

Maisons-Alfort, le 17 décembre 2012

Le directeur général

AVIS

de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail

relatif à la sécurité d'emploi des préparations de thé vert

L'Anses met en œuvre une expertise scientifique indépendante et pluraliste.

L'Anses contribue principalement à assurer la sécurité sanitaire dans les domaines de l'environnement, du travail et de l'alimentation et à évaluer les risques sanitaires qu'ils peuvent comporter.

Elle contribue également à assurer d'une part la protection de la santé et du bien-être des animaux et de la santé des végétaux et d'autre part l'évaluation des propriétés nutritionnelles des aliments.

Elle fournit aux autorités compétentes toutes les informations sur ces risques ainsi que l'expertise et l'appui scientifique technique nécessaires à l'élaboration des dispositions législatives et réglementaires et à la mise en œuvre des mesures de gestion du risque (article L.1313-1 du code de la santé publique).

Ses avis sont rendus publics.

L'Anses a été saisie le 16 mai 2011 par la Direction générale de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes (Dgccrf) pour la réalisation de l'expertise suivante : demande d'avis relatif à la sécurité d'emploi des préparations de thé vert.

1. CONTEXTE ET OBJET DE LA SAISINE

Depuis 2003, de nombreux effets indésirables en lien avec la consommation de préparations à base de thé vert ont été signalés à travers le monde. L'Anses a notamment été destinataire de 17 signalements relatifs à des produits contenant du thé vert dans le cadre de la nutrivigilance. La Dgccrf a souhaité que les données disponibles soient étudiées afin de caractériser au mieux les risques liés aux préparations de thé vert et, le cas échéant, d'identifier les incertitudes scientifiques qui persistent quant à l'existence ou à la portée des risques réels pour la santé publique.

La Dgccrf pose les questions suivantes :

- Quelles sont les conditions requises pour garantir la sécurité d'emploi de préparations à base de thé vert dans les compléments alimentaires ?
- Quelles sont les conditions requises pour garantir la sécurité d'emploi de préparations à base de thé vert dans les autres matrices alimentaires ou en tant que denrée alimentaire (commercialisée sous forme d'infusion, par exemple) ?
- Quelles sont les incertitudes scientifiques empêchant de caractériser le risque ?
- Quelles sont les études requises pour lever ces incertitudes ?

Afin de permettre une meilleure compréhension des réponses apportées, l'Anses propose de répondre aux questions dans l'ordre suivant :

- Quelles sont les incertitudes scientifiques empêchant de caractériser le risque ?
- Quelles sont les études requises pour lever ces incertitudes ?
- Quelles sont les conditions requises pour garantir la sécurité d'emploi de préparations à base de thé vert dans les compléments alimentaires ?

- Quelles sont les conditions requises pour garantir la sécurité d'emploi de préparations à base de thé vert dans les autres matrices alimentaires ou en tant que denrée alimentaire (commercialisée sous forme d'infusion, par exemple) ?

2. ORGANISATION DE L'EXPERTISE

L'expertise a été réalisée dans le respect de la norme NF X 50-110 « Qualité en expertise – Prescriptions générales de compétence pour une expertise (mai 2003) ».

L'expertise collective a été réalisée par le comité d'experts spécialisés (CES) « Nutrition humaine » réuni le 15 septembre 2011, sur la base de rapports initiaux rédigés par 3 rapporteurs.

On notera par ailleurs, que l'Anses s'est autosaisie en 2011 sur la question du risque d'hépatotoxicité du thé vert dans le cadre de la nutrivi-gilance. Depuis, cette saisine a donné lieu à l'avis 2011-SA-0108, après consultation du CES « Nutrition humaine » en date des 24 novembre 2011 et 22 mars 2012.

3. ANALYSE ET CONCLUSIONS DU CES

3.1. Composition du thé vert sous forme de feuille et sous forme de poudre

D'après la Pharmacopée française (2010) le « thé vert » est constitué de « la feuille jeune, non fermentée, soumise à une dessiccation rapide à chaud (produisant des inactivations enzymatiques et préservant les catéchines), puis séchée de *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze et de ses variétés cultivées ». Cette matière première, (généralement utilisée en infusion), renferme :

- jusqu'à 20 % de composés phénoliques, soit environ 400 mg (de polyphénols totaux) dans une tasse de thé vert (Bruneton 2009) :
 - o acides phénols (acide caféique, acide chlorogénique) ;
 - o des tanins « galliques » (esters du glucose et de l'acide gallique) ;
 - o des flavonols (O-hétérosides et C-hétérosides) ;
 - o principalement dans ce groupe de composés phénoliques, des composés flavaniques : 5-12 % de EGCG [gallate du (-)-épigallocatechol] ; 1-5 % de ECG [gallate du (-)-épicatéchol], et le 3,5 digallate des mêmes, 0,2-2 % de EC [(-)-épicatéchol], du (+)-galocatechol et du (+)-catéchol ;
 - o des proanthocyanidols : gallates et digallates de prodelphinidols, de procyanidols, des théasinensines ;
 - o et des formes dimériques, les assamicaïnes ;
- des protéines (15-20 %), des acides aminés (3 % dont surtout l'éthylamide de l'acide glutamique, dénommé théanine) ;
- des glucides (5 %) et des polysaccharides (13 %) ;
- des saponines triterpéniques ou théasaponines, très solubles dans l'eau (et dans les premiers infusats) et donc susceptibles de modifier la disponibilité d'autres composants ;
- de l'acide ascorbique, des vitamines du groupe B ;
- 2 à 4 % de bases puriques (constituant majoritaire : la caféine) ;
- des hétérosides d'alcools aromatiques, aliphatiques et terpéniques, odorants et libérés lors de l'infusion ;
- des matières minérales, dont des fluorures (130 à 160 mg/kg) pouvant expliquer des cas de fluorose (Cao et al. 2003; Hallanger Johnson et al. 2007; Whyte et al. 2005; Whyte et al. 2008).

3.2. Composition d'une infusion

L'infusion est la préparation traditionnelle et renferme les composés les plus polaires. Cependant, en raison d'une certaine amertume, la tradition chinoise fait généralement rejeter le premier infusat,

ce qui peut revenir à rejeter une proportion élevée sinon la majorité (suivant la température et le temps de contact) de ces composés (saponines, caféine, catéchols dont l'EGCG).

Ce n'est donc que ce qui reste qui est bu sous la forme d'un deuxième infusât moins concentré.

Ensuite, toujours d'après la tradition chinoise, la même matière végétale est réutilisée pour de nouvelles infusions ; l'infusion est encore aromatique mais de moins en moins chargée en caféine et polyphénols.

La composition varie aussi selon la variété du thé ; en effet, il peut s'agir de feuilles adultes ou de boutons floraux. La tradition chinoise ne retenait qu'un bouton et 2 ou 3 feuilles jeunes voisines, or la teneur en catéchols est plus basse dans ces feuilles jeunes que dans des feuilles adultes. De plus, la présentation commerciale en poudre ou sachet peut faire utiliser des feuilles âgées (non présentables comme boutons jeunes) et sous forme de débris, c'est à dire plus riches en catéchols et les libérant mieux du fait de la fragmentation.

La composition varie aussi selon le rapport volume d'eau et masse de thé mise à infuser (en général 7,5-10 g/L), selon le degré de division, selon la température (50-100°C), selon le temps de contact, selon le mode d'extraction : infusion statique, décoction, avec ou sans agitation.

Le rejet du premier infusât après une durée d'infusion de 2 minutes reviendrait à éliminer 72% de la caféine et approximativement 50 % des catéchols (Astill et al. 2001).

Par ailleurs, la caféine (alcaloïde) forme des complexes avec les composés acides comme les tanins et les catéchols. Parmi ces derniers, l'EGCG est majoritaire ; une association caféine-EGCG est très probable dans un premier infusât compte tenu de ces teneurs ; or la disponibilité de ces complexes n'est pas connue.

Le mode de préparation traditionnel, soit le rejet du premier infusât, revient à réduire considérablement les quantités de catéchols absorbées par rapport à des simulations de consommation théoriques, surtout en cas de prises répétées.

Les estimations de consommations qui ont pu être faites avec les produits commercialisés en Occident portent sur :

- des infusâts natifs sous la forme d'un sachet dans lequel la matière végétale est finement divisée entraînant des rendements d'extraction améliorés, et de qualité moins bonne que dans le thé en vrac (feuilles moins jeunes ou débris plus riches en catéchols) ;
- un cumul de tels infusâts en cas de prises renouvelées puisqu'un nouveau sachet dose est utilisé à chaque fois. Ceci peut amener avec les infusions présentes sur le marché français et à plus forte raison avec des extraits concentrés, à des consommations très supérieures à celles apportées par des infusions préparées selon la tradition (avec des thés issus de jeunes boutons et en jetant le 1^{er} infusât). Enfin le consommateur peut être tenté d'agiter le sachet ou de l'écraser ce qui augmente le passage des catéchols dans l'eau par simple diffusion.

Le rapport de l'EFSA cite des teneurs montrant une très grande variabilité avec des produits commercialisés et pas nécessairement constitués du jeune bouton foliaire entier ou peu divisé (EFSA-ESCO et al. 2009) :

- dans des feuilles de thé vert des teneurs de 16 à 203 mg/g d'EGCG ont été mesurées, soit une moyenne de 71 mg/g (USDA 2007) ;
- dans une infusion de 100 mL, ces teneurs pourraient être de 77,8 mg d'EGCG en moyenne (minimum : 2,3 mg/100 mL ; maximum : 203 mg/100 mL) (USDA 2007) ; il y aurait avec des thés chinois et japonais, 26 à 41 mg d'EGCG (51-84 mg de catéchols totaux) dans une tasse de 100 mL (Khokhar et al. 1997) ;
- dans une première infusion préparée avec les formes commercialisées en Occident, des teneurs de l'ordre de 141-338 mg /L de caféine et 398-1127 mg/L de catéchols totaux dont 117-442 mg/L d'EGCG ont été mesurées (Reto et al. 2007).

Avec les présentations en sachets, le rendement d'extraction est plus élevé, avec 82 % des catéchines extraites en 3 minutes (Astill et al. 2001). En effet, la température de l'eau est proche de l'ébullition, les feuilles sont finement divisées ; enfin le sachet peut être agité au lieu de ne subir qu'une simple diffusion passive.

Le thé vert est beaucoup plus riche en catéchols (13 %) que le thé noir qui, après fermentation, n'en renferme que 2 %.

Il faut noter aussi que le rejet du premier infusat fait éliminer la majorité des saponosides, tensioactifs naturels (extrêmement solubles dans l'eau, même à froid) susceptibles de modifier la digestion de nutriments ou de xénobiotiques. Ils sont évidemment très abondants dans une infusion première (ils sont aussi présents dans un extrait alcoolique et dans une poudre) mais à des taux plus bas dans les infusés suivants.

3.3. Composition d'un extrait alcoolique

Certains extraits concentrés et souvent décaféinés, utilisés dans des compléments alimentaires, peuvent atteindre des teneurs très élevées en catéchols (jusqu'à 80 %). Des quantités théoriques de 130-500 mg/g ont été mesurées dans des produits commercialisés (Manning et al. 2003). Tous les composants non minéraux (y compris les saponosides) trouvés dans une infusion sont bien extraits par un mélange eau/alcool (80 %). Cependant, des substances lipophiles présentes dans la matrice végétale du thé vert (intrinsèques ou contaminants potentiels) peuvent être mieux extraites que par l'eau chaude seule. Les doses utilisées apportent des quantités de 70-200 mg de catéchol par prise de complément à base d'extrait (Bun et al. 2006).

3.4. Niveaux de consommation

Les données de consommation provenant de l'étude Inca 2 réalisée en 2006-2007 montrent que sur 2624 adultes (18 à 79 ans) 891 sont des consommateurs de thé dont l'âge moyen est de 47 ans. Ces consommateurs de thé sont majoritairement des femmes (68 ± 1,9%). Parmi les consommateurs de thé, 576 consommateurs ont identifié le type de thé consommé. Ainsi, 222 adultes sont des consommateurs de thé vert exclusivement et 83 adultes consomment du thé vert et du thé noir. La fréquence de consommation chez les adultes qui consomment du thé vert au moins une fois par jour est de 1,5 thé par jour (± 0,5). Cette consommation se déroule majoritairement au petit-déjeuner, en association avec une prise alimentaire. Le thé vert n'est jamais consommé de façon isolée au déjeuner et au dîner. Lorsque la consommation de thé vert a lieu à jeun, c'est principalement lors de la collation matinale.

3.5. Réponses aux questions posées

Question 1 : Quelles sont les incertitudes scientifiques empêchant de caractériser le risque ?

De très nombreux travaux scientifiques ont été menés afin d'évaluer l'activité biologique des catéchines contenues dans le thé vert et la toxicité potentielle de préparations à base de thé vert. Sur le plan biologique, le mélange des catéchines présentes dans les extraits de thé vert leur confère des propriétés anti-oxydantes (surtout *in vitro*). Des allégations de santé sont utilisées sans que la réelle efficacité de ces extraits ne soit toujours démontrée. Ainsi, la FDA n'a pas validé les activités anti-cancer si souvent évoquées dans la littérature, en raison de preuves jugées insuffisantes (Food and Drug Administration 2004).

Sur le plan toxicologique, de nombreuses études ont été réalisées mais il en ressort une grande difficulté d'interprétation et de comparaison des résultats en raison de différences importantes dans la composition des produits administrés qui sont soit des extraits de thé vert aqueux ou hydro-alcooliques n'ayant que rarement les mêmes teneurs en EGCG, soit des mélanges de catéchines dont la composition n'est pas toujours précisée, soit directement l'EGCG. Les différentes souches de rats utilisés : rat Wistar (Yoshida et al. 2011), souris B6C3F1 et rat Fisher 344 (Chan et al. 2010), rat Sprague Dawley (Chandra et al. 2010) posent également des problèmes d'interprétation des résultats. De plus, certaines études *in vitro* sont réalisées avec des concentrations très supérieures aux expositions *in vivo*. Parfois, le nombre d'animaux mis en jeu est insuffisant pour permettre la moindre interprétation. Il est regrettable que toutes ces études aient été développées isolément sans respecter une stratégie commune de développement.

Il en résulte beaucoup d'incertitudes scientifiques :

Incertaines cinétiques

▪ *In vitro*, il a été montré dans le cytoplasme hépatique du rat une plus grande aptitude à méthyler et à sulfo-conjuguer l'EGCG que dans celui de la souris et de l'Homme, montrant ainsi une différence dans la biotransformation entre espèces. Il a été montré que l'EGCG peut inhiber l'activité méthylante de la catéchol-O-méthyltransférase (COMT) qui intervient dans le métabolisme de molécules endogènes (catécholamines, estrogènes) mais également d'un certain nombre de xénobiotiques potentiellement toxiques (Lu et al. 2003). Ceci pourrait orienter sur une toxicité indirecte des catéchols et en particulier de l'EGCG qui ralentirait la détoxification de xénobiotiques.

Il se pourrait aussi que la COMT puisse biotransformer ces catéchines et réduire leur potentiel hépatotoxique propre par formation d'un dérivé de méthylation moins toxique (Galati et al. 2006). Ces dérivés réduiraient, en bloquant des fonctions phénols, la formation de formes réactives de l'oxygène et de quinones, probablement plus toxiques.

Dans un modèle *ex vivo* d'iléon isolé humain utilisant différentes catéchines, il a été mis en évidence la présence de 2 métabolites hydroxylés sous forme de valérolactone. Il en ressort que la diversité de la population microbienne intestinale peut influencer de manière significative le métabolisme des catéchines et peut-être expliquer en partie la grande variabilité individuelle observée chez l'Homme (Schantz et al. 2010).

• Chez l'animal, une très faible biodisponibilité est observée pour la plupart des catéchines du thé vert. Les catéchines circulantes dans le plasma le sont à des concentrations très faibles, majoritairement à l'état libre pour l'EGCG ou sous forme de dérivés sulfo/glucuronoconjugués pour les autres catéchines. Pour l'EGCG, les concentrations plasmatiques sont beaucoup plus faibles chez le rat que chez la souris. La perméabilité de la membrane gastro-intestinale et le métabolisme au niveau de la paroi intestinale peuvent l'expliquer en partie. La liaison de l'EGCG aux protéines est assez élevée (92%) et la distribution tissulaire se fait de manière similaire dans la plupart des tissus. Les réactions de méthylation sont également très impliquées dans le métabolisme. L'élimination se fait principalement par les fèces (*via* la bile) et faiblement par les urines. L'EGCG n'est pas retrouvé dans les urines.

Il a été clairement démontré chez le chien que toute administration à jeun augmente de manière très significative les concentrations plasmatiques en catéchines, sans doute résultant de variations de pH au niveau de l'estomac, une tendance acide contribuant à une meilleure stabilité des catéchines (Kapetanovic et al. 2009).

• Chez l'Homme, les concentrations plasmatiques en catéchines présentent certaines différences. Celles de l'EGCG sont faibles et l'EGCG est présent uniquement sous forme libre alors que l'EGC et l'EC se retrouvent sous forme conjuguée (glucurono- ou sulfo-). La biodisponibilité de l'EGCG est plus faible que celle de l'EGC et de l'EC. L'EGC n'est pas détecté dans le plasma. La cinétique est linéaire pour une gamme de doses déterminées d'EGCG (jusqu'à environ 400 mg) mais une saturation d'absorption survient pour des doses supérieures. Pour l'EGCG et l'EGC, la $\frac{1}{2}$ vie terminale est respectivement de l'ordre de 5 et 2,7 h. L'EGCG n'est pas éliminé dans les urines. Comme chez l'animal, le métabolisme débute au niveau intestinal. Il n'est pas observé de métabolisme de type I, mais des réactions métaboliques de type II essentiellement représentées par des glucuronoconjuguaisons et des méthylations. Parmi les formes méthylées, le métabolite 4'-O-Me EGC semble être le plus important avec de grandes discordances sur les concentrations plasmatiques selon les auteurs (Renouf et al. 2011).

La plupart des études rapportent des variations interindividuelles considérables qui pourraient s'expliquer en partie par une grande diversité de la population microbienne dans le tractus gastro-intestinal (Schantz et al. 2010).

• Induction/inhibition enzymatique

Chez le rat Wistar toutes les variétés de thé (vert ou non) augmentent l'activité du CYP 1A1 (cytochrome P450, famille 1, sous-famille A, polypeptide 1). L'activité cytosolique de la GSH transférase est augmentée avec le thé vert. Des différences d'activité ont été rapportées entre catéchines galliques et non galliques. Pour l'induction, des résultats assez contradictoires sont rapportés selon la catéchine considérée. De faibles activités inhibitrices sur CYP ont été montrées *in vitro* sur microsomes (CYP2D6 et 3A4). Par contre l'EGC et l'EGCG présentent un important effet inhibiteur sur les enzymes de phase II (COMT, UGT et SULT). Sur microsomes de foie humain, il a été montré une forte inhibition (IC_{50} : 33 μ g/mL) de l'EGCG vis à vis de l'UGT1A4 (UDP-glucuronosyltransférase 1-4) (Mohamed et al. 2011).

- Phénotypage de la COMT

Il est bien établi que le gène de la COMT est polymorphique. Dans une étude de faible effectif chez l'Homme (2 groupes de 10 sujets), l'activité de la COMT ne semble pas avoir une influence sur l'absorption et l'élimination de l'EGCG (Miller et al. 2011). Dans une autre étude (cohorte de 660 sujets de sexe masculin consommant quotidiennement du thé vert), il a été observé une teneur urinaire en métabolites plus faible (35-45%) chez ceux possédant un génotype de faible activité que chez ceux ayant une activité plus élevée, d'où une rétention de ces métabolites. Les conséquences pour la santé ne sont pas encore clairement établies (Inoue-Choi et al. 2010).

Incertitudes toxicologiques

Liées à la présence des catéchines

- *In vitro*, les études réalisées montrent sur des cultures d'hépatocytes de rat, une hépatotoxicité d'extraits hydro-alcooliques de feuilles de thé vert avec une contribution majeure de l'EGCG pour des concentrations de l'ordre de 500 µg/mL. Après examen par microscopie électronique, il a été montré que la toxicité résultait d'une atteinte mitochondriale avec phénomène de gonflement, infiltration leucocytaire, et présence de gouttelettes lipidiques (El Daly 2011). L'inhibition des topo-isomérases observées pourrait constituer une explication. Sur une batterie de tests *in vitro*, il a été montré que l'acide gallique souvent associé à certaines catéchines du thé vert pouvait jouer un rôle dans la survenue de l'hépatotoxicité comme cela a été évoqué dans la partie cinétique (Liu et al. 2011).

La viabilité des hépatocytes de rat traités par de l'EGCG est altérée à 200 µM (Galati et al. 2006). Une mort cellulaire s'ensuit, accompagnée de production de formes réactives de l'oxygène et d'une déplétion de glutathion (GSH). Les mêmes effets toxiques sur le potentiel de membrane mitochondriale pouvant conduire à une apoptose peuvent être constatés sur des lignées de cellules cancéreuses (HT-29 de carcinome colorectal) à 100 µM avec des dérivés de l'acide gallique, dont le plus toxique est l'EGCG.

Un prétraitement avec des inhibiteurs de la COMT (entacapone) augmente les effets toxiques de l'EGCG, ce qui semble montrer que l'activation des voies de métabolisation de l'EGCG (en particulier les voies qui neutralisent les groupes phénols) en réduit les effets toxiques. En particulier la COMT facilite la détoxification de l'EGCG en le métabolisant en dérivés méthylés en 4' et 4'', ce qui prévient l'accumulation de dérivés orthoquinoniques de l'acide gallique et de l'EGCG qui seraient les plus toxiques. Ces formes phénoliques, quinoniques réactives pourraient révéler des effets pro-oxydants ou être détoxifiées par condensation avec de la cystéine ou GSH selon la quantité disponible.

Ce seraient ces mêmes effets pro-oxydants des dérivés galliques du thé vert, responsables à certaines doses de leur hépatotoxicité, mais aussi pro-oxydants sur des lignées cancéreuses qui auraient fait attribuer au thé vert des propriétés « d'anticancéreux » (Lambert et al. 2007), d'antiradicalaire, mais uniquement extrapolées à partir d'effets observables *in vitro*.

- Chez l'animal, les études de toxicité ont été menées essentiellement chez le rat, quelques unes chez le chien ou la souris dans le cadre d'études sub-chroniques ne dépassant pas 13 semaines. Une étude de cancérogenèse de 24 mois vient d'être réalisée chez le rat (Yoshida et al. 2011). Dans certaines études, des effets hépatiques sont observés lorsque de fortes doses de catéchines sont administrées par voie orale, particulièrement chez le rat (El Daly 2011). Ils peuvent se manifester par une élévation des marqueurs biologiques hépatiques mais également par des atteintes cellulaires (nécrose). Chez la souris, des élévations très significatives des alanine aminotransférases (Galati et al. 2006) sont rapportées pour une dose unique de 1500 mg/kg ou pour 2 doses de 750 mg/kg (Lambert et al. 2010). Chez le chien, les variations cinétiques rapportées précédemment après prise à jeun d'extrait de thé vert, se traduisent en termes d'hépatotoxicité par une élévation très significative des biomarqueurs (aspartate aminotransférase (ASAT), ALAT, BIL totale) et une survenue de nécrose hépatocytaire.

Dans l'étude de cancérogenèse chez le rat d'une durée de 24 mois, aucune atteinte hépatique n'a été observée pour des doses de catéchines de l'ordre de 2000 mg/kg/j.

Certaines études animales ont pu mettre en évidence la survenue d'effets toxiques extra-hépatiques. C'est ainsi qu'une étude réalisée selon les bonnes pratiques de laboratoires (BPL) met

en évidence des effets au niveau de l'épithélium olfactif (rat et souris) se traduisant par des inflammations et des atrophies de cet épithélium (Chan et al. 2010). Des baisses de poids du thymus, de la rate avec atrophie (présence de pigments de lipofuschine) ont été rapportées chez le rat et chez la souris avec quelques cas de nécrose. Des atteintes des ganglions mésentériques (avec atrophie) ont également été observées chez la souris (Chan et al. 2010). De rares cas de fonctions altérées de la thyroïde (baisse de la thyroxine peroxydase, des T3 et T4, et élévation compensatoire de la TSH) sont également rapportés chez le rat (Chandra et al. 2010) ainsi que des baisses de poids testiculaire, probablement en rapport avec une possible inhibition de la production de testostérone montrée *in vitro*.

De toutes ces études, chez l'animal, il en ressort des NOAELs très disparates de 45 mg/kg/j à 1250 mg/kg/j chez le rat (Wang et al. 2010) jusqu'à l'absence de NOAEL chez la souris (Chan et al. 2010) et chez le chien à jeun.

L'Efsa adopte une DJA de 0,5 mg/kg/j d'EGCG sur la base d'une NOAEL de 50 mg/kg/j après application d'un facteur de sécurité de 100 (EFSA-ESCO et al. 2009).

- Chez l'Homme, les quelques études épidémiologiques ne rapportent pas d'effet indésirable notable lié peut-être à une durée d'observation trop courte et aux faibles effectifs mis en jeu. Cependant, un certain nombre d'effets indésirables a été noté depuis plus d'une dizaine d'années. Certains sont jugés avec une causalité « possible », d'autres avec une causalité « probable ». Quelques cas d'effets graves ont été rapportés parmi les gros consommateurs de préparations à base de thé vert.

Diverses atteintes sont observées : digestives, neurologiques et cardiovasculaires, en rapport avec la présence de caféine, et hépatiques. Les effets jugés les plus graves sont les effets hépatiques. Certains médicaments, préparations ou compléments alimentaires, ont dû être retirés du marché. L'hépatotoxicité peut être qualifiée de cytolytique (60% des cas), cholestatique (20%) ou mixte (20%). L'imputabilité est souvent sujette à discussion en raison de la méconnaissance précise de la composition, de l'insuffisance de données (dosages, quantités ingérées et multiplicité de produits associés), rendant difficile la définition d'un profil particulier de toxicité.

L'influence du jeûne sur les concentrations plasmatiques des diverses catéchines montrée de manière très significative chez le chien trouve également une répercussion chez le consommateur de thé vert. En cas de prise à jeun de l'EGCG, les concentrations maximales peuvent être augmentées d'un facteur 5 par rapport à une même dose absorbée en présence d'aliments (Chow et al. 2005).

La survenue d'interactions avec d'autres constituants (compléments alimentaires, médicaments, etc.) sur la biodisponibilité des catéchines du thé vert a été observée. C'est ainsi qu'un certain nombre de médicaments (fexofénadine, midazolam, buspirone, dextrométhorphan, etc.) peuvent présenter des concentrations plasmatiques plus élevées avec des conséquences significatives en terme d'activité thérapeutique (Colalto 2010). Il s'agit de médicaments métabolisés par le CYP 3A4 qui pourraient au niveau des microsomes intestinaux être partiellement inhibés par les catéchines du thé vert.

Outre la présence dominante des catéchines dans le thé vert, les autres constituants identifiés semblent jouer un rôle très mineur.

Il existe peu de publications sur la toxicité de la théanine. Cependant, les rares données disponibles montrent que cet acide aminé joue un rôle dans le métabolisme du glutamate en augmentant les concentrations hépatiques en glutamate chez la souris avec pour conséquence une élévation du taux de glutathion circulant. Une étude de 13 semaines chez le rat n'indique aucun effet indésirable jusqu'à la dose de 4000 mg/kg/j.

Les monographies sur le thé vert fixent un seuil de caféine à ne pas dépasser. Il est certain que cette dernière peut exercer ses effets pharmacologiques, se traduisant par une excitation du système nerveux central, mais en aucun cas la présence de cette molécule ne peut être rendue responsable des effets indésirables rapportés (pharmacopée française, 2010).

Considérant la toxicologie du fluor, compte tenu du contenu présent dans une infusion, il n'y a pas de raison que cet élément puisse jouer un rôle dans les effets indésirables attribués aux extraits de thé vert (Cao et al. 2003; Hallanger Johnson et al. 2007; Whyte et al. 2005; Whyte et al. 2008).

Question 2 : Quelles sont les études requises pour lever ces incertitudes ?

▪ De nombreuses études sont manquantes du point de vue de la phytochimie, de la disponibilité et de l'évaluation de la toxicité.

Le comité considère qu'une étude comparative de la composition (teneurs en catéchols, en saponines, et interactions possibles) d'une infusion traditionnelle et d'une infusion instantanée est nécessaire. Il souligne également la nécessité d'une étude comparative de la disponibilité des catéchols purs, et des dérivés d'oxydation (dont des formes quinoniques), par voie orale et avec diverses matrices. De même, il est important de mieux comprendre les transformations des catéchols dans le tube digestif ; la biodisponibilité de ces composés générés chez l'Homme et de leurs complexes possibles avec les bases xanthiques.

▪ Dans toute recherche d'une toxicité, il est important de pouvoir situer l'espèce animale étudiée quant à sa représentativité vis-à-vis de l'Homme. Des études de métabolisme *in vitro* ont été réalisées. Trois espèces ont été retenues dans le cadre des études de toxicité : souris, rat et chien. Des données métaboliques sont disponibles uniquement sur microsomes et aucune donnée métabolique n'est disponible chez le chien.

Le comité considère qu'il est nécessaire de réaliser une étude in vitro sur les microsomes et les hépatocytes (souris, rat, chien et Homme) afin de pouvoir comparer les différents métabolismes et ainsi valider l'espèce animale qui serait utilisée en toxicologie comme étant la plus représentative de l'Homme.

▪ Les effets indésirables rapportés pouvant résulter d'une prise concomitante de médicaments ou d'autres plantes ou compléments alimentaires ; il importe de disposer de données sur un possible pouvoir inducteur et/ou inhibiteur des catéchines. Des données sont disponibles mais elles sont très disparates, montrant que les catéchines peuvent moduler l'activité de certaines enzymes du métabolisme. Les variations importantes d'AUC (aire sous la courbe) de ces activités observées après une prise concomitante de thé vert et de certains médicaments restent pour l'instant mal explicitées.

Le comité considère qu'une étude menée chez l'animal permettrait de confirmer ou d'infirmer l'existence d'un pouvoir inducteur ou inhibiteur des catéchines sur les cytochromes et de situer leur seuil potentiel d'activité par rapport aux doses auxquelles le fort consommateur de thé vert peut être exposé.

▪ La survenue d'une hépatotoxicité par réaction immuno-allergique ne peut être exclue. En effet, certaines études animales ont montré des signaux d'alerte sur des organes lymphoïdes (thymus et rate). Des liaisons covalentes à certaines protéines (cystéine) ont été rapportées. Aucune détermination des paramètres immunologiques n'a été réalisée dans les différentes études analysées.

Le comité considère qu'une étude sub-chronique chez l'Homme comportant l'évaluation de paramètres comme la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (IL-1, TNF- α) par les cellules de Küpffer, l'activité des cellules NK, la détermination des IgG et des lymphocytes T, pourrait constituer un élément de réflexion, tout en sachant que dans ce domaine, le modèle animal est assez peu prédictif de ce qui peut être observé chez l'Homme.

▪ Les réactions de type II (conjugaisons et méthylation) jouent un rôle important dans le métabolisme des catéchines et tout particulièrement chez l'Homme. Quelques études récentes montrent des différences individuelles importantes sur la biodisponibilité des catéchines en fonction du polymorphisme génétique des iso-enzymes impliquées (COMT).

Le comité considère que des études portant sur la localisation tissulaire (foie, intestin) précise de ces iso-enzymes COMT et UGT, et l'influence de leur polymorphisme sur l'absorption des diverses catéchines sont nécessaires afin d'avoir une meilleure approche des prédispositions individuelles observées chez les forts consommateurs de thé vert.

Question 3 : Quelles sont les conditions requises pour garantir la sécurité d'emploi de préparations à base de thé vert dans les compléments alimentaires ?

▪ **Au niveau de l'enregistrement du dossier**

Dans le cas du thé vert, il paraît incontournable de refuser tout dossier dont la composition qualitative et quantitative ne correspond pas à ce qui est déclaré, dont la qualité pharmaceutique n'est pas démontrée et dont les mentions d'étiquetage ne sont pas jugées assez rigoureuses notamment sur le dosage, la posologie et la durée de consommation. Le problème de la source de production de la préparation se trouve également posé et plus particulièrement les achats sur Internet qui ne peuvent en aucun cas apporter les garanties requises. Toutes les demandes relatives aux allégations de santé doivent être faites dans le cadre du règlement 1924/2006 (EFSA 2010a; EFSA 2010b; EFSA 2011).

La feuille de thé vert fait l'objet d'une monographie à la Pharmacopée française et à Santé Canada ainsi qu'à la Pharmacopée des Etats-Unis (2009). Cette dernière a décidé de rétrograder le classement des extraits de thé vert de la classe 1 (absence de risques sérieux pour la santé) à la classe 2 obligeant de préciser un message d'alerte sur l'étiquette. Il n'existe pas de monographie à l'EMA. La FDA a accordé un statut GRAS aux catéchines de thé vert en 2008.

▪ **Au niveau du consommateur**

Les préparations à base de thé vert disponibles sur le marché présentent dans la plupart des cas des compositions insuffisamment caractérisées, très variables selon les lots et les origines géographiques.

Des mesures de prévention devraient être adoptées par les forts consommateurs :

- limiter ses achats aux seules préparations autorisées (extraits aqueux) ;
- respecter les doses recommandées. Les risques en cas de surdosage devraient être mentionnés sur l'étiquetage ;
- éviter toute prise de médicament ou d'autres compléments alimentaires sans un avis médical ;

Des études ont confirmé qu'à des doses excédant la DJA, les catéchols, et principalement l'EGCG sont hépatotoxiques (Chan et al. 2010; Galati et al. 2006). Il est important de raisonner en apport journalier d'EGCG qui devrait être limité à la dose journalière admissible de 0,5 mg/kg/j (EFSA-ESCO et al. 2009). Cette valeur pourrait déjà être dépassée avec une seule infusette moderne de 1,5 g et en une seule prise (consommation du 1^{er} infusat), et à plus forte raison avec des extraits.

Question 4 : Quelles sont les conditions requises pour garantir la sécurité d'emploi de préparations à base de thé vert dans les autres matrices alimentaires ou en tant que denrée alimentaire (commercialisée sous forme d'infusion, par exemple) ?

Les infusions constituent probablement la forme la plus sûre à condition de considérer les apports journaliers en EGCG par rapport à l'usage traditionnel ou d'en fixer une limite d'apport à 0,5 mg/kg/j.

La consommation pendant plusieurs mois de 4-6 tasses par jour (Rohde et al. 2011) peut entraîner des effets néfastes chez certains sujets, en raison de polymorphismes génétiques. Néanmoins, l'EGCG ne serait pas seul à l'origine de ces effets car au regard des données de biodisponibilité, il ne se trouve qu'en pourcentage infime et la molécule réellement toxique pourrait en être un dérivé d'oxydation tels que des quinones réactives ou des complexes d'addition, pouvant aussi conduire à des composants allergisants ou à d'autres composants non connus.

L'infusion apporte, par ses caractères organoleptiques, un plaisir gustatif que n'ont pas les formes enrobées ou incorporées dans des matrices inertes. L'étiquetage devrait mentionner que l'infusion ne doit pas être consommée à jeun, et devrait indiquer une limitation du nombre de prises/jour en fonction du taux en EGCG.

Les formes autres que les infusions ne sont acceptables qu'à condition de n'utiliser que des extraits à l'eau, voire à l'alcool, mais en y indiquant de la même manière le taux du traceur EGCG et en justifiant leur apport journalier par rapport à la consommation traditionnelle.

L'usage de doses excessives dans des régimes restrictifs pour des cures d'amaigrissement avec de multiples consommations journalières effectuées en dehors des repas est à proscrire quelles que soient les formes de présentations (infusions ou compléments) car il conduit à :

- dépasser la dose de 0,5 mg/kg/j d'EGCG ;
- consommer le thé vert dans une situation qui augmente les risques de toxicité.

3.6. Conclusions du CES

La feuille de thé vert renferme plusieurs groupes de dérivés phénoliques solubles dans des extraits alcooliques mais également dans l'eau chaude (infusion), qui se retrouvent dans des extraits aqueux ou hydroalcooliques secs. L'absorption de poudre de thé par le biais de compléments alimentaires revient à absorber potentiellement tous les composés qui y sont résorbables, y compris les plus lipophiles.

Un nombre considérable d'études a été mené sur les extraits de thé vert. Il est extrêmement difficile de faire une synthèse de l'ensemble des résultats tant ils sont disparates, voire contradictoires, en raison d'approches méthodologiques, très souvent différentes. Ces études ont été réalisées en grande partie chez le rat alors que la souris semble être plus proche de l'Homme du point de vue de la cinétique de ces extraits de thé vert.

Sur les modèles *in vitro/in vivo*, la toxicité hépatique peut être considérée comme assez faible mais plus marquée chez la souris que chez le rat. Les cas cliniques, signalés au dispositif de nutrivigilance, imputés aux extraits de thé vert sont rares au regard du nombre de consommateurs de produits à base de thé vert. Il ne s'agit donc probablement pas d'une toxicité hépatique directe liée à la présence d'une catéchine particulière ou de métabolites réactifs. Plus probablement, d'autres facteurs peuvent être avancés :

- les modifications physico-chimiques des extraits (stabilité, épimérisation), et les réactions individuelles ;
- un phénotype enzymatique spécifique pour lequel de grandes variabilités individuelles sont observées ;
- une réaction fortuite d'origine immuno-allergique ;
- un état pathologique temporaire et individuel ;
- une prise à jeun en état de sous-alimentation ;
- la prise associée d'autres molécules (contenues dans des médicaments ou les compléments alimentaires) pouvant interagir.

Toutefois, compte tenu du dépassement possible de la DJA (une infusette de 1,5 g peut faire dépasser la DJA d'EGCG de 0,5 mg/kg/j), le CES considère qu'il est nécessaire d'obtenir des informations complémentaires afin de se prononcer sur le risque éventuel pour les consommateurs. En effet, en raison de l'insuffisance des données de teneurs en EGCG, ainsi que de la grande variabilité possible selon la nature des thés utilisés, il n'est pas possible de traduire cette DJA en recommandation de consommation maximale ou en restrictions commerciales.

Le CES recommande donc pour les thés verts destinés à être infusés : la réalisation d'un plan d'échantillonnage des produits disponibles sur le marché suivi des dosages de l'EGCG dans les conditions usuelles de préparation, en faisant varier les paramètres susceptibles d'influencer l'extraction (température de l'eau, temps d'infusion, teneurs dans le 1^{er} infusat et dans le 2^{ème} infusat). Ces données de dosage actualisées permettront de documenter des doses maximales d'apport. Concernant les compléments alimentaires (ou les poudres), le CES recommande que seuls soient mis sur le marché, ceux à base d'extraits aqueux de feuilles dont la posologie (ou le mode d'utilisation) proposée ne conduit pas à un dépassement de la DJA.

Le CES conclut qu'un respect strict de la réglementation d'autorisation des préparations à base de thé vert ainsi qu'une révision complète des allégations de santé non vérifiées scientifiquement qui sont attribuées à cette plante devraient permettre de réduire le risque

d'apparition des cas rares d'effets indésirables associés aux dérives de consommation de cette boisson très populaire par rapport à la tradition asiatique.

4. CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS DE L'AGENCE

L'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail adopte les conclusions du CES « Nutrition humaine » et souligne les objectifs fixés en matière d'étiquetage des préparations de thé vert. Celui-ci doit permettre d'assurer le respect de la DJA de l'EGCG (gallate d'épigallocatechol) en précisant par exemple :

- une limitation du nombre de prises par jour en fonction du taux d'EGCG ;
- l'indication qu'il convient de ne pas cumuler la consommation de plusieurs préparations à base de thé vert.

L'Agence rappelle que l'EGCG est le composé phénolique majoritaire dans le thé vert suspecté d'être à l'origine d'effets hépatotoxiques. En retenant les valeurs les plus élevées de la littérature, la DJA de ce composé peut être dépassée avec des préparations de thé vert dans certaines conditions de préparation ou d'utilisation usuelles.

Néanmoins, l'Agence souligne que :

- les cas cliniques, signalés au dispositif de nutrivigilance, imputés aux extraits de thé vert sont rares au regard du nombre élevé de consommateurs de produits à base de thé vert ;
- les résultats de dosages d'EGCG sont parcellaires et d'une grande variabilité, notamment selon les origines et les formes de préparations de thé vert.

Ainsi, l'agence estime indispensable de disposer de données complémentaires, notamment des résultats de dosage d'EGCG actualisés dans différents produits disponibles sur le marché français et selon différents modes d'utilisation afin d'être en mesure de mieux caractériser l'exposition des consommateurs.

L'Agence se saisira de ces nouvelles données afin d'affiner cette première analyse, de caractériser les éventuels risques sanitaires liés à certains modes d'utilisation et d'émettre, le cas échéant, des recommandations plus précises.

Le directeur général

Marc Mortureux

MOTS-CLES

Thé, catéchols, polyphénols, infusion, foie.

BIBLIOGRAPHIE

- Astill C, Birch MR, Dacombe C, Humphrey PG, Martin PT (2001) Factors affecting the caffeine and polyphenol contents of black and green tea infusions. *J Agric Food Chem* 49(11), 5340-7.
- Bruneton J (2009) 'Plantes médicinales.' 4ème edn. (Tec & Doc: Paris)
- Bun SS, Bun H, Guedon D, Rosier C, Ollivier E (2006) Effect of green tea extracts on liver functions in Wistar rats. *Food Chem Toxicol* 44(7), 1108-13.
- Cao J, Zhao Y, Liu J, Xirao R, Danzeng S, Daji D, Yan Y (2003) Brick tea fluoride as a main source of adult fluorosis. *Food Chem Toxicol* 41(4), 535-42.
- Chan PC, Ramot Y, Malarkey DE, Blackshear P, Kissling GE, Travlos G, Nyska A (2010) Fourteen-week toxicity study of green tea extract in rats and mice. *Toxicol Pathol* 38(7), 1070-84.
- Chandra AK, De N (2010) Goitrogenic/antithyroidal potential of green tea extract in relation to catechin in rats. *Food Chem Toxicol* 48(8-9), 2304-11.
- Chow HH, Hakim IA, Vining DR, Crowell JA, Ranger-Moore J, Chew WM, Celaya CA, Rodney SR, Hara Y, Alberts DS (2005) Effects of dosing condition on the oral bioavailability of green tea catechins after single-dose administration of Polyphenon E in healthy individuals. *Clin Cancer Res* 11(12), 4627-33.
- Colalto C (2010) Herbal interactions on absorption of drugs: Mechanisms of action and clinical risk assessment. *Pharmacol Res* 62(3), 207-27.
- EFSA-ESCO, Scientific Cooperation report (2009) Advice on the EFSA guidance document for the safety assessment of botanicals and botanical preparations intended for use as food supplements based on real case studies. *EFSA Journal* 7(9), 280.
- EFSA, Panel on Dietetic Products Nutrition and Allergies (NDA) (2010a) Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to *Camellia sinensis* (L.) Kuntze (tea), including catechins from green tea, and contribution to the maintenance or achievement of a normal body weight (ID 1107, 1112, 1544, 2716), increased betaoxidation of fatty acids leading to a reduction in body fat mass (ID 1123, 1124, 3698), and maintenance of normal blood glucose concentrations (ID 1115, 1545) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006. *EFSA Journal* 8(10), 1791.
- EFSA, Panel on Dietetic Products Nutrition and Allergies (NDA) (2010b) Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to *Camellia sinensis* (L.) Kuntze (tea), including catechins in green tea and tannins in black tea, and protection of DNA, proteins and lipids from oxidative damage (ID 1103, 1276, 1311, 1708, 2664), reduction of acid production in dental plaque (ID 1105, 1111), maintenance of bone (ID 1109), decreasing potentially pathogenic intestinal microorganisms (ID 1116), maintenance of vision (ID 1280), maintenance of normal blood pressure (ID 1546) and maintenance of normal blood cholesterol concentrations (ID 1113, 1114) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No1924/2006. *EFSA Journal* 8(2), 1463.
- EFSA, Panel on Dietetic Products Nutrition and Allergies (NDA) (2011) Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to *Camellia sinensis* (L.) Kuntze (tea), including catechins in green tea, and improvement of endothelium-dependent vasodilation (ID 1106, 1310), maintenance of normal blood pressure (ID 1310, 2657), maintenance of normal blood glucose concentrations (ID 1108), maintenance of normal blood LDL-cholesterol concentrations (ID 2640), protection of the skin from UV-induced (including photo-oxidative) damage (ID 1110, 1119), protection of DNA from oxidative damage (ID 1120, 1121), protection of lipids from oxidative damage (ID 1275), contribution to normal cognitive function (ID 1117, 2812), "cardiovascular system" (ID 2814), "invigoration of the body" (ID 1274, 3280), decreasing potentially pathogenic gastro-intestinal microorganisms (ID 1118), "immune health" (ID 1273) and "mouth" (ID 2813) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006. *EFSA Journal* 9(4), 2055.

- El Daly AAA (2011) Effect of Green Tea Extract on the Rat Liver; Histoarchitectural, Histochemical and Ultrastructural Studies. *Journal of American Science* 7(5), 65-73.
- Food and Drug Administration (2004) Green Tea and Reduced Risk of Cancer Health Claim.
- Galati G, Lin A, Sultan AM, O'Brien PJ (2006) Cellular and in vivo hepatotoxicity caused by green tea phenolic acids and catechins. *Free Radic Biol Med* 40(4), 570-80.
- Hallanger Johnson JE, Kearns AE, Doran PM, Khoo TK, Wermers RA (2007) Fluoride-related bone disease associated with habitual tea consumption. *Mayo Clin Proc* 82(6), 719-24.
- Inoue-Choi M, Yuan JM, Yang CS, Van Den Berg DJ, Lee MJ, Gao YT, Yu MC (2010) Genetic Association Between the COMT Genotype and Urinary Levels of Tea Polyphenols and Their Metabolites among Daily Green Tea Drinkers. *Int J Mol Epidemiol Genet* 1(2), 114-123.
- Kapetanovic IM, Crowell JA, Krishnaraj R, Zakharov A, Lindeblad M, Lyubimov A (2009) Exposure and toxicity of green tea polyphenols in fasted and non-fasted dogs. *Toxicology* 260(1-3), 28-36.
- Khokhar S, Venema D, Hollman PC, Dekker M, Jongen W (1997) A RP-HPLC method for the determination of tea catechins. *Cancer Lett* 114(1-2), 171-2.
- Lambert JD, Kennett MJ, Sang S, Reuhl KR, Ju J, Yang CS (2010) Hepatotoxicity of high oral dose (-)-epigallocatechin-3-gallate in mice. *Food Chem Toxicol* 48(1), 409-16.
- Lambert JD, Sang S, Yang CS (2007) Possible controversy over dietary polyphenols: benefits vs risks. *Chem Res Toxicol* 20(4), 583-5.
- Liu Y, Flynn TJ, Ferguson MS, Hoagland EM, Yu LL (2011) Effects of dietary phenolics and botanical extracts on hepatotoxicity-related endpoints in human and rat hepatoma cells and statistical models for prediction of hepatotoxicity. *Food Chem Toxicol* 49(8), 1820-7.
- Lu H, Meng X, Yang CS (2003) Enzymology of methylation of tea catechins and inhibition of catechol-O-methyltransferase by (-)-epigallocatechin gallate. *Drug Metab Dispos* 31(5), 572-9.
- Manning J, Roberts JC (2003) Analysis of catechin content of commercial green tea products. *J Herb Pharmacother* 3(3), 19-32.
- Miller RJ, Jackson KG, Dadd T, Nicol B, Dick JL, Mayes AE, Brown AL, Minihane AM (2011) A preliminary investigation of the impact of catechol-O-methyltransferase genotype on the absorption and metabolism of green tea catechins. In 'Eur J Nutr. ' 2011/03/30 edn.)
- Mohamed ME, Frye RF (2011) Inhibitory Effects of Commonly Used Herbal Extracts on UDP-Glucuronosyltransferase 1A4, 1A6, and 1A9 Enzyme Activities. *Drug Metab Dispos* 39(9), 1522-8.
- Renouf M, Redeuil K, Longet K, Marmet C, Dionisi F, Kussmann M, Williamson G, Nagy K (2011) Plasma pharmacokinetics of catechin metabolite 4'-O-Me-EGC in healthy humans. *Eur J Nutr.*
- Reto M, Figueira ME, Filipe HM, Almeida CM (2007) Chemical composition of green tea (*Camellia sinensis*) infusions commercialized in Portugal. *Plant Foods Hum Nutr* 62(4), 139-44.
- Rohde J, Jacobsen C, Kromann-Andersen H (2011) [Toxic hepatitis triggered by green tea]. *Ugeskr Laeger* 173(3), 205-6.
- Schantz M, Erk T, Richling E (2010) Metabolism of green tea catechins by the human small intestine. *Biotechnol J* 5(10), 1050-9.
- USDA (2007) Database for the flavonoid content of selected foods. *U.S. Department of Agriculture.*

Wang D, Xiao R, Hu X, Xu K, Hou Y, Zhong Y, Meng J, Fan B, Liu L (2010) Comparative safety evaluation of Chinese Pu-erh green tea extract and Pu-erh black tea extract in Wistar rats. *J Agric Food Chem* 58(2), 1350-8.

Whyte MP, Essmyer K, Gannon FH, Reinus WR (2005) Skeletal fluorosis and instant tea. *Am J Med* 118(1), 78-82.

Whyte MP, Totty WG, Lim VT, Whitford GM (2008) Skeletal fluorosis from instant tea. *J Bone Miner Res* 23(5), 759-69.

Yoshida M, Takahashi M, Inoue K, Nakae D, Nishikawa A (2011) Lack of chronic toxicity and carcinogenicity of dietary administrated catechin mixture in Wistar Hannover GALAS rats. *J Toxicol Sci* 36(3), 297-311.