

N° d'ordre : 4131



THÈSE

PRÉSENTÉE À

L'UNIVERSITÉ BORDEAUX 1

ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES

Par Olivier CALA

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR

SPÉCIALITÉ : CHIMIE-PHYSIQUE

APPROCHE MOLECULAIRE DE L'ASTRINGENCE PAR L'ETUDE DES
INTERACTIONS ENTRE LES TANINS DU VIN ET LES PROTEINES DE LA
SALIVE

Directeurs de recherche : Erick J. DUFOURC et Isabelle PIANET

Soutenue le : 07 décembre 2010

Devant la commission d'examen formée de :

Alain Milon	(Rapporteur)	Professeur de l'Université Paul Sabatier
Victor de Freitas	(Rapporteur)	Professeur de l'Université de Porto
Eric Fouquet	(Président)	Professeur de l'Université Bordeaux 1
Christian Roumestand	(Examineur)	Professeur de l'Université de Montpellier
Erick Joël Dufourc	(Directeur de thèse)	Directeur de recherche CNRS
Isabelle Pianet	(Directeur de thèse)	Ingénieur de recherche CNRS

à ma mère,

mon père, ma sœur

et mon épouse

Remerciements

Je tiens à remercier tout d'abord mes deux directeurs de thèse Isabelle Pianet et Erick Dufourc pour m'avoir permis de réaliser cette thèse sous leur responsabilité, de m'avoir fait confiance et de m'avoir donné les moyens, les conseils, le savoir pour effectuer trois années de thèse dans des conditions parfaites.

Je remercie le CIVB d'avoir permis cette thèse, merci monsieur Charlier pour nos échanges.

Je remercie aussi mon jury de thèse d'avoir accepté de juger mon travail, le professeur Victor De Freitas, le professeur Alain Milon, le professeur Christian Roumestand et le professeur Eric Fouquet.

Mes directeurs de thèse ont été plus que des chefs, je tiens à les remercier personnellement.

Isabelle, un grand merci pour tout, pour nos échanges autant scientifiques que personnels, j'ai vraiment apprécié nos discussions et nos aventures lors des congrès (même si j'ai perdu ma valise !) Tu as toujours été présente quand j'avais besoin d'un conseil, pour la rédaction du manuscrit. Merci pour les différents restos (d'ailleurs je t'en dois un, j'ai perdu notre pari qui restera entre nous...) et pour ta gentillesse. Merci pour tout.

Erick, un chef qui aura marqué mes débuts dans la recherche. Tu as su me faire confiance dans mon travail, toujours d'une grande efficacité, pour les corrections pour les conseils que tu donnes qui ont su me motiver et me donner cette envie de faire de la recherche. En dehors du labo, c'est la même chose, j'ai eu la chance de pouvoir jouer au squash avec toi, et là encore on voit qui est le chef. Mais honnêtement, je suis content (même si c'est rare) j'ai réussi à te battre ! Une chose qui va me manquer et que je ne pense pas retrouver ailleurs, tu as acheté une table de ping-pong à tes étudiants ...

Je remercie toutes les personnes de cette équipe et une personne que j'apprécie beaucoup, c'est Axelle. Tu es géniale, « mon ingénieure préférée ». Ce que j'ai appris en RMN je te le dois en parti, toujours de bonne humeur, toujours là quand une séquence ne marche pas, toujours là pour expliquer les choses d'une manière super pédagogique. C'est très agréable d'être dans un labo avec des personnes souriantes, je suis content d'avoir partagé mes 3 années de thèse avec toi.

Cécile, merci également pour ta gentillesse, tu étais là avant moi, partis avant que j'arrive et revenu mais c'est moi qui pars. On a donc pas pu partagé beaucoup de chose mais le peu que j'ai vu (l'école EBSA où tu faisais la folle !!! J'ai des photos à l'appui) me permette de dire qu'on se serait bien entendu.

Benoît, tu as pu me faire beaucoup rire, tu me paies un café ? Ah non, t'as pas de monnaie, comme d'habitude. Merci pour nos discussions. Julie, qui est nouvelle dans le groupe tu vas travailler sur les tanins, tu vas voir c'est cool. Merci pour ta sympathie.

Les étudiants, Vanessa, je suis content de t'avoir connu. Bravo pour la thèse, finalement on finit en même temps mais ça aura permis de partager un peu plus. J'espère que la suite sera comme tu le désires, avec François, le boulot et

Jeannot, tu es exceptionnel, mon voisin de bureau, l'humeur changeante, mais tu m'auras fait rire entre notre séjour en Corse, au labo avec le coupé-décalé, le curling, le ping-pong, la sieste (non c'est pas des vacances). J'ai un petit conseil que je t'ai déjà donné, ne gâches pas tes capacités, d'après le pote Olivier, Chapitre I versé 66.

Les nouveaux merci Aurélien qui va reprendre la synthèse des tanins, tu verras c'est rigolo. Nicole que je viens juste de connaître et Marie, c'est bizarre, tu ne fais pas parti de l'équipe mais je t'ai vu souvent ces derniers temps. Camille, je te confie mon sujet (enfin moi j'ai rien choisi) continu et fais plein de publis sans oublier de m'inclure dans les auteurs. Denis, le glandeur de service, un petit apéro ? J'espère que tu pourras continuer en thèse, ça à l'air bien parti, bon courage mec.

Je veux aussi remercier les anciens, Sèb, qui m'a initié à linux, Frantz avec qui j'ai pu commencer le squash, et vania. Mais surtout merci à Anna, une fille géniale, toujours prête à donner un coup de main, toujours prête à faire n'importe quoi, ping-pong, curling, bombe, expérience de lévitation ... je suis sûr qu'on y arrivera. Merci pour la visite de Munich, dommage ce n'était pas en octobre. Et enfin Christian avec qui on a pu rigoler durant sa dernière année de thèse, le monsieur copier-coller. Au final on est à deux portes de distances dans nos nouvelles équipes mais plus à Bordeaux, à Toulouse donc on va pouvoir continuer, il faut juste qu'on arrive à récupérer la table de ping-pong à Erick, ils en ont plus besoin maintenant, je pense qu'on peut la prendre !!!

Les non RMNistes, et oui personne n'est parfait, Rémi, un ami qui va me manquer, toutes nos discussions, les repas au RU, les soirées, les choses qu'on fait avec un pote, merci vraiment beaucoup.

Tony, c'est la même, sauf qu'on a partagé un truc en plus le « string Borat ».

Céline, toujours gentille, attentionnée prête à me border avant d'aller au lit, merci la miss, j'attends avec impatience le faire-part de mariage. Trois amis sur qui je peux compter et qui peuvent compter sur moi. J'étais un peu chez moi en étant chez eux (et c'est pas une métaphore), promis je vais plus à l'hôtel. Passez à la maison quand vous voulez (hein Céline).

Marine, merci également, tu es unique, on peut parler de tout, rien ne te choque, reste comme ça et pareil j'attends les faireparts de mariage et de naissance.

Marion (Franklin), toujours rigolote et de bonne humeur. Merci pour tout.

Mélanie, l'autre miss, on est nait au même endroit, à quelques mois de décalage, on s'est connu 25 ans après à l'IECB, je t'apprécie beaucoup et j'attends de te revoir.

Xavier, un très bon pote, pareil il faut qu'on arrive à se revoir histoire que je puisse enfin te battre au squash.

Merci à toute la communauté IECBienne. Merci à l'ensemble du CESAMO (Christiane, Claire, Noël, Jean-Michel, Christelle). Un grand merci à Sandy pour m'avoir coaché pour la synthèse des tanins.

Merci à Cameron, Samir, Sarah et Yoan, Claude Manigand et Bernard Gallois avec qui j'ai eu l'occasion de travailler. Un grand merci à Michel Laguerre pour la modélisation moléculaire et pas que, toujours disponible, merci. Merci à Patricia Dolor, une excellente gestionnaire ça aide en thèse.

Bon ma thèse n'a pas été que des moments d'amusements et de détente mais j'ai vraiment aimé mes trois années passées à Bordeaux.

Je remercie bien évidemment ma famille qui m'a toujours encouragée, mon père qui a énormément fait pour moi et pas que pour la thèse. Ma mère que j'adore, qui me manque énormément et à qui je dédie cette thèse, je pense qu'elle aurait été fière. Ma sœur qui compte beaucoup pour moi. Pour finir je remercie mon épouse, Diane, qui me supporte au quotidien, qui m'encourage, merci pour tout ce que tu es.

- Abréviations –

µm : micromètre

Å : Angström (10^{-10} mètres)

aa : acide aminé

Ala : alanine

Arg : arginine

Asn : asparagine

Asp: acide aspartique

Bn : Benzyl

Boc : tert-Butoxycarbonyl

CMC : Concentration micellaire critique

COSY : Correlation spectroscopy

C-term : Carboxy-terminale

Cys : cystéine

Da : Dalton

DC : Dichroïsme circulaire

DCC : Dicyclocarbodiimide

DCM : Dichlorométhane

DDQ : 2,3-dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzophenone

DIEA : Diisopropylethylamine

DM : Dynamique moléculaire

DMF : N,N-diméthylformamide

DMSO : Diméthylsulfoxyde

EDT : Ethanedithiol

FID : Free induction decay

Fmoc : 9-Fluorenylmethoxycarbonyl

Gln : glutamine

Glu : acide glutamique

Gly : glycine

HBTU : 2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetraméthyluronium hexafluorophosphate

His : histidine

HOBt : 1-Hydroxybenzotriazole

Ile : isoleucine

J : Constante de couplage (en Hertz)

Leu : leucine

Lys : lysine

MALDI-TOF : Matrix assisted laser desorption/ionisation – Time of flight

Met : méthionine

MM : Modélisation moléculaire
mM : millimolaire
mn : minute
nm : nanomètre
NMP : N-méthylpyrrolidone
NOE : Nuclear Overhauser enhancement
NOESY : Nuclear Overhauser enhancement spectroscopy
N-ter : extension amino-terminale
Pbf: 2,2,4,6,7-pentaméthylidihydrobenzofuran-5-sulfonyl
Phe : phénylalanine
PRH : Protéine riche en histidine
Pro : proline
PRP : Protéine riche en proline
RMN : Résonance Magnétique Nucléaire
RMSD : Root mean squared deviation
ROESY : Rotating frame Overhauser enhancement spectroscopy
RP-HPLC : Chromatographie liquide à haute performance en phase inverse
Ser : serine
SM : Spectrométrie de masse
ta : température ambiante
TFA : Acide trifluoroacétique
TFE : Trifluoroethanol
THF : Tétrahydrofurane
Thr : thréonine
TOCSY : Total correlation spectroscopy
Trp : tryptophane
TSP : Acide 3-trimethylsilyl-propionique-2,2,3,3-d₄
Tyr : tyrosine
UV : Ultra violet
Val : valine
 $\Delta\delta$: Variation de déplacement chimique

AVANT PROPOS

Apparu il y a bien longtemps dans le berceau fertile du Proche-Orient, le vin a traversé les plus grandes civilisations des plus anciennes à nos jours. A travers le temps et les traditions, il incarne les différentes civilisations. La culture du vin s'est diffusée sur des milliers de kilomètres, jusqu'à nos côtes françaises, outre-Atlantique, et sur tous les continents. Le monde Entier produit, consomme du vin. Dans le miroir du vin, les civilisations reflètent des images multiples. L'amitié, la convivialité, le partage, des religions aux systèmes sociaux, du rapport à la nature ou au corps, rien n'y échappe. Le vin fait parler autant que rêver. D'après Salvador Dalí, « Qui sait déguster ne boit plus jamais de vin mais goûte des secrets ».

La dégustation est faite de subtilités et de modération et aiguise presque tous les sens ; la vue, l'odorat, le goût et le toucher. En fait, déguster c'est observer, analyser et comprendre le vin. La couleur, les arômes, les saveurs et textures racontent une histoire. La dégustation c'est aussi le plaisir de reconnaître le style du vin, quelquefois son millésime ou sa provenance. De ce fait, la dégustation devient alors un voyage dans notre mémoire, dans le temps et dans l'histoire à travers une note de poésie comme peuvent le souligner certaines descriptions :

« Sublime toucher de bouche, tannins soyeux, de la pureté et de la profondeur », « Une bouche dense, charnue et élégante sur des tannins fins et fruités, avec une belle allonge ».

Déguster, c'est goûter avec attention un produit dont on veut apprécier la qualité ; c'est le soumettre à nos sens, en particulier ceux du goût et de l'odorat ; c'est essayer de le connaître en recherchant ses différents défauts et ses différentes qualités et en les exprimant.

(M. Ribéreau-Gayon et Emile Peynaud)

Production scientifique

Publications

- 1- Pianet I., Cala O., Fabre S., Dufourc E.J., Fouquet E., Laguerre M. *Planta Medica*, **76**, 1165 (2010)
- 2- Cala O., Pinaud N., Simon C., Fouquet E., Laguerre M., Dufourc E.J., Pianet I. *FASEB journal*, **24**, 4281-4290 (2010)
- 3- Cala O., Fabre S., Fouquet E., Dufourc E.J., Pianet I. *C. R. chimie*, **3**, 449-452 (2010)
- 4- Gargouri M., Manigand C., Mauge C., Granier T., Langlois d'Estaintot B., Cala O., Pianet I., Bathany K., Chaudiere J., Gallois B. *Acta Crystallographica section D*, **52**, 161-164 (2008)

Communications orales :

- Communication en anglais lors de Workshop avec Banafshe Larijani, Group leader du laboratoire de biophysique cellulaire à l'Institut de la recherche sur le cancer de Londres, février 2010 Bordeaux France « ***Physico-chemistry study of tannin-saliva proteins interaction and wine Astringency*** ».
- Communication en anglais lors de Workshop avec le professeur J. H. Davis de l'Université de Guelph, Canada, septembre 2009, Bordeaux France « ***Gain understanding of wine astringency by NMR: study of tannin-saliva proteins interaction*** ».
- 2nd conférence du réseau RMN Aquitain, avril 2009, Bordeaux France « ***Gain understanding of wine astringency by NMR : study of tannin-saliva proteins interaction*** ».
- XXIIème conférence du GERM en mars 2009, Fréjus France « ***NMR of human saliva protein/wine tannins complexes towards deciphering astringency with physical-chemistry tools*** ».
- Journée de l'ISM (Institut des Sciences Moléculaire) janvier 2009, Bordeaux France. « ***Approche moléculaire de l'astringence par l'étude des interactions entre tannins et protéines de la salive*** ».

Communications par affiches :

- Euromar and 17th Ismar 2010, Florence, 4-9 juillet 2010, Italie « ***New findings in the understanding of the Red wine astringency mechanism by NMR tools*** »
- XXVIIème Conférences Internationale des Polyphenols (ICP 2008), Salamanque, 8-11 juillet 2008, Espagne. « ***Tannins-saliva proteins recognition monitored by dynamic and structural NMR*** ».
- Première "Journée Jeunes Chercheurs" mai 2008, et 1ère conférence du réseau RMN aquitain mars 2008, Bordeaux France « ***Astringency: study of interaction between salivary proteins and tannins*** ».

SOMMAIRE

Liste des abréviations.....	I
------------------------------------	----------

Production scientifique.....	III
-------------------------------------	------------

Chapitre I

Introduction

L'astringence, une sensation gouvernée par les interactions tanins – protéines

A. De la dégustation du vin rouge à la sensation d'astringence.....	3
B. Les tanins.....	6
a) Structure chimique des tanins.....	6
i. Les tanins hydrolysables.....	6
ii. Les tanins condensés	7
b) Structure tridimensionnelle des procyanidines	12
c) Propriétés physicochimiques des Procyanidines	13
d) Propriétés biologiques	14
C. Les protéines de la salive.....	15
a) Généralités	15
b) Les PRPs.....	16
c) Les histatines.....	19
D. Les interactions tanins-protéines salivaires.....	21
E. Situation du sujet et Objectifs.....	25

Chapitre II Synthèse des peptides et des procyanidines

A.	Synthèse des procyanidines.....	31
B.	Synthèse peptidique.....	33
a)	Principe de la synthèse peptidique en phase solide	34
b)	Purification des peptides et contrôle de leur pureté.....	36

Chapitre III Méthodes
--

A.	Dichroïsme circulaire.....	47
a)	Structure particulière des peptides/protéines riches en proline.....	49
B.	Expériences RMN.....	51
a)	Stratégie employée pour la caractérisation de structure tridimensionnelle.....	52
i.	Identification des systèmes de spins.....	53
ii.	Détermination de la structure primaire et des contraintes de distance	54
b)	Stratégie employée dans l'étude des interactions tanins protéines salivaires	55
i.	Expériences STD.....	55
ii.	Expériences DOSY.....	58
iii.	Analyse des variations de déplacements chimiques.....	60
C.	Modélisation Moléculaire.....	60

Chapitre IV

Étude de l'interaction entre le peptide IB7₁₄ et différentes procyanidines

A.	Paramètres expérimentaux.....	66
a)	Paramètres RMN.....	66
b)	Paramètres de la dynamique moléculaire	67
c)	Paramètres du dichroïsme circulaire.....	68
B.	Résultats.....	69
a)	Dichroïsme circulaire	69
b)	RMN du peptide IB7 ₁₄	71
i.	Attribution des résonances protons.	71
c)	Attribution séquentielle du peptide.....	72
d)	Vers l'obtention de la structure 3D.....	74
C.	RMN des complexes tannin- peptide IB7₁₄	75
a)	Mise en évidence des sites de fixation sur le peptide	75
b)	Interaction du point de vue du tanin	76
c)	Détermination des sites de fixation du tanin sur la protéine	78
D.	Analyse physico-chimique des interactions entre les procyanidines et IB7₁₄	80
a)	Analyse des déplacements chimiques.....	80
b)	Analyse du coefficient de diffusion.....	81
c)	Etude du processus d'agrégation	87
E.	Dynamique moléculaire.....	88
F.	Discussion	90
a)	Spécificité de l'interaction tanin-PRP.....	91
b)	Relation entre l'affinité pour le peptide et la structure tridimensionnelle des procyanidines.....	93
c)	Complexe tanin-protéine et sensation d'astringence.....	94
G.	Conclusion.....	94

Chapitre V

Étude de l'interaction entre le peptide IB9₃₇ et différentes procyanidines

A.	Analyse structurale du peptide IB9₃₇.....	97
a)	Dichroïsme circulaire	97
b)	RMN du proton : attribution des résonances des différents acides aminés d' IB9₃₇.....	99
c)	Attribution séquentielle du peptide IB9₃₇.....	102
d)	Vers l'obtention de la structure 3D.....	105
B.	Détermination des sites de fixations des tanins sur le peptide	107
C.	Analyse des interactions entre les procyanidines et IB9₃₇	108
a)	Analyse des variations de déplacements chimiques.....	108
b)	Analyse des variations du coefficient de diffusion	112
c)	Etude du processus d'agrégation	117
d)	Dynamique moléculaire	118
D.	Discussion.....	121
a)	Structure tridimensionnelle d'IB9₃₇.....	122
b)	Stœchiométrie et spécificité de l'interaction tanin-peptide IB9₃₇.....	122
c)	Effet de la longueur du peptide sur l'interaction tanin-peptide de la salive	122
d)	Formation des complexes et précipitation.....	123
e)	Structure tridimensionnelle du complexe.....	123
E.	Conclusion.....	123

Chapitre VI

Étude de l'interaction entre le peptide Histatine3 et la procyanidine B1

A.	Paramètres expérimentaux	128
a)	RMN	128
B.	Analyse structurale de l'Histatine 3	129
a)	Dichroïsme circulaire	129
b)	Attribution des protons du peptide Histatine 3	130
c)	Attribution séquentielle de l'Histatine 3.....	131
C.	Etude de l'interaction de l'Histatine et de la procyanidine B1	134
a)	Recherche des sites de fixation	134
b)	Analyse des variations de déplacement chimique.....	135
c)	Analyse du coefficient de diffusion	137
d)	Evaluation de l'agrégation du peptide.....	139
D.	Modélisation moléculaire	140
E.	Discussion	141
F.	Conclusion	142

Chapitre VII

Conclusion générale & perspectives

A.	Conclusion générale	145
B.	Perspectives.....	148

Référence bibliographique	153
---------------------------------	-----

ANNEXES

A.	Synthétiseur de peptide.....	167
B.	Spectrométrie de masse Maldi-Tof.....	174
C.	Dichroïsme circulaire1.....	76
D.	Modélisation moléculaire1.....	79
E.	RMN.....	184

Chapitre I
Introduction

A. De la dégustation du vin rouge à la sensation d'astringence

Lors de la dégustation d'un vin rouge, l'examen du vin se fait en plusieurs étapes. Premièrement, l'examen visuel, donnant des informations sur la brillance et sur la couleur, la robe du vin. Deuxièmement, l'examen olfactif permettant de rechercher les nuances aromatiques et les différentes odeurs qui se dégagent, et enfin l'examen gustatif qui permet de définir la structure du vin et son niveau de qualité. Les sensations gustatives et tactiles en bouche sont donc essentielles pour définir la qualité du vin.

Le vin est un milieu extrêmement complexe, contenant une multitude de composés de concentrations diverses. Nous retrouvons en majorité de l'eau à quasiment 80% et de l'éthanol de 10% à 15% (Taillandier 2005). Beaucoup de composés représentés en moindre proportion jouent cependant un rôle important sur la qualité des vins tels que les sucres, les acides, les tanins, les protéines ou autres composés volatiles.

Un vin est dit de qualité lorsqu'il présente une structure équilibrée. Trois facteurs clefs y contribuent (Blouin 2008) : l'alcool, l'acidité et la présence de tanins. En effet, la présence de tanin est un élément majeur déterminant la qualité des vins rouges, principalement dans le sud Ouest de la France en général et dans le bordelais en particulier où les cépages utilisés et le procédé de vinification donnent des vins pouvant atteindre des concentrations en tanins de 4 g par litre de vin.

En œnologie, les tanins sont très étudiés pour leurs propriétés physico-chimiques et organoleptiques. Ces molécules ont une forte capacité à fixer les protéines et d'autres polymères végétaux (polysaccharides) pour les « tanner », autrement dit les rendre plus stables. Lors du collage des vins rouges, des protéines comme l'albumine, la caséine ou la gélatine sont ajoutées pour précipiter les particules en suspension responsables du trouble. Ces protéines ont la particularité d'être riches en proline tout comme certaines protéines salivaires, les Protéines Riches en Prolines (PRPs). Ces protéines vont fixer ces particules du vin et notamment les tanins.

Les deux propriétés organoleptiques principales des tanins sont l'amertume et l'astringence. Ces deux propriétés, l'une gustative et l'autre tactile, peuvent être une marque de qualité lorsque la présence de tanins développe le corps et la souplesse d'un vin, on parle alors de « bons tanins », mais peuvent être un signe de défaut lorsque les tanins deviennent trop rugueux ou trop durs, on parle dans ce cas de « mauvais tanins ».

L'amertume est un goût, *sensu stricto*, car elle résulte de l'interaction spécifique de certaines molécules (et donc des tanins) avec des récepteurs localisés sur la langue. En plus de l'amertume, on connaît quatre autres goûts différents : le sucré, le salé, l'acide, et l'umami (Ikeda 2002; Lindemann

Chapitre I : Introduction

L'astringence, une sensation gouvernée par les interactions tanins – protéines

2002). Ces sensations résultent chacune d'entre elles de l'interaction de molécules sur des récepteurs cibles, dont la localisation fait débat. Alors qu'il était admis depuis longtemps qu'il existait des récepteurs propres à chaque goût, et chacun localisé sur une région bien définie de la langue, des études réalisées au cours la dernière décennie semblent montrer qu'il n'existerait qu'un seul type de récepteur du goût qui adapterait sa réponse en fonction de la molécule en interaction (Adler 2000; Chandrashekar 2006) (figure I-1a).

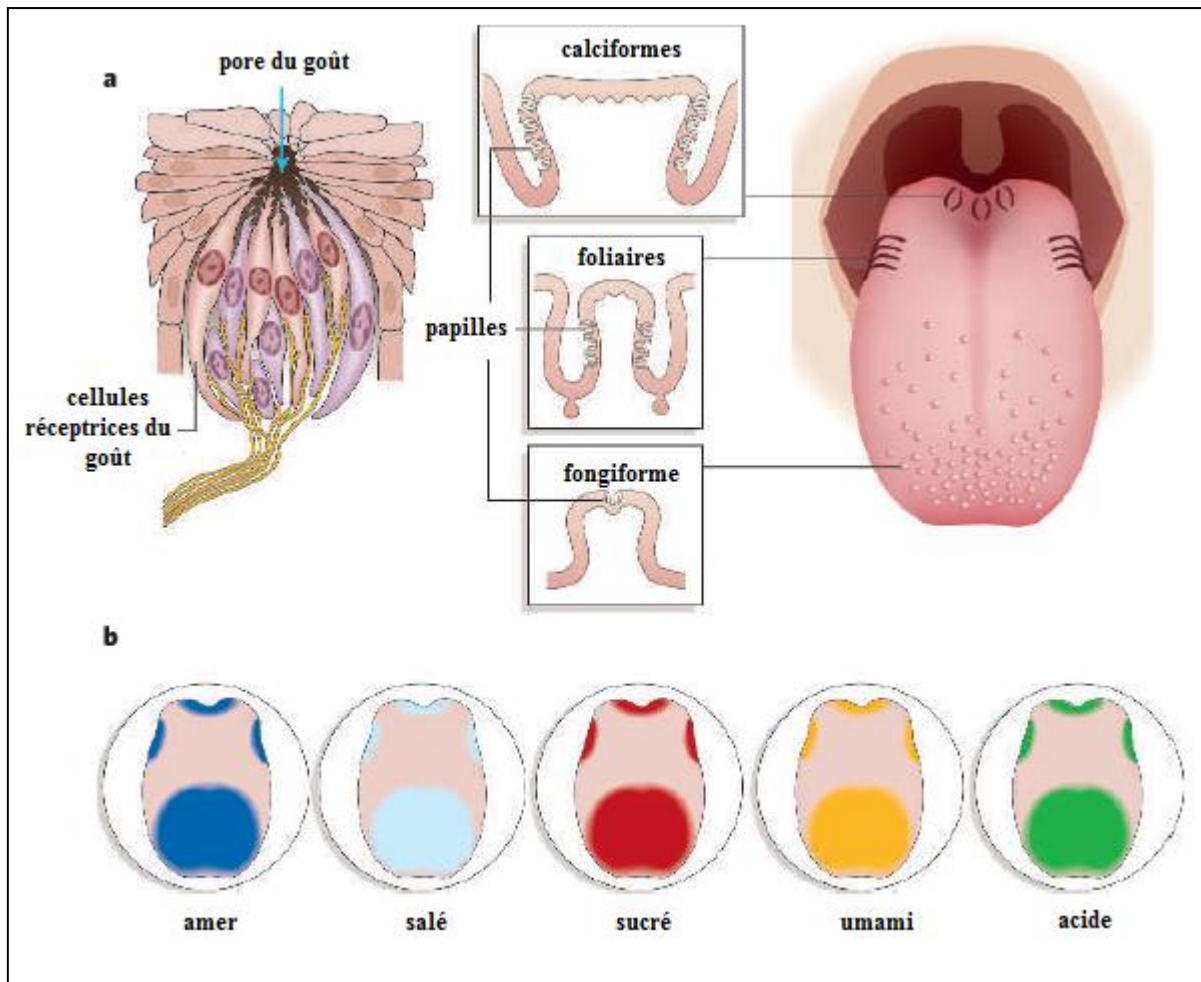


Figure I-1 : Localisation des différents récepteurs responsables du goût.

a. régions spécifiques des récepteurs du goût suivant Lindermann et Kikunae. b. représentation des récepteurs spécifiques du goût, réparties sur toute la langue suivant Adler et Chandrashekar.

Chapitre I : Introduction

L'astringence, une sensation gouvernée par les interactions tanins – protéines

La sensation d'astringence, quant à elle, est définie comme une sensation de sécheresse ressentie en bouche lors de l'ingestion de certains aliments riches en tanins (Joslyn 1964; Green 1993; Bacon 2000). Le terme « astringent » vient du latin *stringare* qui signifie resserrer. Une substance astringente a la propriété de provoquer la contraction des tissus de l'épithélium buccal, faisant suite à un assèchement causé par la perte de la fonction principale de la salive qui est la lubrification de la bouche. Cette sensation de sécheresse est le résultat d'une forte interaction entre des protéines de la salive et les tanins. Cette interaction conduit à la précipitation du complexe tanin-protéine à l'origine de cette modification de la lubrification du palais.

Ainsi, au niveau gustatif « un bon tanin » sera présent mais sans rudesse excessive, qualifié de « gras », « soyeux » selon le vocabulaire fréquent des dégustateurs. Quant au mauvais tanin, il sera décrit comme apportant de la rudesse et de l'âpreté au vin.

Les méthodes d'évaluation du goût les plus efficaces reposent sur une analyse de la description sensorielle. Pour cela il est nécessaire de définir des termes communs et pertinents qui permettent d'évaluer la sensation d'astringence ((Gawel 1997; Gawel 2001; Gawel 2007). On retrouve notamment pour l'astringence des termes tels que desséchant, poussiéreux, granuleux lorsque la sensation est trop forte. Alors qu'on peut également retrouver des termes tels que doux, sensation de velours, correspondant à un bon équilibre tannique.

La quantité et la précision des termes correspondant à l'astringence montrent la complexité de cette évaluation. Ceci peut être expliqué par le fait que plusieurs substances peuvent être responsable de plusieurs caractères, telles que les tanins qui jouent un double rôle, dans les sensations d'astringence et d'amertume. Un vocabulaire en accord est également complexe étant donné que les perceptions d'amertume, d'acidité et d'astringence peuvent être confuses (Lee 1991; Kallithraka 1997; Vidal 2003).

Les sensations gustatives sont, également, dépendantes du dégustateur. Chaque personne perçoit les goûts de manière différente, le patrimoine génétique, les habitudes alimentaires, les facteurs psychologiques, ou tout simplement l'entraînement à la dégustation sont des facteurs qui influencent la sensibilité. La composition salivaire varie d'un individu à l'autre, ce qui augmente la difficulté de l'analyse. Même au sein d'un jury habitué et entraîné il peut exister des variations dues aux stimuli de l'environnement.

On voit donc à travers ces descriptions que l'astringence des vins rouges dépend fortement de deux acteurs que sont les tanins et les protéines salivaires. Un état des lieux de l'ensemble des connaissances acquises de ces différents acteurs et de leurs interactions, en particulier au niveau moléculaire, est présenté ci-après.

B. Les tanins

Le terme tanin sert à désigner toute une catégorie de composés naturels de nature polyphénolique. Selon une ancienne définition, les tanins sont des « composés phénoliques solubles dans l'eau, possédant une masse moléculaire comprise entre 500 Da et 3500 Da qui, en plus de la réactivité usuelle des composés phénoliques, ont la capacité de faire précipiter les alcaloïdes, la gélatine et les autres protéines » (Batesmith 1954). Cette hétérogénéité de masse correspond à des polymères de 2 à 10 unités flavanes (Lea 1992).

Deux groupes majoritaires sont mis en évidence selon la nature chimique du polyphénol de base : les tanins hydrolysables et les tanins condensés.

a) Structure chimique des tanins

i. Les tanins hydrolysables

Les tanins hydrolysables sont constitués d'un sucre comme unité de base pouvant être poly-substitué tel que le β -1,2,3,4,6-pentagalloyl-D-glucose (Haslam 1989) estérifié par l'acide gallique. La substitution peut être faite avec l'acide gallique ou ellagique, formant ainsi les gallo- ou les ellagitanins (Okuda, Yoshida et al. 1993) (Figure I-2). Ces tanins sont peu présents dans la grappe de raisin, néanmoins, ils peuvent être retrouvés dans le vin si ce dernier est élevé en fût de chêne : dans ce cas, ils sont transférés de la barrique au vin au cours de l'élevage, qui peut atteindre 18 à 24 mois pour certains grands vins. Leur concentration peut atteindre tout au plus une centaine de mg par litre de vin (Ribereau-Gayon 2002). Les gallotanins, dont le plus commun est le pentagalloylglucose, sont naturellement retrouvés dans certaines plantes telles que les fagacées, éricacées, géraniacées, acéracées ; l'acide tannique, souvent utilisé pour la clarification du vin ou de la bière ou encore dans le procédé de dénaturation de l'alcool industriel, dans les glands ; et les ellagitanins dans les noix de galle du chêne.

Chapitre I : Introduction
L'astringence, une sensation gouvernée par les interactions tanins – protéines

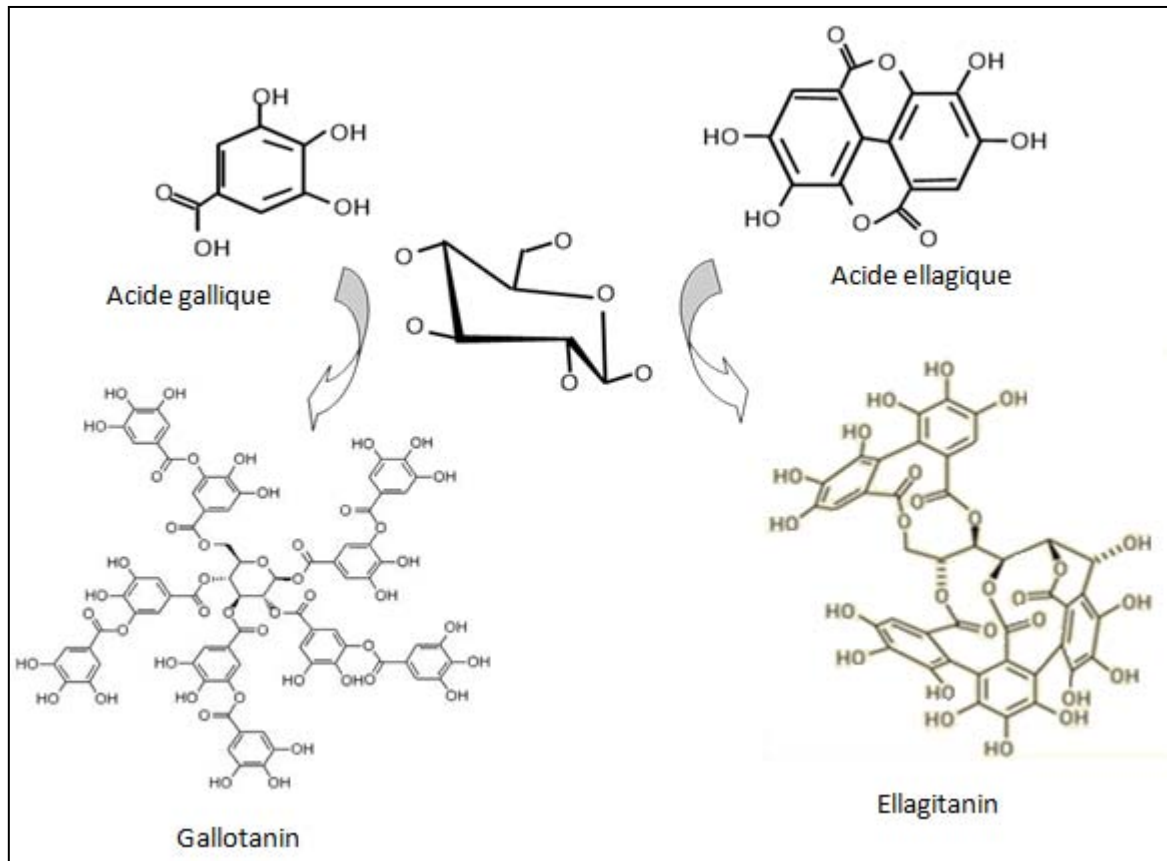


Figure I-2 : Schéma de représentation de la formation des tanins hydrolysables dérivés du β -1,2,3,4,6-pentagalloyl-D-glucose : les gallotanins (à gauche) et les ellagitanins (à droite)

ii. Les tanins condensés

On trouve les tanins condensés dans de nombreux fruits et produits alimentaires dérivés (Foo 1980; Haslam 1988) tels que le thé, le chocolat, le café, le vin. Ce sont des polymères de flavan-3-ols plus ou moins complexes. Leur concentration dans le vin est connue pour varier en fonction du type de cépage utilisé, des conditions climatiques, de la nature du sol, des techniques employées pour la vinification entre autres. Ils proviennent des parties solides du raisin telles que la pellicule et les pépins. Ils sont transférés au vin lors de l'étape de macération.

Chapitre I : Introduction

L'astringence, une sensation gouvernée par les interactions tanins – protéines

La nomenclature suivante est souvent utilisée :

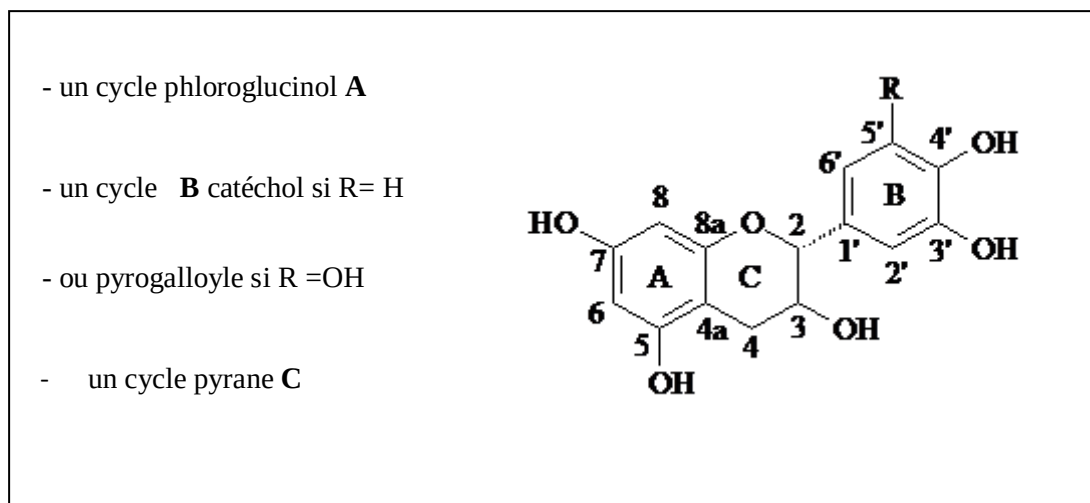


Figure I-3 : Nomenclature des unités monomères flavanes (IUPAC 2-(3,4-dihydroxyphenyl)-chromane 3,5,7 triol (Ribereau.P 1969))

Leur unité structurale est le noyau flavane avec 15 carbones organisés en C6-C3-C6 (Porter et al, 1980). On les appelle également proanthocyanidines car ils ont la capacité de libérer des anthocyanidines, pigments rouges obtenus par chauffage de ces derniers en milieu acide.

Les proanthocyanidines possèdent une grande variété structurale. Ceci est dû à leur degré de polymérisation (nombre et type de liaisons interflavanes), au nombre, à la position et aux types de substitutions (galloylation, hydroxylation) mais également à la stéréochimie du carbone asymétrique 3 du cycle pyrane C qui peut être R ou S, alors que la stéréochimie du carbone 2 est toujours de type R dans les raisins et donc dans le vin.

Nous ne parlerons que des oligomères de flavan-3-ols, aussi appelés procyanidines, qui sont constitués uniquement de deux unités de bases : la catéchine et l'épicatéchine. La seule différence entre ces deux molécules repose sur la stéréochimie du carbone 3 où la stéréochimie du groupement hydroxyle du cycle pyrane C est S pour la catéchine et R pour l'épicatéchine.



Figure I-4 : Structure des monomères de catéchine et d'épicatéchine

Chapitre I : Introduction

L'astringence, une sensation gouvernée par les interactions tanins – protéines

Il existe deux classes de polymères en fonction du type de liaison qui relie les monomères (Weinges 1968). Le type A (figure I-5), peu présent dans le raisin et le vin, qui relie les monomères par deux liaisons, une liaison carbone de type C4-C8 ou C4-C6 et une liaison éther C₂-C₅ ou C₂-C₇ et le type B (figure I-6), le plus rencontré, qui relie les monomères par une liaison Carbone-Carbone en C₄-C₆ ou C₄-C₈.

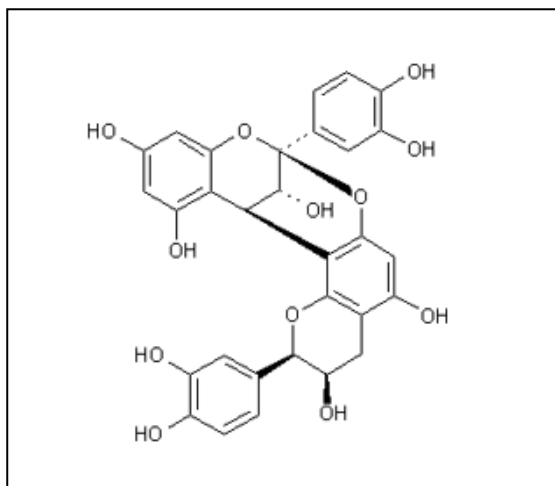


Figure I-5 : Structure de la procyanidin A2

Les polymères rencontrés dans le raisin et donc dans le vin possèdent, majoritairement, des oligomères de procyanidines de type B. Le nombre d'unités pouvant atteindre 30 dans les pellicules (Souquet 1996) et 10 dans les pépins de raisin (Prieur 1994), on peut imaginer le nombre de compositions différentes possibles. Ainsi, on peut dénombrer 8 dimères différents (que l'on a tous retrouvé dans les pépins raisins de Merlot et de Cabernet Sauvignon, (de Freitas 2000)) 32 trimères, 128 tétramères etc.(Figure I-6).

Chapitre I : Introduction

L'astringence, une sensation gouvernée par les interactions tanins – protéines

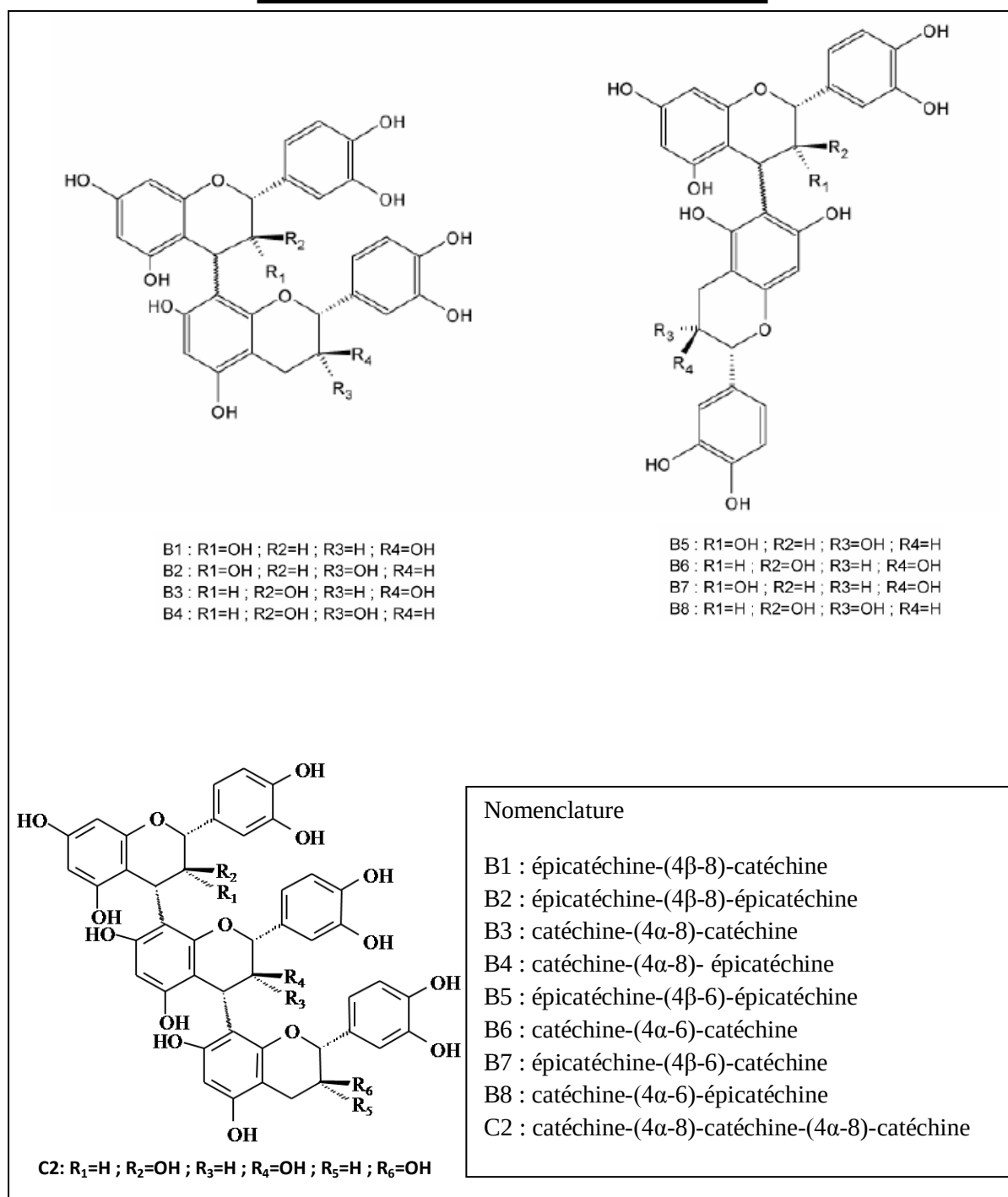


Figure I-6 : Structure et nomenclature pour les tanins condensés de flavan-3-ols de la série B: dimères liés en C4 – C8 (en haut à gauche), et en C4 – C6 (en haut à droite) et un trimère liés en C4 – C8 - C4 – C8 (en bas à gauche).

Cependant, l'analyse des procyanidines des pellicules comporte des difficultés en raison de leur proportion face aux autres composés phénoliques présents en quantités non négligeables tel que les anthocyanes (Escribanobailon 1995). On peut tout de même avoir une idée de la distribution de 10 procyanidines dans des pellicules de la variété de Merlot (Escribanobailon 1995) comme le montre le tableau I-1

Chapitre I : Introduction
L'astringence, une sensation gouvernée par les interactions tanins – protéines

composés		Distribution relative
Cat	(+)-catéchine	+ + +
Epi	(-)-Epicatechine	+
ECG	(-)-Epicatechine-3-O-gallate	-
B1	Epi-4 β -8-Cat	+ +
B2	Epi-4 β -8-Epi	-
B3	Cat-4 α -8-Cat	+
B4	Cat-4 α -8-Epi	+
B2-3'-O-G	Epi-4 β -8-Epi-3-O-gallate	-
T2	Epi-4 β -8- Epi-4 β -8-Cat	+ + +
C1	Epi-4 β -8- Epi-4 β -8-Epi	-

Tableau I-1 : Distribution relative de différentes procyanidines dans la variété de Merlot (Escribanobailon 1995)

Il faut noter que la composition globale des oligomères et polymères varie suivant le type de cépage, le millésime, la maturation de la baie de raisin et au niveau de la sensation d'astringence il semblerait que cette sensation augment avec le degré de polymérisation (Arnold 1980; Brossaud 2001).

Période récolte	Cépage- parcelle	Monomères			Dimères						CCE	Tétra	
		Cat	Epi	ECG ^a	B1	B2 ^b	B3	B4	B2G ^a	B4G ^a			
Véraison	CS	P110	406.24 ^a	270.51	108.21	32.69	13.87	43.28	44.26	108.44	36.12	3.60 ^c	14.97
		P113	486.26 ^a	307.38	142.99	35.99	15.15	50.38	55.84	128.62	43.69	3.70 ^c	23.02
	M	P105	502.78 ^a	371.77	156.55	35.19	21.44	81.06	75.93	111.04	47.41	8.54 ^c	21.08
		P115	533.09 ^a	346.59	140.32	29.67	20.78	73.57	62.75	111.65	40.88	2.89 ^c	24.13
		P122	491.23 ^a	444.57	147.58	27.68	19.56	58.88	70.68	94.03	44.90	7.18 ^c	30.87
Mi-maturité	CS	P110	111.87	99.96	11.45	17.41	20.55	21.29	35.56	20.72	23.80	nd	25.31
		P113	114.73	105.82	9.66	18.35	21.84	20.57	25.87	22.06	19.49	nd	18.72
	M	P105	106.72	153.50	12.60	21.66	19.13	37.20	36.28	44.49	24.55	1.77 ^c	26.30
		P115	88.22	140.11	10.87	17.57	16.80	27.81	31.58	38.31	21.93	1.35 ^c	26.48
		P122	88.32	141.46	11.16	20.78	19.17	30.50	31.77	37.19	22.45	1.34 ^c	16.65
Maturité	CS	P110	50.67	52.29	1.61	12.32	13.83	12.69	17.79	12.70	11.55	nd	6.41
		P113	73.50	71.43	2.30	12.00	20.01	15.95	28.93	12.72	13.23	0.82 ^c	6.46
	M	P105	82.33	126.78	8.60	16.18	22.82	32.90	47.79	30.96	23.06	2.44 ^c	10.93
		P115	66.76	111.65	6.57	16.04	21.06	30.37	29.60	28.73	16.75	2.79 ^c	8.64
		P122	89.26	152.02	9.02	19.80	27.82	35.55	34.78	35.23	20.55	2.93 ^c	5.16
Vendange	CS	P110	46.53	46.09	1.24	9.48	15.75	11.94	14.23	9.91	9.98	0.70 ^c	4.40
		P113	56.04	58.29	1.53	10.50	18.08	13.66	26.46	10.68	9.89	0.83 ^c	4.11
	M	P105	70.49	112.60	6.52	22.15	25.32	37.91	30.72	29.97	21.66	3.54	10.79
		P115	65.81	121.07	5.43	20.78	27.71	34.26	34.13	30.50	22.09	3.13 ^c	3.58
		P122	67.79	121.76	6.57	18.05	26.13	29.03	31.24	31.17	20.06	2.17 ^c	8.49

Tableau I-2 : Quantification par HPLC en détection UV (a) et UV+fluorimétrie (b) des procyanidines de deux cépages différents CS Cabernet Sauvignon et M merlot d'un millésime 2007 suivant leur maturation. Thèse Sandy Fabre Université de Bordeaux1. Valeur en mg/Kg de baie. (c) Valeur limite de quantification. CCE est un trimère de Cat-Cat-Epi et tetra un tétramère de Cat-Cat-Cat-Cat.

Chapitre I : Introduction

L'astringence, une sensation gouvernée par les interactions tanins – protéines

Nous pouvons constater que l'évolution globale est la même quels que soient le cépage et se caractérise par une diminution de la quantité totale des procyanidines. Cette diminution affecte aussi bien les monomères (catéchine et épicatechine) que les composés galloylés (ECG, B2G et B4G) et les oligomères, les proportions respectives de chacun évoluent au cours de la maturation du raisin.

b) Structure tridimensionnelle des procyanidines

Deux mécanismes conformationnels influencent la structure tridimensionnelle des procyanidines le premier concernant l'hétérocycle C, le second concernant l'angle dièdre C₃-C₄-C₈-C₇.

L'hétérocycle pyrane C des procyanidines, peut adopter deux conformations, E ou A selon que le cycle B se trouve respectivement en position équatoriale ou en position axiale. Un équilibre rapide existe entre ces deux conformations. La mesure des constantes de couplages en RMN du proton peut nous renseigner sur les proportions des deux formes (Hemingway R.W. 1992).

L'isomérisation rotationnelle caractérisée par l'angle dièdre C₃-C₄-C₈-C₇ entre deux unités flavanols : ainsi, les procyanidines dimères peuvent adopter une forme compacte ou étendue (Foo 1983). Ces deux formes sont dues à une rotation ralentie autour de la liaison interflavane due à l'encombrement stérique imposées par les deux unités flavanes dont la barrière d'énergie est suffisamment élevée pour distinguer les deux formes rotamères par RMN du proton et du ¹³C. La proportion entre ces deux formes rotamères dépend de la nature du substituant (Hatano 1997; Khan 1997) et de la procyanidine. Dans un milieu mimant le vin (H₂O/EtOH : 90 /10, v/v), Tarascou et al (Tarascou 2006) ont montré que les procyanidines B1 et B3 adoptent très majoritairement une structure tridimensionnelle compacte (95%). Dans ce modèle, la procyanidine B4 possèdent également une structure tridimensionnelle compacte majoritaire, mais dans une moindre proportion (75%) alors que pour la procyanidine B2, les deux formes coexistent à 50% chacune (figure I-7). En ce qui concerne les procyanidines trimères, (Tarascou 2007) il existe quatre formes rotamères dues aux rotations possibles autour des deux liaisons interflavanes. En utilisant la même nomenclature que celle utilisée pour les dimères, les trimères peuvent adopter une structure compacte-compacte, compacte-étendue, étendue-compacte ou étendue-étendue (figure I-7). La procyanidine C2 (cat 4α-8 cat 4α-8 cat) dans un milieu hydroalcoolique adopte indifféremment ces quatre formes, l'une d'entre elles restant majoritaire : la compacte-compacte forme présentée dans la figure I-7 adaptée des articles d'Isabelle Tarascou (Tarascou 2006; Tarascou 2007).

Chapitre I : Introduction

L'astringence, une sensation gouvernée par les interactions tanins – protéines

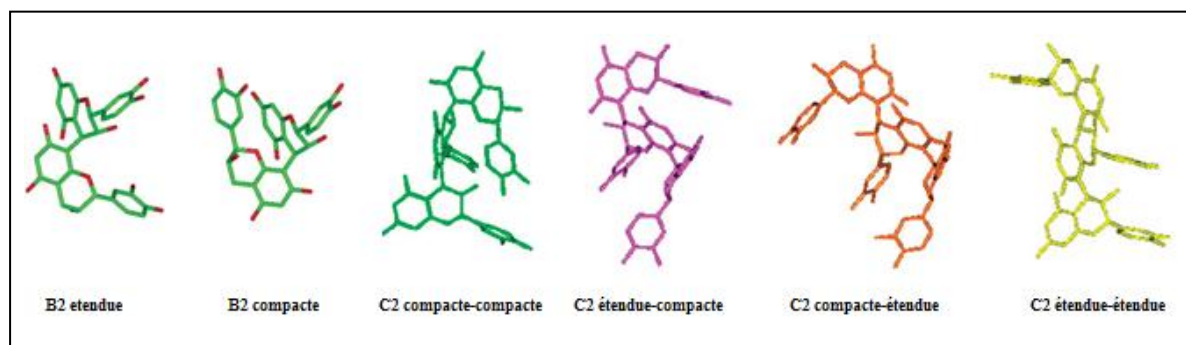


Figure I-7 : Structure tridimensionnelle des procyanidines B2 (deux forme à gauche) et C2 (quatre formes à droite) (Tarascou 2006; Tarascou 2007).

c) Propriétés physicochimiques des Procyanidines

Les tanins ont des propriétés chimiques et physicochimiques particulières. Par exemple, au cours du vieillissement, les tanins condensés peuvent réagir entre eux ou avec d'autres composés phénoliques présents dans le vin tels que les anthocyanes ou les ellagitanins. Ces réactions sont susceptibles de modifier la couleur et les caractéristiques organoleptiques du vin (Haslam 1980).

Outre le fait de leurs différences structurales, les procyanidines peuvent aussi se complexer entre elles pour former des micelles ou agrégats. Ce comportement a été décrit pour la première fois par Baxter et al (Baxter et al, 1996 J. Chem. Soc. Faraday trans, 1996, 92, 231) sur le tanin méthyl gallate. Cette auto-association s'effectue selon un modèle simple dans lequel chaque tanin s'associe avec les autres avec la même constante d'association K_a . Ce modèle a été amélioré par Pianet et al qui ont travaillé sur différentes procyanidines monomères, dimères et trimères (Pianet 2008). Au-delà d'une certaine concentration, la Concentration Micellaire Critique (CMC), un processus de micellisation des procyanidines se met en place conduisant à la formation de petites micelles d'un diamètre de l'ordre du nanomètre, qui correspondrait à un assemblage d'une dizaine de molécules pour les procyanidines oligomères (figure I-8), ou à des agrégats et des précipités pour les procyanidines monomères (Figure I-8a). En effet, les monomères auraient une faculté d'auto-association dix fois supérieure à celles des dimères et trimères avec une forte affinité ($K_a \approx 40 \text{ M}^{-1}$). Leur auto-association conduirait à la formation de micelles voire des agrégats à des concentrations relativement faibles avec une CMC de l'ordre 5 g.L^{-1} (10 mM) dans un milieu mimant le vin. Ces agrégats pourraient être responsables d'un trouble visible pouvant conduire dans le temps à un phénomène de précipitation. En ce qui concerne les dimères (figure I-8b) et trimères, l'auto-association se produit avec une constante d'affinité plus faible ($K_a \approx 6 \text{ M}^{-1}$) et conduit à la formation de micelles de petites tailles à des concentrations beaucoup plus élevées de l'ordre de 15 g.L^{-1} (20 mM). Au niveau structural, cette auto-association est favorisée par des interactions hydrophobes de type π - π stacking entre les cycles aromatiques des tanins (figure I-8).

Chapitre I : Introduction

L'astringence, une sensation gouvernée par les interactions tanins – protéines

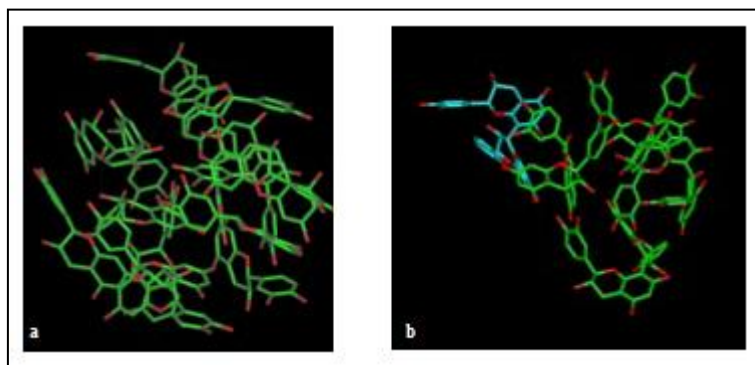


Figure I-8 : Formation de micelle de catéchine (a) et de dimère B3 (b) obtenu après respectivement 2 et 3 ns de temps de calcul sur 15 catéchine et 5 B3. Figure adaptée de (Pianet 2008)

Ce comportement colloïdal est important car il définit d'une part la fraction de tanin susceptible d'interagir avec les protéines, et d'autre part, comme nous le verrons par la suite, le mode d'interaction avec les protéines.

d) Propriétés biologiques

Il est reconnu que le rôle biologique des procyanidines dans les plantes est surtout lié à la protection contre les infections, les insectes ou bien encore les herbivores (Aron 2008). Ces différentes propriétés sont induites par leurs capacités à interagir avec les protéines, à chélater les métaux et à leur activité antioxydante (He 2008). Ces trois capacités sont également à l'origine des effets bénéfiques attribués aux procyanidines en santé humaine. Les procyanidines font l'objet d'un grand nombre d'études concernant leurs propriétés pharmacologiques intéressantes : action antioxydante, action contre les maladies cardiovasculaires, contre les cancers, agent antimicrobien, antiviral, neuroprotecteur (Bennick 1982; Pourcel 2007; Aron 2008). Du fait de leur présence en abondance dans notre alimentation quotidienne et de leur propriété à se lier à des protéines avec une bonne affinité, conduisant à la formation de complexes solubles ou non, de nombreuses équipes se sont intéressées aux tanins et à leurs rôles biologiques bénéfiques (antioxydants, anticancéreux, antimutagènes ...) ou délétères (cancéreux, mutagènes, antinutritifs ...) (Papadopoulou 2004). Grands nombres de ces propriétés sont la conséquence d'interaction des tanins avec des protéines cibles. C'est aussi à travers des interactions entre tanins et protéines de la salive, qu'ils ont un rôle gustatif important.

C. Les protéines de la salive

a) Généralités

La salive est composée d'eau (99%), d'électrolytes en plus faible quantité tels que les cations (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} ...), de nombreuses protéines, de glycolipides, de glucides, d'enzymes ... (Wu 1994; Humphrey 2001). La composition salivaire est régulée par le flux de salive mais aussi par les stimuli externes. Les proportions de ces diverses composantes varient également d'un individu à l'autre (Neyraud 2006; Walz 2006; Gho 2007). La salive joue un rôle de lubrifiant, de protection de la muqueuse buccale et des dents. Elle tamponne le milieu, aide à la digestion des aliments, et permet d'en apprécier le goût. On trouve de nombreuses espèces de protéines dans la salive. Une étude sur le protéome de la salive a permis d'identifier plus de 1400 protéines différentes (Guo 2006). Leur concentration moyenne est de l'ordre de 3,5 mg/mL (Bennick 1982). Cette concentration peut fluctuer avec l'alimentation et suivant les personnes. Une personne qui a l'habitude de boire du vin aura une meilleure faculté à produire les protéines impliquées dans la sensation d'astringence telles que les protéines riches en proline (Kallithraka 1998). Ces protéines sont synthétisées majoritairement dans les glandes salivaires, submandibulaire et parotide. On y trouve les mucines, qui sont des protéines glycosylées représentant près de 26% de la composition protéique salivaire totale. Elles sont fortement impliquées dans la lubrification (Fox 1985). Elles sont produites par les glandes submandibulaires et sublinguales. Les glandes parotides, quant à elles, sécrètent principalement des protéines riches en prolines (PRPs), le reste étant essentiellement des enzymes notamment des amylases. Les PRPs et les histatines connues pour piéger les polyphénols ont retenu notre attention. Ce sont les protéines les plus impliquées pour piéger les polyphénols.

Le graphique suivant présente la composition moyenne des protéines majoritaires de la salive humaine

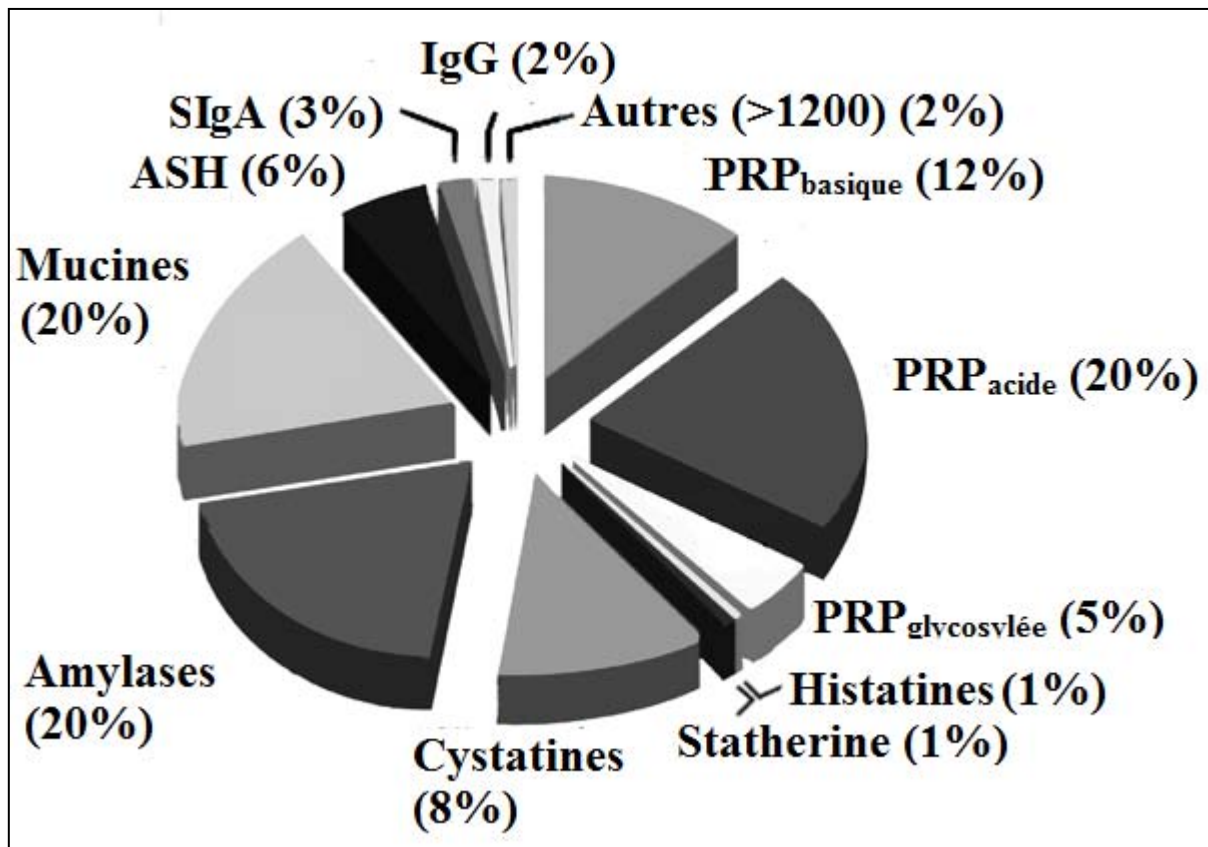


Figure I-9 : Répartition des protéines majoritaires de la salive humaine (Scarano 2010). ASH : Albumine du Sérum Humain ; SIgA : sérum d'immunoglobuline A ; IgG :Immunoglobuline G ; PRP : Protéine riche en proline.

b) Les PRPs

Les PRPs peuvent représenter jusqu'à 70% des protéines sécrétées dans la glande parotide. Elles sont réparties en 3 familles, les PRP acides, les PRP glycosylées et les PRP basiques.

Les PRP acides, qui représentent 45% des protéines de cette famille, possèdent des sites de liaison spécifique de l'ion calcium avec un nombre de sites variables en fonction des protéines (Wong R.S.C. 1980). Elles pourraient agir comme un réservoir à calcium permettant le maintien de l'homéostasie calcique dans la bouche (Bennick 1982). En effet, elles lient le calcium, inhibent la croissance des cristaux d'hydroxyapatite à la surface des dents (Hay 1979; Bennick 1981; Hay 1987) et jouent un rôle dans la stabilisation des sels de phosphate de calcium dans la salive (Moreno 1979) .

Les PRP glycosylées , qui représente 13% des protéines de cette famille, agissent comme des lubrifiants (Hatton 1985) et fixent les bactéries buccales (Bergey 1986). Plus récemment, leur rôle antiviral a été démontré particulièrement par leur action sur une protéine du manteau du HIV-140 en formant une liaison avec le virus (Beeley 2001).

Chapitre I : Introduction

L'astringence, une sensation gouvernée par les interactions tanins – protéines

Les PRP basiques, qui représentent 30% des protéines de cette famille, ne possèdent pas de rôle spécifique mais sont connues pour fixer les polyphénols. Toutes les PRPs possèdent cette propriété mais les PRPs basiques, de part leur structure fibrillaire, assimilable à une hélice collagène, sont davantage aptes à neutraliser les effets néfastes des tanins alimentaires, par formation de complexes et précipitation de ces derniers (Mehansho 1987; Carlson 1988; McArthur 1995). Cette propriété leur confère un rôle protecteur contre le potentiel toxique et cancérigène des tanins alimentaires (Mehansho 1983; Mehansho 1987; Lu 1998). En particulier, les PRPs liant les tanins préviendraient du cancer de l'œsophage (Warner 1988).

Les groupes des PRPs glycosylées et des PRPs basiques sont les plus variés car leurs protéines sont exprimées à partir de 4 gènes (PRB1 à PRB4) possédant de nombreux allèles localisés sur le chromosome 12 (Lyons 1988; Lyons 1988; Scherer 2006). De plus, il existe un fort polymorphisme en longueur de chaîne. La plupart des pro-protéines codées par ces gènes sont maturées avant sécrétion, aboutissant à un grand nombre de PRPs sécrétées (Lyons 1988; Lyons 1988). On retrouve ainsi des séquences polypeptidiques ubiquitaires dans cette population de protéines comme l'illustre la figure I-10. Notamment, Bennick a identifié plus de 20 PRP au sein de la salive humaine (Bennick 1981).

Cette famille est caractérisée par une structure primaire qui présente un grand nombre de répétitions, constituée en majeure partie de résidus proline à 40%, de résidus glycine à 21%, et de résidus glutamine à 17%. En effet, ces trois résidus représentent près de 80% de tous les acides aminés contenus dans les PRP. Cette famille porte le nom de Protéines Riches en Prolines car la proline y représente à elle seule près de la moitié des acides aminés, alors que la plupart des protéines usuelles ne comportent pas plus de 5% de prolines dans leurs séquences.

Lorsqu'on réalise un alignement de séquence, on peut identifier des domaines conservés. Dans le cas des PRPs, une séquence d'une soixantaine d'acides aminés est fortement conservée.

L'astringence, une sensation gouvernée par les interactions tanins – protéines

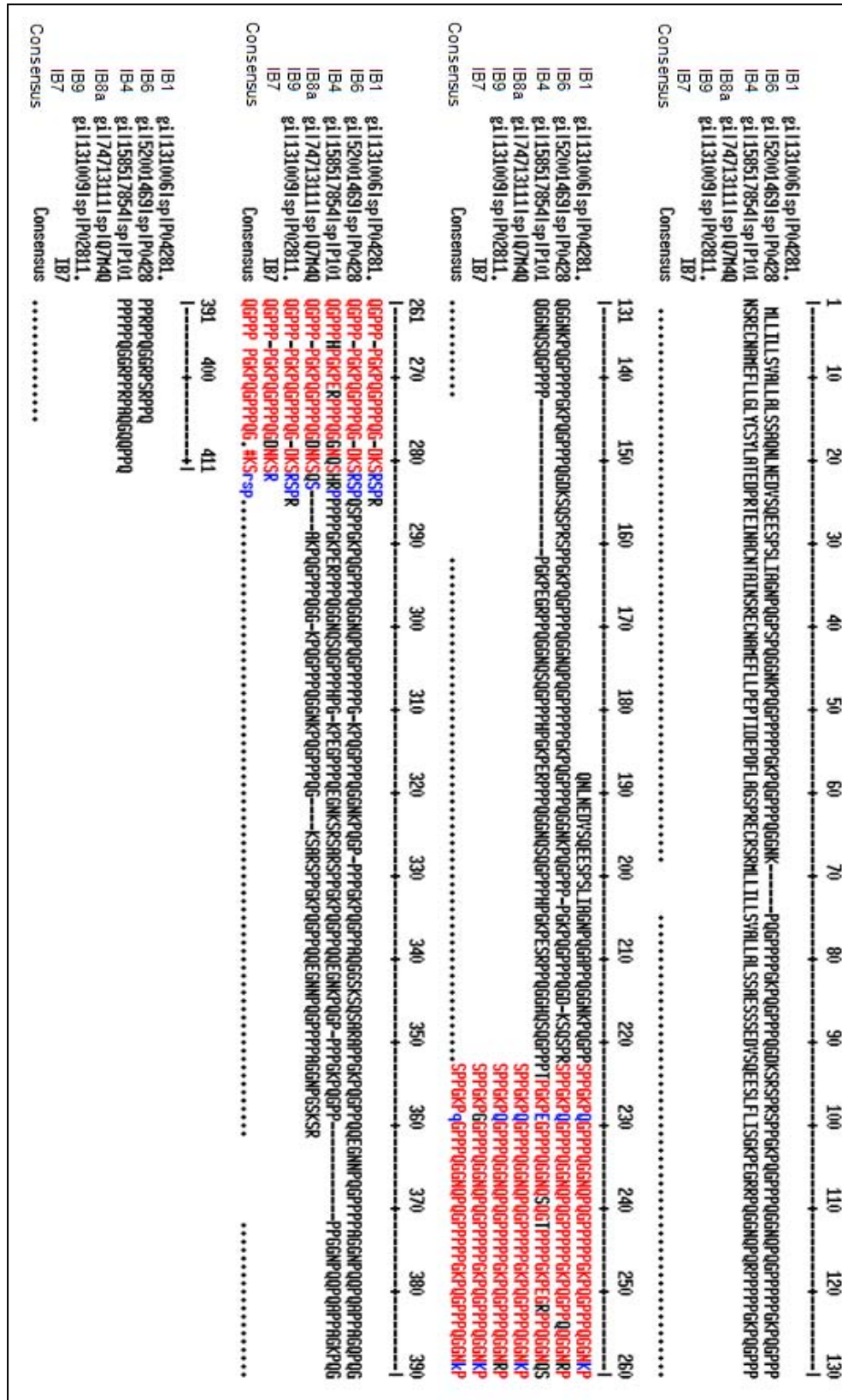


Figure I-10 : Alignement de séquence de 6 PRPs (IB1, IB4, IB6, IB7, IB8c et IB9)

En rouge les acides aminés conservés, en bleu les acides aminés de la même famille, en noir les acides aminés différents et le tiret représentant une pénalité d'insertion.

Chapitre I : Introduction

L'astringence, une sensation gouvernée par les interactions tanins – protéines

Il faut noter que la séquence conservée (en rouge) est entièrement représentée par les protéines IB7 de 59 acides aminés et IB9 de 61 acides aminés. Cette séquence d'une soixantaine d'acides aminés représente environ 80% d'identité de toutes les séquences de cette famille de protéines.

De plus, ce domaine conservé contient des répétitions de séquences : une séquence de 5 acides aminés (PQGPP) répétées 5 fois et une séquence de 9 acides aminés (PPGKPQGPP) répétées 3 fois. Ces motifs renforcent la spécificité et l'homogénéité de ce type de protéines dont la structure secondaire apparaît comme une hélice de type II (Simon 2003) typique d'enchaînements poly(Lproline) ou la pelote statistique engendrent une perte de corrélation ($i, i+3$), ce qui ne permet pas d'observer directement le pas de l'hélice mais possède un tour d'hélice avec 3 résidus par tour. Ceci est dû au nombre et à la répétition des résidus proline qui de part leur propre structure, d'une part, restreignent la conformation de la chaîne carbonée, et qui par l'encombrement observé par la liaison N-CH₂, et d'autre part défavorisent la formation d'hélice α . Enfin, du fait que le proton amide est remplacé par le groupe CH₂, la proline est incapable d'agir comme un donneur de liaison hydrogène (Williamson 1994). Ainsi, la torsion induite par cet acide aminé dans une chaîne peptidique rend beaucoup plus accessible le groupement carbonyle, permettant à la proline d'agir comme un accepteur de liaison hydrogène. (Hagerman 1980; Hagerman 1981).

c) Les histatines

Les histatines ou protéines riches en histidines (PRHs) sont de petits peptides cationiques et antifongiques riches en résidus histidines. Elles ont un rôle de défense contre des agents pathogènes salivaires. Elles ont cependant aussi été mises en évidence pour leur forte affinité pour les tanins (Yan 1995; Naurato 1999; Wroblewski 2001).

Ce sont des protéines structurellement proches, tout comme les PRPs. Douze PRHs ont pu être isolées de la salive humaine et leur structure primaire a été étudiée (Troxler 1990). Comme le montre la figure I-11, les PRHs ne possèdent pas de résidus proline à l'exception des histatines 1 et 2. En contrepartie, le résidu histidine représente près de 25% des résidus dans la séquence totale de cette famille de protéines. Les PRHs ont généralement une structure secondaire en pelote statistique mais peuvent adopter une conformation en hélice α lorsqu'elles sont dans un environnement hydrophobe. Ce phénomène a été montré lors de l'étude de leurs activités antimicrobiennes où l'interaction de PRH avec les microorganismes serait facilitée suite à sa restructuration en hélice α (Raj 1990). Tout comme pour les PRPs, il existe au sein de cette famille une très forte homologie de séquence. PRH 3 est une protéine-peptide de 32 acides aminés, PRH 4 représente la séquence C-terminal de PRH 3 avec une longueur de 20 acides aminés. PRH 5 représente la partie N-terminale de PRH 3 sur une longueur de 24 acides aminés. Les PRH suivantes, de 6 à 12, représentent des petits morceaux de séquences de PRH 3. PRH 1 et 2 sont très proches de la séquence de PRH 3 avec quelques modifications ponctuelles.

Chapitre I : Introduction

L'astringence, une sensation gouvernée par les interactions tanins – protéines

Outre leur rôle antimicrobien (Xu 1993; Meiller 2009; Tay 2009), les histatines ont été décrites comme capable de fixer les tanins alimentaires et les acides tanniques, cette fixation pouvant conduire à la précipitation des complexes formés pour des pH variant entre 3,0 et 7,4, donc en accord avec le pH du vin (Yan 1995; Naurato 1999).

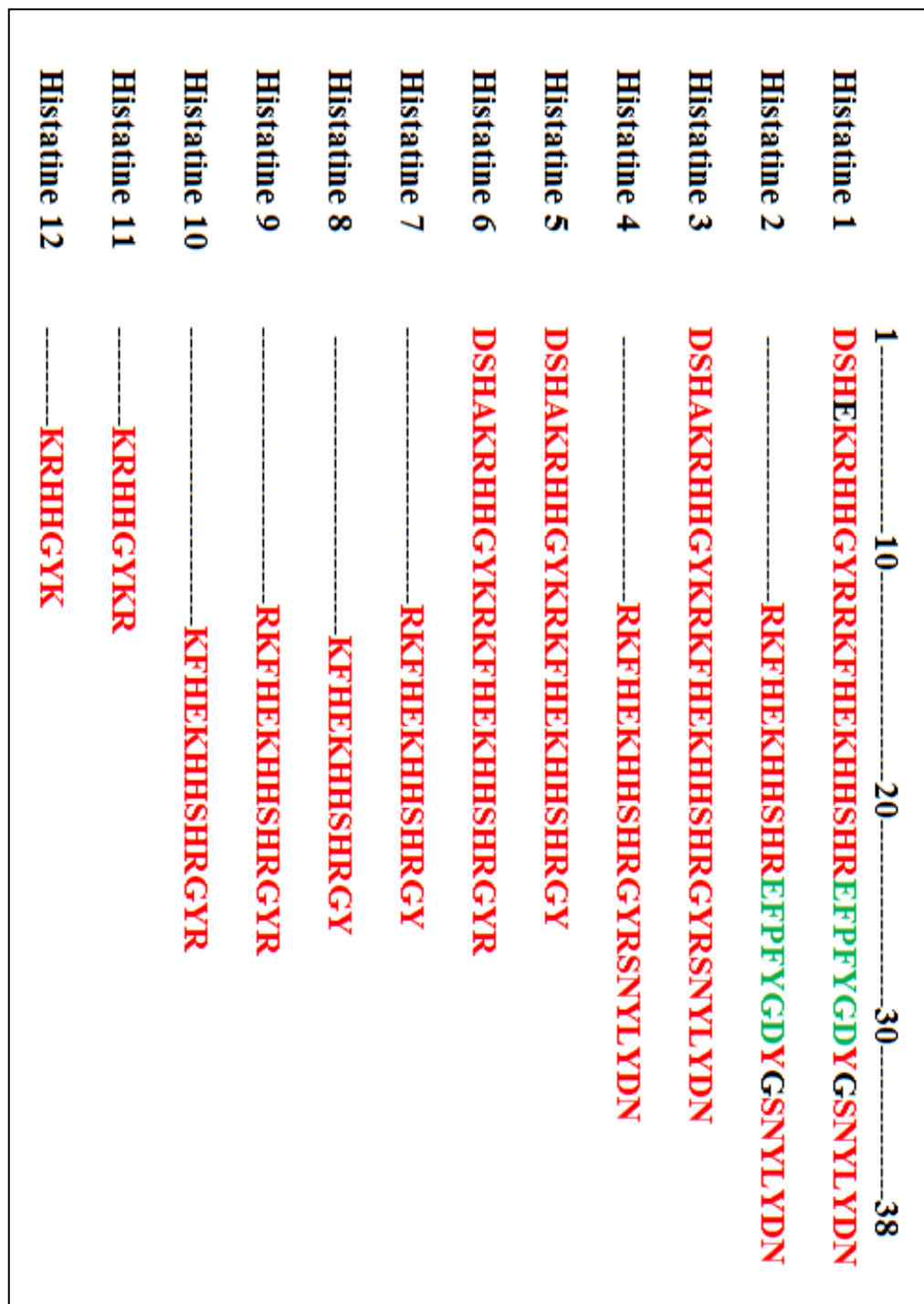


Figure I-11 : Alignement de séquence de 12 Protéines Riches en Histidines (PRHs) ou Histatines connues d'après Troxler, Offner et al. 1990. En rouge les acides aminés conservés, en vert, une séquence d'insertion, en noir les acides aminés différents et le tiret représentant une pénalité d'insertion

D. Les interactions tanins-protéines salivaires

Les tanins sont très présents dans notre alimentation et en plus de leur rôle biologique dans les plantes et sur la santé, les tanins ont un rôle important au niveau gustatif.

Ce rôle gustatif, notamment l'astringence, est principalement lié à l'association entre différents tanins avec une certaine catégorie de protéines de la salive, les protéines riches en proline. Cette propriété a été largement décrite ces 20 dernières années. Dans ces études de nombreux modèles de protéines, de tanins et de techniques très variées ont été utilisées afin de comprendre le mécanisme de cette interaction. A l'issue de ces différentes études plusieurs modèles d'association/précipitation ont été proposés.

Concernant les protéines, une des plus communément utilisée, a été l'albumine de sérum de bœufs (BSA), d'une part car elle est commerciale et d'autre part car elle représente une protéine transport modèle susceptible de fixer et de véhiculer à travers le système sanguin des molécules bioactives telles que les polyphénols (Hagerman 1981; Frazier 2003; Hatano 2003; Carvalho 2006; Frazier 2010). Les interactions des tanins ont été également étudiées sur d'autres modèles de protéines dont la structure fibrillaire liée à la présence de nombreuses prolines présentait des homologies avec les PRP. C'est le cas de la gélatine (Frazier 2010) ou encore de la β -caséine (Jobstl 2004) voire de polyproline synthétique (Pascal 2007). Au regard de ces différents travaux, il a été montré que les protéines fibrillaires riches en prolines présentent une bien meilleure affinité vis-à-vis des tanins (jusqu'à un facteur 100) que la BSA, dont la structure globulaire ne favoriserait pas la fixation des tanins. D'autres protéines ont également été étudiées par différentes équipes du fait de leur présence dans la salive : l' α -amylase ((de Freitas 2002; Carvalho 2006)), ou les histatines (Naurato 1999; Wroblewski 2000; Wroblewski 2001). Enfin, certaines équipes ont étudié les interactions des tanins directement sur les protéines riches en proline : sur les protéines entières telles que IB8c (Carvalho 2006), IB5 (Charlton 1996; Canon 2009) ou sur des fragments peptidiques représentatifs de cette famille de protéines (Simon 2003; Cala 2010).

Concernant les tanins, tous les types de tanins ont été utilisés que ce soit des tanins purs hydrolysables comme les tri-, tetra- ou penta-galloyle glucose (Baxter 1997; Frazier 2003) ou des tanins condensés comme des monomères de catéchine, épicatechine (Baxter, Lilley et al. 1997; luck et al, 1994, phytochem.37, 357 ; Frazier, Deaville et al. 2003), épigallocatechine gallate (Charlton et al, JAFC 21002, 50, 1593 ; JACS 2002, 124, 9899 ; Jobstl et al, biomacromolecules, 2004, 5, 942) des dimères purs (Hagerman, 1998, 46, 2590 ; Baxter et al, 1997 ; Simon 2003) ou encore sur des fractions de procyanidines dont le degré de polymérisation moyen a été déterminé (Carvalho et al, 2006 ; Ozawa et al, phytochem 1987, 26, 2937 ; Poncet-Legrand et al, 2007 ; ...). De ces travaux, il

Chapitre I : Introduction

L'astringence, une sensation gouvernée par les interactions tanins – protéines

est difficile de tirer des conclusions sur les affinités relatives et la stœchiométrie de l'interaction de l'ensemble de ces tanins vis-à-vis des protéines du fait de la diversité des modèles de protéines et des conditions expérimentales utilisés (méthodes d'analyses, solvants, températures ...). Cependant, il semblerait que les tanins condensés monomères présentent une affinité moindre que leurs homologues de plus hauts degrés de polymérisations ou que les tanins hydrolysables. Globalement, l'ensemble de ces études montre d'une part, l'importance de la nature protéique et d'autre part, que la structure et la flexibilité des tanins jouent un rôle important sur l'affinité de l'interaction.

Vis-à-vis des techniques utilisées, on peut en distinguer deux grandes catégories selon que l'analyse se fait au niveau macromoléculaire ou moléculaire voire atomique. Au niveau macromoléculaire, on trouve des techniques de néphélométrie (une technique de mesure de la teneur en particule en suspension, ou de la turbidité d'un milieu). En utilisant cette technique, Victor de Freitas et son équipe (de Freitas 2003; Carvalho 2004) ont pu montrer sur des système BSA-polyphénols que les carbohydrates (dextran, glucose, arabinogalactan, β -cyclodextrine, pectine et autres) avaient une influence (non équivalente pour chaque carbohydrate) sur la solubilité des complexes tanins-protéines formant des agrégats conduisant à un trouble de la solution. On retrouve également des techniques de diffusion dynamique de la lumière, de titration par microcalorimétrie et de dichroïsme circulaire. En croisant ces 3 techniques, Pascal et *al.* ont présenté une étude d'agrégation d'une PRP suite à la fixation de tanin. Frazier et al (Frazier 2003) travaillant sur les tanins ont montré par titration en calorimétrie que différents tanins provenant de différentes plantes telles que le thé, le raisin ou le sorgho, avaient une affinité différente pour la BSA et pour la gélatine. Des techniques de mesures de taux de précipitation par dosage de la radioactivité de la BSA précipité lors de l'ajout de tanins a été développé il y a 30 ans par Ann E. Hagerman et son équipe. Ils ont pu mettre en évidence la spécificité des interactions (Hagerman et Butler, 1981) mais aussi comparer l'affinité relative de différentes catégories de tanins (Ellagitannin, Gallotanin, ou procyanidine), capables de se fixer aux protéines par le biais de liaison non covalente (Hagerman, 1992). En fonction des tanins, ces liaisons sont de nature hydrophobe pour les tanins hydrolysables ou hydrogène pour les tanins condensés (Hagerman 1998). Enfin, Jobstl et Williamson ont utilisé la microscopie électronique à transmission et l'ultracentrifugation analytique (Jöbstl 2004) pour analyser les interactions entre la β -caséine et l'épigallocatechine gallate (EGCG) induisant des précipitations du complexe formé.

L'utilisation de techniques permettant d'avoir des informations directement au niveau moléculaire voire atomique ont été également utilisées, en particulier les techniques de spectrométrie de masse. L'équipe de Véronique Cheynier (Sarni-Manchado 2002; Canon 2009) a pu mettre en évidence que cette technique permet d'accéder à la stœchiométrie du complexe tanin protéine formée et à sa stabilité (B. Plet, Thèse). La résonance plasmonique de surface peut aussi être utilisée dans le cadre d'étude moléculaire des complexes comme le présente Douat-Casassus *et.al* (Douat-Casassus 2009) lors de la détermination de l'interaction entre un ellagitannin (vescalagine) et une topoisomérase. La

Chapitre I : Introduction

L'astringence, une sensation gouvernée par les interactions tanins – protéines

cristallographie aux rayons X, la modélisation moléculaire et la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) restent les seules méthodes permettant d'obtenir des informations précises au niveau atomique et moléculaire. La cristallographie est cependant limitée par le fait de la complexité à obtenir des cristaux de protéines qui diffractent suffisamment pour des protéines peu ou pas structurées. La modélisation moléculaire s'appuie sur des données et contraintes RMN (Simon 2003; Nonier 2006; Carteau 2007; Tarascou 2007; Pianet 2008). C'est pourquoi la RMN a été largement employée depuis une quinzaine d'années pour décrire ces interactions d'un point de vue moléculaire (Luck 1994; Murray 1994; Baxter 1997; Charlton 2002; Charlton 2002; Simon 2003; Tarascou 2006; Schwarz 2008; Pascal 2009).

De l'ensemble de ces travaux, quelques résultats sont communément admis. D'une part, l'affinité des tanins pour les protéines en général augmente avec le degré de polymérisation des tanins utilisés (Baxter 1997; Sarni-Manchado 1999). Ensuite, les protéines salivaires, leur taille et leur richesse en proline semble augmenter l'affinité pour les tanins ((Charlton 1996), (Carvalho 2006)). D'autre part, la présence de proline empêche toute structuration de la protéine et donc facilite l'accès des tanins aux sites de fixations (Williamson 1994). Enfin, ces interactions peuvent conduire à la précipitation du complexe tanin-protéine, phénomène réversible dès lors que l'on dilue ou que l'on ajoute d'avantage de protéine (Luck 1994; Hagerman 1998; Jobstl 2004).

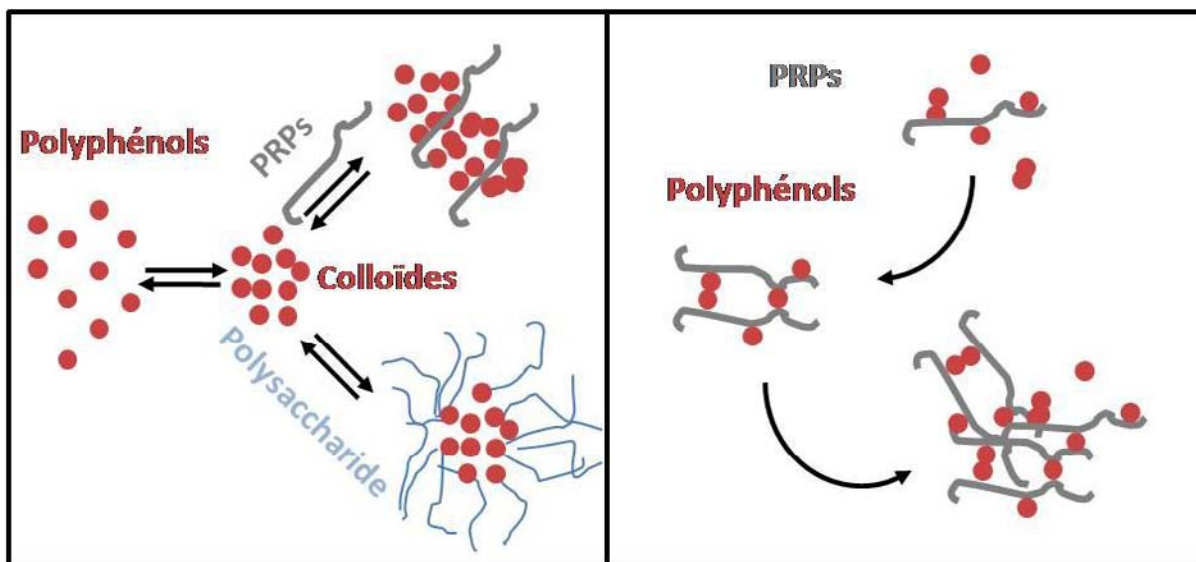


Figure I-12 : Schéma représentant l'astringence selon les mécanismes de Charlton (à droite) et d'Haslam (à gauche).

Quoiqu'il en soit, il y a formation d'un complexe tanins-protéines susceptible de former un trouble en solution voire de précipiter.

Chapitre I : Introduction

L'astringence, une sensation gouvernée par les interactions tanins – protéines

Là encore plusieurs modèles d'association/précipitation sont proposés. Selon le modèle de Haslam (fig I-12), cette complexation s'effectuerait en trois étapes.

Tout d'abord la protéine pourrait fixer un ou plusieurs tanins avec également la possibilité que les tanins libres se lient entre eux pour former des colloïdes. Ces colloïdes peuvent ensuite interagir avec la protéine. Ce premier complexe tanins-protéine formé peut se lier à une deuxième protéine où les colloïdes de tanins pourraient jouer le rôle de multidentate. Enfin plusieurs complexes de deux protéines et de plusieurs tanins pourraient s'associer entre eux pour former un complexe final conduisant au phénomène de précipitation. Cette précipitation semblerait réversible par un phénomène de dilution par ajout de protéines (Luck 1994).

Selon Charlton (fig I-9, gauche), il existerait une limite dans la formation de complexes tanins –protéines lors de la dégustation de vin du fait que chaque protéine ne peut fixer qu'un certain nombre de polyphénols et du fait que les tanins peuvent également interagir avec les polysaccharides présents dans le vin (Carvalho 2006; He 2006).

Par contre, la nature des interactions mises en jeu fait débat. Diverses écoles s'affrontent. La première prône une interaction majoritairement hydrophobe entre les cycles polyphénoliques des tanins et le noyau pyrrolidine de la proline ((Murray 1994; Murray 1994)). la seconde propose la formation de liaison hydrogène entre le C=O de la proline et les hydroxyles des phénol. La proline du fait de sa fonction amide tertiaire, augmente la capacité de la fonction carboxylique à accepter une liaison hydrogène (Haslam 1996; Simon 2003; Jobstl 2006). D'autres types d'interactions ont été mises en évidence par Clifford (Clifford 1986) mettant en jeu des liaisons électrostatiques avec les anions phénolates mais ne peuvent pas être prises en compte pour expliquer les interactions dans les conditions de pH du vin. Il est important de se rapprocher au plus près des conditions naturelles de cette complexation étant donné que plusieurs facteurs peuvent perturber la formation de ce type de complexe (concentration, solvant, pH, force ionique, nature des molécules impliquées).

En effet, lors de la formation de complexes tanins - protéines salivaires, plusieurs paramètres entrent en jeu. Les structures tridimensionnelles des protéines ainsi que celle des tanins et de leur capacité à s'auto-associer tiennent un rôle très important dans la formation des complexes. Mais il ya également, la longueur et le type de protéines rencontrées, ou encore, la nature et le degré de polymérisation des tanins utilisés qui influent sur cette formation.

Il est donc primordial pour comprendre la formation de ce type de complexe, de caractériser les propriétés physico-chimiques des interactions pour différentes procyanidines et différentes protéines.

E. Situation du sujet et Objectifs

D'après la littérature, il semblerait qu'il n'y ait pas de séquence spécifique d'interaction sur les protéines riches en proline ou en histidine mais un site privilégié en fonction d'une suite d'acides aminés entraînant une conformation propice à l'interaction. Ainsi, par le suivi des déplacements chimiques des protons de deux peptides riches en proline de 19 et 22 résidus n'ayant pas un enchaînement identique, Murray et ses collaborateurs constatent une affinité similaire des deux peptides vis-à-vis des polyphénols (Murray 1994). La particularité des sites tient majoritairement à la présence de résidus prolines.

L'existence de plusieurs sites de liaisons des tanins sur une même protéine est largement envisageable. En effet, Hagerman et Butler (Hagerman 1981) montrent que le nombre de tanins fixés augmente avec la taille de la protéine. Ce résultat est en accord avec une multiplicité des sites. L'interaction a également été suivie par la mesure de variation de turbidité de solutions contenant tanins et protéines (de Freitas 2001), ou encore par des essais compétitifs au moyen de protéines marquées (Hagerman 1981). Concernant le tanin, l'affinité PRP-tanin observée augmenterait avec le nombre de groupements galloylés que possèdent le tanin : Penta Galloyle Glucose > TétraGG > TriGG (Charlton 1996). De même, l'épicatéchine interagit davantage avec les PRPs lorsqu'elle est galloylée (de Freitas 2001). D'une manière générale, la régiospécificité (liaison interflavane 4-6 ou 4-8) ainsi que le degré de polymérisation du tanin seraient à l'origine de la différence d'affinité entre les PRPs et les tanins. Le dimère B3 (catéchine(4 β -8)-catéchine) formerait des complexes de plus grande taille avec les PRPs que le monomère catéchine de (de Freitas 2001). La constante de dissociation entre un peptide de 19 résidus et le PGG ou l'épigallocatechine galloylée varie d'un facteur dix autour du millimolaire (~10 mM et 1 mM respectivement), alors que le nombre de sites de liaison est estimé à 2 dans le premier cas et 8 pour le second (Charlton 2002).

La nature de l'interaction demeure quant à elle mal connue. Liaisons hydrogène et interactions hydrophobes seraient les forces majeures de l'interaction en conditions physiologiques (Clifford 1986). Selon certains auteurs, les tanins et les protéines interagiraient majoritairement *via* des interactions hydrophobes entre le groupement latéral (pyrrolidine) de la proline et les cycles aromatiques des polyphénols. Dans ce cas, les liaisons hydrogène, apparaissant comme secondaires, serviraient à stabiliser le complexe (Oh 1980; Luck 1994; Murray 1994). Spencer *et al.* suggèrent que la liaison de nature hydrophobe est formée par certains résidus aromatiques de la chaîne hydrocarbonnée des protéines (Spencer 1988). Cependant les PRPs et en particulier la protéine IB7, ne possèdent pas de résidus aromatiques dans leur séquence. D'après Baxter *et al.*, le stacking hydrophobe du phénol sur la proline est le mode d'interaction majeur sur un segment PRP de 19 résidus, mais dans 10% de DMSO qui paraît pas représenter un milieu hydroalcoolique mimant convenablement le vin (Baxter 1997). En revanche, d'autres études suggèrent que l'interaction provient de la formation de liaisons hydrogène

Chapitre I : Introduction

L'astringence, une sensation gouvernée par les interactions tanins – protéines

entre l'hydroxyle phénolique et le carbonyle du peptide (Hagerman 1981; Artz 1987). Peleg *et al.* suggèrent également que l'augmentation de l'astringence avec le degré de polymérisation des tanins serait due à la capacité des plus gros polymères à former davantage de liaisons hydrogène entre les groupements hydroxyles des composés phénoliques et le peptide (Peleg 1999). D'une manière générale, on parle de phénomène de surface (Haslam 1989) : les tanins seraient adsorbés à la surface des protéines en formant ainsi une monocouche hydrophobe.

La nature de l'interaction, les sites de fixations, la force de l'interaction sont des éléments qui font débat. Il semble donc important de focaliser nos recherches sur l'influence de la structure chimique des tanins et des protéines de la salive à l'égard des paramètres physicochimiques qui gèrent la formation des complexes tanins-protéines de manière stable au cours du temps. Le but à long terme, est d'essayer de corréler les données physicochimiques obtenues aux sensations ressenties en bouche par les œnologues.

Au sein du laboratoire, il a été montré que la combinaison des techniques de RMN, de spectrométrie de masse et du calcul moléculaire permettaient d'étudier les interactions entre un peptide modèle et représentatif des protéines salivaires, IB7₁₄, et un tanin que l'on retrouve dans les vins rouges, la procyanidine B3 (Simon 2003; Simon 2003). La structure spatiale (Tarascou 2006; Tarascou 2007) et le comportement colloïdal des tanins ont été également étudiés (Pianet 2008).

Dans l'étude des interactions entre les tanins du vin et les protéines de la salive, les protéines basiques riches en proline semblent être les plus aptes à fixer les polyphénols. La protéine IB7 apparaît donc comme une protéine représentative de la famille des PRPs basiques. Cette protéine de longueur peptidique de 59 acides aminés peut être subdivisée en trois parties homologues contenant les motifs conservés de 5 acides aminés et 9 acides aminés, représentatifs de la famille des PRPs basiques.

IB7 :

SPPHKPQGPPQGGNQPGPPPPGKPQGPPQGGNKPQGPPPGKPQGPPPQGDNKS⁵⁹

IB7 : SPPHKPQGPPPQGG¹⁴

NQPGPPPPGKPQGPPPQGG³⁴

NKPQGPPPGKPQGPPPQGDNKS⁵⁹

Figure I-13 : Analyse de la séquence de la protéine IB7 et de ses motifs répétés de 5 acides aminés (soulignés) et 9 acides aminés (en bleu).

Chapitre I : Introduction

L'astringence, une sensation gouvernée par les interactions tanins – protéines

Par conséquent, la protéine IB7 étant une protéine modèle représentative de sa famille, dans le cadre des études sur les protéines salivaires riches en proline, il est possible de travailler avec le peptide de 14 acides aminés que l'on nommera IB7₁₄. Ce peptide est un petit peptide intéressant. Il est constitué des 14 premiers acides aminés de la protéine IB7 et regroupe les deux types de séquences répétées.

Le travail décrit dans ce mémoire a plusieurs objectifs :

Nous souhaitons mesurer dans un premier temps l'influence de la structure et du comportement colloïdal sur l'affinité de différents tanins catéchiques à l'égard des protéines salivaires. Pour cela nous avons utilisé le modèle de peptide représentatif des protéines de la salive, le peptide IB7₁₄ et plusieurs procyanidines monomères, dimères et trimères qui présentent des différences significatives au niveau de leur structure tridimensionnelle et de leur comportement colloïdal. Le peptide IB7₁₄ représente une séquence que l'on retrouve dans un grand nombre de PRP à plusieurs reprises.

Dans un deuxième temps, nous avons mesuré l'influence de la structure et de la taille des protéines de la salive sur les paramètres physicochimiques de l'interaction. Notamment, nous avons choisi de travailler sur une PRP plus longue : IB9₃₇

(SPPHKPQGPPPQGG¹⁴NQPQGPPPGKPQGPPPQGGNKP³⁷)

Qui représente près de trois fois le peptide IB7₁₄.

Comme la littérature tendrait à indiquer que les histatines ont une affinité vis-à-vis des tanins, comparable à celle des PRPs (*vide supra*), nous avons souhaité déterminer l'affinité des tanins que nous avons utilisés vis-à-vis de l'histatine 3 (DSHAKRHHGYKRKFHEKHHSRGYRSNYLYDN³²). Les différents tanins utilisés dans cette étude sont des procyanidines synthétisées à partir de monomères de catéchine et d'épicatéchine identiques aux tanins issus du vin. Nous avons donc utilisé un monomère de catéchine, quatre dimères B1, B2, B3, et B4 et un trimère C2 dont la synthèse est détaillée dans le chapitre qui suit.

Les méthodes que nous avons utilisées sont principalement la RMN et la modélisation Moléculaire. Elles nous ont permis d'obtenir, les structures tridimensionnelles des peptides, de mesurer les constantes de dissociation et la stœchiométrie des complexes formés mais également de mesurer leur taille.

Nous commencerons dans le chapitre II par la description des synthèses réalisées. D'une part la synthèse des différentes procyanidines que nous avons utilisés dans cette étude et d'autre part la synthèse chimique en phase solide des différents peptides IB7₁₄, IB9₃₇ et histatine 3. Le chapitre III sera consacré aux méthodes physico-chimiques que nous avons utilisées. Les chapitres IV, V et VI

Chapitre I : Introduction

L'astringence, une sensation gouvernée par les interactions tanins – protéines

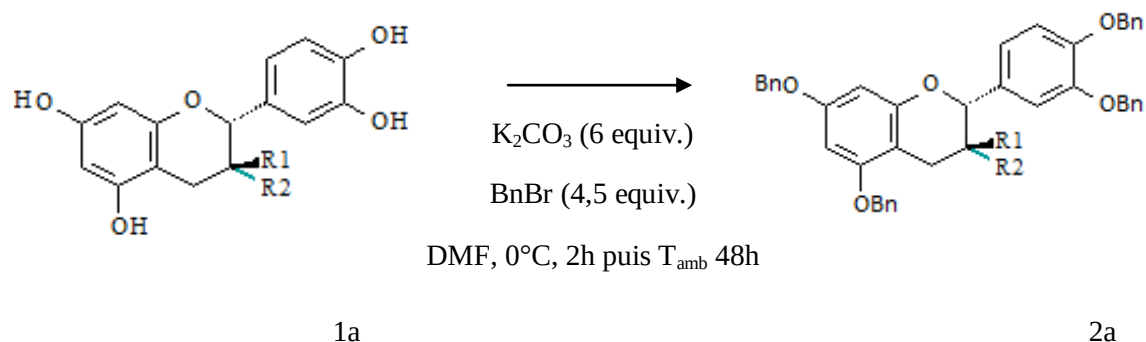
détailleront respectivement les résultats et discussions relatives au comportement des peptides et des procyanidines dans des milieux de composition variable.

Le chapitre VII fera le bilan de cette étude, où nous proposerons également les perspectives permises par ces travaux de thèse.

Chapitre II Synthèse des peptides et des procyanidines
--

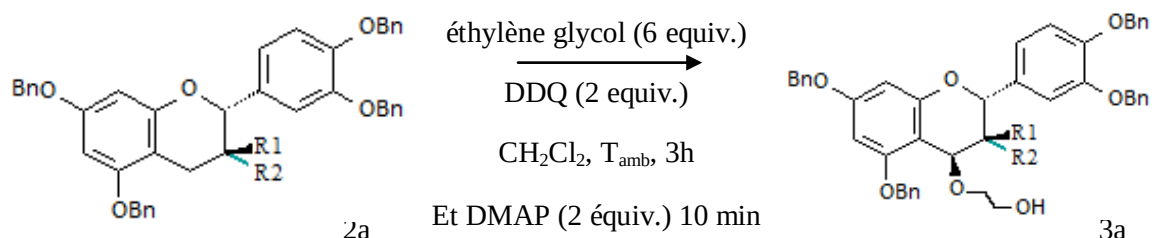
A. Synthèse des procyanidines

L'approche générale qui a été développée au laboratoire pour synthétiser des procyanidines liée en C4-C8 est basée sur le couplage stœchiométrique de deux unités monomères en utilisant comme catalyseur le TiCl_4 (Tarascou 2006). Ce couplage s'effectue d'une part entre un nucléophile, qui est le monomère (catéchine/épicatéchine) protégé sur ses fonctions phénoliques par un groupement benzyle (2a) et un électrophile qui sera le monomère protégé 2a activé par l'éthylène glycol en C4 et protégé en C8. L'étape de protection se fait de la manière suivante :

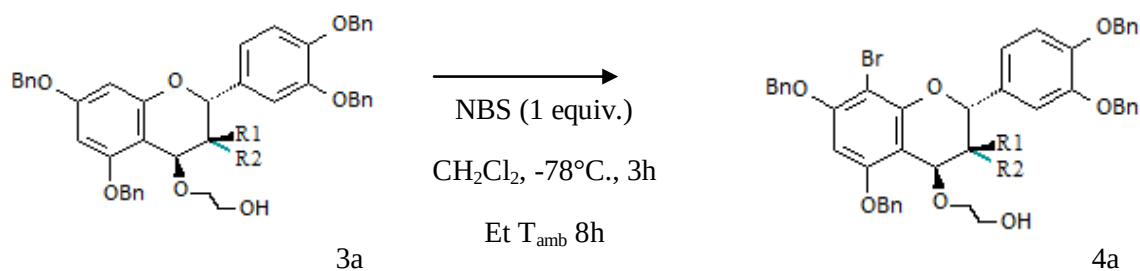


La purification est réalisée sur colonne de gel de silice (100% dichlorométhane). Son rendement est de 81 % pour la catéchine ($\text{R}_1=\text{OH}$) et de 83 % pour l'épicatéchine ($\text{R}_2=\text{OH}$).

L'activation se fait de la manière suivante :

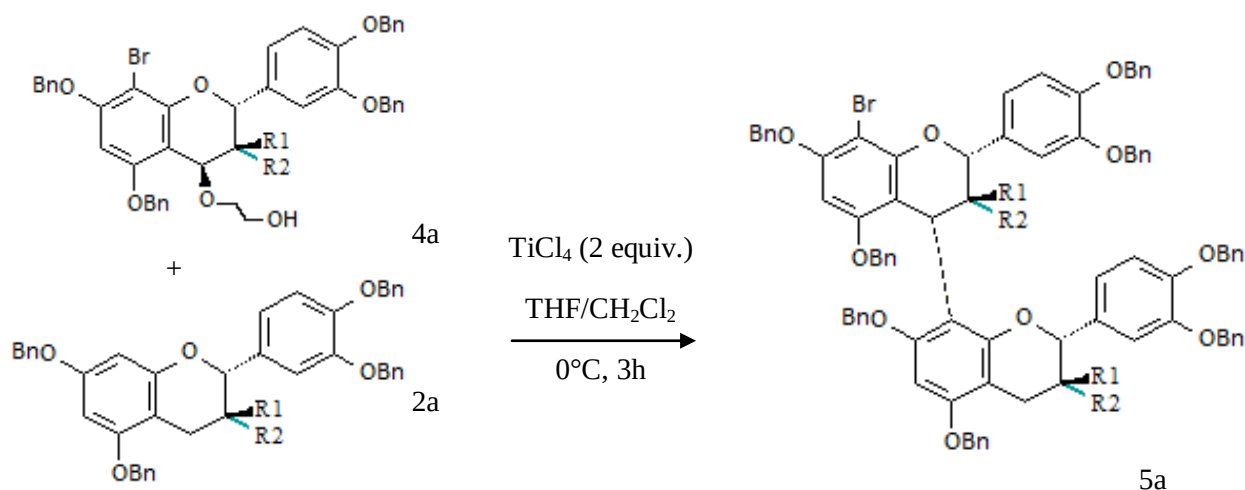


La purification est réalisée sur colonne de gel de silice (éther de pétrole/acétate d'éthyle 50/50). Cette étape se faisant avec un rendement de 69% pour la catéchine protégée et 63 % pour l'épicatéchine protégée et la protection en C8 se fait comme suit avec un rendement proche de 99 % quelque soit le produit de départ :



Cette stratégie est inspirée de deux publications différentes : celle de Tückmantell et al (Kozikowski 2001) qui proposa la technique de couplage entre une unité électrophile et une unité nucléophile en utilisant le TiCl_4 comme catalyseur ; cette méthode, novatrice, ne permettait pas cependant de contrôler le degré de polymérisation des procyanidines formées ; et celle de Saito et al (Saito 2003) , qui proposa de protéger le C8 du cycle A de façon à limiter la polymérisation incontrôlée.

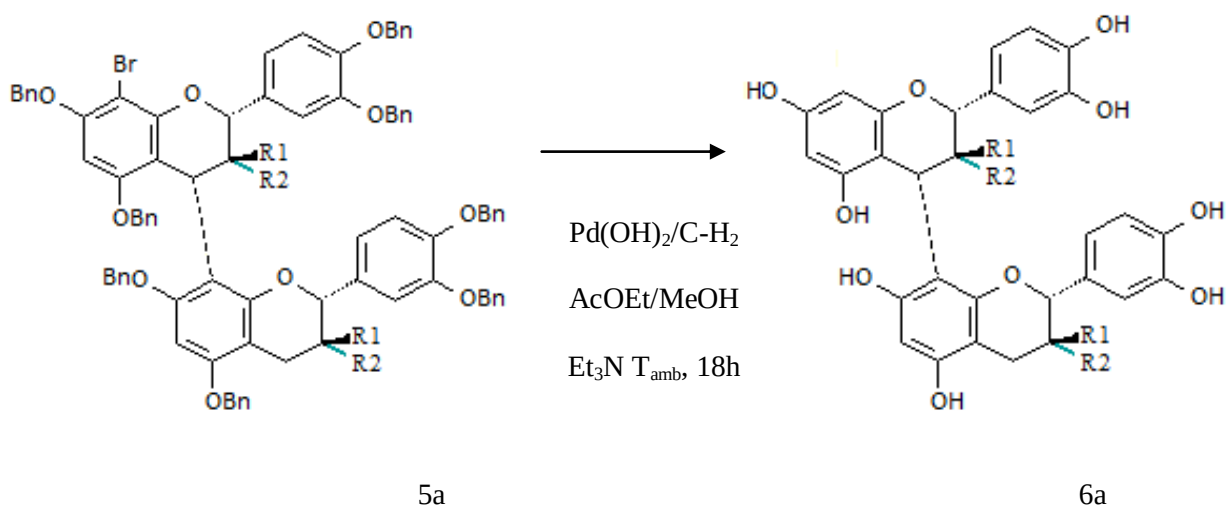
L'étape de couplage se fait : entre l'électrophile 4a et le nucléophile 2a :



La purification est réalisée sur colonne de gel de silice (pentane/acétate d'éthyle 80/20).

Ce couplage permet de synthétiser les stéréoisomères naturels avec un rendement de 67 % avec la catéchine et 59 % avec l'épicatéchine.

Cette méthode de synthèse est intéressante à deux niveaux parce que le produit de couplage 5a peut ou bien être déprotégé, et on peut ainsi obtenir les 4 dimères en 4-8 possibles. Cette déprotection se fait en une seule étape :



La purification est réalisée sur colonne de gel de silice (acétone/méthanol 96/4).

Et l'ensemble des 4 dimères est obtenu avec un rendement global de : 29% pour B1, 27 pour B2, 38 pour B3 et 30 pour B4.

Ce produit de couplage 5a permet également d'atteindre la synthèse d'oligomères de degrés de polymérisation plus élevés, selon deux voies différentes :

Voie 1 : Le dimère C8-bromé et décabenzylé 5a peut être utilisé en tant que nucléophile après sa débromation. L'étape de couplage se fait avec l'électrophile 4a, et donne accès à un trimère bromé et pentabenzylé. Cette voie conduit au trimère C2, par exemple (Cat-Cat-Cat) avec un rendement global de 27%.

Voie 2 : Le dimère C8-bromé et décabenzylé 5a peut être en position F4 et sert, à ce moment là d'électrophile. On peut y coupler le nucléophile 2a et obtenir le même trimère que par la voie 1. Cette voie conduit à la synthèse du trimère C2 avec un rendement de 18 %.

Toutes les réactions ont été réalisées sous argon sous agitation et avec des solvants anhydres.

Les réactions ont été suivies sur chromatographie sur couche mince (CCM) avec des conditions d'élution identiques à celles des purifications.

B. Synthèse peptidique

La synthèse de nos différents peptides a été effectuée selon la stratégie de Merrifield (Merrifield 1963) en phase solide à l'aide d'un synthétiseur de peptide ABI 433A (cf annexe) en utilisant la chimie de type FastMoc, plus douce et mieux adaptée que la méthode Boc. La synthèse des différents peptides :

IB7₁₄ (¹SPPGKPQGPPPQGG¹⁴)

IB9₃₇ (¹SPPGKPQGPPPQGGNQPPQGGPPPPGKPQGPPPQGGNR³⁷)

Histatine3 (¹DSHAKRHHGYKRKFHEKHHSRGRYSNYLYDN³²)

ont été effectuées sur le synthétiseur de peptide Applied Biosystem Peptide Synthesizer 433A (PE Biosystem, Courtaboeuf, France) en utilisant une chimie propre à la synthèse sur support solide de type FastMoc. Le résultat de synthèse a ensuite été purifié par HPLC (Water 2487 avec un détecteur d'absorbance à double longueur d'onde) en utilisant une colonne à phase inverse Nova Pak C18 (Alliance chromatographic system, Waters, Saint-Quentin-en-Yvelines, France) et un gradient variant de 100% H₂O à 100% d'acétonitrile. La pureté a été contrôlée par spectrométrie MALDI-TOF dont le principe est repris en Annexe B.

a) Principe de la synthèse peptidique en phase solide

Nous rappelons seulement ici le principe, les détails sont donnés dans l'annexe A.

Ce principe est basé sur l'utilisation d'un support solide, qui doit être inerte vis-à-vis des réactifs de synthèse et réactifs. Il se présente sous la forme d'une résine de type Wang. Cette résine a la particularité d'être pré-chargée : elle porte le résidu aminé par lequel la synthèse doit débuter. Comme cette synthèse se fait de l'acide aminé C-terminal vers l'acide aminé N-terminal, la résine doit être préchargée avec le résidu carboxy terminal du peptide à synthétiser. Tous les acides aminés sont protégés au niveau de leur fonction amine par un groupement Fmoc.

La figure II-1 présente le schéma général de cette synthèse peptidique qui se fait en 4 étapes : la déprotection, l'activation, le couplage et le « capping ».

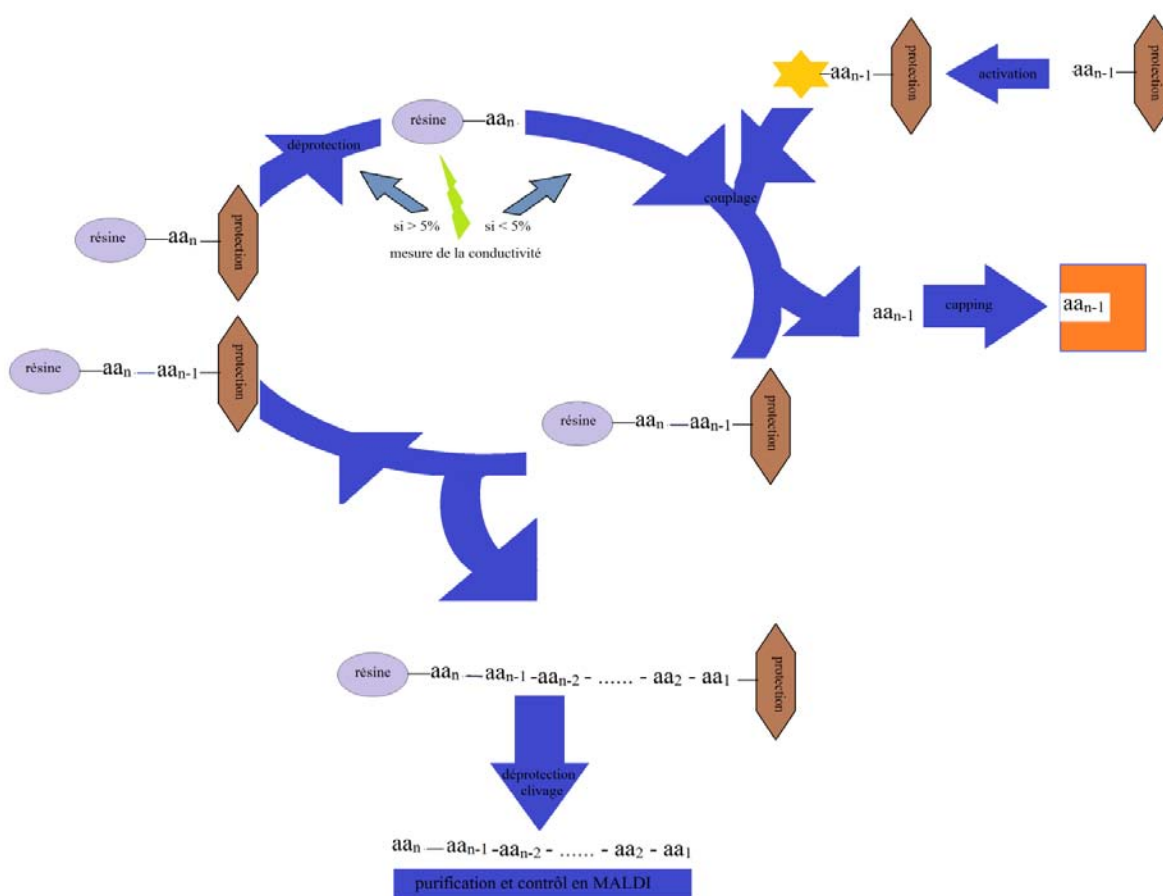


Figure II-1 : Schéma général de synthèse peptidique sur support solide. Chaque acide aminé est protégé par un groupement Fmoc schématisé en marron. L'acide aminé C-terminal est directement greffé sur la résine (violet). Après une étape de déprotection contrôlée par mesure de la conductivité, l'acide aminé n-1 est activé avant l'étape de couplage. Le peptide ainsi formé est renvoyé dans la boucle de synthèse jusqu'à obtention du peptide finale qui subira une étape de clivage permettant de libérer le peptide de la résine.

Etape de déprotection :

Cette première étape consiste à retirer le groupement protecteur de l'acide aminé C-terminal chargé sur la résine qui rendra accessible sa fonction amine, laquelle pourra réagir avec le carbonyle activé de l'acide aminé qui suit. Cette déprotection est assurée par une amine secondaire, la pipéridine.

Etape d'activation :

Avant de réaliser le couplage du deuxième acide aminé, une étape d'**activation** est nécessaire pour transformer la partie acide carboxylique en ester activé. Cette étape est assurée par l'action d'HBTU, d'HOBt et de la DIEA simultanément.

Etape de couplage :

L'étape suivante est le **couplage** qui permet de lier les deux acides aminés (acide aminé déprotégé AA_{N+1} et l'acide aminé activé (toujours protégé avec un groupement Fmoc) AA_N).

Etape de « capping » :

L'étape de couplage n'étant pas totale (rendement de 99%), la formation de peptides délétés ou tronqués lors de la synthèse peut avoir lieu. L'étape de « capping » permet de s'affranchir de la synthèse de peptides « délétés » et consiste à bloquer les fonctions amines qui n'ont pas réagies. Cette étape est assurée par l'anhydride acétique. Après chaque étape de déprotection, une mesure de la conductivité est réalisée. Lors de la déprotection, la pipéridine libre peut réagir avec un dibenzofulvène pour donner du dibenzofulvène-pipéridine quantifiable en UV à 301 nm. Des sels de carbamate sont également produits et peuvent être suivis par conductimétrie. Une autre étape de déprotection est programmée jusqu'à ce que la différence entre deux mesures successives de conductivité après deux étapes de déprotection successives soit inférieure ou égale à 5%. Dans ce cas, on estime que la déprotection de toutes les amines a eu lieu.

Voici un exemple de suivi de conductivité pour la synthèse du peptide IB7₁₄, pour les 4 premiers résidus, G14-G13-Q12-P11.

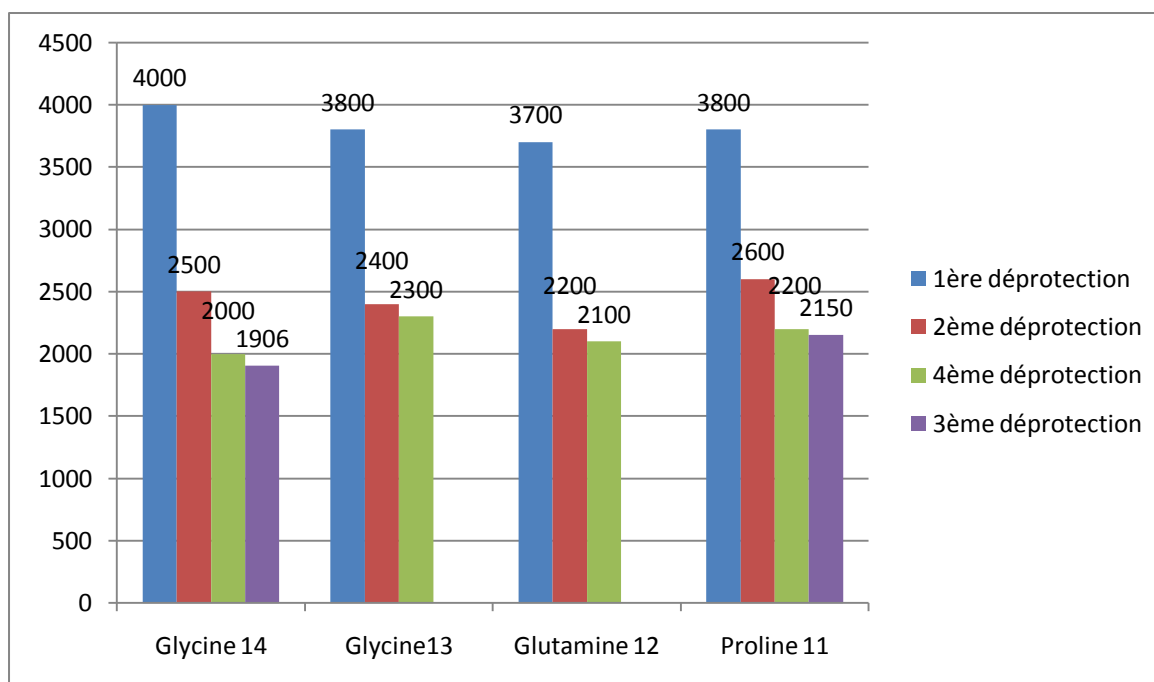


Figure II-2 : Monitoring de la conductivité pour contrôler la déprotection lors de synthèse peptidique sur support solide.

Pour le premier acide aminé, nous avons la première mesure de conductivité à 4000 (UA), pour la deuxième déprotection la mesure est de 2500 UA soit une différence de : $(4000-2500) / 4000 = 37,5\%$. Entre la 2^{ème} et la 3^{ème} déprotection nous avons : $(2500-2000) / 2500 = 25\%$. Entre la 3^{ème} et la 4^{ème} déprotection nous avons : $(2000-1906) / 2000 = 4,7\%$. La déprotection s'achève donc après la 4^{ème} mesure.

L'étape de déprotection peut être plus ou moins longue. Ceci est dû à la nature de l'acide aminé à déprotéger comme lors de la déprotection de résidus arginine. D'autres perturbations peuvent apparaître au niveau du monitoring, des exemples sont expliqués en Annexe A

Un cycle correspond à l'ensemble des actions de déprotection de l'amine de l'acide aminé C-terminal, de l'activation du carbonyle de l'acide aminé à lier, du couplage et du « capping ». Il y a autant de cycles que d'acides aminés à ajouter.

A la fin de la synthèse peptidique, la résine est récupérée et séchée au dessiccateur pendant 4 heures.

b) Purification des peptides et contrôle de leur pureté

Les différents peptides sont obtenus après leur séparation de la résine, leur purification et le contrôle de leur pureté par HPLC couplée à la spectrométrie de masse.

Etape de clivage :

Afin de séparer la résine du peptide néo-synthétisé, une étape de clivage en milieu acide est nécessaire. Pour cela la résine-peptide est pesée puis lavée par trois cycles de deux solutions : méthanol puis dichlorométhane. A chaque cycle la résine-peptide est filtrée (fritté de porosité 4). La solution de clivage est composée de TFA/phénol/H₂O/TIPS (88/5/5/2). La résine-peptide est dissoute dans cette solution sous agitation amagnétique durant 1 heure. Lors du clivage, la solution de résine change de couleur et devient jaune. Le mélange résine seule et peptide néo-synthétisé est lavé au DCM puis filtré. Le peptide récupéré est précipité avec de l'éther froid (-20°C).

Etape de purification :

L'étape de purification est faite par HPLC en phase inverse sur une colonne C18 (5µm, 100 Å, 3,9 x 150mm). L'élution est réalisée suivant un gradient de 100% de A (eau/TFA 0,1%) à 100% de B (acétonitrile/TFA 0,08%) sur une durée variable en fonction du peptide à purifier et avec un débit variant de 0,5 ml/min à 2 ml/min toujours suivant le peptide. Le peptide est détecté en UV à deux longueurs d'ondes (214 nm représentative des liaisons peptidiques et 254 nm représentative des groupements aromatiques). Les chromatogrammes des différents peptides synthétisés sont présentés dans la figure II-3. Le peptide IB₇₁₄ est élué à 11 min, celui d'IB₇₃₉ à 21 min et celui de la HRP à 25 min. Chaque fraction contenant les peptides est récupérée, et leur pureté est contrôlée en spectrométrie de masse en mode MALDI-TOF.

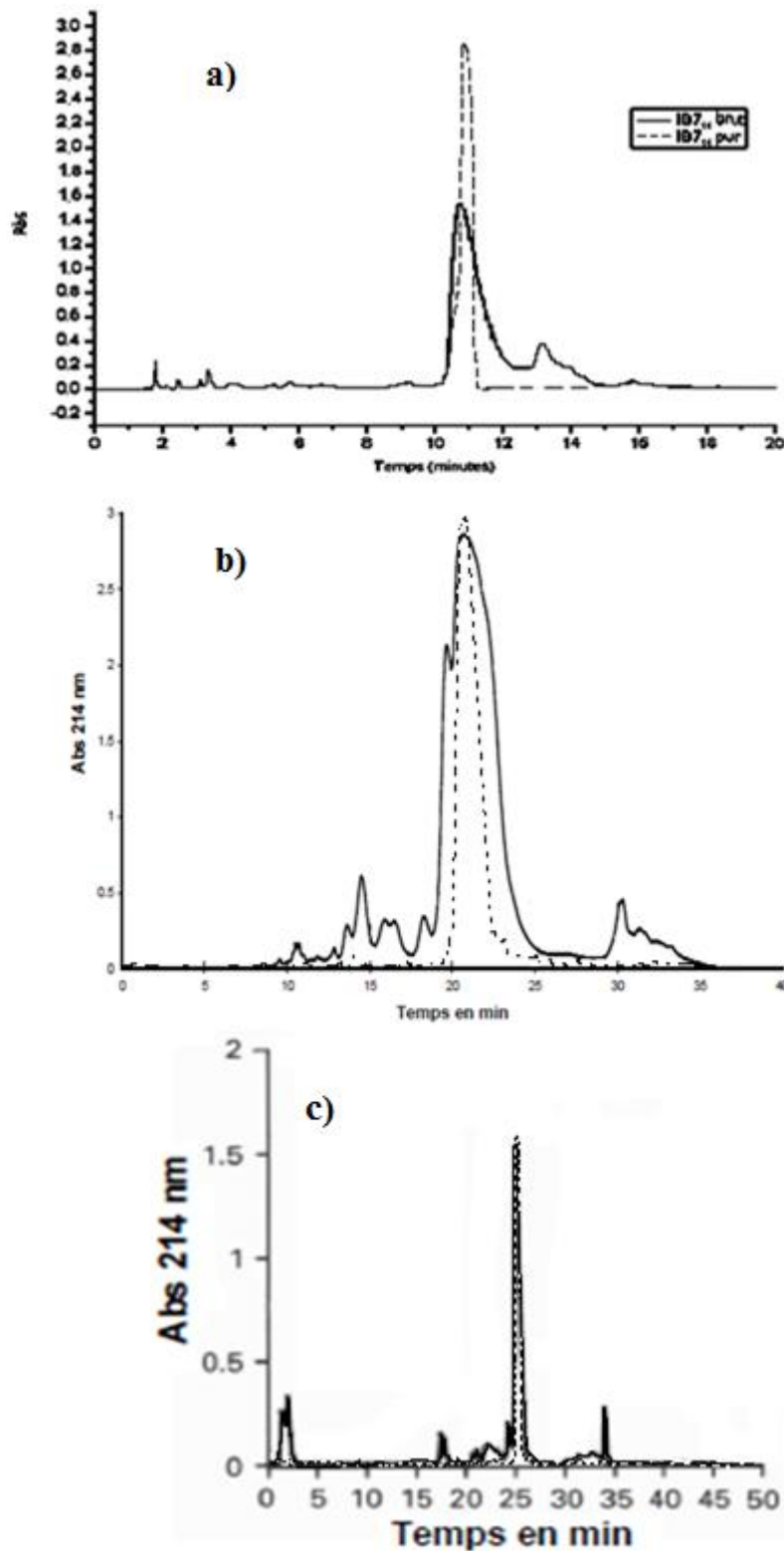


Figure II-3: Chromatogrammes obtenus après synthèse du peptide IB7₁₄ en pointillé (a), IB9₃₇ (b) et Histatine 3 (c) par HPLC en phase inverse, équipée d'une colonne C18, sous un gradient linéaire H₂O/Acétonitrile (de 100/0 à 0/100) sur 40 min délivré avec un débit de 1 ml/mn. Le chromatogramme en trait plein représente le brut, celui en pointillé le chromatogramme du peptide purifié.

Contrôle de la pureté des peptides synthétisés :

Ce contrôle est effectué par spectrométrie de masse MALDI-TOF (Bruker Reflex III), dont le principe est donné en Annexe B, et qui donnera la masse du peptide synthétisé et permettra de voir si d'autres peptides sont présents dans la solution. Pour l'analyse de nos échantillons, l'acide α -cyano-4-hydroxy-cinnamique a été utilisé comme matrice. La figure II-4 présente les spectres maldi de chacun des 3 peptides synthétisés, montrant la pureté des échantillons.

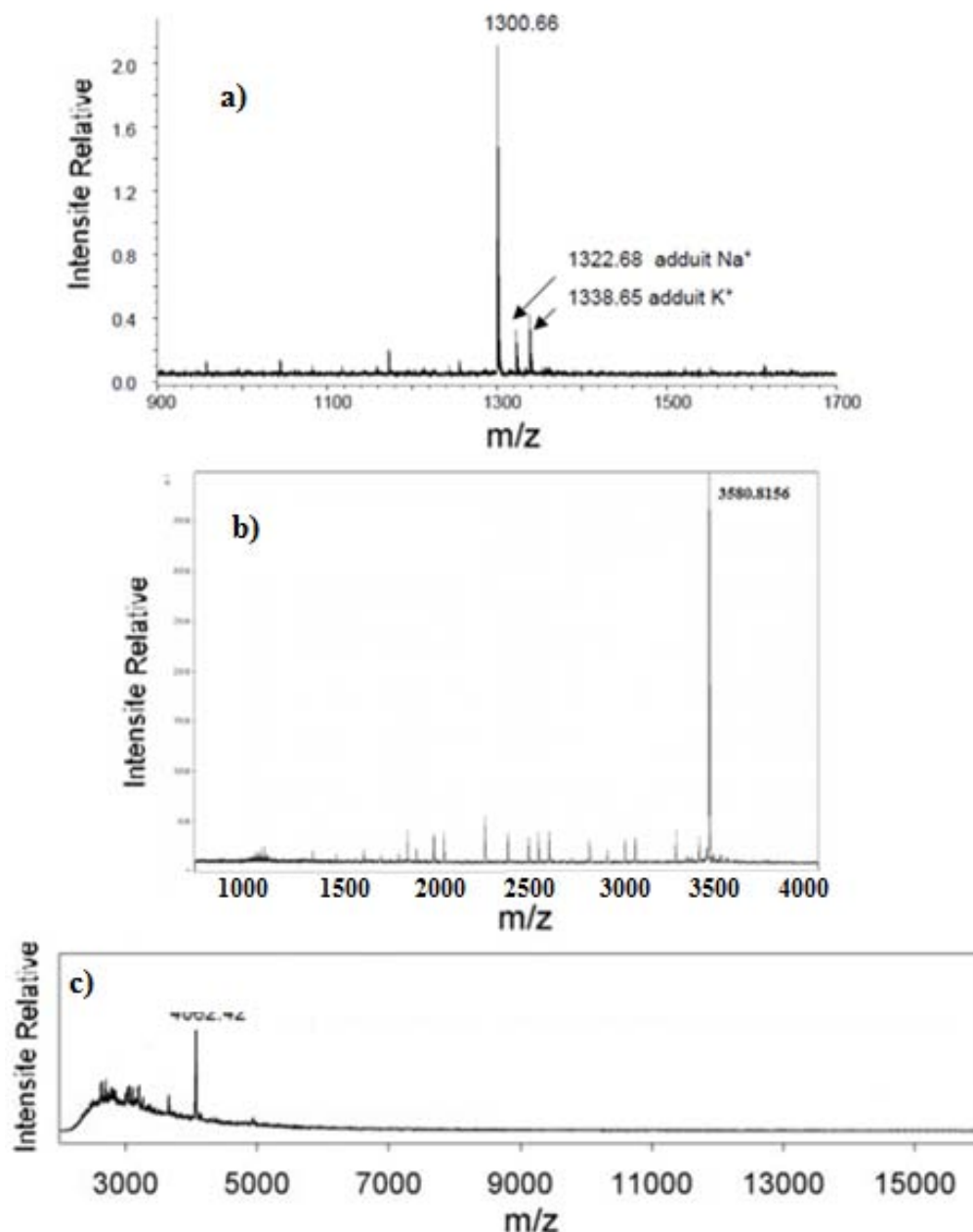


Figure II-4 : Spectres de masse en MALDI-TOF : a), brut de synthèse du peptide IB7₁₄ dont le pic majoritaire de 1300,66 Da correspond au peptide IB7₁₄ monoisotopique (M+H). b), spectre du brut de synthèse du peptide IB9₃₇ de masse monoisotopique M+H = 3580,81 Da. c), le spectre du brut de synthèse de l'histatine 3 de masse monoisotopique M+H = 4062,42 Da. La présence d'autres pics traduit l'impureté de la solution.

Le spectre effectué sur le brut de synthèse d'IB7₁₄ montre la présence d'un pic largement majoritaire d'un rapport masse/charge (m/z) de 1300,66. Ce pic correspond au peptide IB7₁₄ de masse mono isotopique de 1300,66 soit de masse exacte 1299,66 g.mol⁻¹, montrant ainsi que la synthèse a été faite avec un très bon rendement. Les impuretés présentes dans l'échantillon ont été éliminées par HPLC en phase inverse. La figure II-3 montre les chromatogrammes obtenus avant (en trait plein) et après (en pointillé) la purification. Sur le brut, les pics élués le plus rapidement correspondent aux groupements protecteurs. Le pic étalé reflète un mélange de plusieurs produits peptidiques ayant une composition de nature très proche. Après fractionnement, seul le peptide IB7₁₄ est présent dans la solution. La pureté de la fraction peptidique apparaît nettement sur le spectre car seul le pic correspondant au temps d'élution du peptide (~11 minutes) est présent. A l'issue de cette chromatographie, le succès de la purification est confirmé par spectrométrie de masse dont le spectre correspond à la masse du peptide (avec ou sans adduits). Le rendement obtenu pour la synthèse du peptide IB7-14 est de 59% après purification, ce qui fait un taux de greffage par acide aminé de $\sqrt[13]{0,59}$; soit 96%. Cette valeur est proche du rendement théorique maximal proposé par la technique qui est de 98%. 35 mg de peptide IB7₁₄ pur ont été synthétisés.

Le spectre effectué sur le brut de synthèse d'IB9₃₇ montre la présence d'un pic largement majoritaire d'un rapport masse/charge (m/z) de 3580,81 Da. Ce pic correspond au peptide IB9₃₇ de masse mono isotopique de 3580, 81 soit de masse exacte 3579, 82 g.mol⁻¹. Les impuretés présentes dans l'échantillon ont été éliminées par HPLC en phase inverse. La figure II-3 montre les chromatogrammes obtenus. Le pic à 21 min est passé en spectrométrie de masse qui montre la présence majoritaire du peptide IB9₃₇ avec quelques pics correspondant au peptide ayant subi quelques délétions. La pureté de la fraction peptidique apparaît nettement sur le spectre par l'intensité relative de chaque pic. Le rendement obtenu pour la synthèse du peptide IB9₃₇ est de 23 % après purification, ce qui fait un taux de greffage par acide aminé de $\sqrt[36]{0,23}$; soit 96%. 13 mg de peptide IB9₃₇ pur ont été synthétisés.

Le spectre effectué sur le brut de synthèse de l'Histatine 3 montre la présence d'un pic majoritaire avec un rapport masse/charge (m/z) de 4062,42 Da. Ce pic correspond au peptide His 3 de masse mono isotopique de 4062,42 soit de masse exacte 4061,40 g.mol⁻¹. Les impuretés présentes dans l'échantillon ont été éliminées par HPLC en phase inverse. La figure II-3 montre les chromatogrammes obtenus. Le pic à 25 min est passé en spectrométrie de masse qui montre la présence majoritaire du peptide Histatine 3 avec quelques pics correspondant au peptide ayant subi quelques délétions. La pureté de la fraction peptidique apparaît nettement sur le spectre par l'intensité relative de chaque pic. Le rendement obtenu pour la synthèse de l'histatine 3 est de 15% après purification, ce qui fait un taux de greffage par acide aminé de $\sqrt[31]{0,15}$; soit 94%. 18 mg d'histatine 3 pure ont été synthétisées.

En résumé, nous avons produit les molécules suivante :

B1 (60 mg), B2 (60 mg), B3 (40 mg), B4 (40 mg) et C2 (100 mg)

Les peptides IB7₁₄, IB9₃₇, et His 3 avec une pureté estimé par spectrométrie de masse > 95%.

Ces molécules seront étudiés dans les chapitres IV, V et VI. Nous allons rappeler brièvement dans le chapitre suivant la stratégie et les méthodes physico-chimiques que nous avons employé

Caractérisation des produits par RMN :

RMN 1H (300 MHz, CDCl₃, ppm)

(2a) 3',4',5,7-tetra-O-benzylcatechine : δ = 7,48-7,28 (H aromatiques Bn, m, 20H) ; 7,05 (H2', s, 1H) ; 6,98 (H5' et H6', s, 2H) ; 6,29 et 6,23 (H6 et H8, d, 2H, J_{6,8} = 2,3 Hz) ; 5,20 (CH₂Bn, s, 2H) ; 5,19 (CH₂Bn, s, 2H) ; 5,05 (CH₂Bn, s, 2H) ; 5,01 (CH₂Bn, s, 2H) ; 4,65 (H2, d, 1H, J_{2,3} = 8,3 Hz) ; 4,03 (H3, m, 1H) ; 3,13 et 2,67 (H4a et H4b, ABX, 2H, J_{4a,4b} = 16,4 Hz, J_{4a,3} = 5,6 Hz et J_{4b,3} = 8,9 Hz).
3',4',5,7-tetra-O-benzylepicatchine : δ = 7,47-7,35 (H aromatiques Bn, m, 20H) ; 7,18 (H2', d, 1H, J_{2',6'} = 1,2 Hz) ; 7,02 (H6', dd, 1H, J_{6',5'} = 8,4 Hz, J_{6',2'} = 1,2 Hz) ; 6,99 (H5', d, 1H, J_{5',6'} = 8,4 Hz) ; 6,30 (H6 et H8, s, 2H) ; 5,21 (CH₂Bn, s, 2H) ; 5,17 (CH₂Bn, s, 2H) ; 5,07 (CH₂Bn, s, 2H) ; 5,03 (CH₂Bn, s, 2H) ; 4,93 (H2, s, 1H) ; 4,23 (H3, m, 1H) ; 3,02 et 2,95 (H4 α et H4 β , ABX, 2H, J_{4 α ,4 β} = 17,2 Hz, J_{4 α ,3} = 1,5 Hz et J_{4 β ,3} = 4,3 Hz).

RMN 1H (300 MHz, CDCl₃, ppm)

(3a) 3',4',5,7-tetra-O-benzyl-4 β -(2-hydroxyethyloxy)catechine: δ = 7,62-7,30 (H aromatiques Bn, m, 20H) ; 7,21 (H2', d, 1H, J_{2',6'} = 1,5 Hz) ; 7,09 (H6', dd, 1H, J_{6',5'} = 8,3 Hz, J_{6',2'} = 1,5 Hz) ; 6,97 (H5', d, 1H, J_{5',6'} = 8,3 Hz) ; 6,37 (H6, d, 1H, J_{6,8} = 1,9 Hz) ; 6,27 (H8, d, 1H, J_{8,6} = 1,9 Hz) ; 5,27 (CH₂Bn, s, 2H) ; 5,19 (CH₂Bn, s, 2H) ; 5,12 (CH₂Bn, s, 2H) ; 5,03 (CH₂Bn, s, 2H) ; 4,96 (H2, d, 1H, J_{2,3} = 12 Hz) ; 4,86 (H4, d, 1H, J_{4,3} = 3,4 Hz) ; 3,98-3,83 (H9 et H3, m, 3H) ; 3,76-3,58 (H10, m, 2H).

3',4',5,7-tetra-O-benzyl-4 β -(2-hydroxyethyloxy)épicatéchine : δ = 7,50-7,20 (H aromatiques Bn, m, 20H) ; 7,19 (H2', d, 1 H, J_{2',6'} = 1,5 Hz) ; 7,08 (H6', dd, 1H, J_{6',5'} = 8,3 Hz, J_{6',2'} = 1,5 Hz) ; 6,97 (H5', d, 1H, J_{5',6'} = 8,3 Hz) ; 6,33 (H6, d, 1H, J_{6,8} = 2,3 Hz) ; 6,30 (H8, d, 1H, J_{8,6} = 2,3 Hz) ; 5,23 (CH₂Bn, s, 2H) ; 5,21 (CH₂Bn, s, 2H) ; 5,14 (CH₂Bn, s, 2H) ; 5,09 (H2, d, 1H, J_{2,3} = 6,8 Hz) ; 4,96 (CH₂Bn, s, 2H) ; 4,63 (H4, d, 1H, J_{4,3} = 2,6 Hz) ; 4,00 (H3, dd, 1H, J_{3,4} = 2,6 Hz, J_{3,2} = 5,3 Hz) ; 3,98-3,65 (H9 et H10, m, 4H).

RMN 1H (300 MHz, CDCl₃, ppm)

(4a) 3',4',5,7-tetra-O-benzyl-4 β -(2-hydroxyethyloxy)-8-bromo-catechine: δ = 7,53-7,23 (H aromatiques Bn, m, 20H) ; 7,17 (H2', d, 1H, J_{2',6'} = 1,9 Hz) ; 7,05 (H6', dd, 1H, J_{6',5'} = 8,3 Hz, J_{6',2'} = 1,9 Hz) ; 6,96 (H5', d, 1H, J_{5',6'} = 8,3 Hz) ; 6,28 (H6, s, 1H) ; 5,23-4,99 (4 CH₂Bn, m, 8H) ; 5,09

(H2, d, 1H, J_{2,3} = 10,6 Hz) ; 4,82 (H4, d, 1H, J_{4,3} = 3,4 Hz) ; 3,86 (H9, m, 2H) ; 3,77 (H3, m, 1H) ; 3,66 (H10, m, 2H).

3',4',5,7-tetra-O-benzyl-4β-(2-hydroxyethoxy)-8-bromo-epicatechine: δ = 7,53–7,26 (H aromatique, m, 20H) ; 7,24 (2'H, d, 1H, J_{2',6'} = 1,5 Hz) ; 7,05 (H6', dd, 1H, J_{6',5'} = 8,3 Hz, J_{6',2'} = 1,5 Hz) ; 6,99 (H5', d, 1H, J_{5',6'} = 8,3 Hz) ; 6,29 (H6, s, 1H) ; 5,24–5,05 (4 CH₂Bn, m, 8H) ; 5,03 (H2, d, 1H, J_{2,3} = 6,8 Hz) ; 4,65 (H4, d, 1H, J_{4,3} = 2,6 Hz) ; 4,05 (H3, m, 1H) ; 3,84–3,66 (H9 et H10, m, 4H)

RMN 1H (300 MHz, CDCl₃, ppm)

(5a) Dimère B1BnBr: δ = 7,50–7,26 (H aromatiques, m) ; 7,21–6,80 (H2'B/E, H5'B, H6'B/E, 5'EH, Maj et min) ; 6,64 (H2'E/B, Maj, d, J_{2',6'} = 1,5 Hz) ; 6,35 (H6D, Maj, s) ; 6,32 (H6'E/B, Maj ; dd, J_{6',5'} = 8,3 Hz, J_{6',2'} = 1,9 Hz) ; 6,20 (H6A, min, s) ; 6,17 (H6D, min, s) ; 6,05 (H6A, Maj, s) ; 5,45 (H2C, Maj, s) ; 5,38 (H2C, min, s) ; 4,85 (H4C, Maj, d, J_{3C,4CMaj} = 1,1 Hz) ; 4,73 (H4C, min, d, J < 1 Hz) ; 4,62 (H2F, min, d, J_{2F,3F min} = 8,5 Hz) ; 4,07 (H3C, Maj, d, J_{3C,4CMaj} = 1,1 Hz) ; 3,93 (H3C, min, m) ; 3,69 (H3F, Maj, m) ; 3,58 (H2F, Maj, d, J_{2F,3FMaj} = 11,3 Hz) ; 3,23 et 2,55 (H4Fa et H4Fb, Maj, ABX, J_{4Fa,4Fb Maj} = 16,7 Hz avec J_{4Fa,3F Maj} = 6,4 Hz et J_{4Fb,3F Maj} = 9,8 Hz) ; 3,14 et 2,68 (H4Fa et H4Fb, min, ABX, J_{4Fa,4Fb min} = 16,2 Hz avec J_{4Fa,3F min} = 5,3 Hz et J_{4Fb,3F min} = 9,0 Hz)

Dimère B2BnBr: δ = 7,52–7,25 (H aromatiques, m) ; 7,22–6,74 (H2'B, H2'E, H5'B, H5'E, H6'E/B, m) ; 6,35 (H6D, Maj, s) ; 6,28 (H6'B/E, d, J_{2',6'} = 8,3 Hz) ; 6,23 (H6A, min, s) ; 6,20 (H6D, min, s) ; 6,13 (H6A, Maj, s) ; 5,57 (H2F, Maj, s) ; 5,37 (H2F, min, s) ; 5,25–4,96 (CH₂Bn, H2F, min, m) ; 4,89 (H2F, Maj, s) ; 4,33 (H3F, Maj, m) ; 4,12 (H3C, min, s) ; 4,00 (H3C, Maj, s) ; 3,81 (H3F, min, d, J = 3,6 Hz) ; 3,00–2,84 (H4Fα et H4Fβ, Maj et min, m).

Dimère B3BnBr: δ = 7,56–7,24 (H aromatiquesBn, m) ; 7,19–7,04 (H2'B et H2'E, min et Maj) ; 6,99–6,83 (H5'B, min et Maj, H5'E Maj) ; 6,93–6,83 (H6'B, min et Maj) ; 6,78 (H5'E, min, d, J_{5',6'Emin} = 1,5 Hz) ; 6,32 (H6D, Maj, s) ; 6,29 (H6'E, min, d, J_{6',5'Emin} = 1,5 Hz) ; 6,26 (H6A, min et H6'E, Maj) ; 6,24 (H6A, Maj, s) ; 6,15 (H6D, min, s) ; 5,34–4,49 (CH₂Bn, min et Maj, m) ; 4,88 (H4C, min, d, J_{4,3Cmin} = 8,3 Hz) ; 4,80 (H4C, Maj, d, J_{4,3CMaj} = 9,03 Hz) ; 4,62 (H2C, min et Maj, d, J_{2,3C} = 9,8 Hz) ; 4,44 (H2F, min, d, J_{2,3Fmin} = 8,7 Hz) ; 4,32 (H3C, Maj, m) ; 4,19 (H3C, min, m) ; 3,73 (H3F, min et Maj, m) ; 3,72 (H2F, Maj, d, J_{2,3F Maj} = 12,1 Hz) ; 3,26 et 2,70 (H4Fa et H4Fb, min, ABX, J_{4Fa,4Fb min} = 16,6 Hz avec J_{4Fa,3F min} = 5,8 Hz et J_{4Fb,3F min} = 9,4 Hz) ; 3,11 et 2,46 (H4Fa et H4Fb, Maj, ABX, J_{4Fa,4Fb Maj} = 16,2 Hz avec J_{4Fa,3F Maj} = 4,9 Hz et J_{4Fb,3F Maj} = 8,5 Hz).

Dimère B4BnBr : δ = 7,49–6,80 (H aromatiquesBn, m, 40H) ; 7,22–6,67 (H2'B, H5'B, H6'B, H2'E, H5'E, H6'E, m, 6H) ; 6,22 (H6D, s, 1H) ; 6,18 (H6A, s, 1H) ; 5,24–4,38 (8 CH₂Bn, m, 16H) ; 4,83 (H4C, d, 1H, J_{4,3C} = 8,28 Hz) ; 4,58 (H2C, d, 1H, J_{2,3C} = 9,6 Hz) ; 4,19 (H3C, m, 1H) ; 3,88 (H3F, m, 1H) ; 3,78 (H2F, s, 1H) ; 2,88 et 2,57 (H4Fa, et H4Fb, ABX, 2H, J_{4Fa,4Fb} = 17,1 Hz avec J_{4Fa,3F} = 4,4 Hz et J_{4Fβ,3F} < 1 Hz) (Seuls les déplacements chimiques du dimère Majoritaire sont présentes)

RMN 1H (400 MHz, H₂O/10% D₂O, ppm)

(6a) DimèreB1 : δ = 7,01 (H2'B, d, 1H, J2',6'B=1,4 Hz) ; 6,89 (H5'B, d, 1H, J5',6'B = 8,2 Hz) ; 6,80 (H5'B et H6'E, m, 2H) ; 6,66 (H2'E, d, 1H, J2',6'E = 2,3 Hz) ; 6,56 (H6'E, d, 1H, J6',2'E = 2,3 Hz) ; 6,24 (H6D, s) ; 5,86 (H6, s, 1H) ; 5,37 (H8A, s, 1H) ; 5,18 (H2C, d, 1H, J2C,3C = 1,1 Hz) ; 4,40 (H4C, m, 1H) ; 4,01 (H3F, m, 1H) ; 3,97 (H3C, m, 1H) ; 3,92 (H2F, d, 1H, J2F,3F = 9,1 Hz) ; 3,07 et 2,46 (H4Fa et H4F β , ABX, 2H, J4Fa,4F β = 16,2 Hz, J4Fa,3F = 5,6 Hz, J4F β ,3F = 9,8 Hz). (Seuls les déplacements chimiques du dimère majoritaire sont représentés).

Dimères B2 : forme compacte : δ = 7,08 (H2'B, d, J2'B,6'B < 1 Hz) ; 6,93 (H6'B, m) ; 6,92 (H5'B et H5'E, m) ; 6,72 (H2'E, d, J2'E,6'E < 1 Hz) ; 6,52 (H6'E, m) ; 6,26 (H6D, s) ; 5,82 (H6A, s) ; 5,67 (H8A, s) ; 5,42 (H2C, d, J2C,3C = 1,1 Hz) ; 4,47 (H4C, m) ; 4,32 (H2F, d, J3F,2F < 1 Hz) ; 4,06 (H3C, m) ; 4,02 (H3F, m) ; 2,86 et 2,71 (H4Fa et H4F β , ABX, J4Fa,4F β = 16,9 Hz, J3F,4Fa = 4,5 Hz J3F,4F β < 1 H). forme étendue : δ = 7,14 (H2'E) ; 6,98 (H2'B) ; 6,89 (H6'E) ; 6,77 (H5'B et H5'E) ; 6,60 (H6'B) ; 6,15 (H8A, s) ; 6,12 (H6A, s) ; 6,06 (H6D, s) ; 5,20 (H2C, m) ; 4,82 (H2F, m) ; 4,67 (H4C, m) ; 4,30 (H3F, m) ; 3,98 (H3C, m) ; 2,84 et 2,76 (H4F β et H4Fa, m).

Dimère B3 : δ = 6,87 (H5'B, d, 1H, J5',6'B = 8,2 Hz) ; 6,83 (H5'E, d, 1H, J5',6'E = 8,2 Hz) ; 6,80 (H2'B, d, 1H, J2',6'B < 1 Hz) ; 6,61 (H2'E, d, 1H, J2',6'E < 1Hz) ; 6,61 (H6'B, dd, 1H, J6',2'B < 1 Hz, J6',5'B = 8,2 Hz) ; 6,46 (H6'E, dd, 1H, J2',6'E < 1Hz, J5',6'E = 8,2 Hz) ; 6,15 (H6D, s, 1H) ; 6,00 (H6A, s, 1H) ; 5,71 (H8A, s, 1H) ; 4,58 (H2F, d, 1H, J2,3F = 7,9 Hz) ; 4,39 (H2C, d, 1H, J2,3C = 10,0 Hz) ; 4,36 (H4C, d, 1H, J4,3C = 10,5 Hz) ; 4,29 (H3C, m, 1H) ; 3,92 (H3F, m, 1H) ; 2,85 et 2,49 (H4Fa et H4Fb, ABX, 2H, J4Fa,4Fb = 15,8 Hz, J4Fa,3F = 5,6 Hz et J4F β ,3F = 8,5 Hz).

Dimère B4 : δ = 6,68 (H5'E, d, 1H, J5',6'E = 8,2 Hz) ; 6,63 (H5'B, d, 1H, J5',6'B = 8,2 Hz) ; 6,57 (H2'B, d, 1H, J2',6'B = 1,6 Hz) ; 6,55 (H2'E, d, 1H, J2',6'E = 1,8 Hz) ; 6,34 (H6'B, dd, 1H, J6',5'B = 8,2 Hz, J6',2'B = 1,6 Hz) ; 6,29 (H6'E, dd, 1H) ; 6,02 (H6D, s, 1H) ; 5,89 et 5,82 (H6A et H8A, d, 2H, J6,8A = 2,0 Hz) ; 4,70 (H2F, d, 1H, J2,3F ~ 0 Hz) ; 4,31 (H2C, d, 1H, J2,3C = 9,7 Hz) ; 4,28 (H4C, d, 1H, J4,3C = 8,5 Hz) ; 4,13 (H3C, dd, 1H, J3,2C = 9,7 Hz, J3,4C = 8,5 Hz,) ; 4,00 (H3F, m, 1H) ; 2,78 et 2,55 (H4aF et H4bF, ABX, 2H, J4aF,4bF = 17,2 Hz avec J4aF,3F = 4,7 Hz et J4 β F,3F < 1 Hz)

(Seuls les déplacements chimiques du dimère Majoritaire sont représentés)

Chapitre III

Méthodes

L'analyse de la structure de chaque peptide (IB7₁₄, IB9₃₇, His3) et des différentes procyanidines ainsi que l'étude des interactions de ces différents composés a été réalisée. Pour cela différentes méthodes ont été utilisées, le dichroïsme circulaire (DC), qui apporte des informations sur la structure secondaire des peptides. Ensuite la résonance magnétique nucléaire (RMN), qui nous donne des informations tridimensionnelle des peptides mais aussi des informations qualitatives et quantitatives sur les interactions rencontrées. La modélisation moléculaire enfin, va nous permettre d'avoir des informations complémentaires sur la structure atomique et d'obtenir une représentation tridimensionnelle intégrant les informations du dichroïsme circulaire et de la RMN.

Le principe de chaque méthode sera brièvement présenté dans le cas de l'étude. Plus de précisions seront données en Annexe.

A. Dichroïsme circulaire

Le dichroïsme circulaire est une technique de spectroscopie qui permet d'obtenir des informations sur la structure secondaire des peptides ou des protéines. Seule une faible quantité de produit (μM) est nécessaire du fait de la sensibilité de la technique. Basée sur le fait qu'une molécule chirale absorbe différemment la lumière polarisée droite et gauche. Les protéines sont constituées de composés optiquement actifs et chaque protéine possède une empreinte spectrale qui lui est propre. Sensible au repliement de la chaîne peptidique, le DC présente des courbes différentes suivant l'arrangement spatial adopté par les protéines. Le pourcentage de chaque structure (hélice α , feuillet β , pelote statistique....) d'une protéine est alors obtenu en déconvoluant le spectre expérimental de CD. Le principe de la technique est détaillé en Annexe A.3.

Les expériences de CD ont été réalisées sur un spectromètre de dichroïsme circulaire JASCO J-815 (JASCO, Bouguenais France) permettant de réaliser des mesures d'absorbance UV de 163 à 1100 nm. Seuls les débuts des spectres seront présentés (190-270 nm) car au-delà de 270 nm, aucun renseignement n'est récolté en raison de la nature des acides aminés présents (seuls les résidus tryptophanes absorbent au-delà de 270 nm). L'accumulation de trois scans consécutifs avec un défilement de $0,5 \text{ nm.s}^{-1}$ et un incrément de 0,5 nm, conduit au spectre. Le spectre Dichroïque d'une protéine ou d'un peptide à une longueur d'onde donnée peut s'exprimer sous la forme d'une combinaison linéaire (Saxena 1971):

$$[\theta] = \sum_i f_i \times [\theta]_i \quad (\text{III.1})$$

où les f_i sont les pondérations appliquées aux spectres f_i correspondant à une structure secondaire donnée : l'hélice α , le feuillet β , l'hélice de type I ou II, la pelote statistique. Pour déterminer la

Chapitre III

Méthodes

structure secondaire d'un peptide ou d'une protéine par CD, il faut donc déconvoluer le spectre dichroïque pour en extraire la proportion de chaque pondération f_i , ie de chacune des structures secondaires. Des logiciels peuvent être utilisés pour cela. Ils utilisent les données de bibliothèques contenant des spectres CD de protéines ou de peptides dont la structure secondaire est connue. Ces programmes procèdent à la superposition du spectre obtenu avec la meilleure combinaison linéaire des spectres de références. Il est alors possible de déterminer les différentes composantes de la structure secondaire de la protéine / peptide étudié. Pour l'ajustement du spectre expérimental, la majorité des programmes existants reposent sur des algorithmes auto-cohérents (méthodes de type SELCON – «SELf CONSistent methods », (Sreerama 1993) ou sur des méthodes basées sur l'algèbre linéaire et sur des transformées de Laplace inverses (méthodes du type CONTIN, (Provencher 1981). Il est alors difficile pour l'utilisateur de faire le choix le plus adapté dans la bibliothèque de protéines. Ce problème est d'autant plus vrai dans le cas de l'étude de peptide puisque les bases contenu dans les logiciels sont essentiellement constituées à partir de protéines. Pour remédier à cela, Sébastien Buchoux a développé au sein du laboratoire, un logiciel de déconvolution de spectre CD. Le logiciel, nommé CD-Friend, repose sur l'utilisation d'une base constituée de spectres CD de peptides. Pour cela, des spectres dichroïques de référence ont été réalisés à partir de nouveaux standards dont la structure secondaire a été clairement établie par des expériences en spectroscopie Infra-Rouge (Castano 1999; Castano 1999). Ces peptides sont constitués de motifs répétés de lysine et leucine et se structurent, majoritairement, soit en **hélice α** , soit en **feuillet β** .

En addition, un standard d'**hélice de type II** a été enregistré à partir de la poly-L-proline (disponible commercialement). Enfin, le spectre dichroïque correspondant à une conformation en **pelote statistique** a été obtenu à partir de la poly-L-lysine à pH neutre (Shibata 1992).

Les spectres CD des peptides de références sont présentés figure III-1.

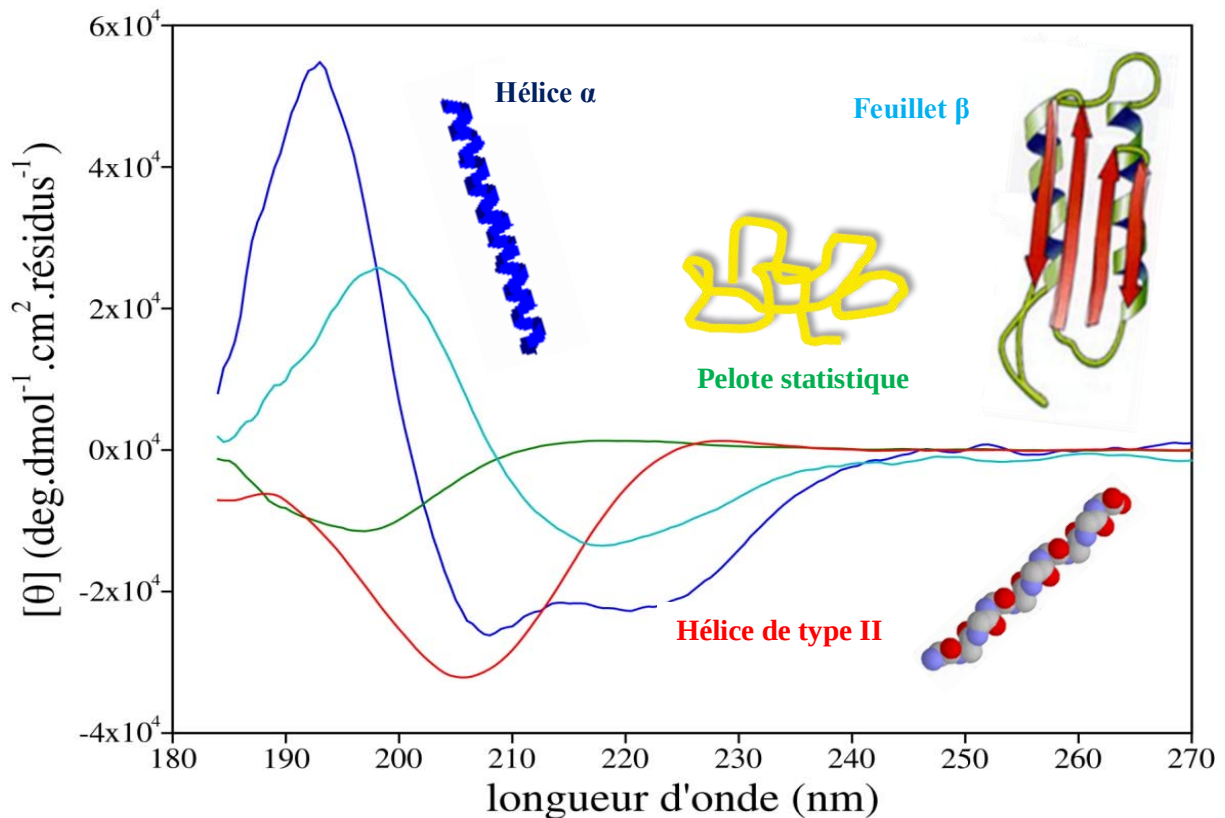


Figure III-1 : Spectres dichroïques standards correspondant aux structures canoniques : hélice α (bleu), feuillet β (cyan), hélice de type II (rouge) et pelote statistique (vert).

Chaque motif structural possède un spectre dichroïque caractéristique. En effet, le spectre de l'hélice α possède trois points singuliers : une intensité maximale apparaît à 192 nm, puis la courbe observe deux minima à 208 et 220 nm. Le feuillet β donne un spectre avec moins d'amplitude que pour une hélice α avec un maximum d'absorption à 198 nm et un minimum à 217 nm. La structure en pelote statistique possède deux extrema comme le feuillet β mais en phase inverse, le maximum est observé à une longueur d'onde de 216 nm et le minimum est observé à une longueur d'onde de 196 nm. L'allure du spectre représentant l'hélice de type II possède un spectre dichroïque proche de celui de la pelote statistique avec un cependant minimum d'absorption à 208 nm et un léger maximum à 222 nm dont l'intensité est proche de 0.

a) Structure particulière des peptides/protéines riches en proline

La grande particularité de la proline provient de la cyclisation de la chaîne latérale sur la fonction amine ce qui induit une contrainte stérique importante sur l'axe de rotation N-C α . La poly(L-proline) est incapable de prendre une structure secondaire classique, ce phénomène étant dû aux contraintes de conformations imposées par ses chaînes latérales pyrrolidines. Ce phénomène de cyclisation lui confère la spécificité de pouvoir adopter deux conformations différentes, une

Chapitre III

Méthodes

conformation *cis* ou une conformation *trans* : dans la configuration *cis*, l'angle de torsion ω est proche de 0° alors que dans la configuration *trans*, l'angle ω est proche de 180° (figure II-5). Ces deux configurations différentes de la proline peuvent conduire à deux conformations du peptide différentes dans le cas d'une poly(L-proline) : une conformation en hélice de type II lorsque les prolines sont de conformation *trans* et en hélice de type I lorsque les prolines adoptent une conformation *cis* (Rabanal 1993). Ces deux hélices sont différenciées tant pour leurs propriétés physiques et spectroscopiques que pour leurs structures cristallographiques. L'hélice de type I (PI) est caractérisée par des angles de torsion $\phi \sim -75^\circ$, $\psi \sim +160^\circ$ et ω de $\sim 0^\circ$, elle forme une hélice droite avec 3,3 résidus par tour ; l'hélice de type II (PII) est caractérisée par des angles de torsion $\phi \sim -75^\circ$, $\psi \sim +145^\circ$ et ω de 180° , c'est une hélice gauche avec 3 résidus par tour. L'hélice de type PII (figure II-6) est beaucoup plus étendue que la PI (Traub nature 1963) ou que l'hélice α plus classique, respectivement le pas de chaque hélice est de 9,3 Å, 5,6 Å et 5,5 Å

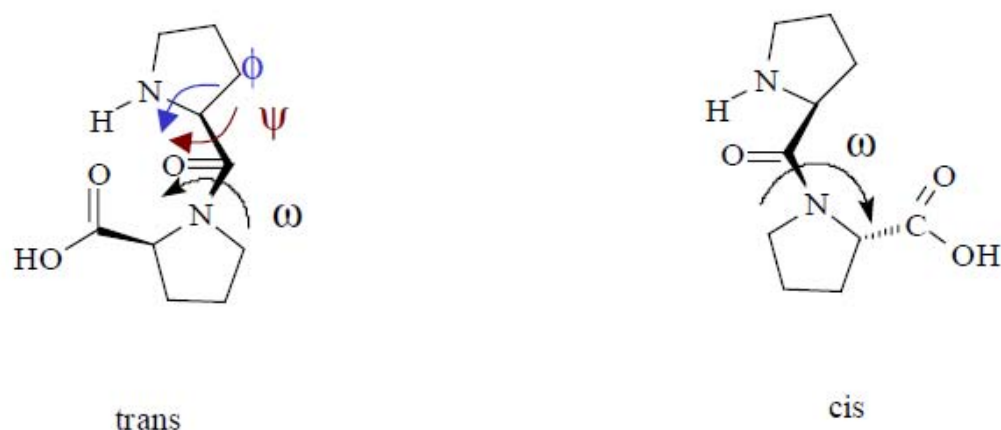


Figure III-2 : Dipeptide Pro-Pro dans le cadre d'une hélice de PII, en *trans*, et dans le cadre d'une hélice PI, en *cis*. Les angles ω , ψ et ϕ sont représentés.

La forme de l'hélice adoptée dépend de la nature du solvant : la formation d'une hélice de type PI est favorisée dans un milieu apolaire, alors que la formation de PII est favorisée dans des milieux polaires (Rabanal 1993). La forme PII est donc la plus représentée dans des conditions biologiques, chez les plantes ou les animaux. En effet, les motifs en hélice de type poly(L-proline) retrouvés dans les PRPs sont tous de type PII. Les angles ϕ et ψ ont été calculés à plusieurs reprises pour différentes protéines et leurs valeurs fluctuent très peu de -75° à -78° et $+145^\circ$ à $+149^\circ$ respectivement (Macarthur 1991; Rabanal 1993; Naganagowda 1998; Persikov 2000).

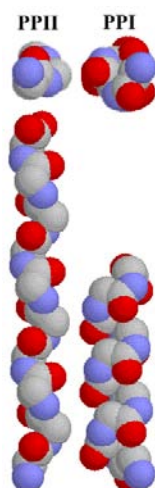


Figure III-3 : Représentation de l'hélice de type II et de l'hélice de type I .

La structure de type poly(L-proline) trouvée dans les PRPs basiques est due au taux de proline dans la structure primaire complète (~50%) ainsi qu'au nombre de prolines consécutives (~30%). L'hélicité de type PII est favorisée par la présence de 4 ou 5 prolines consécutives (Murray 1994). Toutefois, il est notable que certaines protéines sans proline peuvent également se structurer de la sorte (Adzhubei 1993). Ces hélices de type poly(L-proline) ne sont donc pas construites par la formation de liaisons hydrogène intra-chaînes comme les autres structures secondaires. Elles ne sont donc pas identifiables par l'utilisation d'agents susceptibles de rompre des liaisons hydrogène comme le Chlorure de calcium (CaCl_2). Elles peuvent être donc facilement confondues avec des structures désordonnées ou en pelote statistique. Nous avons vu précédemment que la formation de l'hélice de type PII requiert la présence d'un solvant polaire (aqueux ou acide). D'autres facteurs sont également à prendre en considération comme le pH et la température (Shibata 1992). Dans un cadre d'étude similaire, Fox *et al.* (Fox 1999) ont pu montrer qu'il était possible d'induire la formation de l'hélice de type poly(L-proline) en baissant la température.

B. Expériences RMN

La RMN nous a permis d'apporter plusieurs informations dans notre étude. En plus des informations sur la structure tridimensionnelle, nous avons pu déterminer la taille des complexes, les sites de fixations en mesurant les constantes de dissociations et la stœchiométrie des interactions. Les rappels théoriques de la résonance magnétique nucléaire sont regroupés en Annexe E.

a) Stratégie employée pour la caractérisation de structure tridimensionnelle

Dans une protéine le nombre de protons est très important ce qui entraîne un recouvrement partiel de nombreux pics. En outre, les PRPs sont constituées à 70% en trois résidus ce qui augmente le chevauchement des signaux. L'interprétation du spectre 1D est alors difficile (figure II-5 (B) et (C)). Cette difficulté est contournée en utilisant la RMN multidimensionnelle qui permet d'éclater les raies de résonance dans un espace à 2, 3 voire 4 dimensions. La RMN bidimensionnelle (2D) homonucléaire ($^1\text{H} - ^1\text{H}$) nous a suffi quant à l'attribution des protons du peptide IB7₁₄. La RMN 2D hétéronucléaire ($^{13}\text{C} - ^1\text{H}$) a quant à elle permise l'attribution ainsi que la reconnaissance de la régio-chimie de la liaison interflavane du dimère B3.

La détermination structurale de protéines par RMN se déroule en plusieurs étapes, dont la stratégie a été définie par Wüthrich (Wuthrich 1989) : un échantillon de protéine est solubilisé à une concentration suffisante (0,1 à 0,5 mM) dans des conditions de pH et de température fixées. La première étape consiste en l'attribution de tous les protons de la protéine par acide aminé, chacun étant considéré comme un système de spin. La deuxième étape permet de relier les acides aminés en fonction de leur emplacement dans la chaîne peptidique et donc d'accéder à la structure primaire. Ensuite, un autre jeu de séquences multidimensionnelles procure des contraintes conformationnelles d'angles et de distances entre les atomes, qui sont enfin utilisées par la modélisation moléculaire pour remonter à la structure secondaire et tertiaire de la protéine. Lors de l'étude de protéines recombinante, d'autres stratégies peuvent être employées basées sur un double marquage $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$. La stratégie d'attribution développée par Wüthrich est schématisée ci-dessous :

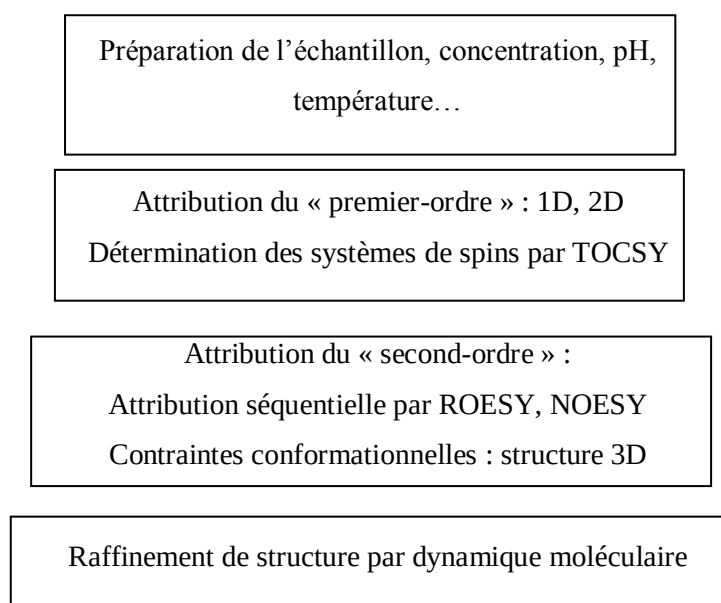


Figure III-4 : Schéma de la stratégie adoptée pour la caractérisation en structure 3D des peptides étudiés (Wuthrich 1989)

i. Identification des systèmes de spins

Pour résoudre la structure des protéines ou de peptides, la RMN est un outil de choix. Pour cela il est nécessaire d'identifier les systèmes de spins, ce qui est fait avec une combinaison de séquences RMN bidimensionnelles composées de plusieurs étapes : la préparation des spins, le temps d'évolution, le temps de mélange (que dans certaine séquence) et la détection.

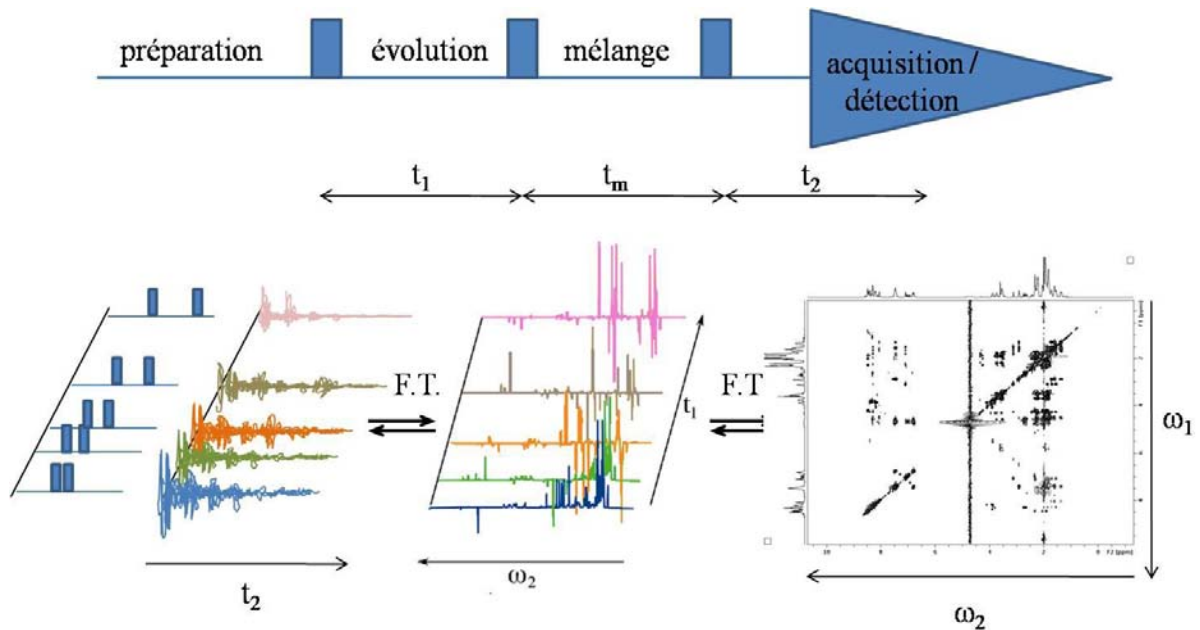


Figure III-5 : Principe de la RMN à deux dimensions. La variation d'un délai t_1 permet de générer une deuxième dimension en plus de la dimension d'acquisition (liée au temps d'acquisition t_2). La transformée de Fourier, appliquée dans les deux dimensions, permet d'obtenir une carte RMN 2D que l'on présente en mode contour. t_m le temps de mélange

Pour notre étude, nous avons utilisé une séquence à deux dimensions du type TOCSY (Total Correlation Spectroscopy) (Braunschweiler 1983; Bax 1985). Cette séquence est une évolution de la séquence développée par Nagayama (Nagayama 1980). Lors de l'utilisation d'une séquence TOCSY, l'aimantation est transférée via l'interaction spin-spin indirecte le long de la chaîne jusqu'à la rupture du relais du couplage en 3J . Le spectre obtenu par ce type de séquence est une carte RMN en deux dimensions où la diagonale correspond à la projection dans le plan du spectre 1D. Les taches hors diagonales correspondent aux corrélations TOCSY. La carte étant symétrique, les taches verticales et horizontales sont identiques et permettent d'identifier tous les systèmes de spins grâce à leur chemin de corrélation spécifique.

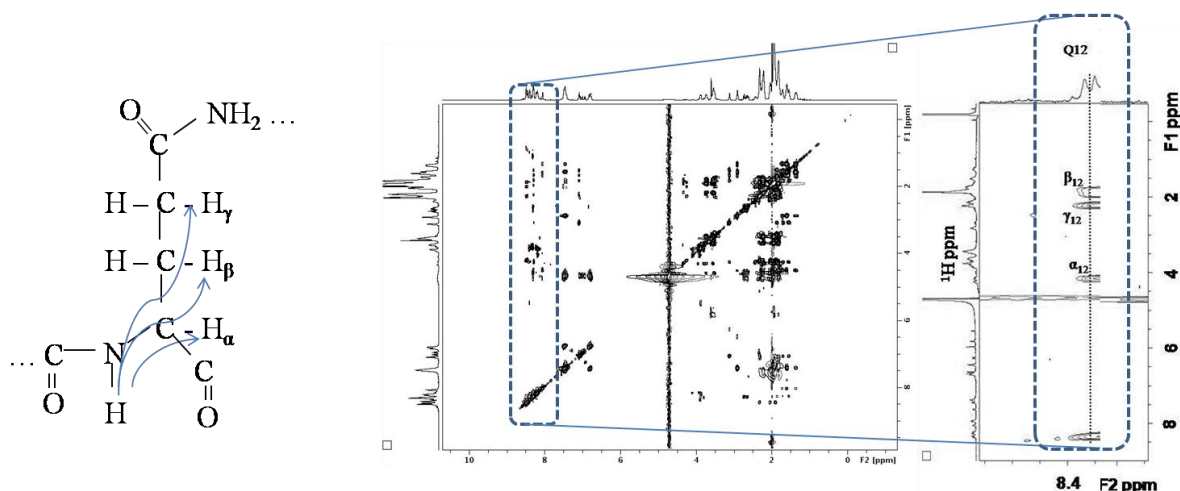
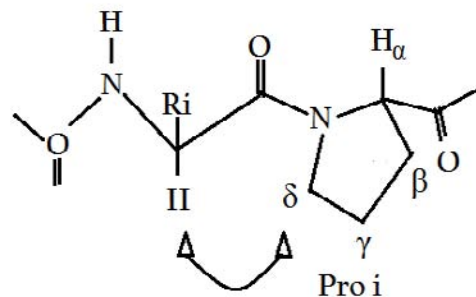
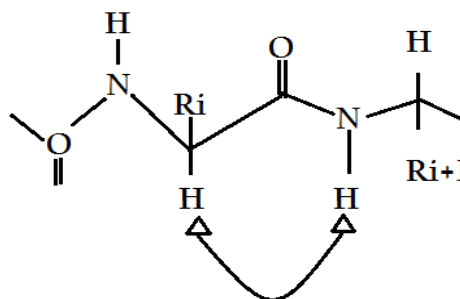


Figure III-6 : Carte TOCSY permettant l'identification des différents systèmes de spins, avec l'exemple de la glutamine Q12 d'IB7₁₄.

ii. Détermination de la structure primaire et des contraintes de distance

Après avoir identifié les différents systèmes de spins, il est indispensable pour obtenir la structure d'une protéine ou d'un peptide d'avoir des informations au niveau de la structure primaire. Ceci permet de déterminer l'enchaînement des acides aminés et d'établir des contraintes de distance donnant des indications sur la proximité entre deux atomes des acides aminés de la séquence. Pour cela, une séquence NOESY ou ROESY, pour respectivement Nuclear Overhauser Spectroscopy et Rotating frame Overhauser Effect Spectroscopy, est utilisée donnant des informations de distance par la corrélation des interaction spin-spin directe entre le proton H_α d'un résidu (i) et le proton amide du résidu (i+1) comme le montre la figure ci contre. Cette méthode d'attribution séquentielle fonctionne pour quasiment tous les acides aminés sauf le résidu proline dont la chaîne latérale est cyclisée sur l'azote tertiaire. Cependant des informations sont tout de même accessibles grâce à l'observation des effets NOE entre le proton H_δ de la proline et le proton H_α du résidu précédent (i-1). Ce type de corrélation dépend de la distance entre les atomes observés, l'interaction dipôle-dipôle ne peut se faire que lorsque les atomes sont distants de moins de 5 Å. Cette distance permet notamment de déterminer la position cis ou trans du résidu proline. L'effet NOE correspond à une variation de l'aimantation correspondant à l'intensité du signal



d'un spin i lorsque l'aimantation du spin s voisin est perturbée. Cet effet NOE peut être positif, négatif ou nul selon la masse molaire des peptides/protéines.

La variante entre la NOESY et la ROESY repose sur l'utilisation d'un champ radiofréquence supplémentaire appelé « spin lock » qui permet de verrouiller la composante de l'aimantation transversale le long de l'axe y' (référentiel tournant). L'effet NOE reste donc positif indépendamment de la masse du peptide. Tout comme dans le cas de la séquence TOCSY, le spectre associé à la séquence NOESY/ROESY est une carte à deux dimensions. Lorsque l'attribution séquentielle est achevée, il reste les taches de corrélations renseignant sur la proximité dans l'espace à $i+2$, $i+3$, $i+4$, des résidus identifiés. L'examen des effets NOE participe à la détermination de la structure secondaire en informant sur l'existence de motifs ou d'éventuels repliements de la protéine. La distance entre deux protons est inversement proportionnelle à l'intensité des taches de corrélation. En connaissant une distance r_{ref} on peut alors obtenir une distance inconnue r_i (en négligeant les effets de dynamique interne) :

$$r_i = r_{\text{ref}} (S_{\text{ref}} / S_i)^{1/6} \quad (\text{III.2})$$

où S_{ref} et S_i sont les volumes respectifs des taches de corrélation entre les protons ref et i . L'obtention de ce types de contraintes permet d'effectuer la dernière étape de la méthodologie de Wüthrich, qui consiste à entrer ce jeux de contraintes dans un logiciel de modélisation approprié qui, à la suite d'une modélisation sous contrainte permet d'obtenir la structure du peptide.

b) Stratégie employée dans l'étude des interactions tanins protéines salivaires

Dans le cadre de cette thèse nous avons utilisé la RMN comme outil permettant d'obtenir des informations sur les interactions entre les tanins du vin et les protéines de la salive. Pour cela nous avons utilisé plusieurs aspects de la RMN. Dans un premier temps, la détermination structurale du peptide a été réalisée. Ensuite, l'identification des sites de fixation en utilisant les séquences NOESY, ROESY et la différence de transfert de saturation plus connue sous le nom de STD (Mayer 1999; Meyer 2003) ont été employées. Enfin, l'analyse des variations de déplacement chimique et par mesure du coefficient de diffusion ((Morris 1993; Wu 1995; Cohen 2005) nous à permis de caractériser les interactions en déterminant de manière absolue les affinités avec une valeur de constante de dissociation et de la stœchiométrie.

i. Expériences STD

Les expériences de RMN par STD « Saturation Transfer-Difference » sont utilisées depuis plusieurs années pour la caractérisation d'interaction entre un ligand et son site de fixation. Si on prend en compte une protéine P et son ligand L on peut écrire la relation suivante :



et donc

$$k_d = k_{on} / k_{off} = [P][T] / [PT] \quad (III.4)$$

Les expériences de transfert de saturation ont été développées dans les années 1960 (Forsén 1963), mais elles trouvent actuellement un nouvel essor en raison de leurs applications prometteuses dans le domaine du screening par RMN, en particulier, sous l'impulsion de Mayer et Meyer (Mayer 2001). Cette technique se révèle ainsi particulièrement efficace à la fois pour cribler des banques de ligands ainsi que pour définir des épitopes de liaison. Cette technique est utilisable dans une plus large gamme d'affinité entre ligand et récepteur que l'expérience TRNOE ($k_d = 10^{-3}$ à 10^{-8} M) (Mayer 1999). L'intérêt supplémentaire de cette méthode est qu'elle permet d'identifier au niveau atomique les protons les plus impliqués dans une interaction.

Son principe repose sur la saturation spécifique des protons du récepteur par une impulsion sélective. Cette saturation va se propager au sein du récepteur grâce à la diffusion de spin par transfert intramoléculaire. En présence d'un ligand, cette saturation va également se propager au ligand par transfert intermoléculaire (fig. III-7).

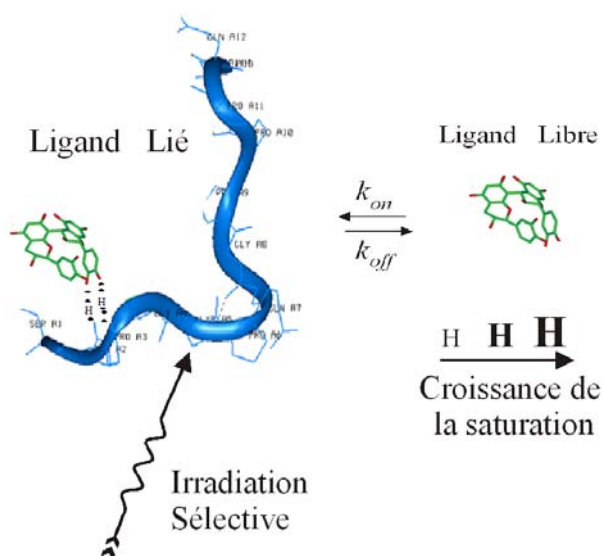


Figure III-7 : Principe de l'expérience STD. Au cours de l'association ligand / récepteur, la saturation du récepteur est transmise à la conformation liée du ligand. Lors de la dissociation, cette saturation est détectée sur la forme libre du ligand. Le degré de saturation traduit la proximité des protons du ligand avec la surface du récepteur.

Cette expérience est généralement réalisée en excès de ligand sur une protéine de poids moléculaire relativement haut à faible concentration. Cette technique peut s'appliquer aussi bien à des expériences 1D que 2D comme dans le cas de l'expérience HSQC ou TOCSY par exemple (Herfurth 2000). En pratique, des spectres sont enregistrés avec et sans saturation des protons du récepteur. Dans le cas d'une saturation du récepteur, les signaux des protons du ligand les plus proches de la surface du récepteur vont être saturés (et donc atténués). Par soustraction du spectre correspondant au ligand sans saturation du récepteur, on observe uniquement les signaux modifiés des atomes du ligand impliqués dans l'interaction, les signaux correspondants aux impuretés ou au récepteur seront soustraits. En pratique, cette méthode nécessite de procéder à des acquisitions plus longues (jusqu'à 1024 scans par exemple pour une 1D STD).

Les principales modifications à apporter à une séquence traditionnelle pour la transformer en expérience de type STD sont (i) d'y ajouter un train d'impulsions juste après le délai de relaxation $d1$ et avant la première impulsion à 90° (dans notre cas, il a été utilisé un train de 40 gaussiennes de 50 ms séparées par un délai de 1 ms afin de pouvoir saturer sélectivement les protons du peptide (fig.III-8)). (ii) de changer le cyclage de phase du récepteur afin de soustraire les acquisitions "on-resonance" de celles "off-resonance". La saturation peut s'effectuer de diverses façons. La durée, la sélectivité en fréquence et la puissance de la radiofréquence d'irradiation sont responsables de l'efficacité de la saturation initiale des atomes du récepteur. Au niveau du choix des fréquences de saturation, la technique STD NMR est particulièrement bien adaptée à la détermination des sites de liaison des peptides en interaction. En effet, les peptides et les tanins ayant des spectres caractéristiques, il est possible de saturer les protons de la protéine (à $-0,5$ ppm) sans perturber ceux du tanin. Le choix de la valeur $-0,5$ ppm a été effectué après plusieurs essais avec des valeurs comprises entre 1 et -4 ppm, ou vers 12 ppm. Cependant une saturation directement sur les premiers signaux du peptide aurait été plus judicieux (1 ppm). Pour l'enregistrement du spectre sans saturation, une fréquence de $+30$ ppm a été choisie, ce qui permet d'irradier sans affecter la protéine ni son ligand.

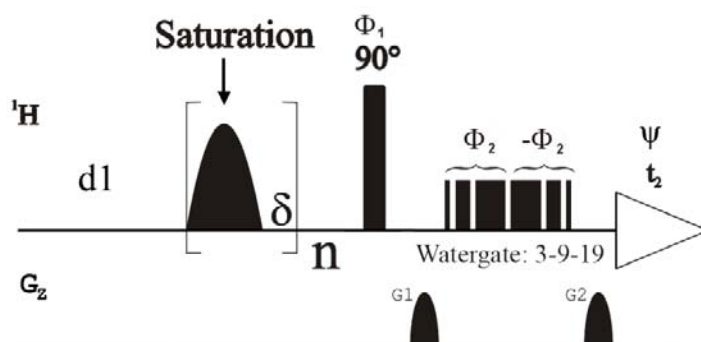


Figure III-8 : Schéma de la séquence RMN d'impulsion STD 1D WATERGATE. Les phases sont $\Phi_1 = \{x, -x\}$, $\Phi_2 = \{x, x, y, y, -x, -x, -y, -y\}$, $\Phi = \{x, x, -x, -x\}$ (Mayer 2001).

Chapitre III

Méthodes

Le type d'impulsion utilisé pour la saturation constitue également un paramètre à prendre en compte. Il a été choisi d'utiliser des impulsions de type gaussienne, qui permettent une bonne sélectivité en fréquence. De plus, leur faible sensibilité aux inhomogénéités de champ magnétique permet d'obtenir des impulsions sélectives de longue durée. D'autres types d'impulsions ont été mis en œuvre, telles que les cascades de gaussiennes (Emsley 1990). Quelques essais avec d'autres formes de signaux d'impulsion ont été réalisés au laboratoire, mais ils n'ont pas pour autant mis en évidence d'amélioration des résultats. Parmi les différents paramètres expérimentaux relatifs à la saturation, l'un d'entre eux a fait l'objet d'une certaine optimisation du délai de relaxation (égal au temps d'acquisition A_q + le délai de relaxation d_1). L'allongement du délai d_1 de 0.1 à 2 s permet une bien meilleure relaxation des signaux avant un nouveau cycle de saturation, et se traduit par une meilleure élimination des signaux de l'eau et des impuretés sur le spectre 1D. En revanche, ceci se traduit également par un allongement de la durée des expériences STD.

ii. Expériences DOSY

Cette technique permet de différencier les espèces présentes en fonction de leur masse molaire, de leur taille et de leur forme, permettant l'étude de systèmes très variés qui va de l'étude des interactions intermoléculaires (Cohen 2005; Ornelas 2007; Boisselier 2008) aux mécanismes d'agrégation moléculaire (Carteau 2007; Carteau 2007; Pianet 2008) ou encore à l'étude des liquides ioniques (Duluard 2008). Les expériences de DOSY permettent de mesurer le coefficient de diffusion translationnelle. Dans un solvant une molécule peut observer une diffusion translationnelle dont la trajectoire suit un mouvement brownien qui est la description mathématique d'un mouvement aléatoire. Ce mouvement est caractérisé par un coefficient de diffusion D relié à la taille de la molécule par la relation de Stokes-Einstein :

$$D = k_B T / (6\pi\eta R_H) \quad \text{(III.5)}$$

Où k_B est la constante de Boltzmann, η la viscosité en poiseuille du solvant utilisé, et R_H le rayon hydrodynamique de la molécule ou du complexe supramoléculaire (dans notre cas le complexe tannins-peptide) considéré en moyenne sphérique. Le suivi du coefficient de diffusion D des peptides en fonction des différents tanins ajoutés va nous permettre de déterminer la taille des différents complexes formés mais également des constantes de dissociation pour chaque procyanidine utilisée en employant la même méthodologie que la variation de déplacement chimique (cf. §3, *vide infra*).

La mesure des coefficients de diffusion est effectuée à l'aide de séquences unidimensionnelles basées sur un écho de spin stimulé par des gradients bipolaires (Johnson 1990) (Gibbs 1991) (Johnson 1999). Les séquences utilisées proviennent de la société Bruker : STEBPGP1D ou BPLED

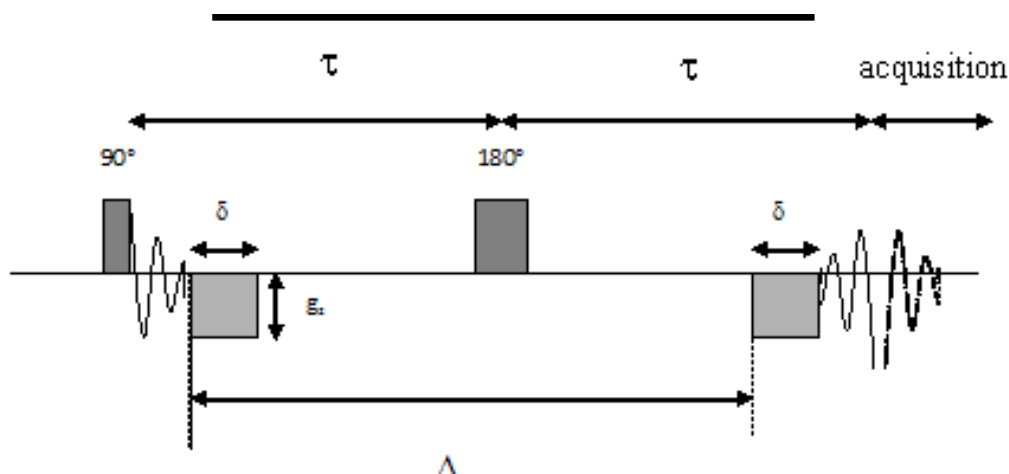


Figure III-9 : Schéma de la séquence RMN DOSY présentant deux impulsions de 90° et 180° respectivement avec emploi de gradients de même intensité g et de même durée δ suivant les impulsions et séparés d'un délai Δ . (Cohen 2005)

Dans ce type de séquence, l'impulsion à 180° inverse le signe du premier gradient de sorte que si les spins observés ne diffusent pas, on se retrouve dans le cas d'une séquence d'écho de spin normale où la totalité du signal se refocalise et où le signal est maximal après l'écho (au niveau de l'acquisition). En revanche, dans le cas de spins qui diffusent, la refocalisation ne se fera pas complètement et de ce fait l'intensité du signal obtenu après l'écho sera plus faible. Cette méthodologie vise à faire disparaître le signal au fur et à mesure de l'augmentation des gradients de telle sorte que plus une molécule diffusera vite, plus le signal diminuera rapidement avec l'augmentation des gradients. Les délais et puissances des impulsions et des gradients sont paramétrés de façon à obtenir un signal résiduel en fin d'expérience de l'ordre de 5% à 10% pour une évolution de la puissance du gradient z de 2 % à 95% (0,01 à 0,4 G/m). Il existe une relation directe entre l'intensité du signal et le gradient appliqué (Stejskal 1965) :

$$\ln(I/I_0) = -[\gamma^2 \times \delta^2 \times G_z^2 \times (\Delta - \delta/3)]D \quad (\text{III.6})$$

Où I_0 et I sont respectivement les intensités du signal à 2% et du signal résiduel, γ le rapport gyromagnétique, Δ et δ le temps de diffusion et la durée d'application des gradients respectivement.

On obtient donc une relation entre le coefficient de diffusion D et l'intensité du signal proportionnel aux gradients, autrement dit lorsqu'on trace la courbe décroissante de $\ln(I/I_0)$ en fonction du carré des gradients G_z^2 , on obtiendra une droite dont la pente donnera la valeur du coefficient de diffusion D en $\text{m}^2.\text{s}^{-1}$. Au préalable, le gradient propre du spectromètre est calibré avec un échantillon dont le coefficient de diffusion transversale est connu (communément, on utilise de l'eau dont le coefficient de diffusion transversal à 298K est égal à $2.10^{-9}\text{m}^2.\text{s}^{-1}$ (Stejskal 1965)).

iii. Analyse des variations de déplacements chimiques

Lorsqu'une interaction se fait entre un ligand (le tannin) et son hôte (le peptide), l'environnement chimique de certains protons de l'hôte (dans notre cas les acides aminés impliqués dans l'interaction) va être modifié créant ainsi une modification de la valeur du déplacement chimique initial. Il est donc possible de regarder les variations de déplacements chimiques de certains protons du peptide lorsqu'on ajoute pas à pas du ligand. Dans le cas d'une fixation spécifique, c'est-à-dire quand on a l'équilibre décrit en équation III.3 Pour les expériences de titration, les variations de déplacements chimiques de certains protons du peptide ont été analysé en fonction de la concentration en procyanidine en utilisant une équation décrite précédemment pour un système à sites multiples (Charlton 2002) (voir détail en annexe):

$$A_{obs} = \frac{1}{2} A_{max} [(1+k_d/n \cdot [P_i] + [T_i]/n \cdot [P_i]) - \{(1 + k_d/n \cdot [P_i] + [T_i]/n \cdot [P_i])^2 - 4 [T_i]/n \cdot [P_i]\}^{1/2}] \quad (III.8)$$

Où A_{obs} est $\Delta\delta_i$, la variation de déplacement chimique (ppm) ou ΔD_{obs} , la variation du coefficient de diffusion, A_{max} est $\Delta\delta_{max}$ (ou ΔD_{max}), la variation maximale de déplacement chimique (ou diffusion D) entre la valeur du déplacement chimique (ou du coefficient de diffusion) de la protéine seule ou saturée par les tanins, k_d est la constante de dissociation exprimée en M, $[T_i]$, la concentration totale en polyphénol pouvant se fixer au peptide exprimé en M, en tenant compte de leur capacité à s'auto-associer ($[Ti] = [T]/(1-k_a[T])$) où k_a est la constante d'auto-association, qui a été déterminé à environ 6 M⁻¹ (Pianet 2008), $[P_0]$, la concentration totale du peptide exprimé en M, et n le nombre de site de fixation des tanins. K_d , n et $\Delta\delta_{max} / \Delta D_{max}$ ont été calculées en utilisant un lissage en minimisant la différence entre la courbe et les points expérimentaux, cette routine est directement utilisée à partir du logiciel Microsoft EXCEL.

C. Modélisation Moléculaire

La modélisation moléculaire utilise des méthodes de calcul théorique (mécanique moléculaire, dynamique moléculaire, mécanique quantique *ab initio* ou semi-empirique) confrontées à des expériences réalisées sur la matière : ces deux approches expérimentales ou purement théoriques deviennent alors complémentaires. La dynamique moléculaire propose une description de la matière à l'échelle atomique ainsi que son suivi au cours du temps. Cette analyse répond à de nombreuses questions sur la structure de protéines et sur la dynamique des systèmes.

La dynamique moléculaire est une méthode d'étude des mouvements et de l'évolution de la configuration spatiale des systèmes moléculaires. La technique repose sur la nature des liaisons et des

Chapitre III

Méthodes

atomes, avec leurs forces associées (élongation de liaison, angles de valence, angles de torsion, forces de Van Der Waals et électrostatiques). Elle dépend également du milieu dans lequel l'échantillon est placé. Ces deux notions vont être abordées uniquement dans le cadre des expériences réalisées sur l'étude des protéines et des complexes. Dans notre étude, la modélisation moléculaire nous a permis d'obtenir une information structurale atomique complémentaire en utilisant comme contraintes les données RMN et de dichroïsme circulaire.

De plus, nous avons pu réaliser le calcul d'hydrophobicité des complexes, ce qui nous a permis de mettre en évidence et de comprendre la nature des forces mises en jeu lors de la formation. L'hydrophobicité potentielle a pu être déterminée en utilisant un logiciel issu de l'équipe de Michel Laguerre (LeSolleu 1997). Il est alors possible de calculer dans une maille définie la somme des contributions lipophiles de chaque atome non-hydrogène en fonction de la distance. Le logiciel permet déterminer les différentes phases de lipophilie d'une molécule. Ceci est assimilable à une séparation de phases huile/eau et de leur interface. Au niveau moléculaire, le logiciel permet donc d'identifier les régions hydrophiles et hydrophobes d'un peptide comme dans notre cas.

Le détail des méthodes est donné en Annexe.

Chapitre IV

Étude de l'interaction entre le peptide IB7₁₄ et différentes procyanidines

La sensation d'astringence, comme cela a été décrit dans le premier chapitre, est le résultat de l'interaction entre les tannins du vin et les protéines de la salive. Dans ce chapitre, l'étude des interactions entre un peptide modèle représentatif de la famille des Protéines Riches en Proline PRPs, IB7₁₄, et différentes procyanidines de synthèse est présentée. Six procyanidines ont été utilisées : un monomère de catéchine, les quatre dimères composés des unités de bases de catéchine ou d'épicatéchine liées en C4-C8 et un trimère de trois unités de catéchine liées en C4-C8 (figure IV-1).

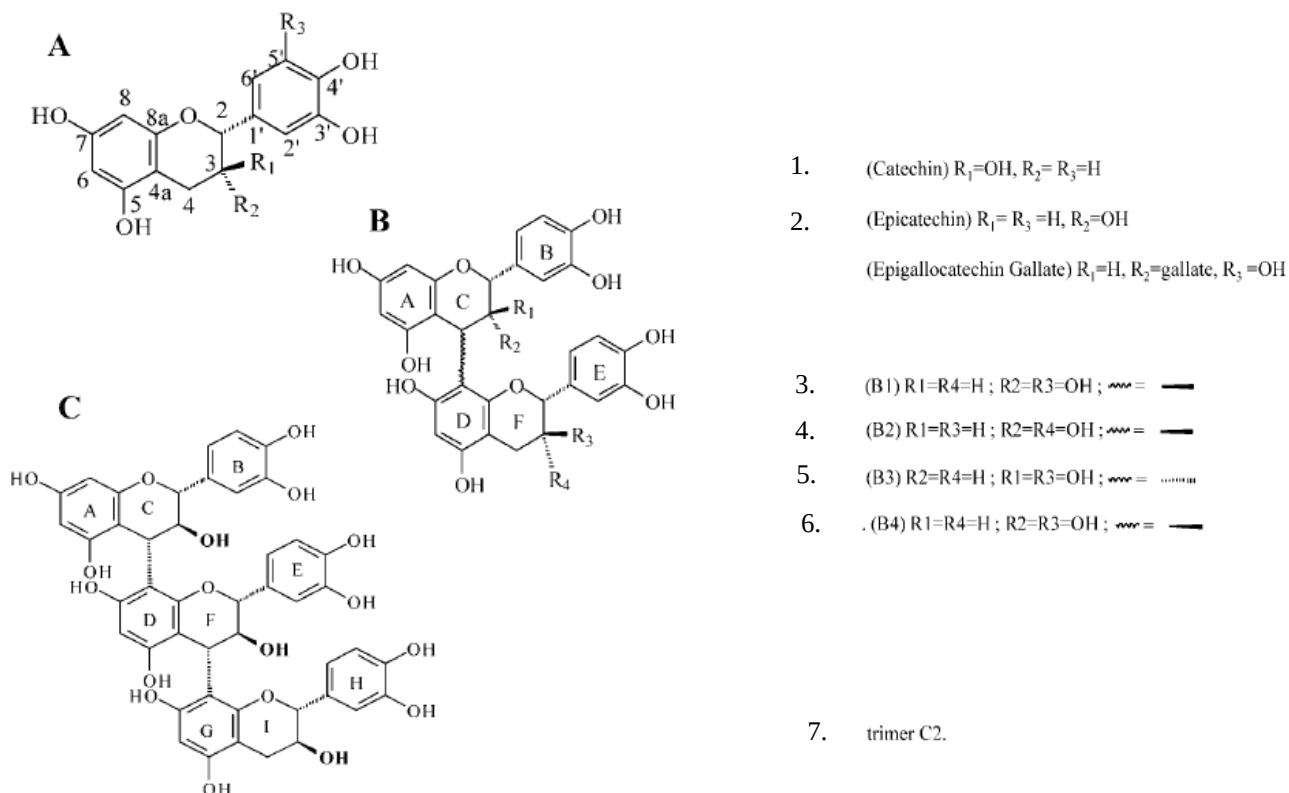


Figure IV-1 : Structure chimique des tannins (A) Monomères : (1) catéchine (Cat); (2) épicatechine (Epi); (B) Dimères: (3) B1, (4) B2, (5) B3, (6) B4 (C) Trimères: (8) C2.

Cet échantillon de procyanidines permet d'étudier l'influence de la stéréochimie du Carbone 3 de l'hétérocycle C et du degré de polymérisation du tannin sur les interactions.

Pour cette étude, nous utiliserons le dichroïsme circulaire, la RMN et la modélisation moléculaire afin de caractériser les interactions qui ont lieu entre un peptide riche en proline et les six procyanidines présentées ci-dessus allant du monomère au trimère. Le dichroïsme circulaire nous apportera des informations sur la structure secondaire que peut adopter le peptide seul. La RMN informera d'une part sur les structures primaire et tertiaire mais également sur les affinités des interactions et la taille des complexes formés. Enfin, la modélisation moléculaire nous donnera des renseignements complémentaires à la RMN sur la nature des complexes.

A. Paramètres expérimentaux

a) Paramètres RMN

Les expériences RMN pour l'étude de l'interaction entre le peptide IB7₁₄ et les différentes procyanidines ont été enregistrées à 298K sur un spectromètre Bruker DPX 400 équipé d'une sonde de 5 mm large bande à gradient inverse comprenant un lock pour le deutérium ²H. Tous les déplacements chimiques proton ont été donnés en respectant comme référence interne le TSP (Tetramethyl Silyl Propionate). Cette référence a également servi de référence pour les données quantitatives. Les spectres protons ¹H ont été enregistrés en utilisant une séquence watergate pour la suppression du signal de l'eau (Piotto 1992; Piotto 1992). Les paramètres utilisés pour ces expériences étaient les suivants: une fenêtre spectrale de 12 ppm, une impulsion à 90° de 7μs, une impulsion pour le Watergate de 9 μs ; un temps de recyclage de 5s incluant 3s de temps d'acquisition et 2 s de délai de relaxation pour être sûr d'avoir une relaxation totale du signal. Une séquence classique de TOCSY 2D a été utilisée (Bax 1985) pour l'attribution des résonances, principalement pour les corrélations des protons du cycle des prolines (Figure III.1) et pour toutes les résonances des protons des tanins (figure III.2 en utilisant les paramètres suivant : une séquence mlevgpTMph19 (BrukerTM software). Les spectres RMN de type TOCSY ont été enregistrés en utilisant le mode States-TPPI, une fenêtre spectral de 7692 Hz dans les deux dimensions, un domaine de temps de 2048 points et un incrément de 256 en t₁. Le temps de relaxation est fixé à 2s, et 16 scans ont été enregistrés par incrément en t₁. Un spinlock de 100 ms a été utilisé. Le traitement des données et leur analyse ont été réalisés en utilisant le programme Topspin version 2.1 de la société Bruker.

Le suivi des interactions a été effectué en utilisant, principalement, deux techniques physicochimiques complémentaires, chacune d'entre elles apportant sa contribution spécifique.

La RMN DOSY (Diffusion Ordered Spectroscopy) a été employée pour mesurer les coefficients de diffusion transversale D. La mesure de la diffusion a été réalisée grâce à la RMN 1D du proton avec l'emploi de gradients pulsés ((PGSE) (Stejskal 1965). La séquence d'impulsions correspond à une expérience d'écho de spin (Hahn-echo) à laquelle il a été ajouté deux gradients G, de même intensité et de même durée, insérés lors des deux périodes d'écho, τ. Pour ce type de séquence, les paramètres utilisés étaient les suivant : une fenêtre spectrale de 12 ppm ; un nombre de scans de 128 ; un temps de recyclage de 2 s ; un délai intergradients Δ, de 150ms ; une durée de gradient δ, de 2ms. La puissance des gradients a été paramétrée de façon à obtenir une variation linéaire de 2 à 95% (1 à 40 G/cm) du maximum de leur puissance en 16 étapes. Le coefficient de diffusion D a été obtenu par intégration de l'intensité du signal dans une zone de résonances spécifique de la région des groupements NH amides des acides aminés en fonction de la puissance des gradients appliqués en utilisant l'équation suivante :

$$I/I_0 = e^{-\gamma^2 G^2 D \delta^2 (\Delta - \delta/3)} \quad (V.2)$$

Où I_0 est l'intensité du signal pour un gradient $G=0$; I l'intensité du signal résiduel ; γ le rapport gyromagnétique ; δ la durée du gradient ; Δ , le temps intergradient. Le coefficient de diffusion est alors utilisé soit pour calculer le rayon hydrodynamique R_H à l'aide de l'équation de Stoke-Einstein, soit pour la détermination de la constante de dissociation k_d et de la stœchiométrie du complexe.

Pour la détermination des sites d'interactions, les expériences de saturation par transfert de diffusion en RMN du proton 1H STD (Saturation Transfer Diffusion) ont été enregistrées sur un échantillon contenant 3mM du peptide IB7₁₄ ou d'un mélange IB7₁₄-B3 dans une solution (D_2O :EtOD 88:12, acide acétique 5mM, pH 3.5) à 400 MHz avec 256 ou 800 scans dépendant de l'échantillon. Les saturations sélectives de la protéine « on-résonance » fixée à - 0.5 ppm et « off-résonance » à 35 ppm ont été effectuées en utilisant une séquence 1D proton avec une cascade d'impulsions pour la saturation alternant entre les phases « on-résonance » et « off- résonance » couplée à une séquence « spoil » pour éviter les effets de magnétisation non désirés (Mayer 2001; Meyer 2003). Les spectres de RMN-STD ont été acquis à 298K en utilisant pour la saturation une cascade de 40 impulsions gaussiennes espacées de 50 ms ; avec un délai entre chaque impulsion de 100 μs ce qui correspond à un temps total de saturation de 2s. Une séquence WATERGATE (Piotto 1992) a été utilisée pour la suppression du signal résiduel de l'eau. Un filtre « spinlock » de 5 kHz et de 10 ms a été appliqué pour supprimer le signal résiduel de la protéine. Enfin, pour être sûr que les résonances qui résultent de la méthode STD étaient liées à la spécificité des interactions, une autre expérience de STD a été réalisée en ajoutant à notre échantillon un capillaire contenant 1mM de solution de glucose.

b) Paramètres de la dynamique moléculaire

En ce qui concerne les calculs en dynamique moléculaire, les molécules de tanins et le ou les peptides ont été placés dans un même système correspondant à une boîte d'eau de 100 Å de côté. Le nombre de molécule dans la boîte est déterminé afin de se placer à une concentration proche des analyses effectuées par RMN. La théorie et le détail de la technique sont développés en Annexe D.

Dans le cas de l'étude du peptide IB7₁₄ la modélisation moléculaire a été réalisée avec deux systèmes différents :

Le premier représentant le peptide et les tannins avec une concentration inférieure à la concentration micellaire critique des tannins (CMC du C2 étant 15 mM (Pianet 2008)). Ce premier système est formé de 2 peptides IB7₁₄ et 3 C2 dans une boîte de simulation contenant $33 \cdot 10^3$ molécules d'eau. ($[C2] = 5mM$). Le deuxième système représentant un système avec des tanins en concentration supérieure à leur CMC : contenant 2 IB7₁₄ and 9 C2 dans une boîte de simulation avec la même quantité de molécules d'eau que pour le premier système ($[C2]= 15 mM$). Les calculs ont été réalisés en utilisant le logiciel GROMACS version 4.0 avec les champs de forces GROMOS96 (G43a1). Les

molécules de trimère C2 ont été paramétrées en utilisant le programme Dundee PRODRG2 server website version 2.5 (beta). Les peptides et tanins ont été mis de manière aléatoire dans une boîte d'eau cubique SPC (Simple Point Charge) de dimensions : 100 x 100 x 100 Å. Les peptides ont été également neutralisés sans ajout de sel. Les expériences de dynamique moléculaire ont été effectuées à température constante (300K, constante de temps de couplage $\tau_p = 0,1$ ps) et pression constante ($P = 1$ bar, $\tau_p = 0,5$ ps) en utilisant la méthode de couplage zz de Berendsen (Berendsen 1984). Le pas de temps est de 2 fs, la méthode de PME (Particle Meshed Ewald) (Darden 1993) a été employée avec un quadrillage cubique (1 Å), un Cutoff de Van Der Waals de 10 Å et une image ont été sauveés chaque 1000 pas. Les deux trajectoires ont été réalisées de la manière suivante : T1) 2 peptides et 3 trimères C2 : représentant un total de 99396 atomes, incluant 32967 molécules d'eau, sur un total de temps de calcul de 42 ns ; T2) 2 peptides et 9 trimères C2 : représentant un total de 99228 atomes, incluant 32729 molécules d'eau, sur un temps de calcul total de 66 ns. Le calcul des surfaces amphiphiles a été réalisée comme décrit précédemment (Simon 2003); les potentiels lipophiles ont été calculés grâce à un logiciel « maison » (LeSolleu 1997) dans lequel nous calculons, sur chaque espace cubique de 0,5 Å de côté, la somme des contributions lipophiles de chaque atome non-hydrogène en fonction de leur distance.

c) Paramètres du dichroïsme circulaire

Les cellules de mesure en quartz utilisées ont un trajet optique 0,1 mm, en rapport avec la concentration de chromophore dans la solution (la cuve de 0,1 mm permet une meilleure précision pour des solutions de 200 μ M à 1 mM). Différentes concentrations ont été testées entre 200 μ M et 1 mM, valeur au-delà de laquelle nous ne pouvons nous placer pour des raisons de saturation de l'appareil. Chaque peptide a été dissous dans un milieu hydroalcoolique H₂O/Ethanol (88/12, v/v), comme celui du vin, l'idéal étant de disposer d'un solvant le plus proche d'un milieu naturel. Les échantillons ont été également stabilisés à pH 3,5 et à 298 K, conditions proches de celle de la salive pour lesquelles l'interaction est la plus favorisée. Les standards poly(L-lysine), poly(L-proline) et autres ont été dissous et enregistrés dans les mêmes conditions.

Pour le traitement des données, les expériences de CD ont été réalisées sur un spectromètre de dichroïsme circulaire JASCO J-815 (JASCO, Bouguenais France). L'accumulation de trois scans consécutifs avec un défilement de 0,5 nm.s⁻¹ et un incrément de 0,5 nm, conduit au spectre.

B. Résultats

Après avoir présenté la caractérisation structurale du peptide par RMN, nous présenterons les résultats obtenus pour l'étude de ce peptide avec 6 différents procyanidines par RMN et modélisation moléculaire afin de déterminer l'influence de la structure des procyanidines sur cette interaction.

a) Dichroïsme circulaire

Afin de déterminer la structure secondaire d'IB7₁₄, nous avons enregistré les spectres de la poly(L-proline), modèle d'hélice de type II ainsi que de la poly(L-lysine) qui, à pH 7,4, adopte une structure désordonnée en pelote statistique dans l'eau. Les spectres dichroïques de ces deux polypeptides sont montrés dans la figure IV-2 et présentent des caractéristiques différentes : la pelote statistique est caractérisée par une ellipticité molaire de l'ordre de -12000 deg.dm⁻¹.cm² pour un minimum d'absorption à 196 nm ; alors que l'hélice de type II a un minimum de l'ordre de -45000 deg.dm⁻¹.cm² à 206 nm. La figure IV-2 montre aussi le spectre dichroïque du peptide IB7₁₄. Un minimum à 200 nm est observé avec une ellipticité de -20000 deg.dm⁻¹.cm², un résultat intermédiaire entre les spectres obtenus pour une hélice de type II, et une pelote statistique.

Après déconvolution, grâce au logiciel CD friend et en utilisant une banque de structures standards connues, on trouve qu'IB7₁₄ est constitué à 38% d'hélice de type PII et 62% de pelote statistique. Ces proportions peuvent être corrélées avec le nombre de prolines consécutives (favorisant la formation d'hélice II) que l'on retrouve dans la séquence du peptide IB7₁₄ (35% avec deux séries à 2 et 3 prolines consécutives).

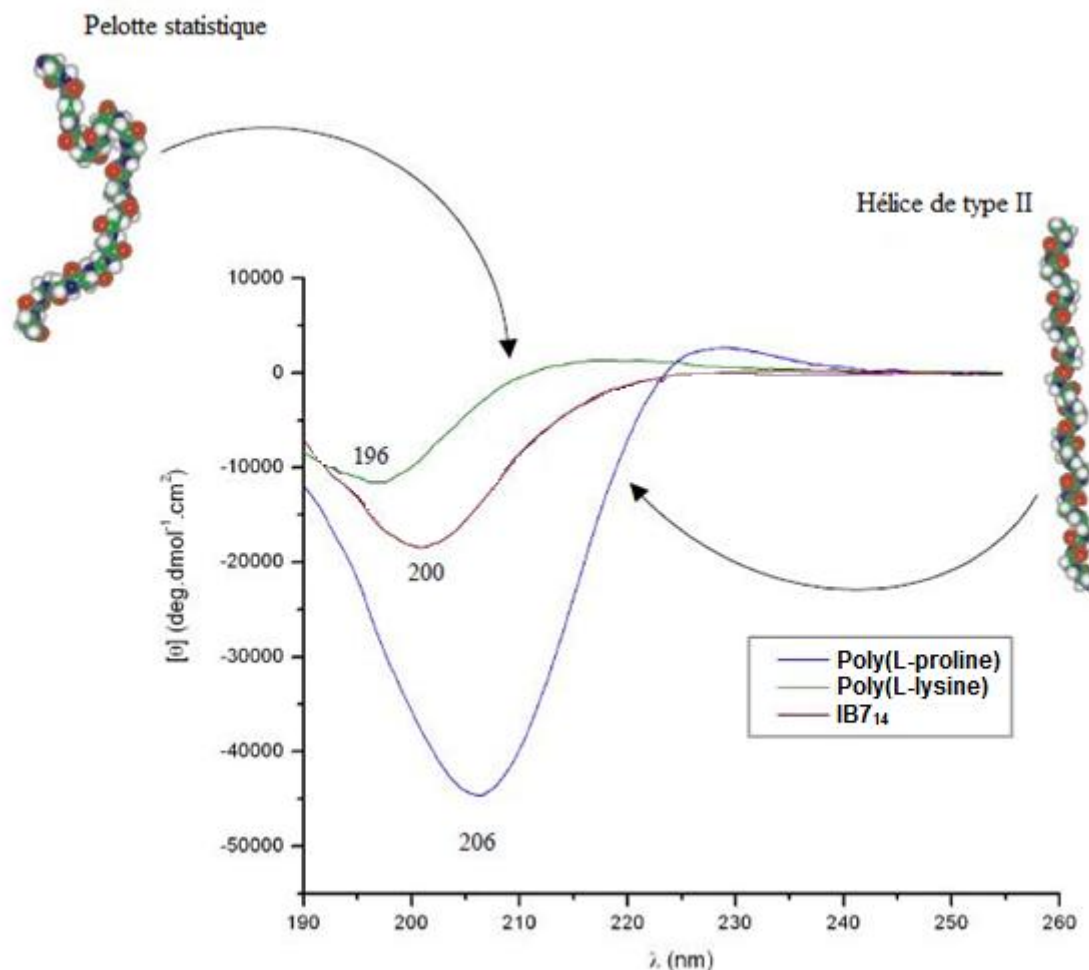


Figure IV-2 : Spectres dichroïques, dans l'eau, de la poly(L-proline) en hélice de type II, de la poly(L-lysine) qui a pH 7,4 adopte une conformation en pelote statistique, et du peptide IB7₁₄ (à 200 μM). Les formes standard sont représentées à côté des spectres.

Les spectres obtenus pour la protéine entière représentant plus de 4 fois le motif IB7₁₄ (thèse Benoit Plet Université Bordeaux 1 et Cécile Simon Université Bordeaux 1) montrent un profil similaire à celui du peptide IB7₁₄, avec un minimum observé à 200 nm avec une ellipticité de $-22000 \text{ deg.dmol}^{-1}.\text{cm}^2$. Cette observation laisse penser que la répétition des quatre séquences provoque une répartition de conformation secondaire identique à celle du peptide, mais également que ce peptide est réellement un bon exemple du comportement de la protéine entière.

b) RMN du peptide IB7₁₄

Toutes les étapes de la stratégie (chapitre III) utilisée pour obtenir la structure 3D ont été suivies ici. Elles sont décrites dans ce qui suit.

i. Attribution des résonances protons.

Il est nécessaire dans un premier temps d'attribuer toutes les résonances des protons de chaque acide aminé du peptide. Pour cela nous avons utilisés la RMN 1D et 2 D du proton avec des séquences Watergate et 2D-TOCSY. Ces deux séquences nous ont permis d'obtenir la valeur des déplacements chimiques de chaque proton de chaque résidu. Deux régions restent importantes pour notre peptide, la région montrant la corrélation entre les NH et les protons de la chaîne latérale (H_α , H_β , H_γ , H_δ , H_ϵ , NH secondaires, ...) (8,6 – 7,8 ppm en F2 et 8 – 0 ppm en F1) permet d'attribuer tous les protons des acides aminés (figure IV-3) ; et la région montrant les corrélations entre les protons H_α des prolines avec les protons H_β et H_γ du cycle pyrrolidine (3 – 1 ppm en F2 et 3 – 6 ppm en F1). Ainsi, pour les prolines, deux régions se distinguent en fonction des résidus voisins à la proline observée. Lorsqu'une proline est suivie d'une autre proline le proton H_α résonne à plus haut champ (autour de 4.5 ppm, c'est le cas des prolines P3, P6, et P11), alors que si elle a pour voisin un quelconque autre résidu, ce même proton résonne à plus bas champ (autour de 5.0 ppm, c'est le cas des P2, P10, et P9 (figure IV-3). Cette expérience nous a permis de retrouver les 2 Gln, les 4 Gly, la Lys, et les 6 Pro de la séquence IB7₁₄, seule la serine de bout de chaîne n'est pas visible.

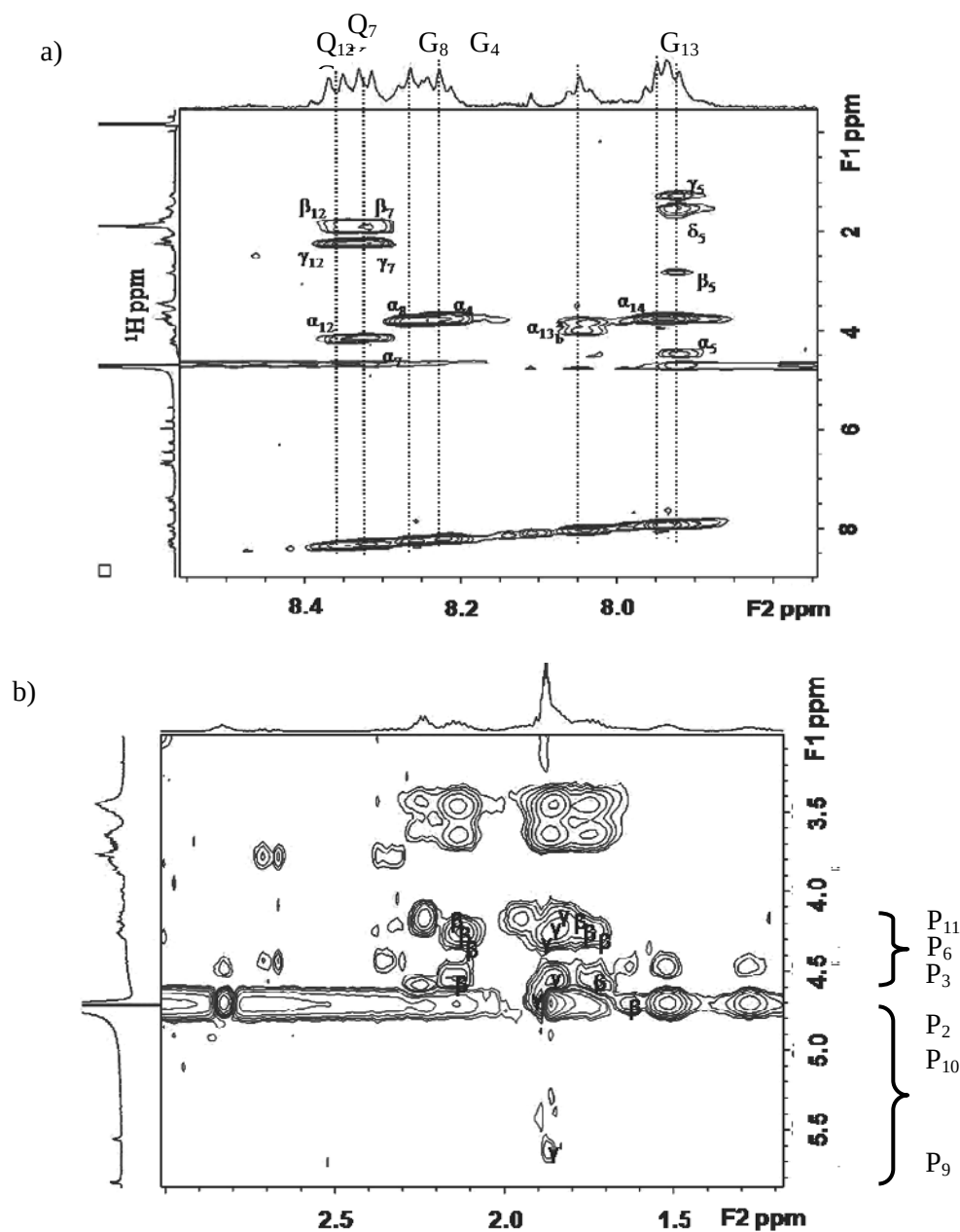


Figure IV-3 : Carte partielle de spectres RMN 2D-TOCSY d'IB7₁₄. Enregistré à 700 MHz, 298 K, pH 3.5, avec le peptide à une concentration de 2mM dans un mélange H₂O:D₂O:EtOD (80:8:12). L'attribution des résonances des protons du peptide dans la région des NH (a) et la région des protons Ha des prolines (b) sont présentées sur la projection 1D ou sur la carte 2D. Les spectres TOCSY ont été enregistrés avec les paramètres suivant : une séquence mlevgpqh19 provenant du logiciel TOPSPIN version 2.1 de Bruker a été utilisée. Les spectres ont été acquis en utilisant un mode states-TPPI avec une fenêtre spectre de 7692 Hz dans les deux dimensions ; un nombre de points de 2048 ; un incrément de 256 dans la dimension t₁ ; un temps de relaxation de 2s ; un nombre de 16 scans par incrément et un « spinlock » de 100 ms. Le traitement des données et leur analyse a été réalisé grâce au logiciel Topspin version 2.1 de Bruker.

c) Attribution séquentielle du peptide

Après avoir attribué l'ensemble des systèmes de spins de chaque acide aminé, il reste à retrouver leur position dans la chaîne peptidique. Pour cela nous avons réalisé une expérience 2D-

ROESY (Rotating frame Overhauser Effect Spectroscopy) qui permet de corrélérer deux spins distants de moins de 5 Å, grâce à l'expression de couplages dipolaires. Ainsi, des effets NOE apparaissent entre le proton H α d'un résidu (i) et le proton NH amide du résidu (i+1). Cette technique proposée par Wuthrich, il y a plus de 20 ans (Wuthrich 1989) permet ainsi une attribution séquentielle d'un peptide.

Le problème reste la proline, qui dès lors qu'elle est présente apporte une rupture dans l'attribution séquentielle d'une chaîne peptidique. Ainsi, dans le cas du peptide IB7₁₄ nombreuses sont les ruptures dans l'attribution séquentielle. Cependant il existe une solution alternative : l'attribution séquentielle peut tout de même être complétée par les corrélations entre le proton H α du résidu (i) et le proton H δ du résidu proline (i+1) (cf. chapitre III).

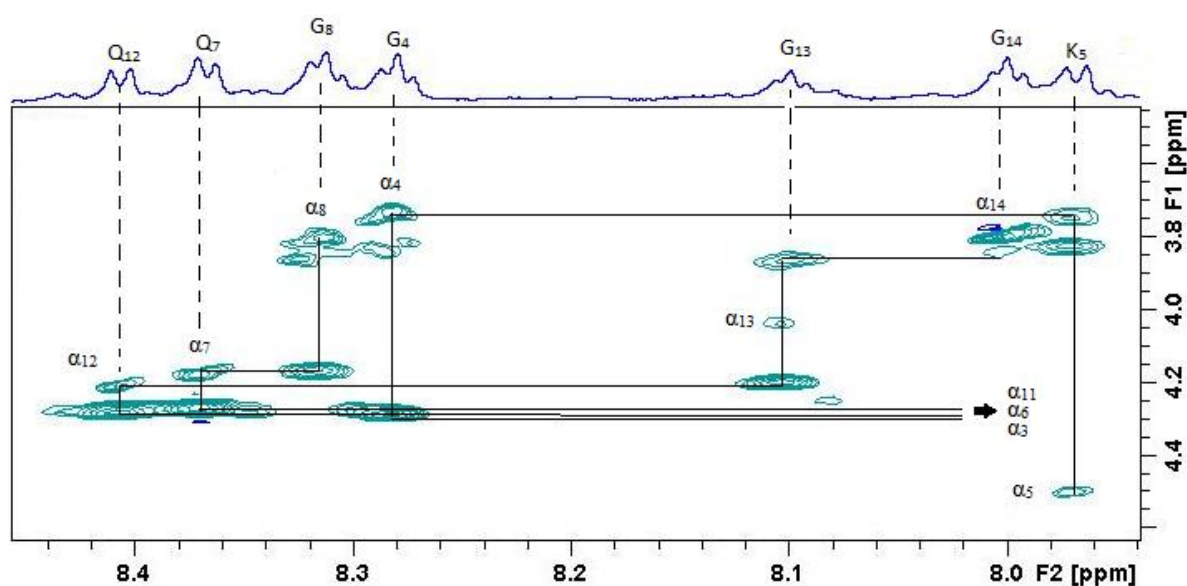


Figure IV-4 : Carte 2D-ROESY de la région des NH amides en dimension F2 et des H α en dimension F1 obtenue à 400MHz, à 298K, pH 3,5 avec 2mM d'IB7₁₄ dans un milieu hydroalcoolique H₂O/D₂O/EtOD (80/8/12, v/v/v). L'attribution des acides aminés est indiquée en pointillé et les corrélations entre le proton H α du résidu (i) et le proton NH du résidu (i+1) est présenté en trait plein

Les résultats obtenus nous ont donc permis d'attribuer l'ensemble des résonances du peptide IB7₁₄ et leur enchainement.

Chapitre IV
Étude de l'interaction entre le peptide IB7₁₄ et différentes procyanidines

	NH	H α	H β_1	H β_2	autres	³ J _{NH-Hα} (Hz)
Serine 1	-	4,279	3,882	3,740	-	8,3
Proline 2	-	4,588	2,227	1,737	H γ =1,882	nd
Proline 3	-	4,272	2,114	1,801	H γ =1,879	nd
Glycine 4	8,221	3,813	-	-	-	5,9
Lysine 5	7,931	4,479	1,641	-	H γ =1,293; H δ =1,538; H ϵ =2,83	7,0
Proline 6	-	4,251	2,133	1,779	H γ =1,860	nd
Glutamine 7	8,315	4,160	1,959	1,838	H γ =2,240	6,6
Glycine 8	8,270	3,813	-	-	-	5,7
Proline 9	-	4,845	-	-	H γ =1,867	nd
Proline 10	-	4,716	2,240	1,638	H γ =1,910	nd
Proline 11	-	4,220	2,240	1,785	H γ =1,852	nd
Glutamine 12	8,360	4,160	1,959	1,838	H γ =2,240	7,0
Glycine 13	8,061	4,007	-	-	-	5,7
Glycine 14	7,954	3,772	-	-	-	5,7

Tableau IV- 1: déplacements chimiques des protons en ppm du peptide IB7₁₄ obtenu à 400MHz, à 298K, pH 3,5 avec 2mM d'IB7₁₄ dans un milieu hydroalcoolique H₂O/D₂O/EtOD (80/8/12, v/v/v. Constantes de couplages 3J (en Hertz) entre les protons amines et les protons α des acides aminés voisins. Ces mesures ont été lues sur le spectre 1D pour le peptide IB7₁₄ seul en solution dans l'eau (avec 10 % de D₂O) à pH 3,5 et 298 K

d) Vers l'obtention de la structure 3D

Les cartes bidimensionnelles obtenues par RMN nous ont permis de réaliser une cartographie des déplacements chimiques de tous les protons du peptide ainsi que de construire un fichier de contraintes structurales de part les effets NOE et les constantes de couplage. Ces données sont ensuite utilisées pour déterminer une structure de basse énergie.

Résidu 1	Résidu 2	Distance	Résidu 1	Résidu 2	Distance
² pro-Hα	³ pro-Hδ	2,2±0,4	⁸ Gly-Hα	⁹ Pro-Hδ	2,2±0,4
³ pro-Hα	⁴ Gly-NH	2,2±0,4	⁸ Gly-Hα	⁹ Pro-Hγ	3,5±0,9
⁴ Gly-Hα	⁵ Lys-NH	2,2±0,4	⁸ Gly-Hα	⁹ Pro-Hβ	3,5±0,9
⁵ Lys-Hα	⁶ Pro-Hδ	2,2±0,4	⁹ pro-Hα	¹⁰ pro-Hδ	2,2±0,4
⁵ Lys-Hα	⁶ Pro-Hγ	3,5±0,9	¹⁰ pro-Hα	¹¹ pro-Hδ	2,2±0,4
⁵ Lys-Hα	⁶ Pro-Hβ	3,5±0,9	¹¹ pro-Hα	¹² Gln-NH	2,2±0,4
⁵ Lys-Hβ	⁶ Pro-Hγ	5,0±0,5	¹¹ pro-Hβ	¹² Gln-NH	3,5±0,9
⁶ Pro-Hα	⁷ Gln-NH	2,2±0,4	¹¹ pro-Hγ	¹² Gln-NH	3,5±0,9
⁶ Pro-Hβ	⁷ Gln-NH	3,5±0,9	¹² Gln-Hα	¹³ Gly-NH	2,2±0,4
⁷ Gln-Hα	⁸ Gly-NH	2,2±0,4	¹³ Gly-Hα	¹⁴ Gly-NH	3,5±0,9
⁷ Gln-Hβ	⁸ Gly-NH	3,5±0,9			

Tableau IV-2 : Distances en Å entre les protons du peptide IB7₁₄ en fonction des effets NOEs déterminés par des expériences Roesy sur le peptide en mélange avec la procyanidine B1 dans un rapport molaire de 1/1 dans un milieu H₂O contenant 10% de D₂O pH 3,5.

C. RMN des complexes tannin- peptide IB7₁₄

a) Mise en évidence des sites de fixation sur le peptide

Le processus d'association entre le peptide IB7₁₄ et les différentes procyanidines a pu être étudié en suivant les variations de déplacements chimiques des résonances du peptide en fonction de la concentration en tanin et ceci pour chaque tanin étudié comme expliqué dans la partie expérimentale (chII d-3). Si l'on regarde en détail, l'ajout de tanin n'affecte pas de la même manière tous les déplacements chimiques des acides aminés du peptide. En revanche, quelque soit le tannin utilisé, les variations maximales de déplacements chimiques ont toujours lieu pour les mêmes cinq acides aminés qui sont la proline 2, la proline 9, la proline 10, la glycine 13 et la glycine 14 comme le montre la figure IV-5 qui présente la variation du déplacement chimique observée pour chaque acide aminé entre une solution 1mM de peptide seul et une solution contenant 1mM de peptide et 7 mM de B1.

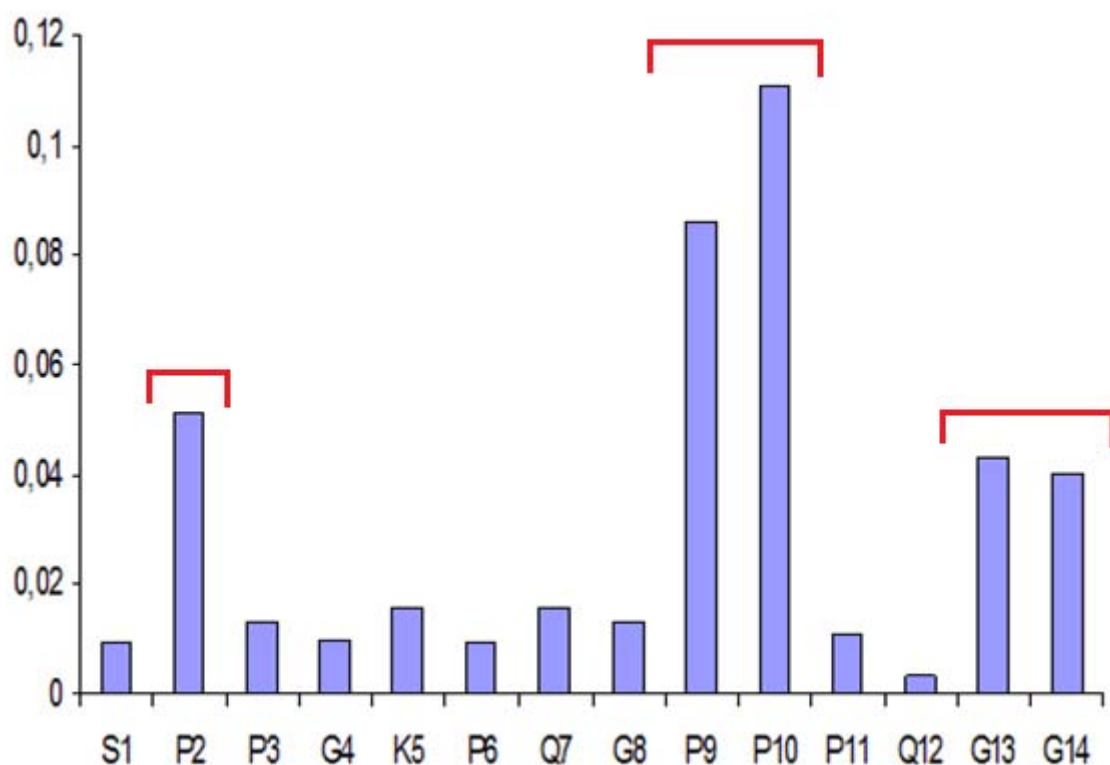


Figure IV-5 : Variation des déplacements chimiques des NH des résidus d'IB7₁₄ (Ha pour la serine1 et les prolines 2, 3, 6, 9, 10 et 11) suite à l'ajout de tanin B1. Les crochets rouges représentent les acides aminés dont les déplacements varient le plus lors de l'ajout de B1.

Ces acides aminés avaient été présentés comme étant les sites de fixations dans le cas du dimère B3 dans le cadre de la thèse de Cécile Simon (Simon 2003).

b) Interaction du point de vue du tanin

De la même façon que pour le peptide seul, l'attribution complète des résonances du tannin en mélange avec le peptide a été effectuée à l'aide de la RMN 1D ¹H et 2D-TOCSY (figure IV-6 et IV-7).

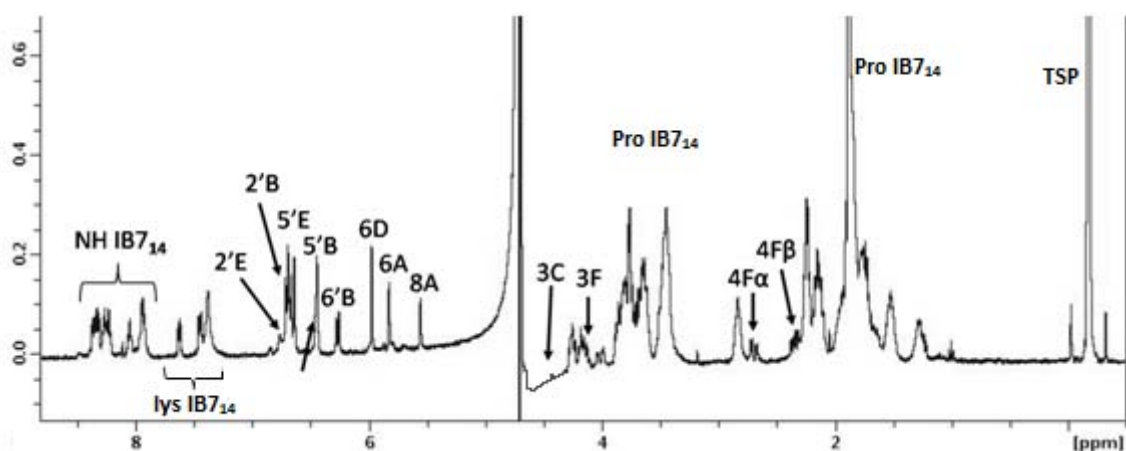


Figure IV-6 : Attribution totale du spectre 1D proton du mélange IB7₁₄ - B1 dans un rapport 1:1, à 298K, pH 3,5. Nomenclature selon figure IV-1

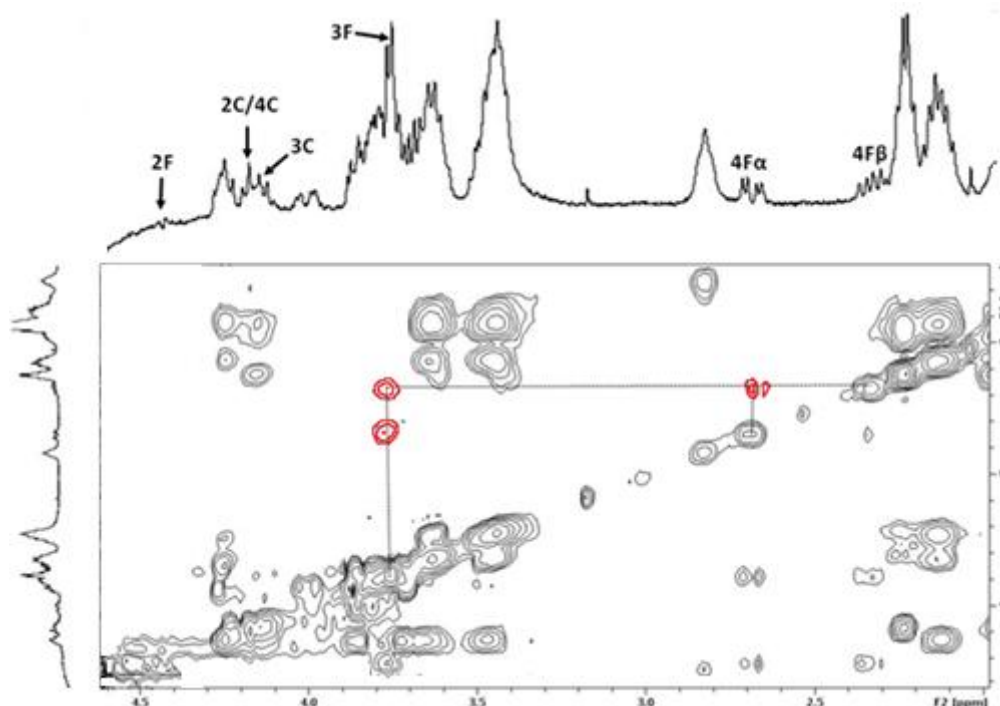


Figure IV-7 : Carte TOCSY du mélange peptide (1mM) procyanidine B1 (1mM) à 298K, pH 3,5, à 400 MHz. Attribution des résonances proton de la procyanidine B1 dans la zone de la région des hétérocycles C et F. Les corrélations intramoléculaire du tanin sont présentées en rouge.

On retrouve les résonances des protons des hétérocycles entre 4,5 ppm pour l'ensemble des tanins, les protons des cycles phloroglucinols autour de 6 ppm et des catéchols autour de 7 ppm. L'ensemble des attributions est reporté dans le tableau IV-4.

¹ H	δ (ppm)	¹ H	δ (ppm)
2C	4,075	2F	-
3C	4,045	3F	3,653
4C	4,075	4Fα	2,589
-	-	4Fβ	2,233
6A	5,517	6D	5,864
8A	5,451	-	-
2'B	6,603	2'E	6,655
5'B	6,336	5'E	6,534
6'B	6,156	6'E	6,354

Tableau IV-4 : Attribution des protons de la procyanidine B1 en mélange avec IB7₁₄ dans un mélange 1/1 dans l'eau (avec 10% de D₂O) à 398K, pH 3,5.

c) Détermination des sites de fixation du tanin sur la protéine

L'utilisation d'expériences du type de transfert de saturation STD a été développée afin de localiser les sites d'interaction du ligand sur son récepteur (Mayer 1999). Son principe repose sur la saturation spécifique des protons du peptide dans notre cas par une impulsion sélective. Cette saturation va se propager au sein du peptide grâce à la diffusion de spin par transfert intramoléculaire. En présence du tanin, cette saturation va également se propager au tanin par transfert intermoléculaire. L'intérêt supplémentaire de cette méthode est qu'elle permet d'identifier au niveau atomique les protons du tanin les plus impliqués dans une interaction.

La Figure IV-8 représente les différents spectres obtenus par STD permettant d'observer les zones du tannin impliquées dans l'interaction avec le peptide.

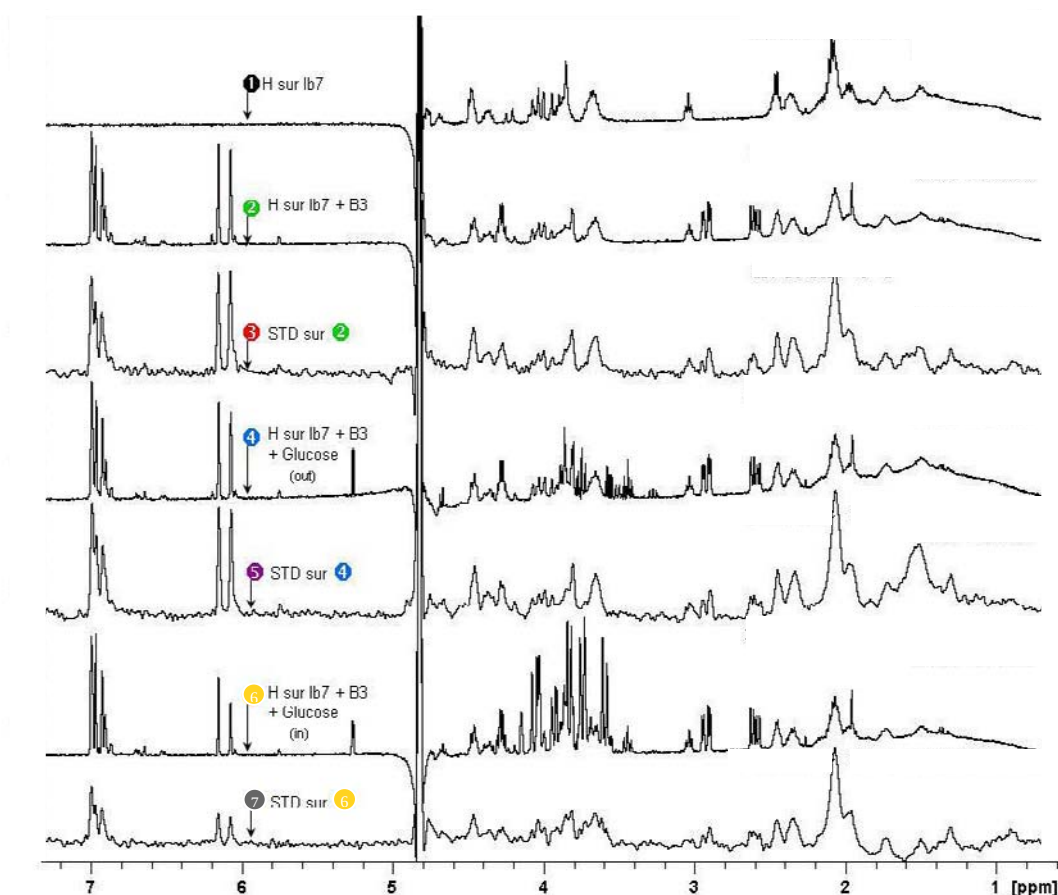


Figure IV-8 : Expériences RMN-STD sur un mélange IB7₁₄/B3/Glucose Expériences RMN-STD sur un mélange IB7₁₄/B3/Glucose. 1- spectre ¹H de IB7₁₄ dans H₂O/D₂O/EtOH, 80/8/12. 2- spectre ¹H de IB7₁₄/B3 (1 :1) dans H₂O/D₂O/EtOH, 80/8/12. 3- spectre STD sur échantillon 2. 4- spectre ¹H d'IB7₁₄/B3 (1 :1) + glucose (externe) dans H₂O/D₂O/EtOH. 5- spectre STD sur échantillon 4. 6- spectre ¹H d'IB7₁₄/B3 (1 :1) + glucose (interne) dans H₂O/D₂O/EtOH. 7- spectre STD sur échantillon 6.

Le spectre 1 est un spectre ¹H du peptide. Le spectre 2 est le même spectre après ajout du dimère B3. Des signaux représentatifs correspondant au dimère apparaissent (H4a H4b, 2,6 et 2,9 ppm (2 dd) ; H2' H5' H6', 7 ppm, (m) ; H6 H8, 6,1 et 6,8 ppm (2 dd)).

Le spectre 3 présente les résultats obtenus par STD sur le spectre 2. Seul le signal du ligand reste visible sur le spectre. Le spectre 3 montre que les signaux correspondant aux protons aromatiques du dimère (autour de 7 ppm) et des protons H6 H8 présentent une plus grande intensité que les autres résonances du tannin. Pour vérifier la spécificité de cette interaction tannin, une solution de glucose a été ajoutée dans un capillaire (externe à l'échantillon) pour donner le spectre 4. Ce spectre est identique au spectre 2 auquel se sont ajoutés les signaux correspondant au glucose (H1 du glucose, 5,3 ppm et zone de résonances autour de 4 ppm). Ce même échantillon 4 est traité par STD (spectre 5), le signal du glucose disparaît entièrement alors que l'on retrouve les signaux représentatifs du dimère : cette expérience confirme la spécificité de l'interaction.

Une nouvelle expérience est réalisée sur un échantillon contenant la protéine IB7₁₄, le dimère B3 et du glucose ajouté directement dans le tube (interne à l'échantillon) le spectre proton (spectre 6) est identique au spectre 5. L'expérience STD est réalisée sur cet échantillon, les résultats obtenus sont présentés sur le spectre 7. On observe la disparition des signaux correspondant au glucose, alors que les signaux correspondant au tannin sont toujours visibles. Ces expériences montrent bien une interaction spécifique entre le tannin et la protéine au niveau des protons des cycles catéchols du tanin, le glucose ne jouant pas de rôle dans cette interaction.

Nous avons dans un deuxième réalisé des expériences ROESY sur un mélange tanin-peptide en proportion 1 : 1 (1 mM) dans un solvant H₂O:D₂O (80:20) pour visualiser les sites d'interactions.

La figure IV-9 présente un exemple de corrélation entre les protons des cycles catéchols B et E du dimère B3 et les protons NH des glycines 13 et 14.

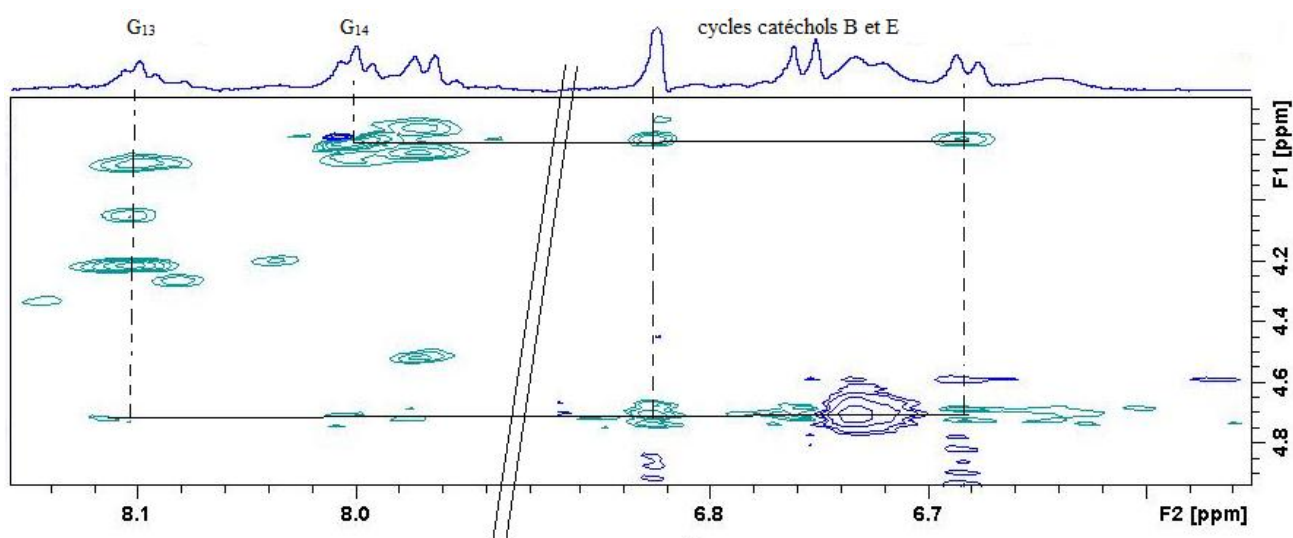


Figure IV-9 : Carte partielle 2D-ROESY d'un mélange peptide - tanin (1:1) à 1mM dans un solvant H₂O:D₂O (80:20) enregistré à 800MHz, à 298K, pH 3,5 . le spectre montre les corrélations entre les protons des cycles catéchols du dimère B3 et des NH des glycines 13 et 14.

Ces expériences montrent que les zones de « contact » du tannin lors de son interaction avec le peptide se localisent majoritairement au niveau des cycles catéchols.

D. Analyse physico-chimique des interactions entre les procyanidines et IB7₁₄

a) Analyse des déplacements chimiques

Lorsque l'on rajoute progressivement des tanins à une solution de peptide à une concentration fixe (dans ce cas, nous avons utilisé une concentration en peptide de 1mM), on observe des variations de déplacements chimiques de certains protons du peptide (figIV-5). La figure IV-10 présente la zone de résonances des NH du peptide des spectres protons enregistrés à différentes concentrations en tanins.

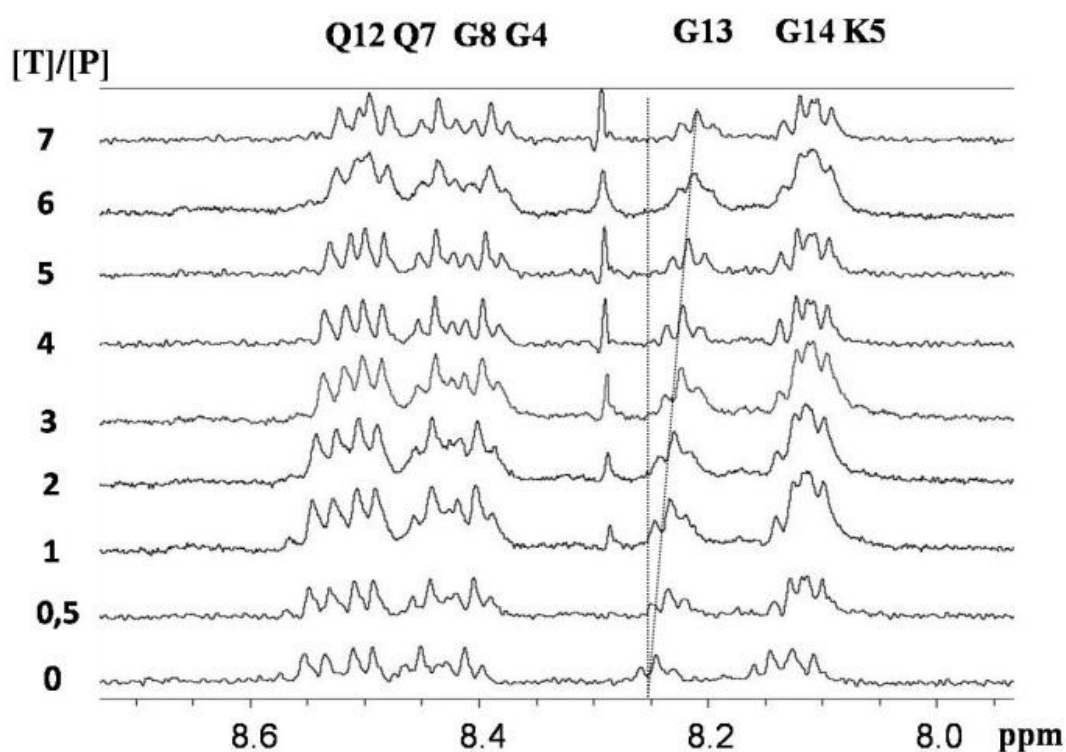


Figure IV-10 : Spectres 1H de la région NH d'IB7₁₄ pour le mélange protéine/tannin représentant la variation de déplacement chimique (ppm) pour chaque rapport tannin/protéine [T/P].

Leur évolution observe le même profil de courbes quelque soit le tannin utilisé, avec un effet de saturation, en accord avec une fixation spécifique. Elle peut-être lissée en utilisant un modèle de fixation simple dans lequel n tannins peuvent se fixer au peptide avec la même constante de dissociation k_d (équation III-8), que nous reprenons ici, le nombre de sites n , la variation maximale de déplacement observé $\Delta\delta_{\max}$ et la constante de dissociation k_d étant les paramètres ajustables.

$$\Delta\delta = \frac{1}{2} \Delta\delta_{\max} (1 + k_d/n[P_0] + [T_i]/n[P_0]) - (1 + k_d/n[P_0] + [T_i]/n[P_0])^2 - 4 [T_i]/n[P_0] \}^{1/2} \quad \text{(III.8)}$$

La figure IV-11 présente les résultats obtenus pour la catéchine, les quatre dimères et pour le trimère C2, où les symboles représentent les points expérimentaux et les courbes, les valeurs calculées après lissage, l'ajustement des variables $\Delta\delta_{\max}$, k_d et n est effectué de telle sorte que la différence entre les points expérimentaux et les points théoriques soit la plus petite possible. Les tableaux IV-(5-10) reportent l'ensemble des valeurs moyennes obtenues pour chacun des tanins. Au regard de ces valeurs, on constate que la stœchiométrie est conservée avec en moyenne 3 procyanidines pouvant se fixer sur 1 peptide IB7₁₄. La constante de dissociation, quant à elle, varie d'un tannin à un autre. On peut ainsi constater que la constante de dissociation du trimère (0,4 mM) est nettement inférieure que les valeurs obtenues pour les dimères (de 2 mM pour B2 à 8mM pour B3) ou pour le monomère (12,8 mM pour la catéchine). Ce résultat montre que le trimère a une affinité pour ce peptide 20 fois supérieure à celle du dimère B3 et 30 fois supérieure à celle du monomère Catéchine.

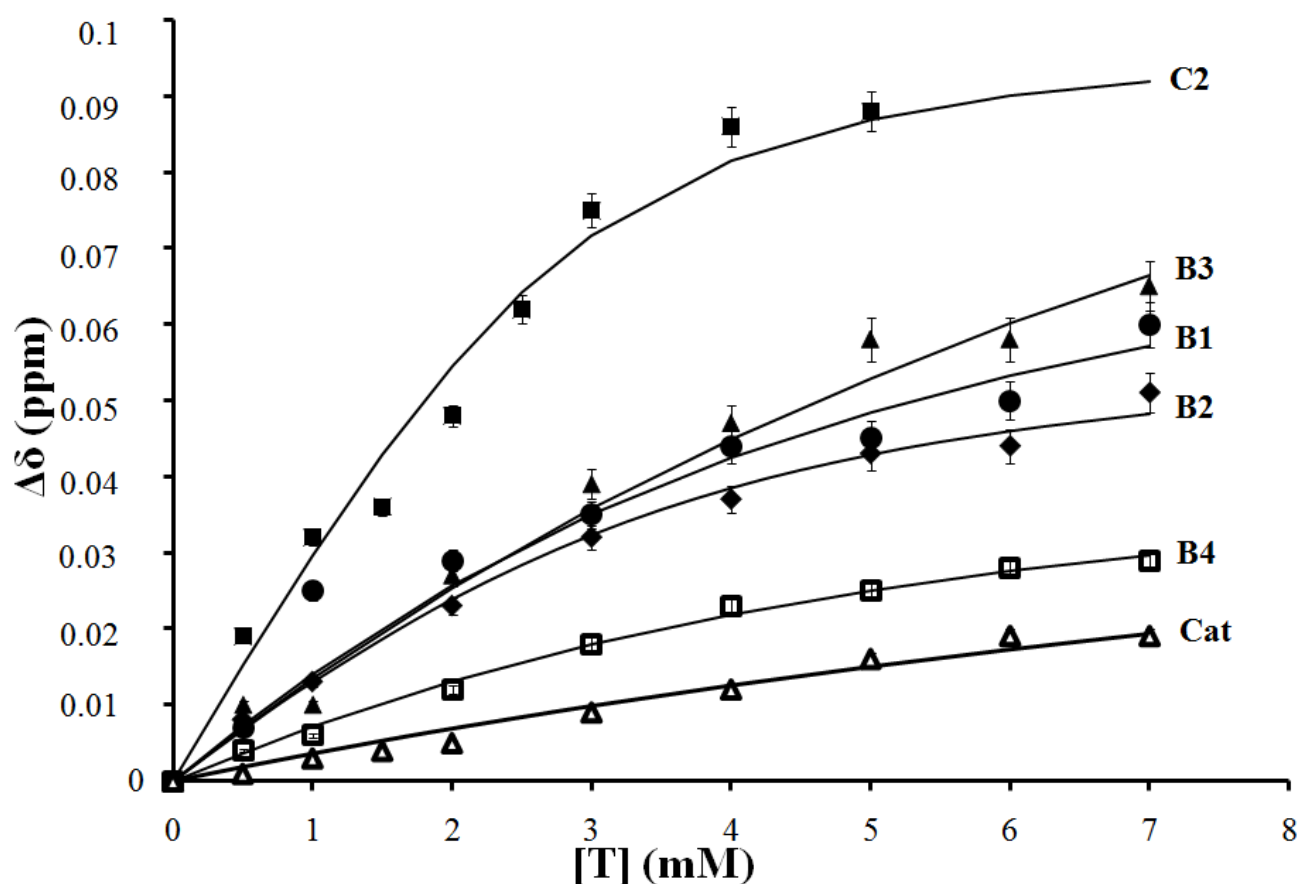


Figure IV-11 : Variation de déplacement chimique (ppm) en fonction du rapport tannin/protéine [T/P] pour le monomère de catéchine, chaque dimère B1, B2, B3 et B4 et le trimère C2 sur le peptide IB7₁₄

b) Analyse du coefficient de diffusion

La mesure de l'évolution du coefficient de diffusion peut être aussi un moyen efficace pour suivre la fixation d'un ligand sur son hôte récepteur (Cohen 2005). Nous avons essayé de voir si cette association tanin-peptide pouvait être suivie de cette manière en utilisant comme moyen de mesure la

RMN DOSY. Étant donné que les masses molaires des deux protagonistes de l'interaction sont proches, (le peptide de 1,3 kDa et les tannins de 289 Da pour le monomère, 578 Da pour les dimères et 867 Da pour le trimère), il nous semblait possible de pouvoir suivre l'évolution du coefficient de diffusion D du peptide lorsqu'on ajoute du tannin, cette évolution traduisant la fixation des tannins sur le peptide.

Une décroissance progressive du coefficient de diffusion du peptide est observée quand la concentration en tanin augmente, et ce quelque soit le tannin utilisé (figure (IV-12)). Cette diminution du coefficient de diffusion du peptide traduit l'augmentation de sa taille et donc montre bien que les tanins se lient au peptide. Cette variation de D peut être également paramétrée en utilisant la même équation que celle utilisée pour suivre les variations de déplacements chimiques *ie* avec l'équation II-2, dans laquelle ΔA correspond à ΔD . Les tableaux IV 5 à 10 reportent également les valeurs obtenues après le lissage des D expérimentaux où la variation maximale du coefficient de diffusion $\Delta D_{\max}$, k_d , la constante de dissociation et n , le nombre de sites de fixation pour chaque procyanidine sont les paramètres ajustables. Les estimations des constantes de dissociation obtenues par ces mesures restent du même ordre de grandeur que celles obtenues lors de l'analyse des déplacements chimiques. Le trimère C2 reste le tannin le plus affiné pour le peptide avec une valeur de k_d de 0,5 mM et une stœchiométrie de 3 (3,4) alors que le monomère de catéchine présente une affinité moindre.

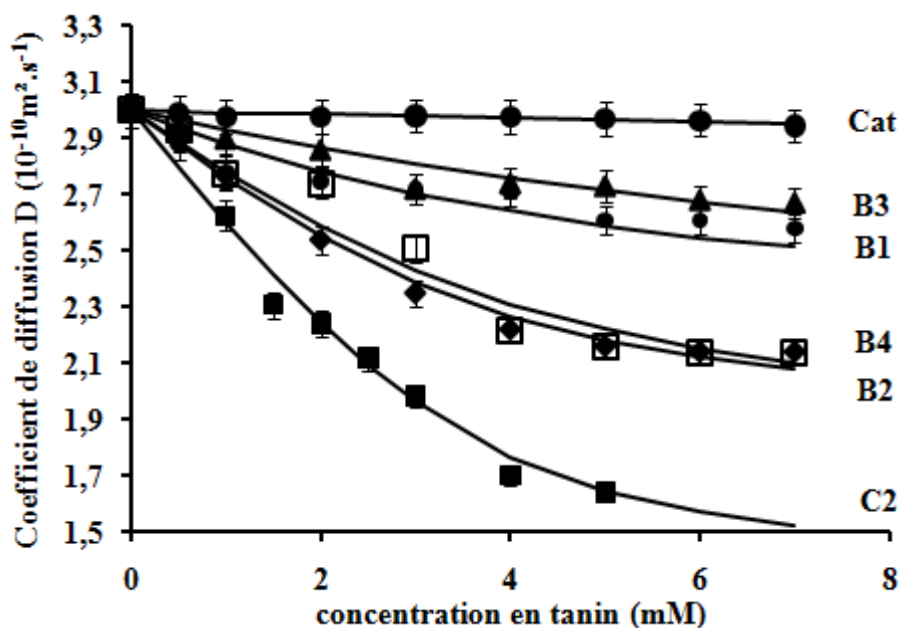


Figure IV-12 : Variation du coefficient de diffusion D ($10^{-10} \text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$) en fonction du rapport tannin/protéine $[T/P]$ pour le monomère de catéchine, chaque dimère B1, B2, B3 et B4 et le trimère C2 sur le peptide IB7₁₄.

Ces mesures de D nous permettent aussi d'accéder à la taille du complexe formé, par la mesure de son rayon hydrodynamique R_H , grâce à la relation de Stokes-Einstein $R_H = k_B T / 6\pi\eta D$, avec $D_{\text{complexe}} = D_{\text{peptide}} - \Delta D_{\max}$, $D_{\text{peptide}} = 3,0 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$, $\eta = 1,095 \text{ cp}$, and $T = 298,13 \text{ K}$. Le peptide seul a

Chapitre IV
Étude de l'interaction entre le peptide IB7₁₄ et différentes procyanidines

un coefficient de diffusion $D_{\text{pept}} = 3,0 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ ce qui correspond à un rayon hydrodynamique, R_H de $7 \pm 1 \text{ \AA}$. Ce rayon R_H augmente à $8 \pm 1 \text{ \AA}$ lorsque le peptide est saturé avec le monomère, à $10 \pm 1 \text{ \AA}$ pour les dimères, et $15 \pm 1 \text{ \AA}$ avec le trimère.

Les tableaux suivant (IV-5 à 10) résument l'ensemble des résultats obtenus suite à l'analyse des variations de déplacement chimique et de coefficient de diffusion au cours de l'ajout progressif de monomère de catéchine, des dimères B1, B2, B3 et B4 et du trimère C2 sur le peptide IB7₁₄.

Cat	δ (ppm)			Coefficient de Diffusion ($10^{-10} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$)	Paramètres de lissage	
[T]/[P]	Proline 2	Proline 10	Glycine 13		k_d	12,760 $\pm$ 0,2
0	4,726	4,801	8,202	3	$\Delta\delta_{\text{max}}$	0,04 $\pm$ 0,01
0,5	4,725	4,802	8,201	2,989	n	3,1 $\pm$ 0,1
1	4,723	4,805	8,201	2,976	RMSD	6,72E-06
1,5	4,722	4,805	8,2	2,979		
2	4,721	4,806	8,199	2,981		
3	4,718	4,807	8,199	2,975		
4	4,714	4,809	8,197	2,971	k_d	12,7 $\pm$ 0,3
5	4,710	4,811	8,196	2,965	ΔD_{max}	0,17 $\pm$ 0,01
6	4,707	4,811	8,194	2,945	n	2,8 $\pm$ 0,3
7	4,707	4,812	8,193	3	RMSD	0,0E-03

Tableau IV-5 : tableau des valeurs de la titration de la catéchine sur le peptide IB7₁₄. Les valeurs de déplacements chimiques pour les acides aminés considérés ainsi que l'évolution du coefficient de diffusion en fonction de la concentration en tanin sont présentés. Les expériences ont été réalisées avec 1mM de peptides dans un mélange H₂O:D₂O: EtOD (80:8:12, vol.) à 298 K, pH 3,5. Les résultats sont présentés dans la partie droite du tableau en utilisant l'équation (II,46) avec en haut les résultats pour l'analyse de la variation des déplacements chimiques et en dessous, ceux obtenus pour la variation du coefficient de diffusion. k_d (la constant de dissociation exprimée en mM) ; n (le nombre de sites de fixation) ; $\Delta\delta_{\text{max}}$ (la variation maximale de déplacement chimique exprimée en ppm) ; ΔD_{max} (la variation maximale du coefficient de diffusion exprimée en $10^{-10}, \text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$) ; RMSD (root mean square deviation, représentant l'écart entre les points expérimentaux et la courbe de titration).

Chapitre IV
Étude de l'interaction entre le peptide IB7₁₄ et différentes procyanidines

B1	δ (ppm)			Coefficient de Diffusion ($10^{-10} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$)	Paramètres de lissage	
[T]/[P]	Proline 2	Proline 9	Glycine 13		k_d	$2,9 \pm 1,4$
0	4,72	4,666	4,666	3,00	$\Delta\delta_{\max}$	0,05
0,5	4,727	4,67	4,67	2,88	n	$3,0 \pm 0,4$
1	4,745	4,672	4,672	2,78	RMSD	6,03E-04
2	4,749	4,678	4,678	2,75		
3	4,755	4,684	4,684	2,72		
4	4,764	4,689	4,689	2,71	k_d	$3,5 \pm 0,3$
5	4,765	4,691	4,691	2,61	$\Delta D_{\max}$	$0,8 \pm 0,1$
6	4,77	4,694	4,694	2,61	n	$2,6 \pm 0,3$
7	4,78	4,695	4,695	2,58	RMSD	2,5E-03

Tableau IV-6 : Tableau des résultats de la titration réalisée sur le peptide IB7₁₄ et le dimère B1. Les conditions expérimentales et le traitement des données sont les mêmes que dans le tableau IV-2

B2	δ (ppm)			Coefficient de Diffusion ($10^{-10} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$)	Paramètres de lissage	
[T]/[P]	Proline 2	Proline 9	Glycine 13		k_d	$1,1 \pm 0,4$
0	4,714	4,714	4,714	3,00	$\Delta\delta_{\max}$	0,06
0,5	4,706	4,706	4,706	2,91	n	$3,2 \pm 0,5$
1	4,701	4,701	4,701	2,77	RMSD	1,11E-03
2	4,691	4,691	4,691	2,54		
3	4,682	4,682	4,682	2,35		
4	4,677	4,677	4,677	2,22	k_d	$0,8 \pm 0,1$
5	4,671	4,671	4,671	2,16	$\Delta D_{\max}$	$1,1 \pm 0,1$
6	4,67	4,67	4,67	2,14	n	$3,6 \pm 0,3$
7	4,663	4,663	4,663	2,14	RMSD	1,0E-03

Tableau IV-7 : Tableau des résultats de la titration réalisée sur le peptide IB7₁₄ et le dimère B2. Les conditions expérimentales et le traitement des données sont les mêmes que dans le tableau IV-2.

Chapitre IV
Étude de l'interaction entre le peptide IB7₁₄ et différentes procyanidines

B3	δ (ppm)			Coefficient de Diffusion ($10^{-10} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$)	Paramètres de lissage	
[T]/[P]	Proline 2	Proline 9	Glycine 13		k_d	
0	4,563	4,563	4,563	3,00	$\Delta\delta_{\text{max}}$	0,16
0,5	4,553	4,553	4,553	2,95	n	3,0±0,5
1	4,553	4,553	4,553	2,90	RMSD	4,97E-09
2	4,536	4,536	4,536	2,86		
3	4,524	4,524	4,524	2,72		
4	4,516	4,516	4,516	2,74	k_d	8,5±0,8
5	4,505	4,505	4,505	2,73	ΔD_{max}	0,9±0,1
6	4,505	4,505	4,505	2,68	n	3,3±0,3
7	4,498	4,498	4,498	2,67	RMSD	1,1E-03

Tableau IV-8 : Tableau des résultats de la titration réalisée sur le peptide IB7₁₄ et le dimère B3. Les conditions expérimentales et le traitement des données sont les mêmes que dans le tableau IV-2.

B4	δ (ppm)			Coefficient de Diffusion ($10^{-10} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$)	Paramètres de lissage	
[T]/[P]	Proline 2	Proline 9	Glycine 13		k_d	
0	4,666	4,72	4,72	3,00	$\Delta\delta_{\text{max}}$	0,09
0,5	4,67	4,727	4,727	2,93	n	3,5±0,3
1	4,672	4,745	4,745	2,77	RMSD	2,86E-03
2	4,678	4,749	4,749	2,74		
3	4,684	4,755	4,755	2,51		
4	4,689	4,764	4,764	2,22	k_d	1,4±0,1
5	4,691	4,765	4,765	2,16	ΔD_{max}	1,2±0,1
6	4,694	4,77	4,77	2,14	n	3,7±0,3
7	4,695	4,78	4,78	2,14	RMSD	0,9E-03

Tableau IV-9 : Tableau des résultats de la titration réalisée sur le peptide IB7₁₄ et le dimère B4. Les conditions expérimentales et le traitement des données sont les mêmes que dans le tableau IV-2.

C2	δ (ppm)			Coefficient de Diffusion ($10^{-10} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$)	Paramètres de lissage	
[T]/[P]	Proline 2	Proline 9	Glycine 13		k_d	
0	4,731	4,871	8,239	3,00	$\Delta\delta_{\text{max}}$	0,4±0,1
0,5	4,712	4,868	8,226	2,92	n	3,0±0,2
1	4,699	4,866	8,216	2,63	RMSD	1,65E-14
1,5	4,695	4,864	8,206	ND		
2	4,683	4,862	8,197	2,31		
2,5	4,669	4,859	8,19	2,24	k_d	0,5±0,1
3	4,656	4,857	8,177	2,12	ΔD_{max}	1,7±0,2
4	4,645	4,854	8,164	1,99	n	3,4±0,3
5	4,643	4,853	8,16	1,70	RMSD	0,4E-03

Tableau IV-10 : Tableau des résultats de la titration réalisée sur le peptide IB7₁₄ et le dimère C2. Les conditions expérimentales et le traitement des données sont les mêmes que dans le tableau IV-2.

De l'ensemble de ces données, il est alors possible de construire une échelle d'affinité des différents tanins vis-à-vis du peptide IB7₁₄ (figure IV-13).

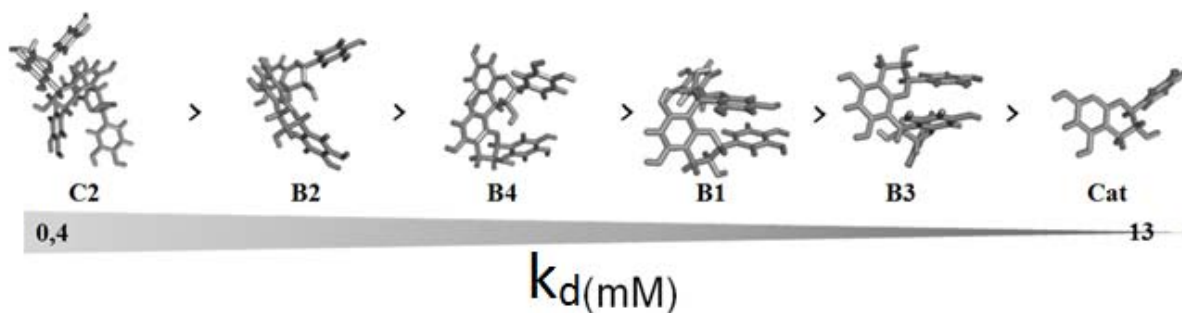


Figure IV-13 : Echelle d'affinité absolue de différentes procyanidines pour le peptide IB7₁₄.

Au niveau de cette échelle d'affinité, deux critères semblent avoir une importance. D'une part, le degré de polymérisation (DP) de la procyanidine semble jouer un rôle important sur l'affinité, plus il est élevé, plus l'affinité est forte. D'autre part, la structure tridimensionnelle semble aussi avoir un rôle important au niveau de l'affinité. En effet, les procyanidines oligomères existent sous plusieurs formes conformationnelles, du fait d'un empêchement à la libre rotation autour de la liaison interflavane. Ainsi, pour les dimères, deux formes coexistent, une forme compacte et une forme étendue (Steynberg et al, 1992, plant polyphenol), leur proportion variant en fonction du solvant (Hemingway et al, 1996, MRC 34, 424) et du dimère (Tarascou 2006; Tarascou 2007). Ainsi le dimère B3, présentant une

structure compacte très largement majoritaire (95%) est le moins affin pour le peptide ; le dimère B2 qui existe à 50% sous les deux formes en échange est le plus affin des dimères. Les dimères B4 et B1 existent majoritairement sous la forme compacte (75 et 90 %, respectivement) et présentent des affinités entre celle de B2 et celle de B3. Pour les trimères, compte tenu des deux liaisons interflavanes, ils peuvent exister sous 4 conformères en échange. . Le trimère C2 existe sous ces quatre formes dans l'eau, l'une d'entre elle étant majoritaire (60%) (Tarascou 2007).

c) Etude du processus d'agrégation

Au cours de la titration, nous avons pu observer la formation d'un précipité consécutif à l'ajout de certains tannins (certains dimères et le trimère) à la solution peptidique. Ce phénomène peut être suivi par RMN quantitative : à chaque ajout supplémentaire de tannin, la quantité de peptide restant en solution est mesurée par l'intégration de la région des NH, l'aire obtenue étant pondérée par rapport à une référence interne, le TMS. La figure IV-14 montre le pourcentage de peptide restant en solution (l'autre partie étant précipitée) tout au long de la titration. Des différences relatives au tannin étudié sont observées. Lorsque l'on ajoute des Procyanidine B3, B4 et dans une moindre mesure, B1 la quasi-totalité du peptide reste en solution, et on ne voit pas non plus de précipité se former au fond du tube, ce qui suggère que ces tanins ne provoquent pas (ou très peu) de précipitation. En revanche, lorsqu'on ajoute du dimère ou du trimère C2 à la solution contenant le peptide, on observe pour des rapports T/P supérieur à 2, une diminution de la quantité de peptide en solution, concomitante avec l'apparition d'un trouble voire d'un précipité dans le tube.

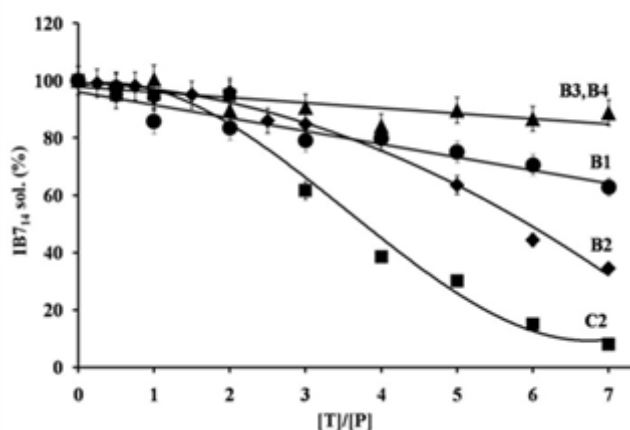


Figure IV-14 : pourcentage de peptide en solution en fonction de la concentration en tannin, dans un mélange H₂O:D₂O: EtOD (80:8:12, vol.) à 298 K, pH 3,5.

En suivant cette méthodologie, nous ne pouvons pas prendre en compte l'aspect cinétique de ce phénomène de précipitation. Cependant, pour chaque titration, deux spectres proton sont enregistrés à 4 h d'intervalle, aucune différence d'intensité n'a été observée entre les deux spectres ce qui laisse

penser que lorsque l'on a formation d'un précipité, celui ci a lieu au cours de la préparation de l'échantillon (maximum 30min).

E. Dynamique moléculaire

La dynamique moléculaire a été utilisée dans cette étude avec plusieurs objectifs : i) déterminer la structure tridimensionnelle du complexe et permet d'identifier et de visualiser les sites de fixation ainsi que de déterminer la stœchiométrie du complexe. ii) identification du processus de précipitation. Nous avons choisi de présenter ici les expériences de modélisation moléculaire sur un système composé du peptide IB7₁₄ et du trimère C2. Ce choix a été fait pour compléter les études en dynamique moléculaire précédente qui avaient été réalisées avec le dimère B3 dans le cadre de la thèse de Cécile Simon (Simon 2003).

Les dynamiques moléculaires ont été réalisées à partir du peptide IB7₁₄ en respectant sa structure tridimensionnelle décrite précédemment (Simon 2003) et du trimère C2 dans sa conformation majoritaire déterminé dans l'eau par Tarascou *et al.* (Tarascou 2007). La première trajectoire T1, est réalisée sur un système contenant 2 peptides IB7₁₄ et 3 trimères C2 dans une boîte d'eau de 100 Å de côté. Ces conditions expérimentales correspondent à un rapport molaire [T]/[P] de 1,5 et une concentration [C2] de 5 mM. Autrement dit, ce premier système permet d'étudier la formation de complexe tanin-protéine en dessous de la CMC de C2, cette CMC ayant été estimée à 15 mM (Pianet et al, 2008). La figure IV-15 présente les différents points clefs de la simulation. Après 5ns, un premier complexe de deux trimères est formé par « π - π stacking ». Au temps $t = 9,5$ ns, le trimère C2 restant vient s'associer à l'un des deux peptides, grâce à la création de liaisons hydrogènes. À cette étape, nous pouvons observer des différences au niveau de la structure tridimensionnelle qu'adopte le peptide lorsqu'il est libre ou complexé à un tanin. Sous sa forme libre, il adopte une conformation fibrillaire très flexible alors qu'une fois complexé au trimère, il se referme sur le tanin laissant un point de flexibilité au niveau de la glycine 8 (résultat en accord avec ceux obtenus par Simon *et al.* sur le B3 (Simon 2003)). A $t = 29$ ns, le second peptide vient se fixer sur le complexe tanin-peptide formé quelques instants auparavant, et au niveau du trimère C2, celui-ci jouant un rôle bidentate. Ce complexe formé de deux peptides liés entre eux par un tanin, représentant une sphère dont le rayon est approximativement de $8,5 \pm 0,1$ Å. reste stable jusqu'à la fin de la simulation ($t = 42$ ns).

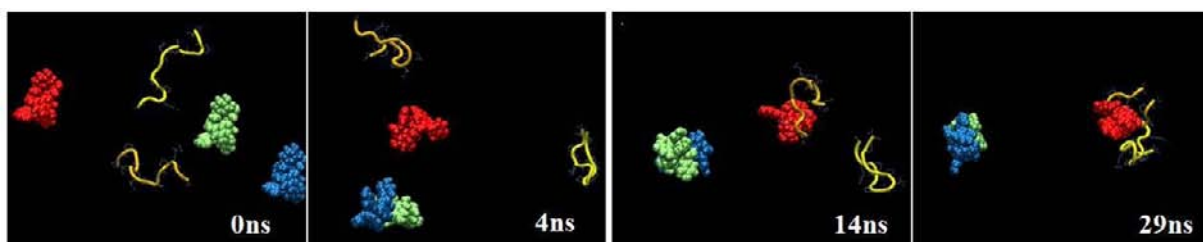


Figure IV-15 : Simulation en dynamique moléculaire d'un système de 2 peptides IB7₁₄ et 3 trimères C2 dans une boîte d'eau de 100 Å de côté. Les peptides sont représentés en ruban jaune et les tanins en « boules et bâtons » en vert, bleu et rouge.

Une deuxième trajectoire est effectuée sur un autre système contenant 2 peptides IB7₁₄ et 9 trimères C2 ce qui correspond à une concentration [C2] de 15 mM (concentration de l'ordre de sa CMC) et à un rapport [T]/[P] de 4,5. Cette simulation est présentée en figure IV-16 et montre une interaction tanin-tanin très rapide. A 0,7 ns et 1,2 ns un premier « stacking » générant des micelles composées de 2 C2 apparaît ; un processus de « micellisation des trimères s'opère par la suite par fusion des petites micelles de trimères C2 déjà formées, ce processus conduit dès 5,9 ns à la formation d'une micelle composée de 5 trimères C2. A 2,3 ns un trimère C2 libre vient se fixer sur un des peptides. A 39 ns, le peptide libre vient fixer la micelle de 5C2, le deuxième peptide venant par la suite s'agréger sur ce complexe. A $t = 60$ ns, un complexe composé des 2 peptides et de 6 tanins se forme, (en accord avec la stœchiométrie de 3 tanins par peptide retrouvée expérimentalement), celui-ci restant stable durant les 16 ns restante de la simulation.

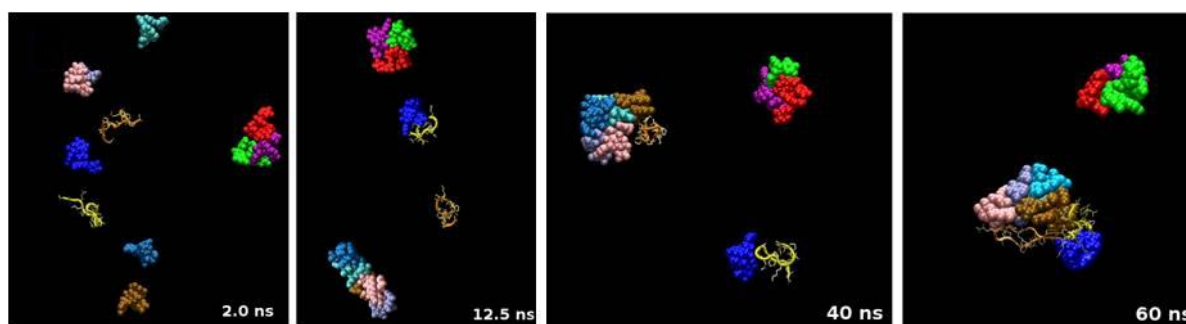


Figure IV-16 : Simulation en dynamique moléculaire d'un système de 2 peptides IB7₁₄ et 9 trimères C2 dans une boîte d'eau de 100 Å de côté. Les peptides sont représentés en ruban jaune et orangé et les tanins en « boules et bâtons » en vert, violet, rouge, bleu clair, bleu foncé, rose, marron, cyan, mauve.

Le complexe final (2 peptides – 6 tanins) a la forme d'une ellipse dont le rayon sur l'axe longitudinal est de $34,5 \pm 0,5$ Å et le rayon sur l'axe transversal est de $23,5 \pm 0,5$ Å.

De cette simulation, nous pouvons penser qu'au dessus de leur CMC, la formation de micelles de tannins est cinétiquement favorisée. Si les peptides semblent se lier préférentiellement aux tannins sous leur forme libre, la deuxième trajectoire montre qu'ils peuvent aussi s'associer à des tannins sous forme micellaire.

Les résultats des dynamiques moléculaires semblent montrer que l'initiation d'un réseau conduisant à la précipitation du complexe « tanin-protéine » peut se faire suivant deux mécanismes différents : au dessous de sa CMC, le trimère C2 existe préférentiellement dans état libre, mais il peut jouer le rôle d'un agent bidentate capable de lier deux peptides ; au dessus de sa CMC, le trimère C2 existe préférentiellement sous forme de micelle, laquelle peut également lier deux peptides.

Un calcul de potentiel lipophile des deux types de complexes a été réalisé au niveau atomique (figure IV-17).

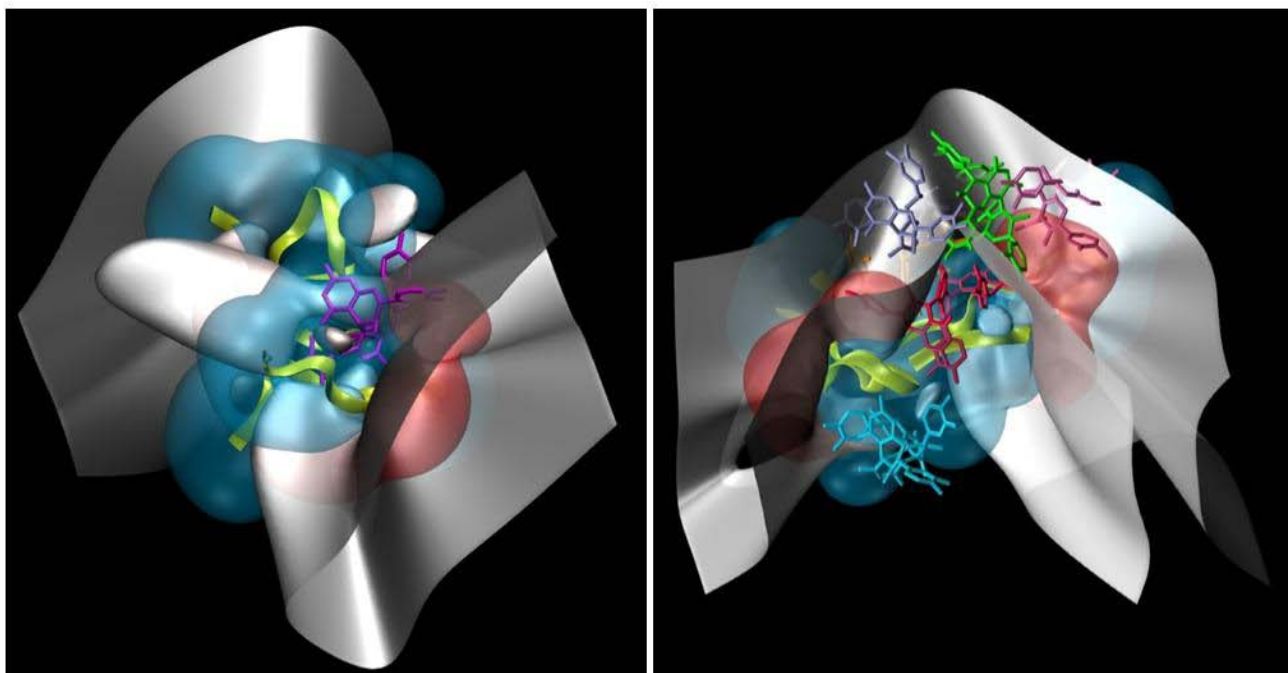


Figure IV-17 : représentation de l'hydrophobicité des peptides ; en rouge, la région hydrophobe ; en bleu, la région hydrophile ; en argent, l'interface. Les peptides sont représentés en ruban jaune, les tanins en bâton de couleur. A gauche est présenté le complexe final de 2 peptides et 1 C2 (trajectoire 1) et à droite le complexe final de 2 peptides et 6 C2 (trajectoire 2).

Lorsqu'un seul trimère s'associe à deux peptides (figure IV-17, image de gauche), on peut observer que l'interaction entre les groupements phénols du tanin et les deux peptides a lieu dans leur région hydrophile (bleue), au niveau des fonctions carboxyles des résidus P2, P9-P10 et G13-G14, par la création de liaisons hydrogènes. Lorsqu'une micelle de 6 C2 s'associe à deux peptides (Figure IV-17, image de droite), on observe que certains tanins se trouvent dans la région hydrophile du peptide (3 d'entre eux forment des liaisons hydrogènes au niveau des résidus P2, Q7-P9 et G14) les autres C2 sont associés par des interactions π - π dans la région hydrophobes des peptides, par l'intermédiaire des cycles aromatiques des tanins et les cycles pyrrolidine des prolines.

F. Discussion

Au sein de la communauté scientifique, la nature des interactions entre les tannins et les protéines de la salive reste très controversée. Pour certains, il s'agit d'interaction hydrophobes de type « π - π stacking » entre les cycles phénoliques et les cycles pyrrolidines des prolines, pour d'autres, elle serait due à des liaisons hydrophiles par le biais de liaisons hydrogènes entre les carbonyles des prolines et les OH des phénols (Simon 2003). Nous avons pu démontrer dans ce chapitre que les deux types d'interactions pouvaient avoir lieu et ceci en fonction de la concentration en tanin utilisée. En dessous de la CMC, nous avons pu mettre en évidence la nature hydrophile de cette interaction entre le peptide riche en proline et les tannins étudiés. Il y a cependant une influence de la conformation des tanins sur le mode d'interaction. Lorsqu'ils adoptent une conformation ouverte tels que le dimère B2

ou le trimère C2, les groupements phénoliques sont accessibles et favorables à la formation de liaisons hydrogènes permettant ainsi de lier deux peptides conduisant à l'initiation d'un réseau tanins-peptides pouvant conduire au phénomène de précipitation. Lorsqu'ils adoptent une conformation majoritairement compacte, tels que les dimères B3, B1 et B4, ces derniers ne peuvent interagir qu'avec un seul peptide à la fois et ne peuvent pas initier la formation d'un réseau conduisant à la précipitation du complexe tannins-peptides.

Pour des concentrations en procyanidines au-dessus de leur CMC, les tannins existent préférentiellement sous forme de micelles composées d'une dizaine de tanins. Ces colloïdes sont capables d'interagir avec les peptides à la fois par des liaisons hydrophiles et des liaisons hydrophobes. Les complexes formés semblent alors capables d'initier la formation d'un réseau qui peut provoquer la précipitation du système.

L'ensemble des résultats est résumé dans un schéma général (figure IV-18) regroupant les différents mécanismes d'interaction que nous avons présentés. Ce schéma ouvre sur une discussion qui tient compte de la spécificité de l'interaction tanin-peptide et de l'influence de la structure tridimensionnelle des tannins et de leur état colloïdal sur l'interaction et la formation de réseaux.

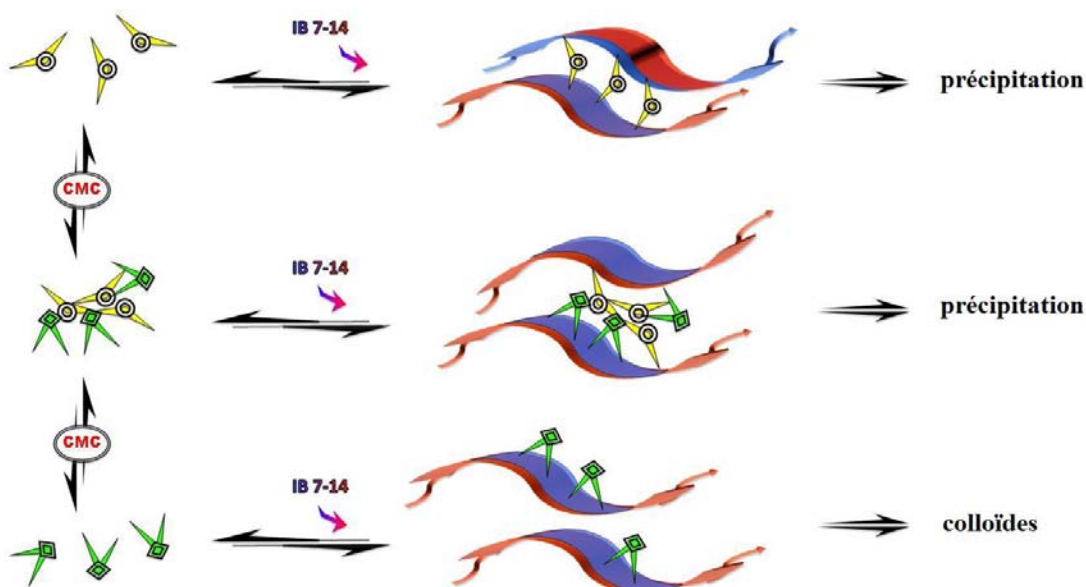


Figure IV-18 : Différents mécanismes représentant l'interaction entre les procyanidines et le peptide IB7₁₄ conduisant à la formation d'un précipité ou à la formation de simples colloïdes. Phénomène dépendant de l'état d'agrégation des tannins (sous la CMC des tannins les molécules sont libres (vert (en bas à gauche) et jaune (en haut à gauche)), au dessus de la CMC, formation de micelle (mélange vert et jaune (au milieu à gauche)) et de leur conformation préférentielle (compacte en vert et étendue en jaune)).

a) Spécificité de l'interaction tanin-PRP

Lorsque les tanins sont ajoutés sous une forme libre au peptide, autrement dit dans des conditions de concentration sous leur CMC (entre 15 et 30 mM selon la procyanidine considérée (Pianet 2008)), nous avons pu démontrer que l'interaction avec le peptide IB7₁₄ était spécifique et se faisait par des interactions hydrophiles. Quelque soit le tanin utilisé, l'interaction a toujours lieu sur les

trois mêmes sites du peptide : P2, P9-P10 et G13-G14. Ceci a été montré par plusieurs méthodes, l'analyse des variations de déplacements chimiques, l'existence de NOE intermoléculaire (figure IV-9) et les calculs de dynamique moléculaire. La région du tanin mise en jeu lors de l'interaction a été appréhendée de plusieurs techniques : la STD nous a permis de montrer l'implication des cycles catéchols et phloroglucinol lors de l'interaction avec le peptide. La modélisation moléculaire a permis de confirmer la formation de liaisons hydrogènes entre les OH des cycles phénoliques et les prolines 2 et 6 du peptide. De plus en considérant l'état d'agrégation des tanins, nous avons pu montrer par dynamique moléculaire, que pour des concentrations supérieures à leur CMC, les tanins s'auto-associent par l'intermédiaire de liaisons π - π cinétiquement favorable (figure IV-16). Néanmoins, les interactions tanin-peptide peuvent se faire entre un agrégat composé de plusieurs tanins et le peptide en mettant en jeu à la fois des interactions hydrophobes et hydrophiles (figure IV-17)

Dans les années 1980, Hagerman et Butler (Hagerman 1981) avaient déjà présenté la spécificité de l'interaction entre des tanins hydrolysables et des protéines, interaction qu'ils imaginaient se faire par le biais de liaisons hydrogènes entre la partie phénolique des tanins et le peptide. Au contraire, d'autres auteurs pensaient que les tanins et les PRPs pouvaient former des complexes par le biais d'interactions hydrophobe (Luck 1994; Murray 1994; Kawamoto 1996; Charlton 2002). En 1998,

Hagerman et ses collaborateurs proposaient des modes d'interactions différents selon la nature des tanins (Hagerman 1998) : les tanins hydrolysables tel que le galloylglucose, qui sont des tanins non polaires, interagiraient avec les protéines par des interactions hydrophobes alors que les tanins condensés telles que les procyanidines, plus polaires, pourraient interagir avec les protéines via des liaisons hydrogènes. Ces auteurs considéraient donc que les interactions peuvent être spécifique dans le cas de liaisons hydrogènes et non spécifique dans le cas des interactions hydrophobes et ceci en fonction de la nature du tanin considéré.

Dans ce chapitre de thèse, nous avons pu montrer que le mécanisme de l'interaction entre les tanins et les protéines n'est pas un phénomène simple. Les deux types d'interaction, hydrophiles et hydrophobes peuvent exister, dépendant de l'état colloïdal du tannin. Nous tenons également à souligner le fait que l'on doit faire preuve de prudence dans l'utilisation du terme «spécifique» étant donné que l'interaction hydrophile spécifique ne se fait que par l'intermédiaire de liaisons hydrogènes entre les phénols des tanins et les carbonyles du squelette du peptides et non de manière spécifique sur la chaîne latérale des acides aminés qui est habituellement impliquée dans la reconnaissance d'un ligand par sa protéine hôte.

b) Relation entre l'affinité pour le peptide et la structure tridimensionnelle des procyanidines

L'échelle d'affinité présentée en figure IV-13 montre que le trimère C2 est le tanin ayant la plus forte affinité pour le peptide IB7₁₄ et que le monomère est celui qui a la moins forte affinité. Les dimères présentés possèdent des différences significatives au niveau de leur affinité pour le peptide en dépit de leur masse identique. L'affinité dépendrait donc de la stéréochimie de l'hydroxyle lié au carbone 3, de la stéréochimie de la liaison interflavane et du degré de polymérisation. Tarascou *et al.* (Tarascou 2006), ont montré que les dimères de procyanidine B1 et B3, qui possèdent les constants de dissociation les plus hautes (2,9 et 8,0 mM, respectivement) et donc les affinités les plus faibles pour le peptide IB7₁₄, adoptent préférentiellement des structures compactes, dans laquelle les groupes catéchols des deux unités (épi)catéchines se font vis à vis. Le dimère B2 quant à lui, dont la constante de dissociation est la plus basse parmi les dimères (et donc l'affinité la plus élevée pour le peptide IB7-14), peut être présent sous deux formes dont une étendue. La notion de « compacte » ou « étendue » est liée à la position des cycles phénoliques dans la structure tridimensionnelle et donc de la disponibilité des groupements hydroxyles susceptibles d'interagir. Dans le cas de la forme compacte, les hydroxyles sont moins accessibles du fait de la stabilisation des cycles par des liaisons π , alors que dans le cas de la forme étendue, les hydroxyles sont libres et favorables à une interaction.

Il apparaît donc que plus la structure du tanin est étendue, plus l'affinité pour le peptide est forte. Ceci est confirmé dans le cas du trimère puisque le trimère, qui existe sous quatre conformères possibles dans lesquels un des catéchols se trouve toujours libre de tout stacking (Tarascou 2007), est le tanin présentant la plus forte affinité pour le peptide IB7₁₄.

La structure tridimensionnelle des tannins est donc importante pour l'affinité mais il semble également que leur état colloïdal joue un rôle dans la formation de réseau ou non. La figure IV-18 présente un résumé de différent processus de la formation de complexe tanin-protéine. Ces différents mécanismes sont construits avec les résultats obtenus par modélisation moléculaire et RMN. En dessous de la CMC des tanins, deux cas sont envisageables. Si les tannins adoptent une conformation compacte comme dans le cas des dimères B3, B1 et B4, le tanin joue un rôle de monodentate ne permettant pas l'initiation de la formation d'un réseau. Dans le cas du dimère B2 ou du trimère C2, une conformation étendue est compatible avec la formation de réseau initié par un complexe de deux peptides liés à un tanin jouant le rôle de bidentate. La dynamique moléculaire montre que dans le cas du C2, le tanin est capable de fixer deux peptides via des liaisons hydrogènes initiant la formation d'un réseau susceptible de conduire à un phénomène de précipitation. Cette précipitation a pu être mise en évidence par RMN de manière quantitative (figure IV-14). Ceci est tout à fait en accord avec les travaux de Charlton et Baxter qui proposent un schéma explicatif de la précipitation qui a lieu lors de la formation de complexe tanin-protéine. (Baxter 1996; Charlton 2002).

Au dessus de leur CMC (10-15 mM), tous les tannins forment des agrégats susceptibles d'interagir avec deux peptides distincts (figure IV-16). Ce complexe supramoléculaire correspond également à l'initiation d'un réseau qui conduirait à la formation d'un précipité.

c) Complexe tanin-protéine et sensation d'astringence.

L'astringence est le résultat de la précipitation du à la formation de complexe entre les tannins et les protéines salivaires. Ce précipité cause la perte de la fonction principale de la salive qui est la lubrification de la cavité buccale et donc conduit à une sensation de sécheresse en bouche (Gawel 1998). Cependant des études récentes ont montré que les tanins libres, en jouant le rôle de stimulus, pouvaient avoir une plus forte influence sur la perception de l'astringence que les tanins déjà impliqués dans les complexes précipités (Kallithraka 2001; Schwarz 2008).

Nous avons démontré que la formation d'un réseau pouvait conduire au phénomène de précipitation en fonction de la concentration et de la conformation structurale qu'adopte préférentiellement les tanins, mais chaque tanin interagit de manière différente et spécifique avec les protéines salivaires ce qui peut expliquer les différences gustatives ressenties. L'influence de la structure des tanins à été mise en évidence dans ce chapitre de thèse, il reste toutefois à contrôler l'influence de la longueur du peptide car des études montrent que la longueur de la protéine influencerait sur l'affinité du complexe formé (Charlton 1996; Carvalho 2006).

G. Conclusion

Nous avons donc pu construire une échelle d'affinité entre IB7₁₄ et six différentes procyanidines. De plus, nous avons pu mettre en évidence la nature des interactions mises en jeu. Deux phénomènes s'opèrent, en dessous de la CMC, des interactions spécifiques ont lieu entre les procyanidines et le peptide. Au dessus de la CMC, les interactions hydrophiles ont lieu dans un premier temps et sont suivies par des interactions hydrophobes entre les tanins et le peptide, dans un deuxième temps nous avons confronté les techniques qui sont le CD, la RMN et la modélisation moléculaire, qui individuellement n'apportent pas toutes les informations sur l'interaction mais qui prises dans leur ensemble permettent d'apporter une vision plus complète des interactions tanins-protéines.

De plus, nous avons pour la première fois pu réaliser une échelle d'affinité sur un système tanins-protéines.

Chapitre V

Étude de l'interaction entre le peptide IB9₃₇ et différentes procyanidines

Le but de ce projet est de déterminer toutes les facettes de la sensation d'astringence. Dans le chapitre précédent nous avons montré l'influence de la structure des tanins sur leur affinité à l'égard d'un peptide de 14 résidus IB7₁₄. Dans ce chapitre, nous allons nous intéresser à l'influence de la taille de la protéine sur son affinité vis-à-vis des tanins.

Il existe, en effet, des travaux récents qui semblent montrer l'influence de la taille de la protéine utilisée sur l'affinité (Charlton 1996; Carvalho 2006): la protéine entière aurait une affinité mille fois plus forte qu'un simple peptide représentatif de la séquence répétée. Notre choix s'est porté sur le peptide IB9₃₇: sa séquence comporte près de trois fois le motif IB7₁₄ (schéma V-1). Ainsi, il possède potentiellement 3 fois plus de sites de fixation pour les tanins. A travers cette étude, nous pouvons comparer le comportement de ces deux peptides quand ils sont en présence de procyanidines, à savoir si IB9₃₇ possède toujours les mêmes sites de fixation, s'il présente la même affinité pour les procyanidines et si le modèle d'interaction proposé pour IB7₁₄ est le même pour IB9₃₇.

Séquence IB7₁₄: SPPGKPQGPPPPQGG

Séquence IB9₃₇: SPPGKPQGPPPPQGGNQPGPPPPGKPQGPPPPQGGNR

Schéma V-1. Séquence des deux peptides étudiés

Dans ce travail, nous avons étudié l'affinité d'IB9₃₇ pour trois procyanidines différentes: le dimère B3, le dimère B1 et le trimère C2, en utilisant les mêmes méthodes que précédemment: le dichroïsme circulaire, la RMN et la modélisation moléculaire. Le trimère C2 a été choisi car il représente le tanin le plus affin vis-à-vis du peptide IB7₁₄, B3 le dimère le moins affin et B1 le dimère situé juste après B3 sur l'échelle d'affinité. Ceci va nous permettre de vérifier si l'échelle d'affinité pour le peptide de 37 résidus est d'une part du même ordre que celle d'IB7₁₄ et d'autre part si l'ordre des procyanidine est conservé sur cette échelle d'affinité. Nous présenterons d'abord l'étude structurale par DC, RMN et modélisation moléculaire du peptide IB9₃₇, puis les interactions avec les 3 procyanidines toujours appréhendées par les mêmes techniques.

A. Analyse structurale du peptide IB9₃₇

a) Dichroïsme circulaire

Les cellules de mesure en quartz utilisées ont un trajet optique 0,1 mm, en rapport avec la concentration de chromophore dans la solution (la cuve de 0,1 mm permet une meilleure précision pour des solutions de 200 µM à 1 mM). Différentes concentrations ont été testées entre 200 µM et 1 mM, valeur au-delà de laquelle nous ne pouvons nous placer pour des raisons de saturation de l'appareil. Chaque peptide a été dissous dans un milieu hydroalcoolique H₂O/Ethanol (88/12, v/v),

comme celui du vin, l'idéal étant de disposer d'un solvant le plus proche d'un milieu naturel. Les échantillons ont été également stabilisés à pH 3,5 et à 298 K, conditions proches de celle de la salive pour lesquelles l'interaction est la plus favorisée. Les standards poly(L-lysine), poly(L-proline) et autres ont été dissous et enregistrés dans les mêmes conditions. Pour le traitement des données, les expériences de CD ont été réalisées sur un spectromètre de dichroïsme circulaire JASCO J-815 (JASCO, Bouguenais France).

Seuls les débuts des spectres seront présentés (190-270 nm) car au-delà de 270 nm, aucun renseignement n'est récolté en raison de la nature des acides aminés présents (seuls les résidus tryptophanes absorbent au-delà de 270 nm). L'accumulation de trois scans consécutifs avec un défilement de 0,5 nm.s⁻¹ et un incrément de 0,5 nm, conduit au spectre. L'analyse de la structure secondaire du peptide IB9₃₇ a été effectuée par mesure de son ellipticité molaire.

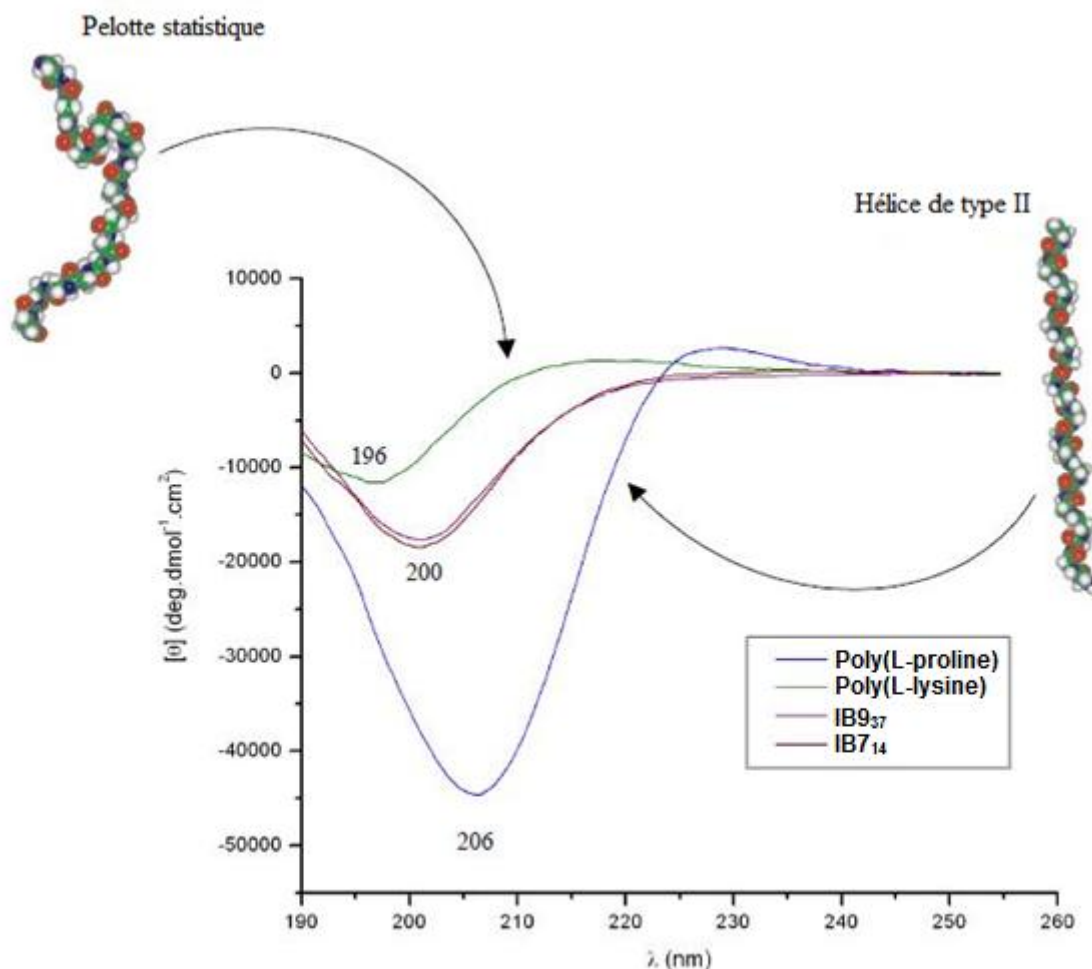


Figure V-1 : Spectres dichroïques, dans l'eau, de la poly(L-proline) en hélice de type II, de la poly(L-lysine) qui a pH 7,4 adopte une conformation en pelote statistique, et du peptide IB7₁₄ (à 200 μ M) et du peptide IB9₃₇. Les formes standard sont représentées à côté des spectres.

La figure V-1 présente le spectre dichroïque de chacun des peptides IB7₁₄ et IB9₃₇ dans les mêmes conditions. IB9₃₇ adopte un profil quasi identique à celui d'IB7₁₄, avec un minimum à 200 nm pour une ellipticité molaire $[\Theta]$ de $-20000 \text{ deg.dm}^{-1}.\text{cm}^{-1}$. Ceci laisse suggérer que la répétition de la séquence IB7₁₄ ne modifie pas la structure secondaire du peptide, autrement dit, la teneur en structures secondaires est inchangée.

Après déconvolution à l'aide du logiciel CD friend et en utilisant la même banque de structures standards connues que précédemment, on trouve qu'IB9₃₇ est constitué à 40% de PII et 60% de pelote statistique. La répartition de 40% de conformation en hélice de type II s'explique par le nombre total de prolines dans la séquence du peptide et du nombre de prolines consécutives qui favoriseraient la formation d'hélices de type II. Ces résultats montrent un pourcentage en hélice de type II similaire au peptide IB7₁₄ laissant penser que la répétition de séquence entraîne dans ce cas une répétition de structure secondaire. Lorsqu'on compare le spectre obtenu à ceux du peptide à la protéine entière (Simon 2003; Plet 2007), les spectres se superposent également. Cette observation laisse penser que la structure secondaire n'est pas affectée par la taille du peptide.

b) RMN du proton : attribution des résonances des différents acides aminés d' IB9₃₇

En suivant la même méthodologie que précédemment, nous avons utilisés la RMN du proton 1D et 2 D TOCSY avec des séquences Watergate afin d'attribuer les différents systèmes de spin correspondant aux différents acides aminés du peptide. Les expériences RMN pour l'étude de l'interaction entre le peptide IB7₃₇ et les différentes procyanidines ont été enregistrées à 298K sur un spectromètre Bruker Avance II 700 MHz équipé d'une sonde TXI de 5 mm comprenant un lock pour le deutérium ²H. Tous les déplacements chimiques proton ont été donnés en respectant la même référence interne que précédemment : le TSP (Tetramethyl Silyl Propionate). Cette référence est bien entendu utilisée également pour les données quantitatives. Les spectres protons ¹H ont été enregistrés en utilisant une séquence Watergate pour la suppression du signal de l'eau (Piotto 1992). Les paramètres utilisés pour ces expériences étaient les suivant : une fenêtre spectrale de 12 ppm, une impulsion à 90° de 7,5 µs à 1 dB une impulsion pour le Watergate de 9 µs à 2,58 dB ; un délai de relaxation de 2 s pour être sûr d'avoir une relaxation totale du signal. Une séquence classique de TOCSY 2D a été utilisée (Bax 1985) pour l'attribution des résonances (séquence mlevgpplh9 (BrukerTM software) en utilisant les paramètres identiques à ceux présentés dans le chapitre IV.

Deux régions restent capitales pour l'attribution de l'ensemble des résonances des acides aminés du peptide IB9₃₇. La région montrant la corrélation entre les NH et les protons de la chaîne latérale (H_α , H_β , H_γ , H_δ , H_ϵ , NH secondaires, (8,6 – 7,8 ppm en F2 et 8 – 0 ppm en F1) ...) permettant d'attribuer tous les acides aminés ayant une fonction NH et la région montrant les corrélations entre les protons H_α et les protons de la chaîne latérale des prolines (H_β , H_γ) (3 – 1 ppm en F2 et 3 – 6 ppm en F1) permettant l'attribution des prolines.

Chapitre V
Étude de l'interaction entre le peptide IB9₃₇ et différentes procyanidines

Comme point de départ de l'attribution, nous avons utilisé le peptide IB₁₄, qui du fait de la répétition de ce motif, peut permettre l'attribution d'un grand nombre d'acides aminés du peptide de 37 résidus : les acides aminés ayant le même environnement chimique dans les deux peptides auront un déplacement chimique identique.

On peut découper le peptide de 37 résidus en « motif » IB_{7₁₄} (Schéma V-2)

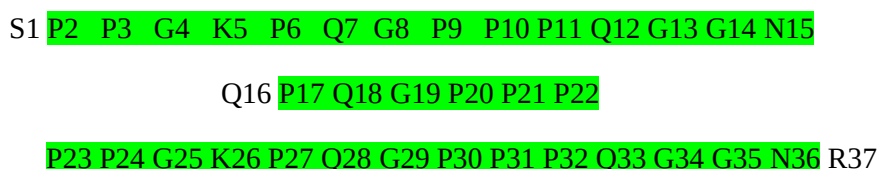


Schéma V-2 : Séquence IB9₃₇ représenté en motif répétée (en vert).

Les résidus ayant exactement le même environnement et donc des résonances identiques ou presque peuvent être répertoriées de la manière suivante :

- a) Q₁₂-Q₃₃ ; Q₇-Q₁₈-Q₂₈ ; G₈-G₁₉-G₂₉ ; G₄-G₂₅ ; G₁₃-G₃₄ ; G₁₄-G₃₅ ; K₅-K₂₆ ; N₁₅-N₃₆ (très semblables)
 - b) P₂-P₂₃ ; P₃-P₂₄ ; P₆-P₂₇ ; P₉-P₂₀-P₃₀ ; P₁₀-P₂₁-P₃₁ ; P₁₁-P₂₂-P₃₂, en ce qui concerne les prolines.
- R₃₇ et Q₁₆ restent par ailleurs isolés.

A l'appui de ces regroupements par « symétrie », les cartes 2D TOCSY du peptide IB_{7₁₄} et du peptide IB9₃₇ se superposent de manière importante comme le montre la figure V-3. Cette superposition facilite grandement l'attribution des résidus communs aux deux peptides. Concernant les résidus prolines, de nouvelles tâches de corrélations apparaissent. Elles peuvent correspondre aux nouveaux résidus proline présents dans IB9₃₇, qui compte 16 prolines contre 6 pour IB_{7₁₄}. Notamment, P22 et P24, qui s'alignent parfaitement avec la séquence du peptide IB_{7₁₄}, possèdent un environnement différent entourés de résidus proline. Le résidu P23 est quant à lui, un résidu proline supplémentaire. Concernant les résidus Q16 et R37, ces deux résidus ne peuvent en aucun cas s'aligner avec IB_{7₁₄} mais possèdent un déplacement chimique des protons de la chaîne latérale caractéristique (Annexe E, tableau A-V). En tenant compte de l'attribution du peptide IB_{7₁₄} et des remarques que l'on vient de faire, nous avons réalisé l'attribution de l'ensemble des résonances protons du peptide IB9₃₇ présentées en figure V-4.

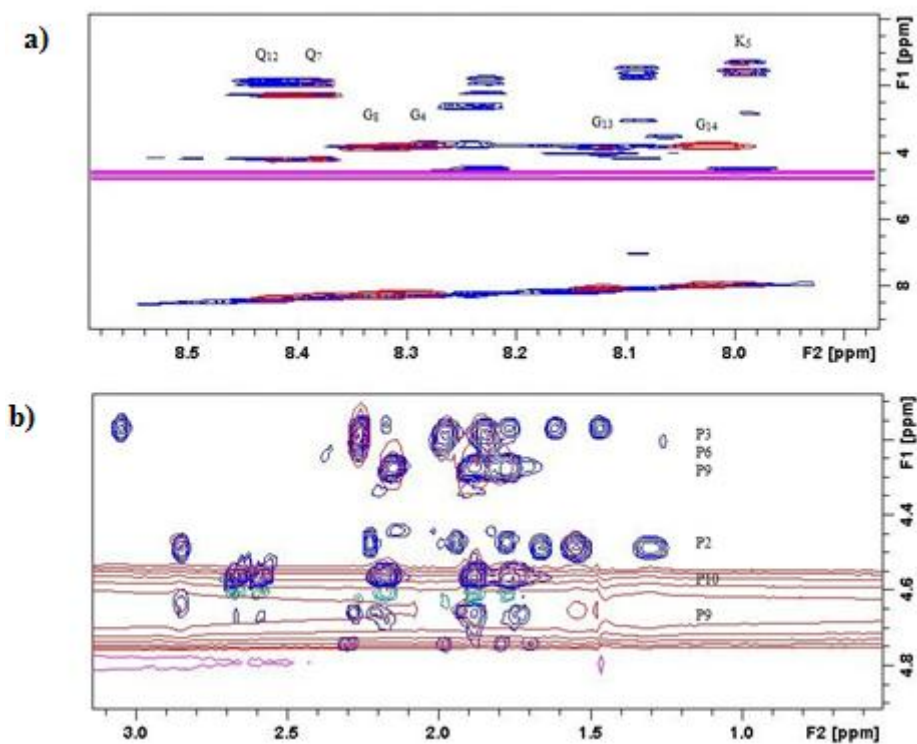


Figure V-3 : Superposition des cartes TOCSY du peptide IB9₃₇ en bleu et du peptide IB7₁₄ en rouge. a) Région des NH amides des peptides. b) Région des résidus proline. Sur les cartes, les annotations correspondent aux résonances attribuées du peptide IB7₁₄

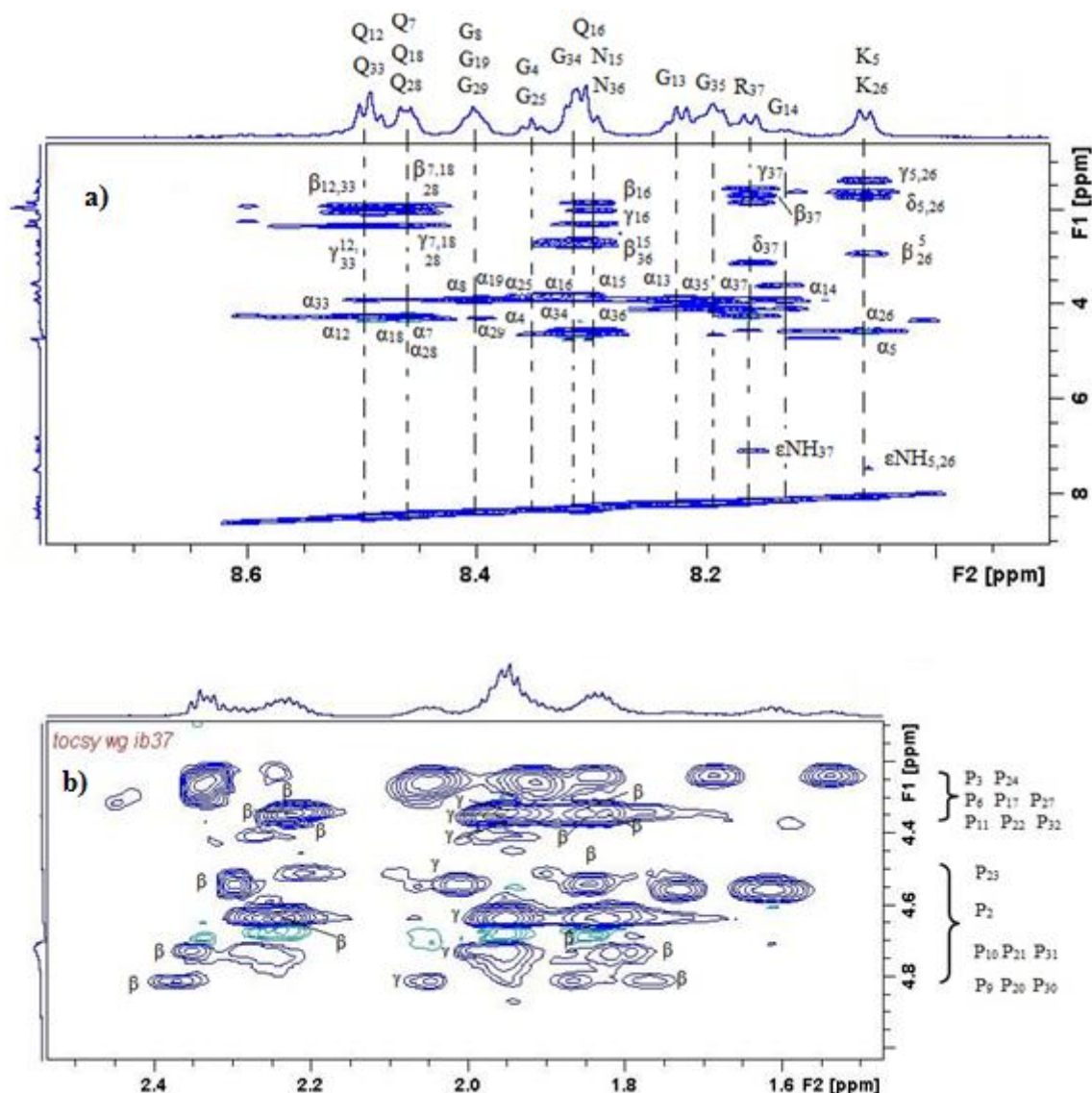


Figure V-4 : Carte partielle de spectres RMN 2D-TOCSY d'IB9₃₇. Enregistré à 700 MHz, 298 K, pH 3.5, avec le peptide à une concentration de 2mM dans un mélange H₂O:D₂O:EtOD (80:8:12). L'attribution des résonances des protons du peptide dans la région des NH (a) et la région des protons Ha des prolines (b) sont présentées sur la projection 1D ou sur la carte 2D. Les spectres TOCSY ont été enregistrés avec les paramètres suivant : une séquence mlevpph19 provenant du logiciel TOPSPIN version 2.1 de Bruker a été utilisée. Les spectres ont été acquis en utilisant un mode states-TPPI avec une fenêtre spectre de 9155 Hz dans les deux dimensions ; un nombre de points de 2048 ; un incrément de 256 dans la dimension t_1 ; un temps de relaxation de 2s ; un nombre de 16 scans par incrément et un « spinlock » de 100 ms. Le traitement des données et leur analyse ont été réalisés grâce au logiciel Topspin version 2.1 de Bruker.

c) Attribution séquentielle du peptide IB9₃₇

Une fois l'ensemble des systèmes de spins correspondant aux 37 acides aminés identifiés dans l'analyse du spectre TOCSY, l'attribution séquentielle des acides aminés du peptide IB9₃₇, a pu être faite grâce à des expériences NOESY. Les corrélations entre le proton Ha d'un résidu (i) et le proton

NH du résidu (i+1) peuvent être observées. Les corrélations correspondant aux résidus proline ne sont pas présentées en totalité.

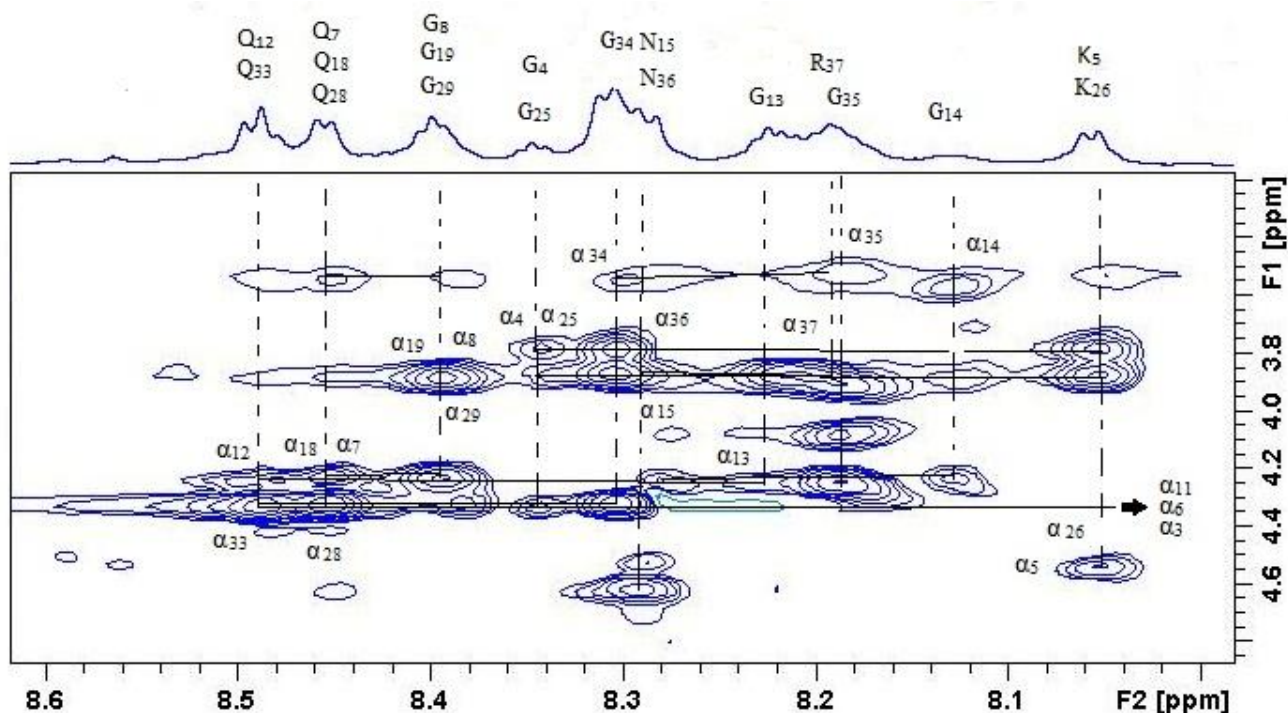


Figure V-5 : Carte 2D-NOESY de la région des NH amides en dimension F2 et des H α en dimension F1. L'attribution des acides aminés est indiquée en pointillé et les corrélations entre le proton H α du résidu (i) et le proton NH du résidu (i+1) est présenté en trait plein. Le spectre a été enregistré sur un spectromètre 700MHz équipé d'une sonde triple résonance TXI, avec une séquence noesygp19 (Bruker) avec un temps de mélange de 300 ms.

Les résultats obtenus nous ont donc permis d'attribuer séquentiellement toutes les résonances du peptide IB9₃₇ :

S₁_P₂_P₃_G₄_K₅_P₆_Q₇_G₈_P₉_P₁₀_P₁₁_Q₁₂_G₁₃_G₁₄_N₁₅_Q₁₆_P₁₇_Q₁₈_G₁₉_

P₂₀_P₂₁_P₂₂_P₂₃_P₂₄_G₂₅_K₂₆_P₂₇_Q₂₈_G₂₉_P₃₀_P₃₁_P₃₂_Q₃₃_G₃₄_G₃₅_N₃₆_R₃₇

L'ensemble des valeurs de déplacement chimique et des attributions des différents protons des acides aminés est présenté dans le tableau ci-dessous :

Chapitre V
Étude de l'interaction entre le peptide IB9₃₇ et différentes procyanidines

	NH	H α	H β_1	H β_2	Autres
Serine 1	-	4,359	3,941	3,792	-
Proline 2	-	4,550	2,291	1,847	H γ =2,013
Proline 3	-	4,337	2,223	1,844	H γ =1,947
Glycine 4	8,315	3,902	-	-	-
Lysine 5	8,062	4,558	1,737	-	H γ =1,371; H δ =1,659; H ϵ = 2,892 NH=7,461
Proline 6	-	4,337	2,223	1,844	H γ =1,947
Glutamine 7	8,461	4,251	2,050	1,911	H γ =2,303
Glycine 8	8,402	3,942	-	-	-
Proline 9	-	4,726	2,349	1,821	H γ =1,994
Proline 10	-	4,632	2,243	1,834	H γ =1,954
Proline 11	-	4,337	2,223	1,844	H γ =1,947
Glutamine 12	8,499	4,268	2,100	1,938	H γ =2,318
Glycine 13	8,226	3,904	-	-	-
Glycine 14	8,133	3,691	3,943	-	-
Asparagine 15	8,309	4,642	2,691	-	-
Glutamine 16	8,298	4,597	2,033	1,871	H γ =2,358
Proline 17	-	4,337	2,223	1,844	H γ =1,947
Glutamine 18	8,461	4,251	2,050	1,911	H γ =2,303
Glycine 19	8,402	3,942	-	-	-
Proline 20	-	4,813	2,369	1,867	H γ =2,047
Proline 21	-	4,632	2,243	1,834	H γ =1,954
Proline 22	-	4,408	2,263	1,844	H γ =1,947
Proline 23	-	4,507	2,206	1,897	H γ =2,090
Proline 24	-	4,337	2,223	1,844	H γ =1,947
Glycine 25	8,315	3,902	-	-	-
Lysine 26	8,062	4,558	1,737	-	H γ =1,371; H δ =1,659; H ϵ = 2,892 NH=7,461
Proline 27	-	4,337	2,223	1,844	H γ =1,947
Glutamine 28	8,461	4,251	2,050	1,911	H γ =2,303
Glycine 29	8,402	3,942	-	-	-
Proline 30	-	4,726	2,349	1,821	H γ =1,994
Proline 31	-	4,632	2,243	1,834	H γ =1,954
Proline 32	-	4,337	2,223	1,844	H γ =1,947
Glutamine 33	8,499	4,268	2,100	1,938	H γ =2,318
Glycine 34	8,316	3,942	-	-	-
Glycine 35	8,195	4,060	-	-	-
Asparagine 36	8,309	4,642	2,691	-	-
Arginine 37	8,160	4,191	1,820	1,702	H γ =1,531 ; H δ =3,282 ; NH=7,170

Tableau V-1: déplacements chimiques des protons en ppm du peptide IB9₃₇ à 700 MHz, 298K, dans un milieu H₂O/D₂O/EtOD (80/8/12, v/v/v)

d) Vers l'obtention d'une structure 3D

Un fichier de contraintes NOE a pu être réalisé à l'aide des cartes NOESY obtenues. Ces données sont ensuite utilisées pour déterminer une structure de basse énergie

Résidu 1	Résidu 2	Distance	Résidu 1	Résidu 2	Distance
² pro-Hα	³ pro-Hδ	2,2±0,4	¹⁷ Gln-Hβ	¹⁹ Gly-NH	3,5±0,9
³ pro-Hα	⁴ Gly-NH	2,2±0,4	¹⁹ Gly-Hα	²⁰ Pro-Hδ	2,2±0,4
⁴ Gly-Hα	⁵ Lys-NH	2,2±0,4	¹⁹ Gly-Hα	²⁰ Pro-Hγ	3,5±0,9
⁵ Lys-Hα	⁶ Pro-Hδ	2,2±0,4	¹⁹ Gly-Hα	²⁰ Pro-Hβ	3,5±0,9
⁵ Lys-Hα	⁶ Pro-Hγ	3,5±0,9	²⁰ pro-Hα	²¹ pro-Hδ	2,2±0,4
⁵ Lys-Hα	⁶ Pro-Hβ	3,5±0,9	²¹ pro-Hα	²² pro-Hδ	2,2±0,4
⁵ Lys-Hβ	⁶ Pro-Hγ	5,0±0,5	²³ pro-Hα	²⁴ pro-Hδ	2,2±0,4
⁶ Pro-Hα	⁷ Gln-NH	2,2±0,4	²⁴ pro-Hα	²⁵ Gly-NH	3,5±0,9
⁶ Pro-Hβ	⁷ Gln-NH	3,5±0,9	²⁵ Gly-Hα	²⁶ Lys-NH	2,2±0,4
⁷ Gln-Hα	⁸ Gly-NH	2,2±0,4	²⁶ Lys-Hα	²⁷ Pro-Hδ	2,2±0,4
⁷ Gln-Hβ	⁸ Gly-NH	3,5±0,9	²⁶ Lys-Hα	²⁷ Pro-Hγ	3,5±0,9
⁸ Gly-Hα	⁹ Pro-Hδ	2,2±0,4	²⁶ Lys-Hβ	²⁷ Pro-Hγ	5,0±0,5
⁸ Gly-Hα	⁹ Pro-Hγ	3,5±0,9	²⁷ pro-Hα	²⁸ Gln-NH	2,2±0,4
⁸ Gly-Hα	⁹ Pro-Hβ	3,5±0,9	²⁷ pro-Hβ	²⁸ Gln-NH	3,5±0,9
⁹ pro-Hα	¹⁰ pro-Hδ	2,2±0,4	²⁷ pro-Hγ	²⁸ Gln-NH	3,5±0,9
¹⁰ pro-Hα	¹¹ pro-Hδ	2,2±0,4	²⁸ Gln-Hα	²⁹ Gly-NH	2,2±0,4
¹¹ pro-Hα	¹² Gln-NH	2,2±0,4	²⁸ Gln-Hβ	²⁹ Gly-NH	3,5±0,9
¹¹ pro-Hβ	¹² Gln-NH	3,5±0,9	²⁹ Gly-Hα	³⁰ Pro-Hδ	2,2±0,4
¹¹ pro-Hγ	¹² Gln-NH	3,5±0,9	²⁹ Gly-Hα	³⁰ Pro-Hγ	3,5±0,9
¹² Gln-Hα	¹³ Gly-NH	2,2±0,4	²⁹ Gly-Hα	³⁰ Pro-Hβ	3,5±0,9
¹³ Gly-Hα	¹⁴ Gly-NH	3,5±0,9	³⁰ pro-Hα	³¹ pro-Hδ	2,2±0,4
¹⁴ Gly-Hα	¹⁵ Asn-NH	2,2±0,4	³¹ pro-Hα	³² pro-Hδ	2,2±0,4
¹⁵ Asn-Hα	¹⁶ Gln-Hα	2,2±0,4	³² pro-Hα	³³ Gln-NH	2,2±0,4
¹⁶ Gln-Hα	¹⁷ Pro-Hδ	2,2±0,4	³² pro-Hβ	³³ Gln-NH	3,5±0,9
¹⁶ Gln-Hα	¹⁷ Pro-Hγ	3,5±0,9	³² pro-Hγ	³³ Gln-NH	3,5±0,9
¹⁶ Gln-Hα	¹⁷ Pro-Hβ	3,5±0,9	³³ Gln-Hα	³⁴ Gly-NH	2,2±0,4
¹⁷ Pro-Hα	¹⁸ Gln-NH	2,2±0,4	³⁴ Gly-Hα	³⁵ Gly-NH	3,5±0,9
¹⁷ Pro-Hβ	¹⁸ Gln-NH	3,5±0,9	³⁵ Gly-Hα	³⁶ Asn-NH	2,2±0,4
¹⁸ Gln-Hα	¹⁹ Gly-NH	2,2±0,4	³⁶ Asn-Hα	³⁷ Gln-Hα	2,2±0,4

Tableau V-2 : Distances en Å entre les protons du peptide IB9₃₇ en fonction des effets NOEs déterminés par des expériences NOESY sur le peptide milieu H₂O/D₂O/EtOD (80/8/12, v/v/v).

Résidus	$^3J_{\text{NH-H}\alpha}$ (Hz)	Résidus	$^3J_{\text{NH-H}\alpha}$ (Hz)	Résidus	$^3J_{\text{NH-H}\alpha}$ (Hz)
S1	8,3	G14	5,7	Q 28	6,6
G4	5,9	N15	7,2	G29	5,7
K5	7,0	Q16	6,4	Q 33	7,0
Q7	6,6	Q18	6,6	G34	5,7
G8	5,7	G19	5,7	G35	5,7
Q12	7,0	G25	5,9	N36	7,2
G13	5,7	K26	7,0	R37	-

Tableau IV-3 : Constantes de couplages 3J (en Hertz) entre les protons amines et les protons α des acides aminés voisins. Ces mesures ont été lues sur le spectre 1D pour le peptide IB9₃₇ seul en solution dans l'eau (avec 10 % de D₂O) à pH 3,5 et 298 K.

L'ensemble de ces résultats ont permis d'obtenir une structure tertiaire du peptide illustré en figure V-6

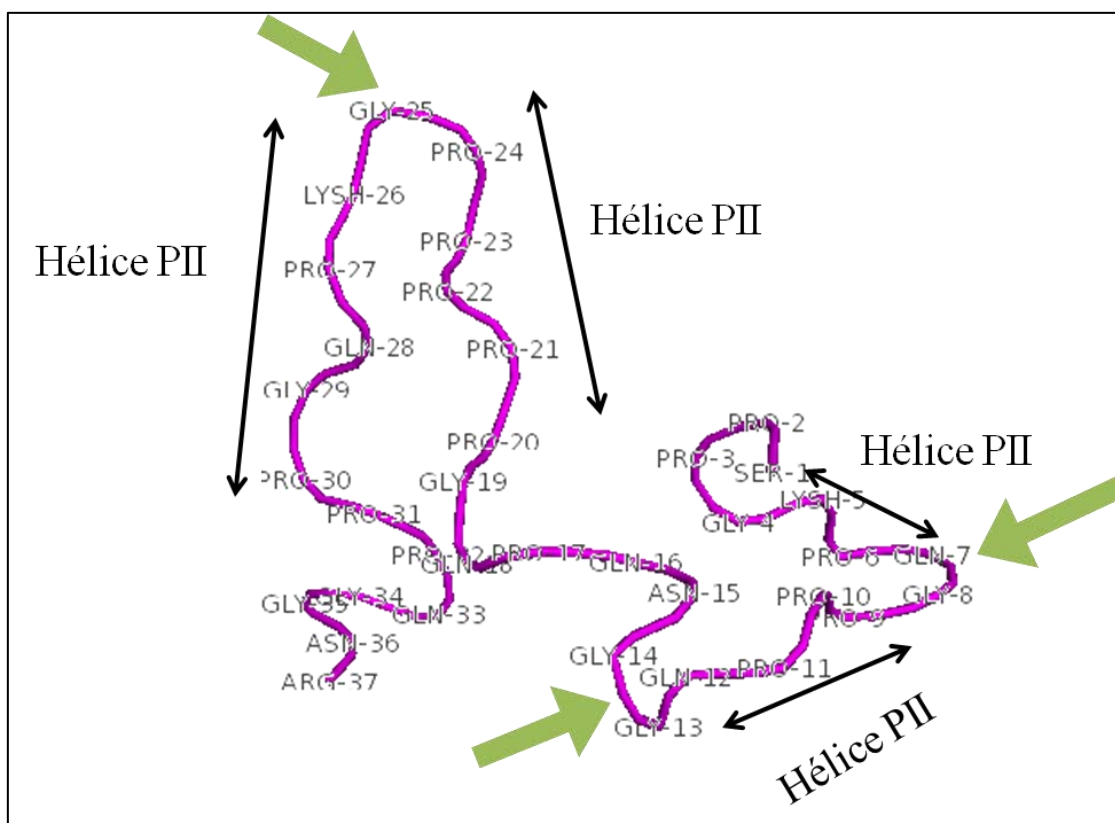


Figure V-6 : structure tridimensionnelle d'IB9₃₇ obtenue par modélisation moléculaire. Les hydrogènes ne sont pas représentés le peptide est représenté en ruban violet et les résidus sont annotés sur le squelette peptidique. Les flèches noires représentent les régions du peptide que l'on retrouve sous forme d'hélice de type II et les flèches vertes montrent les points de flexion au niveau des glycines 8, 13 et 25.

La structure tridimensionnelle d'IB9₃₇ montre une structure relativement ouverte avec des points de flexion au niveau des glycines 8,15, 25 où des motifs en hélice de type II sont retrouvés part et d'autre de ces glycine. Au niveau des hélices la distance entre deux résidus situés un au dessus de l'autre dans l'hélice (pour trois résidus) a été mesurée à $9 \text{ \AA} \pm 0,5$ ce qui correspond au pas de m'hélice de type II. On retrouve 16 résidus impliqués dans la formation de ce type d'hélice. Ces résultats sont en accord avec les résultats de DC.

B. Détermination des sites de fixations des tanins sur le peptide

Cette partie a pour objectif d'identifier les sites de fixation des tanins sur le peptide, mais aussi du peptide sur les tanins. Les expériences de dichroïsme circulaire ont été réalisées pour le peptide seul et avec le tanin. Les tanins absorbent à 213 nm et 237 nm ce qui rend difficile les analyses, c'est pourquoi nous nous sommes concentrés sur la RMN et la modélisation moléculaire.

Dans cet objectif des expériences de NOESY ont été enregistrées. Elles permettent, par l'analyse des corrélations de couplages dipolaires intermoléculaires, de voir les sites du peptide et du tanin les plus proches dans l'espace et ainsi d'identifier leurs sites d'interaction. Plusieurs expériences ont été réalisées avec les différentes procyanidines B1, B3 et C2. Seulement quelques unes sont illustrées dans ce qui suit, les résultats globaux sont reportés dans les tableaux V-(4 à 6).

Ces expériences ont été effectuées sur un mélange tanin-peptide en proportion 1 : 1 (1 mM) dans un solvant H₂O:D₂O (80:20). La figure V-7 présente des exemples de cette proximité spatiale intermoléculaire où l'on peut voir des corrélations entre les protons des cycles catéchols B et E du dimère B3 et les protons H α des prolines 9, 20, 30.

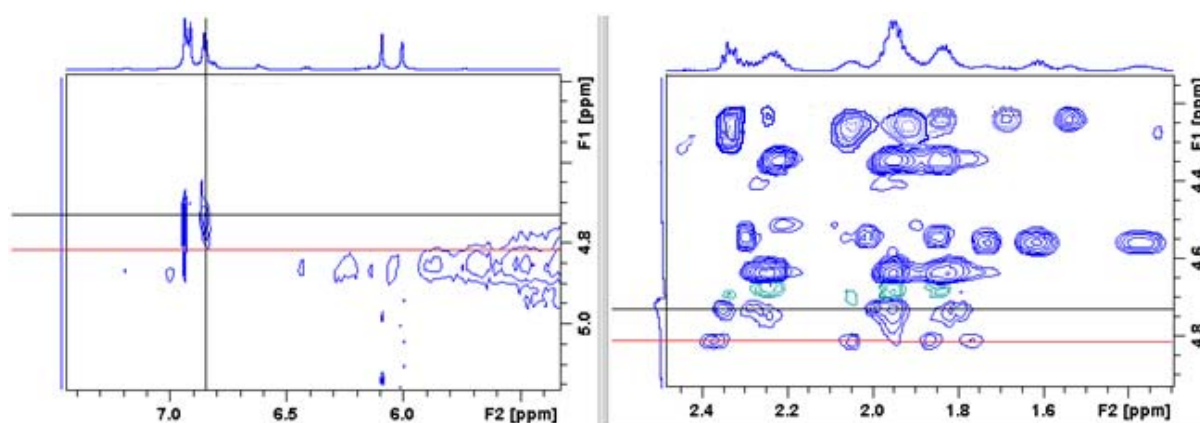


Figure IV-7 : Carte partielle 2D-NOESY extraites du logiciel Topspin (Bruker) d'un mélange peptide - tanin (1:1) à 1mM dans un solvant H₂O:D₂O (80:20) enregistré à 800MHz, à 298k, pH 3,5. Le spectre montre les corrélations entre les protons des cycles catéchols du dimère B3 (6,683 ppm) et les protons H α (4,74 ppm et 4,81 ppm) des proline 9, 20 et 30 (lignes horizontales noires et rouges).

Ces corrélations semblent mettre en évidence les sites de fixation du tanin et du peptide : au niveau du peptide, les résidus P₂, P₉, G₁₃-G₁₄ (comme pour le peptide IB7₁₄) P₂₀, P₂₃, P₃₀, G₃₄-G₃₅ semblent être impliqués ainsi que les cycles catéchols des procyanidines étudiées.

L'analyse des variations de déplacement chimique confirme ces résultats (figure V-8). Si l'on regarde l'effet de l'ajout de la procyanidine C2 sur l'ensemble des déplacements chimiques du peptide, on remarque que cet ajout n'affecte pas de la même manière tous les acides aminés.

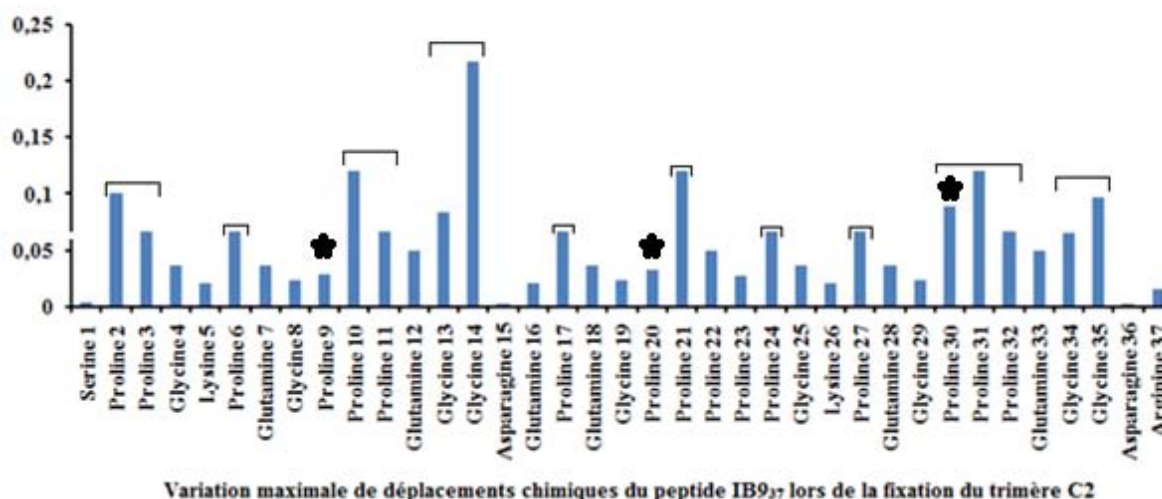


Figure V-8 : Variation des déplacements chimiques des NH des résidus d'IB9₃₇ (Ha pour la serine 1 et les prolines) suite à l'ajout de tanin C2. Les crochets horizontaux signalent les variations les plus importantes correspondant aux acides aminés impliqués dans l'interaction. * Effet NOE détecté entre le tanin B1 et le peptide.

Les résidus les plus affectés (signalés en noir) par l'addition de trimère C2 sont : les prolines 2-3, la proline 6, la proline 10, les glycines 13-14, la proline 17, la proline 21, la proline 24, la proline 27, les prolines 30-31 et les glycines 34-35. Si l'on considère que l'amplitude des variations de déplacements chimiques reflète les sites de fixation des tanins, on peut comptabiliser une dizaine de sites d'interaction. On peut noter que les résidus les plus affectés au niveau des variations de déplacements chimiques ne sont pas forcément les mêmes résidus dont des effets NOEs ont pu être détecté. Cependant, les acides aminés concernés par un effet NOE, se situent à proximité des acides aminés ayant une forte variation de déplacements chimiques.

C. Analyse des interactions entre les procyanidines et IB9₃₇

a) Analyse des variations de déplacements chimiques

Tout comme pour le peptide IB7₁₄, lorsque l'on ajoute une quantité croissante de tanin à une solution de peptide IB9₃₇ (1mM), on observe une variation de déplacement chimique importante pour

certaines protons des acides aminés du peptide, alors qu'aucune variation significative n'est observée au niveau du tanin (Figure V-9).

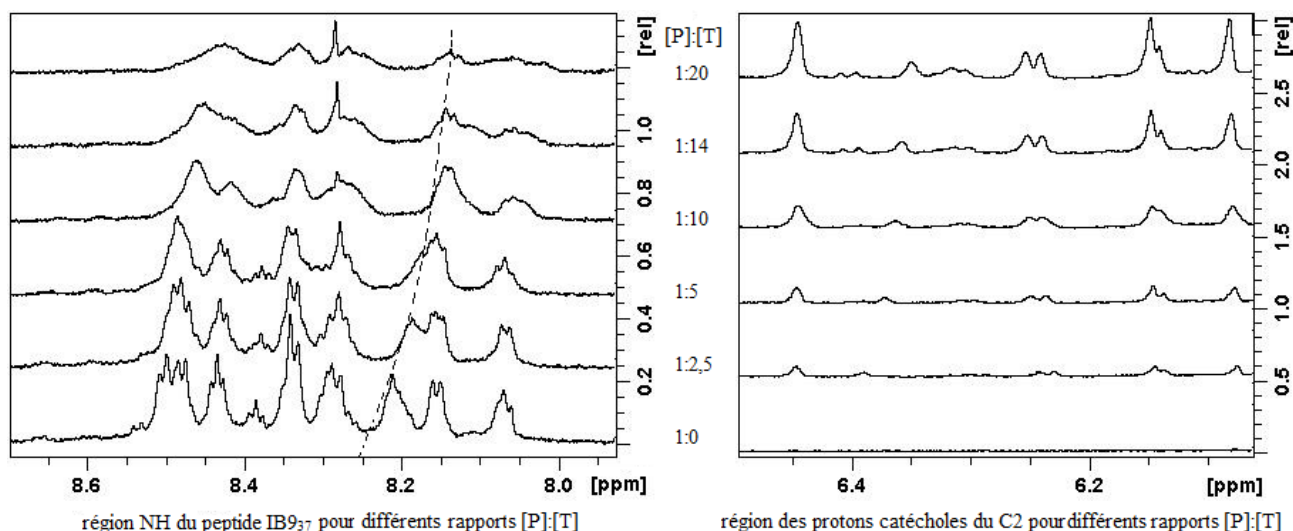


Figure V-9 : Spectres ¹H de la région NH d'IB9₃₇ (à gauche) et de la région de protons catécholes du C2 (à droite) pour le mélange protéine/tanin C2 représentant la variation de déplacement chimique (ppm) pour les différents rapports tanin/protéine [T/P].

Ces variations de déplacements chimiques de certains protons du peptide en présence de la procyanidine C2 ont été paramétrées en utilisant l'équation (III.8) décrite dans le chapitre III, équation décrivant la fixation de tanins sur n sites, avec la même affinité (même k_d) que nous réécrivons ici pour plus de clarté :

$$\Delta\delta = \frac{1}{2} \Delta\delta_{\max} (1 + k_d/n [P_0] + [T_i]/n [P_0]) - \{(1 + k_d/n [P_0] + [T_i]/n [P_0])^2 - 4 [T_i]/n [P_0]\}^{1/2} \quad \text{(III.8)}$$

Tous comme pour le chapitre précédent, les variables $\Delta\delta_{\max}$, k_d et n sont calculées pour que la différence entre les points expérimentaux et les points théoriques soit minimale. On peut remarquer que la courbe calculée reste éloignée des points expérimentaux. Valeur $k_d = 3,6$ mM, $\Delta\delta_{\max} = 0,068$, $n = 10,5$ et RMSD (erreur quadratique moyenne) $> 1.10^{-3}$.

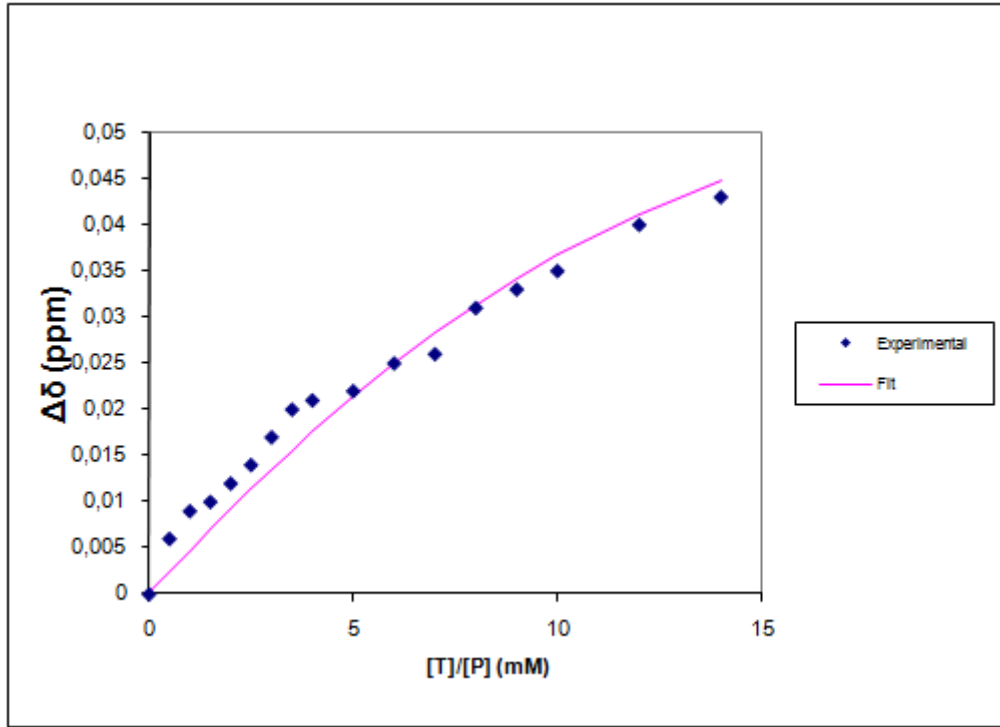
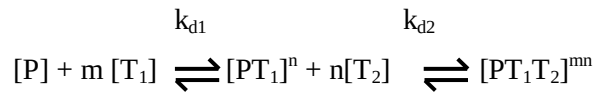


Figure V-10 : Variation des déplacements chimiques des NH du peptide IB9₃₇ en fonction de l'ajout de tanin B1 de 0 à 15 mM pour 1 mM de peptide. En trait continu apparaît le paramétrage réalisé en utilisant l'équation III.8.

Pour un rapport tanin-protéine entre 4 et 7 mM, on devine une cassure au niveau des points expérimentaux, avec un plateau intermédiaire laissant suggérer que le mode d'interaction est quelque peu différent de celui proposé pour le peptide IB7₁₄. Ce type de comportement laisse penser que l'on pourrait avoir deux familles de sites avec des affinités différentes qui pourraient expliquer la différence entre les points expérimentaux et la courbe calculée avec l'équation III-8. On peut proposer une équation inspirée de l'équation III-8 et adaptée de Uchida (Uchida 1971) dans laquelle on considérerait 2 familles de sites n1 et n2 indépendants avec une constante de dissociation respective de k_{d1} et k_{d2} :



D'où on peut extraire :

$$A_{obs} = \left(\frac{1}{2} A_{max} (1 + k_{d1}/n_1 [P_0] + [T_i]/n_1 [P_0]) - \{(1 + k_{d1}/n_1 [P_0] + [T_i]/n_1 [P_0])^2 - 4 [T_i]/n_1 [P_0]\}^{1/2} \right) + \left(\frac{1}{2} A_{max} (1 + k_{d2}/n_2 [P_0] + [T_j]/n_2 [P_0]) - \{(1 + k_{d2}/n_2 [P_0] + [T_j]/n_2 [P_0])^2 - 4 [T_j]/n_2 [P_0]\}^{1/2} \right) \quad (\text{V.1})$$

En paramétrant les points expérimentaux avec cette équation, on se rapproche davantage des points expérimentaux comme le montre la figure V-11.

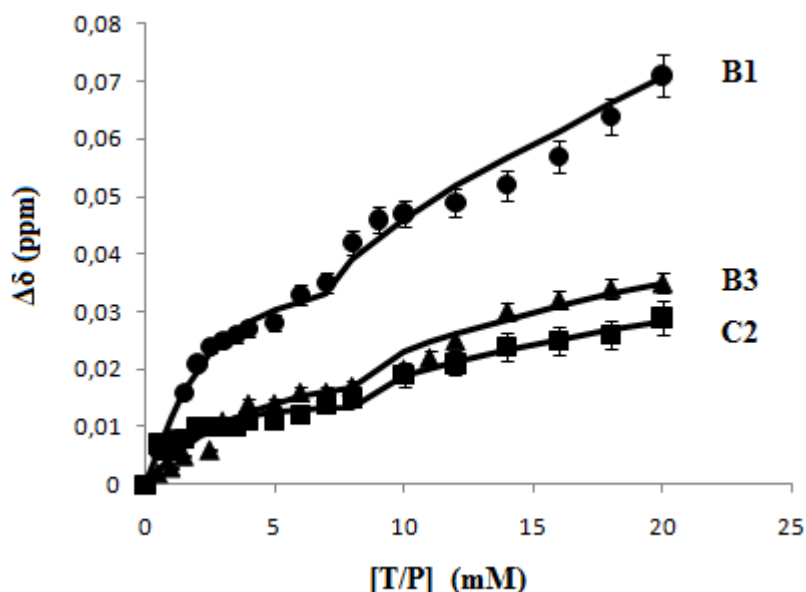


Figure V-11 : Variation des déplacements chimiques (ppm) des NH des acides aminés ayant une variation de déplacements chimiques importantes suite à l'ajout de tanin (Ha dans le cas des proline) en fonction du rapport tanin/protéine [T/P] pour les dimères B1 et B3 et le trimère C2 sur le peptide IB9₃₇. En trait continu apparaît le paramétrage réalisé en utilisant l'équation III.8.

Dans cette expérience, la variation de déplacements chimiques des protons NH observée est reportée en fonction de l'ajout des différentes procyanidines B1 B3 et C2 à une solution contenant 1 mM de peptide IB9₃₇. Les résultats issus du paramétrage des points expérimentaux sont regroupés dans les tableaux V-(4 à 6) ci-dessous. Seuls les acides aminés dont le déplacement chimique varie le plus ont été utilisés pour la détermination des coefficients de dissociation k_{d1} et k_{d2} et des nombres de sites de fixation n_1 et n_2 pour chacune des 3 procyanidines utilisées (B1, B3 et C2). Pour chaque tanin, la stœchiométrie des deux familles de sites est conservée, avec 2 tanins fixés sur la première famille de sites et 8 tanins sur la deuxième, comptabilisant un total de 10 molécules de tanins fixées par peptide, résultat en accord avec nos prévisions faites avec la variation de déplacements chimiques sur l'ensemble de la séquence du peptide (figure V-8) et nos prévisions compte-tenu de la longueur du peptide comparée à celle du peptide IB7₁₄. La deuxième famille de sites présente les mêmes affinités pour le peptide quelque soit le tanin, avec une valeur de constante de dissociation k_{d2} supérieure à 10 mM, correspondant à une affinité inférieure à celle des sites de fixation sur le peptide de 14 résidus pour les mêmes tanins. Concernant la première famille de sites, il existe des différences significatives des k_{d1} entre les différents tanins. Le dimère B3 possède la moins bonne affinité avec un k_{d1} de $2,3 \pm 0,2$ mM, le dimère B1 possède une affinité moyenne avec un k_{d1} de $1,2 \pm 0,1$ mM et le trimère C2 possède la meilleure affinité avec un k_{d1} de $0,5 \pm 0,1$ mM. La modélisation moléculaire devrait permettre d'identifier au niveau atomique les 2 sites de fixation.

b) Analyse des variations du coefficient de diffusion

Les variations du coefficient de diffusion du peptide IB9₃₇ ont été également suivies au cours de l'ajout des procyanidines B1, B3 et C2. Les coefficients de diffusion ont été mesurés par RMN DOSY, et le rayon hydrodynamique R_H du complexe formé déduit de la relation Stokes-Einstein. La figure V-12 présente ces variations. Une décroissance progressive du coefficient de diffusion est observée quelque soit le tanin ajouté, ce qui va dans le sens d'une augmentation de la taille du peptide et donc confirme la formation du complexe tanin-protéine. Les points expérimentaux obtenus ont été paramétrés avec l'équation V-1. Le paramétrage a permis d'obtenir des valeurs proches de celles obtenues par l'étude des variations de déplacements chimiques. Ainsi pour le dimère B3, la constante de dissociation k_{d1} a été évaluée à 1,9 mM pour la première famille de sites $n1$ avec $n1 = 2$ et une constante d'affinité k_{d2} de 9,9 mM pour la deuxième famille de sites $n2$ avec $n2 = 7,9$. La taille du complexe peut alors être déterminée en utilisant les valeurs du coefficient de diffusion pour le peptide seul ($2,4 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$) et le peptide saturé en procyanidine B3 ($2,34 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$), B1 ($1,98 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$), ou C2 ($1,67 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$) ce qui correspond à un rayon hydrodynamique, R_H respectif de $8 \pm 1 \text{ \AA}$ pour le peptide seul, $10 \pm 1 \text{ \AA}$ lorsque le peptide est saturé par l'un ou l'autre des dimères et à $12 \pm 1 \text{ \AA}$ lorsque le complexe est formé avec le trimère C2. Les tableaux suivant V-(4 à 6) reprennent l'ensemble des résultats obtenus (déplacement chimique et coefficient de diffusion) lors de la titration des dimères B1, B3 et du trimère C2 sur le peptide IB9₃₇.

B1	δ (ppm)												
[I]/[P]	GLYCINE 34	GLYCINE 13	GLYCINE 35	GLYCINE 14	PROLINE 6	PROLINE 2	PROLINE 10	Diffusion coefficient (10 ⁻¹⁰ .m ² .s ⁻¹)	Fit parameters				
0	8,388	8,313	8,263	8,203	2,033	2,041	1,701	2,400	SITE 1SITE 2				
0,5	8,381	8,307	8,262	8,194	2,023	2,029	1,692	2,367	k_d				
1	8,379	8,305	8,256	8,189	2,021	2,027	1,689	2,345	1,2 $\pm$ 0,110,0 $\pm$ 0,4				
1,5	8,374	8,297	8,237	8,18	2,015	2,022	1,681	2,323	$\Delta\delta_{max}$ 0,03 $\pm$ 0,020,13 $\pm$ 0,02				
2	8,365	8,292	8,233	8,178	2,013	2,016	1,679	2,299	n 2,3 $\pm$ 0,28,1 $\pm$ 0,3				
2,5	8,363	8,289	8,231	8,176	2,001	2,009	1,665	2,321	RMISD7,33E-052,64E-05				
3	8,361	8,288	8,23	8,166	1,998	2,007	1,663	2,337					
3,5	8,36	8,287	8,227	8,164	1,996	2,005	1,663	2,328					
4	8,358	8,286	8,225	8,162	1,99	2,004	1,659	2,298					
5	8,357	8,285	8,222	8,16	1,988	1,998	1,658	2,317					
6	8,355	8,28	8,212	8,156	1,984	1,995	1,656	2,297					
7	8,35	8,278	8,203	8,154	1,985	1,99	1,649	2,284					
8	8,34	8,271	8,199	8,153	1,964	1,994	1,651	2,302					
9	8,335	8,267	8,19	8,154	1,949	1,966	1,629	2,289					
10	8,333	8,266	8,189	8,133	1,947	1,96	1,617	2,100					
12	8,328	8,264	8,185	8,123	1,937	1,949	1,613	2,100	k_d 1,2 $\pm$ 0,110,0 $\pm$ 0,8				
14	8,32	8,261	8,161	8,111	1,935	1,945	1,606	2,068	ΔD_{max} 0,39 $\pm$ 0,031,17 $\pm$ 0,05				
16	8,3	8,256	8,157	8,094	1,93	1,931	1,592	1,998	n 2,4 $\pm$ 0,38,0 $\pm$ 0,4				
18	8,288	8,251	8,14	8,088	1,92	1,929	1,591	1,985	RMISD1,30E-032,30E-03				

Tableau V-4 : résultats de la titration du dimère B1 sur le peptide IB9₃₇ par variation de déplacement chimique et variation du coefficient de diffusion.

B3	δ (ppm)											
[T]/[P]	GLYCINE 34	GLYCINE 13	GLYCINE 35	GLYCINE 14	PROLINE 6	PROLINE 2	PROLINE 10	PROLINE 9	Diffusion coefficient (10 ⁻¹⁰ .m ² .s ⁻¹)			
0	0	0	0	0	0	0	0	0	2,4	Fit parameters		
0,5	0,007	0,002	0,004	0,02	0,002	0,012	0,004	0,004	2,396			
1	0,012	0,003	0,005	0,023	0,002	0,009	0,001	0,001	2,399	K_d		
1,5	0,015	0,005	0,007	0,04	0,007	0,017	0,009	0,009	2,391	$\Delta\delta_{max}$		
2	0,02	0,01	0,016	0,077	0,026	0,039	0,031	0,031	2,369	n		
2,5	0,015	0,006	0,019	0,08	0,021	0,035	0,028	0,028	2,372	RMISD		
3	0,021	0,011	0,026	0,092	0,027	0,044	0,033	0,033	2,367			
4	0,022	0,014	0,03	0,098	0,029	0,044	0,036	0,036	2,364			
5	0,023	0,014	0,032	0,103	0,031	0,047	0,039	0,039	2,361			
6	0,023	0,016	0,036	0,132	0,034	0,051	0,041	0,041	2,359			
7	0,025	0,016	0,04	0,156	0,037	0,053	0,044	0,044	2,356			
8	0,026	0,017	0,043	0,181	0,04	0,059	0,041	0,041	2,359			
10	0,033	0,02	0,075	0,19	0,059	0,069	0,044	0,044	2,356			
11	0,035	0,022	0,09	0,203	0,059	0,072	0,045	0,045	2,355			
12	0,037	0,025	0,093	0,217	0,06	0,077	0,047	0,047	2,353			
14	0,04	0,03	0,101	0,24	0,067	0,083	0,055	0,055	2,345	K_d		
16	0,042	0,032	0,116	0,258	0,069	0,086	0,058	0,058	2,342	ΔD_{max}		
18	0,045	0,034	0,127	0,268	0,07	0,088	0,059	0,059	2,341	n		
20	0,046	0,035	0,127	0,279	0,07	0,09	0,059	0,059	2,341	RMISD		

Tableau V-5 : résultats de la titration du dimère B3 sur le peptide IB9₃₇ par variation de déplacement chimique et variation du coefficient de diffusion.

C2	δ (ppm)						Diffusion coefficient (10 ⁻¹⁰ .m ² .s ⁻¹)		
[T]/[P]	GLYCINE 34	GLYCINE 13	GLYCINE 35	PROLINE 6	PROLINE 2				
0	0	0	0	0	0	2,400	Fit parameters	SITE 1	SITE 2
0,5	0,007	0,007	0,004	0,006	0,007	2,341			
1	0,008	0,006	0,005	0,01	0,008	2,310			
1,5	0,011	0,008	0,007	0,013	0,012	2,276	$\Delta\delta_{max}$	0,03±0,02	0,13±0,02
2	0,011	0,01	0,016	0,016	0,016	2,186	n	2,3±0,2	8,1±0,3
2,5	0,011	0,01	0,019	0,019	0,021	2,130	RMISD	7,33E-05	2,64E-05
3	0,012	0,01	0,026	0,021	0,022	2,195			
3,5	0,014	0,01	0,03	0,023	0,026	2,151			
4	0,015	0,011	0,032	0,024	0,027	2,085			
5	0,018	0,011	0,036	0,027	0,03	2,117			
6	0,022	0,012	0,04	0,028	0,031	2,031			
7	0,022	0,014	0,043	0,029	0,032	2,101			
8	0,022	0,015	0,075	0,03	0,05	2,055			
10	0,023	0,019	0,09	0,038	0,056	1,896			
12	0,031	0,021	0,093	0,048	0,062	1,925			
14	0,038	0,024	0,101	0,05	0,072	1,816	K _d	0,5±0,1	10,0±0,8
16	0,044	0,025	0,116	0,053	0,076	1,763	ΔD_{max}	0,39±0,03	1,17±0,05
18	0,046	0,026	0,127	0,055	0,078	1,964	n	2,4±0,3	8,0±0,4
20	0,048	0,029	0,127	0,056	0,079	1,671	RMISD	1,30E-03	2,30E-03

Tableau V-6 : Résultats de la titration du trimère C2 sur le peptide IB9₃₇ par variation de déplacement chimique et variation du coefficient de diffusion.

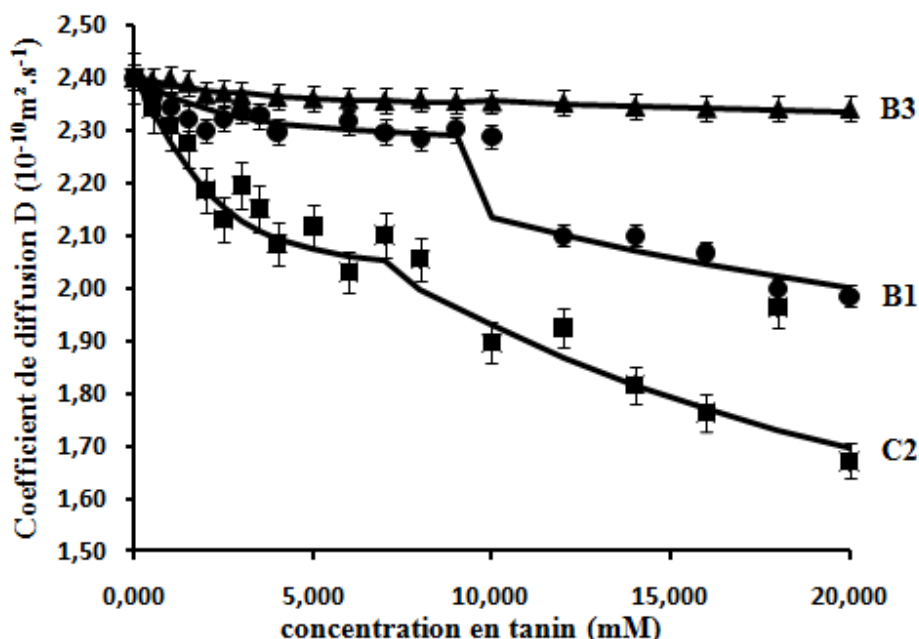


Figure V-12 : Variation du coefficient de diffusion D ($10^{-10} \text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$) en fonction du rapport tanin/protéine $[T/P]$ pour les dimères B1 et B3 le trimère C2 sur le peptide IB9₃₇. En trait continu apparaît le paramétrage réalisé en utilisant l'équation III.8.

Les valeurs des constantes de dissociation calculées à partir des variations de coefficients de diffusion sont donc du même ordre que celles obtenues lors de l'analyse des déplacements chimiques. Le trimère C2 reste le tanin le plus affiné et l'ordre sur l'échelle d'affinité est conservé, le dimère B3 étant le tanin le moins affiné et le dimère B1 le tanin se situant entre les deux, comme le montre l'échelle d'affinité tracée en fonction de la constante de dissociation obtenue pour la première famille de sites la plus affiné (figure V-13).

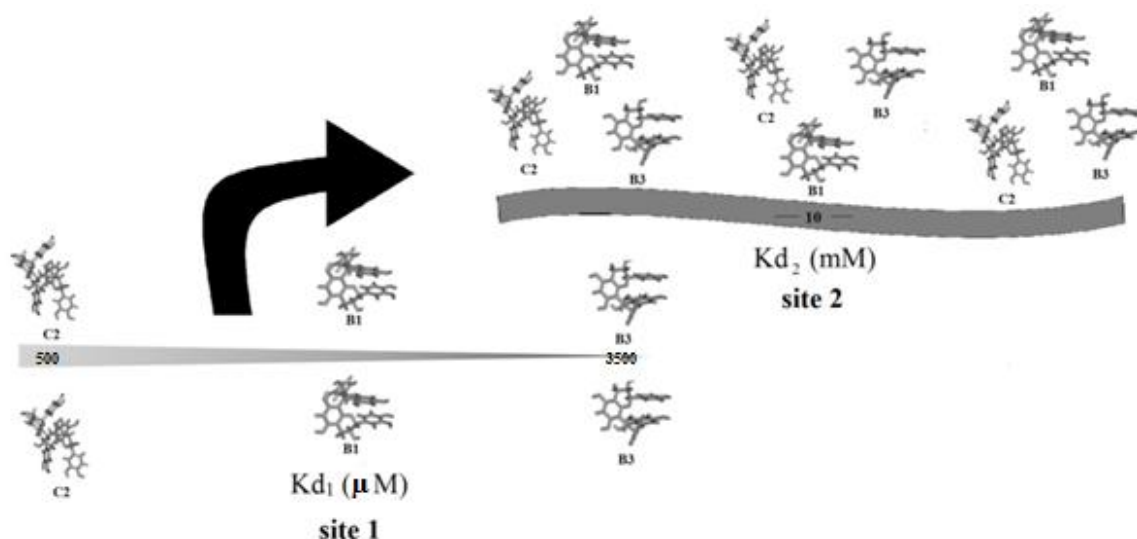


Figure V-13 : Echelle d'affinité absolue des différentes procyanidines pour le peptide IB9₃₇ pour chaque catégorie de sites. L'échelle d'affinité de la première famille de sites illustre les différences d'interaction pour les 3 procyanidines B1, B3 et C2 (sub-millimolaire) et l'échelle d'affinité de la seconde famille de sites (déca-millimolaire) illustre des résultats identiques quel que soit le tanin.

Toutefois, on peut noter que les constantes de dissociation pour chaque procyanidine sont plus faibles pour le peptide IB9₃₇ que pour le peptide IB7₁₄, correspondant à une affinité plus forte (de l'ordre d'un facteur 10), en accord avec des travaux similaires ((Charlton 1996). Cependant, la plus grande différence dans le comportement des deux peptides réside dans le fait que IB9₃₇ possède deux familles de sites indépendants, la première famille présentant des affinités différentes selon la structure des tanins (structure spatiale et degré de polymérisation) et la deuxième famille présentant des constantes d'affinités équivalentes (de l'ordre de 10 mM) quelque soit le tanin étudié.

c) Etude du processus d'agrégation

Durant la titration, on observe la formation d'un précipité au fond du tube RMN pour un rapport $[T]/[P]$ supérieur à 2 et pour certains tanins. Nous avons voulu déterminer le taux de précipitation du peptide en fonction des différents tanins utilisés. Ce phénomène est présenté figure V-14 qui représente en ordonnée le pourcentage de peptide en solution et en abscisse le rapport $[T]/[P]$. Comme pour le peptide IB7₁₄, la proportion de peptide libre a été estimée à partir de l'aire de l'ensemble des protons NH (entre 8.0 et 8.5 ppm) par rapport à une référence interne (TSP) permettant une calibration de l'ensemble des spectres. Des différences relatives au tanin étudié sont observées. La Procyanidine B3 conduit à une précipitation relativement faible du complexe : 50% du peptide est précipité pour un rapport tanin-peptide supérieur à 17 mM. Pour les procyanidines B1 et C2, on a apparition d'un précipité pour un rapport $[T]/[P]$ supérieur à 2.

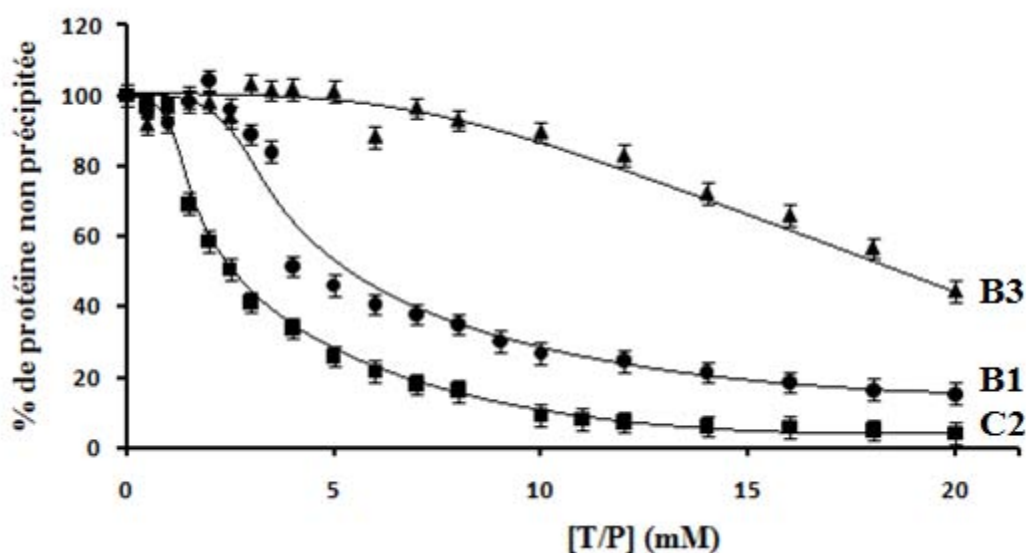


Figure V-14 : Représentation de la précipitation du peptide en fonction du rapport tanin-protéine pour chaque procyanidine utilisée. B1 (cercle), B3 (triangle) et C2 (carré). Les points expérimentaux sont obtenus après intégration des signaux protons de la protéine lors d'expérience de RMN-1D. Le trait continu représente le lissage des points expérimentaux pour une meilleure visualisation des variations.

Là encore, comme pour le peptide IB7₁₄, l'aspect cinétique du phénomène de précipitation n'a pas été pris en compte, par contre, cette précipitation, si elle a lieu, s'opère pendant la ½ heure occupée à la préparation de l'échantillon. Comme contrôle, un spectre proton a été enregistré au début et à la fin de l'analyse par RMN de l'échantillon (spectre proton, TOCSY, DOSY, total de 4h). Aucune différence d'aire n'est observée entre les deux spectres enregistrés à 4 heures d'intervalle ce qui confirme la stabilité du mélange tout au long de l'expérience.

d) Dynamique moléculaire

Pour l'étude de ce peptide, nous avons réalisé des calculs de dynamique moléculaire sur un système composé du peptide IB9₃₇ et du trimère C2.

Les dynamiques moléculaires ont été réalisées à partir d'une structure 3D d' IB9₃₇ (sans contrainte) et de la structure 3D du trimère C2 dans sa conformation majoritaire (Tarascou 2007). La dynamique a été lancée selon la trajectoire suivante : 1 peptide et 9 trimères C2 dans une boîte d'eau de 100 Å de côté, conditions « *in silico* » correspondant à un rapport molaire [T]/[P] de 4,5 et une concentration [C2] de 15 mM. Autrement dit, cette trajectoire permet de suivre la formation de complexe tanin-protéine pour des concentrations en procyanidine de l'ordre de la CMC. La figure V-15a et V-15b présente les différents points clefs de la simulation, où la figure V-15a correspond à la dynamique du système entier et la figure V-15b correspond à la même dynamique mais centrée sur le complexe IB9₃₇/C2.

Le scénario observé est le suivant : IB9₃₇ accroche un premier tanin à $t = 1.3$ ns, puis un second à $t = 7.7$ ns. À cette étape, nous pouvons observer des différences au niveau de la structuration du peptide lorsqu'il est libre ou complexé. Sous sa forme libre, il adopte une conformation fibrillaire très flexible alors qu'une fois complexé au premier puis au second C2, le peptide semble s'enrouler autour des deux procyanidines rendant difficile la fixation d'autres molécules de tanins. Pour les tanins : on observe progressivement la formation de micelles : on a auto-association de 2 ($t = 2$ ns et $t = 7$ ns) puis 3 C2 ($t = 5$ ns), ces deux micro-micelles fusionnent très vite ($t = 7.2$ ns) pour conduire à une micelle de 5 C2, puis 6 ($t = 15.6$ ns) et 7 ($t = 33.6$ ns). Les complexes formés restent stables jusqu'à la fin de la dynamique ($t = 66$ ns). Ces observations confortent l'hypothèse d'une restructuration du peptide suite à l'accrochage du deuxième C2.

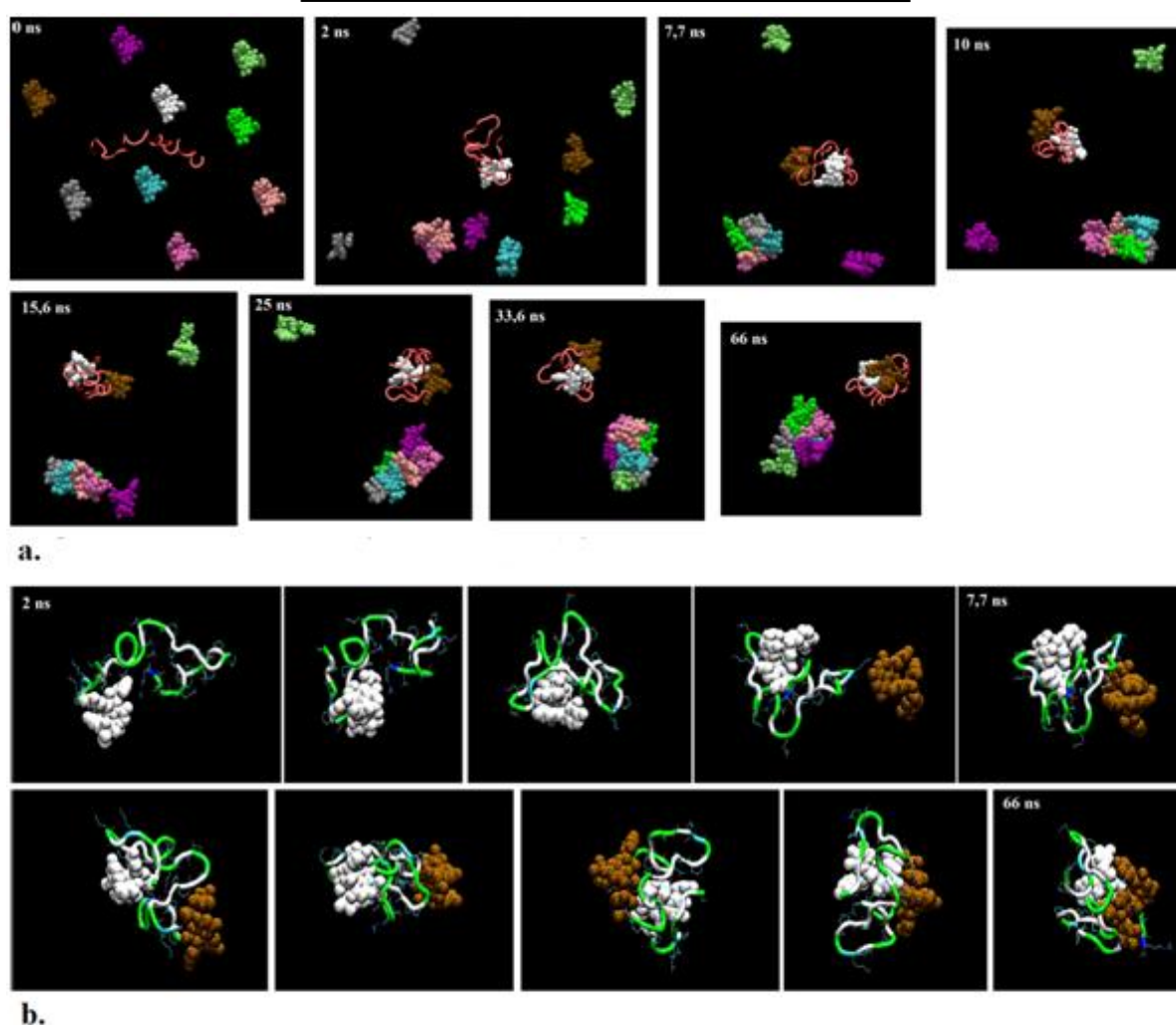


Figure V-15 : dynamique moléculaire sur un système composé de 9 C2 et 1 IB9₃₇ sur 66ns de temps de calcul dans une boîte d'eau de 100 Å de côté. a) Dynamique de l'interaction tanins-peptide par un système de 9C2 et 1 IB9₇₃. b) Dynamique de l'interaction centrée sur le complexe C2/IB9₃₇

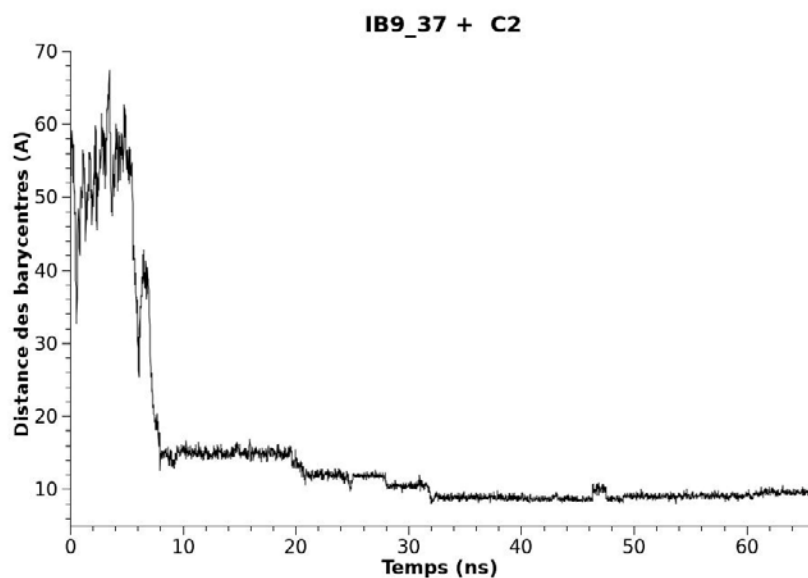


Figure V-16 : Distance entre les barycentres des tanins fixés sur IB9₃₇ en fonction du temps

Si l'on mesure la distance qui sépare les 2 tanins fixés au peptide tout au long de la dynamique, on s'aperçoit qu'ils s'approchent l'un de l'autre jusqu'au contact (figure V-16) Après quoi, les deux molécules restent en contact probablement par π - π stacking, et semble contribuer à la stabilisation du complexe tanins-peptide.

On peut également suivre l'évolution du rayon de gyration du peptide au cours de la dynamique. La structure 3D de la protéine, tant qu'elle est libre de toute interaction avec les tanins, oscille entre une forme discoïde et une forme ellipsoïde traduisant une structure fibrillaire très mobile, et se compacte dès la fixation des tanins.

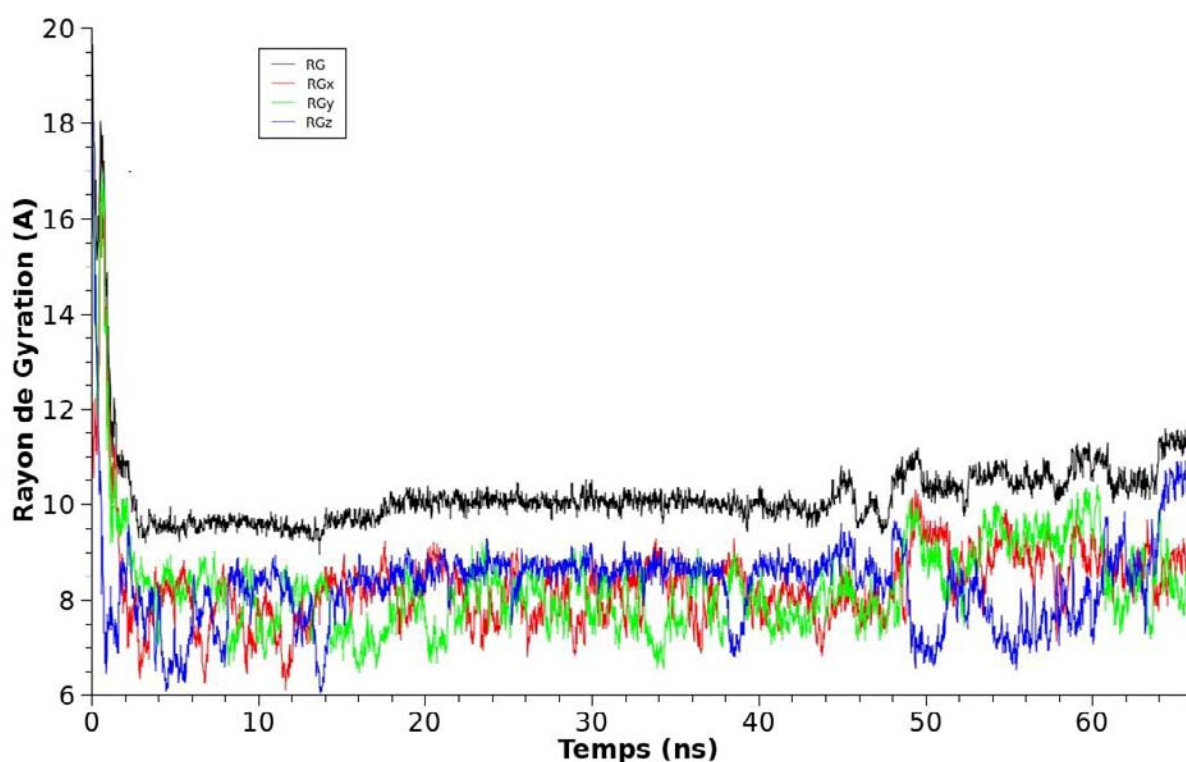


Figure V-17 : Evolution du rayon de gyration du peptide au cours de la simulation.

La figure V-17 présente l'évolution du rayon de gyration durant la simulation selon différents plans d'observation : la courbe rouge représente le RG suivant l'axe X, la verte suivant l'axe Y, la bleue suivant l'axe Z, la courbe noire représentant le rayon de gyration RG global. La fixation du premier tanin dès les 2 premières ns, provoque une chute brutale du RG. Cette chute est représentative de l'enroulement du peptide autour du (des) tanins. En fin de calcul, le RG global est aux alentours de 9-11 Å (avec un RG_x et RG_y de 8 Å et un RG_z de 10 Å), valeur en accord avec le rayon hydrodynamique de l'ordre de 12 Å estimé à partir du coefficient de diffusion du complexe IB9₃₇/ C2. Une analyse fine du complexe a été réalisée. La figure V-18 montre le complexe en fin de simulation.



Figure V-18 : Visualisation du complexe C2-IB9₃₇ en fin de simulation avec les mêmes paramètres que la figure V-15. Les tanins C2 sont représentés en sphère blanche et marron et le peptide est représenté en ruban vert.

Nous pouvons observer que le trimère C2 blanc réalise des liaisons hydrogènes entre ses groupement phénols et les carbonyles des résidus proline 20, la proline 21 et la glycine 13. Le trimère C2 marron quant lui, réalise des interactions hydrogènes avec les résidus proline 3, proline 6. Les deux C2 sont stabilisés dans le complexe par « stacking ».

D. Discussion

La longueur du peptide riche en proline semble être un facteur important dans l'affinité qu'il développe à l'égard des tanins. En effet, Charlton et son équipe (Charlton 1996; Charlton 2002) montrent que le nombre de répétition dans la séquence a une forte influence sur l'affinité, d'un facteur 100 à 1000 suivant le tanin utilisé. Cependant, les travaux reportés dans cet article ne tenaient pas compte du nombre de sites de fixation et l'analyse des variations de déplacement chimique a été faite en regroupant les résidus similaires (proline-X, proline-proline, glycine- proline, glycine-X, ...) et non en traitant les résidus un à un. En 2002 (Charlton, Haslam et al. 2002), dans un nouvel article, les mêmes auteurs proposent de traiter leur résultats expérimentaux avec une nouvelle équation qui tenait compte d'un nombre de sites de fixation n indépendants et présentant la même constante de dissociation k_d . Leurs résultats suggèrent une meilleure affinité (d'un facteur 20) pour le peptide comportant 19 résidus comparé à celui possédant 7 résidus. Au niveau du nombre de sites de fixation, les auteurs trouvent des différences avec un nombre plus important pour la séquence la plus grande. Cependant, leur comparaison reste contestable dans la mesure où les analyses faites pour le 7-mère ne sont pas équivalentes avec celles réalisées avec le 19-mère en termes de tanins testés, de pH et de

température. C'est pourquoi il nous a paru important de tester la longueur du peptide sur son affinité aux tanins en utilisant les mêmes conditions expérimentales. D'autre part, l'attribution totale de l'ensemble des résonances du peptide de 37 résidus nous a permis de suivre les variations de déplacement chimique un à un, même si seuls les résidus qui subissent la plus grande variation sont présentés dans les résultats ci-dessus.

a) Structure tridimensionnelle d'IB9₃₇

L'attribution complète des résonances protons d'IB9₃₇ a permis dans un premier temps grâce à la RMN et la modélisation moléculaire, d'obtenir sa structure tridimensionnelle. Cette structure, confirmée par les résultats de Dichroïsme Circulaire (figure V-1), présente une forte homologie avec celle du fragment IB7₁₄ : ce peptide est linéaire et flexible, avec une proportion d'hélice de type II reflétant le nombre de prolines présentes dans la séquence (33%). Cette structure étendue et ouverte, comme Williamson l'explique dans une revue (Williamson 1994), facilite la fixation de ligands tel que les polyphénols. La présence d'un grand nombre de prolines n'a pas que l'effet de favoriser une structure ouverte, elle favorise également l'interaction avec les polyphénols par l'accessibilité et la capacité de leur groupement carboxyle à former des liaisons hydrogène avec les phénols des tanins (Murray 1994).

b) Stœchiométrie et spécificité de l'interaction tanin-peptide IB9₃₇

Le peptide IB9₃₇ semble apte à fixer de manière spécifique jusqu'à 10 procyanidines dimères ou trimères comme le laisse penser les courbes de variation de déplacements chimiques et de coefficient de diffusion pour lesquelles on observe l'amorce d'un effet plateau au-delà d'un rapport T/P de 10. Les sites de fixations, identifiés par des variations de déplacements chimiques plus importants et par l'existence d'effets NOE intermoléculaire, sont les mêmes quelque soit le tanin : il s'agit des prolines 2-3, de la proline 6, de la proline 10, des glycines 13-14, de la proline 17, de la proline 21, de la proline 24, de la proline 27, des prolines 30-31 et des glycines 34-35. Ces sites ont pu être partagés en deux familles distinctes avec des constantes de dissociation différentes : Une première famille de 2 sites environ avec un k_d dépendant de la nature du tanin, et une deuxième de 8 sites, moins affins, avec un k_d indépendant de la nature du tanin. Cette différence d'affinité semble provenir d'un réarrangement du peptide après avoir fixé les 2 premiers tanins, comme le montrent les calculs de dynamique moléculaires.

c) Effet de la longueur du peptide sur l'interaction tanin-peptide de la salive

De la première famille de site, on peut établir une échelle d'affinité (figure V-13). Cette échelle est la même que celle obtenue avec le motif IB7₁₄, et nous montre la dépendance de la structure 3D qu'adopte préférentiellement le tanin et son degré de polymérisation sur cette affinité : le

trimère est le tanin qui possède la meilleure affinité, le dimère B1 possède une affinité moyenne et enfin, le dimère B3 possède l'affinité la plus faible.

On peut remarquer que, pour l'ensemble des procyanidines, les affinités de la première famille de 2 sites sont environ 10 fois plus fortes que celles obtenues pour le peptide de 14 résidus, résultat en accord avec la littérature.

d) Formation des complexes et précipitation.

Dans le chapitre précédent, nous avons démontré que la formation du complexe tanin-peptide IB7₁₄ pouvait conduire à un phénomène de précipitation dans certaines conditions : quand la conformation du tanin le permet, et /ou quand il existe sous forme de micelles. Dans le cas d'IB9₃₇, on observe les mêmes phénomènes : C2 et dans une moindre mesure B1 conduisent à la précipitation pour des rapports T/P supérieur à 2. Concernant B3, une précipitation du peptide apparaît pour des concentrations au-delà de 12 mM (T/P=12). Cependant, à cette concentration, on s'approche de la valeur de CMC de B3, et on peut donc penser que de la fixation non spécifique de tanin se fait, provoquant la précipitation du complexe comme nous l'avons expliqué dans le chapitre précédent.

e) Structure tridimensionnelle du complexe

Nous avons pu vérifier avec la modélisation moléculaire, les sites d'interaction entre les tanins et le peptide. Les sites visualisés correspondent à des résidus ayant déjà été identifiés par RMN et notamment avec les variations de déplacements chimiques. Les résidus impliqués forment des liaisons hydrogènes entre leurs carbonyles et les phénols des procyanidines. Ce comportement avait été également observé pour le peptide IB7₁₄. Ceci montre que les résidus prolines sont majoritairement impliqués dans l'interaction. Les interactions hydrophiles dans ce cas ont pu donc être mises en évidence. Cependant, la modélisation ne permet pas ici de montrer si des interactions hydrophobes peuvent avoir lieu. La nécessité de réaliser des expériences plus longues, avec des boîtes de calcul plus grandes permettraient de réaliser des simulations avec un nombre de peptide plus important (au moins 2 comme dans l'étude d'IB7₁₄). La limite de cette technique reste le temps de calcul qui est important avec des systèmes de plus en plus complexes.

E. Conclusion

Nous avons pu montrer que l'interaction tanin-peptide de la salive se faisait d'une certaine manière de façon identique pour le peptide de 37 résidus que dans le cas du peptide de 14 résidus. La longueur du peptide affecte bien l'interaction qui a lieu entre les procyanidines et les PRPs. Nous avons pu montrer que le peptide IB9₃₇ possédait deux sites de fixation spécifiques. Une fois ces sites d'affinité sub-millimolaire saturés, le peptide adopte un réarrangement rendant ainsi plus difficile toute

autre fixation. L'interaction est de nature hydrophile dans le cas des sites spécifiques. Comme pour le peptide de 14 résidus, on a des sites de fixation formés avec des liaisons hydrogènes pour les deux sites préférentiels. Pour les 8 sites suivants l'affinité est plus faible, c'est pourquoi il serait nécessaire de réaliser des expériences en dynamique moléculaire plus longue afin d'identifier les sites les moins affins.

Chapitre VI
**Étude de l'interaction entre le peptide Histatine3 et la
procyanidine B1**

Chapitre VI

Étude de l'interaction entre le peptide Histatine3 et la procyanidine B1

Dans les protéines salivaires connues pour interagir avec les polyphénols autres que les protéines riches en proline, il y a les Histatines. En effet, si les protéines riches en proline constituent une famille de protéines capables d'interagir avec les polyphénols en les complexant et les précipitant (Mehansho 1987), les Histatines ont été montrées également capable de fixer les tanins (Yan 1995; Naurato 1999). Par contre, si les résidus proline jouent un rôle important dans l'interaction des protéines riches en proline avec des tanins, dans le cas des Histatines, ce sont les résidus basiques qui semblent être les plus impliqués dans l'interaction avec les tanins (Bennick 2002).

Les Histatines aussi appelés PRHs pour Protéines Riches en Histidine représentent un groupe de protéines ayant une forte homologie de séquence. On retrouve chez l'homme 12 PRHs, nommée PRH1 à 12, de structures primaires déterminées (Troxler, Offner et al. 1990). D'autres membres de cette famille de protéines ont été identifiés (Xu, Lal et al. 1993). Les membres les plus représentés sont PRHs 1, 3 et 5, représentant 85-90% de la famille. Contrairement aux PRPs, les Histatines ne contiennent pas de résidus proline à l'exception de PRHs1 et 2 qui en contiennent une. L'histidine est l'acide aminé majoritaire, puisqu'il représente environ 25% de tous les résidus et, avec les acides aminés basiques, représente 30% à 75% du total des acides aminés présents. En solution aqueuse, les PRHs adoptent une structure en pelote statistique, alors que dans un environnement hydrophobe ces protéines peuvent adopter une structure hélicoïdale, un phénomène qui a été associée à l'activité antimicrobienne de ces protéines, car ce changement de structure peut faciliter l'interaction des peptides avec les micro-organismes (Al Raj et al. 1990). La concentration en PRHs a été estimée à 32 mM dans la salive humaine, représentant environ 2,6% des protéines totales (Sugiyama 1993).

Leur rôle dans les mécanismes de défense de la bouche (Xu 1993; Meiller 2009; Tay 2009), a été extrêmement étudié au cours des dernières années en raison de leurs activités antibactériennes et antifongiques. Dans une étude l'équipe de Bennick (Yan et Bennick 1995), a montré que les PRHs étaient aussi capables de précipiter les tanins condensés ainsi que l'acide tannique. A pH neutre, PRH 5 précipite jusqu'à deux fois plus d'acide tannique que la gélatine, connue comme liant fort de l'acide tannique. Des résultats similaires ont été obtenus lorsque l'acide tannique a été remplacé par des tannins condensés. Ce fut une découverte inattendue, du fait de la quasi-absence de proline dans ces protéines et de leur petite taille contrairement au PRPs. Les Histatines constituent clairement une nouvelle famille de protéines capables de lier les tanins et donc pourraient jouer un rôle au niveau de la sensation d'astringence.

La capacité des Histatines à précipiter les tanins condensés a été démontrée par plusieurs équipes (Yan 1995; Yan 1995; Naurato 1999; Wroblewski 2000; Wroblewski 2001). L'ensemble de ces travaux montre que les Histatines 3 et 5 possèdent la même région d'interaction pour les tanins condensés, région localisée dans la partie C-terminale des peptides. Mais cette région de fixation semble varier selon la nature chimique des tannins (Naurato 1999) : le pentagalloyl glucose (PGG),

Chapitre VI

Étude de l'interaction entre le peptide Histatine3 et la procyanidine B1

par exemple, qui précipite de la même manière les PRHs 1, 3, 5, se fixe indifféremment sur les régions N et C-terminal de la protéine. La plupart des complexes protéines-tanins resteraient insolubles, ce qui suggère que les Histatines pourraient interagir avec les tanins et donc avoir une influence sur la sensation d'astringence.

Comme la littérature a l'air d'indiquer que les PRH interagissent avec les tanins au même titre que les PRP. Il nous a paru important de les étudier.

Ce chapitre est consacré à l'étude de l'interaction entre une PRH, la PRH 3, qui est représentative de cette famille de protéine (schéma VI-1) et la procyanidine B1. Cette étude a été faite dans les mêmes conditions expérimentales pour les PRPs dans le but de définir les différences liées au mode de fixation des tanins et à leur affinité. Pour cette étude, nous avons repris la même démarche que celle employée pour les deux chapitres précédents, en comparant les résultats obtenus pour un tanin commun aux trois études, le dimère B1. Ce choix a été fait car le dimère B1 présente une affinité intermédiaire pour les peptides IB7₁₄ et IB9₃₇, avec respectivement des valeurs de 3,5 mM et 1 mM.

Il est clair que ce chapitre est encore exploratoire car nous n'avons pas réalisé, faute de temps, toutes les expériences souhaitées. Il sera intéressant aussi d'étendre ces études à d'autres tanins.



Schéma VI-1 : structure chimique de l'Histatine 3, PRH3 ou His 3, composée de 32 acides aminés

A. Paramètres expérimentaux

Les paramètres utilisés pour le dichroïsme circulaire et pour la modélisation moléculaire sont identiques aux chapitres précédents.

a) RMN

Les expériences RMN ayant permis l'élucidation structurale de l'Histatine ont été enregistrées à 298K sur un spectromètre Bruker Avance III 800 MHz équipé d'une cryosonde TXI de 5 mm comprenant un lock pour le deutérium ²H et trois canaux ¹H, ¹³C, ¹⁵N. La sensibilité et la résolution de la cryosonde couplée à un spectromètre de 800 MHz permet de réaliser des expériences hétéronucléaire ¹H/¹³C ou ¹H/¹⁵N avec des molécules non enrichies en isotope. Les expériences HSQC ¹H/¹⁵N ont notamment permis d'identifier les différentes amines du peptide. La caractérisation de ce peptide a été réalisée par l'utilisation successive d'expériences RMN proton, TOCSY, NOESY et HSQC. Les paramètres utilisés étaient les suivants : une fenêtre spectrale de 10000 Hz en dimension proton et 40 Hz en dimension azote, centrée sur les corrélations entre les protons amides et l'azote qui le porte, 2048 points en ¹H, 256 en ¹⁵N, une impulsion 90° pour le proton de 12,43 µs à 0 dB et pour l'azote une impulsion de 38 µs à -4dB.

B. Analyse structurale de l'Histatine 3

a) dichroïsme circulaire

Lorsqu'on regarde les spectres obtenus en dichroïsme circulaire figure VI-1 et les informations structurales combinées aux informations issues de la littérature, le peptide adopte une structure secondaire en pelote statistique dans un milieu aqueux tel que l'eau.

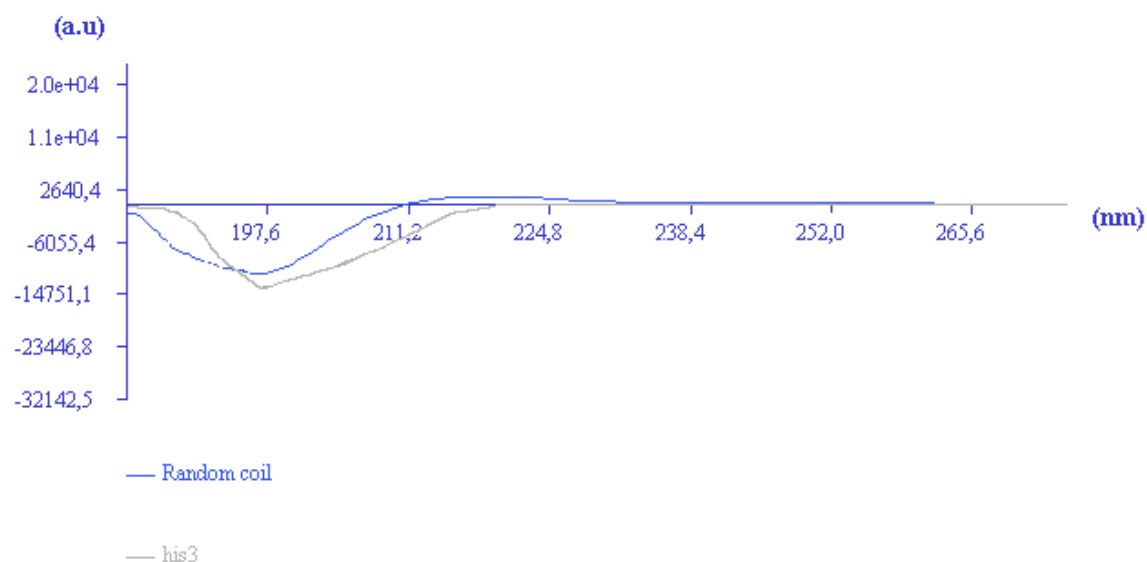


Figure VI-1 : Spectre dichroïque de l'Histatine 3 à 100 μ M dans un solvant H₂O/D₂O/EtOD (80/8/12, v/v/v), pH 3,5. En trait gris, le spectre de l'Histatine 3 et en bleu celui de la référence représentant une structure secondaire en pelote statistique.

En effet, la déconvolution du spectre dichroïque, effectuée en utilisant le logiciel CD-friend (Sébastien Buchoux), montre que le peptide His 3 présente majoritairement une structure secondaire en pelote statistique avec un minimum observé à 198 nm typique de ce type de structure. Ce logiciel permet d'estimer, partir de courbes de références obtenues dans les mêmes conditions, la proportion de chaque type de structure secondaire. Dans notre cas, le peptide adopte une structure en pelote statistique à 80%, 15% d'hélice de type II et 5% d'hélice α . Ce résultat est en accord avec les études déjà réalisées sur des peptides de la famille des Histatines humaines dans un milieu aqueux (Brewer 1998; Naurato 1999). Les expériences avec ajout de tanin n'ont pas été effectuées mais pourraient apporter des informations structurales supplémentaires sur les complexes formés mais nous avons observé des problèmes dans des expériences précédentes suite à l'absorption des polyphénols.

Chapitre VI

Étude de l'interaction entre le peptide Histatine3 et la procyanidine B1

b) Attribution des protons du peptide Histatine 3

La première étape de cette attribution consiste à déterminer l'ensemble des systèmes de spins et de les attribuer aux différents acides aminés du peptide PRH3. Ceci a été fait par l'analyse de spectres TOCSY (Figure VI-2).

L'attribution de l'ensemble des résonances de His 3 dans un milieu hydroalcoolique a été facilitée par des études structurales préliminaires effectuées sur les Histatines 3 et 5 dans un tampon phosphate et dans le DMSO (Raj 1990; Brewer 1998; Raj 1998). La figure VI-2 présente une carte TOCSY $^1\text{H}/^1\text{H}$ montrant les attributions de chaque résidu aminé à partir de la région des NH.

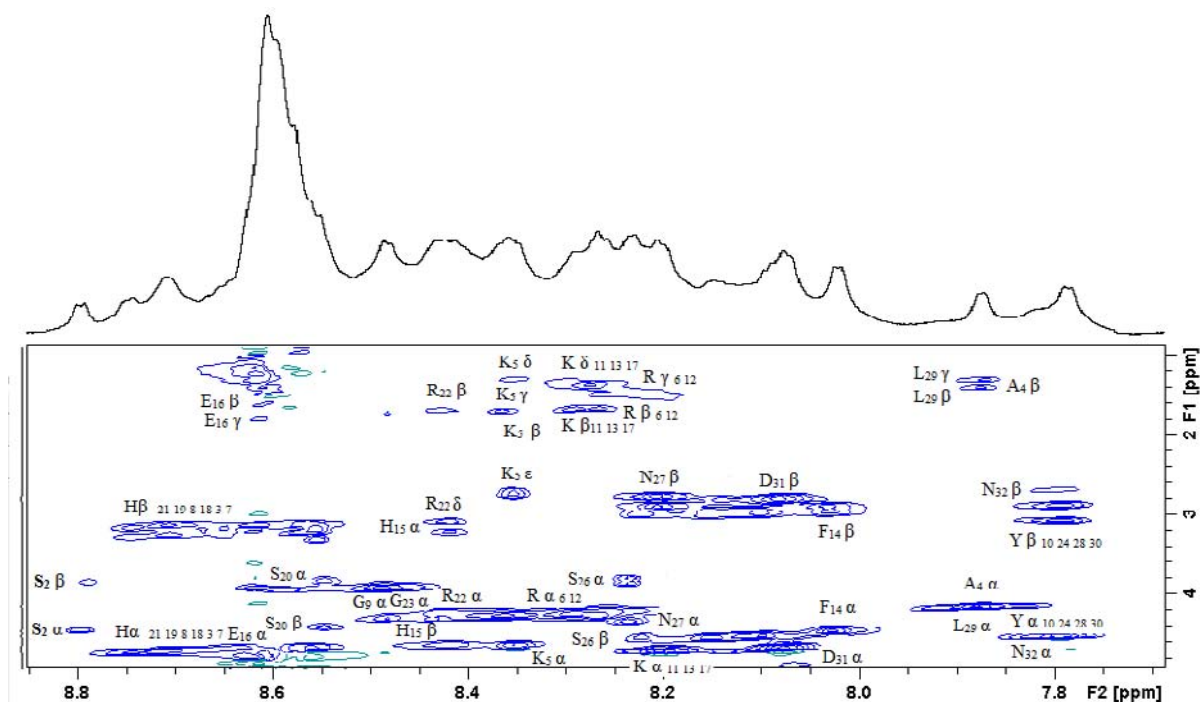


Figure VI-2 : Carte partielle TOCSY de l'Histatine 3 à 3mM dans un milieu hydroalcoolique $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}/\text{EtOD}$ (80/8/12 : v/v/v) enregistré à 298 K représentant un agrandissement de la région des corrélations NH-H α . Ce spectre a été enregistré à 800 MHz avec un spinlock de 100 ms.

Nous avons pu identifier 2 Asp, 3 Ser, 4 Lys, 4 Tyr, 1 Ala, 1 Phe, 1 Gln, 4 Arg, 2 Asn, 1 Leu, 2 Gly et 7 His. Cependant, les chevauchements au niveau des pics des spectres protons 1D et 2D peuvent nous donner quelques doutes. A 8,2 ppm par exemple, nous observons la superposition de résidus arginine, lysine, asparagine, ou encore à 8,65 ppm la superposition de résidus histidine, et glutamate. Pour éliminer nos doutes, nous avons effectué des expériences HSQC $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ en abondance naturelle.

Chapitre VI

Étude de l'interaction entre le peptide Histatine3 et la procyanidine B1

Ces expériences HSQC $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ ont été enregistrées sur un spectromètre 800MHz doté d'une cryosonde triple résonance. Les spectres ont été acquis sur le peptide sans marquage. Le gain de résolution de l'aimant et le gain de sensibilité de la cryosonde ont permis l'acquisition des spectres sur un échantillon d'Histatine à 4mM dans le même milieu que précédemment à 298K. La carte partielle HSQC de la région des amines est présentée en figure VI-3.

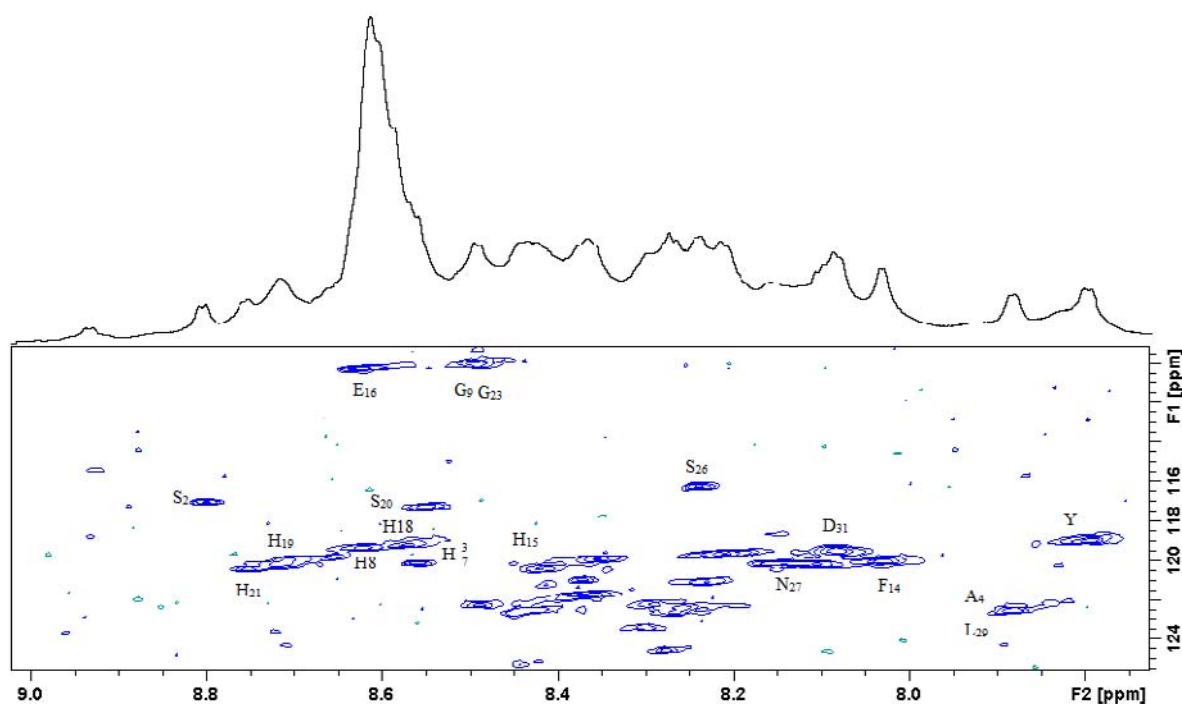


Figure VI-3 : Spectre HSQC $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ de l'Histatine 3 à 4mM dans un milieu $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}/\text{EtOD}$ (80/8/12 : v/v/v) enregistré à 800 MHz à 298K, pH 3,5.

c) Attribution séquentielle de l'Histatine 3

Tous les systèmes de spins ayant été attribués aux 32 résidus du peptide, leur enchaînement a pu être déterminé par l'étude des corrélations dipolaires intramoléculaires obtenues par des expériences de type NOESY dont une carte est présentée en figure VI-4, représentant la région des corrélations obtenues entre les $\text{H}\alpha$ et les NH .

Étude de l'interaction entre le peptide Histatine3 et la procyanidine B1

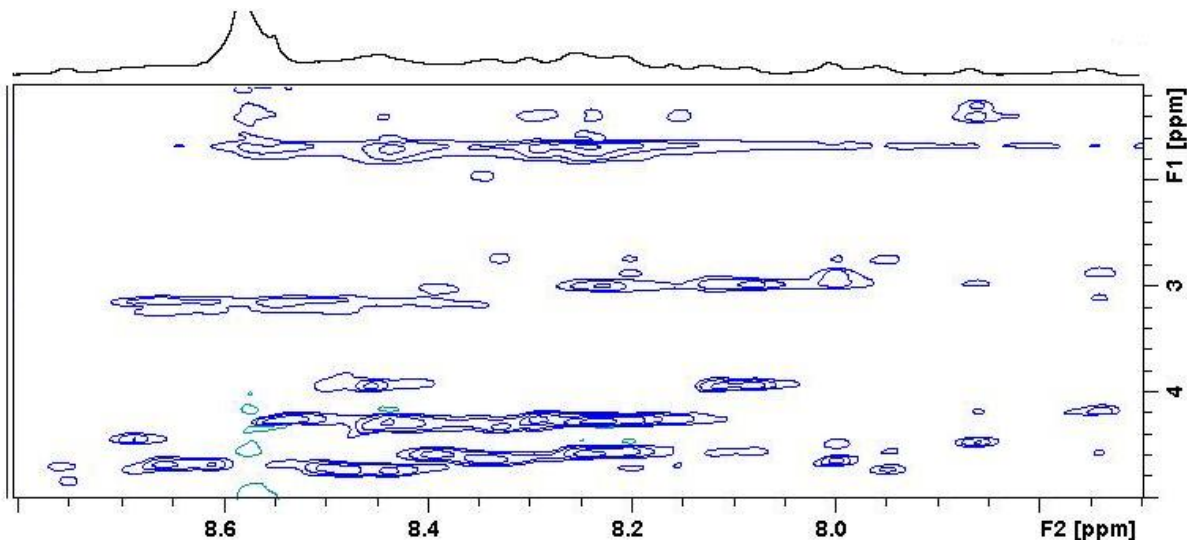


Figure VI-4 : Carte partielle NOESY de l'Histatine 3 à 3mM à 298K à 800MHz, dans un milieu H₂O/D₂O/EtOD (80/8/12 : v/v/v) et un temps de mélange de 300 ms.

Ce type de carte nous a permis d'attribuer, d'une part les différents NOE nous permettant l'attribution séquentielle des acides aminés, grâce à l'étude des corrélations entre les Ha d'un résidu i et les NH du résidu suivant $i+1$, et, d'autre part, d'obtenir des informations supplémentaires sur la structure tridimensionnelle qu'adopte le peptide. L'ensemble de ces informations sont présentés dans la figure VI-5, l'intensité des pics de corrélation nous permettant d'avoir des informations de distances entre deux protons.

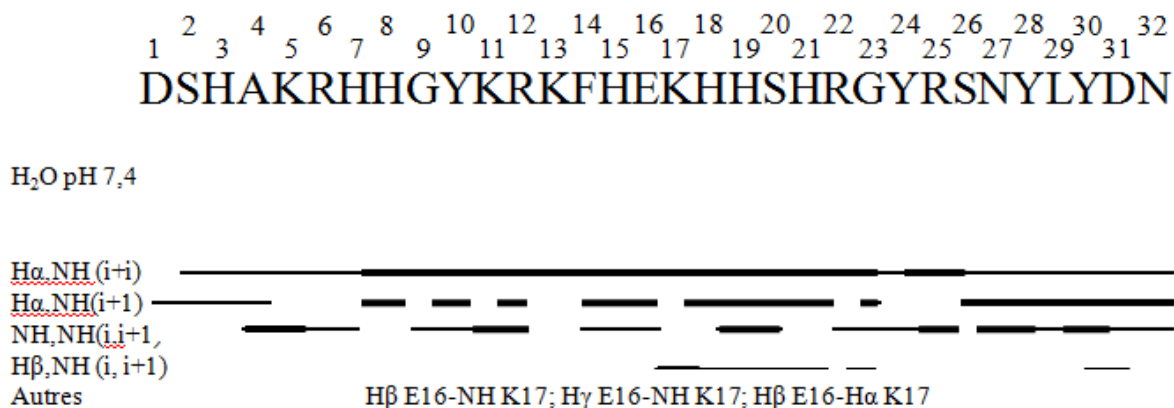


Figure VI-5 : Représentation des NOE observées sur la séquence du peptide Histatine 3. L'intensité de la ligne est proportionnelle à l'intensité observée en NOE. Un NOE fort (trait épais) représente une distance courte ($<2\text{\AA}$) et inversement, un NOE faible (trait fin) représente une distance longue ($>3,3\text{\AA}$) et un NOE moyen (trait intermédiaire) représente une distance moyenne ($2\text{\AA} < X < 3,3\text{\AA}$).

Chapitre VI

Étude de l'interaction entre le peptide Histatine3 et la procyanidine B1

L'ensemble des déplacements chimiques des résidus du peptide Histatine 3 sont répertoriés dans le tableau suivant :

	NH	H α	H β_1	H β_2	Autres
Asp 1	-	4,52	2,95		-
Ser 2	8,80	4,46	3,85	3,83	-
His 3	8,57	4,65	3,22	3,19	-
Ala 4	7,82	4,15	1,45		H γ =1,30
Lys 5	8,36	4,63	1,77	-	H γ =1,32; H ϵ = 2,76 NH= nd
Arg 6	8,27	4,23	1,69		H γ =1,36
His 7	8,57	4,65	3,22	3,19	-
His 8	8,66	4,68	3,20	3,16	-
Gly 9	8,49	3,91	-	-	-
Tyr 10	8,15	4,53	2,88	-	-
Lys 11	8,27	4,23	1,69	-	H γ =1,36
Arg 12	8,30	4,22	1,70	-	H γ =1,40
Lys 13	8,30	4,22	1,70	-	H γ =1,40
Phe 14	8,03	4,47	2,96	2,89	2,6H=7,54 ; 4H=7,69 ; 3,5H=7,85
His 15	8,42	4,63	3,22	3,10	-
Glu 16	8,61	4,78	1,82	-	H γ =2,45
Lys 17	8,42	4,67	1,69	-	H γ =1,2 ; H ϵ =2,74
His 18	8,62	4,78	3,22	3,14	-
His 19	8,71	4,72	3,25	3,17	-
Ser 20	8,55	4,40	3,85	-	-
His 21	8,75	4,74	3,29	3,17	-
Arg 22	8,42	4,24	1,69	-	H γ =1,39 ; H δ =3,16
Gly 23	8,49	3,91	-	-	-
Tyr 24	8,08	4,67	2,79	-	-
Arg 25	8,27	4,23	1,69		H γ =1,36
Ser 26	8,24	4,34	3,86	3,79	-
Asn 27	8,21	4,71	2,83	-	-
Tyr 28	7,83	4,55	2,88	-	-
Leu 29	7,82	4,15	1,45		H γ =1,30
Tyr 30	7,79	4,54	2,97	-	-
Asp 31	8,08	4,67	2,79	-	-
Asn 32	7,83	4,55	2,88	-	-

Tableau VI-1 : tableau des attributions des protons de l'Histatine 3, à 800MHz, 298K, dans un milieu hydroalcoolique H₂O/D₂O/EtOD (80/8/12, v/v/v) pH 3,5.

Chapitre VI

Étude de l'interaction entre le peptide Histatine3 et la procyanidine B1

Concernant la structure 3D du peptide, peu d'informations sont apportées, nous n'avons pas identifié d'effet NOE à $i+2$, $i+3$, etc. Une structure du peptide obtenue par modélisation moléculaire sans contrainte RMN est illustrée en figure V-6

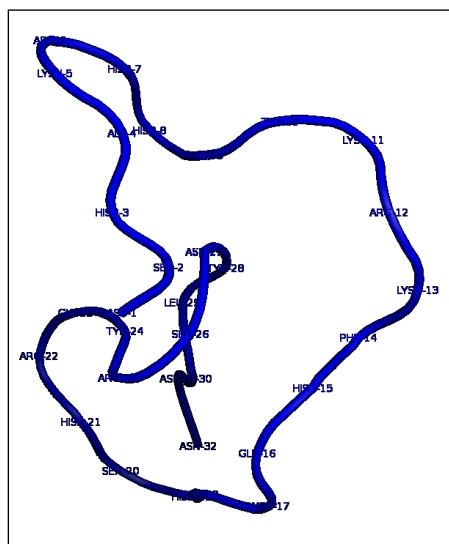


Figure V-6 : Structure tridimensionnelle de l'Histatine 3 obtenue par modélisation moléculaire. Les hydrogènes ne sont pas représentés le peptide est représenté en ruban bleu et les résidus sont annotés sur le squelette peptidique.

La structure 3D de l'Histatine présentée ci-dessus confirme la structure secondaire de type pelote statistique retrouvée par DC et en accord avec la littérature (Brewer 2002).

C. Etude de l'interaction de l'Histatine et de la procyanidine B1

a) Recherche des sites de fixation

Grâce à l'attribution complète de l'ensemble des résonances protons du peptide, le suivi des variations de déplacements chimiques des acides aminés de ce peptide impliqués lors de l'interaction avec une procyanidine peut alors être fait. Dans un premier temps nous avons voulu voir quels étaient les acides aminés les plus sensibles à la présence de tannins, et donc vraisemblablement impliqués dans l'interaction. La figure VI-7 nous présente la variation de déplacement chimique observée pour chaque résidu de l'Histatine 3 après un ajout de dimère B1 pour un rapport tanin/peptide de 20.

Chapitre VI

Étude de l'interaction entre le peptide Histatine3 et la procyanidine B1

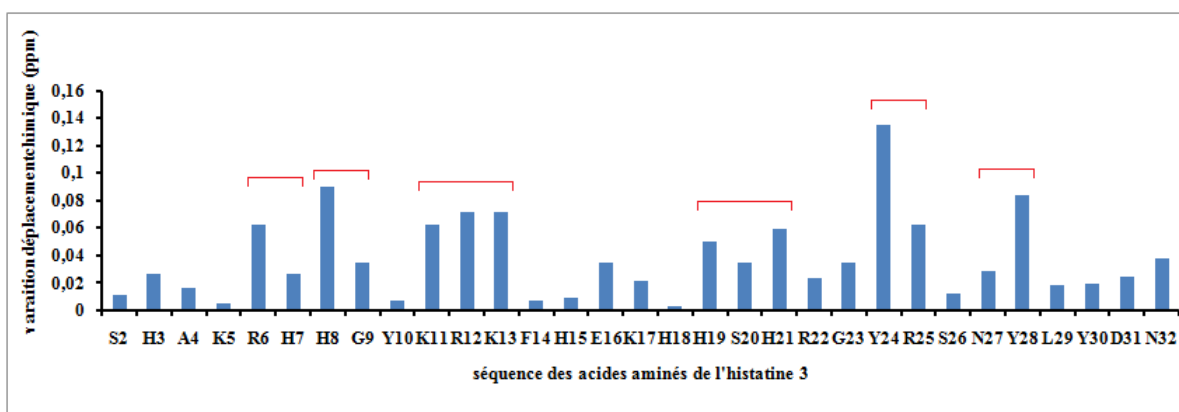


Figure VI-7 : Variation de déplacement chimique des NH des résidus de l'Histatine 3 après ajout de procyanidine B1 pour un rapport T/P =20. Un crochet horizontal rouge indique les résidus dont la variation de déplacements chimiques est la plus importante.

A travers cette expérience, on constate que tous les résidus ne sont pas affectés de la même manière par l'ajout de procyanidine. Cinq à six régions différentes montrent une variation de déplacement chimique significative pouvant correspondre à un site de fixation : arginine 6, histidine 8, lysine 11-arginine 12-lysine 13, histidine 19-histidine 21, tyrosine 24-arginine 25 et tyrosine 28.

b) Analyse des variations de déplacement chimique

La variation des déplacements chimiques des protons des acides aminés de His 3 les plus impliqués dans l'interaction avec la procyanidine B1 a été étudiée, et les points expérimentaux obtenus lissés avec l'équation (III.8) traduisant une interaction spécifique d'un peptide hôte avec n ligands tannins, chacun des sites de fixation présentant la même affinité à l'égard du peptide. La figure VI-8 présente la superposition de spectres TOCSY obtenus sans tannin (en bleu) et en présence de procyanidine B1 (20mM). Les acides aminés présentant les plus grandes variations de déplacement chimique sont annotés sur le spectre.

Chapitre VI

Étude de l'interaction entre le peptide Histatine3 et la procyanidine B1

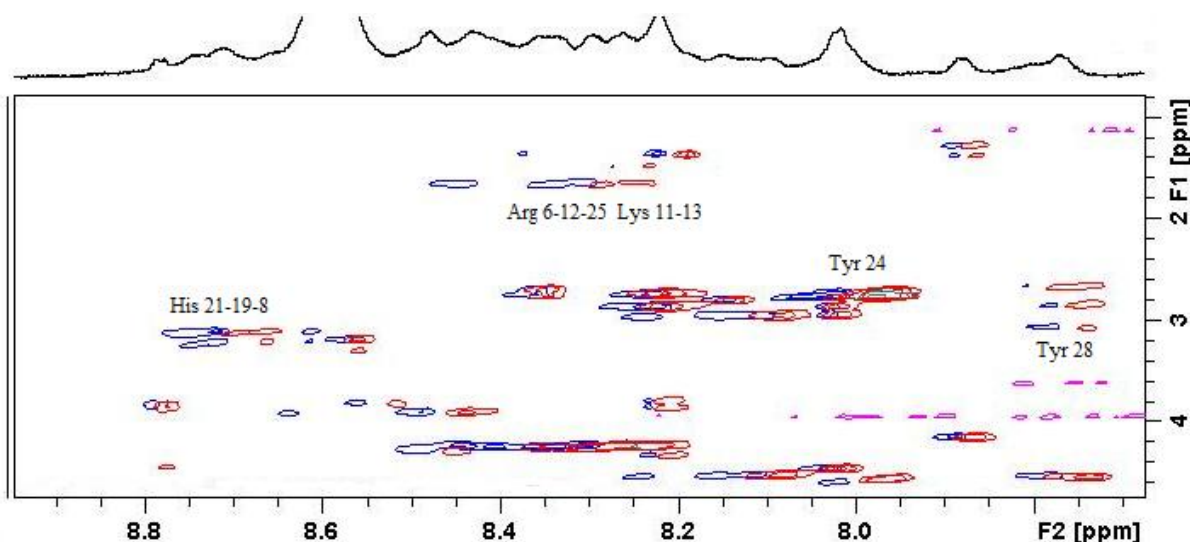


Figure VI-8 : Superposition de carte TOCSY de 1 mM d'Histatine 3 avec respectivement 0 mM (bleu) et 20 mM (rouge) de B1.

La figure VI-9 présente les variations obtenues pour les NH des histidines (symboles) au cours de l'ajout progressif de procyanidine B1. Le paramétrage des points expérimentaux (trait) a été effectué en utilisant comme variable ajustable la constante de dissociation k_d , le nombre de tanins fixés n et la variation maximale de déplacement chimique ($\Delta\delta_{\text{max}}$) à partir de l'équation III.8 avec un site de fixation qui semble convenir dans notre cas ($\text{RMSD} = 10^{-5}$).

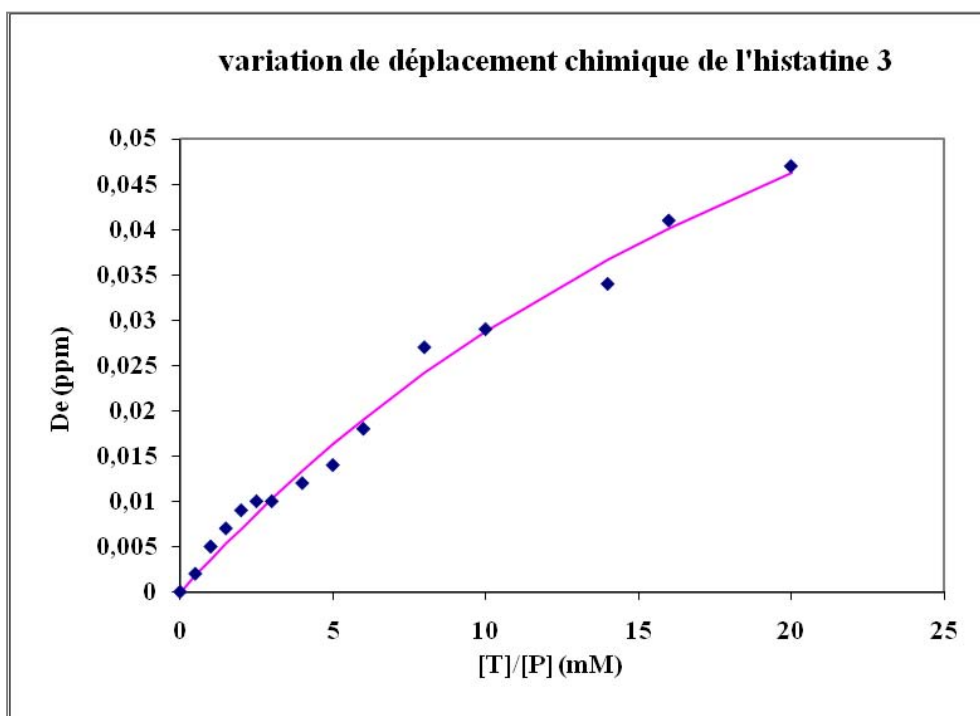


Figure VI-9 : Variation de déplacement des NH amines de l'Histatine en fonction du rapport tanin/peptide correspondant à un ajout de procyanidine B1. Les points expérimentaux sont représentés en bleu et la courbe en rose est la représentation graphique de l'équation II-2 dont on extrait les valeurs de la constante de dissociation k_d , le nombre de sites de fixation n , et la variation maximale de déplacement chimique $\Delta\delta_{\text{max}}$.

Chapitre VI

Étude de l'interaction entre le peptide Histatine3 et la procyanidine B1

Les valeurs de k_d , n et $\Delta\delta_{\max}$ ont été déterminées pour trois acides aminés (histidine 19, histidine 21 et tyrosine 24) parmi les acides aminés qui varient le plus (arginine 6, histidine 8, lysine 11-arginine 12-lysine 13, histidine 19-histidine 21, tyrosine 24-arginine 25 et tyrosine 28). L'ensemble des résultats, répertoriés dans le tableau VI-2, nous permettent donc d'estimer la constante de dissociation k_d pour B1 au-delà de 20 mM, avec un nombre de site de fixation $n=6$.

c) Analyse du coefficient de diffusion

La variation des coefficients de diffusion de l'Histatine 3 a été également suivie au cours de l'ajout progressif de la procyanidine B1, ce suivi nous permettant de mesurer la fixation des tanins sur le peptide. La figure VI-10 présente les variations observées en fonction du rapport tanin/peptide (symboles), ces points expérimentaux ayant été paramétrés en utilisant l'équation II-2, k_d , n et $\Delta D_{\max}$ étant les variables ajustables (trait).

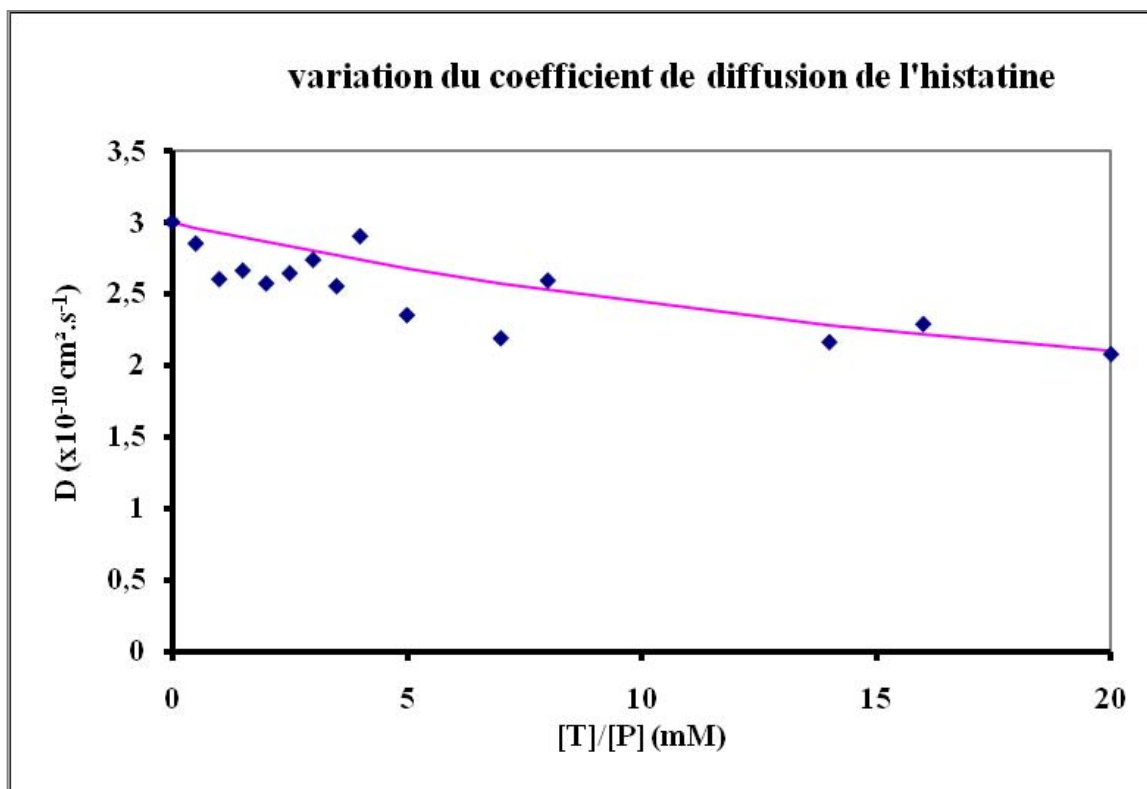


Figure VI-10 : variation du coefficient de diffusion de l'Histatine en fonction du rapport tanin/peptide correspondant à l'ajout de dimère B1.

Une diminution de la valeur du coefficient de diffusion du peptide est observée au fur et à mesure de l'ajout du tanin B1, diminution suggérant l'augmentation de la taille du peptide, et donc de la fixation du tanin. Le lissage des points permet de retrouver le nombre de 6 tanins fixés par peptide

Chapitre VI

Étude de l'interaction entre le peptide Histatine3 et la procyanidine B1

avec une constante de dissociation supérieure à 20 mM, valeurs en accord avec celles obtenues par l'étude des variations de déplacement chimique (tableau VI-2).

B1	δ (ppm)			Diffusion coefficient (10 ⁻¹⁰ .m ² .s ⁻¹)	paramètres	
[T]/[P]	Histidine 21	Histidine 19	Tyrosine 24		Déplacement chimique	
0	8,744	8,713	8,101	3	k _d	19,940±1,9
0,5	8,741	8,711	8,099	2,851	Δδ _{max}	0,075±0,021
1	8,739	8,708	8,099	2,602	n	5,84±0,11
1,5	8,737	8,706	8,098	2,662	RMSD	3,21E-05
2	8,736	8,704	8,097	2,572		
2,5	8,735	8,703	8,095	2,643		
3	8,735	8,703	8,093	2,737		
4	8,734	8,701	8,092	2,553		
5	8,733	8,699	8,092	2,901		
6	8,732	8,695	8,09	2,351		
8	8,728	8,686	8,089	2,190	Diffusion	
10	8,724	8,684	8,088	2,592	k _d	21,6±1,0
14	8,717	8,679	8,083	2,163	ΔD _{max}	2,01±0,03
16	8,712	8,672	8,083	2,288	n	5,9±0,3
20	8,71	8,666	8,081	2,079	RMSD	1,0E-03

Tableau VI-2 : Tableau récapitulatifs des valeurs de déplacement chimique des protons amines de l'Histatine 3 pour les résidus histidine 19, histidine 21 et tyrosine 28 ainsi que du coefficient de diffusion du peptide. Les valeurs calculées de k_d , n et $\Delta D_{\max}$ sont reportées pour chaque analyse.

Chapitre VI

Étude de l'interaction entre le peptide Histatine3 et la procyanidine B1

D'après les données RMN le rayon hydrodynamique R_H est de 10Å pour le peptide seul et de 13Å pour le peptide complexé.

d) Évaluation de l'agrégation du peptide

L'ajout progressif de procyanidine B1 à une solution de His 3 (1 mM) conduit à la formation d'un précipité visible. Pour voir si la formation de ce précipité était liée à la formation d'un agrégat contenant le peptide, le pourcentage de peptide resté en solution au cours de l'addition de tanins a été évalué en comparant l'intensité des résonances NH du peptide tout au long de la titration par rapport à une référence interne (TSP). On peut voir que l'ajout de tanin induit une diminution faible mais progressive de la quantité de peptide en solution (figure VI-11)

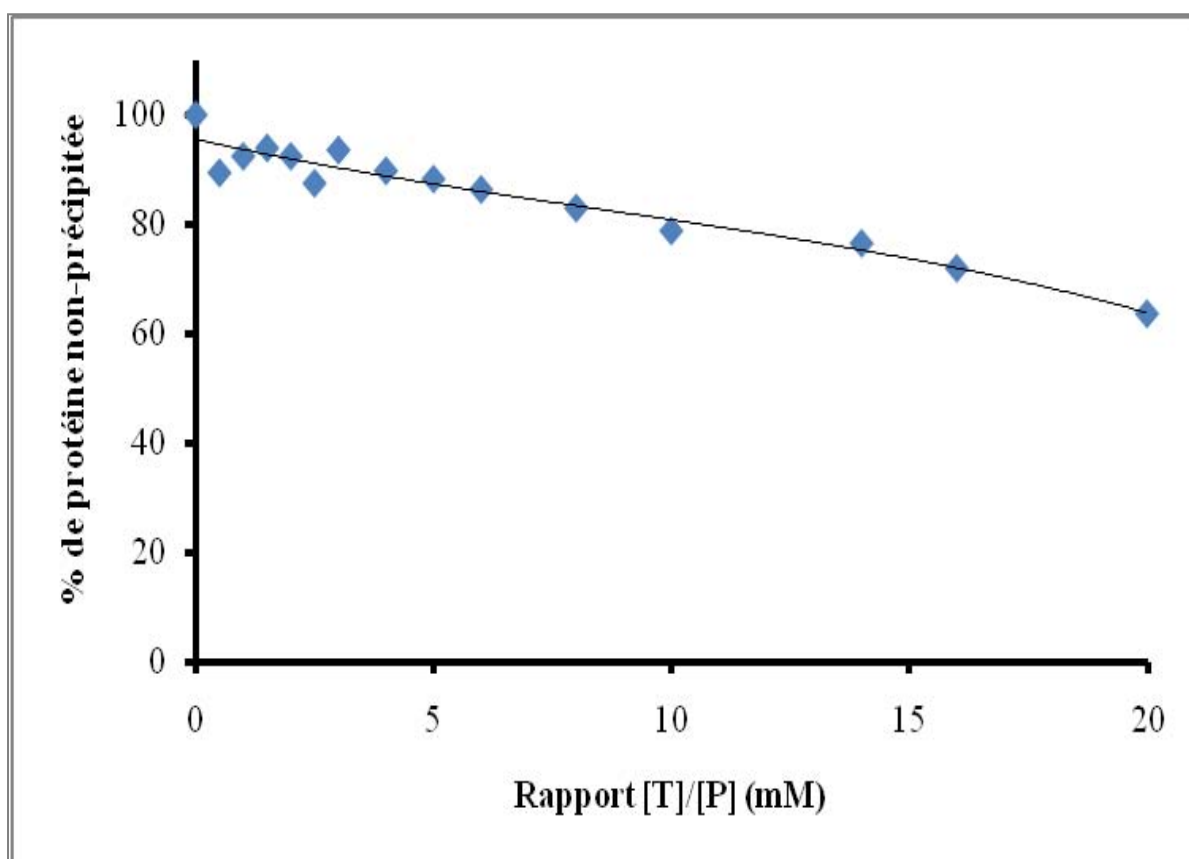


Figure VI-11 : Représentation de l'état de précipitation de l'Histatine 3 en fonction du rapport tanin/peptide dans le cas de l'ajout de procyanidine B1. La courbe représente le pourcentage de peptide en solution.

Cette légère diminution démontre un phénomène de précipitation relativement faible. Celui-ci ne peut cependant pas être dissocié du fait qu'à forte concentration en tanin, on se retrouve au dessus de la CMC.

D. Modélisation moléculaire

Dans le cadre de cette étude, des calculs en dynamique moléculaire ont été réalisés de la même manière que lors des études des PRPs. Pour l'étude de l'Histatine 3, les paramètres qui ont été utilisés sont : le logiciel GROMACS version 4.0 avec les champs de forces GROMOS96 (G43a1) et le programme Dundee PRODRG2 server website version 2.5 (beta) pour le paramétrage des tanins. Les molécules ont été placées de manière aléatoire dans une boîte d'eau cubique SPC de 100 Å de côté avec des valeurs de température et pression constantes (respectivement 300K, constante de temps de couplage $\tau_p = 0,1$ ps ; $P = 1$ bar, $\tau_p = 0,5$ ps). La méthode de couplage zz de Berendsen (Berendsen 1984) a été employée. La simulation a été effectuée avec un pas de temps de 2 fs, une méthode PME avec un quadrillage cubique (1 Å), Cutoff de VDW de 10 Å et sauvegarde d'image chaque 1000 pas. Nous n'avons réalisé qu'une seule trajectoire de 60 ns avec 1 peptide His3 et 9 molécules de B1. La figure VI-12 montre la simulation de ce système dans une boîte d'eau de 100 Å de côté.

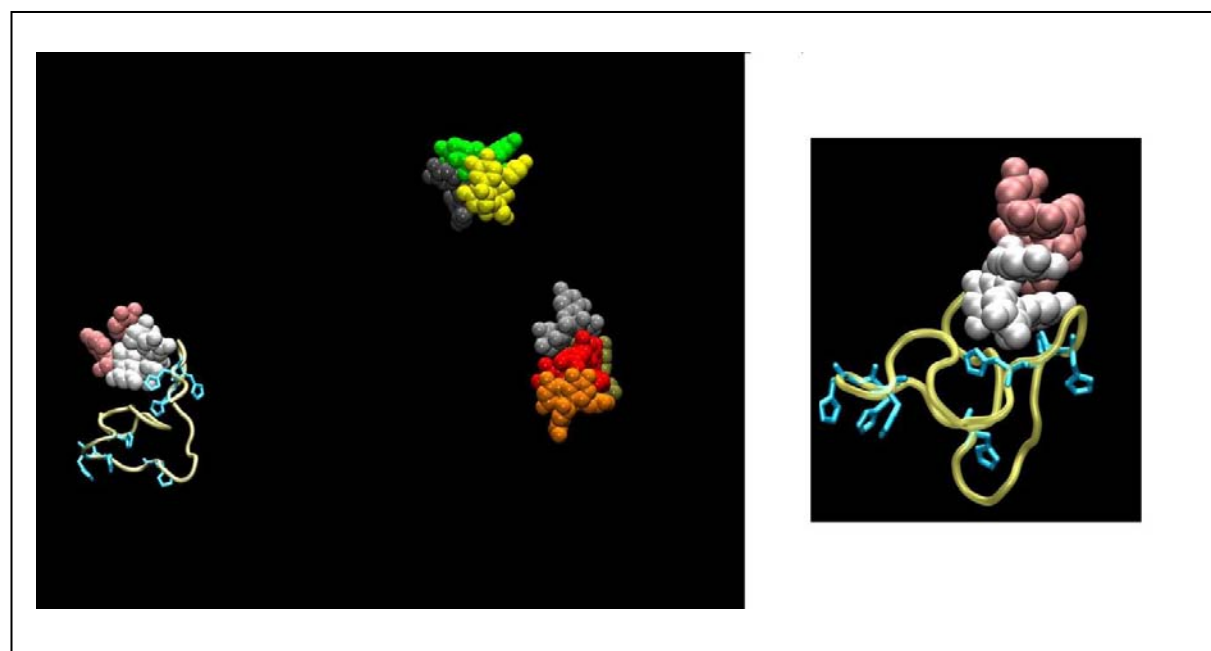


Figure VI-12 : simulation en dynamique moléculaire d'un système de 1 peptide Histatine 3 et 9 procyanidines B1. Les procyanidines sont représentées en boules (rose, blanc, gris foncé, jaune vert, gris clair, rouge orange et kaki) le peptide est représenté en ruban jaune, les résidus histidines sont représentés en sticks bleus. A gauche la boîte entière de la simulation après 60 ns de calcul et à droite un grossissement du complexe peptide-tanins

Chapitre VI

Étude de l'interaction entre le peptide Histatine3 et la procyanidine B1

Deux procyanidines qui se fixent sur le peptide (B1 lac et B1 rose) se lient à l'Histatine 3 au niveau de plusieurs résidus. Pour le premier, on peut observer des interactions entre le dimère B et les résidus histidine 3, arginine 6, lysine 5 et tyrosine 24 et pour le second, vraisemblablement, les liaisons hydrogène relient le dimère B1 aux résidus acide aspartique 31 et histidine 8. L'interaction réalisée est du type cation- π . Au niveau des tanins, la formation de micelle se fait de façon très rapide (2 ns) pour former deux micelles de 4 C2 et 3 C2.

E. Discussion

Le peptide His 3, bien qu'il adopte préférentiellement une conformation en pelote statistique, est capable de fixer de manière spécifique au niveau de certains résidus histidines et également au niveau d'une tyrosine jusqu'à 6 procyanidines B1. Cette reconnaissance s'effectue toutefois avec une affinité beaucoup moins importante que celle observée pour des peptides riches en prolines, suggérant que ces derniers sont probablement plus impliqués dans la sensation d'astringence induite par l'absorption de tanins.

Un tableau répertoriant l'ensemble des affinités et des stœchiométries des 3 peptides étudiés pour le dimère B1 a été faite (tableau VI-3.) où l'on voit clairement que l'Histatine 3 présente une affinité beaucoup plus faible que les peptides riches en prolines.

Peptide	Affinité (mM)	stœchiométrie
IB7 ₁₄	2,9	3
a. IB9 ₃₇	0,5/10	2/8
His3	20	6

Tableau VI-3 : Tableau d'affinité (en mM) de l'interaction des différents peptides IB7₁₄, IB9₃₇ et His 3 avec la procyanidine B1. a. Pour IB9₃₇, il y a 2 k_d et 2 familles de sites indiqués séquentiellement.

Ces résultats semblent montrer que la présence de nombreux résidus prolines au niveau des PRPs, joue un rôle majeur dans l'interaction à la fois par les contraintes structurales qu'elles engendrent et par la nature de leurs fonctions carboxyles aptes à créer des liaisons hydrogènes avec les phénols des procyanidines.

L'association de certains tanins (EGCG, l'acide tannique) avec cette famille de peptides salivaires avait déjà été proposée par différentes équipes (Yan 1995; Lu 1998; Naurato 1999; Wroblewski 2001; Bennick 2002). En particulier, Yann et Bennick ont été les premiers à montrer (Yan 1995) que l'Histatine 5, un peptide identique aux 24 premiers résidus de l'Histatine 3, était capable de précipiter les tanins condensés ainsi que l'acide tannique. En 2001, Wróblewski et collaborateurs travaillant sur un modèle d'Histatines de la salive humaine et d'épigallocatechine gallate (Wroblewski 2001) sont arrivés à la conclusion que les interactions seraient de nature hydrophobes opérant majoritairement entre les cycles polyphénoliques de l'EGCG et les cycles aromatiques des tyrosines et

Chapitre VI

Étude de l'interaction entre le peptide Histatine3 et la procyanidine B1

imidazole des histidines, mais également des parties hydrophobes des résidus arginine et lysine. Alors que nous avons pu montrer dans notre étude que les résidus les plus impliqués dans l'interaction sont les résidus basiques et chargés en formant des interactions de type cation- π , ce qui peut être retrouvées dans des cas similaires dans la littérature (Jean-Francois 2009) où des liaisons cation- π ont été mise en évidence entre les résidus arginine chargée positivement et les cycles aromatiques des stérols. En effet, nous avons montré que les résidus les plus affectés lors de l'ajout de procyanidine B1 sont les résidus basiques lysine, arginine, histidine mais également les tyrosines. Ces mêmes auteurs avaient trouvé une stœchiométrie de 6 tanins fixés par peptide. Cependant, ils ont déterminé des constantes de dissociation entre les Histatines et l'EGCG de l'ordre du millimolaire. Cette différence dans la constante de dissociation peut être liée à la galloylation de l'EGCG. A priori, la présence d'un groupement galloyle augmenterait l'affinité des tanins pour les protéines (Brossaud 2001; Noble 2002).

Il est important de noter que dans notre travail, l'étude de la fixation de la procyanidine B1 sur le peptide his 3 s'est faite en faisant varier la procyanidine B1 dans une gamme de concentration allant de 0 à 20 mM (ce qui correspondait à des rapports T/P allant de 0 à 20, puisque nous travaillions à une concentration d'Histatine de 1mM). Cette gamme de concentration en procyanidines utilisée est un problème dans la mesure où au delà d'une certaine concentration, la procyanidine B1 existe sous forme de petites micelles (.CMC B1=17 mM, (Pianet 2008)) Cet état colloïdal du tanin a été montré dans les chapitres précédents pouvoir induire une fixation non spécifique sur les PRPs, capables de provoquer la précipitation du complexe tanins-PRP. On peut se demander si un tel phénomène prend place avec le peptide His 3 au-delà d'une certaine concentration en B1. En effet, au-delà d'une concentration de 10 mM en B1, la variation de déplacements chimiques des protons de His 3 prend plutôt l'allure d'une droite, en accord avec une fixation non-spécifique du tanin. Pour confirmer cela, il serait nécessaire d'effectuer une titration en travaillant avec des concentrations en peptides plus faibles de sorte à conserver les rapports T/P et travailler à des concentrations en tanins inférieures à leur CMC, nécessitant l'utilisation d'un spectromètre à plus haut champ éventuellement équipé d'une sonde plus sensible comme la cryosonde.

F. Conclusion

Dans ce chapitre, les interactions entre les Histatines et les polyphénols ont été mises en évidence par des méthodes physico-chimiques regroupant la RMN et la modélisation moléculaire. Les affinités de ces interactions restent faibles (20 mM) et réalisées entre les résidus basiques (histidine, arginine et lysine) par le biais de liaisons cation- π . Les affinités mesurées montrent donc que l'Histatine est clairement moins impliquée dans l'interaction avec les polyphénols par rapport aux PRPs. Cependant, cette étude est préliminaire. Il serait intéressant de comparer l'effet d'autres dimères, du trimère ou plus sur l'affinité, et la structure du peptide.

Chapitre VII Conclusion générale & perspectives

A. Conclusion générale

Le but de ce travail était d'apporter de nouveaux éléments dans la compréhension de la sensation d'astringence. Sensation de sécheresse ressentie en bouche lors de dégustation de vin rouge causé par l'interaction des tanins du vin et des protéines salivaires conduisant à un phénomène de précipitation et par conséquent à la perte de la fonction de lubrification des protéines de la salive.

Suivant la description des œnologues (Gawel 1998), cette sensation peut correspondre à un sentiment de dessèchement, poussiéreux ou granuleux lorsque la sensation est trop forte. On peut également ressentir une sensation de douceur ou de velours, correspondant à un bon équilibre tannique. Les termes œnologiques sont très variés pour définir cette sensation (Gawel 1998; Gawel 2001). De plus, la description de la sensation d'astringence reste difficile car elle peut être confondue avec l'amertume (Lee 1991; Kallithraka 1997; Vidal 2003). Les tanins responsables de l'astringence sont essentiellement les tanins condensés tels que les procyanidines.

Concernant ces tanins, il existe une multitude de molécules de structure très proche, basées de monomères de catéchine ou d'épicatéchine dont la seule différence repose sur la stéréochimie du carbone en position 3 (Weinges 1968). Deux types de liaisons existent (C4-C8 ou C6-C8) permettant ainsi de former 8 dimères différents, 32 trimères différents. Ces différentes molécules présentent également des différences au niveau de leur structure tridimensionnelle (Foo 1983; Hemingway R.W. 1992), et par conséquent possèdent des propriétés physico-chimique propres. Ce sont des molécules capables de s'autoassocier formant ainsi des micelles (Pianet 2008) ce qui peut avoir une influence non négligeable sur l'interaction avec les protéines salivaires comme dans le cas de l'astringence.

Par une approche moléculaire permettant de caractériser les complexes formés. Nous avons pu voir que le DC, la RMN et la modélisation moléculaire constituaient des techniques de choix dans ce type d'étude. Trois points ont été abordés, l'influence de la structure des tanins (structure 3D et composition), l'influence de la taille de la protéine et l'influence de la séquence de la protéine.

Lorsque des tanins arrivent en bouche, la salive et particulièrement certaines protéines peuvent interagir avec ces tanins pour former des complexes. Nous avons pu montrer la spécificité des protéines riches en proline dans cette interaction. D'autres protéines sont capables de fixer les polyphénols telles que les histatines, protéines riches en histidine, mais à une échelle bien moins importante. Des études antérieures avaient montré le rôle potentiel de ces histatines dans l'interaction avec les tanins.(Yan 1995; Naurato 1999; Wroblewski 2000; Wroblewski 2001; Bennick 2002; Charlton 2002). L'équipe de Bennick a fortement contribué dans ce domaine de recherche en montrant la formation de complexe histatines-tanins par le biais d'interactions entre les cycles des polyphénols et les résidus basiques des protéines ou encore des cycles des tyrosines. De plus, Wroblewski et ses

Chapitre VII

Conclusion générale & perspectives

collaborateurs (Wroblewski 2001) ont montré que la force de l'interaction était du même ordre que lors des interactions tanins-PRPs, alors que nous avons pu montrer par titration en RMN que l'interaction histatines-tanins était vingt fois plus faible que pour les PRPs. Un autre point commun peu toutefois être noté, celui de nombre de sites de fixation. Il semblerait que quelque soit le tanin utilisé, EGCG dans le cas de Wroblewski et procyanidine B1 dans notre cas, il y ait six sites de fixation sur l'histatine 3, un peptide de 32 acides aminés.

Les affinités des tanins vis-à-vis des protéines salivaires montrent une préférence des polyphénols à interagir avec les PRPs et notamment avec les résidus proline par le biais d'interaction hydrogène entre les phénols des tanins et les groupements carboxyles des prolines. Nous avons pu ajouter des éléments dans la compréhension de la formation de ce type de complexe. Si on prend le cas du peptide IB7₁₄ qui constitue la plus petite séquence contenant le motif conservé dans toutes les protéines de la famille, plusieurs éléments entre en jeu dans la formation des complexes. D'abord Haslam et McManus (McManus 1981) puis Charlton et Baxter (Charlton 2002) avait proposé un mécanisme permettant d'expliquer ces interactions et comment elles conduiraient à un phénomène de précipitation.

Nous avons présenté dans ce travail notre propre mécanisme en tenant compte des résultats passés, de la littérature et de nos propres résultats.

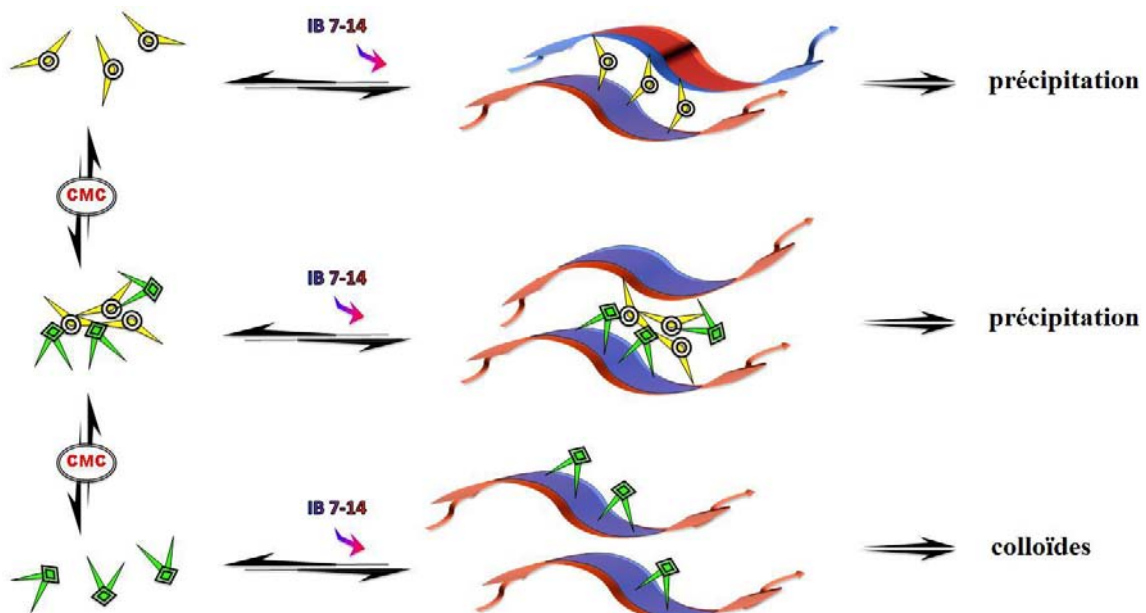


Figure VII-1 : Différents mécanismes représentant l'interaction entre les procyanidines et le peptide IB7₁₄ conduisant à la formation d'un précipité ou à la formation de simples colloïdes. Phénomène dépendant de l'état d'agrégation des tannins (sous la CMC des tannins les molécules sont libres (vert (en bas à gauche) et jaune (en haut à gauche)), au dessus de la CMC, formation de micelle (mélange vert et jaune (au milieu à gauche)) et de leur conformation préférentielle (compacte en vert et étendue en jaune)).

La figure VII-1 (reprise du chapitre VI figure VI-17), présente les différents cas possible contribuant à la formation de complexe tanins-protéines pouvant conduire à une précipitation. Ici, l'importance de la

Chapitre VII

Conclusion générale & perspectives

structure des tanins est relevée. Tout d'abord, pour des concentrations tanniques inférieure à leur CMC (<15mM, (Pianet 2008)), nous avons noté une influence de la conformation des tanins sur le mode d'interaction. Lorsqu'ils adoptent une conformation ouverte tels que le dimère B2 ou le trimère C2, les groupements phénoliques sont accessibles et favorables à la formation de liaisons hydrogènes permettant ainsi de lier deux peptides conduisant à l'initiation d'un réseau tanins-peptides pouvant conduire au phénomène de précipitation. Lorsqu'ils adoptent une conformation majoritairement compacte, favorisant la formation de liaison π tels que les dimères B3, B1 et B4, les tannins peuvent interagir avec un seul peptide ne provoquant pas la précipitation du complexe. Alors qu'au dessus de leur CMC (> 15mM), tannins forment des colloïdes de manière préférentielle. Ces colloïdes sont capables d'interagir avec les peptides à la fois par des liaisons hydrophiles et des liaisons hydrophobes. Les complexes formés sont alors capables de provoquer la précipitation du système. Cela nous a permis de construire une échelle d'affinité absolue montrant qu'en plus de la structure 3D des tanins, le degré de polymérisation avait une grande influence sur les interactions. Plus le degré de polymérisation est élevé, plus l'affinité est importante (Cala 2010).

Un troisième aspect abordé dans ce travail était l'influence de la longueur de la protéine sur l'interaction. Charlton et ses collaborateurs avaient démontré que la force de l'interaction étaient nettement améliorée par la taille du peptide (Charlton 1996). Dans notre étude, le peptide IB9₃₇ représentant près de trois fois le domaine conservé, a été utilisé dans ce but. Dans le cas du peptide IB9₃₇, une réorganisation du peptide s'opère, sans changement notable de la structure secondaire, suite à la fixation spécifique de deux molécules de tanin. L'affinité de cette interaction est plus forte que pour le peptide plus court. Le fait important est le changement de conformation 3D du peptide. De ce fait, deux types de sites de fixations apparaissent, un premier avant restructuration et le second après. Le peptide pouvant fixer plusieurs tanins (10 pour IB9₃₇), la fixation des tanins qui intervient après la réorganisation tridimensionnelle du peptide, se fait vraisemblablement sur des sites équivalents et indépendants entre eux et indépendants des tanins. Alors que pour le peptide IB7₁₄, les sites de fixations étaient équivalents et indépendants (entre eux) mais dépendants des tanins (avec une constante d'affinité différentes). Le modèle défini pour le peptide court pourrait également s'appliquer pour IB9₃₇.

De manière générale, lors de la dégustation de vins rouges, les tanins en contact avec les protéines salivaires se fixeraient de manière spécifique avec les PRPs sur les résidus prolines préférentiellement par des liaisons hydrogènes entre les phénols des tanins et les groupements carboxyles des acides aminés. Les complexes seraient stabilisés par des interactions hydrophobes d'une part entre les cycles des polyphénols entre eux par « stacking » et d'autre part entre les cycles des tanins et ceux des prolines. Les protéines s'enrouleraient autour des tanins donnant des sites de

Chapitre VII

Conclusion générale & perspectives

fixation différents. La formation de complexe contenant plusieurs protéines avec plusieurs tanins conduirait à la précipitation de ces systèmes et donc à la sensation de sécheresse en bouche.

Au niveau du vin, les vins qui contiennent une bonne concentration en tanins sont bien entendu les plus astringents, mais à concentration tannique équivalente, les vins dont les tanins les polymérisés et dont la structure 3D est la plus dynamique auraient une plus grande influence sur la sensation d'astringence.

Il est possible de connaître les différentes concentrations des vins, Sandy Fabre, durant sa thèse (Fabre 2009), a développé une méthode permettant de définir et de quantifier différentes procyanidines comme le présente le chromatogramme qui suit.

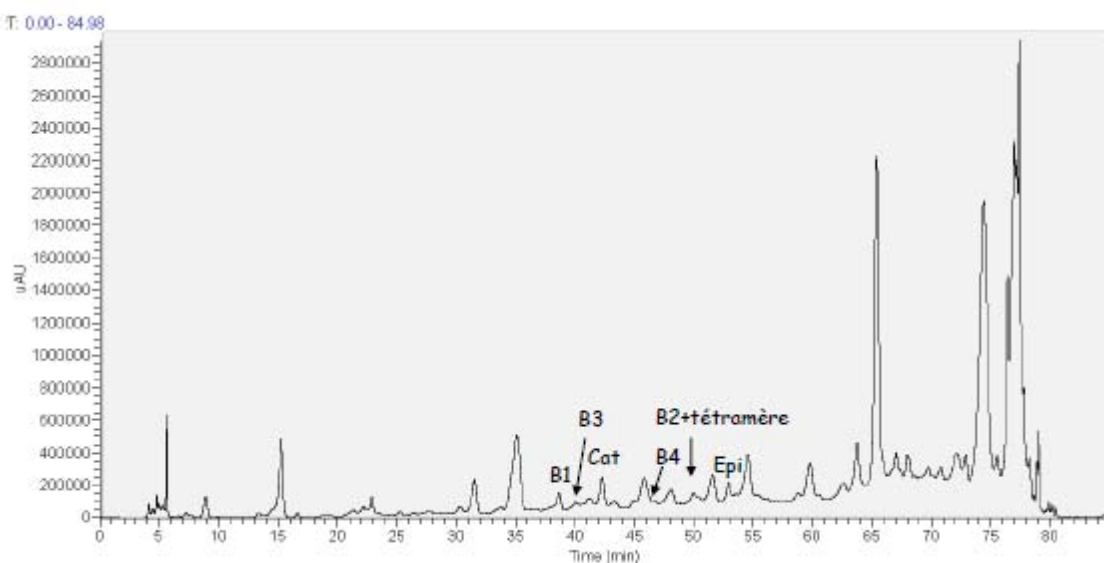


Figure VII-3 : Chromatogramme d'un vin (Cuve 117, CS, fin de fermentation malolactique), en détection UV à 280 nm (thèse Sandy Fabre Université Bordeaux 1 2010).

B. Perspectives

Lors de nos titrations, les spectres RMN nous ont montré un élargissement des raies de résonance. Des expériences de mesure de la relaxation pourraient être envisagée afin d'apporter des informations supplémentaires sur la dynamique de l'interaction.

Pour comprendre d'une manière plus précise le mécanisme de l'astringence, des études complémentaires avec d'une part des tanins galloylés seraient intéressantes afin de caractériser l'influence de la galloylation. D'autre part l'emploi de tanins dont le degré de polymérisation est supérieur à 3 permettrait d'agrandir notre échelle d'affinité.

Dans le but de vérifier la spécificité de l'interaction, il serait intéressant de tester par RMN et modélisation moléculaire les interactions avec les mêmes rapports tanins/peptide mais pour une

Chapitre VII

Conclusion générale & perspectives

concentration finale en tanin inférieure à la CMC des tanins. Ceci afin de vérifier si la précipitation du complexe et si la spécificité de la fixation est respectée.

Des expériences avec d'autres protéines telles que les protéines riches en proline acides pourraient être étudiées afin de les comparer aux protéines riches en proline basique. Nos analyses, comme celles de la littérature, montrent des affinités relativement faibles (mM).

Dans le vin, les tanins ne représentent que 1% de la composition, il serait judicieux de réaliser des analyses avec différentes concentrations en glucose afin d'évaluer son influence sur l'interaction(He 2006). Des interactions sont possibles entre les tanins et les sucres ou entre les tanins et les lipides pouvant modifier leur affinité pour les protéines salivaires. Au niveau technologiques, les avancés permettent d'étudier des systèmes de plus en plus complexe. La RMN reste une technique de choix dans ce cadre là. La modélisation moléculaire permet de réaliser des calculs sur des systèmes des plus en plus gros pour des simulations longues en un temps convenable.

Il me paraît intéressant de tester la cristallographie aux rayons X qui permettraient d'avoir une structure cristalline pour la première fois. Le choix du système est très important, une protéine relativement grande avec des tanins fortement polymérisés permettraient la formation d'un complexe stable pouvant cristalliser. Le phénomène de précipitation étant une étape d'échec dans la cristallisation, la nucléation semble possible en testant différentes concentration dans différents solvant de cristallisation.

Enfin, un test avec des dégustateurs avertis et avec des ajouts dosés de tanins directement dans du vin permettrait de confirmer notre échelle d'affinité. Le problème qui se pose est d'obtenir suffisamment de procyanidines pures pour réaliser une étude statistiquement fiables et permettant de comparer nos données physico-chimiques aux palais des professionnels. Ceci permettrait, en utilisant IB7₁₄ comme sonde, de pouvoir doser la sensibilité des dégustateurs pour la sensation d'astringence et d'autre part de pouvoir distinguer réellement l'astringence de l'amertume.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- Acuie-beghin, v., p. Sausse, et al. (2008). "polyphenol-beta-casein complexes at the air/water interface and in solution: effects of polyphenol structure." journal of agricultural and food chemistry 56(20): 9600-9611.
- Adams, d. J., e. M. Adams, et al. (1979). "computer-simulation of polar liquids." molecular physics 38(2): 387-400.
- Adler, e., m. A. Hoon, et al. (2000). "a novel family of mammalian taste receptors." cell 100(6): 693-702.
- Adzhubei, a. A. And m. J. E. Sternberg (1993). "left-handed polyproline-ii helices commonly occur in globular-proteins." journal of molecular biology 229(2): 472-493.
- Allen, m. P. And d. J. Tildesley (1989). Computer simulations of liquids. Oxford.
- Arnold, r. A., a. C. Noble, et al. (1980). "bitterness and astringency of phenolic fractions in wine." journal of agricultural and food chemistry 28(3): 675-678.
- Aron, p. M. And j. A. Kennedy (2008). "flavan-3-ols: nature, occurrence and biological activity." molecular nutrition & food research 52(1): 79-104.
- Artz, w. E., p. D. Bishop, et al. (1987). "interaction of synthetic proanthocyanidin dimer and trimer with bovine serum-albumin and purified bean globulin fraction g-1." journal of agricultural and food chemistry 35(3): 417-421.
- Audry, e., j. P. Dubost, et al. (1986). "a new approach of structure-activity-relationships - the potential of molecular lipophily." european journal of medicinal chemistry 21(1): 71-72.
- Bacon, j. R. And m. J. C. Rhodes (2000). "binding affinity of hydrolyzable tannins to parotid saliva and to proline-rich proteins derived from it." journal of agricultural and food chemistry 48(3): 838-843.
- Batesmith, e. C. (1954). "flavonoid compounds in foods." advances in food research 5: 261-300.
- Bax, a. And d. G. Davis (1985). "mlev-17-based two-dimensional homonuclear magnetization transfer spectroscopy." journal of magnetic resonance 65(2): 355-360.
- Bax, a. And d. G. Davis (1985). "practical aspects of two-dimensional transverse noe spectroscopy." journal of magnetic resonance 63(1): 207-213.
- Baxter, n. J., t. H. Lilley, et al. (1997). "multiple interactions between polyphenols and a salivary proline-rich protein repeat result in complexation and precipitation." biochemistry 36(18): 5566-5577.
- Baxter, n. J., m. P. Williamson, et al. (1996). "stacking interactions between caffeine and methyl gallate." journal of the chemical society-faraday transactions 92(2): 231-234.
- Beeley, j. A. (2001). "basic proline-rich proteins: multifunctional defence molecules?" oral diseases 7(2): 69-70.

- Bennick, a. (1982). "salivary proline-rich proteins." molecular and cellular biochemistry 45(2): 83-99.
- Bennick, a. (1986). "magnetic-resonance studies of salivary components." magnetic resonance in medicine 3(5): 818-818.
- Bennick, a. (2002). "interaction of plant polyphenols with salivary proteins." critical reviews in oral biology & medicine 13(2): 184-196.
- Bennick, a., a. C. McLaughlin, et al. (1981). "the location and nature of calcium-binding sites in salivary acidic proline-rich phosphoproteins." journal of biological chemistry 256(10): 4741-4746.
- Berendsen, h. J. C., j. P. M. Postma, et al. (1984). "molecular-dynamics with coupling to an external bath." journal of chemical physics 81(8): 3684-3690.
- Bergey, e. J., m. J. Levine, et al. (1986). "use of the photoaffinity cross-linking agent n-hydroxysuccinimidyl-4-azidosalicylic acid to characterize salivary-glycoprotein bacterial interactions." biochemical journal 234(1): 43-48.
- Blouin, j. (2008). Analyse et composition des vins comprendre le vin
- Boisselier, e., c. Ornelas, et al. (2008). "four generations of water-soluble dendrimers with 9 to 243 benzoate tethers: synthesis and dendritic effects on their ion pairing with acetylcholine, benzyltriethylammonium, and dopamine in water." chemistry-a european journal 14(18): 5577-5587.
- Braunschweiler, l. And r. R. Ernst (1983). "coherence transfer by isotropic mixing - application to proton correlation spectroscopy." journal of magnetic resonance 53(3): 521-528.
- Brewer, d., h. Hunter, et al. (1998). "nmr studies of the antimicrobial salivary peptides histatin 3 and histatin 5 in aqueous and nonaqueous solutions." biochemistry and cell biology-biochimie et biologie cellulaire 76(2-3): 247-256.
- Brewer, d. And g. Lajoie (2002). "structure-based design of potent histatin analogues." biochemistry 41(17): 5526-5536.
- Brossaud, f., v. Cheynier, et al. (2001). "bitterness and astringency of grape and wine polyphenols." australian journal of grape and wine research 7(1): 33-39.
- Cala, o., s. Fabre, et al. (2010). "nmr of human saliva protein/wine tannin complexes. Towards deciphering astringency with physico-chemical tools." comptes rendus chimie 13(4): 449-452.
- Cala, o., n. Pinaud, et al. (2010). "nmr and molecular modeling of wine tannins binding to saliva proteins: revisiting astringency from molecular and colloidal prospects." faseb j.
- Canon, f., f. Pate, et al. (2009). "characterization, stoichiometry, and stability of salivary protein-tannin complexes by esi-ms and esi-ms/ms." analytical and bioanalytical chemistry 395(8): 2535-2545.
- Carlson, d. M. (1988). "proline-rich proteins and glycoproteins - expressions of salivary-gland multigene families." biochimie 70(11): 1689-1695.

- Carteau, d., d. Bassani, et al. (2008). "the "ouzo effect": following the spontaneous emulsification of trans-anethole in water by nmr." comptes rendus chimie 11(4-5): 493-498.
- Carteau, d., i. Pianet, et al. (2007). "probing the initial events in the spontaneous emulsification of trans-anethole using dynamic nmr spectroscopy." langmuir 23(7): 3561-3565.
- Carvalho, e., n. Mateus, et al. (2004). "flow nephelometric analysis of protein-tannin interactions." analytica chimica acta 513(1): 97-101.
- Carvalho, e., n. Mateus, et al. (2006). "influence of wine pectic polysaccharides on the interactions between condensed tannins and salivary proteins." journal of agricultural and food chemistry 54(23): 8936-8944.
- Carvalho, e., m. J. Povoas, et al. (2006). "application of flow nephelometry to the analysis of the influence of carbohydrates on protein-tannin interactions." journal of the science of food and agriculture 86(6): 891-896.
- Castano, s., i. Cornut, et al. (1999). "the amphipathic helix concept: length effects on ideally amphipathic likj(i=2j) peptides to acquire optimal hemolytic activity." biochimica et biophysica acta-biomembranes 1416(1-2): 161-175.
- Castano, s., b. Desbat, et al. (1999). "structure, orientation and affinity for interfaces and lipids of ideally amphipathic lytic likj(i=2j) peptides." biochimica et biophysica acta-biomembranes 1416(1-2): 176-194.
- Chandrashekar, j., m. A. Hoon, et al. (2006). "the receptors and cells for mammalian taste." nature 444(7117): 288-294.
- Charlton, a. J., n. J. Baxter, et al. (2002). "polyphenol/peptide binding and precipitation." journal of agricultural and food chemistry 50(6): 1593-1601.
- Charlton, a. J., n. J. Baxter, et al. (1996). "tannin interactions with a full-length human salivary proline-rich protein display a stronger affinity than with single proline-rich repeats." febs letters 382(3): 289-292.
- Charlton, a. J., e. Haslam, et al. (2002). "multiple conformations of the proline-rich protein/epigallocatechin gallate complex determined by time-averaged nuclear overhauser effects." journal of the american chemical society 124(33): 9899-9905.
- Chen, y. H., j. T. Yang, et al. (1972). "determination of secondary structures of proteins by circular-dichroism and optical rotatory dispersion." biochemistry 11(22): 4120-&.
- Clifford, m. N. (1986). "coffee bean dicaffeoylquinic acids." phytochemistry 25(7): 1767-1769.
- Cohen, y., l. Avram, et al. (2005). "diffusion nmr spectroscopy in supramolecular and combinatorial chemistry: an old parameter - new insights." angewandte chemie-international edition 44(4): 520-554.
- Darden, t., d. York, et al. (1993). "particle mesh ewald - an n.log(n) method for ewald sums in large systems." journal of chemical physics 98(12): 10089-10092.
- De freitas, v., e. Carvalho, et al. (2003). "study of carbohydrate influence on protein-tannin aggregation by nephelometry." food chemistry 81(4): 503-509.

- De Freitas, v. And n. Mateus (2001). "structural features of procyanidin interactions with salivary proteins." journal of agricultural and food chemistry 49(2): 940-945.
- De Freitas, v. And n. Mateus (2002). "nephelometric study of salivary protein-tannin aggregates." journal of the science of food and agriculture 82(1): 113-119.
- De Freitas, v. A. P., y. Glories, et al. (2000). "developmental changes of procyanidins in grapes of red vitis vinifera varieties and their composition in respective wines." american journal of enology and viticulture 51(4): 397-403.
- Douat-casassus, c., s. Chassaing, et al. (2009). "specific or nonspecific protein-polyphenol interactions? Discrimination in real time by surface plasmon resonance." chembiochem 10(14): 2321-2324.
- Duluard, s., j. Grondin, et al. (2008). "lithium solvation and diffusion in the 1-butyl-3-methylimidazolium bis(trifluoromethanesulfonyl)imide ionic liquid." journal of raman spectroscopy 39(5): 627-632.
- Emsley, l. And g. Bodenhausen (1990). "gaussian pulse cascades: new analytical functions for rectangular selective inversion and in-phase excitation in nmr." chem. Phys. Lett. 165: 469-476.
- Escribanobailon, m. T., m. T. Guerra, et al. (1995). "proanthocyanidins in skins from different grape varieties." zeitschrift fur lebensmittel-untersuchung und-forschung 200(3): 221-224.
- Fabre, s. (2009). Université bordeaux 1.
- Fabre, s., n. Pinaud, et al. "colloidal behavior of wine galloylated tannins." comptes rendus chimie 13(5): 561-565.
- Foo, l. Y. And l. J. Porter (1980). "the phytochemistry of proanthocyanidin polymers." phytochemistry 19(8): 1747-1754.
- Foo, l. Y. And l. J. Porter (1983). "synthesis and conformation of procyanidin diastereoisomers." journal of the chemical society-perkin transactions 1(7): 1535-1543.
- Forsén, s. And r. A. Hoffman (1963). "study of moderately rapid chemical exchange reactions by means of nuclear magnetic double resonance." j chem phys. 39: 2892-2901.
- Fox, d. G., p. D. Cary, et al. (1999). "conformational studies of the c-terminal domain of bacteriophage pf1 gene 5 protein." biochimica et biophysica acta-protein structure and molecular enzymology 1435(1-2): 138-146.
- Fox, p. C. (1985). "simplified biopsy technique for labial minor salivary-glands." plastic and reconstructive surgery 75(4): 592-593.
- Frazier, r. A., e. R. Deaville, et al. (2010). "interactions of tea tannins and condensed tannins with proteins." journal of pharmaceutical and biomedical analysis 51(2): 490-495.
- Frazier, r. A., a. Papadopoulou, et al. (2003). "probing protein-tannin interactions by isothermal titration microcalorimetry." journal of agricultural and food chemistry 51(18): 5189-5195.
- Gawel, r. (1998). "red wine astringency : a review." austral.j. Grape wine res. 4: 74-95.

- Gawel, r., p. G. Iland, et al. (2001). "characterizing the astringency of red wine: a case study." food quality and preference 12(1): 83-94.
- Gho, f., a. Pena-neira, et al. (2007). "induction of salivary polypeptides associated with parotid hypertrophy by gallotannins administered topically into mouse mouth." journal of cellular biochemistry 100(2): 487-498.
- Gibbs, s. J. And c. S. Johnson (1991). "a pfg nmr experiment for accurate diffusion and flow studies in the presence of eddy currents." journal of magnetic resonance 93(2): 395-402.
- Green, b. G. (1993). "oral astringency - a tactile component of flavor." acta psychologica 84(1): 119-125.
- Guo, t., p. A. Rudnick, et al. (2006). "characterization of the human salivary proteome by capillary isoelectric focusing/nanoreversed-phase liquid chromatography coupled with esi-tandem ms." journal of proteome research 5(6): 1469-1478.
- Hagerman, a. E. And l. G. Butler (1980). "determination of protein in tannin-protein precipitates." journal of agricultural and food chemistry 28(5): 944-947.
- Hagerman, a. E. And l. G. Butler (1981). "the specificity of proanthocyanidin-protein interactions." journal of biological chemistry 256(9): 4494-4497.
- Hagerman, a. E., m. E. Rice, et al. (1998). "mechanisms of protein precipitation for two tannins, pentagalloyl glucose and epicatechin(16) (4 -> 8) catechin (procyanidin)." journal of agricultural and food chemistry 46(7): 2590-2595.
- Haslam, e. (1980). "invino veritas - oligomeric procyanidins and the aging of red wines." phytochemistry 19(12): 2577-2582.
- Haslam, e. (1988). "plant polyphenols (syn vegetable tannins) and chemical defense - a reappraisal." journal of chemical ecology 14(10): 1789-1805.
- Haslam, e. (1996). "natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action." journal of natural products 59(2): 205-215.
- Haslam, e., t. H. Lilley, et al. (1989). "traditional herbal medicines - the role of polyphenols." planta medica(1): 1-8.
- Hatano, t. And r. W. Hemingway (1997). "conformational isomerism of phenolic procyanidins: preferred conformations in organic solvents and water." journal of the chemical society-perkin transactions 2(5): 1035-1043.
- Hatton, m. N., r. E. Loomis, et al. (1985). "masticatory lubrication - the role of carbohydrate in the lubricating property of a salivary glycoprotein albumin complex." biochemical journal 230(3): 817-820.
- Hay, d. I., e. C. Moreno, et al. (1979). "phosphoprotein-inhibitors of calcium-phosphate precipitation from salivary secretions." inorganic perspectives in biology and medicine 2(4): 271-285.
- He, f., q. H. Pan, et al. (2008). "chemical synthesis of proanthocyanidins in vitro and their reactions in aging wines." molecules 13(12): 3007-3032.
- He, q., b. Shi, et al. (2006). "interactions of gallotannins with proteins, amino acids, phospholipids and sugars." food chemistry 95(2): 250-254.

- Hemingway r.w., I. P. E., branham s.j. (1992). "plant polyphenols: synthesis, properties, significance." basic life science 59: 487-499.
- Herfurth, I., t. Weimar, et al. (2000). "application of 3d-tocsy-trnoesy for the assignment of bioactive ligands from mixtures this work was supported from the bmbf (fkz 031161) and from the german research council (dfg, sonderforschungsbereich 470, teilprojekt b3). We thank the fonds der chemischen industrie for generous support. We also thank dr. T. Keller and dr. G. Wolff (bruker analytik gmbh, germany) for excellent support. Dr. Yasmin karimi-nejad (solvay pharmaceuticals, netherlands) is thanked for helpful discussions." angew chem int ed engl 39(12): 2097-2099.
- Humphrey, s. P. And r. T. Williamson (2001). "a review of saliva: normal composition, flow, and function." journal of prosthetic dentistry 85(2): 162-169.
- Ikeda, k. (2002). "new seasonings." chemical senses 27(9): 847-849.
- Jean-francois, f., b. Desbat, et al. (2009). "selectivity of cateslytin for fungi: the role of acidic lipid-ergosterol membrane fluidity in antimicrobial action." faseb journal 23(11): 3692-3701.
- Jobstl, e., j. R. Howse, et al. (2006). "noncovalent cross-linking of casein by epigallocatechin gallate characterized by single molecule force microscopy." journal of agricultural and food chemistry 54(12): 4077-4081.
- Jobstl, e., j. O'connell, et al. (2004). "molecular model for astringency produced by polyphenol/protein interactions." biomacromolecules 5(3): 942-949.
- Johnson, c. S. (1999). "diffusion ordered nuclear magnetic resonance spectroscopy: principles and applications." progress in nuclear magnetic resonance spectroscopy 34(3-4): 203-256.
- Johnson, w. C. (1990). "protein secondary structure and circular-dichroism - a practical guide." proteins-structure function and genetics 7(3): 205-214.
- Kallithraka, s., j. Bakker, et al. (1997). "evaluation of bitterness and astringency of (+)-catechin and (-)-epicatechin in red wine and in model solution." journal of sensory studies 12(1): 25-37.
- Kallithraka, s., j. Bakker, et al. (1998). "evidence that salivary proteins are involved in astringency." journal of sensory studies 13(1): 29-43.
- Kallithraka, s., j. Bakker, et al. (2001). "interaction of (+)-catechin, (-)-epicatechin, procyanidin b2 and procyanidin c1 with pooled human saliva in vitro." journal of the science of food and agriculture 81(2): 261-268.
- Kawamoto, h., f. Nakatsubo, et al. (1996). "stoichiometric studies of tannin-protein co-precipitation." phytochemistry 41(5): 1427-1431.
- Khan, m. L., e. Haslam, et al. (1997). "structure and conformation of the procyanidin b-2 dimer." magnetic resonance in chemistry 35(12): 854-858.
- Kozikowski, a. P., w. Tuckmantel, et al. (2001). "studies in polyphenol chemistry and bioactivity. 3.(1,2) stereocontrolled synthesis of epicatechin-4alpha,8-epicatechin, an unnatural isomer of the b-type procyanidins." j org chem 66(4): 1287-96.

- Laguerre, m., saux, m., dubost, j.-p., and carpy, a. (1997). "mlpp : a program for the calculation of molecular lipophilicity in proteins." pharmaceutical sciences 3(5-6): 217-222.
- Lea, a. G. H. (1992). Plant polyphenols : synthesis, properties, significance.
- Lee, c. B. And h. T. Lawless (1991). "time-course of astringent sensations." chemical senses 16(3): 225-238.
- Lesolleu, h., m. Laguerre, et al. (1997). "a pharmacophore for high affinity paf antagonists .2. Hydrophobicity study using the molecular lipophilicity potential." journal of lipid mediators and cell signalling 16(2): 75-113.
- Lindemann, b., y. Ogiwara, et al. (2002). "the discovery of umami." chemical senses 27(9): 843-844.
- Lu, y. And a. Bennick (1998). "interaction of tannin with human salivary proline-rich proteins." archives of oral biology 43(9): 717-728.
- Luck, g., h. Liao, et al. (1994). "polyphenols, astringency and proline-rich proteins." phytochemistry 37(2): 357-371.
- Lyons, k. M., e. A. Azen, et al. (1988). "many protein products from a few loci - assignment of human salivary proline-rich proteins to specific loci." genetics 120(1): 255-265.
- Lyons, k. M., j. H. Stein, et al. (1988). "length polymorphisms in human proline-rich protein genes generated by intragenic unequal crossing over." genetics 120(1): 267-278.
- Macarthur, m. W. And j. M. Thornton (1991). "influence of proline residues on protein conformation." journal of molecular biology 218(2): 397-412.
- Mandel, i. D. (1987). "the functions of saliva." journal of dental research 66: 623-627.
- Marion, d., m. Ikura, et al. (1989). "rapid recording of 2d nmr-spectra without phase cycling - application to the study of hydrogen-exchange in proteins." journal of magnetic resonance 85(2): 393-399.
- Marion, d. And k. Wuthrich (1983). "application of phase sensitive two-dimensional correlated spectroscopy (cosy) for measurements of h-1-h-1 spin-spin coupling-constants in proteins." biochemical and biophysical research communications 113(3): 967-974.
- Mayer, m. And b. Meyer (1999). Angew. Chem., int. Ed. Engl. 38: 1784-1788.
- Mayer, m. And b. Meyer (1999). "characterization of ligand binding by saturation transfer difference nmr spectroscopy." angewandte chemie-international edition 38(12): 1784-1788.
- Mayer, m. And b. Meyer (2001). "group epitope mapping by saturation transfer difference nmr to identify segments of a ligand in direct contact with a protein receptor." journal of the american chemical society 123(25): 6108-6117.
- Mcarthur, c., g. D. Sanson, et al. (1995). "salivary proline-rich proteins in mammals - roles in oral homeostasis and counteracting dietary tannin." journal of chemical ecology 21(6): 663-691.
- Mcmanus, j. P., k. G. Davis, et al. (1981). "the association of proteins with polyphenols." journal of the chemical society-chemical communications(7): 309-311.

- Mehansho, h., I. G. Butler, et al. (1987). "dietary tannins and salivary proline-rich proteins - interactions, induction, and defense-mechanisms." annual review of nutrition 7: 423-440.
- Mehansho, h., a. Hagerman, et al. (1983). "modulation of proline-rich protein-biosynthesis in rat parotid-glands by sorghums with high tannin levels." proceedings of the national academy of sciences of the united states of america-biological sciences 80(13): 3948-3952.
- Meiller, t. F., b. Hube, et al. (2009). "a novel immune evasion strategy of candida albicans: proteolytic cleavage of a salivary antimicrobial peptide." plos one 4(4): 9.
- Merrifield, r. B. (1963). "solid phase peptide synthesis .1. Synthesis of a tetrapeptide." journal of the american chemical society 85(14): 2149-&.
- Meyer, b. And t. Peters (2003). "nmr spectroscopy techniques for screening and identifying ligand binding to protein receptors." angewandte chemie-international edition 42(8): 864-890.
- Moreno, e. C., k. Varughese, et al. (1979). "effect of human salivary proteins on the precipitation kinetics of calcium-phosphate." calcified tissue international 28(1): 7-16.
- Morris, k. F. And c. S. Johnson (1993). "resolution of discrete and continuous molecular-size distributions by means of diffusion-ordered 2d nmr-spectroscopy." journal of the american chemical society 115(10): 4291-4299.
- Murray, n. J. And m. P. Williamson (1994). "conformational study of a salivary proline-rich protein repeat sequence." europaean journal of biochemistry 219(3): 915-921.
- Murray, n. J., m. P. Williamson, et al. (1994). "study of the interaction between salivary proline-rich proteins and a polyphenol by 1h-nmr spectroscopy." europaean journal of biochemistry 219(3): 923-935.
- Naganagowda, g. A., t. L. Gururaja, et al. (1998). "delineation of conformational preferences in human salivary statherin by h-1, p-31 nmr and cd studies: sequential assignment and structure-function correlations." journal of biomolecular structure & dynamics 16(1): 91-107.
- Nagayama, k., a. Kumar, et al. (1980). "experimental-techniques of two-dimensional correlated spectroscopy." journal of magnetic resonance 40(2): 321-334.
- Naurato, n., p. Wong, et al. (1999). "interaction of tannin with human salivary histatins." journal of agricultural and food chemistry 47(6): 2229-2234.
- Neyraud, e., t. Sayd, et al. (2006). "proteomic analysis of human whole and parotid salivas following stimulation by different tastes." journal of proteome research 5(9): 2474-2480.
- Noble, a. C. (2002). Astringency and bitterness of flavonoid phenols. Chemistry of taste: mechanisms, behaviors, and mimics. P. Given and d. Paredes. Washington, amer chemical soc. 825: 192-201.
- Nonier, m. F., i. Pianet, et al. (2006). "condensation products derived from flavan-3-ol oak wood aldehydes reaction - 1. Structural investigation." analytica chimica acta 563(1-2): 76-83.
- Oh, h. I., j. E. Hoff, et al. (1980). "hydrophobic interaction in tannin-protein complexes." journal of agricultural and food chemistry 28(2): 394-398.

- Ornelas, c., e. Boisselier, et al. (2007). "new water-soluble polyanionic dendrimers and binding to acetylcholine in water by means of contact ion-pairing interactions." chemical communications(47): 5093-5095.
- Papadopoulou, a. And r. A. Frazier (2004). "characterization of protein-polyphenol interactions." trends in food science & technology 15(3-4): 186-190.
- Pascal, c., f. Pate, et al. (2009). "study of the interactions between a proline-rich protein and a flavan-3-ol by nmr: residual structures in the natively unfolded protein provides anchorage points for the ligands." biopolymers 91(9): 745-756.
- Pascal, c., c. Poncet-legrand, et al. (2007). "interactions between a non glycosylated human proline-rich protein and flavan-3-ols are affected by protein concentration and polyphenol/protein ratio." journal of agricultural and food chemistry 55(12): 4895-4901.
- Peleg, h., k. Gacon, et al. (1999). "bitterness and astringency of flavan-3-ol monomers, dimers and trimers." journal of the science of food and agriculture 79(8): 1123-1128.
- Peng, j. W., c. A. Schiffer, et al. (1996). "investigations of peptide hydration using nmr and molecular dynamics simulations: a study of effects of water on the conformation and dynamics of antamanide." journal of biomolecular nmr 8(4): 453-476.
- Persikov, a. V., j. A. M. Ramshaw, et al. (2000). "amino acid propensities for the collagen triple-helix." biochemistry 39(48): 14960-14967.
- Pianet, i., y. Andre, et al. (2008). "modeling procyanidin self-association processes and understanding their micellar organization: a study by diffusion nmr and molecular mechanics." langmuir 24(19): 11027-11035.
- Piotto, m., v. Saudek, et al. (1992). "gradient-tailored excitation for single-quantum nmr-spectroscopy of aqueous-solutions." journal of biomolecular nmr 2(6): 661-665.
- Plet, b. (2007). "la spectrometrie de masse dans l'etude de l'interaction entre proteines de la salive humaine et polyphenols. Vers une approche analytique de l'astringence du vin." universite bordeaux 1: 1-218.
- Pourcel, l., j. M. Routaboul, et al. (2007). "flavonoid oxidation in plants: from biochemical properties to physiological functions." trends in plant science 12(1): 29-36.
- Prieur, c., j. Rigaud, et al. (1994). "oligomeric and polymeric procyanidins from grape seeds." phytochemistry 36(3): 781-784.
- Provencher, s. W. And j. Glockner (1981). "estimation of globular protein secondary structure from circular-dichroism." biochemistry 20(1): 33-37.
- Rabanal, f., m. D. Ludevid, et al. (1993). "cd of proline-rich polypeptides - application to the study of the repetitive domain of maize glutelin-2." biopolymers 33(7): 1019-1028.
- Raj, p. A., m. Edgerton, et al. (1990). "salivary histatin-5 - dependence of sequence, chain-length, and helical conformation for candidacidal activity." journal of biological chemistry 265(7): 3898-3905.
- Raj, p. A., e. Marcus, et al. (1998). "structure of human salivary histatin 5 in aqueous and nonaqueous solutions." biopolymers 45(1): 51-67.

- Ribereau-gayon, p. (2002). "untitled." journal international des sciences de la vigne et du vin 36(1): 1.
- Saito, a., n. Nakajima, et al. (2003). "synthetic studies of proanthocyanidins. Part 4. The synthesis of procyanidin b1 and b4: tmsotf-catalyzed cyclization of catechin and epicatechin condensation." heterocycles 61: 287-+.
- Sarni-manchado, p. And v. Cheynier (2002). "study of non-covalent complexation between catechin derivatives and peptides by electrospray ionization mass spectrometry." journal of mass spectrometry 37(6): 609-616.
- Sarni-manchado, p., v. Cheynier, et al. (1999). "interactions of grape seed tannins with salivary proteins." journal of agricultural and food chemistry 47(1): 42-47.
- Saxena, v. P. And wetlaufe.db (1971). "new basis for interpreting circular dichroic spectra of proteins." proceedings of the national academy of sciences of the united states of america 68(5): 969-&.
- Scarano, e., a. Fiorita, et al. (2010). "proteomics of saliva: personal experience." acta otorhinolaryngologica italica 30(3): 125-130.
- Scherer, s. E., d. M. Muzny, et al. (2006). "the finished dna sequence of human chromosome 12." nature 440(7082): 346-351.
- Schwarz, b. And t. Hofmann (2008). "is there a direct relationship between oral astringency and human salivary protein binding?" European food research and technology 227(6): 1693-1698.
- Shibata, a., m. Yamamoto, et al. (1992). "biphasic effects of alcohols on the phase-transition of poly(l-lysine) between alpha-helix and beta-sheet conformations." biochemistry 31(25): 5728-5733.
- Simon, c. (2003). "structure et dynamique de proteines de la salive humaine en interaction avec les tanins du vin de bordeaux." universite bordeaux 1: 1-218.
- Simon, c., k. Barathieu, et al. (2003). "three-dimensional structure and dynamics of wine tannin-saliva protein complexes. A multitechnique approach." biochemistry 42(35): 10385-10395.
- Simon, c., i. Pianet, et al. (2003). "synthesis and circular dichroism study of the human salivary proline-rich protein ib7." journal of peptide science 9(2): 125-131.
- Souquet, j. M., v. Cheynier, et al. (1996). "polymeric proanthocyanidins from grape skins." phytochemistry 43(2): 509-512.
- Spencer, c. M., y. Cai, et al. (1988). "polyphenol complexation - some thoughts and observations." phytochemistry 27(8): 2397-2409.
- Sreerama, n. And r. W. Woody (1993). "a self-consistent method for the analysis of protein secondary structure from circular-dichroism." biophysical journal 64(2): a170-a170.
- Stejskal, e. O. And j. E. Tanner (1965). "spin diffusion measurements - spin echoes in presence of a time-dependent field gradient." journal of chemical physics 42(1): 288-&.

- Sugiyama, k. And k. Ogata (1993). "high-performance liquid-chromatographic determination of histatins in human saliva." journal of chromatography-biomedical applications 619(2): 306-309.
- Taillandier, p., ed. (2005). Le vin :composition et transformations chimiques
- Tarascou, i., k. Barathieu, et al. (2006). "an improved synthesis of procyanidin dimers: regio- and stereocontrol of the interflavan bond." europaen journal of organic chemistry(23): 5367-5377.
- Tarascou, i., k. Barathieu, et al. (2006). "a 3d structural and conformational study of procyanidin dimers in water and hydro-alcoholic media as viewed by nmr and molecular modeling." magnetic resonance in chemistry 44(9): 868-880.
- Tarascou, i., m. A. Ducasse, et al. (2007). "structural and conformational analysis of two native procyanidin trimers." magnetic resonance in chemistry 45(2): 157-166.
- Tay, w. M., a. I. Hanafy, et al. (2009). "a plausible role of salivary copper in antimicrobial activity of histatin-5-metal binding and oxidative activity of its copper complex." bioorganic & medicinal chemistry letters 19(23): 6709-6712.
- Troxler, r. F., g. D. Offner, et al. (1990). "structural relationship between human salivary histatins." journal of dental research 69(1): 2-6.
- Uchida, h., j. Heystek, et al. (1971). "evidence for nonequivalent binding sites in human methemoglobin." journal of biological chemistry 246(7): 2031-&.
- Verlet, l. (1967). "computer experiments on classical fluids .i. Thermodynamical properties of lennard-jones molecules." physical review 159(1): 98-&.
- Vidal, s., l. Francis, et al. (2003). "the mouth-feel properties of grape and apple proanthocyanidins in a wine-like medium." journal of the science of food and agriculture 83(6): 564-573.
- Walz, a., k. Stuhler, et al. (2006). "proteome analysis of glandular parotid and submandibular-sublingual saliva in comparison to whole human saliva by two-dimensional gel electrophoresis." proteomics 6(5): 1631-1639.
- Weinges, k., kaltenha.w, et al. (1968). "knowledge of proanthocyanidines .10. Procyanidines from fruits." annalen der chemie-justus liebig 711(mar): 184-&.
- Williamson, m. P. (1994). "nuclear-magnetic-resonance studies of peptides and their interactions with receptors." biochemical society transactions 22(1): 140-144.
- Williamson, m. P. (1994). "the structure and function of proline-rich regions in proteins." biochemical journal 297: 249-260.
- Wroblewski, k., r. Muhandiram, et al. (2001). "the molecular interaction of human salivary histatins with polyphenolic compounds." europaen journal of biochemistry 268(16): 4384-4397.
- Wroblewski, k. C. And a. Bennick (2000). "the interaction of human salivary histatin5 with epigallocatechin gallate." journal of dental research 79: 2290.
- Wu, a. M., g. Csako, et al. (1994). "structure, biosynthesis, and function of salivary mucins." molecular and cellular biochemistry 137(1): 39-55.

- Wu, d. H., a. D. Chen, et al. (1995). "an improved diffusion-ordered spectroscopy experiment incorporating bipolar-gradient pulses." journal of magnetic resonance series a 115(2): 260-264.
- Wuthrich, k. (1989). "protein-structure determination in solution by nuclear magnetic-resonance spectroscopy." science 243(4887): 45-50.
- Xu, l., k. Lal, et al. (1993). "salivary proteolysis of histidine-rich polypeptides and the antifungal activity of peptide degradation products." archives of oral biology 38(4): 277-283.
- Yan, q. And a. Bennick (1995). "role of human salivary histidine-rich proteins in defense against tannins." journal of dental research 74: 85-85.
- Yan, q. Y. And a. Bennick (1995). "identification of histatins as tannin-binding proteins in human saliva." biochemical journal 311: 341-347.

ANNEXES

A. Synthétiseur de peptide



Figure A-1: synthétiseur ABI 433A Peptide Synthesizer de chez Applied Biosystems.

La synthèse peptidique a été effectuée sur un ABI 433A Peptide Synthesizer de chez Applied Biosystems (figure II)

Les résines, les acides aminés, la N-méthyl-2-pyrrolidinone (NMP), l'acide trifluoroacétique (TFA), le Triisopropylsilyl (TIPS), l'anhydride acétique, l'acétonitrile et la pipéridine proviennent de la société Sigma Aldrich ; le Dichlorométhane, la Diméthylformamide (DMF) et la N,N-diisopropylethylamine (DIEA) proviennent de la société SDS (peypin, France) ; l'Hydroxybenzotriazole (HOBt) et l'O-Benzotriazole-N,N,N',N'-tetramethyl-uronium-hexafluoro-phosphate (HBTU).

La N-Dicyclohexylcarbodiimide (DCC), le Méthanol (MeOH) proviennent de la société Applied Biosystems ; l'éther éthylique et l'acide acétique proviennent de la société Fischer et l'azote gaz provient de la société Air Liquide.

Les réactifs et tous les solvants sont délivrés par une surpression de 4,5 bars appliquée à toutes les bouteilles.

Les acides aminés peuvent être protégés sur leur fonction latérale en suivant le tableau suivant :

Acide aminé	Groupe protecteur	Fonction protégée
Alanine Ala (A)	-	
Arginine Arg (R)	Pbf	Guanidino N
Asparagine Asn (N)	Trt	Amide
Acide aspartique Asp (D)	OtBu	Carboxyl
Cystéine Cys (C)	Trt	Sulfhydryl
Glutamine Gln (Q)	Trt	Amide
Acide glutamique Glu (E)	OtBu	Carboxyl
Glycine Gly (G)	-	
Histidine His (H)	Trt	Imidazole
Isoleucine Ile (I)	-	
Leucine Leu (L)	-	
Lysine Lys (K)	Boc	Amino
Méthionine Met (M)	-	
Phénylalanine Phe (F)	-	
Proline Pro (P)	-	
Sérine Ser (S)	tBu	Hydroxyl
Thréonine Thr (T)	tBu	Hydroxyl
Tryptophane Trp (W)	Boc	Indole
Tyrosine Tyr (Y)	tBu	Phénol
Valine Val (V)	-	

Tableau A-1: groupements protecteurs des chaînes latérales des acides aminés lors d'une synthèse de type Fmoc. tBu : t-Butyl ; Pbf : 2,2,4,6,7-pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl ; Trt : Trityl ; Boc : t-butyloxycarbonyl

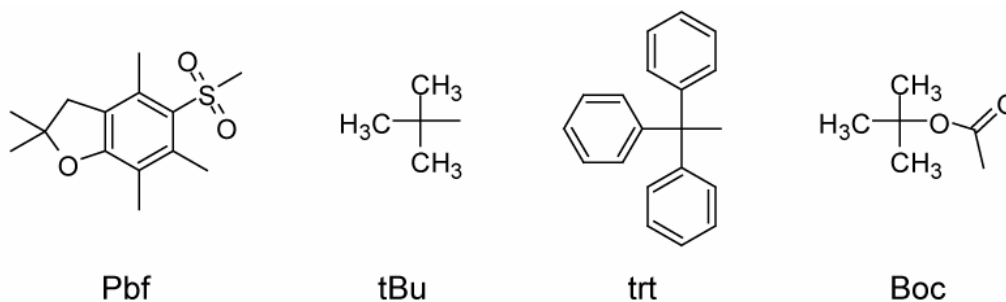


Figure A-2 : formule brute des groupements protecteurs.

Contenance des bouteilles pour une synthèse FastMoc à une échelle de 0,25 mmol :

Bouteille	Solvant et Réactif	Fonction
1	Pipéridine	Déprotection
2	-	-
4	Anhydride acétique 19ml Ac Anh 9ml DIEA 0,8g HOBT 400ml NMP	Capping
5	HBTU 37,93g HBTU 13,58g HOBT 200ml DMF	Activation
6	MeOH	Chargement
7	2M DIEA 69,85ml DIEA 130ml NMP	Couplage
8	1M DCC	Chargement
9	DCM	Lavage
10	NMP	Lavage

Tableau A-2 : représentant la position des bouteilles et de leur contenu ainsi que leur rôle.

La synthèse peptidique est réalisée en utilisant une chimie de type FastMoc, sur support solide. Les résines utilisées sont du type Fmoc-wang-resin. Les acides aminés sont protégés par un groupement Fmoc. Pour une synthèse à l'échelle 0,25 mmol, les cartouches d'acides aminés contiennent 1,0 mmol de chaque acide aminé et 0,25 mmol de résine pré-chargée avec l'acide aminé C-terminal est placée dans le réacteur.

Le synthétiseur fonctionne avec différent module représentant chacun une étape bien défini comme le montre le tableau suivant :

ANNEXES

Module	Fonction	Temps moyen (min)
A	Dissoudre l'acide aminé	7,6
B	Déprotection / Ω MonPrevPk	8,8
C	Lavage DCM	7,6
D	Lavage NMP	4,6
E	Ajout DIEA et Transfert	2,2
F	Couplage	22,2
G	Resin sample (resin non pré-chargée)	1,7
H	Chargement et couplage	54
total		108,7

Tableau A-3: représentant les différents modules du synthétiseur avec leur fonction et la durée moyenne de chaque module.

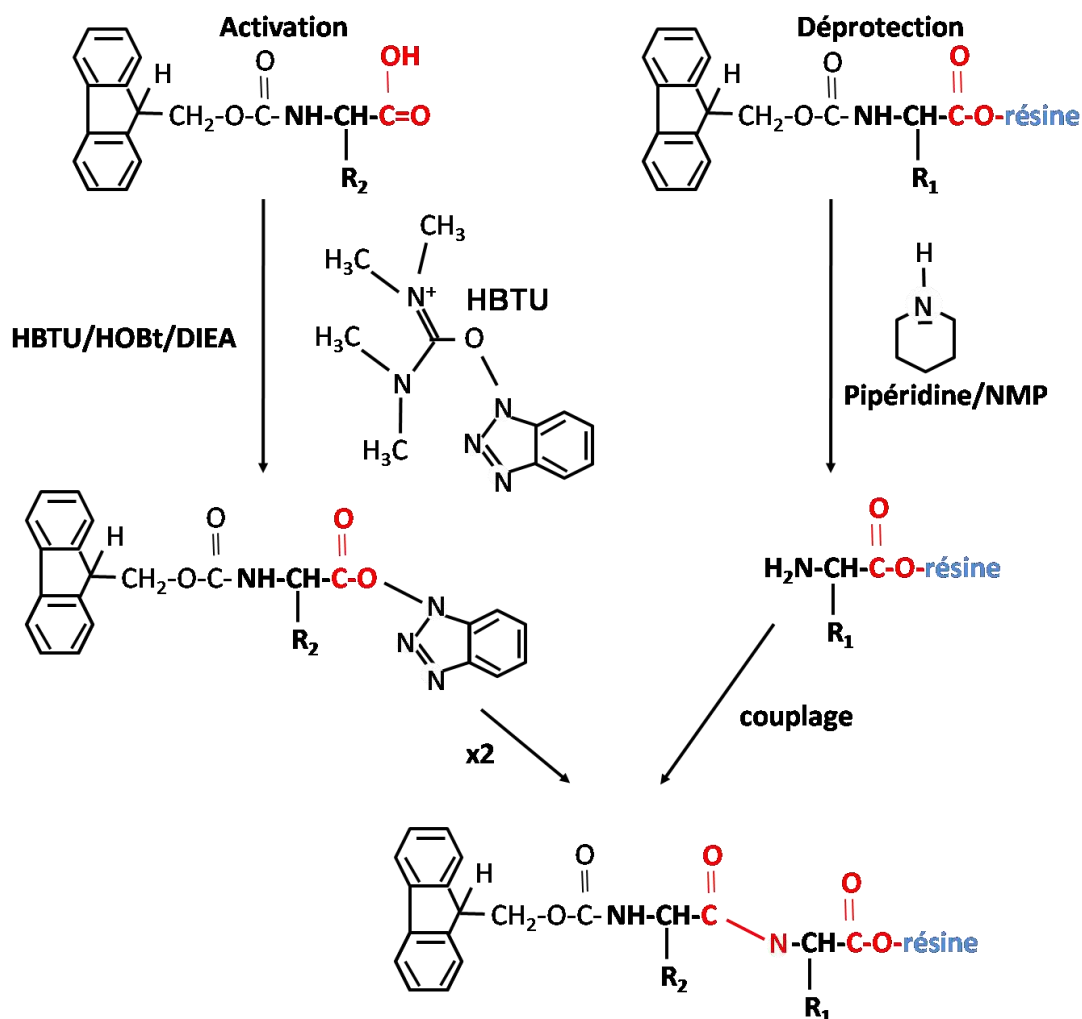


Figure A-3 : schéma général de synthèse peptidique sur support solide.

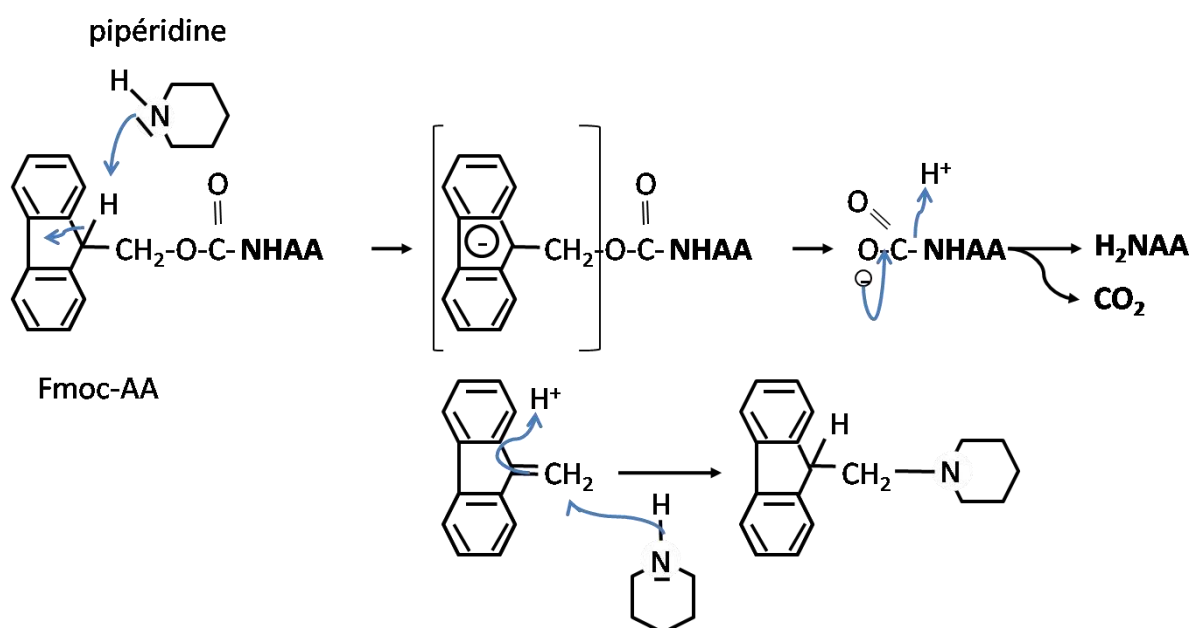


Figure A-4: schéma de la déprotection du groupement protecteur par la pipéridine lors d'une synthèse peptidique sur support solide.

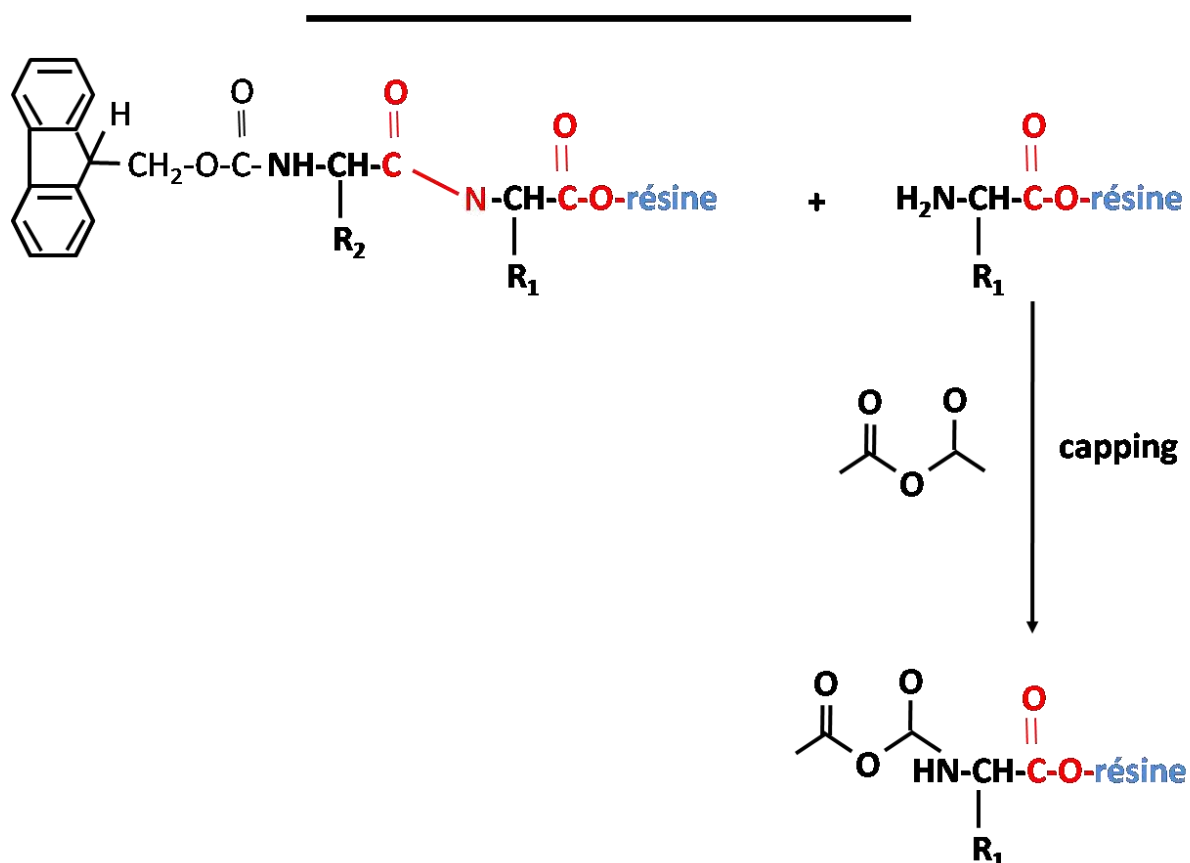
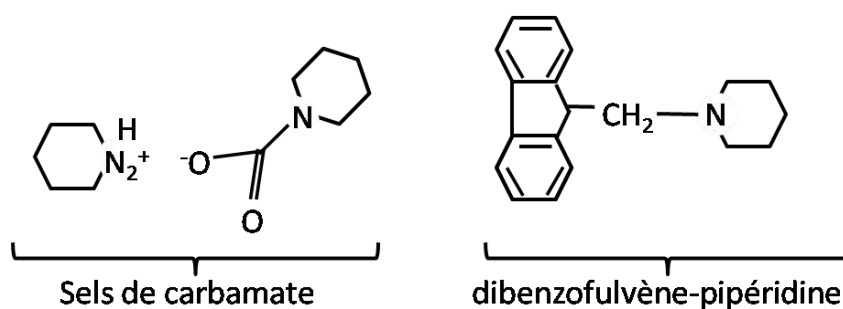


Figure A-5: schéma de l'étape de capping lors d'une synthèse peptidique sur support solide.

Après chaque étape de déprotection, une mesure de la conductivité est réalisée. Lors de la déprotection, la pipéridine libre peut réagir avec un dibenzofulvène pour donner du dibenzofulvène-pipéridine quantifiable en UV à 301 nm. Des sels de carbamate sont également produits et peuvent être suivis par conductimétrie.



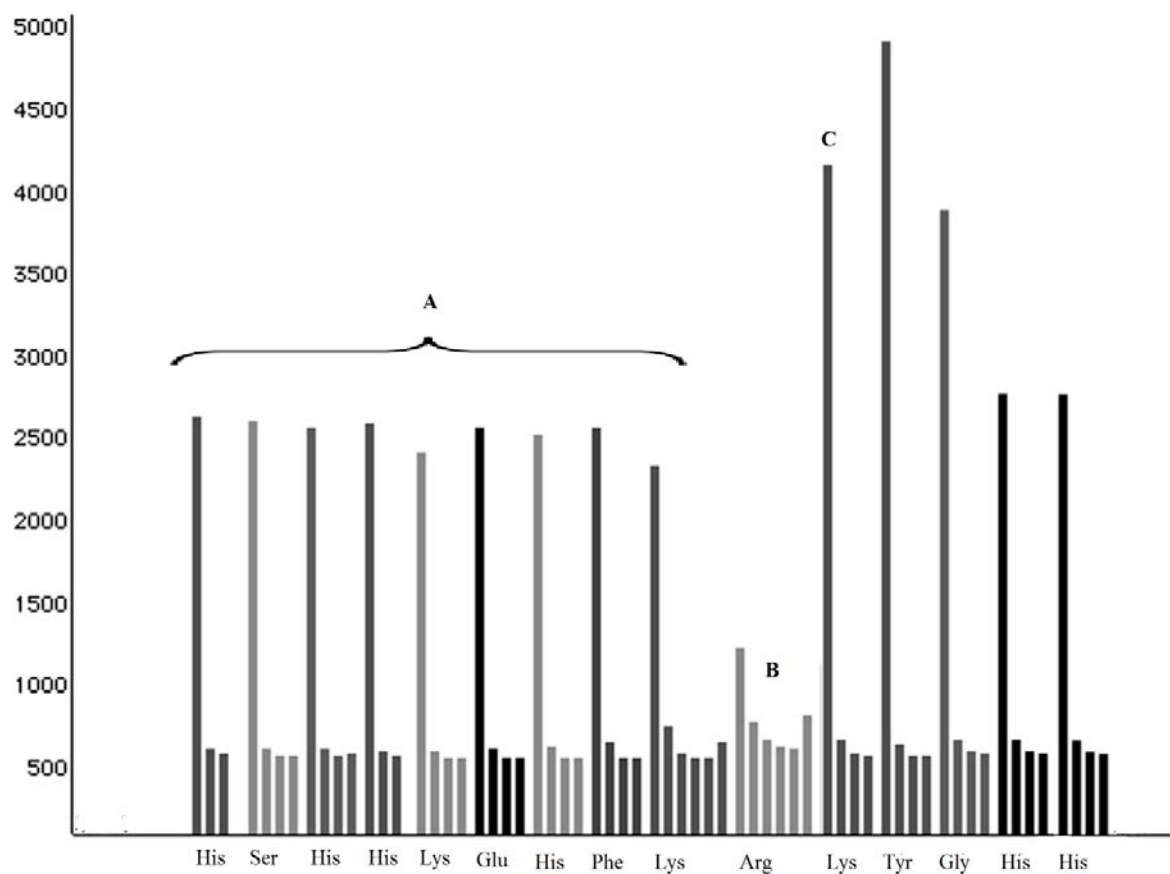


Figure A-6 : exemple de monitoring visible suivant différents aspects. A monitoring classique, B monitoring de la déprotection d'un résidu arginine, C monitoring suivant une difficulté de déprotection.

B. Spectrométrie de masse Maldi-Tof

La technique d'analyse MALDI a connu un essor considérable au cours de ces dernières années pour l'analyse de molécules complexes, de biopolymères et de polymères synthétiques. Son succès repose sur des déterminations précises de masses moléculaires, des études structurales avec une excellente sensibilité (une picomole, voire une concentration plutôt 1 pM) pour une gamme de masse très étendue (de 500 à >200000 Da).

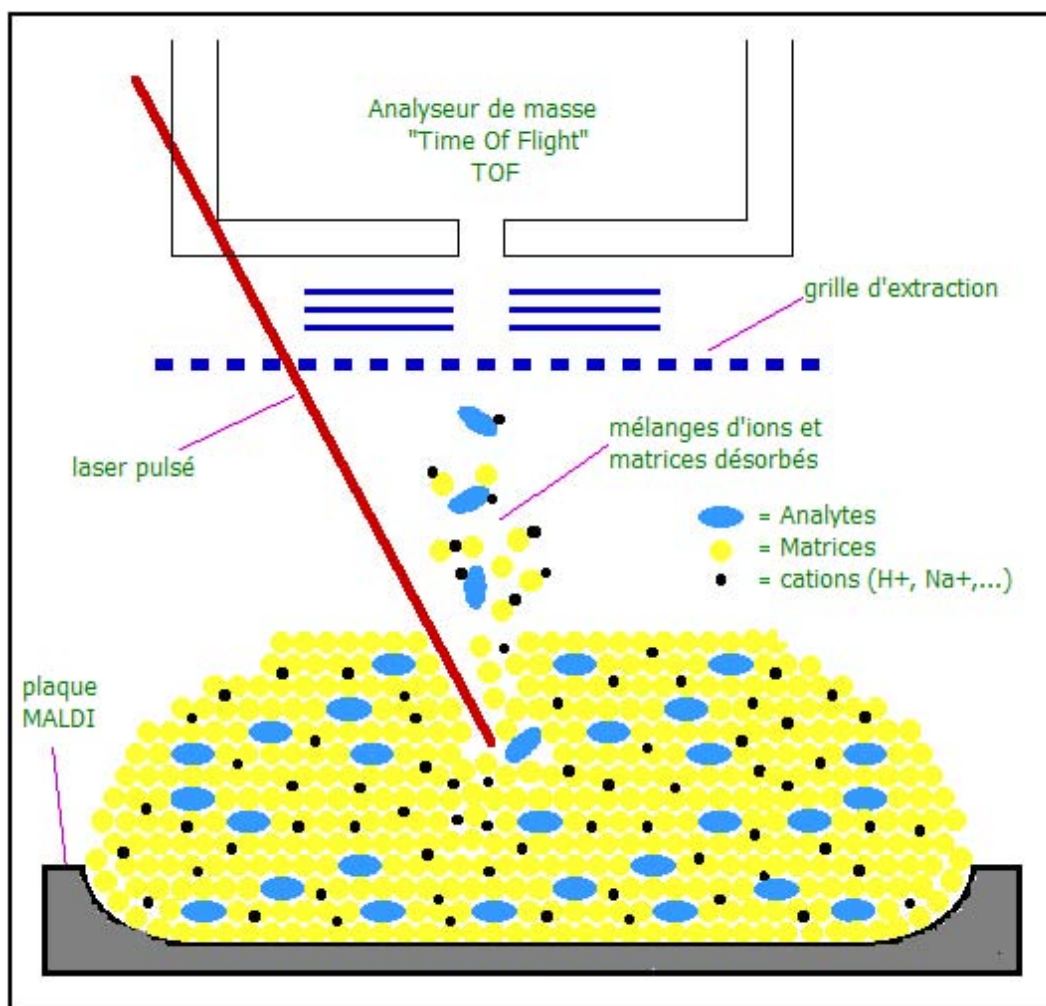


Figure A-7: schéma d'ionisation par Désorption Laser sur matrice (MALDI).

Le MALDI est basé sur l'utilisation d'un composé (la matrice) qui absorbe dans l'UV. L'échantillon à analyser est dilué environ 10.000 fois dans cette matrice. L'échantillon est introduit dans le spectromètre sous forme solide, après complète évaporation des solvants (il y a co-cristallisation de l'échantillon et de la matrice). Il n'y a donc pas de couplage direct possible avec la chromatographie. Le dépôt échantillon matrice est placé sous vide (10⁻⁷mbar), désorbé à l'aide d'un laser (UV) et ionisé.

Une différence de potentiel va permettre à l'échantillon ainsi vaporisé sous forme de plasma d'être accéléré puis de voyager dans l'analyseur pour atteindre le détecteur.

La source d'ions Maldi est principalement associée à un analyseur à temps de vol (TOF –Time Of Flight). Le temps mis pour atteindre le détecteur dépend du rapport masse/charge de l'ion analysé.

L'impulsion laser produit des clusters comprenant des molécules neutres de matrice (M), des ions de matrice $(M+H)^+$, $(M-H)^-$ et des molécules neutres d'échantillon (A).

Les molécules contenues dans l'échantillon sont ionisées par protonation (ou déprotonation) par la matrice photo-excitée (transfert d'énergie).

Un haut voltage est appliqué sur la plaque, accélérant ainsi les ions hors de la source vers l'analyseur.

On compte 1.000 à 10.000 molécules de matrice accélérée pour 1 molécule d'échantillon (? c'est ça que tu veux dire ?).

Trois matrices permettent de réaliser une grande partie des analyses :

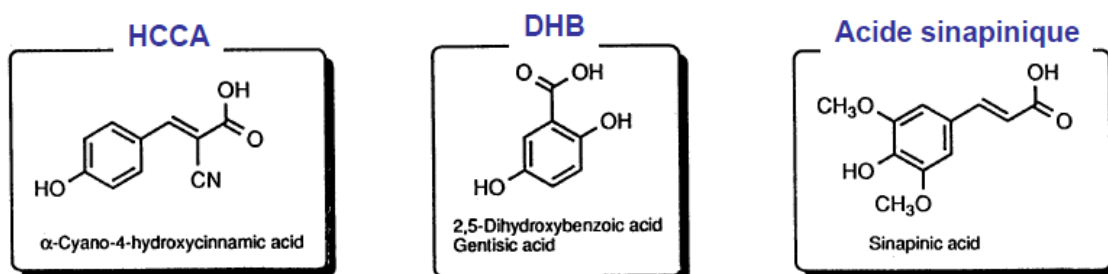


Figure A-8: formule développée des différentes type de matrice.

Ces matrices absorbent à 337 nm (un peu moins à 355 nm, surtout ac. Sinapinique), cristallisent facilement et sont solubles dans les solvants organiques.

Matrice	Type d'échantillon
α -cyano(HCCA) chaude	Peptides / Protéines / Glycoprotéines
Acide dihydroxybenzoïque(DHB) froide	Peptides glycosylés, phosphorylés, glycanes, Polymères polaires
Acide sinapinique(SA) chaude	Protéines de haut PM / Glycoprotéines / polymères polaires
HCCA + DHB	Peptides

Tableau A-4 : correspondance matrice – échantillon.

. Les ions expulsés de la source MALDI sont accélérés et parcourent une distance l dans le tube à temps de vol de l'analyseur en un temps t_m qui est fonction de leur rapport masse sur charge.



Figure A-9: cible maldi

Les masses moléculaires des ions sont alors facilement analysées par la relation :

$$m/z = 2V\Delta t_m^2/l^2 \quad (A.1)$$

où m et z sont la masse et la charge de l'ion, respectivement; V est le potentiel accélérateur; l représente la longueur du tube analyseur (je ne vois pas de l dans ta formule ?) et Δt_m est l'intervalle de temps entre l'impulsion laser et l'impact de l'ion sur le détecteur. L'équation ci-dessus montre que deux ions de masses différentes et de même charge auront des vitesses différentes. Ils auront donc des temps de vol différents dans l'analyseur, de telle sorte que l'ion le plus léger provoquera un impact sur le détecteur avant l'ion le plus lourd. Ainsi les protéines peuvent être triées de manière linéaire en fonction de leur masse.

Cette technique offre un grand nombre d'avantages pour l'étude de peptides et de protéines :

- Rapide, automatisable avec un haut débit d'analyses (plusieurs milliers d'analyses / j).
- Bonne résolution si associé à un TOF (> 10.000 pour peptides < 3000 Da).
- Très bonne sensibilité (quelques femtomoles).

C. Dichroïsme circulaire

Une molécule chirale possède des coefficients d'extinctions molaires différents pour une polarisation de la lumière circulaire gauche et pour une polarisation de la lumière circulaire droite, il en résulte une différence d'absorption, ΔA , entre les deux polarisations. En faisant varier la longueur d'onde λ du faisceau de lumière incident, on obtient un spectre de dichroïsme circulaire où

$$\Delta A = A_G - A_D. \quad (A.2)$$

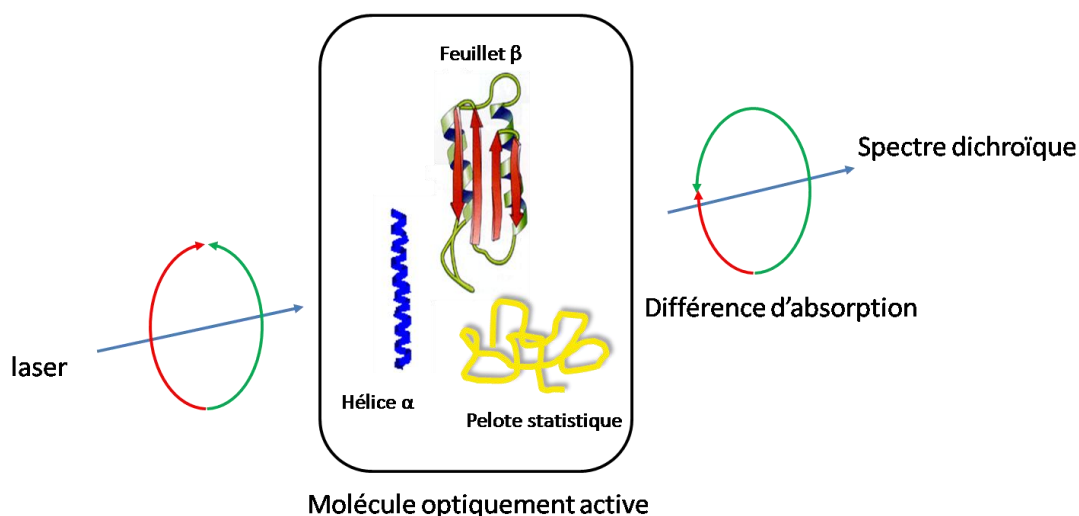


Figure A-10: principe du dichroïsme circulaire.

Cette grandeur dépend de la longueur d'onde et suit la loi de Beer-Lambert :

$$\Delta A = (\varepsilon_G - \varepsilon_D) \times c \times l. \quad (A.3)$$

Où $\varepsilon_{G(\theta)}$ et $\varepsilon_{D(\theta)}$ sont les coefficients d'extinctions molaires de la lumière polarisée gauche et droite, c la concentration molaire et l le trajet optique.

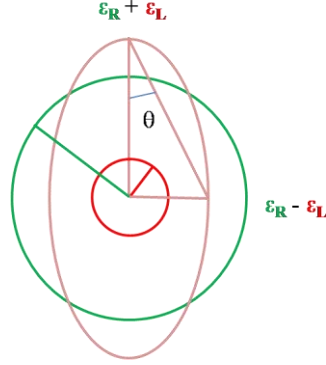


Figure A-11: lumière polarisée droite et gauche.

Toutefois, nous ne sommes capables de mesurer seulement l'ellipticité θ . Cet angle correspond à une certaine forme de polarisation de la lumière, pour une polarisation rectiligne, $\theta = 0^\circ$. Dans le cas d'une polarisation correspondant à un cercle parfait, $\theta = 45^\circ$. L'ellipticité mesurée est égale à :

$$\Delta \varepsilon = (\varepsilon_L - \varepsilon_R) \quad (A.4)$$

La différence entre ε_L et ε_R suit l'équation suivante :

$$\Delta \varepsilon = (\varepsilon_L - \varepsilon_R) = \frac{1}{lc} \times \log_{10} \times \left[\frac{I_R}{I_L} \right] \quad (A.5)$$

Afin de pouvoir comparer les spectres CD entre eux, on utilise, comme unité spectrale, l'ellipticité molaire par résidu, $[\theta]$. Cette unité, normalisée par rapport à la concentration et au nombre n de résidus, permet en effet de comparer facilement les spectres expérimentaux et s'exprime en $\text{deg} \cdot \text{dmol}^{-1} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{résidu}^{-1}$.

$$[\theta] = \frac{4500}{\pi \times l \times c} \times (\varepsilon_L - \varepsilon_R) \log_e 10 \log_{10} \left[\frac{I_R}{I_L} \right] \quad (A.6)$$

$$\Delta \varepsilon \propto \theta / c \cdot l ; [\theta] = 100 \times \theta / c \cdot l \quad (A.7)$$

$$[\theta] = \frac{100 \times \theta}{n \times l \times c} = \frac{\Delta \varepsilon \times 3300}{n} \quad (A.8)$$

Où n est le nombre de liaisons peptidiques

Pour calculer la proportion de chaque structure secondaire des spectre de références sont réalisés.

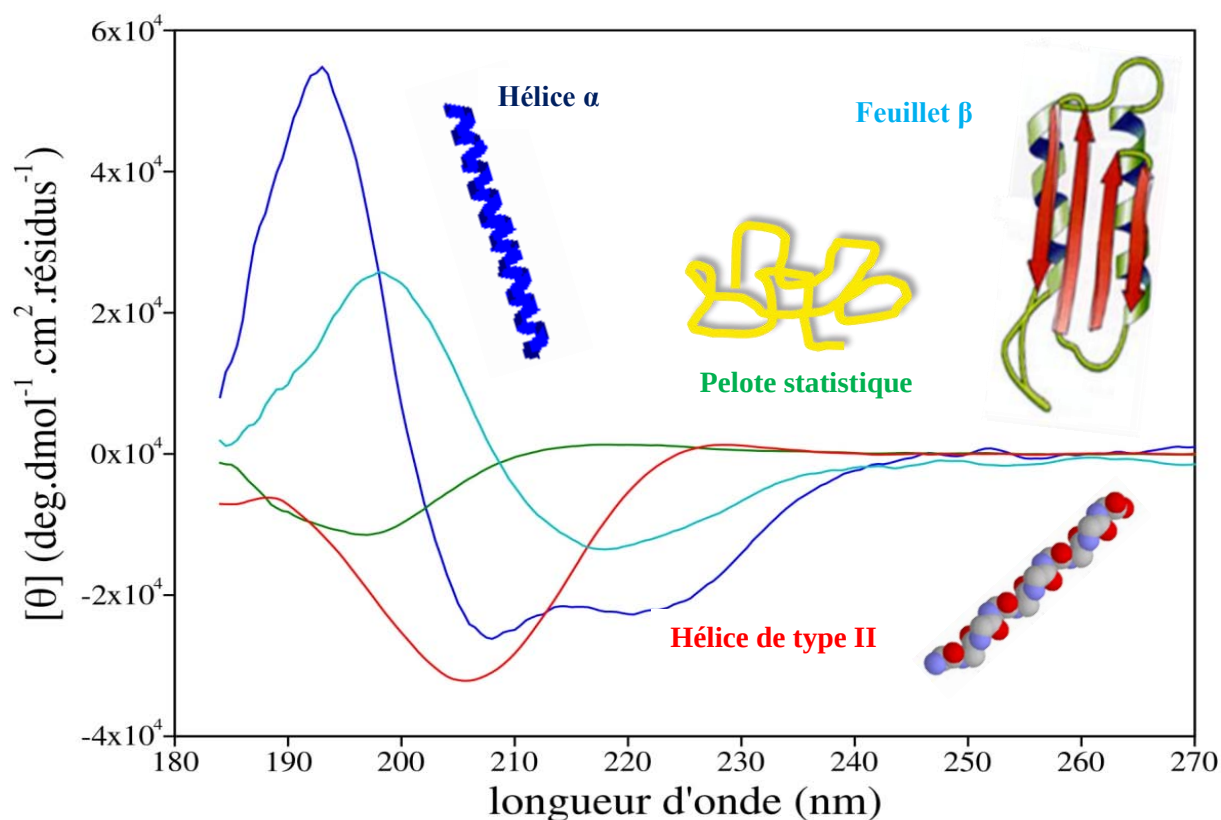


Figure A-6: Spectres dichroïques standards correspondant aux structures canoniques : hélice α (bleu), feuillet β (cyan), hélice de type II (rouge) et pelote statistique (vert).

Chaque motif structural possède un spectre dichroïque caractéristique. En effet, le spectre de l'hélice α possède trois points singuliers : une intensité maximale apparaît à 192 nm, puis la courbe observe deux minima à 208 et 220 nm. Le feuillet β donne un spectre avec moins d'amplitude que pour une hélice α avec un maximum d'absorption à 198 nm et un minimum à 217 nm. La structure en pelote statistique possède deux extrema comme le feuillet β mais de manière inversée, le maximum est observé à une longueur d'onde de 216 nm et le minimum est observé à une longueur d'onde de 196 nm. L'allure du spectre représentant l'hélice de type II possède un spectre dichroïque proche de celui de la pelote statistique avec un minimum d'absorption à 208 nm et un léger maximum à 222 nm dont l'intensité est proche de 0.

D. Modélisation moléculaire

La modélisation moléculaire représente l'étude des mouvements d'un système moléculaire, elle utilise des méthodes de calculs théoriques afin de définir au mieux un système moléculaire. Elle fait partie des études de modélisation regroupées souvent sous le terme de chimie numérique regroupant différentes méthodes telle que la mécanique quantique *ab initio* ou semi-empirique, la dynamique moléculaire ou encore la mécanique moléculaire.

- les méthodes *ab initio*, correspondent à la résolution des équations de la mécanique quantique. Ces méthodes sont les plus précises pour les grandeurs calculées mais nécessitent cependant une grande puissance de calcul pour résoudre les équations tel que l'équation de Schrödinger. Ces méthodes seront donc employées pour des systèmes relativement simples (quelques centaines d'atomes).
- pour des systèmes légèrement plus complexes, les méthodes semi-empiriques seront employées. Elles sont basées sur les grandeurs provenant de l'expérience et permettent de simplifier le calcul. Une façon de contourner cet inconvénient est d'introduire des paramètres empiriques dans les équations.
- pour les systèmes les plus complexes (typiquement > 1000 atomes), les méthodes quantiques sont rarement utilisées, la mécanique newtonienne est alors utilisée pour décrire le système étudié. Avec cette méthode, les coordonnées des atomes vont être modifiées pour obtenir la conformation de la molécule ayant l'état énergétique le plus bas.

Pour décrire les systèmes moléculaires, la dynamique moléculaire utilise l'équation de Newton, équation qui permet de calculer l'énergie du système. L'équation devient dans notre cas d'un système contenant N atomes :

$$\vec{M}_i = \frac{\partial^2 \vec{r}_i}{\partial t^2} = \vec{F}_i, i=1 \dots N \quad (\text{A.9})$$

Où $\vec{F}_i$ représentant les forces appliquées aux atomes sont les dérivées partielles des fonctions potentiel $V(r_1, r_2, \dots, r_N)$:

$$\vec{F}_i = - \frac{\partial V}{\partial \vec{r}_i} \quad (\text{A.10})$$

L'ensemble des constantes de force et coefficients d'interactions pour les forces s'exerçant est appelé champ de force. Le système est constitué d'un ensemble de « boules » représentant les atomes et de « ressorts » représentant les liaisons. Les interactions entre les atomes s'organisent suivant deux composantes : intramoléculaire et intermoléculaire correspondant respectivement aux interactions liantes (énergies de déformations des liaisons, des angles et des dièdres) et aux interactions non-liantes.

L'énergie potentielle peut être définie par l'équation qui suit :

$$E_{\text{potentielle}} = E_{\text{liaisons}} + E_{\text{angles}} + E_{\text{dièdres}} + E_{\text{non-liante}} \quad (\text{A.11})$$

a) Interactions liées

Les énergies des interactions liées sont représentées par la somme des potentiels utilisés entre les atomes liés par une ou plusieurs liaisons chimiques covalentes.

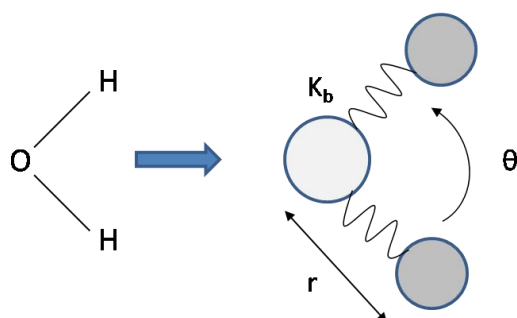


Figure A-73 : schéma des interactions liées.

Longueurs de liaisons standards :

$$r_0 = 1,53 \text{ \AA} \text{ (C}_{\text{sp}3}\text{-C}_{\text{sp}3}\text{)}$$

$$r_0 = 1,09 \text{ \AA} \text{ (C-H)}$$

Valeurs angulaires standards :

$$\theta_0 = 109,5^\circ \text{ (C}_{\text{sp}3}\text{)}$$

$$\theta_0 = 120^\circ \text{ (C}_{\text{sp}2}\text{)}$$

$$\theta_0 = 180^\circ \text{ (C}_{\text{sp}}\text{)}$$

- Elongation des liaisons :

$\sum_{\text{liaisons}} K_b (r - r_0)^2$ où r est la longueur de la liaison (en $\text{\AA}$) r_0 la valeur de la liaison à l'équilibre et K_b la constante de force (en $\text{Kcal.mol}^{-1}.\text{\AA}^{-1}$)

- Déformation de l'angle de valence :

$\sum_{\text{angles}} K_\theta (\theta - \theta_0)^2$ où θ est l'angle instantané (en $^\circ$), θ_0 la valeur de l'angle à l'équilibre et K_θ la constante de force associée (en Kcal.mol^{-1}).

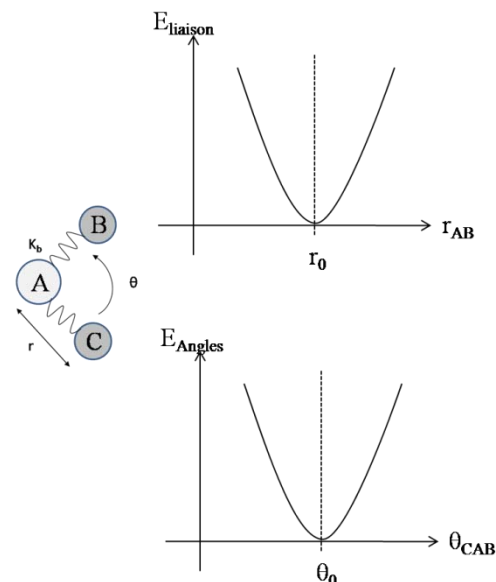


Figure A-14 : représentation des énergies potentielles des élongations de liaisons et de la déformation des angles de valence.

- **Déformation des dièdres :**

L'énergie potentielle correspondant à la déformation des angles dièdres ϕ correspond à trois liaisons entre quatre atomes consécutifs et donc correspond à l'angle de rotation autour de la liaison centrale.

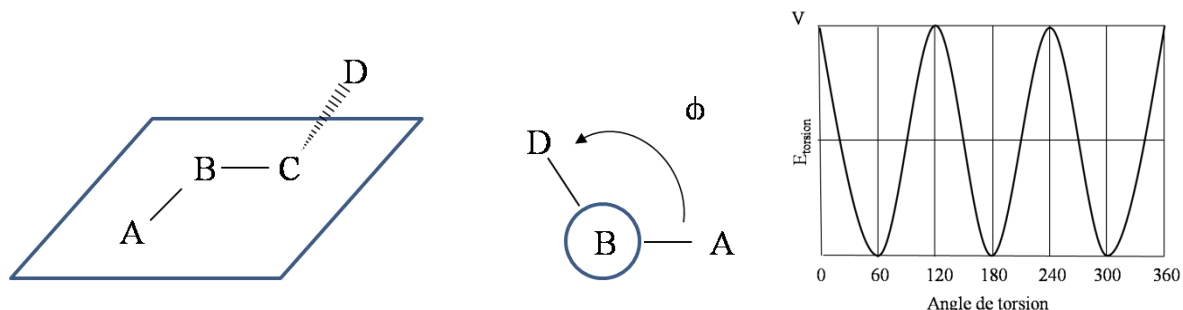


Figure A-15: représentation des énergies potentielles de la déformation des angles dièdres.

Défini par :

$$\sum_{\text{dièdres}} \sum_n V_n (1 + \cos(n\phi - \gamma)) \quad (\text{A.12})$$

où V_n est la valeur de la barrière de rotation d'ordre n (en Kcal.mol^{-1}), γ la phase (en°) et ϕ la valeur instantanée du dièdre (en°).

b) Interactions non-liées

Les interactions non-liantes concernent les atomes portés par des molécules distinctes de plus de trois liaisons covalentes. Ces interactions peuvent être divisées en deux composantes : les interactions de Lennard-Jones plus communément appelé interactions de Van Der Waals et les interactions électrostatiques.

- **Interaction de Van Der Waals**

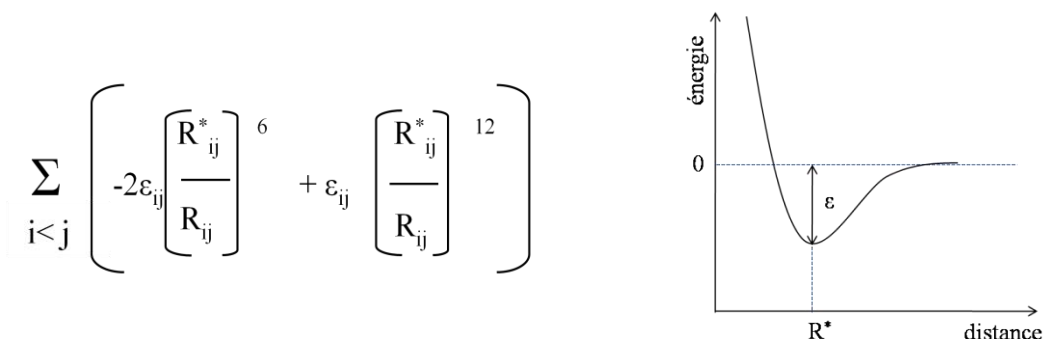


Figure A-16: représentation des énergies potentielles des interactions de Van Der Waals.

ϵ_{ij} et R_{ij}^* sont les paramètres de Lennard-Jones pour l'interaction entre les atomes i et j , ϵ_{ij} est la profondeur du puits énergétique de Van Der Waals avec une distance égale à R^* . Les termes en $-R_{ij}^6$

et R_{ij}^{12} sont respectivement les force de dispersion de London, force d'attraction et les force de répulsion de Pauli due à la superposition des orbitales électroniques.

- Interaction électrostatique

La force de l'interaction électrique entre deux particules chargées est définie par la loi de Coulomb et est exprimée par un potentiel inversement proportionnel à la distance des particules et proportionnel au produit des charges de chaque particule :

$$\sum_{i < j} q_i q_j / R_{ij} \quad (\text{A.13})$$

Où q_i et q_j sont les charges partielles des atomes i et j . Ces charges peuvent être ajustées de manière à reproduire le moment dipolaire de la molécule ou le potentiel électrostatique obtenu par les calculs de mécanique quantique ou *ab initio*.

c) Logiciel utilisé

Pour décrire le système étudié, les simulations ont été réalisées en utilisant comme champ de force GROMACS version 4.0 (**GRO**ningen **M**achine for **C**hemical **S**imulation) et the GROMOS96 utilisant les champs de forces GROMOS 96 (G43a1) ((Peng, Schiffer et al. 1996) et paramétré avec le serveur internet Dundee PRODRG2 version 2.5 (beta) ou en utilisant un autre logiciel, Desmond version 2.0 via l'interface Maestro version 8.5 avec le champ de force OPLS All Atoms 2005. Les simulations ont été faites dans un ensemble NVT permettant de contrôler l'ensemble des constantes (nombre d'atomes, volume, température), avec un cutoff de VdW, avec l'algorithme SHAKE avec les atomes d'hydrogène. Le cutoff est une distance de troncature qui permet de réduire le temps de calcul due à la multiplicité des termes pour les interactions non-liées. Le cutoff permet donc de définir une distance représentant un rayon dans lequel les interactions sont prises en comptes et de négliger les autres.

Un thermostat Noosé-Hoover a été utilisé, les interactions électrostatiques ont été traitées via la méthode PME (Particle Meshed Ewald) (Darden, York et al. 1993).

Pour construire le système d'étude les molécules sont randomisées dans une boîte d'eau SPC (Simple Point Charge) cubique ((Berendsen, Postma et al. 1984) dont les dimensions sont connues. Afin de limiter les effets de bords, il est commun d'utiliser des conditions périodiques aux limites PBC (Adams, Adams et al. 1979). La boîte est entourée par des répliques d'elle-même. Une molécule qui

sort de la boîte entre dans la même boîte par le côté opposé et ceci afin que le nombre de particules de la boîte soient toujours fixe.

d) Minimisation d'énergie

L'état le plus stable est représenté par la conformation qui a l'énergie potentielle la plus faible donc au niveau du minimum global. Cependant, il existe plusieurs puits de potentiel locaux et il n'existe pas de méthodes mathématiques pour déterminer. Pour cela, nous utilisons des méthodes numériques permettant de trouver le puits de potentiel global telles que la méthode des gradients par « steepest descent » (descente la plus rapide) qui permet de descendre rapidement vers un puits de potentiel local ou la méthode des gradients conjugués qui tiens compte des itérations précédentes pour les suivante.

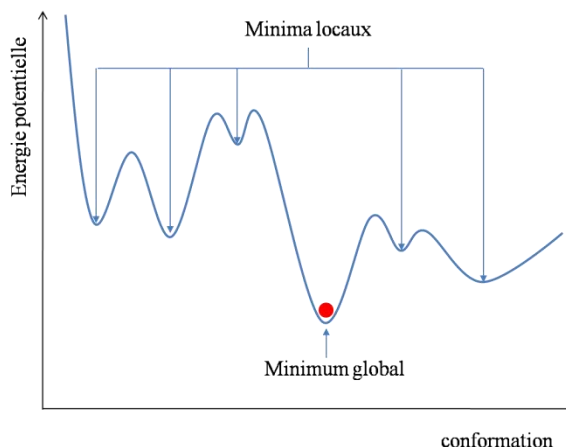


Figure A-8: représentation des énergies potentielles des élongations de liaisons et de la déformation des angles de valence.

Il est également possible de combiner ces deux méthodes pour arriver au minimum global. Les calculs s'arrêtent lorsque le RMS (Root Mean Square) est inférieur à la valeur défini par l'utilisateur ou lorsque le nombre d'itération est atteint.

e) La dynamique moléculaire

Cette méthode permet de suivre l'évolution de la conformation des molécules du système étudié, et de déterminer directement les données structurales et thermodynamiques. Les différentes configurations du système peuvent être générées par intégration des équations de mécanique classique de Newton.

Le résultat nous donne la position des atomes, aussi appelée trajectoire ainsi que leurs vitesses au cours du temps.

L'équation de Newton permet donc de calculer l'accélération a_i de chaque atome i de masse m_i :

$$\mathbf{F}_i = m_i \times \mathbf{a}_i \text{ et } d^2\mathbf{r}_i / dt^2 = \mathbf{F}_i / m_i \quad (\text{A.14})$$

La force est la dérivée de l'énergie potentielle V en fonction des coordonnées r_i :

$$\mathbf{F}_i = \partial \mathbf{V} / \partial \mathbf{r}_i \quad (\text{A.15})$$

La résolution des équations de Newton peut se faire avec l'algorithme de Verlet (Verlet 1967) où les positions, les vitesses et accélérations au temps t , et aussi les positions au temps $(t - \delta t)$ permettent de calculer les positions au temps $(t + \delta t)$.

Si V_i est la vitesse moyenne de l'atome i dans l'intervalle de temps $[t, t + \delta t]$ alors X_i à l'instant $t + \delta t$ est défini par :

$$\vec{x}_i(t + \delta t) = \vec{x}_i(t) - \vec{x}_i(t - \delta t) + \frac{\vec{F}_i}{m_i} \delta t^2 \quad (\text{A.16})$$

Le temps de calcul est inversement proportionnel au pas d'intégration utilisé δt . Plus ce pas est grand, plus le temps de calcul sera court, mais il doit cependant rester petit devant la période de vibration des liaisons rencontrées (X-H) et donc doit être de l'ordre d'une femtoseconde (10^{-15} s).

E. RMN

a) Quelques rappels théoriques

Pour décrire le comportement d'un noyau dans un champ magnétique, il faut dans un premier temps que le nombre de spin (caractéristique des noyaux) de l'atome que l'on souhaite observé soit non nul.

Avec un moment cinétique et un moment magnétique non nuls, tel que le proton ^1H , le carbone ^{13}C , ou encore l'azote ^{15}N . à l'équilibre les noyaux sont orientés dans un champ magnétique principal $\vec{B}_0$, les spins observe alors un mouvement de précession à une fréquence propre du noyaux en question : la fréquence de Larmor qui est définie par l'équation qui suit :

$$\nu_0 = \gamma B_0 / 2\pi \quad (\text{A.17})$$

Où ν_0 est la fréquence de Larmor, γ le rapport gyromagnétique, B_0 le champ magnétique principal.

En appliquant un deuxième champ magnétique $\vec{B}_1$ oscillant à la fréquence ν_0 , perpendiculaire à $\vec{B}_0$, par une impulsion radiofréquence, la distribution des spins est alors perturbée entre les niveaux énergétiques liés au champ fixe B_0 .

$$\mathbf{B}_1 = 2\mathbf{B}_1 \cos \Delta t \quad (\text{A.18})$$

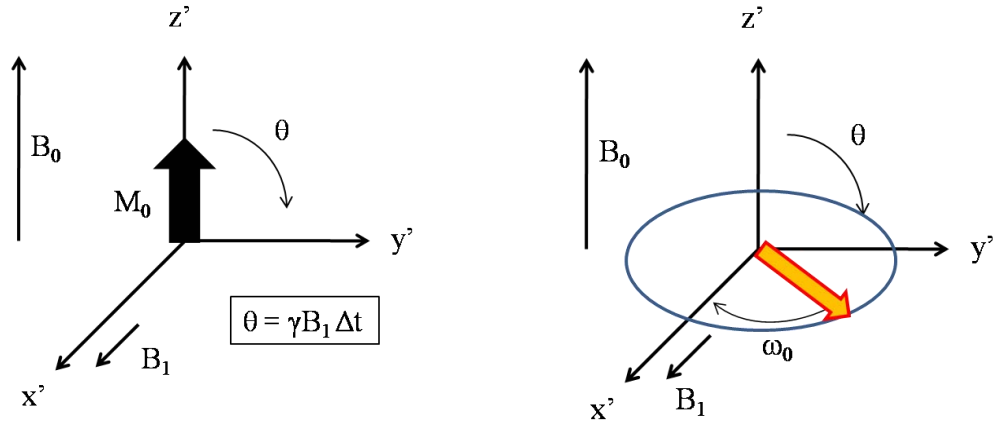


Figure A-18: perturbation de l'équilibre par un champ magnétique B1.

En appliquant la radiofréquence B_1 pendant une durée $\tau = \theta / \gamma B_1$, le système jusqu'alors aligné suivant l'axe z subit une inclinaison avec un angle θ , autrement dit, M bascule dans le plan xy .

Une bobine de réception est placée dans le plan xy et enregistre le signal électrique émis lors du retour à l'équilibre du système. Ce retour se compose de deux relaxations, la relaxation longitudinale (ou réseau de spin) selon l'axe z suivant un temps T_{1z} ; et la relaxation transversale (ou spin-spin) selon le plan xy suivant un temps T_2 .

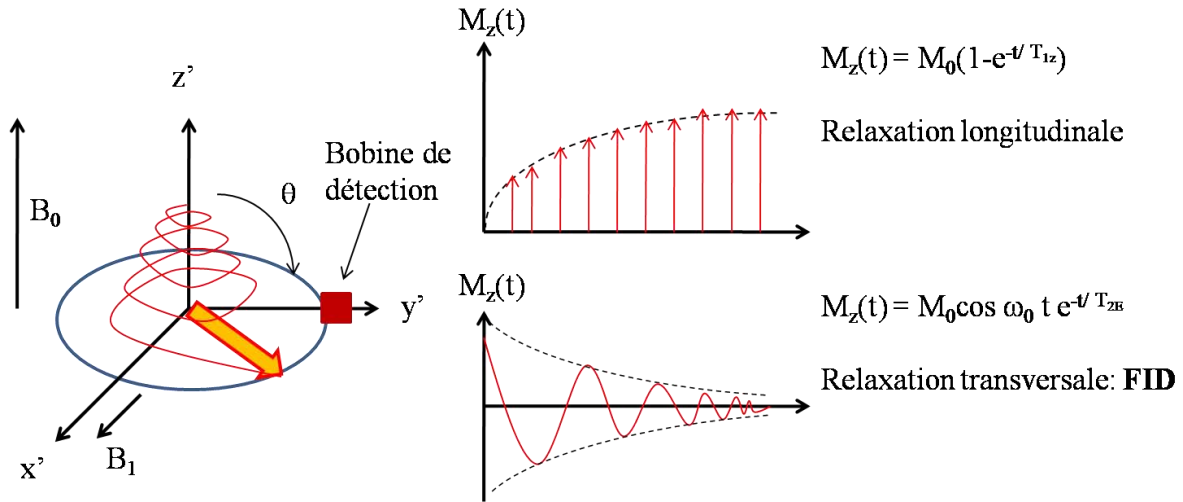


Figure A-19: relaxation longitudinale et transversale.

Dans le cas de la relaxation longitudinale, l'évolution du signal suit une exponentielle croissante suivant l'axe z définie par :

$$M_Z(t) = M_0(1 - e^{-\frac{t}{T_{1z}}}) \quad (\text{A.19})$$

La relaxation longitudinale est directement liée à la dynamique plus ou moins rapide du système étudié à l'échelle de la nanoseconde.

Dans le cas de la relaxation transversale, l'évolution du signal suit une cosinusoïde d'argument ($\omega_0 t$). Ce signal représenté sous forme d'une sinusoïde amortie est le signal de précession libre ou Free Induction Decay plus communément appelé FID définie par :

$$M_z(t) = M_0 \cos \omega_0 t e^{-t/T_{2x}} \quad (\text{A.20})$$

La relaxation transversale est directement liée à la dynamique plus ou moins lente du système étudié à l'échelle de la microseconde à la seconde.

La FID est un signal dans l'échelle du temps et ne peut pas être analysé en tant que tel. Un outil mathématique permet de passer de cette échelle de temps à l'échelle de fréquence, la transformée de Fourier (FT) :

$$S(\Omega) = \int_0^\infty s(t) \exp\{-i\Omega t\} dt \quad (\text{A.21})$$

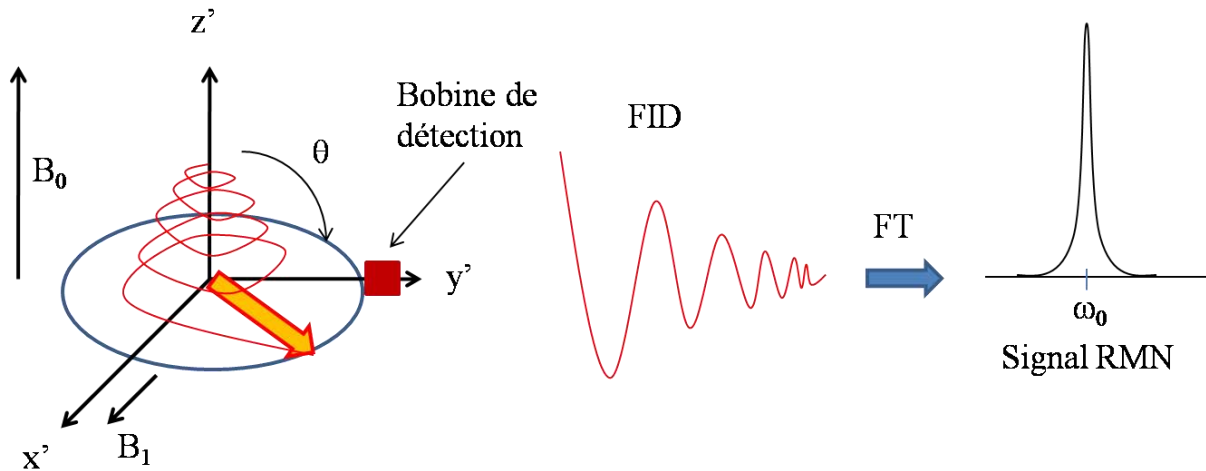


Figure A-20 : transformation du signal dans le temps à un signal fréquentiel par la transformée de Fourier.

b) Les interactions magnétiques

Il existe 2 types d'interactions magnétiques dans les liquides le blindage électronique et le couplage spin-spin indirecte

- Le blindage électronique :

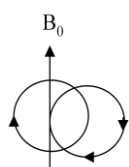
$$\omega_0 = \gamma B_0 \quad (\text{A.22})$$

La relation de Larmor correspond à la fréquence d'un noyau donné (comme par exemple le proton ^1H) et reste la même pour tout les protons sans prendre en compte l'environnement chimique de chacun.

La relation devient alors :

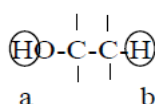
$$\Omega_0 = \gamma B_0 (1-\sigma) \quad (\text{A.23})$$

où σ est la constante d'écran dû à la création d'un petit champ magnétique qui en fonction de la circulation des électrons va s'ajouter ou se soustraire au champ B_0 .

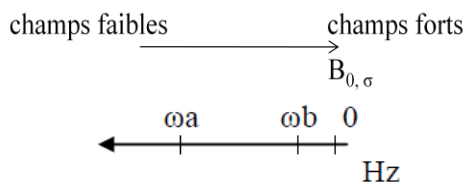


$B_{\text{loc}} = -\sigma B_0$ (ce champ local est environ 10^6 fois plus faible que B_0)

Bloc dépend directement de la densité d'électron, donc plus il y a d'électron, plus σ est grand.



La densité d' e^- est plus importante pour Hb que pour Ha du fait que l'oxygène prend des e^- à Ha



$$\text{Bloc a} = -\sigma_a B_0 < \text{Bloc b} = -\sigma_b B_0 \quad (\text{A.24})$$

$$\omega_a = \omega_0(1-\sigma_a) > \omega_b = \omega_0(1-\sigma_b)$$

ANNEXES

$$\delta = (\omega_i - \omega_s)/\omega_0 \text{ ppm (partie par million)} \quad (\text{A.25})$$

Le déplacement chimique est étroitement lié à la nature du groupement du noyau que l'on visualise en RMN. Dans le cas des études de protéines ou de peptides, qui sont formés d'enchainement d'acides aminés possédant des structures chimiques très proches, nous pouvons réaliser des expériences RMN bidimensionnelles qui permettent de discriminer les différents groupements (cf. tableau X)

X	Structure	NH	H α	H β	Autres
Gly (G)		8.39	3.97	-	-
Ala (A)		8.25	4.35	1.39	-
Val (V)		8.44	4.18	2.13	γCH_3 0.97, 0.94
Ile (I)		8.19	4.23	1.90	γCH_2 1.48, 1.19 γCH_3 0.95 δCH_3 0.89
Leu (L)		8.42	4.38	1.65, 1.65	γCH 1.64 δCH_3 0.94, 0.90
Pro (P)		-	4.44	2.24, 2.02	γCH_2 2.03, 2.03 δCH_2 3.68, 3.65
Ser (S)		8.38	4.50	3.88, 3.88	-
Thr (T)		8.24	4.35	4.22	γCH 1.23
Asp (D)		8.41	4.76	2.84, 2.75	-
Glu (E)		8.37	4.29	2.09, 1.97	γCH_2 2.31, 2.28
Lys (K)		8.41	4.36	1.85, 1.76	γCH_2 1.45 δCH_2 1.70 ϵCH_2 3.02 ϵNH_2 7.52
Arg (R)		8.27	4.38	1.89, 1.79	γCH_2 1.70, δCH_2 3.32 NH 7.17, 6.62
Asn (N)		8.75	4.75	2.83, 2.75	γNH_2 7.39
Gln (Q)		8.41	4.37	2.13, 2.01	γCH_2 2.38 δNH_2 6.87
Met (M)		8.42	4.52	2.15, 2.01	γCH_2 2.64, δCH_2 2.13
Cys (C)		8.31	4.69	3.28, 2.96	-
Trp (W)		8.09	4.70	3.32, 3.19	2 : 7.24 4 : 7.65 5 : 7.17 6 : 7.24 7 : 7.50 NH 10.22
Phe (F)		8.23	4.66	3.22, 2.99	2, 6 : 7.30 3, 5 : 7.39 4 : 7.34
Tyr (Y)		8.18	4.60	3.13, 2.92	2, 6 : 7.15 3, 5 : 6.86
His (H)		8.41	4.63	3.26, 3.20	2 : 8.12 4 : 7.14

Tableau A-5 : tableau des déplacements chimiques des 20 acides aminés

- Couplage spin-spin indirect

Des noyaux ayant un même environnement chimique, ont un même déplacement chimique, ils sont dit équivalents.

Des noyaux ayant un environnement chimique différent ont un déplacement chimique différent, ils sont dit non-équivalents.

On peut alors définir des groupes de spins qui vont former un couplage qui se manifeste par l'éclatement des raies de résonances en multiplets.

Dans le cas d'un couplage homonucléaire tel qu'un couplage ^1H - ^1H , le nombre de raies pour le signal correspondant au spin I est égal à $2nI+1$, où n est le nombre de spin I (dans le cas du proton $I = 1/2$).

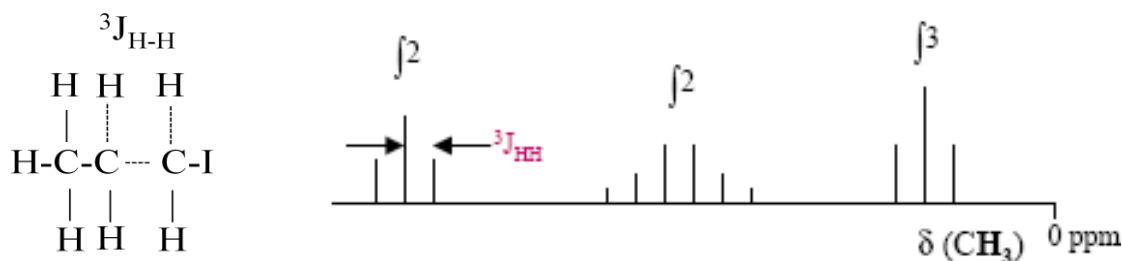


Figure A-21 : Exemple de couplage spin-spin indirect

Le couplage spin-spin indirect se fait par les électrons de liaisons et donc un couplage ^nJ correspondant à un couplage entre deux spins séparés par n liaisons. Ce couplage devient faible avec le nombre de liaisons et donc par expérience, n'est mesurable que pour un couplage entre deux noyaux distants de 5 liaisons au plus. Dans le cas présenté en figure II-24, le couplage a lieu entre deux protons distants de trois liaisons, les couplages en ^3J sont appelés couplages vicinaux. Ils sont très utiles puisqu'ils sont directement reliés aux angles dièdres φ entre les spins par la relation de Karplus (karplus 1959) :

$$^3\text{J}(\varphi) = A + B \cos \varphi + C \cos^2 \varphi \quad (\text{A.26})$$

Dans le cas d'un couplage ^1H - ^1H , les constantes théoriques sont :

$A = 4,22$; $B = 0,5$; $C = 4,5$. La mesure des constantes de couplages ^3J directement sur les spectres RMN permet de retrouver les valeurs des angles dièdres correspondants.

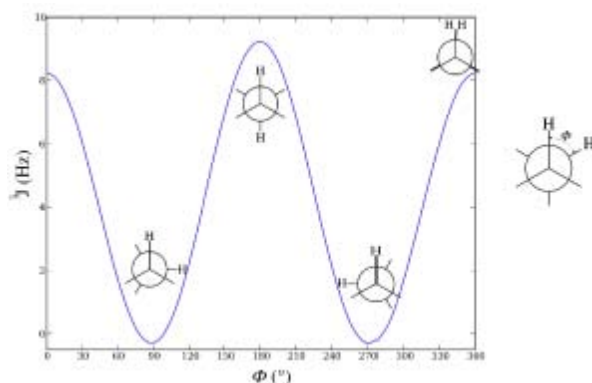


Figure A-22: courbe de Karplus-Conroy, relation entre l'angle dièdre et le couplage vicinal 3J .

- **Couplage spin-spin direct : Effet Overhauser Nucléaire (NOE)**

Deux spins différents I et J peuvent aussi interagir directement avec leur moment magnétique $\vec{\mu}$.

Cette interaction est caractérisée par un couplage dipole-dipole dont la constante séculaire est définie par :

$$b_{ij} = -(\mu_0/4\pi) (\gamma_i \gamma_j \hbar / r_{ij}^3) \quad (A.27)$$

où r_{ij} représente la distance entre les deux noyaux I et J et dans le cas d'un couplage dipolaire homonucléaire, l'hamiltonien est définie par :

$$\hat{H}_D = d_{ij} (3\hat{I}_z \hat{J}_z - \hat{I} \cdot \hat{J}) \quad (A.28)$$

Et dans le cas d'un couplage hétéronucléaire :

$$\hat{H}_D = d_{ij} 2\hat{I}_z \hat{J}_z \quad (A.29)$$

d_{ij} est ici la constante dipolaire qui dépend de l'angle θ_{ij} représentant l'angle entre la liaison IJ correspondant à r_{ij} et le champ magnétique B_0 . On peut alors écrire :

$$d_{ij} = b_{ij} \frac{1}{2} (3 \cos^2 \theta_{ij} - 1) \quad (A.30)$$

Cette constante de couplage spin-spin directe se compose de deux dépendances distinctes, une dépendance orientationnelle et une dépendance en distance soit :

$$\underbrace{\frac{3\mu_0}{8\pi} \frac{\gamma_i \gamma_j \hbar}{r_{ij}^3} \cos^2 \theta_{ij}}_{\text{dépendance orientationnelle}} + \underbrace{\frac{\mu_0}{8\pi} \frac{\gamma_i \gamma_j \hbar}{r_{ij}^3}}_{\text{dépendance en distance}} \quad (A.31)$$

Dans un milieu liquide, dynamique, la constante orientationnelle est nulle, alors que la constante en distance du couplage dipolaire conduit à un phénomène de relaxation : « Nuclear Overhauser Effect » (NOE).

Cet effet diminue rapidement avec la distance avec un rapport $(1/r^6)$, expérimentalement, l'effet est considéré comme nul lorsque la distance est supérieure à $5\text{\AA}$. Dans le cadre d'étude structurale, l'effet NOE est déterminé pour évaluer la proximité spatiale entre deux noyaux et donc donne des informations sur la structure tridimensionnelle adoptée par la molécule.

- Identification des systèmes de spins

Pour résoudre la structure des protéines ou de peptides, la RMN est un outil de choix. Pour cela il est nécessaire d'identifier les systèmes de spins, ce qui est fait avec une combinaison de séquences RMN bidimensionnelles composées de plusieurs étapes : la préparation des spins, le temps d'évolution, le temps de mélange (que dans certaine séquence) et la détection.

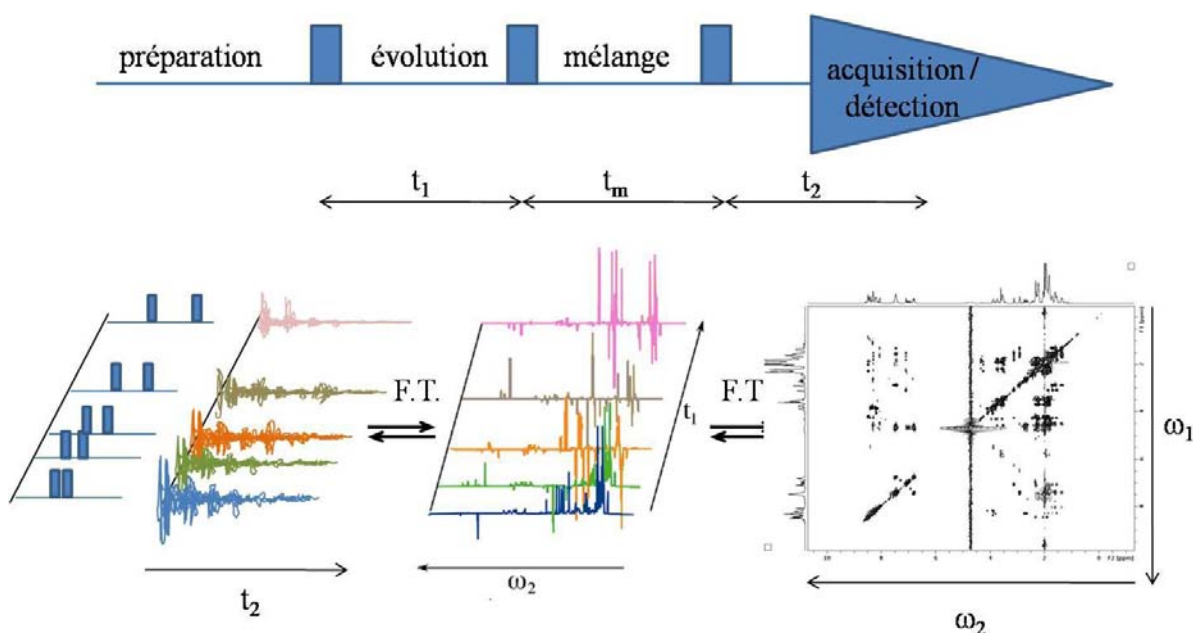


Figure A-23 : Principe de la RMN à deux dimensions

Pour notre étude, nous avons utilisé une séquence à deux dimensions du type TOCSY (Total Correlation Spectroscopy) ((Braunschweiler and Ernst 1983; Bax and Davis 1985)

Cette séquence est une évolution de la séquence développée par Nagayama en 1981. Lors de l'utilisation d'une séquence TOSCY, l'aimantation est transférée via l'interaction spin-spin indirecte le long de la chaîne jusqu'à la rupture du relais du couplage en 3J .

Le spectre obtenu par ce type de séquence est une carte RMN en deux dimensions où la diagonale correspond à la projection dans le plan du spectre 1D. Les taches hors diagonales correspondent aux corrélations TOCSY. La carte étant symétrique, les taches verticales et horizontales sont identiques et permettent d'identifier tous les systèmes de spins grâce à leur chemin de corrélation spécifique de chaque molécule.

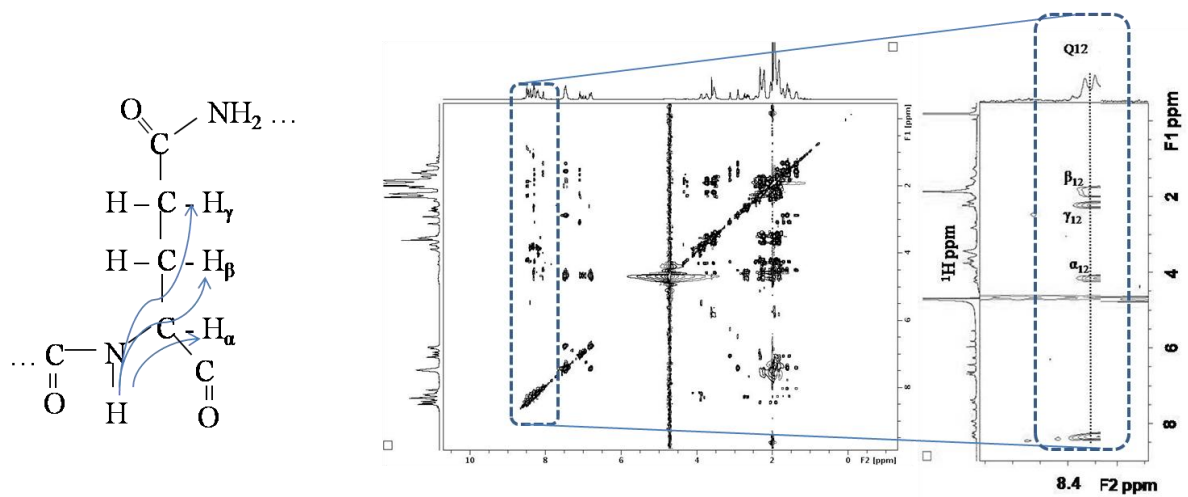
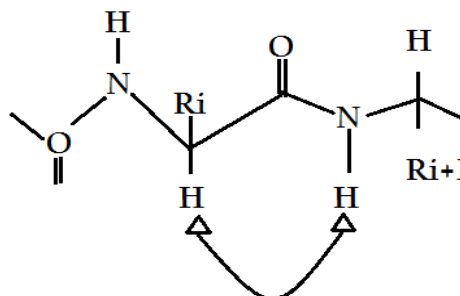


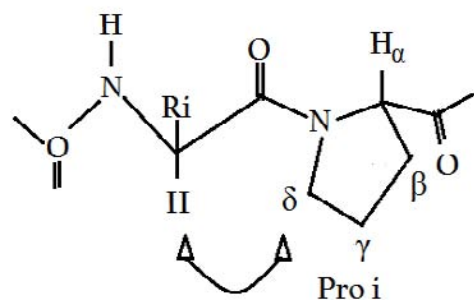
Figure A-24: Carte TOCSY permettant l'identification des différents systèmes de spins, avec l'exemple de la glutamine Q12 d'IB7₁₄.

- Détermination de la structure primaire et contrainte de distance

Après avoir identifié les différents systèmes de spins, il est indispensable pour obtenir la structure d'une protéine ou d'un peptide d'avoir des informations au niveau de la structure primaire. Ceci permet de déterminer l'enchaînement des acides aminés et d'établir des contraintes de distance donnant des indications sur la proximité entre deux atomes des acides aminés de la séquence. Pour cela, une séquence NOESY ou ROESY pour respectivement Nuclear Overhauser Spectroscopy et Rotating frame Overhauser Effect Spectroscopy est utilisée donnant des informations de distance par la corrélation des interaction spin-spin directe entre le proton H α d'un résidu (i) et le proton amide du résidu (i+1) comme le montre la figure ci contre :



Cette méthode d'attribution séquentielle fonctionne pour quasiment tous les acides aminés sauf le résidu proline dont la chaîne latérale est cyclisée sur l'azote tertiaire. Cependant des informations sont tout de même accessibles grâce à l'observation des effets NOE entre le proton H δ de la proline et le proton H α du résidu précédent (i-1)



Ce type de corrélation dépend de la distance entre les atomes observés, l'interaction dipôle-dipôle ne peut se faire que lorsque les atomes sont distants de moins de 5 Å. L'effet NOE correspond à une variation de l'aimantation correspondant à l'intensité du signal d'un spin i lorsque l'aimantation du spin s voisin est perturbée. Cet effet NOE peut être positif, négatif ou nul selon la masse molaire des peptides/protéines.

La variante entre la NOESY et la ROESY repose sur l'utilisation d'un champ radiofréquence supplémentaire appelé « spin lock » qui permet de verrouiller la composante de l'aimantation transversale le long de l'axe y' (référentiel tournant). L'effet NOE reste donc positif indépendamment de la masse du peptide.

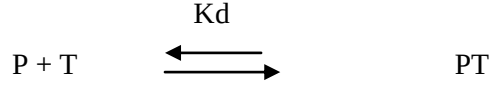
Tout comme dans le cas de la séquence TOCSY, le spectre associé à la séquence NOESY/ROESY est une carte à deux dimensions. Lorsque l'attribution séquentielle est achevée, il reste les taches de corrélations renseignant sur la proximité dans l'espace des résidus identifiés. L'examen des effets NOE participe à la détermination de la structure secondaire en informant sur l'existence de motifs ou d'éventuels repliements de la protéine. La distance entre deux protons est inversement proportionnelle à l'intensité des taches de corrélation. En connaissant une distance r_{ref} on peut alors obtenir une distance inconnue r_i :

$$r_i = r_{\text{ref}} (S_{\text{ref}} / S_i)^{1/6} \quad (\text{A.32})$$

où S_{ref} et S_i sont les intensités respectives des taches de corrélation entre les protons ref et i .

c) analyse de la variation de déplacement chimique

Lorsqu'une interaction se fait entre un ligand (le tannin) et son hôte (le peptide), l'environnement chimique de certains protons de l'hôte (dans notre cas les acides aminés impliqués dans l'interaction) va être modifié créant ainsi une modification de la valeur du déplacement chimique initial. Il est donc possible de regarder les variations de déplacements chimiques de certains protons du peptide lorsqu'on ajoute pas à pas du ligand. Dans le cas d'une fixation spécifique, c'est-à-dire quand on a l'équilibre suivant :



$$K_d = [P][T] / [PT]$$

Avec

$$[P] = [P_0] - [PT]$$

Et

$$[T] = [Ti] - [PT]$$

Et si cet équilibre est dit « rapide » à l'échelle de temps de la RMN, 1 seul déplacement chimique sera observé, δ_{obs} , qui correspondra à une pondération entre le peptide seul et le peptide associé à un tannin :

$$\delta_{obs} = ([P]/[P_0])\delta_P + ([PT]/[P_0])\delta_{PT}$$

Avec

$$\Delta\delta_{max} = \delta_P - \delta_{PT}$$

On peut écrire la variation de déplacement chimique donné $\Delta\delta$ à une concentration de T et de P de la façon suivante :

$$\Delta\delta = \delta_P - \delta_{obs}$$

Soit :

$$\Delta\delta = \delta_P - ([P]/[P_0])\delta_P - ([PT]/[P_0])\delta_{PT}$$

$$\Delta\delta = \delta_P - ([P]/[P_0])\delta_P - ([PT]/[P_0])\delta_{PT}$$

$$\Delta\delta = \{([P_0] - [P])/[P_0]\}\delta_P - ([PT]/[P_0])\delta_{PT}$$

$$\Delta\delta = ([PT]/[P_0])\delta_P - ([PT]/[P_0])\delta_{PT}$$

Et donc :

$$\Delta\delta = ([PT]/[P_0])\Delta\delta_{max} \quad (A.33)$$

De l'ensemble de ces équations, on peut écrire la relation suivante :

$$K_d = ([P_0] - [PT])([Ti] - [PT]) / [PT]$$

soit :

$$[PT]^2 - [PT]([Ti] + [P_0] + K_d) + [P_0][Ti] = 0$$

et donc :

$$[PT]/[P_0] = \frac{1}{2} (1 + [Ti]/[P_0] + K_d/[P_0] - \{(1 + [Ti]/[P_0] + K_d/[P_0])^2 - 4[Ti]/[P_0]\}^{1/2})$$

et donc, si on intègre cette dernière équation dans l'équation (II.45), on obtient :

$$\Delta\delta = \frac{1}{2} \Delta\delta_{\max} [(1 + K_d/[P_0] + [Ti]/[P_0]) - \{(1 + K_d/[P_0] + [Ti]/[P_0])^2 - 4[Ti]/[P_0]\}^{1/2}] \quad (\text{A.34})$$

Cette équation peut être étendue à la fixation indépendante de n tanins sur la protéine à condition que chaque site de fixation ait la même affinité pour le tannin et s'écrit donc :

$$\Delta\delta = \frac{1}{2} \Delta\delta_{\max} [(1 + K_d/n[P_0] + [Ti]/n[P_0]) - \{(1 + K_d/n[P_0] + [Ti]/n[P_0])^2 - 4[Ti]/n[P_0]\}^{1/2}] \quad (\text{A.35})$$

où n représente le nombre de tanins fixés par protéine, $[P_0]$ la concentration totale de protéine et $[Ti]$ la quantité de tanins disponible compte tenu de leur capacité à s'auto-associer :

$$[Ti] = [T]/(1 - K_a[T])$$

Et
$$[T] = \{(1 + 2K_a[T_0]) + (1 + 4K_a[T_0])^{1/2}\} / 2K_a^2[T_0]$$

où $[T_0]$ représente la concentration totale en tanin et K_a la constante d'association.

Ainsi, les variations de déplacements chimiques du peptide peuvent être analysées avec l'équation II-10, en ajustant les variables K_d et n . Il est également à noter que les variations de coefficient de diffusion observées pour le peptide lorsque l'on rajoute des tannins suivent la même équation, et dans ce cas $\Delta\delta$ peut être remplacé par ΔD .

Résumé

Lors de la dégustation des vins rouges, une sensation de sécheresse nommée astringence peut avoir lieu. Cette sensation est causée par l'interaction des tanins du vin et des protéines salivaires correspondant à un phénomène d'une extrême complexité. Cinq tanins représentatifs des vins B1, B2, B3, B4 et C2, et trois peptides représentatifs des protéines de la salive IB7₁₄, IB9₃₇ et l'histatine 3 ont été synthétisés et étudiés par des approches de physico-chimie et de biologie structurale telles que la RMN, le dichroïsme circulaire et la modélisation moléculaire. Après une étude structurale, les paramètres de l'interaction ont été déterminés pour l'ensemble des systèmes permettant de construire des échelles d'affinités montrant l'influence de la structure tridimensionnelle des tanins et de leur nature (degrés de polymérisation), de la longueur du peptide et la meilleure affinité des tanins pour les PRP comparées aux PRH. Ces études ont également mis en évidence l'importance de la concentration en tanin sur le phénomène de précipitation. En dessous de leur CMC, les tanins forment des colloïdes avec les peptides par le biais de liaisons hydrogènes, et au-dessus de leur CMC, les interactions hydrophiles restent préférentielles mais des interactions hydrophobes interviennent dans un deuxième temps.

Mots clés : Protéines salivaires humaines, tanins, structure, interaction, RMN, Modélisation moléculaire.

Abstract

During tasting of red wines, a sensation of dryness named astringency may occur. This sensation is caused by the interaction between wine tannins and salivary proteins corresponding to an extremely complex phenomenon. Five representative wine tannins B1, B2, B3, B4 and C2, and three representative peptides IB7₁₄, IB9₃₇ and histatin 3 from saliva were synthesized and studied by physical chemistry and biology structural tools, such as NMR, circular dichroism and molecular modeling. After a structural study, the parameters of the interaction were determined for all systems allowing to build affinities scales, showing the influence of three-dimensional structure of tannins and their nature (degree of polymerization), the influence of the peptide length and the higher affinity of tannins for PRP than HRP. These studies have also highlighted the importance of concentration of tannin on the phenomenon of precipitation. Below their CMC, tannins bind specifically to salivary proteins. Above the CMC, the specific interactions are still present, but tannins can also form micelles and create hydrophobic interactions.

Keywords: Human salivary proteins, tannins, structure, interaction, NMR, molecular modeling