or Pressure: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *J Nutr*. 2020, 150(12):3269-3279. doi:10.1093/jn/nxaa295

Jiang, H. Y., Shii, T., Matsuo, Y., Tanaka, T., Jiang, Z. Z., & Kouno, I. (2011). A new catechin

oxidation product and polymeric polyphenols of post-fermented tea. *Food Chemistry*, 129, 830–836.

Kim, A.; Chiu, A.; Barone, M.K. et al. Green tea catechins decrease total and low-density lipoprotein cholesterol: a systematic review and meta-analysis. *J Am Diet Assoc.* 2011, 111(11):1720-1729. doi: 10.1016/j.jada.2011.08.009

Kirkpatrick CF, Sikand G, Petersen KS, Anderson CAM, Aspary KE, Bolick JP, Kris-Etherton PM, Maki KC. Nutrition interventions for adults with dyslipidemia: A Clinical Perspective from the National Lipid Association. *J Clin Lipidol.* 2023 Jul-Aug;17(4):428-451. doi: 10.1016/j.jacl.2023.05.099. Epub 2023 Jun 2. PMID: 37271600. *Médecine des Maladies Métaboliques*, ISSN: 1957-2557, Vol: 12, Issue: 1, Page: 50-61

Kolber MR, Klarenbach S, Cauchon M, Cotterill M, Regier L, Marceau RD, Duggan N, Whitley R, Halme AS, Poshtar T, Allan GM, Korownyk CS, Ton J, Froentjes L, Moe SS, Perry D, Thomas BS, McCormack JP, Falk J, Dugré N, Garrison SR, Kirkwood JEM, Young J, Braschi É, Paige A, Potter J, Weresch J, Lindblad AJ. Lignes directrices simplifiées de PEER sur les lipides : actualisation 2023 : Prévention et prise en charge des maladies cardiovasculaires en soins primaires. *Can Fam Physician.* 2023 Oct;69(10):e189-e201. French. doi: 10.46747/cfp.6910e189. PMID: 37833093; PMCID: PMC10575651.

Kontush A. HDL and Reverse Remnant-Cholesterol Transport (RRT): Relevance to Cardiovascular Disease. *Trends Mol Med.* 2020 Dec;26(12):1086-1100. doi: 10.1016/j.molmed.2020.07.005. Epub 2020 Aug 26. PMID: 32861590.

Lecoffre C, Perrine AL, Blacher J, Olié V. Cholesterol LDL chez les adultes en France métropolitaine : concentration moyenne, connaissance et traitement en 2015, évolutions depuis 2006. *Bull Epidemiol Hebdo.* 2018;(37):710-8. http://invs.santepubliquefrance.fr/beh/2018/37/2018_37_1.html

Li L, Stillemark-Billton P, Beck C, Boström P, Andersson L, Rutberg M, Ericsson J, Magnusson B, Marchesan D, Ljungberg A, Borén J, Olofsson SO. Epigallocatechin gallate increases the formation of cytosolic lipid droplets and decreases the secretion of apoB-100 VLDL. *J Lipid Res.* 2006 Jan;47(1):67-77. doi: 10.1194/jlr.M500424-JLR200. Epub 2005 Oct 14. PMID: 16227197.

Li Y, Luo X, Hua Z, Xue X, Wang X, Pang M, Wang T, Lyu A, Liu Y. Apolipoproteins as potential

communicators play an essential role in the pathogenesis and treatment of early atherosclerosis. *Int J Biol Sci.* 2023 Aug 21;19(14):4493-4510. doi: 10.7150/ijbs.86475. PMID: 37781031; PMCID: PMC10535700.

Li, Y., Xu, S., Mihaylova, M.M., Zheng, B., Hou, X., Jiang, B., Park, O., Luo, Z., Lefai, E., Shyy, J.Y.-J., et al. (2011). AMPK Phosphorylates and Inhibits SREBP Activity to Attenuate Hepatic Steatosis and Atherosclerosis in Diet-Induced Insulin-Resistant Mice. *Cell Metabolism* 13, 376–388.

Liang, Y. R., Zhang, L. Y., & Lu, J. L. (2005). A study on chemical estimation of Pu-erh tea quality. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85, 381–390.

Ling, T. J., Wan, X. C., Ling, W. W., Zhang, Z. Z., Xia, T., Li, D. X., et al. (2010). New triterpenoids and other constituents from a special microbial-fermented tea— Fuzhuan brick tea. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 4945–4950.

Luo J, Yang H, Song BL. Mechanisms and regulation of cholesterol homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2020 Apr;21(4):225-245. doi: 10.1038/s41580-019-0190-7. Epub 2019 Dec 17. PMID: 31848472.

Lütjohann D, Klör HU, Stellaard F. Measurement of Serum Low Density Lipoprotein Cholesterol and Triglyceride-Rich Remnant Cholesterol as Independent Predictors of Atherosclerotic Cardiovascular Disease: Possibilities and Limitations. *Nutrients.* 2023 May 5;15(9):2202. doi: 10.3390/nu15092202. PMID: 37432317; PMCID: PMC10181074.

Madsen CM, Varbo A, Nordestgaard BG. Extreme high high-density lipoprotein cholesterol is paradoxically associated with high mortality in men and women: two prospective cohort studies. *Eur Heart J.* 2017 Aug 21;38(32):2478-2486. doi: 10.1093/eurheartj/ehx163. PMID: 28419274.

Maixent JM, Zeil JM. ABC, a patented innovation in the infusion of teas and herbal plants: enrichment of *Camellia sinensis* leaves with dry extracts from herbal plants. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand).* 2019, 65, 76-78.

Maixent JM. Opinion paper food supplements: The European regulation and its application in France. Thoughts on safety of food supplements. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand),* 2012, 30, 720-17299.

Maixent JM. Opinion paper food supplements: The European regulation and its application in France. Thoughts on safety of food supplements. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 2012 Jun 30;58 Suppl: OL1720-9. PMID: 22762528.

Maixent, JM, Fares, M, François C. Safe plants infusion from traditional herbal remedies for insomnia and anxiety causes a dose-dependent increase of NO and has a protective effect on the renal cellular stress caused by hypoxia and reoxygenation. *Can J Biotech*, 2018, 2, 116-123.

Marieb EN, Katha, H, Dubé S, Anatomie et physiologie humaine, Montréal, Québec : Editions du renouveau pédagogique-Pearson education 2019.

Maron DJ, Lu GP, Cai NS, Wu ZG, Li YH, Chen H, Zhu JQ, Jin XJ, Wouters BC, Zhao J. Cholesterol-lowering effect of a theaflavin-enriched green tea extract: a randomized controlled trial. *Arch Intern Med*. 2003 Jun 23;163(12):1448-53. doi: 10.1001/archinte.163.12.1448. PMID: 12824094.

Matsuo M. ABCA1 and ABCG1 as potential therapeutic targets for the prevention of atherosclerosis. *J Pharmacol Sci*. 2022 Feb;148(2):197-203. doi: 10.1016/j.jphs.2021.11.005. Epub 2021 Dec 1. PMID: 35063134.

Meng XH, Li N, Zhu HT, Wang D, Yang CR, Zhang YJ. Plant Resources, Chemical Constituents, and Bioactivities of Tea Plants from the Genus *Camellia* Section *Thea*. *J Agric Food Chem*. 2019 May 15;67(19):5318-5349. doi: 10.1021/acs.jafc.8b05037. Epub 2018 Dec 3. PMID: 30449099.

Mok, P., Chang, R. C. C., Wang, M. F., & So, K. F. (2008). A review on the laboratory investigations and epidemiological studies of black and Pu-erh tea. *Dietary Supplements, ACS Symposium Series*, 987, 144–159.

Momose, Y.; Maeda-Yamamoto, M.; Nabetani, H. Systematic review of green tea epigallocatechin gallate in reducing low-density lipoprotein cholesterol levels of humans. *Int J Food Sci Nutr*. 2016, 67(6):606-613. doi:10.1080/09637486.2016.1196655

Neyestani, T.R.; Nikooyeh, B. A comprehensive overview on the effects of green tea on anthropometric measures, blood pressure, glycemic and lipidemic status: An umbrella review and meta meta-analysis study. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2022, 32(9):2026-2040. doi: 10.1016/j.numecd.2022.05.021

Ogier N, Amiot MJ, Georgé S, Maillot M, Mallmann C, Maraninchi M, Morange S, Lescuyer JF, Peltier SL, Cardinault N. LDL-cholesterol-lowering effect of a dietary supplement with plant extracts in subjects with moderate hypercholesterolemia. *Eur J Nutr*. 2013 Mar;52(2):547-57. doi: 10.1007/s00394-012-0357-x. Epub 2012 Apr 24. PMID: 22527287.

Onakpoya, I.; Spencer, E.; Heneghan, C.; Thompson, M. The effect of green tea on blood pressure and lipid profile: a systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2014, 24(8):823-836. doi: 10.1016/j.numecd.2014.01.016

Ong KL, Cochran BJ, Manandhar B, Thomas S, Rye KA. HDL maturation and remodelling. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*. 2022 Apr;1867(4):159119. doi: 10.1016/j.bbalip.2022.159119. Epub 2022 Feb 2. PMID: 35121104.

Pierre, S, Lesnik P, Duran MJ, Moreau, M, Paganelli, F, Chapman J, George F, Sampol J, Maixent JM. Oxidized LDLs alter Na, K-ATPase activity in human endothelial cells. Prevention by Ginkgo biloba Extract (EGb 761). *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 2008, 54, 1032-1042.

Quarfordt SH, Levy RI, Frederickson DS. The kinetic properties of very low density lipoprotein triglyceride in type 3 hyperlipoproteinemia. *Biochim Biophys Acta*. 1973 Mar 8;296(3):572-6. doi: 10.1016/0005-2760(73)90117-3. PMID: 4347392.

Raja V, Aguiar C, Alsayed N, Chibber YS, ElBadawi H, Ezhov M, Hermans MP, Pandey RC, Ray KK, Tokgözoğlu L, Zambon A, Berrou JP, Farnier M. Non-HDL-cholesterol in dyslipidemia: Review of the state-of-the-art literature and outlook. *Atherosclerosis*. 2023 Oct; 383:117312. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2023.117312. Epub 2023 Sep 30. PMID: 37826864.

Regulation (EC) No 1924/2006 of the European Parliament and of the Council of 20 December 2006 on nutrition and health claims made on foods (OJ L 404, 30.12.2006, p.9)

Shao, W. F., Powell, C., & Clifford, M. N. (1995). The analysis by HPLC of green, black and pu'er teas produced in Yunnan. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 69, 535–540.

Tang GY, Meng X, Gan RY, Zhao CN, Liu Q, Feng YB, Li S, Wei XL, Atanasov AG, Corke H, Li HB. Health Functions and Related Molecular Mechanisms of Tea Components: An Update Review. *Int J Mol Sci*. 2019 Dec 8;20(24):6196. doi: 10.3390/ijms20246196. PMID: 31817990; PMCID:

PMC6941079.

Vieux F, Rémond D, Peyraud JL, Darmon N. Approximately Half of Total Protein Intake by Adults Must be Animal-Based to Meet Nonprotein, Nutrient-Based Recommendations, With Variations Due to Age and Sex. *J Nutr*. 2022 Nov;152(11):2514-2525. doi: 10.1093/jn/nxac150. Epub 2022 Jul 11. PMID: 36774117; PMCID: PMC9644177.

von Eckardstein A, Nordestgaard BG, Remaley AT, Catapano AL. High-density lipoprotein revisited: biological functions and clinical relevance. *Eur Heart J*. 2023 Apr 21;44(16):1394-1407. doi: 10.1093/eurheartj/ehac605. PMID: 36337032; PMCID: PMC10119031.

Walldius G, Jungner I, Holme I, Aastveit AH, Kolar W, Steiner E. High apolipoprotein B, low apolipoprotein A-I, and improvement in the prediction of fatal myocardial infarction (AMORIS study): a prospective study. *Lancet*. 2001 Dec 15;358(9298):2026-33. doi: 10.1016/S0140-6736(01)07098-2. PMID: 11755609.

Wang S, Qiu Y, Gan RY, Zhu F. Chemical constituents and biological properties of Pu-erh tea. *Food Res Int*. 2022 Apr; 154:110899. doi: 10.1016/j.foodres.2021.110899. Epub 2021 Dec 15. PMID: 35337597.

Wang, H. F., Provan, G. J., & Helliwell, K. (2000). Tea flavonoids: Their functions, utilisation and analysis. *Trends in Food Science & Technology*, 11, 152–160.

Xiao X, Huang Y, Sadeghi F, Feychting M, Hammar N, Fang F, Zhang Z, Liu Q. Carbohydrate, Lipid, and Apolipoprotein Biomarkers in Blood and Risk of Thyroid Cancer: Findings from the AMORIS Cohort. *Cancers (Basel)*. 2023 Jan 14;15(2):520. doi: 10.3390/cancers15020520. PMID: 36672472; PMCID: PMC9856513.

Xu J, Wang M, Zhao J, Wang YH, Tang Q, Khan IA. Yellow tea (*Camellia sinensis* L.), a promising Chinese tea: Processing, chemical constituents and health benefits. *Food Res Int*. 2018 May; 107:567-577. doi: 10.1016/j.foodres.2018.01.063. Epub 2018 Jan 31. PMID: 29580521.

Xu, R.; Yang, K.; Li, S.; Dai, M.; Chen, G. Effect of green tea consumption on blood lipids: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Nutr J*. 2020, 19(1):48. doi:10.1186/s12937-020-00557-5

Yang X, Dai H, Deng R, Zhang Z, Quan Y, Giri M, Shen J. Association between tea consumption and prevention of coronary artery disease: A systematic review and dose-response meta-analysis. *Front Nutr.* 2022 Nov 24; 9:1021405. doi: 10.3389/fnut.2022.1021405. PMID: 36505265; PMCID: PMC9729734.

Yang, C. R., Chen, K. K., & Zhang, Y. J. (2006). Categories of tea and the definition of Pu-erh tea. *Tea Science and Technology*, 2, 37–38 (in Chinese).

Yang, X. R., Ye, C. X., Xu, J. K., & Jiang, Y. M. (2007). Simultaneous analysis of purine alkaloids and catechins in *Camellia sinensis*, *Camellia ptilophylla* and *Camellia assamica* var. *kucha* by HPLC. *Food Chemistry*, 100, 1132–1136.

Zannis VI, Chroni A, Krieger M. Role of apoA-I, ABCA1, LCAT, and SR-BI in the biogenesis of HDL. *J Mol Med (Berl)*. 2006 Apr;84(4):276-94. doi: 10.1007/s00109-005-0030-4. Epub 2006 Feb 25. PMID: 16501936.

Zhang, L., Li, N., Ma, Z. Z., & Tu, P. F. (2011). Comparison of the chemical constituents of aged Pu-erh tea, ripened Pu-erh tea, and other teas using HPLC-DAD-ESI-MSn. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 8754–8760.

Zhao, M., Ma, Y., Wei, Z. Z., Yuan, W. X., Li, Y. L., Zhang, C. H., et al. (2011). Determination and comparison of γ -aminobutyric acid (GABA) content in Pu-erh and other types of Chinese tea. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 3641–3648.

Zhao, Y.; Asimi, S.; Wu, K.; Zheng, J.; Li, D. Black tea consumption and serum cholesterol concentration: Systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Clin Nutr.* 2015, 34(4):612-619. doi: 10.1016/j.clnu.2014.06.003

Zhu, H. T., Yang, C. R., Li, Y., & Zhang, Y. J. (2008). Advances on the research of microbes during the post-fermentative process of Pu-er tea. *Acta Botanica Yunnanica*, 30, 1–7 (in Chinese).

Résumé :



Olivier Pons Laboratoire IAP, Université de Toulon

Sujet : Effet hypolipidémiant de *Camellia sinensis* (Hao Ling® Tea) chez les sujets atteints d'hypercholestérolémie non traités avec des statines : protocole d'étude pour un essai randomisé, en double aveugle, contrôlé par placebo. Effets lipotropes des molécules antioxydantes du thé (*Camellia sinensis*) sur la maladie hépatique chronique la plus courante dans les pays industrialisés car elle est fortement associée à la dyslipidémie liée au développement. A ce jour, les mécanismes de la pathologie restent mal définis et les moyens thérapeutiques disponibles ont une efficacité modérée. Des études épidémiologiques ont rapporté un effet bénéfique de la consommation de thé dans la lutte contre les troubles hépatiques et les facteurs de risque cardiovasculaires tels que la dyslipidémie. Cependant, les mécanismes par lesquels un mélange de thé vert, de thé Oolong et de thé Pu-erh, le thé Hao Ling, réduit le foie gras et la dyslipidémie restent inconnus. Par conséquent, l'objectif de cette thèse était d'évaluer les effets et les mécanismes d'action du thé Hao Ling sur le cholestérol et la dyslipidémie, à travers deux approches, l'une sur le modèle cellulaire et l'autre sur le modèle animal. Nos résultats montrent que le thé Hao Ling réduit la lipogenèse hépatique *in vitro* et *in vivo* et atténue ainsi la stéatose induite par un régime riche en graisses et en saccharose élevé dans un modèle de rat. Nous avons observé que ce thé améliore le profil lipidique sanguin en augmentant les taux plasmatiques de HDL. Nous avons également pu mettre en évidence que le thé possède des propriétés antioxydantes et hépato-protectrices pour contrer un inducteur de stress oxydatif *in vitro* et diminuer la peroxydation lipidique *in vivo*. Enfin, nous avons montré que le stress oxydatif en soi entraînait une accumulation de lipides intracellulaires dans les hépatocytes isolés et que le thé, en raison de ses propriétés antioxydantes, empêchait ce phénomène. Le thé Hao Ling est une bonne approche nutritionnelle pour prévenir le cholestérol et maintenir le ratio LDL / HDL.

Mots-clés : cholestérol, dyslipidémie, lipotrope, thé, antioxydants

Summary:

Olivier Pons IAP Laboratory, University of Toulon

Lipid-lowering effect of *Camellia sinensis* (Hao Ling® Tea) in subjects with hypercholesterolemia not treated with statin: study protocol for a randomized, double-blind, placebo-controlled trial.

Lipotropic effects of antioxidant molecules of tea (*Camellia sinensis*) on the most common chronic liver disease in industrialized countries because being strongly associated with the development related dyslipidemia. To date, the mechanisms of pathology remain poorly defined and available therapeutic means have moderate efficacy. Epidemiological studies have reported a beneficial effect of tea consumption in the fight against liver disorders and cardiovascular risk factors such as dyslipidemia. However, the mechanisms by which a blend of green tea, Oolong tea and Pu-erh tea, Hao Ling tea, reduces fatty liver and dyslipidemia remain unknown. Therefore, the objective of this thesis was to evaluate the effects and mechanisms of action of Hao Ling tea on cholesterol and dyslipidemia, through two approaches, one on cellular model and the other on animal model. Our results show that Hao Ling tea reduces the hepatic lipogenesis *in vitro* and *in vivo* and thus attenuates steatosis induced by a high fat-high sucrose diet in a rat model. We observed that this tea improves the blood lipid profile by increasing plasma HDL levels. We were also able to highlight that tea owns antioxidant and hepato-protective properties to counteract an inducer of oxidative stress *in vitro* and to decrease lipid peroxidation *in vivo*. Finally, we have shown that the oxidative stress *per se* resulted in an accumulation of intracellular lipid in isolated hepatocytes and that the tea, due to its antioxidant properties, prevented this phenomenon. The Hao Ling tea is a good nutritional approach in preventing Cholestérol and to maintain LDL/HDL ratio.

Keywords : cholesterol, dyslipidemia, lipotropic, tea, antioxidants