

N° d'ordre : 4124

THESE

présentée à

L'UNIVERSITE BORDEAUX I

ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES

par Adéline DELCAMBRE

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR

SPECIALITE : CHIMIE ANALYTIQUE ET ENVIRONNEMENT

**UNE APPROCHE MOLECUALIRE DE L'ASTRINGENCE DES VINS: UTILISATION DE
SONDES POUR L'ETUDE DES INTERACTIONS ENTRE PROTEINES DE LA SALIVE
ET POLYPHENOLS**

Soutenue le 3 décembre 2010

Après avis de:

M. Gérard BOLBACH, Directeur de Recherche CNRS
M. Jean-Michel MERILLON, Professeur d'Université Bordeaux 2

Rapporteur
Rapporteur

Devant la commission d'examen formée de :

M. Gérard BOLBACH, Directeur de Recherche CNRS
M. Jean-Michel MERILLON, Professeur d'Université Bordeaux 2
M. Michel LAGUERRE, Directeur de Recherche CNRS
M. Bernard GALLOIS, Directeur de Recherche CNRS
M. Jean-Marie SCHMITTER, Professeur d'Université Bordeaux 1

Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Directeur de thèse

RESUME

L'astringence est une sensation de sécheresse ressentie en bouche lors de la dégustation des vins rouges, qui résulte de la complexation entre les polyphénols du vin et les protéines de la salive, provoquant une diminution de lubrification en bouche. Parmi les protéines salivaires, les protéines riches en prolines (PRP) sont connues pour leur capacité à se lier aux polyphénols et à précipiter avec eux. Une meilleure connaissance de ce phénomène au niveau moléculaire est nécessaire pour le comprendre et le maîtriser. Il a été montré qu'un peptide de quatorze acides aminés, IB7₁₄, dont la séquence est conservée au sein des protéines riches en proline, était un mime représentatif des PRP. Un travail préliminaire par spectrométrie de masse résolue en énergie a permis de caractériser les interactions entre des polyphénols et le peptide IB7₁₄. Une échelle d'affinité en phase gazeuse a ainsi été déterminée.

Cependant, cette méthodologie d'analyse d'un système modèle ne permet pas de s'accommoder de la complexité du vin. C'est pourquoi nous avons conçu une nouvelle stratégie reposant sur l'utilisation de sondes moléculaires immobilisées sur des billes magnétiques. Dans un premier temps nous avons élaboré une sonde peptidique, en greffant le peptide IB7₁₄ sur des billes magnétiques portant des fonctions carboxylates. Cette sonde peptidique a ensuite été étudiée avec des polyphénols modèles. Après sédimentation des billes magnétiques, les polyphénols non captés par la sonde ont été dosés par spectrométrie de masse en utilisant un étalon interne. Une échelle d'affinité en phase liquide a été établie de cette manière. Les positions relatives des polyphénols modèles sur cette échelle sont similaires à celles qui ont été établies en phase gazeuse. Dans un second temps, nous avons construit sur le même principe une sonde polyphénolique. Pour cela, un polyphénol modifié chimiquement a été immobilisé sur des billes magnétiques portant des fonctions amines. Cette sonde polyphénolique a été utilisée pour étudier l'interaction avec le peptide IB7₁₄.

Par ailleurs, pour préparer une étude des interactions entre polyphénols et protéines salivaires avec des mélanges plus complexes que les systèmes modèles, une étude de fractionnement des protéines salivaires a été entreprise, permettant notamment de éliminer l'amylase, protéine majoritaire de la salive humaine. De même, un fractionnement d'un vin rouge a été entrepris pour disposer de fractions de tannins caractérisées par spectrométrie de masse.

La sonde peptidique est l'outil moléculaire qui offre le plus de perspectives de développement ultérieur.

Mots clés : spectrométrie de masse, astringence, protéine de la salive, polyphénols, sondes moléculaires.

ABSTRACT

Astringency is a pucker or dry mouth sensation, typically experimented with red wine tasting, that finds its origin in the complexation of polyphenols with salivary proteins, producing a reduced lubrication of the oral cavity. Among salivary proteins, proline rich proteins (PRPs) are well known for their capacity to bind and precipitate dietary polyphenols. A better knowledge of this phenomenon at the molecular level is required in order to master it. A 14 amino acid stretch from the PRP IB7 has been synthesized and shown to be a representative mimic of PRPs. Previous work by Energy Resolved Mass Spectrometry (ERMS) allowed characterizing the keys parameters of the interactions between these polyphenols and the IB7₁₄ probe. An affinity scale in the gas phase was determined in this way.

However, the ERMS approach was hardly compatible with the complexity of wine polyphenols, and a validation of the affinity scale in condensed phase was required. Thus, we designed a new strategy relying on the use of molecular probes immobilized on magnetic beads. A peptidic probe was obtained by grafting the synthetic IB7₁₄ peptide on magnetic beads bearing carboxylate functions, and used to study its interaction with model polyphenols. After magnetic precipitation of the beads, unbound polyphenols left in the supernatant were quantified by mass spectrometry using an internal standard. An affinity scale in liquid phase was established in this way. Relative positions of model polyphenols on this latter scale were similar to those determined by ERMS. A polyphenolic probe was obtained by grafting a model polyphenol on beads bearing amine functions. This probe has been used to study the interaction with IB7₁₄.

To prepare further work on more complex mixtures, attempts were made to fractionate human saliva; this allowed eliminating amylase, the major salivary protein. Wine tannins were also fractionated, in order to isolate condensed polyphenols that are characterized by mass spectrometry.

The peptidic probe is the molecular tool that offers the best perspectives for future work.

Key words : mass spectrometry, astringency, salivary proteins, polyphenols, molecular probes.

A ma mère, je dédie ce manuscrit

Ce travail de thèse a été réalisé grâce au soutien financier du Comité Interprofessionnel des Vins de Bordeaux, au sein de l'Institut Européen de Chimie et Biologie dans l'équipe du laboratoire de Spectrométrie de Masse des Macromolécules Biologiques (UMR 5248) sous la direction du professeur Jean-Marie Schmitter. Je tiens à vous remercier de m'avoir fait confiance pour mener à bien ce projet de recherche, je regretterai juste de ne pas avoir assez profitée de vos connaissances. Merci de m'avoir accueillie dans votre équipe (deux fois, une fois en master et en thèse).

Je remercie également tous les membres de mon jury d'avoir acceptés d'évaluer mon travail, et de trouver le temps nécessaire mon lire mon manuscrit.

Monsieur BOLBACH, j'ai apprécié vos remarques, vos suggestions ainsi que vos idées auxquelles je n'aurais pas pensé mais qui m'ont permis de découvrir de nouvelles techniques intéressantes.

Monsieur MERILLON cela fut un plaisir d'être évaluée par quelqu'un connaissant le domaine des polyphénols sous un autre angle.

Monsieur GALLOIS, merci d'avoir accepté d'être mon président de mon jury de thèse, et d'avoir pris le temps de juger mon travail.

Monsieur LAGUERRE, je n'ai qu'un seul mot MERCI. En plus d'être un membre de mon jury, j'ai eu l'immense chance de travailler chez vous. Je n'oublierais pas toutes nos conversations sur les polyphénols (qui datent de l'époque de mon master) et tous vos précieux conseils.

Passons maintenant aux « autres remerciements », je vais certainement oublier des personnes j'espère qu'elles ne m'en tiendront pas rigueur.

A mon équipe merci de m'avoir accueillie si chaleureusement, d'avoir été présente dans les bons comme dans les mauvais moments.

Katell....j'ai adoré cette dernière année à partager ton bureau (pas le lundi). Nos discussions, ton rire vont me manquer, mais je garderais en souvenir tous les bons moments passés en ta présence. Les mots ne suffiront pas pour te remercier d'avoir toujours été là pour moi (ton épaule me manquera).

Stéphane, mon bourreau, mon clown....jamais je ne pourrais assez te remercier pour tout : présentation, congrès, manuscrit, soutenance, électrophorèse...Alors même si je ne l'ai pas assez dit au cours des ces 3 années MERCI MERCI. Et même en dehors du travail tu étais là comme Katell. Au final je ne garderais pas l'image du bourreau mais celle d'un ami plus qu'un collègue qui m'a aidé et permis de grandir. Toi, tes blagues, tes biscotos à base de Danette au chocolat et Foufou...je ne retrouverais jamais cela au Canada. Merci tous les deux vous avez énormément compté pour moi.

Je remercie également Corinne (merci pour les recettes et les conversations autour de la cuisine), Luc (que la force soit avec toi), Armelle, Latifa (gourmande), Fabien (ta bonne humeur et tes blagues), Yorgos (toujours les bons plans) et Benoît (merci pour tes conseils).

Merci également à tous les membres de l'équipe du Pôle Protéomique de la Plateforme Génomique Fonctionnelle de Bordeaux : Jean-William (merci Jiwi de m'avoir remonté le moral), Renaud (Maru je suis fan), Delphine (Maman électrophorèse), Sébastien, Stéphane C, Anne-Marie, Michel et Marc.

A ma SOPHIE Adorée je n'ai qu'un seul mot....SOSSO !!!!Je ne regrette absolument pas d'avoir fait ta connaissance, tu as été d'une précieuse aide, une amie fidèle (très fidèle). Merci ma SOSSO d'avoir été présente.

A Jean, plus un ami qu'un collègue merci d'avoir été la première personne à m'avoir fait confiance. Grace à vous j'ai découvert le monde de la chimie organique et cette découverte m'a donné envie de continuer.

Vous avez toujours été de bons conseils et toujours présent dans les bons comme dans les mauvais moments. Même ici je continue à vous vous-voyer je pense que je n'arriverais jamais à passer le cap du « tu ». Merci Jean.

Je remercie tous mes amis :Aline, Flavie, Céline B., Céline F., Sophie A., Sophie M., Christophe, Claire, David, Jiwi, Delphine, Johanna, Pierre-Yves, Agnès A., Fabrice, Pauline, Marie-Edith, Thomas B., Fabien, Yorgos, Agnès & Jules.....

Merci Flavie et Céline B., d'avoir toujours cru en moi et cela depuis le lycée (cela ne nous rajeunit pas !!).

Yann, Yann que dire...tu m'a soutenu, supporté mon caractère de cochon, mais tu es toujours là. Quand je regarde en arrière je me dis qui l'eut cru. Certainement pas moi, souviens toi quand on c'est connu pour moi il était hors de question de faire une thèse. Mais tu m'as donné envie de continuer et grâce à toi j'ai découvert le monde secret des polyphénols. Ces trois années furent chaotiques, pas mal de mauvaises nouvelles, mais ensemble nous y sommes arrivés et cela est l'essentiel. Tu es mon meilleur ami, ma moitié, celui qui me pousse pour avoir plus confiance en moi, tu es complémentaire de moi.

A la famille de Yann, Yvette, Gilles, Clara, Fred, Gaëlle et Alix merci d'avoir été là. Yvette et Gilles les mots ne suffiront pas pour vous remercier pour tout, mais merci.

Maintenant la famille : A mon frère adoré Bertrand que j'aime plus que tout, j'ai envie de te dire, soit heureux, nous le méritons. Même si la vie ne nous a pas fait de cadeau nous y sommes arrivés et cela ait le plus important.

A mon papa, merci de m'avoir toujours poussé à me dépasser. Sans tant rendre compte, tu as permis à ce projet d'aboutir et à aller au bout des choses. Je t'aime Papa, profite de la vie. Je remercie également le reste de ma famille et mon chat Ulysse ma mascotte.

Je finirais en dédiant ce manuscrit à ma Maman partie durant ma thèse. Elle aurait été fière de moi, de mon travail, de mon aboutissement.

Résumé	3
Abstract	4
Liste des abréviations	15
Chapitre I. A la découverte de l'astringence des vins rouges	19
I. L'astringence goût ou sensation ?	21
I.1. Définition de l'astringence.....	21
I.2. Les partenaires responsables de l'astringence.....	21
II. Les composés phénoliques.....	21
I.1. Les non-flavanoïdes	25
I.1.1. Les acides hydroxybenzoïques	25
I.1.2. Les acides hydroxycinnamiques.....	25
I.2. Les flavanoïdes.....	26
I.2.1. Les flavanones	28
I.2.2. Les anthocyanidines.....	29
I.2.3. Les flavonols	29
I.2.4. Les flavan-3ols ou flavanols	29
A] Les tanins	29
A.1] Les tanins hydrolysables	30
A.2] Les tanins mixtes	31
A.3] Les tanins condensés	32
I.3. Les polyphénols choisis pour l'étude	35
III. Les protéines salivaires humaines	37
II.1. L'alpha-amylase.....	38
II.2. Les mucines.....	38
II.3. Les cystatines	38
II.4. Les stathérines	39
II.5. Les histatines.....	39
II.6. Les protéines riches en prolines	39
II.6.1. Les protéines riches en prolines acides.....	39
II.6.2. Les protéines riches en proline glycosylées	39
II.6.3. Les protéines riches en prolines basiques.....	40
II.7. Les protéines salivaires retenues pour l'étude.....	41
IV. Les interactions.....	42
IV.1. Les effets hydrophobes	43
IV.2. Les liaisons hydrogènes	43
IV.3. L'affinité de la complexation	45

IV.4. Aspects mécanistiques de la complexation	46
V. Les différentes études	47
VI. Les objectifs de la thèse	48
VII. Bibliographie	49
Chapitre II. Etudes préliminaires et stratégies d'étude de l'astringence.....	55
I. Choix d'un peptide modèle.....	56
II. La spectrométrie de Masse Résolue en Energie	56
II.1. La méthodologie	56
II.2. Résultats et discussion	59
III. Stratégies envisagées.....	63
III.1. La sonde peptidique : élaboration et mode d'utilisation	63
III.2. La sonde polyphénolique : élaboration et mode d'utilisation.....	64
IV. Bibliographie.....	64
Chapitre III. Matériels et Méthodes	67
I. La synthèse peptidique en phase solide (SPPS)	68
I.1. Stratégie de synthèse	68
I.1.1. Les étapes de la synthèse	69
I.1.2. Le clivage	72
I.1.3. La purification	73
II. La spectrométrie de masse.....	74
II.1. La source electrospray.....	75
II.1.1. Le principe de l'ionisation par électronébulisation	75
II.1.2. La génération des ions en phase gazeuse	78
a) Le modèle de Dole.....	78
b) Le modèle d'Iribarne et Thomson	79
II.1.3. Mode d'introduction de l'échantillon	79
II.2. L'analyseur	80
II.2.1. Principe du piège ionique	80
II.2.2. Le spectromètre LCQ Advantage	83
a) Détermination de masse moléculaire.....	83
III. Couplage de la chromatographie en phase liquide et de la spectrométrie de masse	84
IV. Electrophorèse 1D	85
V. Bibliographie.....	87

Chapitre IV. Etude de l'astringence en phase liquide au moyen d'une sonde peptidique	91
I. Elaboration de la sonde peptidique	93
I.1. Fonctionnalisation des billes magnétiques	93
I.2. Greffage du peptide sur les billes magnétiques et détermination du rendement de greffage	94
I.3. Conclusion	96
II. Etude des polyphénols modèles	97
II.1. Choix des polyphénols	97
II.2. Analyse des polyphénols par spectrométrie de masse ESI-Piège Ionique	99
III. Etude de l'interaction sonde peptidique/polyphénol	105
III.1. Principe de l'interaction	105
III.2. Quantification par spectrométrie de masse	106
III.2.1. Choix de l'étalon interne	106
III.3. Signature spectrale des composés étudiés	107
III.3.1. Signature spectrale de NN	107
III.3.2. Signature spectrale de QR2	109
III.3.3. Signature spectrale de Epi	109
III.4. Etude de l'affinité des polyphénols choisis pour la sonde peptidique	110
III.4.1. Principe de la quantification des polyphénols et calcul d'affinité	110
a) Etude de l'interaction sonde peptidique/NN	110
b) Etude de l'interaction sonde peptidique/QR2	112
c) Etude de l'interaction sonde peptidique/Epi	112
d) Contrôle : utilisation d'une sonde peptidique dite « témoin » négatif	112
III.5. Influence de certains paramètres sur l'interaction	113
III.5.1. Influence de la température	113
III.5.2. Influence du temps d'interaction	113
a) Discussion sur les conditions d'interaction	113
III.6. Conclusion	114
III.7. Interaction de la sonde peptidique avec des mélanges de polyphénols	114
III.7.1. Mélange binaire [NN + QR2]	115
III.7.2. Mélange ternaire [AN + NN + QR2]	115
III.7.3. Mélange quaternaire [AG + AN + NN + QR2]	115
IV. Désorption des complexes non-covalents formés en phase liquide	116
IV.1. Couplage Chromatographie liquide-Spectrométrie de masse	116
IV.1.1. Principe de quantification relative par couplage LC/MS	117
a) Etablissement des courbes d'étalonnage	118
b) Courbe d'étalonnage pour des mélanges de composés	118

IV.2. Etude de la désorption des polyphénols en interaction avec la sonde peptidique.....	118
IV.2.1. Etude de la désorption avec des solvants.....	119
a) Effet de l'acétate d'ammonium.....	119
IV.2.2. Etude de la désorption d'un polyphénol isolé	120
IV.2.3. Etude de la désorption pour un mélange de polyphénols.....	120
V. Conclusion et Perspectives	121
VI. Bibliographie.....	122
Chapitre V. Etude de l'astringence en phase liquide au moyen d'une sonde peptidique	125
I. Elaboration de la sonde polyphénolique	126
I.1. Synthèse du polyphénol modifié.....	127
I.2. Fonctionnalisation, greffage des billes magnétiques et détermination du rendement de couplage	129
I.3. Conclusion.....	130
II. Etude de l'interaction entre la sonde polyphénolique et le peptide IB714.....	131
II.1 Choix et caractérisation par spectrométrie de masse du peptide modèle.....	131
II.2. Principe de l'étude de l'interaction	132
II.3. Quantification par spectrométrie de masse	133
III.3.1. Choix de l'étalon interne.....	133
III.3.2. Principe de la quantification relative	133
II.4. Etude de l'affinité du peptide IB714 pour la sonde polyphénolique	134
III. Conclusion	136
IV. Bibliographie.....	136
Chapitre VI. Vers des mélanges plus complexes de polyphénols et protéines.....	139
I. Les protéines salivaires.....	140
I.1. Prélèvement d'échantillons et traitement.....	142
I.2. Dosage des protéines salivaires	142
I.3. Etude par électrophorèse 1D des protéines salivaires.....	142
I.3.1. Optimisations.....	143
a) Les différentes colorations	143
b) Résolution des gels SDS-PAGE	145
I.3.2. Etape de précipitation au TCA.....	145
I.3.3. Tests de précipitation des protéines salivaires en présence de vin rouge ou d'eau.....	146
I.4. Fractionnement des protéines salivaires	146
I.4.1. Utilisation des Vivaspin.....	146
I.5. Elimination de l'amylase.....	147

I.6. Conclusion et perspectives.....	149
II. Fractionnement d'un vin rouge.....	150
II.1. Protocole par Sep-Pack C18	150
II.2. Analyse par spectrométrie de masse ESI-LC-MS	151
III. Conclusion et perspectives	153
IV. Bibliographie.....	153
Chapitre VII. Conclusions et Perspectives.....	157
Chapitre VIII. Partie Expérimentale	163
I.Synthèse peptidique sur support solide	164
I.1. Matériel.....	164
I.2. Synthèse	164
I.3. Protocole post-synthèse : le clivage	164
I.4. Purification par HPLC	165
II. Préparation de la sonde peptidique	166
II.1. Fonctionnalisation des billes magnétiques et immobilisation du peptide IB17 ₁₄	166
II.2. Mesure de l'absorbance en UV	166
II.3. Protocole de l'étude de l'interaction sonde peptidique/polyphénols	167
II.4. Calcul des valeurs d'« affinités »	167
II.5. Graphes de calibrations par LC/MS	167
III. Préparation de la sonde polyphénolique.....	167
III.1. Synthèse du polyphénol modifié.....	167
III.2 Fonctionnalisation des billes magnétiques et immobilisation du polyphénol modifié.....	169
III.3. Mesure de l'absorbance	169
III.4. Calcul d'« affinité »	170
IV. Les protéines salivaires	173
IV.1.Dosage par la méthode de Bradford	173
IV.2.Electrophorèse SDS-PAGE	174
IV.3. Techniques de colorations	174
a) Coloration au Bleu de Coomassie R250.....	174
b) Coloration à l'argent.....	175
IV.5. Protocole de l'élimination de l'amylase	175
V. Paramètres utilisés en spectrométrie de masse pour l'identification des polyphénols	176

Liste des abréviations

ACN	Acétonitrile
AGC	Automatic Gain Control
Boc	t-Butoxycarbonyle
Cat	Catéchine
CoA	Coenzyme A
CRM	Charge Residue Model
C-Term	Extension Carboxyl-terminale
CT	Capillaire Transfert
Epi	Epicatéchine
Da	Dalton
DC	Dichroïsme circulaire
DCC	<i>N,N'</i> -Dicyclohexylcarbodiimide
DCM	Dichlorométhane
DIEA	<i>N,N</i> -Diisopropylethylamine
DMF	<i>N,N</i> -Diméthylformamide
DMSO	Diméthylsulfoxyde
ED ₅₀	Energie de dissociation 50%
ERMS	Energy Resolved Mass Spectrometry
ESI	Electrospray Ionisation
FAB	Fast Atom Bombardment
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl
FTIR	Fourier Transformed. InfraRed spectroscopy
Gln/Q	Glutamine
Gly/G	Glycine
IC	Ionisation chimique
IE	Impact électronique
IEM	Ion Evaporation Model
HBtU	O-(Benzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -Hexafluorophosphate
HF	Acide Fluorhydrique
HMP	4-HydroxyMéthylPhenoxyméthyle
HOBt	Hydroxybenzotriazole
HPLC	Chromatographie liquide haute performance
KDa	KiloDalton
LT	Lentille Tube
Lys/K	Lysine
NCE	Normalized Collision Energy

NMP	N-Méthyl-2-Pyrrolidine
N-Term	Extension N-Terminale
MeOH	Méthanol
nm	nanomètre
Pa	Pascal
PEG	PolyEthylèneGlycol
PDMS	Plasma Desorption Mass Spectrometry
PI	Piège Ionique
PRPa	Protéines riches en prolines acides
PRPb	Protéines riches en prolines basiques
PRPg	Protéines riches en prolines glycosylées
Pro/P	Proline
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
SDS	Sodium Dodécyl Sulfate
SM	Spectrométrie de masse
SPPS	Synthèse sur support solide
tBu	t-butyl
TEMED	N'-N'-N'-N'-tétraméthylène diamine
TFA	Acide trifluoroacétique
ToF	temps de vol
Th	Thompson
trt	Trityl
uma	unité de masse atomique
UV	Ultra-Violet

CHAPITRE I :

A LA DECOUVERTE DE L'ASTRINGENCE

Le vin, boisson alcoolisée obtenue par fermentation du raisin, est un mélange complexe de composés volatils ou non, en solution ou en suspension. Parmi ces composés, l'éthanol est présent à environ 12%, l'acide tartrique à 5 g.L⁻¹, les polyphénols entre 1 et 4 g.L⁻¹, les glucides entre 2 et 3 g.L⁻¹, les protéines entre 1 et 3 g.L⁻¹, et les sels minéraux entre 50 et 200 mg.L⁻¹ [1, 2]. Le pH est d'environ 3,5 (selon les cépages, les conditions climatiques et la vinification). Par l'ensemble des associations possibles et des transformations subies au cours de sa maturation, le vin est un produit « vivant » qui ne peut donc pas être étudié comme n'importe quelle solution.

I. L'astringence goût ou sensation ?

Lors de la dégustation des vins rouges, plusieurs caractéristiques visuelles entrent en jeu comme la notion de robe, de texture et de souplesse, accompagnées de sensations tactiles et gustatives. Ces sensations gustatives sont des facteurs importants car ils vont définir un caractère propre au vin [1-6].

1.1. Définition de l'astringence

La notion d'astringence du latin « ad stringere » [7] (qui signifie serrer), est une sensation tactile qui se traduit par une sensation de rétrécissement, d'étirement et de plissement de l'épithélium buccal. L'astringence est considérée comme un phénomène perceptif multiple [8] : il s'agit de la combinaison de trois sensations, à savoir le plissement [7] (sensation de serrage en bouche, impression d'étirement dans les joues et dans les muscles du visage), de dureté (textures non lisses dans la cavité orale) et de sécheresse (manque de lubrification ou d'humidité résultant des frictions entre les surfaces orales [9-12]). L'augmentation de ces frictions active des récepteurs de la bouche, conduisant ainsi à la perception de l'astringence.

Cependant, il est bien connu que l'astringence peut être confondue à tort avec l'amertume : cette confusion à propos de cette qualité organoleptique perceptive a déjà été décrite par Aristote (384-322 av JC). L'astringence est considérée comme un goût avec des qualités de dureté et de pugnacité [7, 13]. Elle est associée à de nombreux produits alimentaires tels que la bière, le thé, le café, les fruits rouges et le vin [7]. Dans le cas des vins rouges, l'astringence peut être considérée comme une qualité ou un défaut du vin [8, 14].

1.2. Les partenaires responsables de l'astringence

La sensation d'astringence des vins rouges est liée aux interactions entre les composés phénoliques [13] présents dans le vin et les protéines salivaires [7, 11, 12, 15-17]. Les composés phénoliques sont à l'origine de la couleur des vins rouges et confèrent au vin un caractère tannique et une astringence plus ou moins importante

(dans le cas des vins blancs, les composés phénoliques sont peu présents et la sensation d'astringence n'est pas prononcée) [2].

Lors de la dégustation d'un vin rouge, les polyphénols présents dans ce dernier s'agrègent avec des protéines salivaires, induisant la sensation d'astringence [18-20] (**Figure I.1**). Notamment, les protéines riches en prolines basiques, dont la seule fonction connue est d'interagir avec les polyphénols, jouent un rôle crucial dans cette sensation [20-22]. L'astringence est la propriété la plus marquante des polyphénols [23], et elle est liée à la taille des molécules et au nombre de noyaux phénoliques présents. Par ailleurs, d'un individu à un autre l'astringence peut être perçue différemment, car les taux de sécrétions salivaires dépendent du régime alimentaire riche en polyphénols ou non [1]. L'astringence des polyphénols augmente avec le degré de polymérisation, puis diminue lorsque celui-ci excède 8 sous-unités monomériques.

Par ailleurs, les acides organiques présents dans le vin peuvent aussi contribuer à l'astringence en augmentant l'efficacité des interactions des polyphénols avec les protéines salivaires, alors que le taux d'alcool du vin va au contraire réduire cette perception. D'après Bate-Smith [24], les composés qui ont la capacité de se lier avec des protéines salivaires sont considérés comme astringents.

Du fait que l'astringence puisse être considérée comme une qualité ou un défaut du vin rouge, il est important pour les œnologues de comprendre et de maîtriser ce phénomène. A l'échelle moléculaire ce phénomène n'est pas encore bien compris. Une connaissance approfondie des mécanismes moléculaires à l'origine de ce phénomène physiologique devrait contribuer à l'élaboration d'une méthode objective d'évaluation de l'astringence, complémentaire de la dégustation.

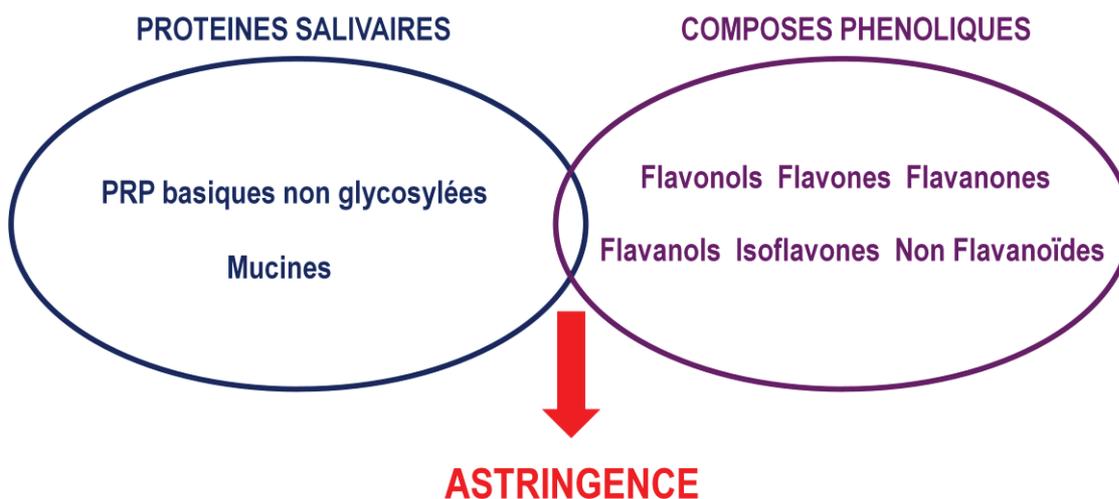


Figure I.1 : Schéma récapitulatif des différents partenaires induisant la sensation d'astringence

II. Les composés phénoliques

Les composés phénoliques ou polyphénols sont présents dans tous les végétaux, et sont définis comme des métabolites secondaires. On les retrouve dans de nombreuses boissons élaborées à partir d'extraits végétaux (le cidre, la bière, le vin), dans certains fruits et légumes (fraise, pomme de terre, kaki), les graines oléagineuses (noix, noisettes), et dans d'autres denrées alimentaires [1] [25, 26]. Ces composés produits par les végétaux n'interviennent donc pas dans la survie de l'espèce (métabolites primaires), mais jouent différents rôles avec notamment des propriétés antibactériennes, antifongiques, antioxydantes, mais également répulsives de part leur goût désagréable. Ils interviennent aussi sur la santé humaine : propriétés antioxydantes [27] contre le vieillissement cellulaire (cosmétiques), actions anticancéreuses [3, 26, 28], contre les maladies cardiovasculaires [29] et coronariennes [30-32].

Ces polyphénols regroupent plusieurs milliers de molécules [4, 33, 34] réparties dans deux grandes sous familles. La caractéristique de ces molécules est la présence d'un ou de plusieurs cycles benzéniques portant un ou plusieurs groupements hydroxyles. Les deux sous-familles des composés phénoliques sont les non-flavanoïdes et les flavanoïdes, qui regroupent à leur tour des sous-familles (**Tableau I.1**).

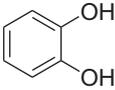
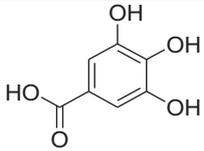
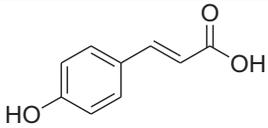
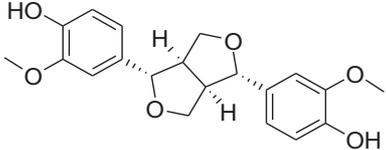
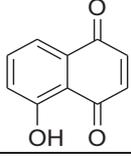
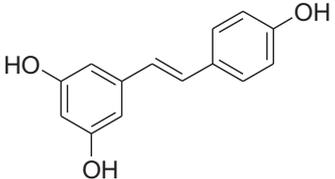
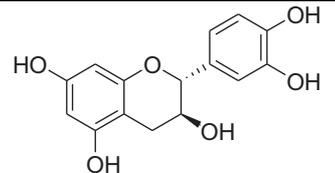
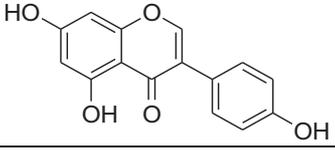
Classe	Squelette carboné	Structure	Exemple	Origines (exemples)
Phénols simples	C6		Catéchol	Nombreuses espèces
Acides hydroxybenzoïques	C6-C1		Acide gallique	Epices, fraises
Acides hydroxycinnamiques Coumarines	C6-C3		Acide p-coumarique	Pomme de terre, pomme
Lignanes	(C6-C3) ₂		Pinorésinol	Pin
Lignines	(C6-C3) _n			Fruits à noyaux
Naphtoquinones	C6-C4		Juglone	Noix
Stilbènes	C6-C2-C6		Resvératrol	Vigne
Flavonoïdes	C6-C3-C6		Catéchine	Fruits, légumes
Isoflavonoïdes			Génistéine	Fleurs
Tanins condensés	(C6-C3-C6) _n			Raisin, kaki

Tableau I.1 : Structure des différentes classes de composés phénoliques [1]

II.1. Les non flavanoïdes

Les non-flavanoïdes sont des acides phénols. Ces composés appartiennent à deux groupes, les acides hydroxybenzoïques et les acides hydroxycinnamiques. Ces deux familles sont présentes dans le vin rouge à des concentrations variant de 100 à 200 mg.L⁻¹ [1, 2].

II.1.1. Les acides hydroxybenzoïques

Ils sont dérivés de l'acide benzoïque et ont une formule de type C1-C6, un ou plusieurs groupements hydroxyles pouvant se substituer à un ou plusieurs atomes d'hydrogènes. Ils existent principalement sous forme d'esters ou de glucosides (**Figure I.2**).

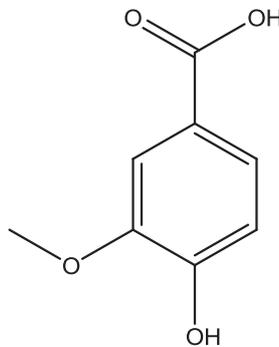


Figure I.2 : Exemple d'acide hydroxybenzoïque, l'acide vanillique

II.1.2. Les acides hydroxycinnamiques

Ils sont dérivés de l'acide cinnamique et ont une formule de type C6-C3. Le plus connu des dérivés, est l'acide caféique présent quasiment chez tous les végétaux (**Figure I.3**).

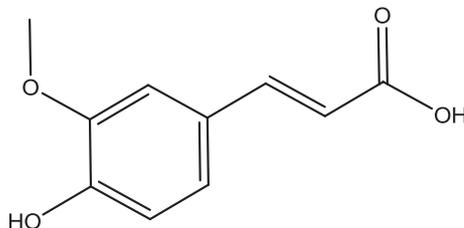


Figure I.3: Acide caféique

Les coumarines et les stilbènes ^[35] (**Figure I.4**) sont des dérivés des acides hydroxycinnamiques par cyclisation interne de la chaîne latérale. Les stilbènes ^[36, 37] sont présents dans la vigne en faible quantité et interviennent dans des mécanismes de défense naturelle de la vigne contre les champignons.

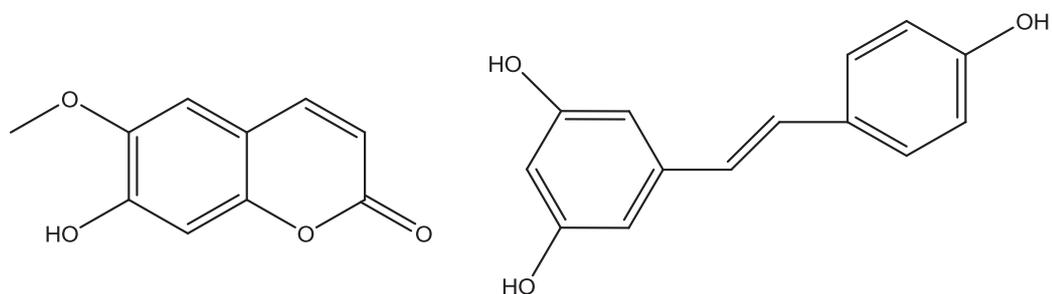


Figure I.4: A gauche : exemple d'une coumarine, la scopolétine ; à droite un stilbène, le resvératrol

II.2. Les flavanoïdes

Les flavanoïdes sont des dérivés du noyau flavane, structure formée de trois noyaux : phloroglucinol (cycle A), catéchol (cycle B) et d'un hétérocycle (cycle C), pour un squelette en C6-C3-C6, (**Figure I.5**) ^[1, 2, 38].

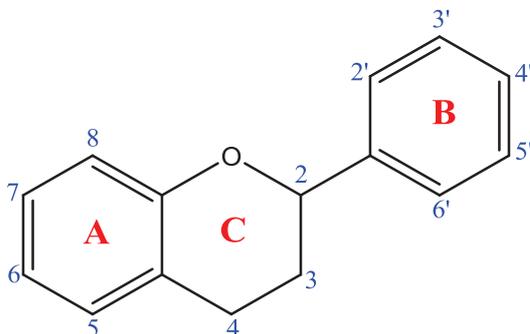


Figure I.5: Noyau flavane avec la nomenclature propre aux composés phénoliques

Ces flavanoïdes constituent la famille la plus grande et la plus diversifiée des composés phénoliques, plusieurs milliers de molécules ont été identifiées à ce jour ^[33, 34]. Elles sont réparties en plus de dix classes selon leurs fonctions; les plus importantes sont présentées dans la **Figure I.6**.

Le classement porte essentiellement sur les insaturations du cycle C et sur le taux d'oxydation de la molécule. Les variations au sein d'une même classe portent sur le nombre et la position des groupes hydroxyles présents sur les cycles benzéniques, ainsi que la possible glycosylation ^[39] de certaines fonctions alcool ou phénol.

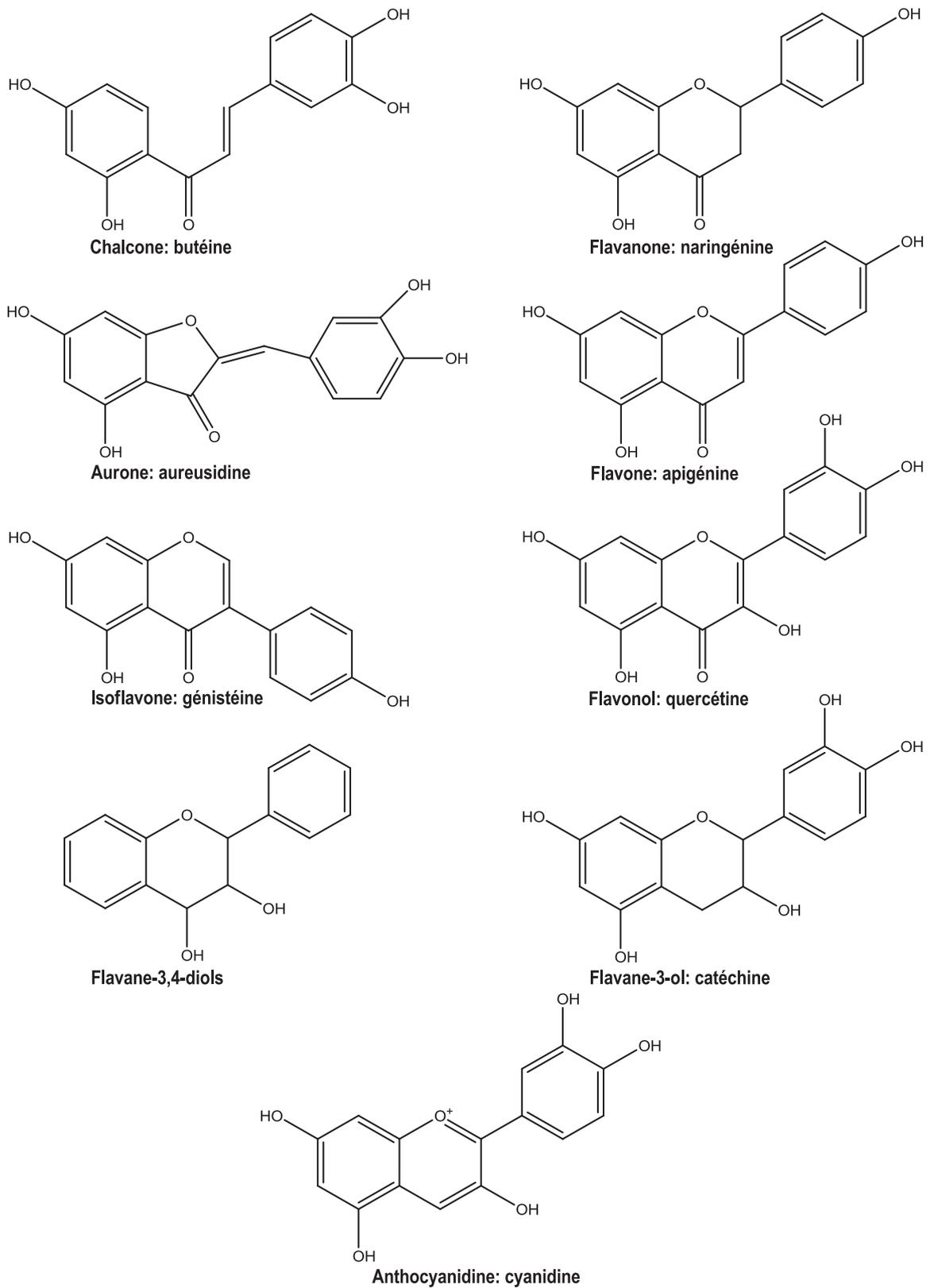


Figure I.6 : Structures des différentes familles de flavanoïdes .

Les mécanismes de biosynthèse des principaux composés phénoliques sont maintenant bien connus (**figure I.7**). Les deux acides aminés aromatiques phénylalanine et tyrosine sont présents dans les protéines mais sont également à l'origine de la formation de la plupart des composés phénoliques. La première étape de la biosynthèse permet la formation de la chalcone, synthétisée par condensation d'une molécule de 4-coumaroyl-CoA (CoA : coenzyme A) et de trois molécules de malonyl-CoA. La plupart des composés phénoliques sont des dérivés de la chalcone [40].

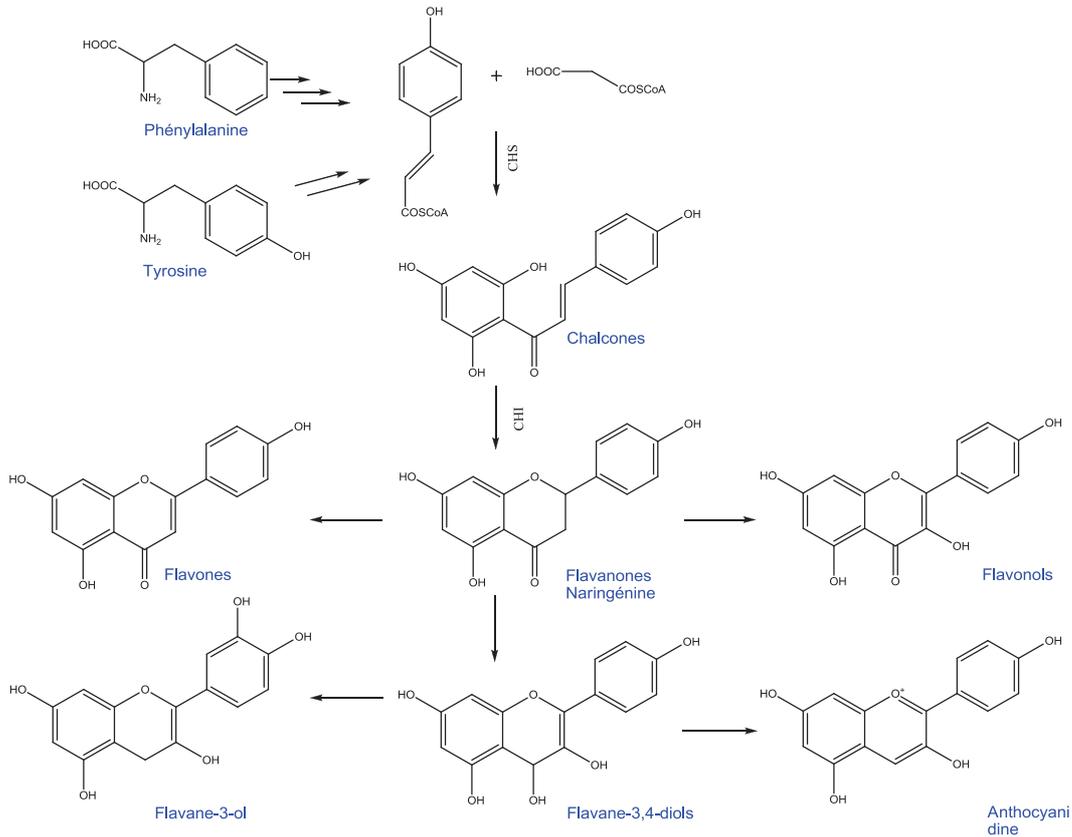


Figure I.7 : Biosynthèse des principaux composés phénoliques [39]

II.2.1. Les flavanones

Le flavanone le plus connu est la Naringénine, qui est la molécule centrale dans la biosynthèse des flavanoïdes. La naringénine permet la synthèse des flavanols, des flavones, des flavane-3-4-diols et de leurs dérivés.

II.2.2. Les anthocyanidines

Les anthocyanidines sont des pigments rouges localisés dans la pellicule de raisin, mais également présents dans les feuilles de la vigne en fin de cycle végétatif. Ces molécules sont responsables de l'évolution de la couleur du vin au cours de la maturation. Leur teneur diminue au cours du vieillissement [4, 41-43].

II.2.3. Les flavonols

Les flavonols sont rencontrés dans les pellicules des raisins blanc et noir, et ils sont extraits lors de la macération. Ils sont pratiquement absents dans les vins blancs [2].

II.2.4. Les flavane-3-ols ou flavanols

Les flavane-3-ols sont aussi responsables au cours du vieillissement de l'évolution de la couleur du vin et de certaines perceptions gustatives (diminution de l'amertume et de l'astringence). Cette famille de molécules constitue les éléments de base des tanins [3, 43].

A] les tanins

Les tanins sont utilisés depuis l'Antiquité pour le traitement des peaux d'animaux. Ils ont une importance économique et écologique, et sont responsables de l'amertume et de l'astringence de nombreux fruits et légumes (pomme, kaki, raisin) et de leurs produits dérivés. Les tanins sont des composés phénoliques condensés qui ont la capacité à se lier aux protéines salivaires en solution et de les précipiter, ainsi qu'à d'autres polymères végétaux tels que les polysaccharides [4, 44]. Dans le cas du tannage du cuir les tanins réagissent avec le collagène.

D'après la définition établie par Bate-Smith [24], les tanins sont des composés phénoliques hydrosolubles, dont la masse moléculaire doit être comprise entre 500 et 3000 Da, capables de précipiter les alcaloïdes, la gélatine et autres protéines. Cependant, différents travaux ont mis en évidence que des composés phénoliques ayant une masse inférieure à 500 Da ou supérieure à 3000 Da, peuvent être considérés comme des tanins, puisqu'ils peuvent précipiter par complexation avec des protéines et sont aussi perçus comme astringents (notamment l'épicatéchine dont la masse moléculaire est de 290 Da) [1].

Les tanins sont amphiphiles : ils possèdent une partie hydrophile due aux groupements hydroxyles, et une partie hydrophobe due aux noyaux aromatiques (**Figure I.8**). De plus, tous les tanins sont connus pour être amers et astringents.

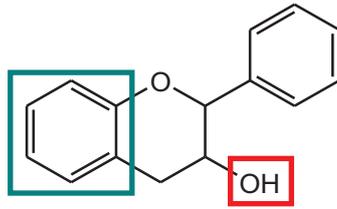


Figure I.8 : le flavan-3-ol, en vert une partie hydrophobe, en rouge la partie hydrophile.

Selon la nature

des molécules élémentaires, trois types de tanins sont distingués :

- les tanins hydrolysables
- les tanins condensés ou catéchiques
- les tanins complexes ou mixtes.

A.1] Les tanins hydrolysables

Les tanins hydrolysables sont des composés constitués d'un noyau glucose estérifié par l'acide gallique ou ellagique (**Figure I.9**). Ces tanins comprennent les gallotanins et les ellagitanins, qui après hydrolyse libèrent respectivement de l'acide gallique et de l'acide ellagique [3, 4, 45-47].

Ces tanins sont présents en faible concentration dans le vin et sont issus du bois lors de l'élevage en fût de chêne. Dans le bois de chêne deux isomères des ellagitanins sont présents majoritairement :

- la vescalagine
- la castalagine

Ces tanins sont hydrosolubles mais ce ne sont pas des tanins naturels du vin. D'autres composés, tels la grandinine et la roburine, qui après hydrolyse partielle donnent la vescalagine et la castalagine, sont aussi présents en faible quantité. Ces tanins jouent un rôle significatif dans la qualité du vin. Ils sont plus astringents que les tanins condensés, mais ils sont présents en plus faible concentration.

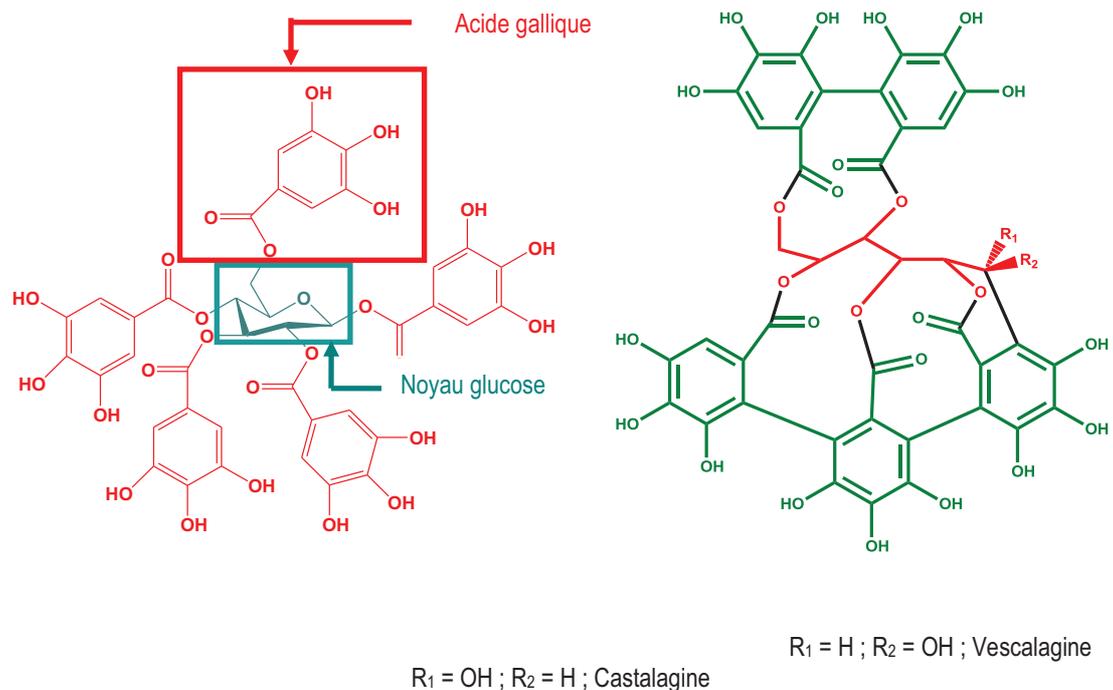


Figure I.9: A gauche le 1,2,3,4,6-penta-O-galloyl- β -D-glucose entouré d'un noyau glucose et d'acide gallique ; à droite structure de deux ellagitanins.

A.2] Les tannins mixtes

Les tanins complexes sont présents dans les plantes. Ils sont formés d'une partie de tanins hydrolysables et d'une autre de tanins condensés (**Figure I.10**). Ces tanins ont pour structure un complexe covalent entre un ellagitanin et un flavanol. Par exemple certaines études ont mis en évidence un tanin formé d'une catéchine et de la vescalagine, l'Acutissimine ^[48], présent naturellement chez une espèce de chêne (*quercus acutissima*), et lors du vieillissement du vin en fût de chêne.

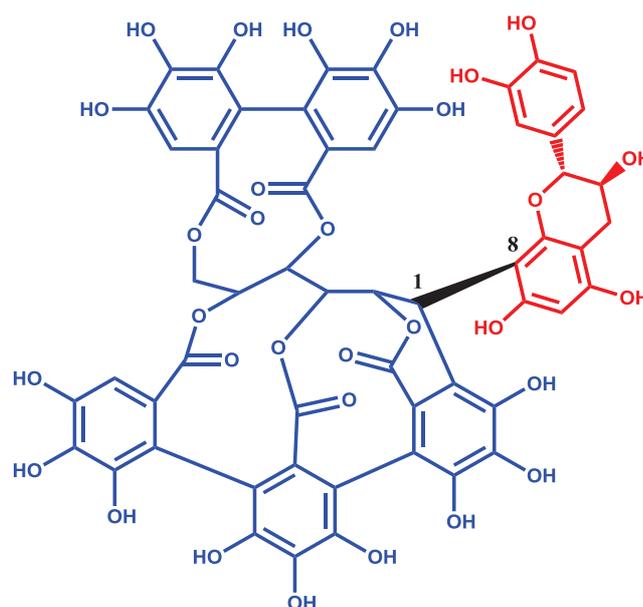


Figure I.10: Acutissimine présent dans les chênes, en rouge la catéchine (tanin condensé) et la vescalagine en bleue (tanin hydrolysable).

A.3] Les tanins condensés

Les tanins condensés, catéchiques ou proanthocyanidines sont des polymères plus ou moins complexes du flavan-3-ol (**Figure I.11**). La condensation donne des dimères, des oligomères et des polymères, présents dans la peau, les pépins de raisin et le vin. Ils sont extraits des grappes de raisins, leur concentration est de 1 à 4 g/L dans les vins rouges de Bordeaux. Les flavanols sont connus aussi pour être potentiellement antioxydants, captant les radicaux libres *in vitro* et *in vivo* [1, 4, 49-52].

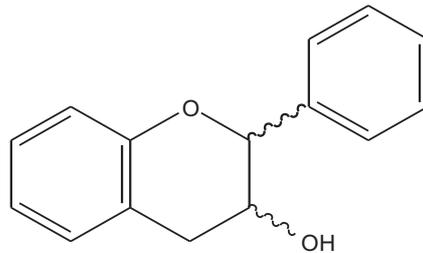


Figure I.11: Flavan-3-ol.

Les monomères

Les deux principales unités monomériques rencontrées sont la (+)-catéchine et la (-)-épicatéchine, qui ont un squelette carboné C6-C3-C6 commun à tous les flavanoïdes. Les caractéristiques principales sont (**Figure I.12**) :

- deux cycles phénoliques reliés par un hétérocycle oxygéné saturé (noyau phényl-2-chromane),
- deux centres asymétriques C2 et C3 qui conduisent à 4 isomères,
- le C2 est exclusivement de stéréochimie R dans le raisin et le vin,
- le cycle A est nommé phloroglucinol,
- le cycle B est un cycle catéchol,
- le cycle C est un cycle pyrane.

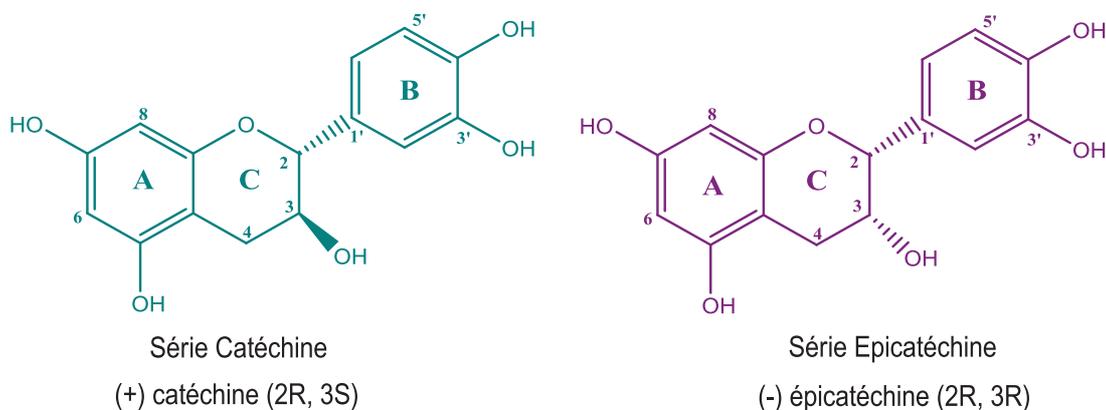


Figure I.12 : Structures des flavan-3-ols, précurseurs des tanins

La (+)-catéchine et la (-)-épicatéchine diffèrent seulement par la stéréochimie du groupement hydroxyle en position C3 du cycle pyrane (C). Les unités monomériques vont se condenser et donner des proanthocyanidines dimères, oligomères et polymères. Lorsque le cycle B est dihydroxylé les tanins condensés sont nommés procyanidines [53].

Les dimères

Les dimères résultent de la condensation de deux unités flavan-3-ol. A ce jour, deux types de dimères sont connus, répartis en types A et B.

Dimères de type A (C₃₀H₂₄O₁₂)

Les dimères de type A sont présents en faible quantité dans le vin ; la liaison interflavane se fait soit en C4/C6, soit en C4/C8, plus une liaison éther entre C5 ou C7 de l'unité terminale et C2 de l'unité supérieure (**Figure I.13**) Le dimère le plus connu présent dans le vin est A₂ [2, 54, 55].

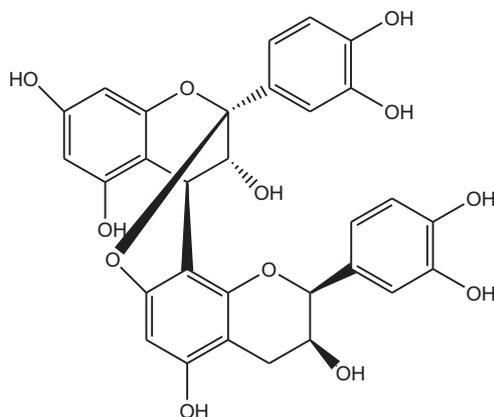


Figure I.13: Proanthocyanidine A₂, liaison interflavane en C4-C8 et liaison éther en C5-C2

Dimères de type B (C₃₀H₂₆O₁₂)

Deux types d'unités monomériques (Cat/Epi) associées par deux types de liaisons (C4-C8 ; C4-C6) interflavanes différentes, impliquent l'existence de 8 dimères différents (16 dimères potentiels en tenant compte de la stéréochimie de la liaison interflavane) (**Figure I.14**). Ces molécules sont flexibles ; elles possèdent trois centres chiraux :

- C2 du cycle C
- C3 du cycle C
- C4 du cycle C.

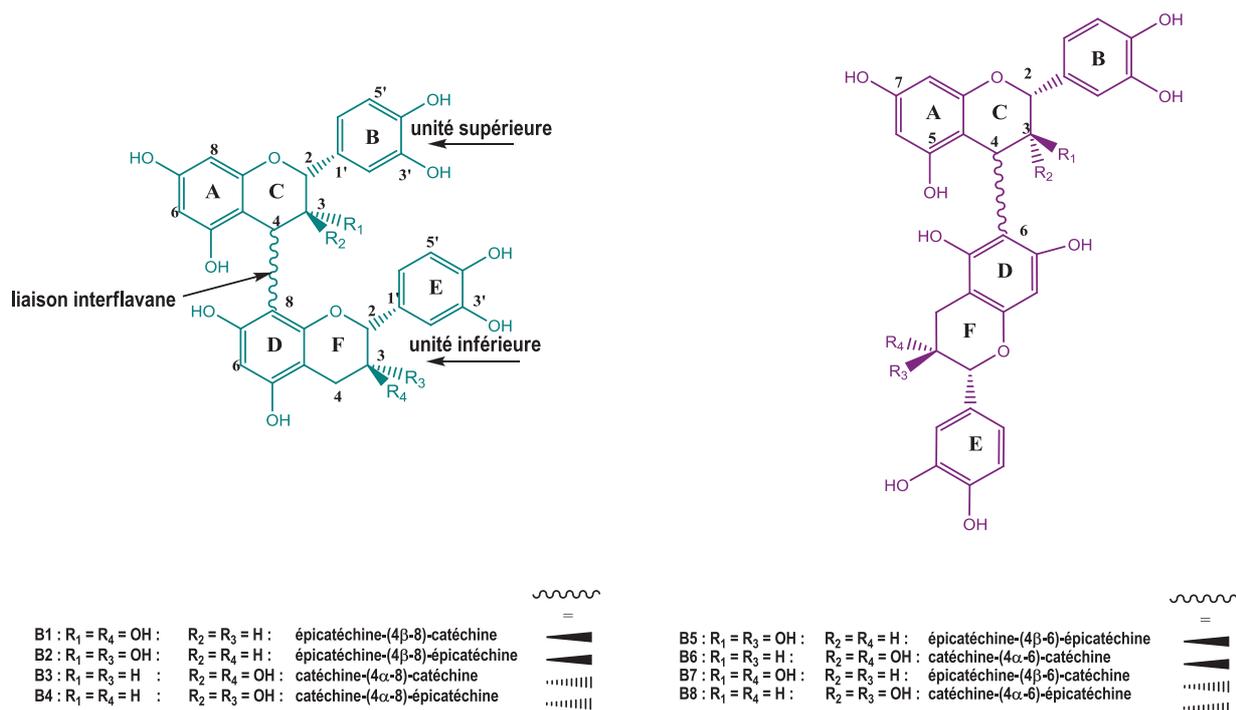


Figure I.14: Les huit dimères issus de l'épicatéchine et de la catéchine.

Les deux unités de flavan-3-ol sont reliées par une liaison interflavane. Elle peut se faire entre le C4 de l'hétérocycle C et le C8 du cycle phloroglucinol de l'unité inférieure, (dimères B1 à B4) ou entre C4 et C6 (dimères B5 à B8). La liaison interflavane peut adopter deux stéréochimies différentes :

- de type β quand l'épicatéchine est unité supérieure et l'unité inférieure est au dessus du plan du cycle C de l'unité supérieure.
- de type α quand la catéchine est entité supérieure et l'unité inférieure est en dessous du plan du cycle C de l'unité supérieure.

Au total huit dimères sont issus de la (+)-catéchine et de la (-)-épicatéchine. Le dimère B1 est celui que l'on retrouve le plus fréquemment en plus grande quantité dans le vin.

L'étude structurale par RMN^[49] des dimères a montré que B1, B2, B3 et B4 existent sous deux conformations ^[49, 56-59]

- une forme dite étendue lorsque les deux cycles aryles C et F sont opposés.
- une forme dite compacte lorsque les deux cycles C et F sont face à face.

Ce phénomène est lié à une restriction de la rotation au niveau de la liaison interflavane. Les résultats ont mis en évidence que le dimère B2 est présent sous les deux formes en quantité équivalente, tandis que B1,

B3 et B4 sont préférentiellement observés sous la forme compacte dans l'eau ou en solution hydro-alcoolique. Cependant dans d'autres solvants comme l'acétone la proportion varie (**Figure I.15**).

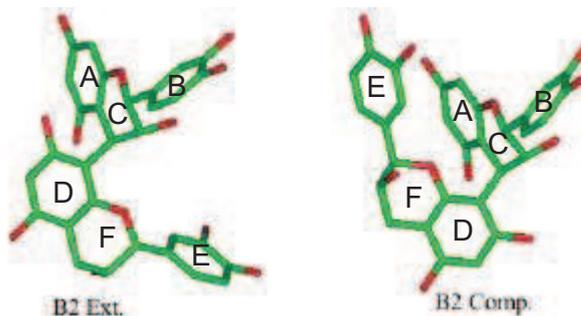


Figure I.15: à gauche B2 en forme étendue les cycles C et F sont opposés, à droite B2 en forme compacte les cycles C et F sont face à face^[48].

Le rapport de ces deux formes semble varier en fonction de la nature du dimère. Différentes études de RMN et de modélisation moléculaire ont montré que le cycle B opte préférentiellement pour la position pseudo équatoriale ^[56-59]. Cette conformation permet de rigidifier la structure du dimère et d'obtenir la structure la plus stable.

Oligomères, polymères

Les oligomères sont constitués de trois à dix unités (masse moléculaire comprise entre 900 et 3000 g/mol), tandis que les polymères présentent plus de dix unités de flavanol (masses moléculaires supérieures à 3000 g/mol).

Les liaisons interflavanes sont de la même nature que pour les dimères; ainsi on peut trouver 32 trimères différents, 128 tétramères distincts et ainsi de suite.

II.3. Les polyphénols choisis pour l'étude

Les flavanols sont des molécules largement impliquées dans la sensation d'astringence. Il est admis d'après différentes publications que l'astringence augmente avec le degré de polymérisation des flavanols. Cependant, les flavanols ne sont pas les seuls composés responsables de l'astringence, d'autres flavanoïdes interviennent dans ce phénomène.

En raison de la complexité phénomène d'astringence, il était indispensable d'élaborer un modèle d'étude simplifié, reposant sur une sélection de polyphénols modèles. Pour notre étude, plusieurs classes de composés phénoliques ont été retenues (**Figure I.16**). Ce choix s'appuie notamment sur des travaux de thèse antérieurs,

qui ont conduit à l'élaboration d'une échelle d'affinité entre une sélection de polyphénols et des peptides représentatifs de protéines salivaires (Benoît Plet, 2007) [60].

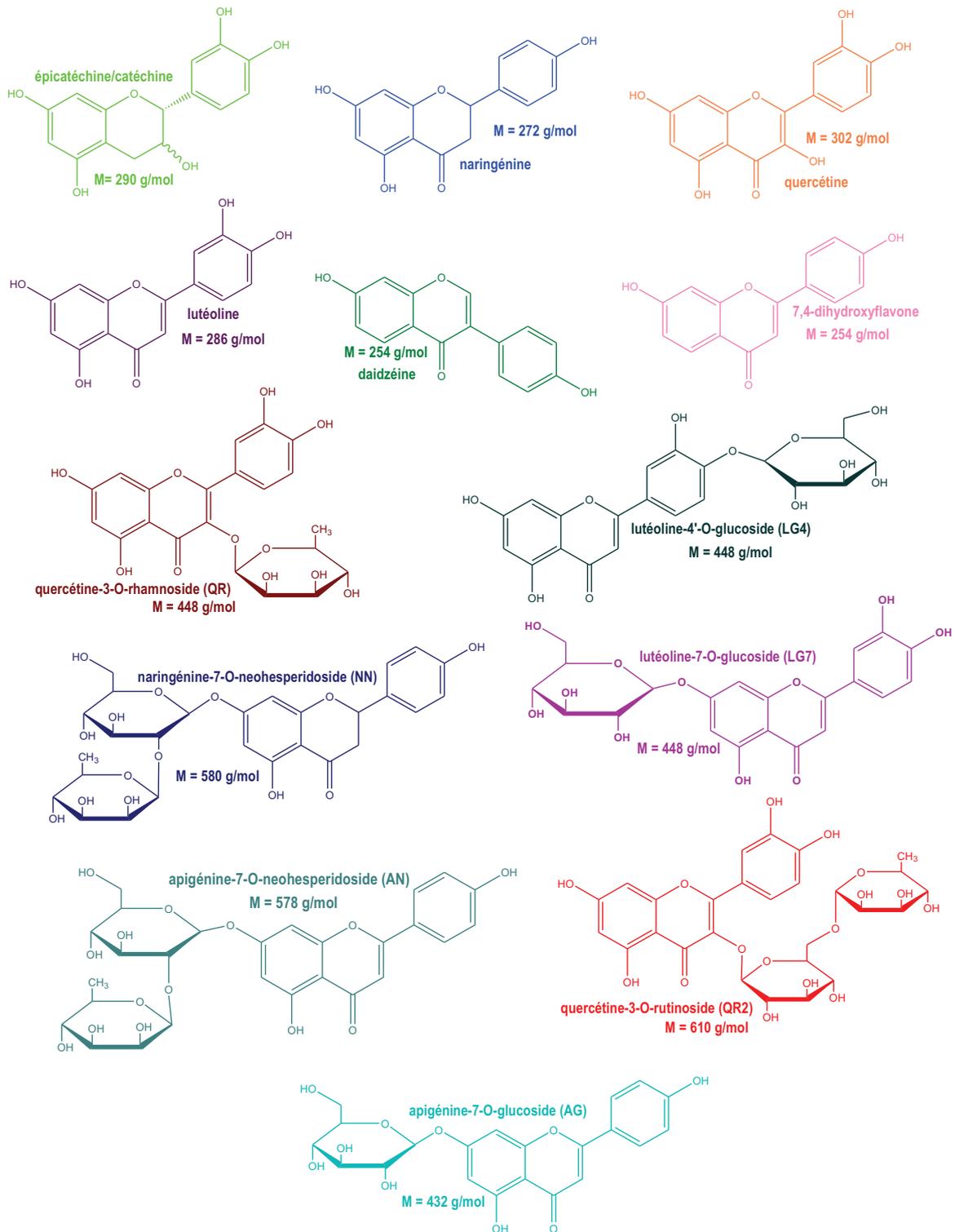


Figure I.16 : les différents polyphénols étudiés

III. Les protéines salivaires

La salive est une solution diluée aqueuse d'électrolytes, de tampons et de protéines ^[61], qui sont principalement produits par trois glandes salivaires (parotide, submandibulaire et sublinguale) ^[62]. Les trois glandes principales assurent 90 % de la production de la salive, les 10 % restant venant des glandes dites mineures (labiales) ^[16, 62]. La glande submandibulaire produit 65 %, la parotide 20 % et la sublinguale 8 % de la salive (**Schéma I.1**) ^[63]. La sécrétion journalière peut varier entre 1 à 5 litres de salive ^[63, 64].

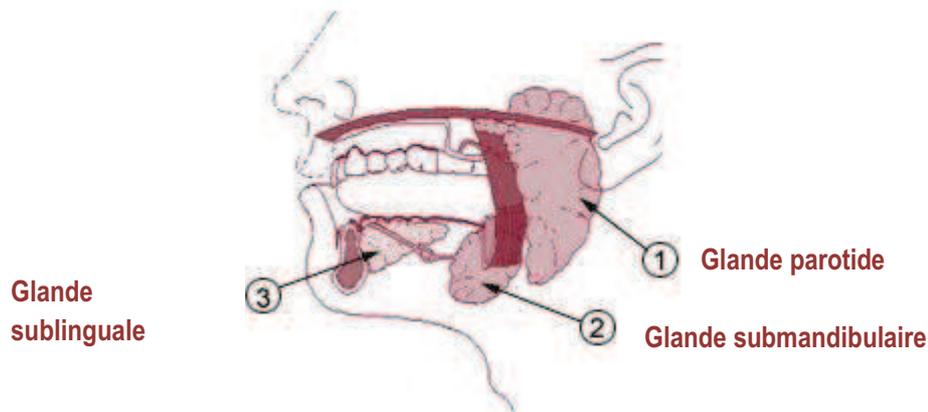


Schéma I.1 : Localisation des différentes glandes produisant les protéines salivaires

Cinq fonctions peuvent être attribuées à la salive ^[61-63, 65-67]:

- la lubrification et la protection
- une action de tampon
- la maintenance de l'intégrité dentaire
- une activité antimicrobienne
- une implication dans la digestion et la détermination du goût

La salive forme la première ligne de défense contre les attaques virales et bactériennes, et elle est la source des immunoglobulines. Parmi ce milieu complexe, 35 % des protéines sont des isoformes de l'alpha-amylase ^[68]; les protéines riches en proline représentent 30 % des protéines totales ^[69], les mucines 16 %, le reste des protéines salivaires étant constitué notamment des histatines (protéines riches en histidines), des cystatines, des stathérines, des lactoferrines ^[68] et d'autres protéines présentes à faible concentration (**Tableau 3**) ^[64]. A ce jour 1381 protéines salivaires distinctes de par leur structure et de par leur rôle sont connues ^[64, 70]. De plus, différentes études ont montré que le taux de sécrétion salivaire est propre à chaque individu. Ainsi pour une même personne, des différences de sécrétion sont observées d'un jour à l'autre, ce qui suggère une modulation de la sécrétion salivaire suivant le régime alimentaire.

Protéines salivaires	Sécrétion de la glande parotide	Sécrétion de la glande sublinguale et submandibulaire	Sécrétion salive entière
Amylase	650-2600	-	380-500
Mucines	-	101-790	90-700
Histatines	30-55	13-70	2-30
Stathérines	18-210	20-150	2-12
Protéines riches en prolines	230-1250	270-1335	90-180
Cystatines	2-4	92-280	240-280

Tableau I.2 : Concentrations ($\mu\text{g/mL}$) des protéines salivaires sécrétées par les différentes glandes ^[64]

III.1. L'alpha-amylase

Cette protéine est surtout produite par la glande parotide, mais elle est aussi synthétisée par le pancréas ^[64]. L'alpha-amylase est constituée de deux familles d'isoenzymes: la famille A glycosylée (63 kDa) et la famille B non glycosylée (59 kDa). L'amylase salivaire est absente de la sécrétion submandibulaire et sublinguale. Elle intervient dans la défense bactérienne, la protection des membranes muqueuses, l'activité antimicrobienne, l'homéostasie du calcium et des minéraux, ainsi que dans la lubrification des tissus oraux ^[71, 72]. Elle joue aussi un rôle partiel dans la digestion.

III.2. Les mucines

Deux types de mucines sont présentes parmi les protéines salivaires, MG1 et MG2 qui ont des hauts poids moléculaires (respectivement > 1 MDa et 250 kDa) ^[63, 64]. Ces protéines sont fortement glycosylées et elles présentent des séquences riches en prolines voisines de celles des protéines salivaires riches en prolines ^[64]. Elles sont localisées dans les cellules épithéliales, et jouent un rôle dans la protection de l'épithélium. De plus, elles interviennent aussi dans la lubrification, l'hydratation et la protection de la cavité orale.

III.3. Les cystatines

Les cystatines comme leur nom l'indique sont riches en cystéines, et regroupent quatre superfamilles ^[64]. Elles sont produites aussi bien par la parotide que les glandes sublinguale et submandibulaire. Parmi, les quatre superfamilles, la famille la plus connue comprend les cystatines S, SA, SN, C et D (de 120 à 122 résidus). Ces protéines contribuent au maintien de l'homéostasie des surfaces dentaires.

III.4. Les stathérines

Les stathérines sont des petites molécules sécrétées par la glande parotide, submandibulaire et sublinguale [64]. Elles sont les seules protéines à être capable d'inhiber la précipitation du calcium de phosphate [68]. Elles permettent aussi le maintien du fluide oral.

III.5. Les histatines

Ces protéines produites par les trois glandes salivaires sont riches en histidines (25%), et de faible masse moléculaire (inférieure à 5000 Da) [64, 73]. Les principales histatines sécrétées sont les histatines 1,3 et 5 qui représentent 80% de cette famille[68]. Elles ont un rôle défensif contre certains agents pathogènes [65].

III.6. Les protéines riches en prolines

Comme leur nom l'indique, ces protéines salivaires comportent une proportion élevée de résidus proline[69]. Elles représentent environ 30 % des protéines de la salive. Environ une vingtaine de protéines riches en prolines (PRP) sont connues chez l'homme [21, 74]. Cette famille est caractérisée par une homologie de séquence importante avec une forte proportion (70 à 80%) de résidus proline, glycine et glutamine. Les PRP sont regroupées en trois classes : les acides (45%), les basiques (30%), et les glycosylées (25%) [74]. Les PRP sont codées par 6 gènes localisés sur le chromosome 12p13.2. : deux gènes PRH1 et PRH2 codent pour les PRP acides, quatre gènes PRB1-PRB4 codent pour les PRP basiques (non glycosylées et glycosylées) [61, 75, 76]. Les gènes PRB1-PRB4 donnent naissance à des proprotéines qui subissent des modifications post-traductionnelles : clivage protéolytique, insertion ou suppression d'acide aminé, glycosylation [77].

III.6.1. Les protéines riches en prolines acides

Ces protéines sont produites par les glandes parotide, submandibulaire et sublinguale[66], et elles ont une masse moléculaire comprise entre 12 et 16 kDa [4, 69]. Leur rôle est de maintenir l'homéostasie de l'acide calcique dans la bouche, et elles favorisent la stabilisation du calcium et son transport[21, 78], mais elles participent aussi à la formation de la plaque dentaire [79].

III.6.2. Les protéines riches en prolines basiques glycosylées

Ces protéines sont codées par les gènes PRB3 et PRB4 [76], et elle sont sécrétées uniquement par la glande parotide [66]. Leur masse moléculaire varie entre 36 et 78 kDa. Elles résultent de la glycosylation des PRP basiques. Elles représentent environ 17 % des protéines salivaires. Ces protéines participent avec les mucines à

la lubrification de la muqueuse essentiellement grâce à leurs parties glycosylées. Elles ont des propriétés antibactériennes *via* un processus d'adhésion des bactéries, et antivirales [80].

III.6.3. Les protéines riches en prolines basiques non glycosylées

Ces protéines sont codées par les gènes PRB1 et PRB2, et elles sont sécrétées par la glande parotide [21, 66] comme les PRP glycosylées. Ces deux gènes conduisent à l'expression de proprotéines (environ 400 acides aminés), contenant plusieurs protéines riches en prolines basiques non glycosylées. Chez l'homme plus d'une vingtaine de PRPb ont été identifiées.

Ces protéines ont une structure fibrillaire (flexible et étendue) qui favorise les interactions avec les polyphénols ingérés. De ce fait, elles constituent une première barrière, un filtre capable de retenir des molécules qui peuvent être toxiques. Les trois acides aminés les plus représentés au sein de ces protéines, glycine, proline et glutamine, sont présents dans des enchaînements qui engendrent une conformation ouverte et étendue de la protéine [81]. Ces protéines sont constituées à près de 80 % des résidus proline, glycine et glutamine, la proline représentant à elle seule 40 %. La seule fonction connue à ce jour des PRPb, est de se lier aux polyphénols, formant ainsi des complexes stables qui vont précipiter en bouche. Cette propriété est à l'origine de la sensation d'astringence.

Les acides aminés basiques, arginine et lysine, représentent environ 10 % de la séquence. La plus basique des PRPb est IB9 (Tableau 4).

IB4	SPPGKPQGPP QEGNNPQGPPPPAGGNPQQPQAPPAGQPQGPPRPPQGGRPSRPPQ ⁵⁶
IB5	SPPGKPQGPP QEGNKQPQGP PPGKPQGPP PPGGNPQQPQAPPAGKPQGPPPPQGGRPPRPAQGGQPPQ ⁷⁰
IB6	SPPGKPQGPP PQGGNQPGPP PPGKPQGPP PQGGNKQGGPP PPGKPQGPP AQGGSKRSARSPPGKPQGPP ⁷³
IB7	SPPGKPQGPP PQGGNQPGPP PPGKPQGPP PQGGNKQGGPP PPGKPQGPP AQGDNKS ⁵⁹
IB9	SPPGKPQGPP PQGGNQPGPP PPGKPQGPP PQGGNRQGGPP PPGKPQGPP AQGDKRSR ⁶¹
IB8c	SPPGKPQGPP PQGGNQPGPP PPGKPQGPP PQGGNRQGGPP PPGKPQGPP AQGGSKRSA ⁶¹
IB8a	SPPGKPQGPP PQGGNQPGPP PPGKPQGPP PQGGNKQGGPP PPGKPQGPP PQGDNKSQSAKPQGGPPQGGKPQGPPQGGNKQGGPP PPGKPQGPP QEGNNPQGPPPPAGGNPQGGSKSR ¹²⁸

Tableau I.3: Séquences de différentes PRP basiques

Ces protéines possèdent une forte homologie de séquence : dans chaque séquence de protéines, un motif de cinq acides aminés PQGPP et un motif de neuf acides aminés PPGKPQGPP sont répétés plusieurs fois. De plus, la séquence de IB7 est reprise dans la majorité des protéines basiques.

III.7. Les protéines salivaires retenues pour l'étude

Dans le but d'élaborer un modèle d'étude simplifié, nous avons choisi dans un premier temps un peptide de protéines riches en prolines basiques qui a fait l'objet de différentes études en résonance magnétique nucléaire (Thèse de Cécile Simon) [82], en modélisation (Michel Laguerre) et en spectrométrie de masse (thèse de Benoît Plet) [60]. Ce peptide est un segment de 14 acides aminés issu de la structure primaire d'IB7 et préparé par synthèse en phase solide ; il est désigné par IB7₁₄ (**Figure I.17**). Ce peptide est présent au sein de plusieurs protéines riches en prolines basiques, et les résultats des études entreprises sur ce peptide par un faisceau de méthodes (RMN, dichroïsme circulaire, modélisation moléculaire, spectrométrie de masse) ont montré qu'il était un mime représentatif des PRPb.



Figure I.17 : Séquence primaire de la protéine IB7, en rouge délimitation du peptide IB7₁₄.

Dans un second temps, l'ensemble des protéines salivaires a été pris en compte. Pour cette étude, de la salive humaine a été récoltée grâce à différents volontaires.

IV. Les interactions mises en jeu

Plusieurs interactions interviennent dans l'association polyphénols/ protéines (**Figure I.18**) [21, 83]:

- les liaisons hydrogènes,
- les effets hydrophobes,
- les interactions ioniques,
- les forces de Van der Waals

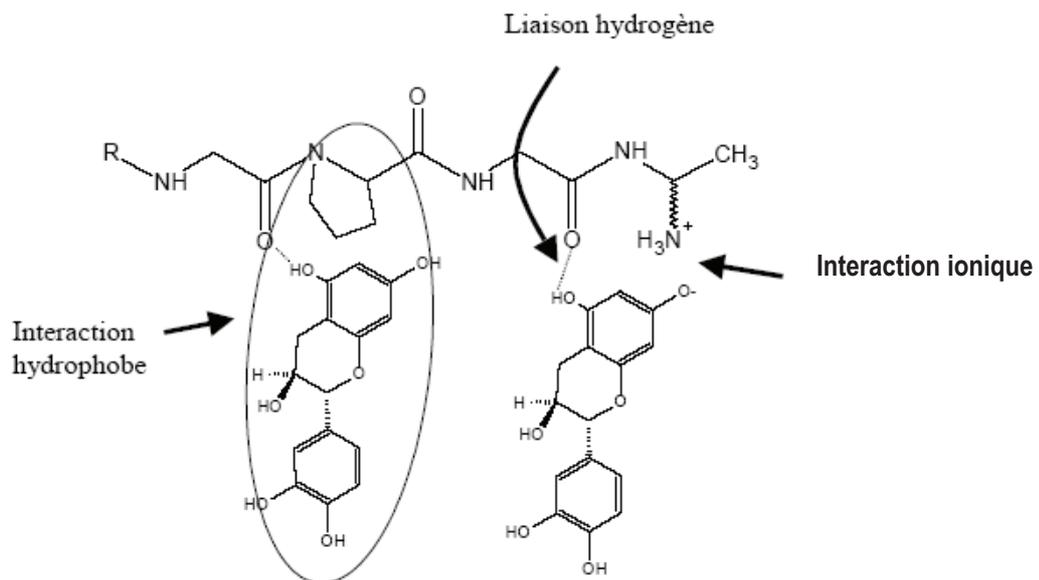


Figure I.18 : les différentes interactions polyphénols/protéines

Le noyau phénolique permet d'engendrer plusieurs types d'interactions : les interactions de dispersion (Van Der Waals) interviennent avec des résidus d'acides aminés peu polaires. Deux théories s'opposent quand à l'intervention des liaisons hydrogènes et des effets hydrophobes, pour expliquer le mécanisme d'interaction entre les composés phénoliques et les protéines salivaires. Pour Haslam, les interactions qui gouvernent principalement la complexation sont les interactions hydrophobes, tandis que pour Hagerman et Butler ce sont principalement les interactions hydrophiles. Les principales interactions gouvernant le complexe vont être développées dans le paragraphe suivant.

IV.1. Les effets hydrophobes

Les effets hydrophobes ^[9] sont dus à la présence de multiples sites aromatiques dans la structure des polyphénols d'une part, et d'autre part à celle des résidus Proline, et donc de la chaîne CH₂-CH₂-CH₂ du cycle pentagonal, qui permet l'association avec les noyaux aromatiques (*stacking* σ - π , **Figure I.19**) ^[19, 83-85].

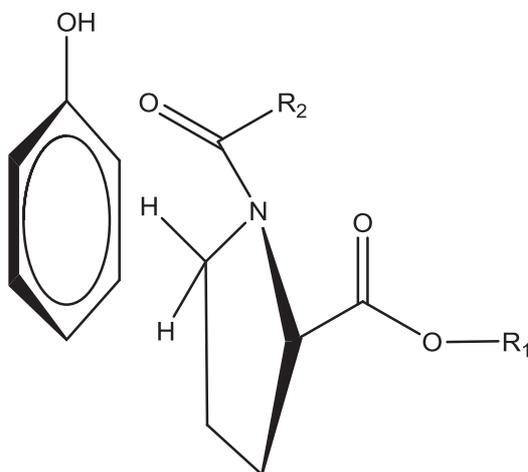


Figure I.19: Interaction par σ - π stacking entre un phénol et un résidu proline

Avec les histatines le *stacking* se fait entre les hétérocycles de type imidazole des histidines et les aromatiques des polyphénols ^[86].

D'après différentes études, les effets hydrophobes interviennent en premier. Les forces de Van Der Waals vont ensuite contribuer à la stabilisation du complexe. Quand au caractère multidentate des polyphénols, il permet de renforcer ces effets par *stacking* π - π entre polyphénols ^[87].

IV.2. Liaisons hydrogènes

Pour Hagerman et Butler ^[22], les liaisons hydrogènes sont la force majeure de stabilisation du complexe polyphénol/protéine. Ces liaisons se créent entre les fonctions hydroxyles des polyphénols et les carbonyles de la protéine ^[85]. La haute affinité des PRP basiques avec les polyphénols est due à la conformation ouverte de ces protéines et à leur capacité à former des liaisons hydrogènes avec les polyphénols ^[59, 88]. Un acteur majeur est la proline (renforcement du rôle du carbonyle par l'amine tertiaire, **Figure I.20**) ^[21, 83, 88]. Par ailleurs, en présence de prolines successives ^[10, 89], ce qui représente une situation souvent répétée dans le cas des PRPs, les sites préférentiels pour former des liaisons hydrogènes sont renforcés, et les protéines ont tendance à adopter une structure en feuillet bêta susceptible d'envelopper le polyphénol en interaction avec elles.

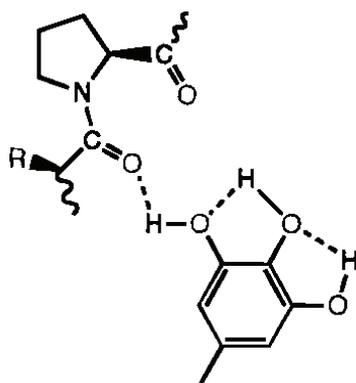


Figure I.20: rôle de la proline dans la formation de liaisons hydrogènes

Certains travaux ont montré que le degré de polymérisation des polyphénols favorise les liaisons hydrogènes. Dans un précédent travail de thèse, Cécile Simon ^[82] a montré grâce à l'expérience de dynamique moléculaire menée par Michel Laguerre ^[88], que le dimère B2 venait interagir avec le peptide IB7₁₄ par sa face hydrophile. La conformation de plus basse énergie obtenue à l'issue de cette dynamique moléculaire est présentée sur la **Figure I.21**.

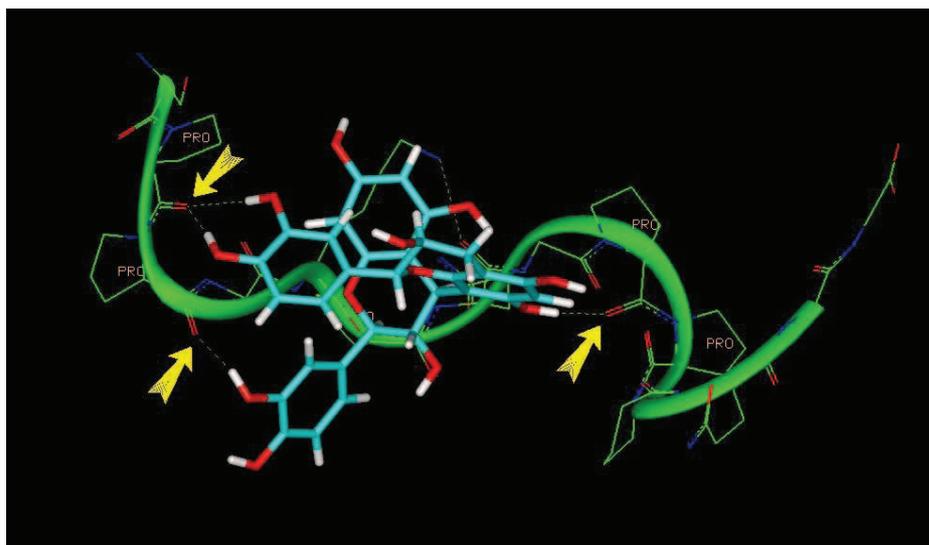


Figure I.21: Interaction résultant de la modélisation moléculaire. Le ruban vert représente la protéine IB7₁₄, et en bleu cyan le tannin B2. Les flèches jaunes montrent les liaisons hydrogènes entre carbonyles de la protéine et hydrogènes des hydroxyles du polyphénol .

Par ailleurs, la détection par spectrométrie de masse des complexes non-covalents entre un peptide IB7₁₄ et un dimère B3 a apporté une preuve supplémentaire de la forte contribution des liaisons hydrogène à l'interaction ^[60].

IV.3. L'affinité de la complexation

L'affinité des polyphénols vis-à-vis des protéines ainsi que la stabilité du complexe dépendent de nombreux facteurs : la température, le solvant utilisé, le pH, le temps de réaction, la nature des protéines et des polyphénols, la stœchiométrie et la concentration [21, 90-94]. La teneur en éthanol n'intervient pas dans le mécanisme de complexation [95]. Les structures tridimensionnelles des protéines et des flavanoïdes sont bien sûr un facteur crucial.

La forte teneur en résidu proline et glycine confère une structure ouverte et souple aux protéines, facilitant ainsi l'approche des polyphénols [1, 87]. L'affinité de la complexation est fonction de la taille et de la conformation des protéines salivaires [96] : les segments peptidiques de PRP montrent moins d'affinité envers les polyphénols que les protéines entières. Un peptide de 14 ou 22 acides aminés présente une constante d'affinité de l'ordre du mM tandis qu'une protéine entière de 60 acides aminés a une constante d'affinité de l'ordre du μM . Une protéine de grande taille a la possibilité de se replier sur elle-même et d'envelopper le polyphénol [89, 92]. De plus, le nombre de sites de fixation augmente [60, 86, 97] avec le nombre d'acides aminés ou de répétition de motifs homologues riches en proline chez les PRP (**Tableau 3**). Cependant, certaines études ont mis en évidence que l'absence de structure secondaire dans les protéines à chaîne courte pourrait favoriser l'établissement de complexes insolubles.

La capacité des polyphénols à interagir avec les protéines dépend du nombre de cycles phénoliques. L'astringence augmente avec le degré de polymérisation des polyphénols, puis diminue à partir de 8 unités monomériques [98]. Le nombre de fonctions *o*-diphénol favorise l'interaction [1]. La liaison interflavane est aussi un paramètre important, car une liaison en C4-C6 est plus forte énergétiquement qu'une liaison C4-C8, permettant ainsi d'avoir une conformation préférentielle du polyphénol [1, 99].

Lorsque la concentration en protéines est faible (le ratio polyphénols/protéines augmente), le mécanisme d'interaction qui a été décrit implique une répartition des polyphénols en monocouche à la surface des protéines, entraînant ainsi une diminution du caractère hydrophile des protéines, une insolubilité des complexes et leur précipitation [1, 92, 94].

Quand la concentration en protéines est élevée (le ratio polyphénols/protéines diminue), les polyphénols, qui sont des ligands multidentates, peuvent se lier simultanément à plusieurs sites de la protéine, renforçant ainsi les interactions hydrophobes. Ces ligands servent d'agent de pontage entre les différentes molécules [1, 94].

Les concentrations relatives en tanins et en protéines influent donc sur la formation des complexes et sur leur précipitation [16, 94, 95]. A de faibles concentrations le mécanisme s'effectue en trois étapes, tandis qu'à de hautes concentrations il n'y a qu'une seule étape (voir ci-dessous) [2]. Le pH, la force ionique ou la teneur en éthanol du milieu influent sur l'agrégation et la précipitation mais n'ont que peu d'effets sur la formation des complexes.

IV.4. Aspects mécanistiques de la complexation

Actuellement, deux mécanismes ont été proposés pour expliquer le mécanisme d'interaction à de faibles concentrations [3, 60, 99-102]. La différence entre ces deux mécanismes intervient dès la première étape.

a)Premier mécanisme

Première étape : les protéines sont libres et en conformation étendue. Plusieurs molécules de polyphénols vont simultanément se lier sur plusieurs sites de la même protéine. Cette addition peut se faire grâce aux propriétés multidentates des polyphénols. La taille de la protéine va diminuer et sa structure sera plus compacte.

Deuxième étape : les polyphénols sont complexés sur les surfaces des protéines et permettent la dimérisation.

Troisième étape : les dimères de protéines vont s'agréger les uns aux autres. Le résultat sera une particule de grande taille qui va alors précipiter en solution (**Figure I.22**).

b)Deuxième mécanisme

Première étape : les polyphénols vont s'agréger les uns sur les autres (ceci est dû à leur caractère multidentate), et ainsi former des agrégats ou particules colloïdales.

Deuxième étape : les particules colloïdales vont se lier sur la surface de la protéine.

Troisième étape : les agrégats sont complexés sur les surfaces des protéines entraînant la dimérisation. Les complexes formés vont ainsi s'agréger les uns et autres et précipiter en solution (**Figure I.22**).

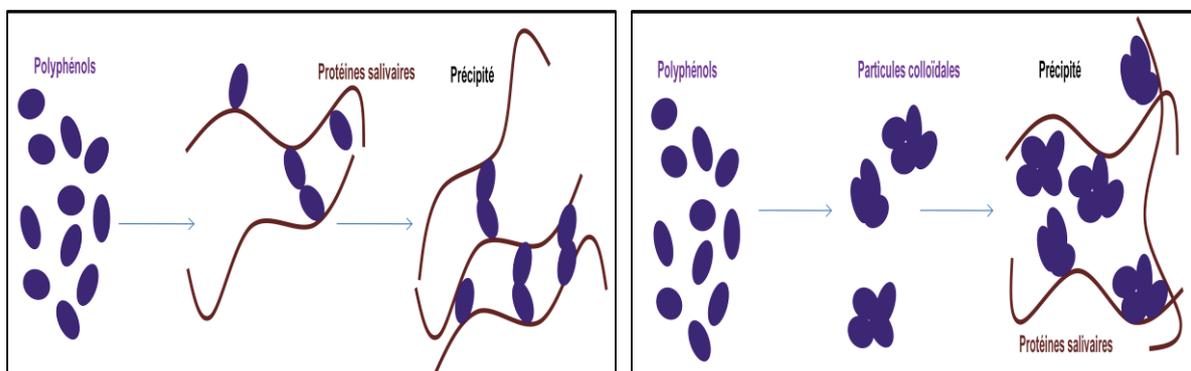


Figure I.22 : Deux mécanismes modèles de l'astringence se réalisant en trois étapes

V. LES DIFFERENTES ETUDES

Les interactions entre les protéines salivaires et les polyphénols sont étudiées depuis une dizaine d'années. Les techniques d'analyses utilisées sont variées : HPLC [103, 104], électrophorèse SDS-PAGE 1D [20, 87, 94, 98, 105, 106], RMN [10, 41, 74, 86, 88, 89, 100, 101, 107], dichroïsme circulaire [11, 81, 92], dynamique moléculaire [91, 100, 108], néphélométrie [19, 109, 110], fluorescence [72, 111], FTIR [112], spectrométrie de masse [109, 113, 114]. De ces études, il se dégage d'une part que les polyphénols et les PRP sont capables d'interagir fortement. Cependant, la nature des interactions mises en jeu pour la formation du complexe reste matière à débat. Certains auteurs indiquent que ce sont les interactions hydrophiles et la formation de liaisons hydrogènes qui permettent la formation du complexe, d'autres expliquent que ce sont les effets hydrophobes, notamment avec l'empilement possible des phénols sur les résidus prolines, qui sont à l'origine de cette interaction. D'autre part, la plupart des études sur ces interactions à l'origine de l'astringence sont effectuées sur des mélanges de polyphénols ou sur des monomères galloylés ou non, mais les études sur les polyphénols modèles isolés en interaction avec des protéines sont rares. De même, une protéine (ou un peptide représentatif) ou une partie des protéines salivaires est prise en compte pour simuler les interactions avec les polyphénols.

VI. LES OBJECTIFS DE LA THESE

L'étude des interactions entre les polyphénols et les protéines salivaires a souvent été réalisée au moyen de méthodes analytiques variées comme nous l'avons évoqué plus haut. La spectrométrie de masse supramoléculaire, utilisant l'ionisation par électronébulisation, a permis d'étudier de tels complexes. Notamment, au cours de sa thèse soutenue en 2007, Benoît Plet ^[60] a développé une approche reposant sur la spectrométrie de masse résolue en énergie (ERMS). La dissociation contrôlée au sein d'un piège ionique des complexes polyphénol-peptide, impliquant notamment IB7₁₄, a permis de proposer une échelle d'affinité relative en phase gazeuse. La méthode utilisée ainsi que l'échelle d'affinité seront présentées ultérieurement. Néanmoins, il ressortait clairement de cette étude qu'il était souhaitable d'obtenir un contrôle et une validation en phase liquide de l'échelle d'affinité obtenue.

Dès lors, prenant ce travail comme base de départ, nous nous sommes fixés pour objectif de mettre au point une méthode d'analyse cantonnée au seul milieu hydro alcoolique, afin de tenter de valider l'échelle d'affinité déterminée en phase gazeuse.

Par ailleurs, les travaux réalisés en ERMS reposaient sur un système modèle composé d'un peptide représentatif d'une PRP et de polyphénols modèles. De fait, cette méthodologie était très difficilement adaptable à l'étude de mélanges complexes de polyphénols tels qu'ils sont présents dans un vin. Nous avons donc inclus dans notre objectif la conception d'une méthodologie permettant de résoudre cette difficulté.

Dans un premier temps, nous présenterons donc brièvement les travaux de Benoît Plet en mode ERMS, puis la stratégie envisagée pour travailler en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse. Les différentes techniques d'analyses utilisées pour étudier les interactions seront présentées dans le chapitre 3. Ensuite, nous décrirons les travaux réalisés dans le cadre des deux stratégies retenues pour faire progresser notre connaissance des interactions protéines/polyphénols, et obtenir une échelle d'affinité en phase liquide permettant de valider ou non celle obtenue en phase gazeuse.

Dans un second temps, nous essaierons de transposer nos deux stratégies à plus grande échelle, de travailler non pas avec un fragment synthétique de protéine, mais directement avec des protéines salivaires. Ces protéines présentes dans la salive humaine seront soumises à des étapes de fractionnement pour faciliter leur caractérisation et déterminer leur implication dans le phénomène d'astringence. Un fractionnement sera aussi appliqué aux polyphénols naturels extraits du vin rouge.

VII. BIBLIOGRAPHIE

1. Sarni-Manchado, P. and V. Cheynier, *Les polyphénols en agroalimentaire*, ed. P.T.D. Lavoisier. 2006. 398.
2. Ribéreau-Gayon, *Traité d'oenologie. Tome 2.* . Dunod ed. Chimie du vin, Stabilisation et Traitement. Vol. Tome 2. 1998.
3. Haslam, E., *Natural Polyphenols (Vegetable Tannins) as Drugs: Possible Modes of Action.* J. Nat. Prod., 1996. **59**(2): p. 205-215.
4. Gawel, R., *Red wine astringency: A review.* Aust. J. Grape. Wine. R., 1998. **4**(2): p. 74-95.
5. Blouin, J. and J. Cruège, *Analyse et Composition des Vins*, ed. C.I. vin. 2003: Dunod.
6. Jackson, R.J., *Wine Tasting A Professional Handbook*, ed. F.S.T.I. Series. 2002.
7. Green, B.G., *Oral astringency: A tactile component of flavor.* Acta Psychol., 1993. **84**(1): p. 119-125.
8. Gawel, R., & al., *Characterizing the astringency of red wine: a case study.* Food Qual. Prefer., 2001. **12**(1): p. 83-94.
9. Guest, S., & al., *The effect of oral drying and astringent liquids on the perception of mouth wetness.* Physio. Behav., 2008. **93**(4-5): p. 889-896.
10. Baxter, N.J., & al., *Multiple Interactions between Polyphenols and a Salivary Proline-Rich Protein Repeat Result in Complexation and Precipitation.* Biochemistry, 1997. **36**(18): p. 5566-5577.
11. Jobstl, E., & al., *Molecular Model for Astringency Produced by Polyphenol/Protein Interactions.* Biomacromolecules, 2004. **5**(3): p. 942-949.
12. Rossetti, D., & al., *Astringency of tea catechins: More than an oral lubrication tactile percept.* Food Hydrocolloids, 2009. **23**(7): p. 1984-1992.
13. Bate-Smith, E.C., *Haemanalysis of tannins: the concept of relative astringency.* Phytochemistry, 1973. **12**(4): p. 907-912.
14. Gawel, R., & al., *A 'Mouth-feel Wheel': terminology for communicating the mouth-feel characteristics of red wine.* Aust. J. Grape. Wine. R., 2000. **6**(3): p. 203-207.
15. Monteleone, E., & al., *Prediction of perceived astringency induced by phenolic compounds.* Food Qual. Prefer., 2004. **15**(7-8): p. 761-769.
16. Rossetti, D., & al., *Interaction of human whole saliva and astringent dietary compounds investigated by interfacial shear rheology.* Food Hydrocolloids, 2008. **22**(6): p. 1068-1078.
17. Schwarz, B., & al., *Is there a direct relationship between oral astringency and human salivary protein binding?* Eur. Food Res. Tech., 2008. **227**(6): p. 1693-1698.
18. Kallithraka, S., & al., *Effect of pH on Astringency in Model Solutions and Wines.* J. Agric. Food Chem., 1997. **45**(6): p. 2211-2216.
19. Charlton, A.J., & al., *Polyphenol/Peptide Binding and Precipitation.* J. Agric. Food Chem., 2002. **50**(6): p. 1593-1601.
20. Lu, Y., & al., *Interaction of tannin with human salivary proline-rich proteins.* Arch. Oral Biol., 1998. **43**(9): p. 717-728.
21. Bennick, A., *Interaction of plant polyphenols with salivary proteins.* Crit. Rev. Oral Biol. Med., 2002. **13**(2): p. 184-196.
22. Hagerman, A.E., & al., *The specificity of proanthocyanidin-protein interactions.* J. Biol. Chem., 1981. **256**(9): p. 4494-4497.
23. Lee, C.B., & al., *Time-course of astringent sensations.* Chem. Sens., 1991. **16**(3): p. 225-238.
24. Bate-Smith, E.C., *Astringency in foods.* Food, 1954. **23**: p. 124-135.
25. Arapitsas, P., & al., *Characterisation of anthocyanins in red cabbage using high resolution liquid chromatography coupled with photodiode array detection and electrospray ionization-linear ion trap mass spectrometry.* Food Chem., 2008. **109**(1): p. 219-226.
26. Petti, S., & al., *Polyphenols, oral health and disease: A review.* J. Dent., 2009. **37**(6): p. 413-423.
27. Karvela, E., & al., *Extraction of phenolics in liquid model matrices containing oak chips: Kinetics, liquid chromatography-mass spectroscopy characterisation and association with in vitro antiradical activity.* Food Chem., 2008. **110**(1): p. 263-272.
28. Hong, C.-Y., & al., *Selective enrichment of ochratoxin A using human serum albumin bound magnetic beads as the concentrating probes for capillary electrophoresis/electrospray ionization-mass spectrometric analysis.* J. Chromatogr. A, 2007. **1159**(1-2): p. 250-255.

29. Hackman, M.R., & al., *Flavanols: digestion, absorption and bioactivity*. *Phytochem. Rev.*, 2008. **7**(1): p. 195-208.
30. Teissedre, P.L., & al., *Inhibition of In Vitro human LDL oxidation by phenolic antioxidants from grape and wines*. *J. Sci. Food Agric.*, 1996. **70**: p. 55-61.
31. Landrault, N., & al., *Antioxidant Capacities and Phenolics Levels of French Wines from Different Varieties and Vintages*. *J. Agric. Food Chem.*, 2001. **49**(7): p. 3341-3348.
32. Mohammad Ali Ghaffari, S.M., *Influence of flavonols as in vitro on low density lipoprotein glycation*. *iranian biomedical journal*, 2007. **11**(3): p. 185-191.
33. Williams, C.A., & al., *Anthocyanins and other flavonoids*. *Nat. Prod. Rep.*, 2004. **21**: p. 539-573.
34. Harborne, J.B., & al., *Anthocyanins and other flavonoids*. *Nat. Prod. Rep.*, 2001. **18**: p. 310-333.
35. Krisa, S., & al., *Production, purification et activité biologique des picéïdes extraits de cultures cellulaires de vitis vinifera L*. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 1997. **136**: p. 7-18.
36. Lee, J., & al., *Antioxidant capacity and stilbene contents of wines produced in the Snake River Valley of Idaho*. *Food Chem.*, 2007. **105**(1): p. 195-203.
37. Vitrac, X., & al., *Determination of Stilbenes (delta;-viniferin, trans-astringin, trans-piceid, cis- and trans-resveratrol, sigma;-viniferin) in Brazilian Wines*. *J. Agric. Food Chem.*, 2005. **53**(14): p. 5664-5669.
38. Havsteen, B.H., *The biochemistry and medical significance of the flavonoids*. *Pharmacol. Therapeut.*, 2002. **96**(2-3): p. 67-202.
39. Lin, L.-Z., & al., *Identification and quantification of flavonoids of Mexican oregano (Lippia graveolens) by LC-DAD-ESI/MS analysis*. *J. Food Compos. Anal.*, 2007. **20**(5): p. 361-369.
40. Winkel-Shirley, B., *Flavanoids biosynthesis: a colorful model for genetics, biochemistry, cell biology and biotechnology*. *Plant Physiology*, 2001. **126**: p. 485-493.
41. Mateus, N., & al., *Identification of Anthocyanin-Flavanol Pigments in Red Wines by NMR and Mass Spectrometry*. *J. Agric. Food Chem.*, 2002. **50**(7): p. 2110-2116.
42. Wang, H., & al., *Characterization of Anthocyanins in Grape Juices by Ion Trap Liquid Chromatography~Mass Spectrometry*. *J. Agric. Food Chem.*, 2003. **51**(7): p. 1839-1844.
43. Dangles O., a., *Antioxidant properties of anthocyanins and tannins: A mechanistic investigation with catechin and the 3',4',7-trihydroxyflavylium ion*. *J. Chem. Soc.*, 2000(8): p. 1653-1663.
44. Chung, K.T., & al., *Tannins and human health: a review*. *Cr. Rev. Food Sci. Nut.*, 1998. **38**(6): p. 421-464.
45. Saucier, C., & al., *Extraction, Detection, and Quantification of Flavano-Ellagitannins and Ethylvescalagin in a Bordeaux Red Wine Aged in Oak Barrels*. *J. Agric. Food Chem.*, 2006. **54**(19): p. 7349-7354.
46. Saucier, C., & al., *Characterization of (+)-Catechin−Acetaldehyde Polymers: A Model for Colloidal State of Wine Polyphenols*. *J. Agric. Food Chem.*, 1997. **45**(4): p. 1045-1049.
47. Quideau, S., & al., *The Chemistry of Wine Polyphenolic C-Glycosidic Ellagitannins Targeting Human Topoisomerase II*. *Chem. Eur. J.*, 2005. **11**(22): p. 6503-6513.
48. Quideau, S., & al., *DNA Topoisomerase Inhibitor Acutissimin A and Other Flavano-Ellagitannins in Red Wine*. *Angew. Chem. Int. Edit.*, 2003. **42**(48): p. 6012-6014.
49. Hemingway, R.W., & al., *Conformation and Complexation of Tannins: NMR Spectra and Molecular Search Modeling of Flavan-3-ols*. *Magn. Reson. Chem.*, 1996. **34**(6): p. 424-433.
50. Tarascou, *Synthèse et caractérisation de procyanidines oligomères pour l'identification de tanins du raisin et du vin*, in *Université de bordeaux 1*. 2005, Bordeaux 1: Bordeaux. p. 187.
51. Goncalves, R., & al., *Inhibition of Trypsin by Condensed Tannins and Wine*. *J. Agric. Food Chem.*, 2007. **55**(18): p. 7596-7601.
52. Waghorn, G., *Beneficial and detrimental effects of dietary condensed tannins for sustainable sheep and goat production--Progress and challenges*. *Anim. Feed Sci. Tech.*, 2008. **147**(1-3): p. 116-139.
53. Sun, B., & al., *Isolation and purification of dimeric and trimeric procyanidins from grape seeds*. *J. Chromatogr. A*, 1999. **841**(1): p. 115-121.
54. Appeldoorn, M.M., & al., *Efficient isolation of major procyanidin A-type dimers from peanut skins and B-type dimers from grape seeds*. *Food Chem.*, 2009. **117**(4): p. 713-720.
55. Prior, R.L., & al., *Identification of Procyanidins and Anthocyanins in Blueberries and Cranberries (Vaccinium Spp.) Using High-Performance Liquid Chromatography/Mass Spectrometry*. *J. Agric. Food Chem.*, 2001. **49**(3): p. 1270-1276.
56. Tarascou, I., & al., *An Improved Synthesis of Procyanidin Dimers: Regio- and Stereocontrol of the Interflavan Bond*. *Eur. J. Org. Chem.*, 2006. **2006**(23): p. 5367-5377.

57. Khan, M.L., & al., *Structure and conformation of the procyanidin B-2 dimer*. Magn. Reson. Chem., 1997. **35**(12): p. 854-858.
58. Codorniu-Hernández, E., & al., *MO-calculations on the solvation effects on the structure of natural flavonoids in aqueous and acetone phases*. J. Mol. Struct., 2005. **715**(1-3): p. 227-239.
59. Tarascou, I., & al., *A 3D structural and conformational study of procyanidin dimers in water and hydro-alcoholic media as viewed by NMR and molecular modeling*. Magn. Reson. Chem., 2006. **44**(9): p. 868-880.
60. Plet, B., *La spectrométrie de masse dans l'étude de l'interaction entre protéines de la salive humaine et polyphénols. Vers une approche analytique de l'astringence du vin* in Bordeaux 2007, Bordeaux I. p. 209.
61. Wilmarth, P.A., & al., *Two-Dimensional Liquid Chromatography Study of the Human Whole Saliva Proteome*. J. Proteome Res., 2004. **3**(5): p. 1017-1023.
62. Lucchi, G., & al., *Mass-spectrometry based characterisation of infant whole saliva peptidome*. Int. J. Pept. Res. Ther., 2009. **15**(3): p. 177-185.
63. Humphrey, S.P. and R.T. Williamson, *A review of saliva: Normal composition, flow, and function*. J. Prothet. Dent., 2001. **85**(2): p. 162-169.
64. Oppenheim, F.G., & al., *Salivary Proteome and Its Genetic Polymorphisms*. Ann. NY. Acad. Sci., 2007. **1098**(1): p. 22-50.
65. Bennis, A., *Extraoral functions of salivary proteins*. J. Oral Biosci., 2007. **49**(1): p. 24-26.
66. Walz, A., et al., *Proteome analysis of glandular parotid and submandibular-sublingual saliva in comparison to whole human saliva by two-dimensional gel electrophoresis*. Proteomics, 2006. **6**(5): p. 1631-1639.
67. Hardt, M., & al., *Toward Defining the Human Parotid Gland Salivary Proteome and Peptidome: Identification and Characterization Using 2D SDS-PAGE, Ultrafiltration, HPLC, and Mass Spectrometry* Biochemistry, 2005. **44**(8): p. 2885-2899.
68. Castagnola, M., & al., *Determination of the human salivary peptides histatins 1, 3, 5 and statherin by high-performance liquid chromatography and by diode-array detection*. J. Chromatogr. B, 2001. **751**(1): p. 153-160.
69. Shimada, *salivary proteins as a defense against dietary tannins*. J. Chem. Ecol., 2006. **32**(6): p. 1573-1561.
70. Huq, N., & al., *A Review of the Salivary Proteome and Peptidome and Saliva-derived Peptide Therapeutics*. Int. J. Pept. Res. Ther., 2007. **13**(4): p. 547-564.
71. Zhang, J., & al., *Inhibition of Salivary Amylase by Black and Green Teas and Their Effects on the Intraoral Hydrolysis of Starch*. Caries Res., 1998. **32**(3): p. 233-238.
72. Rawel, H., M., & al., *Determining the binding affinities of phenolic compounds to proteins by quenching of the intrinsic tryptophan fluorescence*. Mol. Nutr. Food Res., 2006. **50**(8): p. 705-713.
73. Wróblewski, K., & al., *The molecular interaction of human salivary histatins with polyphenolic compounds*. Eur. J. Biochem., 2001. **268**(16): p. 4384-4397.
74. Murray, N.J., & al., *Conformational study of a salivary proline-rich protein repeat sequence*. Eur. J. Biochem., 1994. **219**(3): p. 915-921.
75. Messana, I., & al., *Characterization of the Human Salivary Basic Proline-Rich Protein Complex by a Proteomic Approach*. J. Proteome Res., 2004. **3**(4): p. 792-800.
76. Chan, M., & al., *Proteolytic processing of a human salivary proline-rich protein precursor by proprotein convertases*. Eur. J. Biochem., 2001. **268**(12): p. 3423-3431.
77. Fanali, C., & al., *Mass spectrometry strategies applied to the characterization of proline-rich peptides from secretory parotid granules of pig (Sus scrofa)*. J. Sep. Sci., 2008. **31**(3): p. 516-522.
78. Kauffman, D.L., & al., *Basic proline-rich proteins from human parotid saliva: relationships of the covalent structures of ten proteins from a single individual*. Biochemistry, 1991. **30**(14): p. 3351-3356.
79. Inzitari, R., et al., *Different isoforms and post-translational modifications of human salivary acidic proline-rich proteins*. Proteomics, 2005. **5**(3): p. 805-815.
80. Ramachandran, P., & al., *Identification of N-Linked Glycoproteins in Human Saliva by Glycoprotein Capture and Mass Spectrometry*. J. Proteome Res., 2006. **5**(6): p. 1493-1503.
81. Simon, C., & al., *Synthesis and circular dichroism study of the human salivary proline-rich protein IB7*. J. Pept. Sci., 2003. **9**(2): p. 125-131.
82. Simon, C., *Structure et dynamique de protéines de la salive humaine en interaction avec les tanins du vin de Bordeaux*, Thèse, Université de Bordeaux 1. 2003, pp. 220.

83. Murray, N.J., & al., *Study of the interaction between salivary proline-rich proteins and a polyphenol by H-NMR spectroscopy*. Eur. J. Biochem., 1994. **219**(3): p. 923-935.
84. Luck, G., et al., *Polyphenols, astringency and proline-rich proteins*. Phytochemistry, 1994. **37**(2): p. 357-371.
85. Croft, A.K., & al., *Proline-rich proteins deriving a basis for residue-based selectivity in polyphenolic binding*. Org. Biomol. Chem., 2008. **6**(9): p. 1594-1600.
86. Wróblewski, K., et al., *The molecular interaction of human salivary histatins with polyphenolic compounds*. Eur. J. Biochem., 2001. **268**(16): p. 4384-4397.
87. Sarni-Manchado, P., & al., *Interactions of Grape Seed Tannins with Salivary Proteins*. J. Agric. Food Chem., 1999. **47**(1): p. 42-47.
88. Simon, C., & al., *Three-Dimensional Structure and Dynamics of Wine Tannin-Saliva Protein Complexes. A Multitechnique Approach*. Biochemistry, 2003. **42**(35): p. 10385-10395.
89. Pascal, C., & al., *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, 2009. **91**(9): p. 745-756.
90. Codorniu-Hernández, E., & al., *Theoretical study of flavonoids and proline interactions. Aqueous and gas phases*. J. Mol. Struct., 2003. **623**(1-3): p. 63-73.
91. Codorniu-Hernández, E., & al., *Theoretical affinity order among flavonoids and amino acid residues: An approach to understand flavonoid-protein interactions*. J. Mol. Struct., 2007. **819**(1-3): p. 121-129.
92. Pascal, C., & al., *Interactions between a Non Glycosylated Human Proline-Rich Protein and Flavan-3-ols Are Affected by Protein Concentration and Polyphenol/Protein Ratio*. J. Agric. Food Chem., 2007. **55**(12): p. 4895-4901.
93. Riou, V., & al., *Aggregation of grape seed tannins in model wine--effect of wine polysaccharides*. Food Hydrocolloids, 2002. **16**(1): p. 17-23.
94. Sarni-Manchado, P., & al., *Influence of the Glycosylation of Human Salivary Proline-Rich Proteins on Their Interactions with Condensed Tannins*. J. Agric. Food Chem., 2008. **56**(20): p. 9563-9569.
95. Payne, C., & al., *Interaction of astringent grape seed procyanidins with oral epithelial cells*. Food Chem., 2009. **115**(2): p. 551-557.
96. Deaville, E.R., & al., *Hydrolyzable Tannin Structures Influence Relative Globular and Random Coil Protein Binding Strengths*. J. Agric. Food Chem., 2007. **55**(11): p. 4554-4561.
97. Soares, S., & al., *Interaction of Different Polyphenols with Bovine Serum Albumin (BSA) and Human Salivary alpha-Amylase (HSA) by Fluorescence Quenching*. J. Agric. Food Chem., 2007. **55**(16): p. 6726-6735.
98. Gambuti, A., & al., *Evaluation of aglianico grape skin and seed polyphenol astringency by SDS-PAGE electrophoresis of salivary proteins after the binding reaction*. Food Chem., 2006. **97**(4): p. 614-620.
99. Poncet-Legrand, C., & al., *Poly(L-proline) interactions with flavan-3-ols units: Influence of the molecular structure and the polyphenol/protein ratio*. Food Hydrocolloids, 2006. **20**(5): p. 687-697.
100. Pianet, I., et al., *Modeling Procyanidin Self-Association Processes and Understanding Their Micellar Organization: A Study by Diffusion NMR and Molecular Mechanics*. Langmuir, 2008. **24**(19): p. 11027-11035.
101. Charlton, A.J., & al., *Tannin interactions with a full-length human salivary proline-rich protein display a stronger affinity than with single proline-rich repeats*. FEBS Letters, 1996. **382**(3): p. 289-292.
102. McManus, D., Beart, Gaffney, Lilley, Haslam, *Polyphenol interactions. Part 1. Introduction; some observations on the reversible complexation of polyphenols with proteins and polysaccharides*. J. Chem. Soc., 1985: p. 1429-1438.
103. Hong, J.H., et al., *Interaction of Copper and Human Salivary Proteins*. J. Agric. Food Chem., 2009. **57**(15): p. 6967-6975.
104. Ferrer-Gallego, R., & al., *Statistical correlation between flavanolic composition, colour and sensorial parameters in grape seed during ripening*. Anal. Chim. Acta., 2010. **660**(1-2): p. 22-28.
105. Mehansho, H., & al., *Tannin-mediated induction of proline-rich protein synthesis*. J. Agric. Food Chem., 1992. **40**(1): p. 93-97.
106. Da Costa, G., & al., *Salivary Amylase Induction by Tannin-Enriched Diets as a Possible Countermeasure Against Tannins*. J. Chem. Ecol., 2008. **34**(3): p. 376-387.
107. Tobiason, F.L., R.W. Hemingway, and G. Vergoten, *Modeling the conformation of polyphenols and their complexation with polypeptides: self association of catechin and its complexation with L-proline glycine oligomers*. PLANT POLYPHENOLS 2, ed. K. academic. 1999.

108. Richard, T., & al., *Recognition characters in peptide-polyphenol complex formation*. *Bioch. Biophys. Acta.*, 2006. **1760**(6): p. 951-958.
109. Carvalho, E., & al., *Influence of Wine Pectic Polysaccharides on the Interactions between Condensed Tannins and Salivary Proteins*. *J. Agric. Food Chem.*, 2006. **54**(23): p. 8936-8944.
110. de Freitas, V., & al., *Structural Features of Procyanidin Interactions with Salivary Proteins*. *J. Agric. Food Chem.*, 2001. **49**(2): p. 940-945.
111. Papadopoulou, A., & al., *Interaction of Flavonoids with Bovine Serum Albumin: A Fluorescence Quenching Study*. *J. Agric. Food Chem.*, 2004. **53**(1): p. 158-163.
112. Edelman, A., & al., *Toward the Optical Tongue: Flow-Through Sensing of Tannin-Protein Interactions Based on FTIR Spectroscopy*. *J. Am. Chem. Soc.*, 2002. **124**(49): p. 14741-14747.
113. Canon, F., & al., *Characterization, stoichiometry, and stability of salivary protein-tannin complexes by ESI-MS and ESI-MS-MS*. *Anal. Biol. Chem.*, 2009.
114. Sarni-Manchado, P., & al., *Study of non-covalent complexation between catechin derivatives and peptides by electrospray ionization mass spectrometry*. *J. Mass Spectrom.*, 2002. **37**(6): p. 609-616.

CHAPITRE II :

ETUDES PRELIMINAIRES ET STRATEGIES D'ETUDE DE L'ASTRINGENCE

I. Choix d'un Peptide Modèle

Comme nous l'avons indiqué dans le chapitre I, les protéines salivaires, et plus particulièrement les PRP basiques sont impliquées dans la sensation d'astringence. Au cours de leurs travaux de thèse, C. Simon [1] et B. Plet [2] ont utilisé le peptide IB7₁₄, constitué des 14 premiers acides aminés de la PRP IB7 (**Figure II.1**), comportant une séquence de 9 acides aminés (dont 5 prolines) répétée plusieurs fois dans la protéine entière.



Figure II.1 : Structure primaire de la protéine IB7 et délimitation du peptide IB7₁₄

De plus, ce peptide possède la caractéristique d'avoir sa séquence présente dans toutes les PRPb, et sa synthèse sur support solide, grâce à un synthétiseur de peptides semi-automatique, ne présente pas de difficultés majeures. IB7₁₄ a fait l'objet de plusieurs études par RMN [3], dichroïsme circulaire[4], spectrométrie de masse et modélisation moléculaire, qui ont mis en évidence qu'il était un bon mime représentatif des PRPb. Ceci a été confirmé notamment en spectrométrie de masse par l'étude de peptides plus longs : 34 acides aminés pour IB9₃₄ et 61 acides aminés pour IB8c (Thèse B.Plet, 2007). Nous avons donc choisi de réaliser nos travaux sur la base de l'étude du peptide IB7₁₄, que nous avons préparé par synthèse en phase solide (description de la méthode dans le chapitre III).

II. La Spectrométrie de Masse Résolue en Energie [2]

II.1. La méthodologie

La spectrométrie de masse a été utilisée pour l'étude des assemblages non covalents entre peptides (en particulier IB7₁₄) et polyphénols en procédant à une préformation du complexe en solution, puis en l'ionisant par électronébulisation. Les complexes formés en solution hydroalcoolique (pH 3,5 en solution aqueuse à 10% d'éthanol) sont suffisamment stables pour résister au processus de nébulisation, et à la transmission à un analyseur de type piège ionique (LCQ Advantage, ThermoFischer). Il est ensuite possible d'isoler un état de charge donné de ce complexe (le plus souvent 2+) et de dissocier cet ion à l'aide de collisions avec des atomes d'hélium au sein du piège ionique. La Spectrométrie de Masse Résolue en Energie (Energy Resolved Mass Spectrometry, ERMS) intervient par une augmentation contrôlée de l'énergie interne du complexe ionique considéré. Le suivi de l'intensité des ions issus de ce processus de dissociation permet d'obtenir des courbes de ruptures représentant la disparition et l'apparition d'espèces et de déterminer l'énergie qu'il faut apporter pour dissocier un complexe donné à 50%. Cette valeur est notée ED₅₀, et permet un classement de l'affinité de polyphénols modèles par rapport à une cible peptidique donnée (**Figure II.2**).

L'isolement puis la dissociation de ces complexes non-covalents en phase gazeuse doit être réalisée dans des conditions strictement répétables, avec un contrôle rigoureux des paramètres de mesure qui peuvent affecter l'énergie interne des ions, entraînant ainsi des modifications des graphes d'ED₅₀.

Les paramètres de la source (température appliquée, tension du capillaire de transfert, tension de la lentille tube) et du piège ionique (largeur de la fenêtre d'isolement des ions, état de charge considéré) ont été étudiés. Les paramètres de la source n'ont révélé aucune influence sur l'énergie interne et aucune modification sur l'établissement des courbes ED₅₀ (**Figure II.2**).

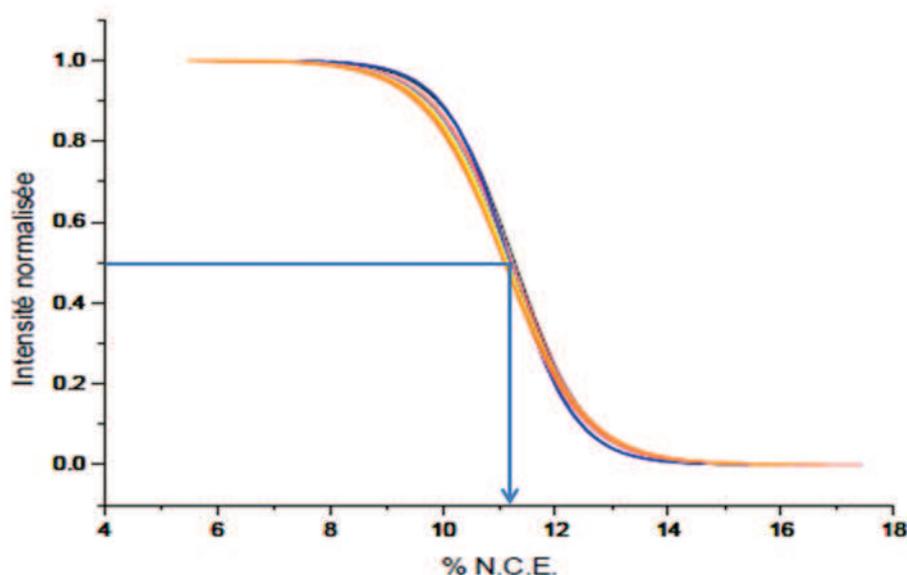


Figure II.2 : Pour le mélange IB7₁₄ (20 µM) / Catéchine (60 µM), courbe de rupture pour une variation de la tension de lentille tube de -130V à +140V, pour le complexe de stoechiométrie 1 :1 ([IB7₁₄ + 2H + Catéchine]²⁺) [2]

Cependant, la largeur de la fenêtre d'isolement des ions est un paramètre critique pour l'énergie de dissociation des complexes formés. En effet, plus la fenêtre d'isolement est étroite et plus l'énergie interne de l'ion augmente, ce qui se traduit par une déstabilisation du complexe et une diminution de l'ED₅₀. La largeur de la fenêtre d'isolement des ions est donc un paramètre critique, qui doit être maintenu strictement fixe dans toutes les expériences d'ERMS.

L'état de charge du complexe est aussi un paramètre à prendre en compte. Plus le nombre de charges est important, et plus le complexe est facile à dissocier (avec l'accroissement de l'effet de répulsion électrostatique, l'énergie à apporter est moindre). Pour contourner ce problème, les complexes sont analysés uniquement avec une stoechiométrie peptide/polyphénol de 1 :1 (**Figure II.3**).

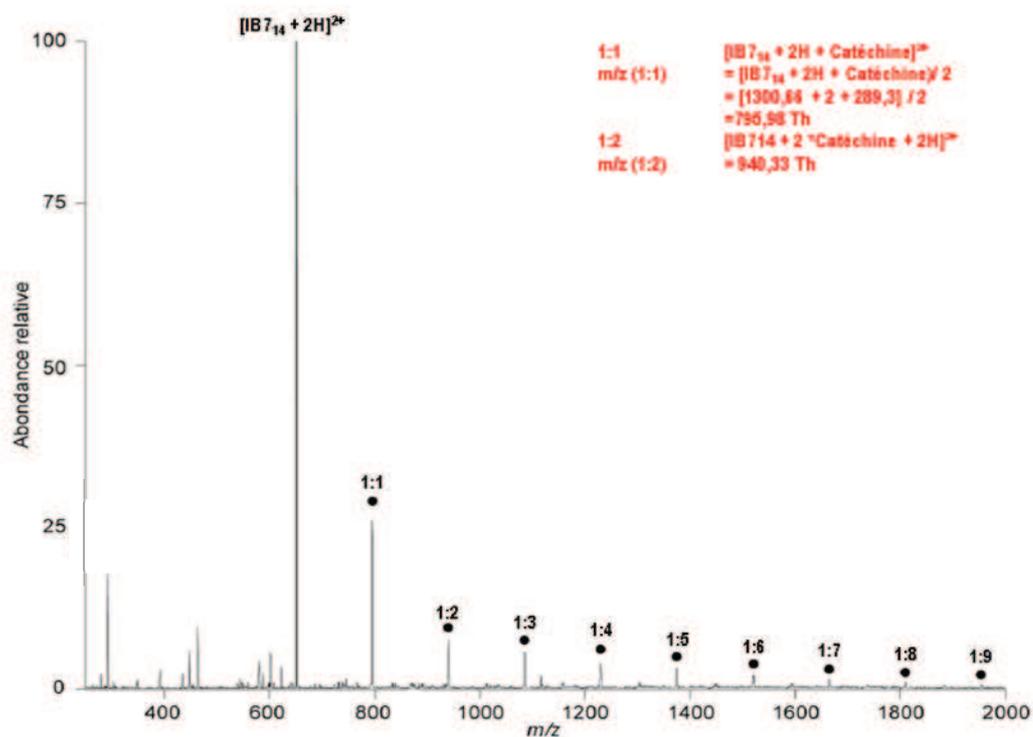


Figure II.3 : Spectre ESI-MS d'un mélange IB7₁₄ (20 µM) / Catéchine (60 µM). On remarque que le complexe de stoechiométrie 1 :1 est plus intense que les autres, mais que des stoechiométries élevées sont observées [2].

Les courbes de dissociation du complexe peptide/polyphénol sont obtenues pour une stoechiométrie du complexe préformé en solution de peptide/polyphénol de 1 :3 (solutions mélangées volume à volume de 20 µM de peptide : 60 µM de polyphénol). Le solvant d'infusion est un mélange Eau/Ethanol/acide acétique (89/10/1).

Pour cette étude les polyphénols sélectionnés avaient tous un double cycle commun à tous les flavanoïdes, et pouvaient être répartis en cinq sous-classes :

- Les flavanols
- Les flavonols
- Les flavones
- Les flavanones
- Les isoflavones

Les différences entre ces composés résident dans la position et le nombre des groupements hydroxyles et des insaturations, les différents arrangements de cycles et la présence/absence de glycanes. Pour la plupart d'entre eux, ce sont des polyphénols monomériques, mais plusieurs dimères ont également été étudiés (Figure II.4).

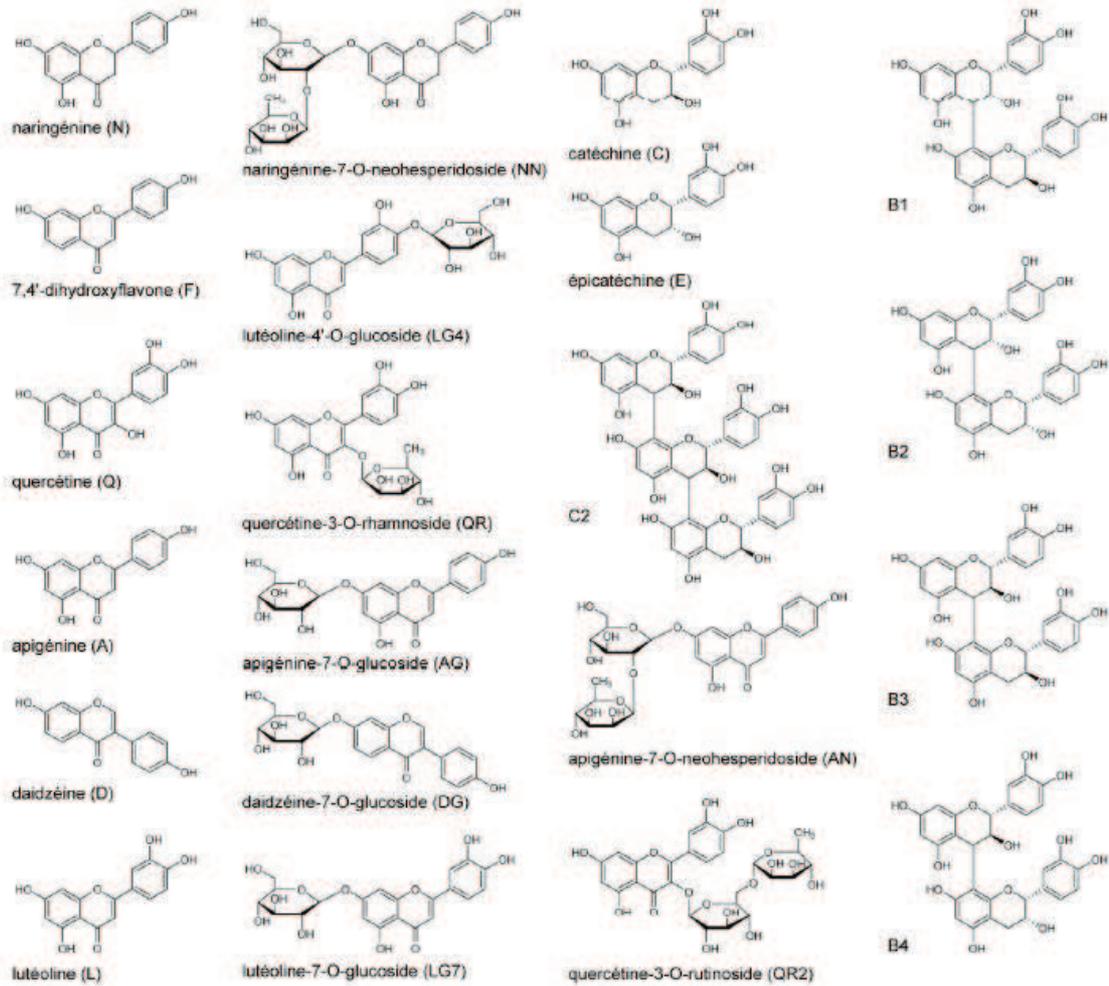


Figure II.4 : Composés phénoliques utilisés pour l'obtention des courbes de ED50 avec le peptide IB7₁₄.

1.2. Résultats et discussion

Plusieurs résultats peuvent être dégagés de l'échelle d'affinité relative en phase gazeuse établie à partir des études réalisées en mode ERMS (**Figure II.5**). Notamment, plus le nombre de liaisons hydrogènes pouvant être créées par la molécule de polyphénol est grand, et plus l'affinité pour le peptide est importante.

Les flavan-3-ols ont toujours une affinité qui augmente avec le degré de polymérisation. Comme le montre l'échelle d'affinité, le trimère C2 est le flavan-3-ol qui possède la meilleure affinité avec le peptide. Puis ensuite viennent les quatre dimères, la catéchine et l'épicatechine ayant une affinité moindre. La sensation d'astringence ressentie lors d'une dégustation d'un vin rouge va dans le même sens [2, 5].

Cette échelle a aussi révélé que le nombre de degrés de liberté est un paramètre plus important que la taille de la molécule. Par exemple la naringénine-7-O-néohespéridoside (NN) (M = 580 Da, nombre de degrés de liberté de 213) a une affinité plus petite que B2 (M = 578 Da, nombre de degrés de liberté de 198). Plus la valeur du nombre de degrés de liberté est faible pour une masse de polyphénol donné, meilleure est l'affinité pour IB7₁₄.

De plus, la position et le nombre des groupements hydroxyles influent aussi sur l'affinité envers le peptide. Il convient de souligner que la méthodologie met en évidence une différence d'affinité nette entre catéchine et épicatechine.

Le même type d'étude par ERMS a été réalisé avec IB9₃₄ et IB8c, et a permis de constater un placement relatif des polyphénols inchangé sur l'échelle d'affinité, validant ainsi le choix d'IB7₁₄ comme mime de PRPb [6].

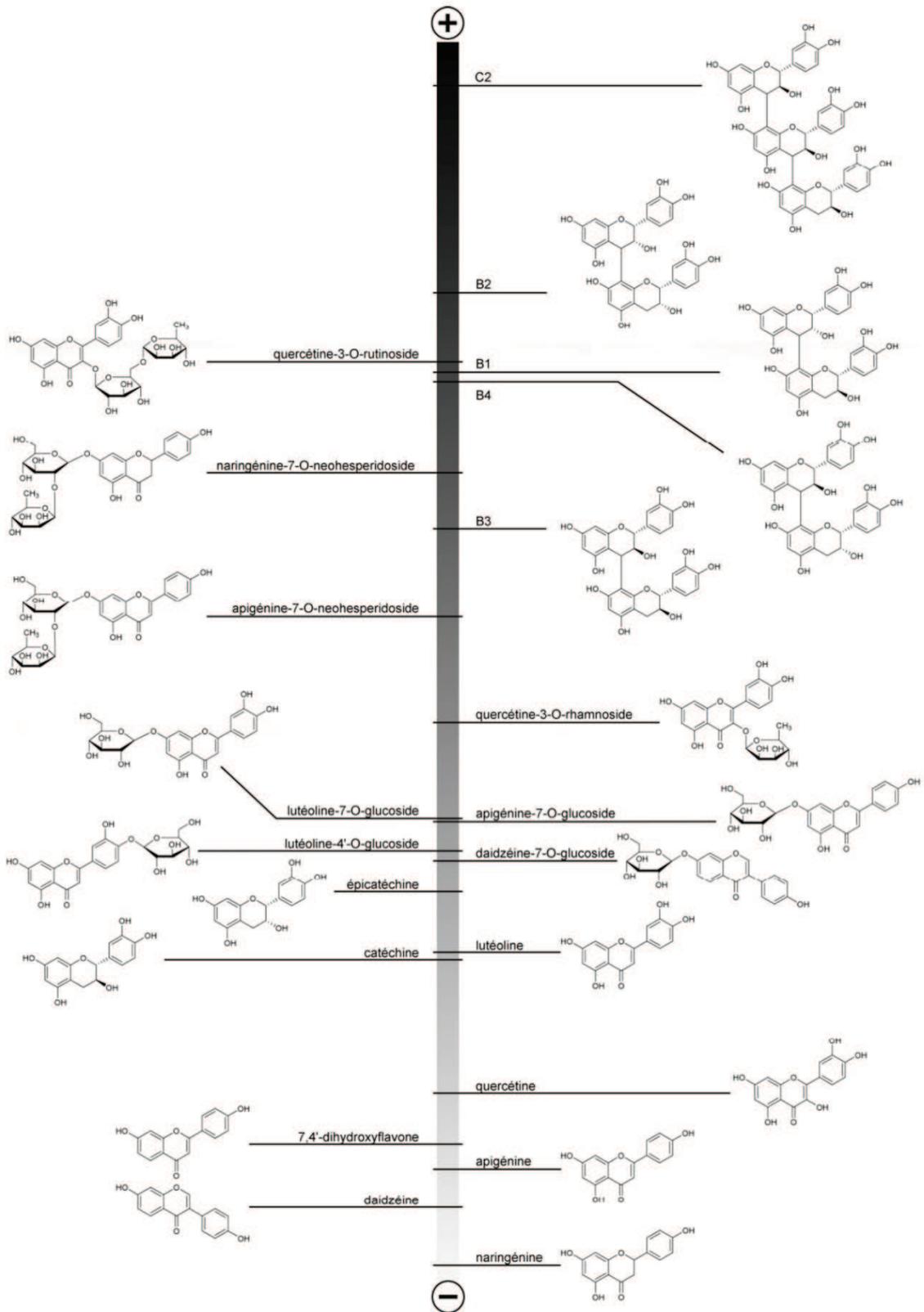


Figure II.5 : Echelle d'affinité en phase gazeuse entre le peptide IB7₁₄ et différents flavonoïdes [2].

L'examen des résultats obtenus a permis de proposer un schéma d'interaction protéine-polyphénol procédant selon le scénario suivant (**Figure II.6**):

- les polyphénols viennent se fixer sur une protéine salivaire (en monocouche), puis les autres composés phénoliques en solution s'agrègent sur ceux qui sont déjà liés à la protéine. L'édifice polyphénol-protéine est d'autant plus stable que les composés créent des liaisons hydrogènes entre eux et la protéine, évoluant ainsi jusqu'à la précipitation.
- S'il n'y a pas précipitation, les polyphénols, grâce à leur caractère multidentate, vont pouvoir servir d'agent pontant sur la couche externe, soit avec une nouvelle protéine, soit avec d'autres polyphénols. Le cycle continue jusqu'à la précipitation.

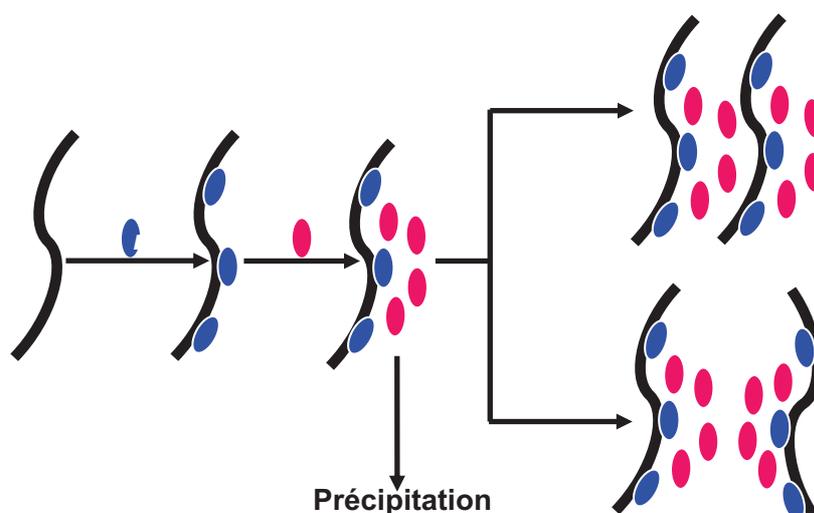


Figure II.6 : Modèle d'interaction protéine-polyphénol proposé. La protéine (en noir, structure étendue) crée une interaction avec une première couche de polyphénols (en rose). Des composés supplémentaires (en bleu) s'agrègent par la suite [2]

Cette méthode permet une évaluation de l'astringence *ex-vivo* sur la base d'une analyse effectuée par spectrométrie de masse en mode ERMS. Cependant, cette étude ne prend pas en compte toutes les interactions entrant en jeu lors de la formation des complexes en phase condensée. En effet, les effets hydrophobes sont perdus ou très affaiblis en phase gazeuse dans le spectromètre de masse, le solvant étant éliminé lors du passage des ions dans l'interface. Autrement dit, les édifices non-covalents sont maintenus en phase gazeuse, mais par des forces éventuellement différentes par leur nature et leur intensité de celles qui existent en solution.

De plus, d'un point de vue pratique, la méthode ERMS est plutôt limitée à l'analyse de polyphénols isolés ou de mélanges très simples, en raison de la formation d'espèces multichargées, alors qu'il est évidemment nécessaire de prendre en compte le comportement de mélanges complexes de polyphénols, tels qu'ils peuvent être isolés à partir d'un vin rouge.

Compte tenu de ces limitations, nous avons envisagé la mise en œuvre de deux stratégies pour tenter de faire progresser notre connaissance de l'astringence.

III. Stratégies envisagées

Le modèle d'étude de l'astringence que nous proposons fait appel à des sondes moléculaires immobilisées sur un support solide par greffage covalent. Les sondes moléculaires seraient soit des fragments synthétiques de protéines salivaires, soit des polyphénols modèles. Nous avons choisi de préparer des sondes moléculaires immobilisées sur un support de billes magnétiques pour faciliter le traitement des échantillons à analyser, et permettre dans un objectif futur l'automatisation d'une méthodologie d'analyse et de criblage rapide. Selon ce concept, les composés qui présentent le plus d'affinité pour la sonde immobilisée peuvent être sélectionnés, isolés, puis identifiés au moyen de la spectrométrie de masse. La spectrométrie de masse assure une détection spécifique à grande sensibilité. Selon cette stratégie l'interaction entre polyphénols et peptides est réalisée en phase liquide hydro alcoolique mimant l'environnement du vin. L'adaptation à des mélanges complexes de polyphénols peut être effectuée par le biais d'un couplage entre chromatographie en phase liquide et spectrométrie de masse.

III.1. La sonde peptidique : élaboration et mode d'utilisation

Sur la base des résultats antérieurs évoqués plus haut, nous avons choisi de synthétiser une sonde mimant une protéine salivaire en immobilisant par greffage covalent (formation d'une liaison peptidique) le segment de PRP IB7₁₄.

Le choix d'un support constitué de billes magnétiques permet de rechercher rapidement des conditions dans lesquelles un type de composés peut se lier à la sonde. L'interaction des polyphénols avec la cible peptidique peut être examinée lors de la phase de mise en contact. La spectrométrie de masse est utilisée pour doser les polyphénols dans le surnageant des billes précipitées par l'action d'un champ magnétique. La sonde peptidique peut de ce fait être mise au contact de mélanges de polyphénols pour identifier les polyphénols ayant la plus grande affinité pour la sonde.

Par ailleurs, différentes conditions de lavage du support plus ou moins sévères peuvent être recherchées pour décrocher les polyphénols par affinité croissante. Cette phase de mise au point avec des composés modèles est un préalable à l'analyse de mélanges de polyphénols naturels extraits du vin rouge. A terme, cette méthodologie pourrait permettre le criblage de tanins d'origines et composition diverses, avec pour objectif final l'établissement d'une relation avec la typicité des vins de Bordeaux.

III.2. La sonde polyphénolique : élaboration et mode d'utilisation

Nous avons aussi envisagé d'identifier les protéines ayant la meilleure affinité envers les composés phénoliques en faisant appel à un polyphénol immobilisé sur support solide. L'objectif est ici de pouvoir mettre en évidence d'autres protéines salivaires que les PRP ayant une forte affinité pour les polyphénols, et par conséquent susceptibles de jouer un rôle important dans la sensation d'astringence.

Les structures primaires de près d'un millier de protéines [7] salivaires humaines ont été répertoriées dans une base de données. Cependant, pour des raisons techniques, les protéines de taille inférieure à 10 kDa n'ont pas été répertoriées par des approches classiques impliquant l'électrophorèse bidimensionnelle. La stratégie d'analyse des protéines sera donc adaptée à cette particularité, en sélectionnant trois fractions selon la taille des protéines : inférieure à 10 kDa, comprise entre 10 et 30 kDa et supérieure à 30 kDa. L'obtention d'un profilage de protéines susceptibles d'interagir fortement avec les polyphénols est donc envisageable. Les protéines de plus haute affinité pour le polyphénol cible pourraient être sélectionnées en vue de la préparation d'une sonde peptidique optimisée, constituée éventuellement de plusieurs segments peptidiques issus de protéines différentes.

IV. Bibliographie

1. Simon, C., *Structure et dynamique de protéines de la salive humaine en interaction avec les tanins du vin de Bordeaux*, 2003. Bordeaux 1
2. Plet, B., *La spectrométrie de masse dans l'étude de l'interaction entre protéines de la salive humaine et polyphénols. Vers une approche analytique de l'astringence du vin*. 2007, Université de Bordeaux I.
3. Simon, C., & al., *Three-Dimensional Structure and Dynamics of Wine Tannin-Saliva Protein Complexes. A Multitechnique Approach*. *Biochemistry*, 2003. **42**(35): p. 10385-10395.
4. Simon, C., & al., *Synthesis and circular dichroism study of the human salivary proline-rich protein IB7*. *J. Pept. Sci.*, 2003. **9**(2): p. 125-131.
5. Bate-Smith, E.C., *Astringency in foods*. *Food*, 1954. **23**: p. 124-135.
6. March, R.E., & al, *Practical aspects of trapped ion mass spectrometry*, ed. C. Press. 2009.
7. Huq, N., & al., *A Review of the Salivary Proteome and Peptidome and Saliva-derived Peptide Therapeutics*. *Int. J. Pept. Res. Ther.*, 2007. **13**(4): p. 547-564.

CHAPITRE III :

MATERIELS ET METHODES

Ce chapitre regroupe les différentes méthodologies utilisées durant la thèse.

I. La synthèse peptidique en phase solide (SPPS)

La synthèse peptidique en phase solide a été mise au point par Merrifield [1] dans les années 1960. Cette méthode repose sur l'introduction successive d'acides aminés protégés, sur un support polymérique insoluble.

I.1. Stratégie de synthèse

La SPPS utilise deux types de stratégies, selon le nom des groupements protecteurs de l'amine de l'acide aminé à coupler :

- Boc (t-butyloxycarbonyl), impliquant une déprotection en milieu acide
- Fmoc (9-fluorenylméthylloxycarbonyl), impliquant une déprotection en milieu basique

La stratégie Boc utilise l'acide fluorhydrique lors de la déprotection des groupements réactifs. L'utilisation de l'acide fluorhydrique étant délicate, la stratégie Fmoc est préférée car elle est plus douce et moins dangereuse. La stratégie Fmoc développée par Atherton et Sheppard en 1971 [2], repose sur l'emploi d'un groupement Fmoc, qui devient labile en présence de pipéridine.

La synthèse sur support solide utilise une résine, inerte par rapport aux réactifs employés, et permettant une bonne solvataion de la chaîne peptidique en élongation et un lavage aisé pour enchaîner rapidement les couplages. Le support solide est constitué de billes de polystyrène. Cette résine est pré-chargée, portant l'acide aminé par lequel la synthèse va commencer, c'est-à-dire l'acide aminé C-Terminal, afin d'éviter toute perte d'intégrité de la stéréochimie sur l'acide aminé activé (Figure III.1).



Figure III.1 : Sens de la synthèse sur support solide. Cette dernière se déroule du C-Terminal vers le N-Terminal.

Tous les acides aminés ont des fonctions amines protégées par un groupement protecteur Fmoc, pour que le N-Term soit momentanément non réactif. Pour éviter toutes réactions des chaînes latérales des acides aminés, d'autres groupements protecteurs masquent ces chaînes (Tableau III.1). Ces groupements sont

déprotégés par action de l'acide trifluoroacétique, en même temps que le peptide de synthèse final est libéré du support solide.

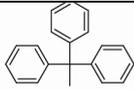
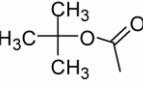
Acides aminés	Groupe protecteur	Structure des groupements
Sérine	tButyl	
Glutamine	Tryphénylméthyl ou Trt (trityl)	
Lysine	Boc	

Tableau III.1 : Groupements protecteurs des chaînes latérales des acides aminés

1.1.1 Les étapes de la synthèse

La résine porte l'acide aminé C-Terminal (dans notre cas Fmoc-Gly). Avant que ne commence la première étape, la résine est mise en suspension dans du dichlorométhane pour la dilater et présenter de façon optimale les groupements réactifs enfouis dans les billes. La synthèse du peptide est réalisée par fixation séquentielle de chaque acide aminé constituant le peptide. Le mécanisme de fixation d'un acide aminé se déroule en quatre étapes (**Figure III.2**).

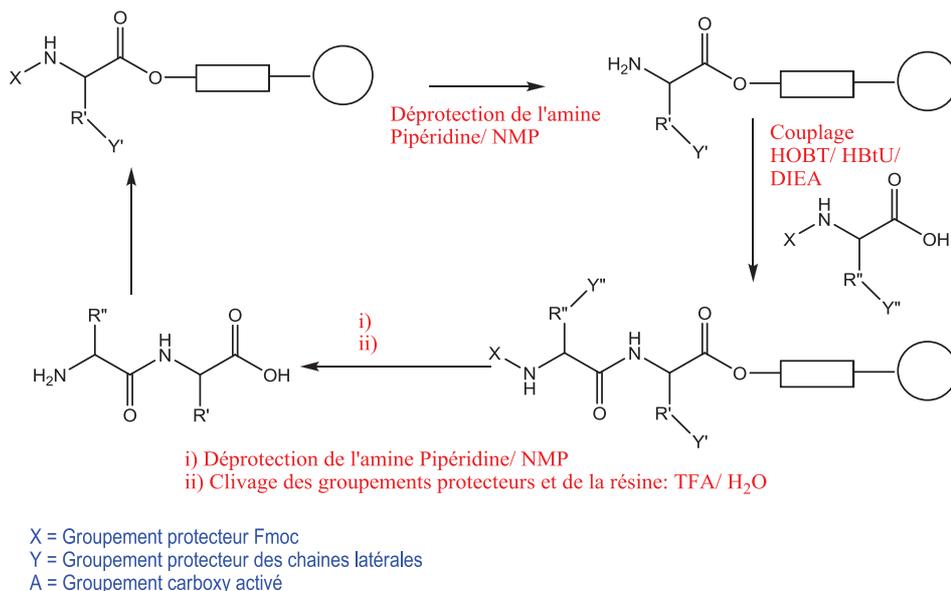


Figure III.2 : Les différentes étapes de la synthèse peptidique sur support solide [2]

a) Etape 1 : la déprotection du groupement amine

Le support solide portant le premier acide aminé (C-Term) est déprotégé par de la pipéridine pure, conduisant ainsi à l'amine activé (**Figure III.3**).

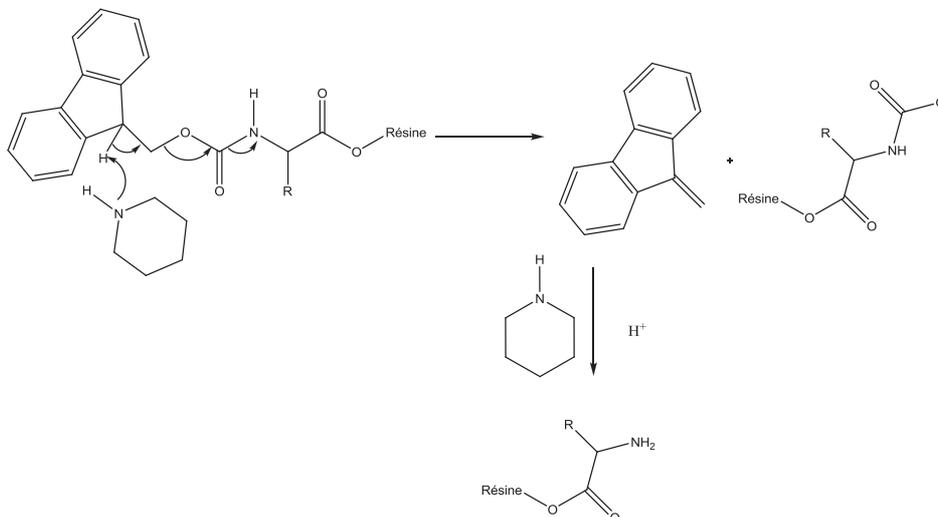


Figure III.3 : Clivage du groupement Fmoc par action de la pipéridine

b) Etape 2 : activation

L'acide aminé à coupler est activé avec un mélange Hydroxybenzotriazole (HOBt)/ O-(Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-Hexafluorophosphate (HBTU) (37,9 g/13,6 g) dans 200 mL de diméthylformamide (DMF) permettant ainsi d'obtenir l'ester activé [3, 4].

c) Etape 3 : couplage

Le couplage permet la formation de la liaison peptidique entre l'ester activé et l'amine déprotégée. Il se déroule dans une solution de 35% de N,N-Diisopropyléthylamine (DIEA) dans N-Méthyl-2-Pyrrolidone (NMP).

d) Etape 4: le « capping »

L'élargissement de la chaîne peptidique (de AAn vers AAn+1) n'étant pas réalisée avec un rendement de 1, il est nécessaire de bloquer l'élargissement des chaînes n'ayant pas réagi. Ceci est réalisé par réaction avec l'anhydride acétique, tous les peptides de longueur incorrecte contenus dans le produit brut de synthèse seront donc terminés par un groupement N-acétyl. Cette étape se fait dans un mélange Anhydride Acétique/ DIEA/ HOBt (19 mL/ 9 mL/ 0,8 g) en solution dans 400 mL de NMP (**Figure III.4**).

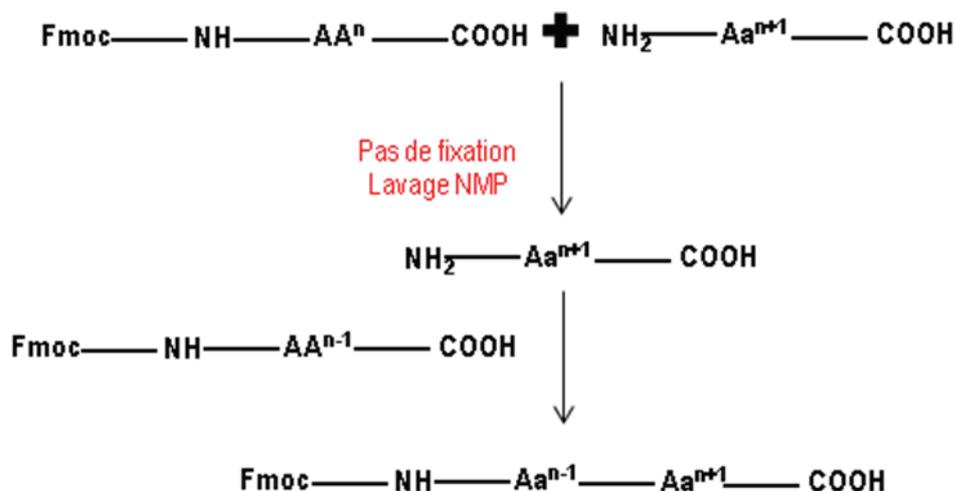


Figure III.4 : Représentation de la formation de peptides tronqués en milieu de chaîne

Chaque cycle est répété jusqu'à l'obtention du peptide désiré, puis suivi d'une déprotection finale et d'un décrochage du peptide accroché à la résine.

Le suivi de la synthèse peptidique se fait par conductimétrie. Lors de la synthèse sur support solide, le succès du couplage d'un acide aminé dépend de la réactivité du groupement carboxyle de l'acide aminé protégé et de l'accessibilité du résidu terminal du peptide en cours d'élongation fixé à la résine. Lors de la synthèse des réarrangements structuraux du peptide peuvent se produire. Cela peut gêner les étapes de déprotection et de couplage. Pour contrôler les rendements de couplage, la synthèse peptidique est suivie par conductimétrie. Lors de la déprotection (étape 1) des sels de carbamate de pipéridine sont relargués. Ces sels permettent de suivre par conductimétrie l'évolution de la déprotection au fil des acides aminés ajoutés. La programmation de la synthèse est réalisée de telle manière que l'étape de déprotection cesse dès lors que le dernier pic observé en conductimétrie est égal au précédent (à 5% près), suggérant que toutes les amines ont été déprotégées. Un faible couplage de l'acide aminé (n+1) induit un faible signal de déprotection (**Figure III.5**).

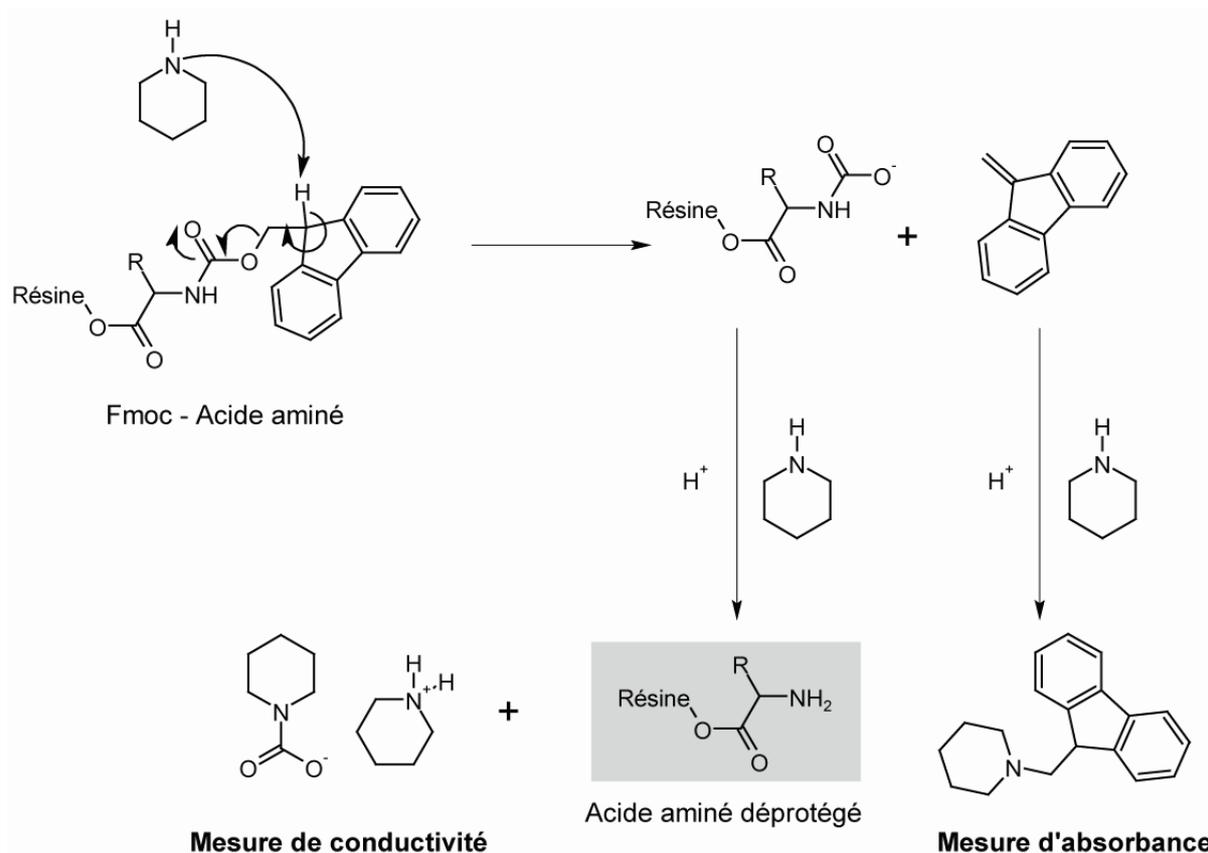


Figure III.5 : La déprotection par la pipéridine de la chaîne peptidique en élévation génère des produits secondaires qui permettent le suivi par conductimétrie (sels de pipéridine-carbamate) ou par absorbance à 301 nm (adduits de dibenzo fulvène-pipéridine). R=chaîne latérale de l'acide aminé.

1.1.2. Le clivage

Le peptide est ensuite repris dans une solution aqueuse de TFA pour enlever tous les groupements protecteurs et le libérer de son support solide (Figure III.6). Le mélange brut de synthèse ainsi obtenu est précipité dans de l'éther.

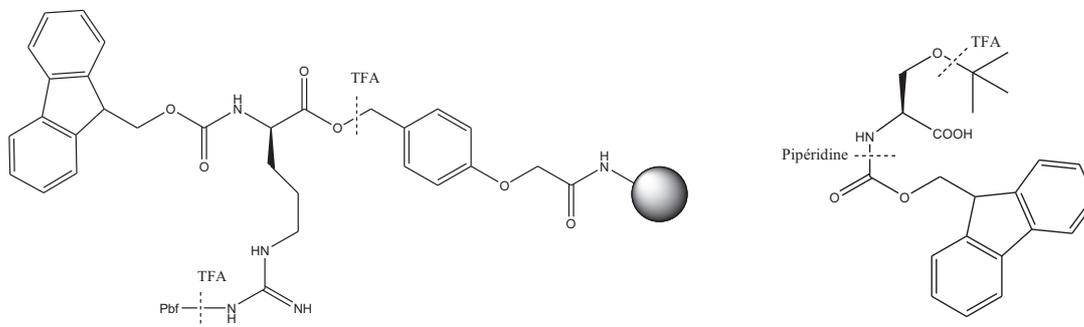


Figure III.6 : A gauche clivage de la résine et des groupements protecteurs. A droite clivage du Fmoc.

I.1.3. La purification

La chromatographie liquide à haute performance sur un support à polarité de phase inversée permet la purification du peptide par élimination des peptides tronqués. La colonne employée est de type semi-préparatif (greffage C18, particules de 15 μm et d'une porosité de 100 \AA , 300 mm de long, 7,8 mm de diamètre interne).

La détection par spectrométrie UV permet une première évaluation de la pureté du produit final, qui est contrôlée par spectrométrie de masse (Figure III.7)

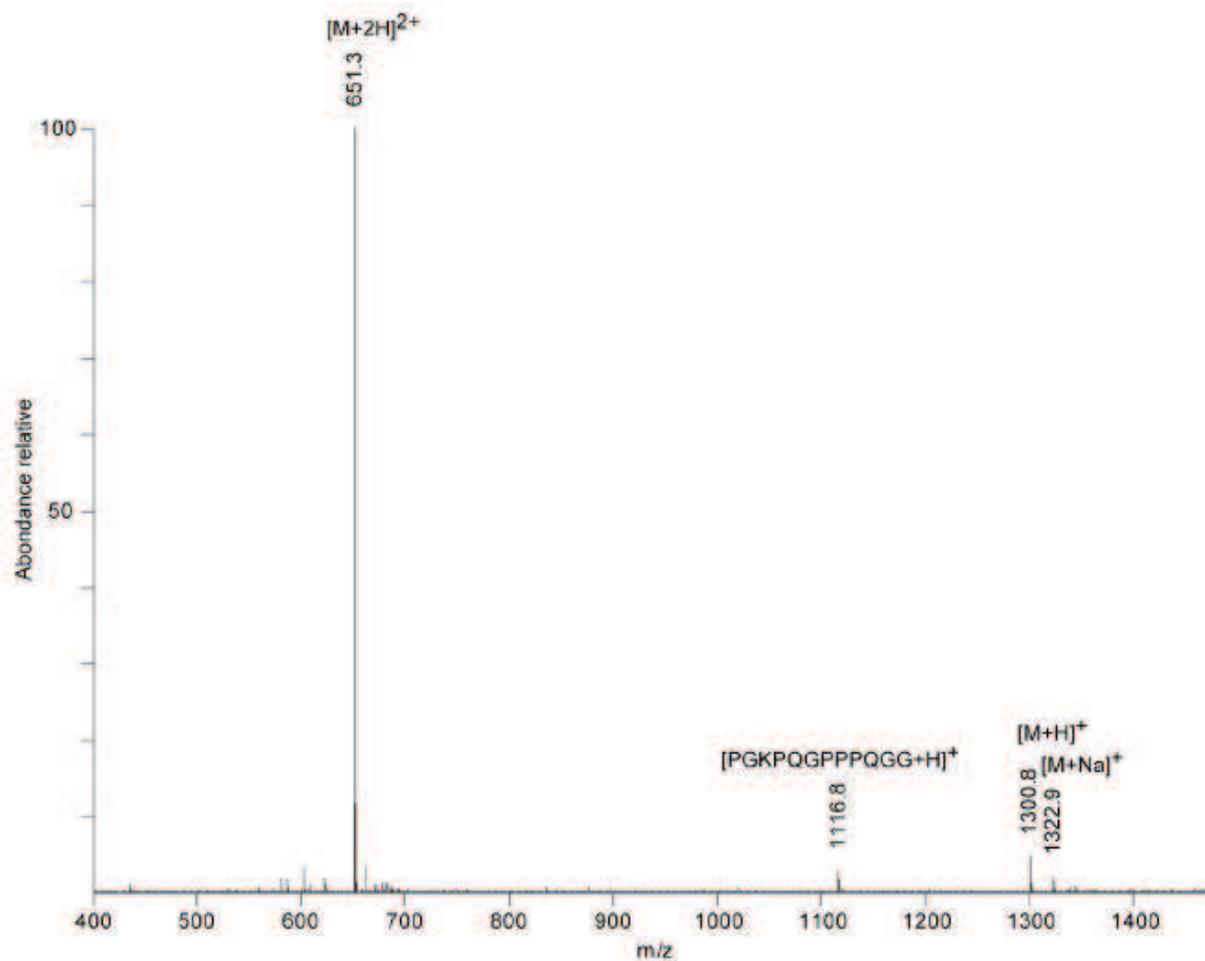


Figure III.7 : Spectre de masse ESI en mode positif du peptide IB7₁₄. MH^+ théorique = 1300,66. L'ion majoritaire est l'espèce doublement chargée. A m/z 1166,8 on note une faible contamination par un peptide tronqué correspondant à PGKPQGPPPPQGG non acétylé.

II. La spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse (SM) est une technique d'analyse permettant de caractériser des molécules par la détermination de leur masse monoisotopique ou moyenne. La SM permet aussi dans certaines conditions d'obtenir des informations sur la structure de ces molécules à partir de la mesure du rapport masse sur charge (m/z) d'ions fragments. Le premier exemple d'analyse par spectrométrie de masse fut réalisé par Joseph J. Thompson (prix Nobel de physique en 1906). A partir de la fin des années 1930, la spectrométrie de masse devint un outil indispensable pour l'étude des petites molécules (Prix Nobel de Chimie en 1934 par Harold Urey). La méthode d'ionisation par impact électronique (IE) étant limitée à l'étude de composés volatils, une extension de la gamme de des molécules analysables par spectrométrie de masse a été obtenue avec l'arrivée de l'ionisation chimique dans les années 1960 (IC, Field et Munson, 1966) [5]; l'extension en gamme de masse a été faible (jusqu'à 800-1000 Da environ), mais l'apport concernant les composés polaires a été plus significatif. En IE et IC classique, l'échantillon est amené en phase gazeuse avant l'ionisation, et ceci a bloqué toute extension efficace de la SM pour l'analyse des biomolécules de grande taille, et notamment des peptides et protéines.

L'obtention d'espèces ionisées en phase gazeuse étant un pré-requis indispensable à toute étude par spectrométrie de masse, plusieurs techniques différentes de l'IE et de l'IC ont été développées pour tenter de déposer le moins d'énergie possible dans les ions formés. Nous citerons ici la désorption sous ionisation chimique, le thermospray, le bombardement par atomes rapides (FAB) [6], la désorption plasma (PDMS)[7] *via* la fission du ^{252}Cf . Au début des années 1980, il était devenu possible de déterminer la masse de petites protéines dans une gamme pouvant aller jusqu'à 25 kDa. Cependant, en atteignant l'objectif d'ionisation de tels composés, seule une masse moléculaire pouvait être mesurée, sans accès à une information sur la structure des molécules analysées.

A la fin des années 1980, deux nouvelles méthodes d'ionisation dites douces ont permis un saut technologique majeur : l'électronébulisation ou electrospray (ElectroSpray Ionisation, ESI [8]) et l'ionisation par laser assistée par une matrice (Matrix Assisted Laser Desorption-Ionisation, MALDI [9]), ce qui a valu le prix Nobel à Fenn & Tanaka en 2002. Avec ces deux modes d'ionisation, il est progressivement devenu possible d'atteindre la mesure de masse de protéines de plus d'1 MegaDalton.

La source d'ions est donc un élément clé d'un spectromètre de masse, qui sous une forme simple est constitué de quatre parties distinctes : une source, un analyseur, un détecteur et un système informatique (Figure III.8).

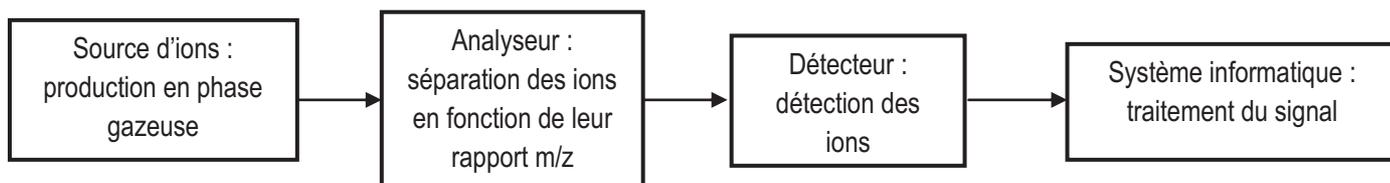


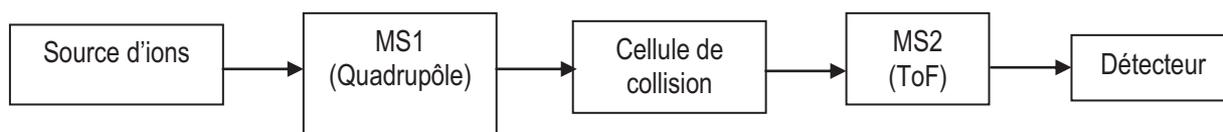
Figure III.8 : Schéma simplifié d'un spectromètre de masse

Les ions produits en phase gazeuse dans la source sont séparés dans l'analyseur en fonction de leur rapport m/z avant d'atteindre le détecteur. Le système informatique a pour fonction le pilotage du spectromètre, l'acquisition et le retraitement des données.

Les deux méthodologies qui se sont imposées pour l'étude des macromolécules biologiques, produisent très majoritairement des ions stables. Pour obtenir de l'information sur la structure de ces ions, la solution technique qui s'est imposée consiste à déstabiliser ces ions par des collisions, puis à analyser les ions fragments produits selon leur rapport m/z avant la détection. On parle alors de spectromètre tandem ou MS/MS, ou éventuellement de spectrométrie de masse multiple (MSⁿ).

Différentes combinaisons d'analyseurs peuvent être utilisées pour constituer un instrument tandem dans lequel la MS/MS est réalisée dans l'espace (Figure III.9).

MS/MS dans l'espace



MS/MS dans le temps

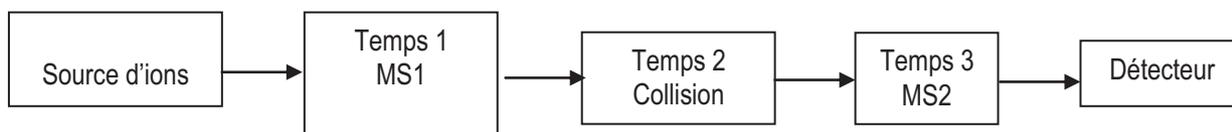


Figure III.9 : Schéma de différentes combinaisons d'analyseurs en mode tandem : exemple de MS/MS dans l'espace avec un Q-ToF, et dans le temps (piège ionique).

Pour notre étude, nous avons choisi d'utiliser un analyseur de masse de type piège ionique, permettant une spectrométrie de masse multiple réalisée dans le temps (Figure III.9). Cet instrument comporte une source

electrospray ESI (LCQ *Advantage*, Thermo Fisher). Seul cet appareillage sera détaillé dans les paragraphes suivants.

II.1. La source electrospray

Cette technique de production d'ions a été décrite pour la première fois par Fenn & al en 1989 [8]. Au départ cette méthode dite douce était dédiée aux protéines, mais très rapidement son utilisation a été élargie pour l'analyse par exemple de molécules polaires. De plus, cette source présente l'avantage de pouvoir être couplée directement avec un chromatographe en phase liquide.

II.1.1. Le principe de l'ionisation par électronébulisation

Pour ce type de source, la formation des ions se produit sous l'effet d'un champ électrique intense à pression atmosphérique, en présence d'un gaz inerte (diazote) servant à assister la nébulisation et assurer la désolvatation des ions. Le processus de formation peut s'expliquer en trois étapes :

- production de gouttelettes chargées
- fission des gouttelettes chargées en microgouttelettes
- émission des ions désolvatés en phase gazeuse

Dans une source ESI classique, l'échantillon à analyser est amené dans la source par un capillaire de silice (de diamètre interne de l'ordre de 50 μm , à un débit de quelques $\mu\text{L}/\text{min}$, qui peut aller jusqu'à plusieurs centaines de $\mu\text{L}/\text{min}$ selon les configurations des instruments). Le débit du gaz de nébulisation et désolvatation est ajusté en fonction du débit de l'échantillon dans la source. L'électronébulisation est produite par application à pression atmosphérique d'un fort champ électrique (3 à 6 kV) entre l'extrémité du capillaire (inséré dans une aiguille métallique) et une contre électrode (capillaire et contre-électrode sont séparés de 0,3 à 2 cm) (**Figure III.10**).

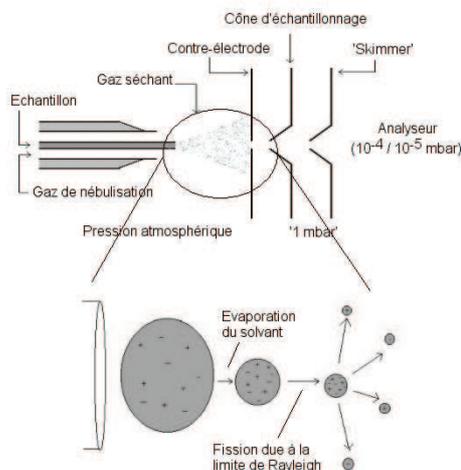


Figure III.10 : Schéma général d'une source électrospray (Micromass)

Ce champ électrique permet d'avoir une accumulation de charges à la surface du liquide situé à l'extrémité du capillaire, et ainsi d'imposer un mouvement électrochimique aux ions formés. L'ionisation par electrospray peut être assimilée à une cellule électrolytique. En mode positif, les cations migrent du capillaire vers la contre-électrode, tandis que les anions vont vers le capillaire métallisé. L'émission continue des gouttelettes fortement surchargées positivement qui forment le spray, génère un excès de charges négatives qui est contrebalancé par une réaction d'oxydation à l'interface capillaire/liquide (**Figure III.11**) [10].

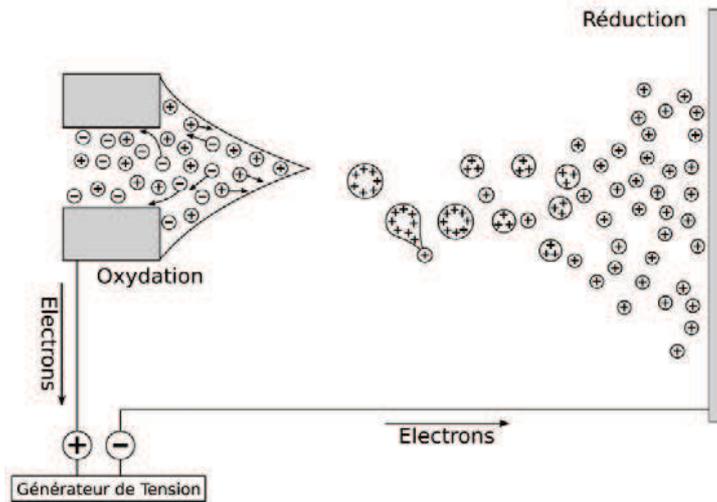


Figure III.11 : Représentation schématique du processus électrochimique de l'electrospray pour la formation des ions positifs (figure modifiée d'après Kebarle, 2000) [10]

7

L'application d'un potentiel sur l'échantillon au niveau du capillaire, permet à l'interface air/liquide de se polariser et de former quasiment un cône, dit de Taylor. Sous l'accumulation des charges formées se forme une extension. Lorsque l'équilibre entre les forces électrostatiques et la tension de surface du liquide est atteint, le cône de Taylor est déstabilisé et des gouttelettes chargées sont émises (diamètre de l'ordre d'une dizaine à quelques dizaines de microns). La déformation du cône de Taylor, génère des gouttelettes dites primaires (ou mères) possédant un excès de charges dépendant du mode de polarité (**Figure III.12**) [10].

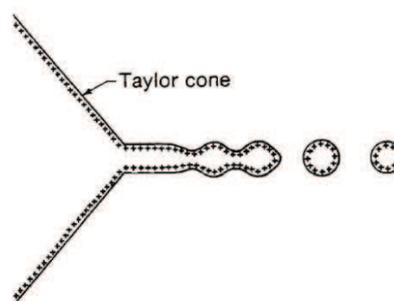


Figure III.12 : Limite de stabilité du cône de Taylor au-delà de laquelle des gouttelettes primaires sont émises

II.1.2. La génération des ions en phase gazeuse

Sous l'effet de la température de la source, du gaz de nébulisation, le solvant des gouttelettes s'évapore, donnant ainsi naissance à des gouttelettes de plus en plus petites, conservant leur charge initiale (processus de désolvatation). A cause des répulsions électrostatiques, la cohésion d'une goutte n'est plus assurée lorsqu'elle atteint la limite de Rayleigh [11]. Cette limite de stabilité de la goutte correspond à son rayon maximum en fonction de l'excès de charges q_{Rayleigh} qu'elle contient.

$$\text{Equation de Rayleigh } q_{\text{Rayleigh}} = 8\pi(\epsilon_0 \gamma R^3)^{1/2}$$

Lorsque que le rayon R de la goutte atteint son maximum, le phénomène d'explosion coulombienne est observé, les gouttelettes éclatent en gouttelettes « filles », de plus en plus petites. Ce procédé en cascade se poursuit jusqu'à la libération en phase gazeuse d'ions désolvatés. Deux théories se dégagent pour expliquer l'émission des ions à partir des gouttelettes vers la phase gazeuse.

Dans le cas du spectromètre que nous avons utilisé (LCQ Advantage), la désolvatation des ions est assurée par un transit dans un capillaire chauffé (température pouvant être ajustée jusqu'à 300°C selon le débit d'échantillon).

a) Le modèle de Dole

Plusieurs fissions successives conduisent à des microgouttelettes (de rayon proche de 1 nm), comportant une ou plusieurs charges élémentaires, mais une seule molécule d'analyte. Après évaporation du solvant résiduel, les charges se localisent sur les sites permettant de générer l'ion le plus stable en phase gazeuse. Ce modèle est appelé « modèle de la charge résiduelle » [12] (CRM ou Charge Residue Model) (Figure III.13).

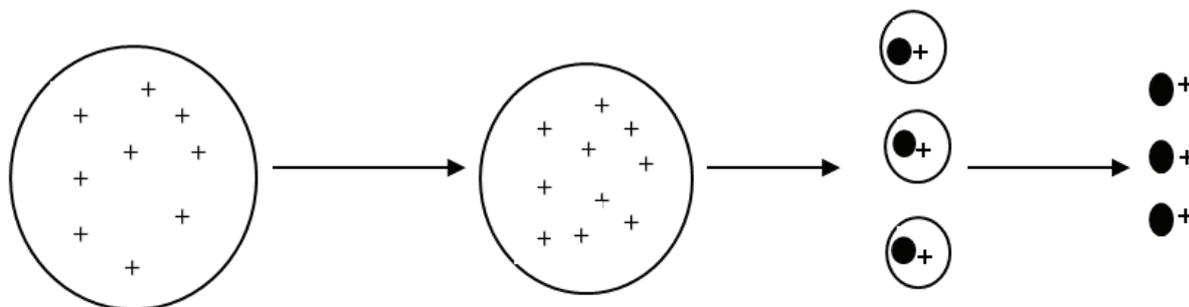


Figure III.13 : Modèle de la charge résiduelle par Dole

b) Le modèle d'Iribarne et Thomson ^[13]

Ce modèle, ou modèle d'évaporation ionique (IEM ou Ion Evaporation Model), suggère que lorsque le rayon des gouttelettes filles atteint un rayon inférieur à la limite de Rayleigh (inférieur à 10 nm), le champ électrique est suffisamment important pour que les ions solvatés soient émis dans la phase gazeuse (**Figure III.14**).

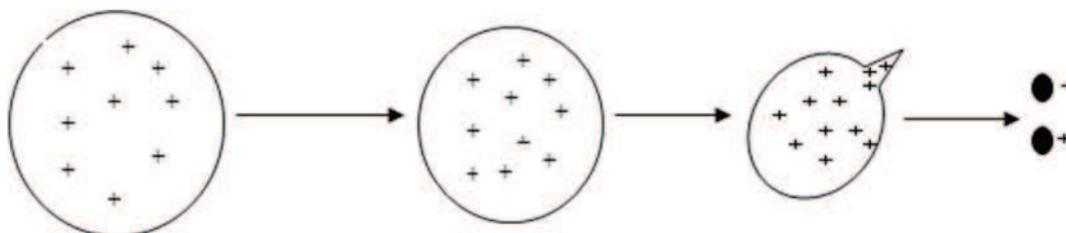


Figure III.14 : Modèle d'évaporation ionique par Iribarne et Thomson

D'après différents travaux, un consensus se dégage pour considérer que l'ionisation des molécules de hautes masses s'effectue selon de modèle de Dole, alors que pour les petites molécules le mécanisme est plutôt l'IEM.

II.1.3. Mode d'introduction de l'échantillon

La méthode la plus simple est l'infusion : l'échantillon à analyser est introduit à l'aide d'un pousse-seringue connecté au capillaire de silice de fin diamètre de la source. Dans notre cas, nous avons utilisé un pousse-seringue KD Scientific avec une seringue de 250 μL et un débit de 6,6 $\mu\text{L}/\text{min}$.

La chromatographie en phase liquide est un mode d'introduction de l'échantillon qui permet de disposer en amont du spectromètre de masse d'un moyen de séparation des composés à analyser. Notamment, les formulations d'éluant fréquemment utilisées en chromatographie à polarité de phase inversée sont compatibles avec l'analyse par spectrométrie de masse, moyennant quelques ajustements (remplacement de l'acide trifluoroacétique par l'acide formique, ou limitation de la concentration de TFA à 0,05% ; utilisation exclusive de tampons volatils). De plus, la chromatographie à polarité de phase inversée est un moyen très efficace de dessalage des échantillons à analyser, permettant ainsi de limiter la formation d'adduits de sodium et de potassium pour les ions. Dans notre cas, nous avons utilisé un chromatographe de type Advantage (Thermo Fischer) avec des colonnes C18 de 2 mm de diamètre et un débit de 0,2 mL/min transmis en intégralité dans la source du spectromètre de masse. Un détecteur UV est par ailleurs intercalé entre la sortie de colonne et l'entrée de la source, permettant une analyse à différentes longueurs d'ondes dans l'UV.

II.2. L'Analyseur

Paul [14] et Steinwedel [15] ont décrit en 1960, pour la première fois le filtre de masse quadripolaire, couramment désigné sous le terme de quadripôle, et le piège ionique quadripolaire. Ce dernier a ensuite été modifié en analyseur pour la spectrométrie de masse par plusieurs constructeurs.

II.2.1 Principe du piège ionique

Cet analyseur est constitué de trois parties : une électrode circulaire de section hyperbolique et deux électrodes chapeaux (également de géométrie hyperbolique). Les ions issus de la source d'ionisation sont guidés jusqu'à l'analyseur et passent à travers l'une des électrodes chapeau et sont éjectés par l'électrode chapeau opposée (suivant l'axe z) (**Figure III.15**).

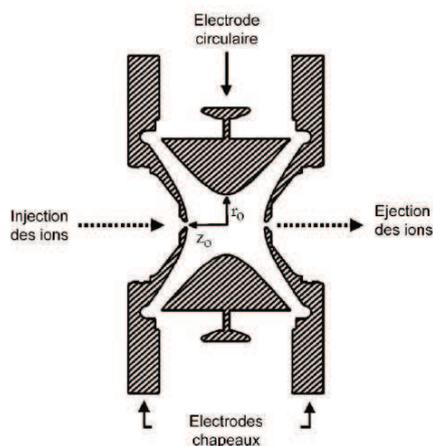


Figure III.15 : Schéma en coupe du piège ionique quadripolaire.

Ces ions sont soumis au potentiel appliqué à l'électrode circulaire ($+\Phi_0$ et $-\Phi_0$) qui comprend une composante continue U et une composante sinusoïdale $V\cos\omega t$:

$$\Phi_0 = U + V\cos\omega t \text{ (où la pulsation } \omega \text{ correspond à une radiofréquence, proche de 100 MHz)}$$

Les électrodes chapeaux ne sont utilisées que pour leur appliquer des potentiels auxiliaires de quelques millivolts pour déstabiliser les ions.

Les ions issus de l'interface sont piégés dans l'analyseur sous l'effet d'un champ quadripolaire généré par la radiofréquence appliquée sur l'électrode circulaire. Des collisions successives avec les molécules du gaz tampon (hélium) présent dans le piège à une pression voisine de 0,1 Pa, ralentissent les ions dont la trajectoire est ainsi refocalisée au sein de l'analyseur. Les ions adoptent une trajectoire stable, formant une sorte de huit dans l'espace (**Figure III.16**).

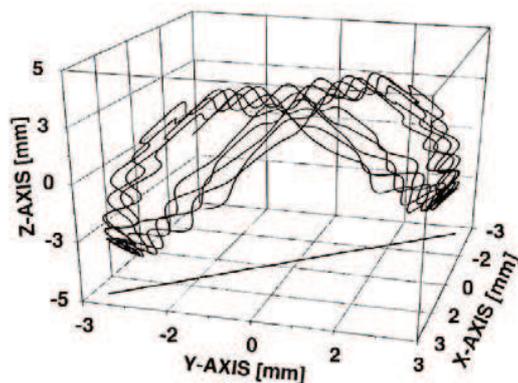


Figure III.16 : Trajectoire d'un ion dans le champ électrique d'un piège à ion

Dans le cas du piège ionique, les ions de différentes masses sont présents simultanément dans la trappe. Le nombre d'ions admis dans le piège est limité de manière automatique (fonction Automatic Gain Control, AGC du LCQ) de manière à éviter les phénomènes parasites dus à la répulsion électrostatique (effet de charge d'espace). Ceci permet de prendre en compte la variation du flux d'analytes engendrée par une séparation chromatographique en amont du spectromètre de masse.

Le mouvement d'un ion au sein du piège, suit une trajectoire oscillante close, décrite par des équations différentielles, analogues aux équations de Mathieu qui s'appliquent aux analyseurs quadripolaires. L'analogie entre ces équations a permis de déterminer les valeurs des paramètres a_u (accélération) et q_u (charge), en fonction des tensions U (tension continue) et V (amplitude radiofréquence), pour lesquelles les trajectoires des ions n'excèdent jamais les dimensions z_0 et r_0 du piège ionique ($u = r$ ou z , u étant les coordonnées de l'ion dans l'espace). L'analyse des ions selon leur rapport m/z est réalisée par une expulsion contrôlée vers le détecteur.

Le mode d'analyse simple (Full scan) permet d'obtenir les valeurs de m/z des espèces multi-chargées. Le nombre de charges d'un ion peut être confirmé par un balayage restreint autour de la valeur m/z de l'ion. Cette fonction ZoomScan du LCQ permet de différencier le nombre de charge des ions mono, doublement et triplement chargés (l'écart entre deux ions du massif isotopique d'un ion doublement chargé est de 0,5 Th) dans le cas du spectromètre LCQ, il n'est plus possible de différencier de manière certaine un ion portant 4 charges (écart de 0,25 Da) d'un ion portant 5 charges (écart de 0,20 Da).

En mode MS/MS, seul les ions ayant un m/z donné sont conservés dans le piège ionique, les autres étant éjectés. Cette sélection peut être réalisée à ± 1 Th autour de la valeur sélectionnée. La fragmentation des ions est alors obtenue en augmentant les valeurs de potentiels appliquées aux électrodes pour augmenter leur énergie cinétique. De multiples collisions ont lieu avec les atomes d'hélium présents dans le piège. Les ions précurseurs vont ainsi être excités et pouvoir se dissocier en ions fragments. Par expulsion du piège, ces derniers sont analysés selon leur valeur de m/z et détectés. Ce processus de fragmentation peut être répété

jusqu'à 9 fois dans le cas du LCQ. Toutefois le nombre de cycles de sélection/fragmentation est limité par la quantité d'ions pouvant être emmagasinés dans le piège (**Figure III.17**).

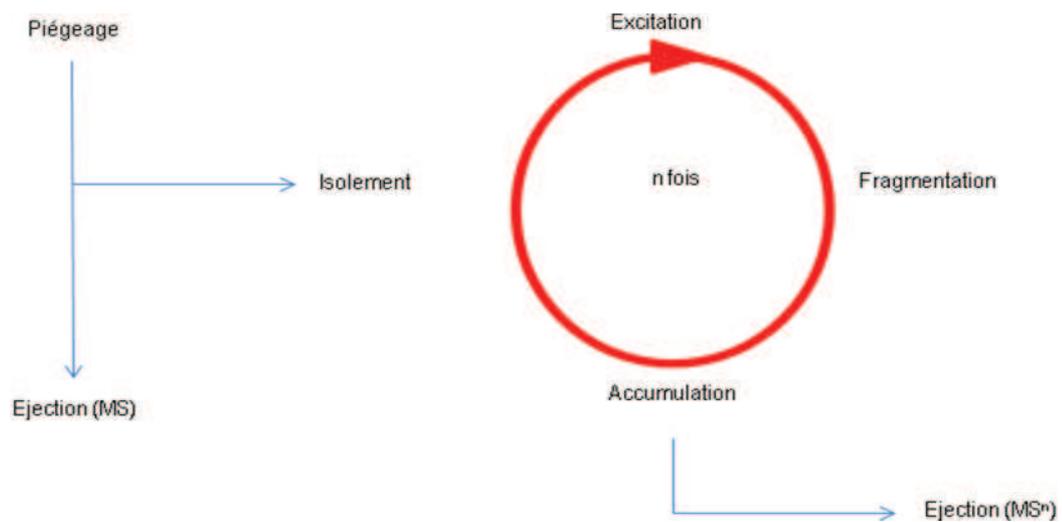


Figure III.17 : Principe de la fragmentation

II.2.2. Le spectromètre LCQ Advantage plus en détail (Figure III.18)

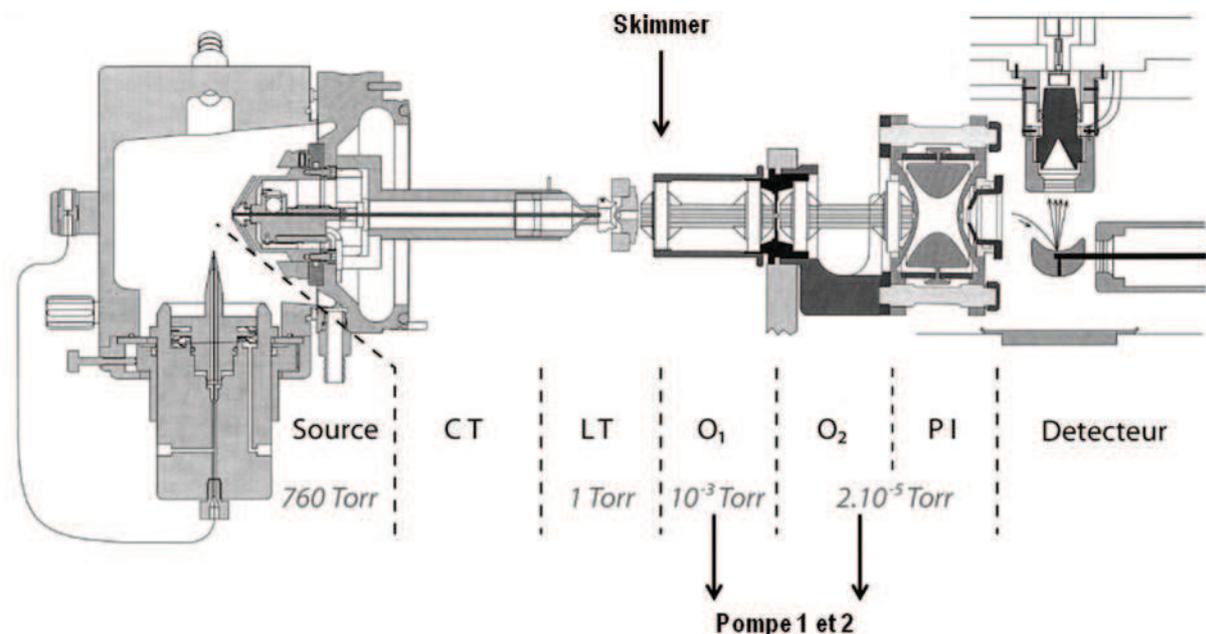


Figure III.18 : Spectromètre de masse LCQ (Source ESI ; CT : Capillaire de transfert ; LT : Lentille tube ; O1 : Premier octopôle ; O2 : second octopôle ; PI : Piège Ionique ; en gris : les pressions des compartiments)

La source ESI est dite orthogonale, car l'échantillon est amené dans la source à 90° par rapport à l'orifice du cône d'entrée de l'analyseur comme cela est montré sur le schéma ci-dessus. Le premier cône est suivi d'un capillaire de transfert métallique (CT) chauffé entre 20 et 300°C . Ce capillaire métallique long d'une quinzaine de centimètres permet une désolvatation optimale des ions en adaptant la température au débit d'entrée de l'échantillon. Ce capillaire est prolongé par une lentille tube (LT), qui permet de focaliser les ions issus du CT vers un autre cône « écumoire » (skimmer). Au niveau de LT règne une pression encore relativement élevée (1 Torr). Ensuite les ions sont focalisés et transmis par deux octopôles O1 et O2 successifs avant l'injection dans le piège ionique (PI). Un pompage secondaire permet d'atteindre le vide requis par le fonctionnement de l'analyseur.

La gamme de masse de l'appareil s'étend de 50 à 2000 Th, l'exactitude de mesure de masse est de l'ordre de 0,05 Th.

a) Détermination de masse moléculaire

L'ionisation par électronébulisation produit des ions multichargés. Un calcul simple, pouvant être réalisé par un logiciel de déconvolution spectrale, permet de remonter à la masse d'une molécule neutre M à partir de deux ions consécutifs porteurs respectivement de z et (z+1) charges (Figure III.19). En effet le spectre nous donne les valeurs m_1 et m_2 de deux pics tels que :

$$m_1 = \frac{M + (z + 1)}{(z + 1)}$$

$$m_2 = \frac{M + z}{z}$$

avec : z : la charge

M : masse moléculaire théorique

m_1 m_2 deux pics consécutifs

On en déduit aisément :

$$z = (m_1 - 1) / (m_2 - m_1)$$

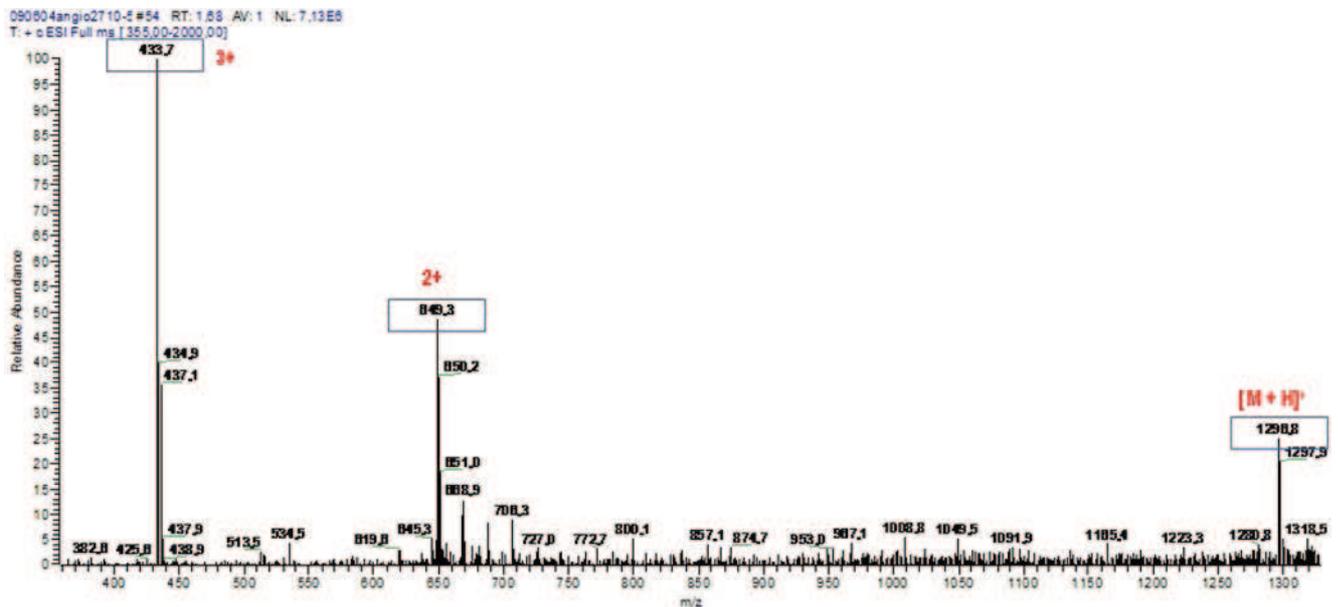


Figure III.19 : Spectre ESI en mode positif de l'Angiotensine I. MH^+ _{théorique} = 1296,48. On distingue l'ion monochargé, le dichargé et le trichargé.

En mode ZoomScan notamment, la résolution du LCQ est suffisante pour déterminer la masse monoisotopique de peptides à partir de leurs ions doublement ou triplement chargés dans la gamme allant jusqu'à 2000 Th.

III. Couplage de la chromatographie en phase liquide et de la spectrométrie de masse

Comme nous l'avons vu précédemment, l'ionisation par électronébulisation est réalisée à partir d'un échantillon introduit dans la source en phase liquide. De ce fait, l'ESI est une méthode idéale pour coupler la chromatographie liquide à un spectromètre de masse (Figure III.20), en particulier dans le cas de la chromatographie à polarité de phase inversée.

Dans ce mode de chromatographie, la phase stationnaire est une silice greffée (à partir de ses fonctions silanols) par des chaînes alkyles, ce qui confère un caractère fortement hydrophobe à ce support si l'on choisit des chaînes longues de type octadécyl. Dans un tel système, l'eau a un pouvoir éluant pratiquement nul. De ce fait, c'est une méthode de choix pour effectuer le dessalage d'analytes : en utilisant l'eau comme seul éluant, ils sont retenus sur la colonne et les sels peuvent être éliminés. Une force éluante croissante est obtenue à l'aide de modifiants organiques tels que le méthanol et l'acétonitrile, ou l'isopropanol pour les solutés les plus retenus, en opérant selon un mode programmé de gradient d'éluion.

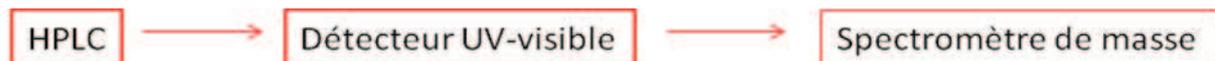


Figure III.20 : Schéma de la chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse

Dans le cas du couplage avec la spectrométrie de masse ESI, il faut veiller à n'utiliser que des tampons volatils. L'acide trifluoroacétique fréquemment utilisé pour les séparations de peptides et protéines tend à former de paires d'ions et à diminuer le signal en mode ESI. Il est donc substitué le plus souvent par de l'acide formique ou acétique.

Le déroulement de la séparation chromatographique peut être suivi par un spectrophotomètre UV, avant la transmission de l'éluant au spectromètre de masse. Dans le cas de l'analyse des peptides, les longueurs d'onde utilisées étaient 214 nm (détection de la liaison peptidique) et 280 nm (présence de Tyr et Trp). Dans le cas de l'analyse des polyphénols, les longueurs d'ondes choisies étaient 280 et 320 nm.

IV. ELECTROPHORESE 1D

Nous avons utilisé cette méthode de séparation pour analyser les protéines salivaires.

L'origine de l'électrophorèse remonte en 1892, par S.E Linder et H. Picton qui s'inspirèrent des travaux de H. Von Helmholtz. Ce dernier a montré que sous l'effet d'un champ électrique, il était possible de déplacer des particules chargées vers le pôle de signe opposé à leur charge. Il faut attendre 1969 avec Beber et Osborn qui introduisent l'agent dénaturant de sodium dodécyl sulfate (SDS) pour voir la séparation de différentes sous-unités protéiques. L'utilisation de gels, permettant une meilleure résolution, a remplacé les supports poreux utilisés en couche mince pour la séparation de molécules de hauts poids moléculaires.

Le principe de l'électrophorèse repose sur le déplacement d'espèces ionisées sous l'effet d'un champ électrique, les anions migrant vers la cathode, les cations vers l'anode. Les caractéristiques propres aux espèces

(propriétés hydrodynamiques) et les conditions de l'électrophorèse vont avoir une influence sur la distance parcourue et la vitesse de migration des ions.

Pour étudier les protéines, l'électrophorèse est pratiquée avec des gels de polyacrylamide, obtenus par polymérisation du monomère d'acrylamide, unité de base, et de bisacrylamide, agent de réticulation. La proportion en acrylamide va définir le maillage et donc la densité du gel. Si la proportion en acrylamide est grande, les mailles du réseau seront donc serrées, seules les petites molécules pourront être séparées (**Figure III.21**).

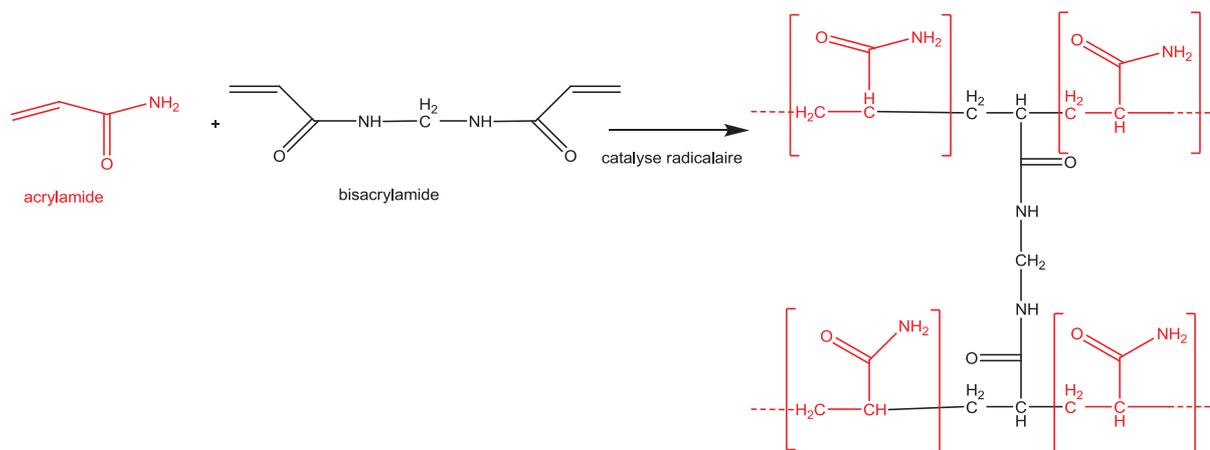


Figure III.21 : Mécanisme de polymérisation de l'acrylamide par catalyse radicalaire

Dans notre cas pour séparer les protéines salivaires, les gels sont constitués de 15 % d'acrylamide pour le gel de séparation et de 5 % pour le gel de concentration (le protocole sera présenté dans le chapitre VIII).

La polymérisation du gel se fait par réaction radicalaire, initiée par le persulfate d'ammonium et catalysée par le TEMED (N'-N'-N'-N'-tétraméthylène diamine).

Compte tenu de la diversité des structures des protéines et de leur répartition de charges à un pH donné, il n'est pas possible de déterminer avec précision la masse moléculaire de protéines natives. La méthode la plus utilisée à cette fin fait appel au dodécyl sulfate de sodium (SDS), d'où la désignation courante de SDS-PAGE (pour Poly Acrylamide Gel Electrophoresis). Le SDS est un détergent anionique fort, qui a la propriété de dénaturer les protéines tout en se liant à elles. La quantité de SDS liée (et donc le nombre de charges introduites) est globalement proportionnelle à la masse moléculaire des protéines. Il est ainsi possible de séparer des protéines dénaturées en fonction de leur masse moléculaire. Avant de dénaturer les protéines, ces dernières sont traitées par un agent réducteur, le béta-mercaptoéthanol, qui va réduire les ponts disulfures.

L'électrophorèse SDS-PAGE est complétée par la mise en place d'un gel de concentration ou « stacking ». Il permet une entrée homogène dans le gel de séparation d'échantillons de volumes sensiblement différents (Figure III.22)

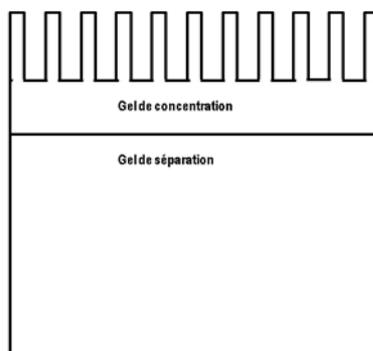


Figure III. 22 : Gel électrophorèse

Après migration, les protéines du gel sont révélées par une technique de coloration bien spécifique selon l'utilisation, dans notre cas soit au Bleu de Coomassie R250, soit au nitrate d'argent.

La révélation au bleu va nous permettre de distinguer les protéines riches en prolines qui vont se colorer en violet (phénomène métachromatique : les protéines contenant des résidus hydrophobes et des résidus prolines en grand nombre apparaissent en bandes de couleur rose à violette). Cette coloration est une méthode quantitative. La révélation à l'argent permet d'obtenir une meilleure limite de détection que la coloration au bleu, mais n'est pas quantitative.

V. Bibliographie

1. Merrifield, R.B., *Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide*. J. Am. Chem. Soc., 1963, 85: p. 2419.
2. Atherton, E., & al., *Solid phase peptide synthesis: a practical approach*. 1989: Oxford
3. Dourtoglou, V., & al., *O-Benzotriazolyl-N,N,N',N'-tetramethyluronium Hexafluorophosphate as Coupling Reagent for the Synthesis of Peptides of Biological Interest*. Synthesis, 1984. 7: p. 572-575.
4. Fields, C.G., & al., *HBTU activation for automated Fmoc solid-phase peptide synthesis*. Pept. Res., 1991. 4(2): p. 95-101.
5. Munson, M.S.B., & al., *Chemical Ionization Mass Spectrometry. I. General Introduction*. J. Am. Chem. Soc., 1966. 88: p. 2621-2630.
6. Barber, M., & al., *Fast atom bombardment of solids (F.A.B.): a new ion source for mass spectrometry*. J. Chem. Soc., Chem. Commun., 1981: p. 325-327.
7. Macfarlane, R.D., & al., *Californium-252 plasma desorption mass spectroscopy*. Science, 1976. 191: p. 920-925.
8. Fenn, J.B., & al., *Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules*. Science, 1989 246: p. 64-71.
9. Tanaka, K., & al., *Protein and Polymer Analyses up to m/z 100 000 by Laser Ionization Time-of flight Mass Spectrometry*. Rapid Commun. Mass Spectrom., 1988. 2(20). p. 151-153
10. Kebarle, P., *A brief overview of the present status of the mechanisms involved in electrospray mass spectrometry*. J. Mass Spectrom., 2000. 35(7): p. 804-817.

11. Rayleigh, L., *On the equilibrium of liquid conducting masses charged with electricity*. Philos. Mag., 1882. 14: p. 184-186.
12. Dole, M., & al., *Molecular Beams of Macroions*. J. Chem. Phys., 1968. 49(5): p. 2240-2249.
13. Iribarne, J.V., & al., *On the evaporation of small ions from charged droplets*. J. Chem. Phys., 1976. 64(6): p. 2287-2294.
14. Paul, W., *Electromagnetic cages for charged and neutral particles*. Angew. Chem. Int. Edit., 1990. 102(7): p. 780-789.
15. Paul, W., Steinwedel, H., *Apparatus for separating charged particles of different specific charges*. German Patent, 1953. 944 , 900

CHAPITRE IV :

ETUDE DE L'ASTRINGENCE EN PHASE LIQUIDE AU MOYEN D'UNE SONDE PEPTIDIQUE

Depuis pratiquement un siècle les composés phénoliques font l'objet de nombreux travaux allant de l'étude de leur implication dans le monde végétal à celle de leur rôle dans l'alimentation. Les premiers travaux sur la notion d'astringence remontent aux années 1980. L'étude au niveau moléculaire de cette sensation, résultant des interactions entre les composés phénoliques et les protéines salivaires, doit contribuer à une meilleure compréhension de ce phénomène avec pour objectif final son contrôle. La maîtrise de l'astringence constitue en effet un avantage important pour l'industrie agroalimentaire et crucial pour les applications œnologiques.

Les études actuelles font souvent appel à des techniques très performantes telles que la Spectrométrie de Masse et la Résonance Magnétique Nucléaire, couplées à des techniques de séparation (électrophorèse, chromatographie).

Nous avons vu qu'un travail préliminaire réalisé au cours de son doctorat par B. Plet [1] a conduit à l'élaboration d'une échelle d'affinité de polyphénols envers un peptide modèle, mime des PRP basiques. Ce travail reposant sur la caractérisation de complexes par une spectrométrie de masse résolue en énergie (ERMS), l'échelle d'affinité concerne les interactions observables en phase gazeuse. Dans ce cas particulier, le rôle prépondérant des interactions hydrophiles dans la formation du complexe a été mis en évidence. L'échelle d'affinité ainsi obtenue permet de refléter des différences subtiles de structure des polyphénols modèles utilisés. Cependant, la méthode utilisée présente deux limitations:

- Elle est difficilement applicable au cas de mélanges complexes de polyphénols
- Elle ne prend pas en compte, en première approximation, les effets hydrophobes qui peuvent intervenir dans la formation des complexes entre peptides et polyphénols intervenant dans la complexation, puisque le processus d'électronébulisation tend à éliminer le solvant aqueux.

Ces limites nous ont amené à développer une stratégie permettant d'étudier cette interaction en phase liquide.

Nous avons fait le choix de conserver, comme modèle simplifié de protéines salivaires riches en prolines basiques, le peptide IB7₁₄ (**Figure IV.1**) sur lequel a porté l'étude en phase gazeuse. Ce segment de quatorze acides aminés du domaine N-Terminal de la protéine IB7 présente un intérêt triple:

- Il est strictement conservé dans la séquence de toutes les PRP basiques
- Il comporte le motif de cinq (PQGPP) et de neuf acides aminés (PPGKPQGPP), répétés dans la séquence des PRPb et conservés d'une PRPb à l'autre
- Sa taille réduite (14 acides aminés, $[M + H]^+ = 1300,6$ Da) en fait un objet facilement analysable en spectrométrie de masse avec un piège ionique dont la gamme de masse est limitée à 2000 Th.



Figure IV.1 : Structure primaire de la protéine salivaire riche en proline basique IB7. En rouge délimitation du peptide IB7₁₄.

De plus, comme notre stratégie consiste en l'élaboration d'une sonde peptidique obtenue par greffage de ce peptide sur un support solide, la structure étendue du peptide (informations obtenues par dichroïsme circulaire et modélisation moléculaire) est de nature à faciliter son immobilisation.

I. Elaboration de la sonde peptidique

I.1. Fonctionnalisation des billes magnétiques

La sonde est réalisée à partir de billes magnétiques fonctionnalisées en surface par des groupements carboxylates. Les billes sont monodispersées, constituées d'un noyau magnétique encapsulé dans un polymère réticulé hydrophile.

Pour offrir une surface de contact importante, nous avons choisi une des plus petites tailles de billes disponibles à partir d'une source commerciale (granulométrie des billes 200 nm, Ademtech). Les billes sont en suspension dans une solution aqueuse contenant 0,09 % d'azidure de sodium (agent de conservation). La première étape consiste à laver les billes. Les groupements carboxyliques sont ensuite activés par l'agent de couplage EDC (1-éthyle-3(3-diméthylaminopropyle)-carbodiimide), formant ainsi des esters activés comme intermédiaires de réaction (Figure IV.2).

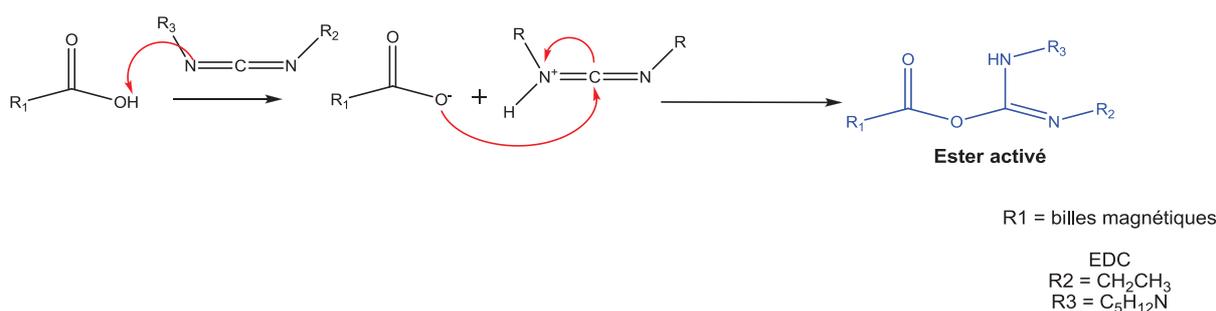


Figure IV.2 : Mécanisme réactionnel simplifié de la formation de l'ester activé à partir des acides carboxyliques en surface des billes magnétiques

1.2. Greffage du peptide sur les billes magnétiques et détermination du rendement de greffage

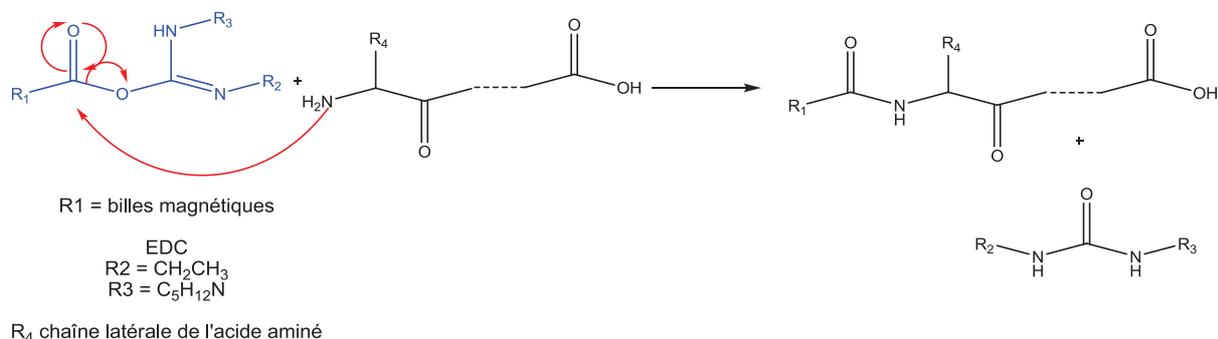


Figure IV.3 : Mécanisme réactionnel de la formation de la liaison amide entre l'ester activé et l'amine primaire du peptide IB7₁₄.

Ces intermédiaires de réaction réagissent avec le peptide (attaque de l'amine primaire du peptide sur l'ester) pour former une liaison amide (liaison peptidique) (**Figure IV.3**).

Les billes sont ensuite remises en suspension dans une solution de tampon Tris pour bloquer les fonctions carboxylates n'ayant pas réagi. Enfin les billes sont lavées avant stockage en milieu tamponné.

La réaction de greffage a pour cible le groupement amino-terminal du peptide. Or, le peptide IB7₁₄ possède aussi une lysine en position 5; il n'est donc pas exclu que le greffage se fasse partiellement à ce niveau. Cependant, les PRP étant connues pour avoir une structure en « random coil » (étendue), on peut émettre l'hypothèse que si l'amine de la chaîne latérale de la lysine se lie aux billes, le peptide conservera malgré tout sa capacité à interagir avec les polyphénols, les résidus du peptide impliqués (principalement les prolines) étant toujours accessibles.

Sachant que les billes présentent une capacité de fixation de 10 à 50 µg de peptide par milligramme, les expériences de greffage ont été engagées avec des quantités de 30 µg à 150 µg de peptide IB7₁₄ pour 3 mg de billes. Le rendement de greffage du peptide sur les billes magnétiques fonctionnalisées est déterminé par dosage du peptide avant et après greffage par mesure de l'absorbance dans l'UV. Pour réaliser cette quantification il nous a fallu au préalable déterminer le coefficient d'extinction molaire du peptide.

Comme le peptide ne contient pas de résidu aromatique, l'absorbance est mesurée à 190 nm avec au moins trois mesures séparées (spectre d'absorbance présenté entre 190 et 390 nm, **Figure IV.4**). Le solvant utilisé présentant une absorbance à cette longueur d'onde, un blanc est réalisé pour chaque mesure.

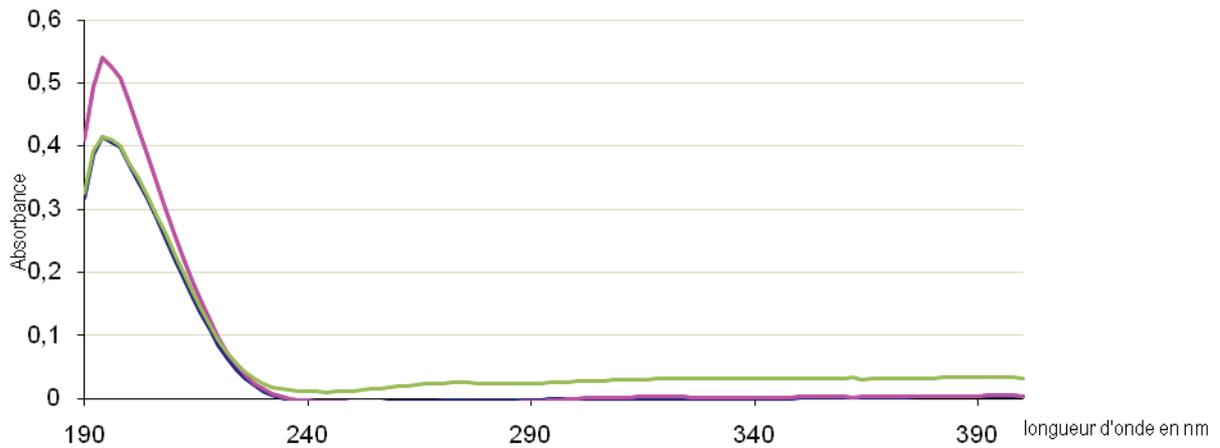


Figure IV.4 : Spectre d'absorbance du peptide IB7₁₄ (trois mesures distinctes)

Le coefficient d'extinction molaire est déterminé pour le maximum d'absorbance obtenu avec une solution de peptide de concentration $5,61 \cdot 10^{-5}$ M, grâce à la loi de Beer-Lambert :

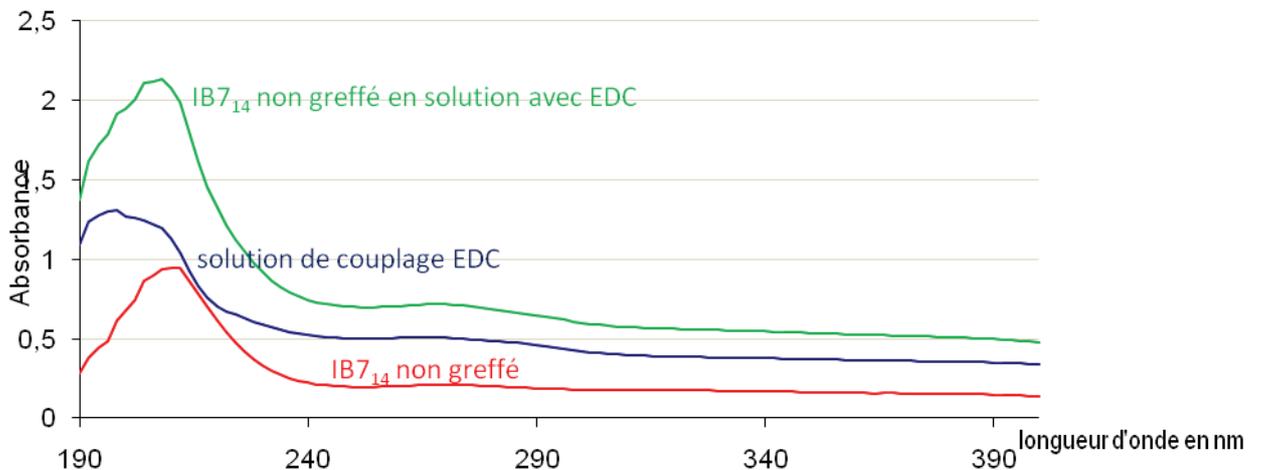
$$\text{Abs} = C \times l \times \epsilon$$

(l : longueur de la cuve en cm, C : concentration en mol.L⁻¹, ε: coefficient d'extinction molaire en L·mol⁻¹·cm⁻¹)

Nous avons déterminé un coefficient d'extinction molaire moyen ε à température ambiante de (80000 ± 3000) L·mol⁻¹·cm⁻¹.

La détermination du taux de greffage passe par la détermination de la part de peptide non greffé (Figure IV.5). Cette dernière est obtenue par mesure de l'absorbance du surnageant du mélange réactionnel après couplage (les billes ayant été séparées par centrifugation).

Figure IV.5 : Evaluation de la part



de peptide non greffé au moyen de mesures d'absorbance UV

Le **Tableau IV.1** présente les rendements de greffage obtenus pour différentes quantités de peptide engagées. Le rendement de greffage moyen est de $(94 \pm 1) \%$.

Quantité de IB7 ₁₄ Pour 3 mg de billes	160 µg	146 µg	146 µg	146 µg	75 µg	105 µg
Rendement de greffage moyen	$94 \pm 1 \%$	$93 \pm 1 \%$	$93 \pm 1 \%$	$95 \pm 1 \%$	$94 \pm 1 \%$	$95 \pm 1 \%$
Pour 1 mg de billes	38,4 nmoles	34,7 nmoles	35,0 nmoles	35,6 nmoles	18,2 nmoles	25,7 nmoles

Tableau IV.1 : Rendements de greffage

1.3. Conclusion

A ce stade, l'élaboration de la sonde peptidique sur des billes magnétiques ne semble avoir présenté aucune difficulté particulière. Ainsi, on retiendra que le protocole utilisé permet la fixation de 18 à 38 nanomoles de peptide IB7₁₄ par milligramme de billes. On note cependant que le greffage du peptide sur les billes peut se réaliser sur la partie *N*-terminale et sur la chaîne latérale de la lysine 5. Les expériences d'interaction avec des polyphénols devront donc être menées avec un seul et même lot de sonde peptidique. De plus, on peut supposer que l'absence d'information sur la densité des groupements carboxyliques en surface des billes magnétiques peut être une variable supplémentaire, le fournisseur ne donnant qu'une fourchette de concentration pour les fonctions réactives en surface des billes.

II. Etude des polyphénols modèles

II.1. Choix des polyphénols

Notre travail a pour objectif l'élaboration d'une échelle d'affinité en phase liquide, mais aussi la comparaison de celle-ci avec l'échelle établie précédemment en phase gazeuse. Pour cette raison, nous avons retenu dans un premier temps les quatorze polyphénols étudiés en phase gazeuse (structures présentées sur la **Figure IV-6**). Ils sont représentatifs de cinq des six sous-classes des flavanoïdes : flavanoles, flavonoles, flavones, flavanones, isoflavones.

Cependant la stratégie envisagée, avec les nombreux contrôles qu'elle impose, est particulièrement lourde dans le cas d'un nombre aussi important de composés. Nous avons donc limité dans un premier temps l'analyse à un nombre réduit de composés pour tenter de valider l'approche.

Cinq composés (quatre dimères et un trimère, représentés en vert sur la **Figure IV-6**) ont été écartés d'emblée, car leur production au laboratoire a impliqué une synthèse chimique multi-étapes et à faible rendement, rendant délicate leur utilisation (les quantités disponibles au début de ce travail n'étaient pas suffisantes et le coût de versions commerciales de ces composés est dissuasif).

Parmi les neuf composés restants nous n'avons retenu que ceux qui offrent des conditions d'analyses compatibles avec notre stratégie (description dans le paragraphe suivant).

Chapitre IV : Etude de l'astringence en phase liquide au moyen d'une sonde peptidique

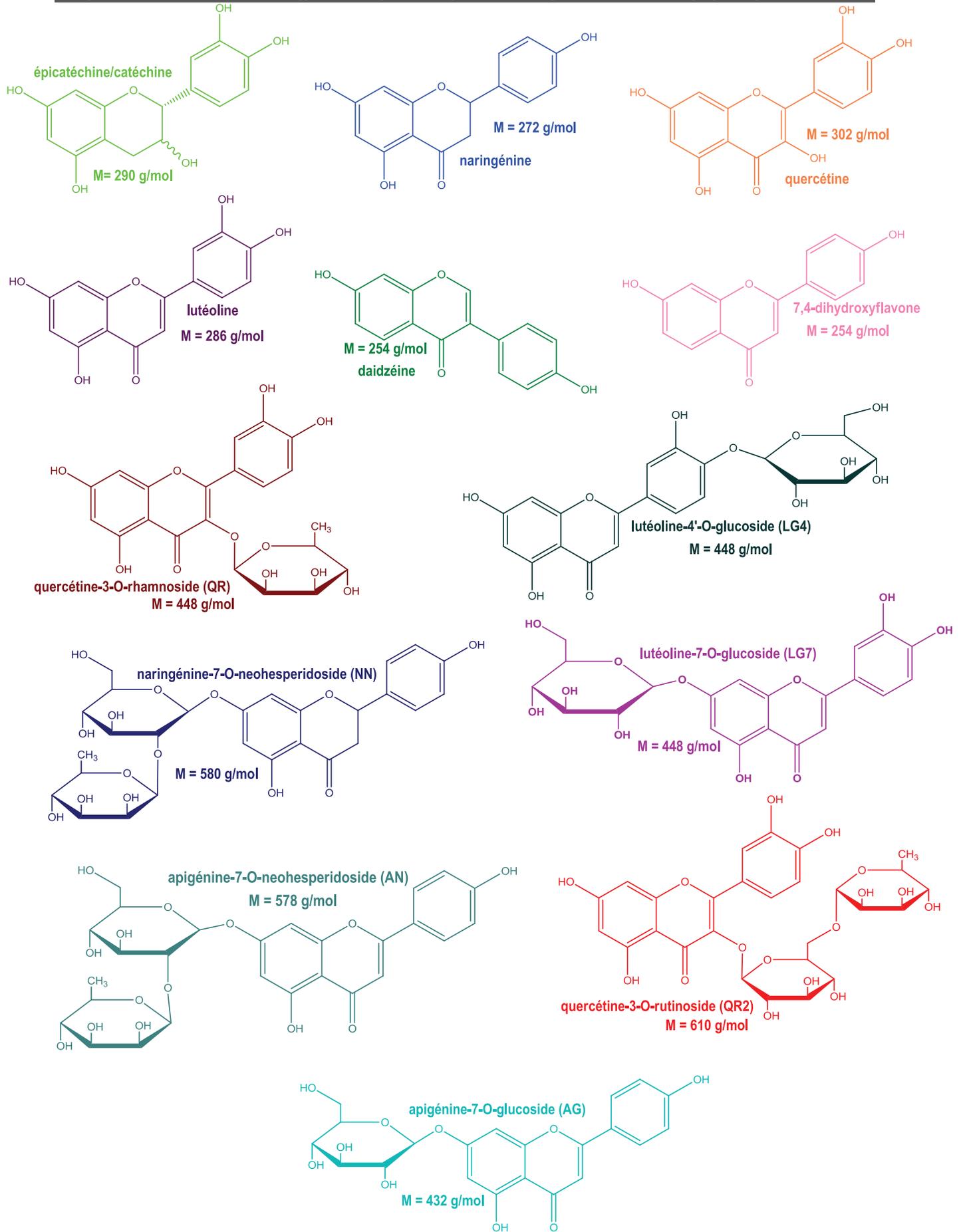


Figure IV.6 : Les quatorze composés phénoliques analysés en infusion par spectrométrie de masse (ERMS)

1.2. Analyse des polyphénols par spectrométrie de masse ESI-Piège ionique

Si notre objectif se limitait à l'étude de l'interaction de la sonde avec des polyphénols purs, nous aurions pu déterminer des conditions d'analyse par spectrométrie de masse optimales pour chacun d'eux. Or nous envisageons d'étudier l'interaction de la sonde avec des mélanges de polyphénols plus ou moins complexes allant jusqu'au cas le plus complexe: le vin rouge. C'est la raison pour laquelle il nous a fallu déterminer des conditions d'analyses adaptées à la majeure partie d'entre eux même si ces conditions n'étaient optimales pour aucun.

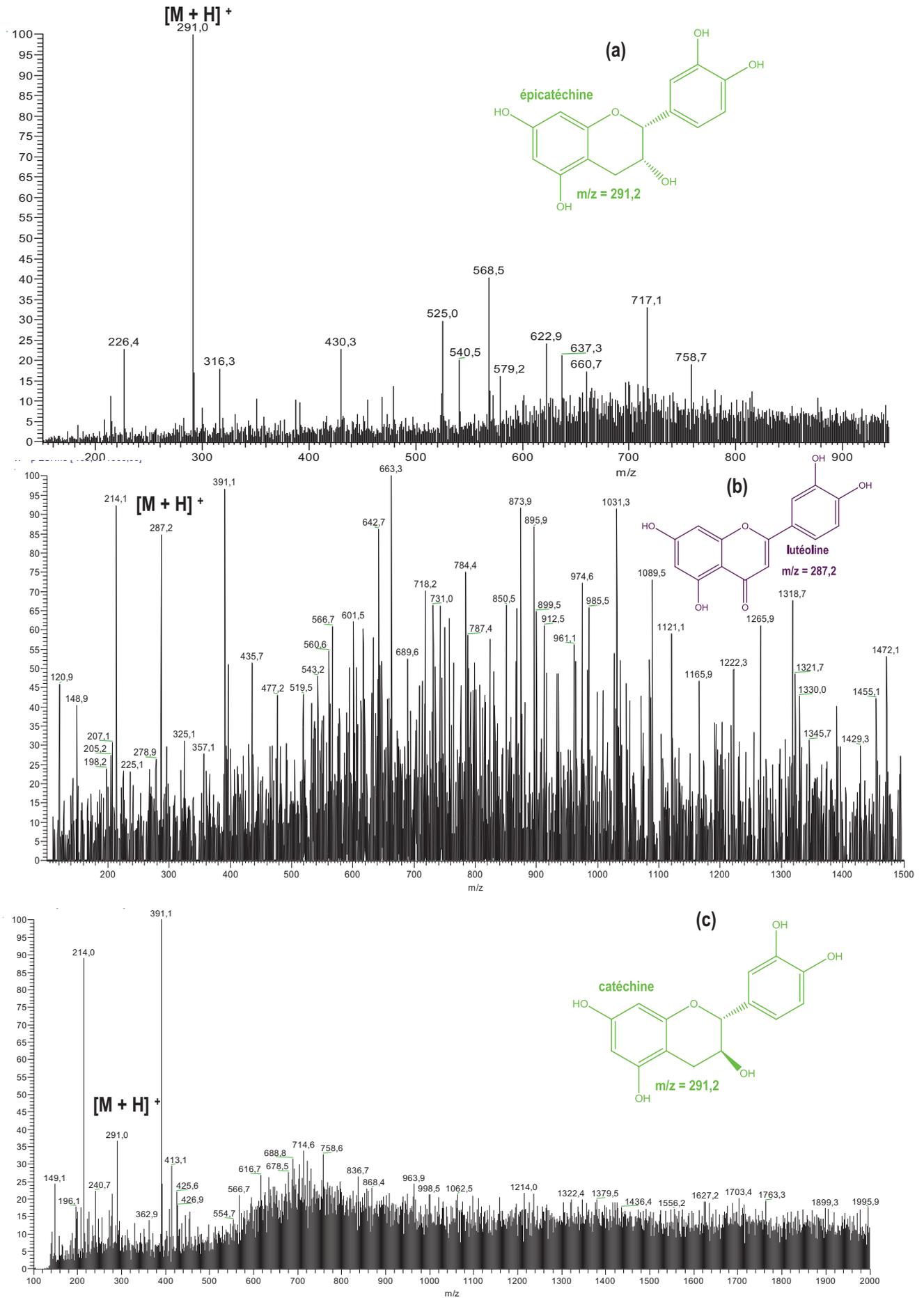
Pour le choix du solvant dans lequel les polyphénols sont analysés, nous avons sélectionné des conditions proches de celles dans lesquelles l'interaction se produit en bouche lors de la dégustation d'un vin. Le vin étant un milieu hydroalcoolique acide (concentration en éthanol d'environ 12 à 14 %, pH = 3, 5 selon les cépages) nous avons choisi un mélange eau/éthanol/acide acétique 89/10/1.

L'analyse des composés phénoliques est réalisée sur un spectromètre de masse LCQ Advantage (Thermo) en mode positif, à une concentration de 35.10^{-6} mol.L⁻¹. Les spectres présentés ci-après ont été réalisés en infusion à un débit de 6 µL/minute. Les paramètres de base des conditions d'ionisation sont présentés dans le **Tableau IV.2**.

Source ESI	Mode positif
Gaz de nébulisation (u.a)	20
Gaz auxiliaire (u.a)	0
Tension de spray	4,5 kV
Température du capillaire de transfert	200 °C
Tension du capillaire de transfert	10 V
Lentille de tube	0

Tableau IV.2 : Paramètres de base des conditions d'ionisation en mode positif

Dans ces conditions, la faible réponse obtenue pour certains polyphénols nous a amené à les disqualifier. C'est le cas de la catéchine et de la lutéoline. Sur les spectres présentés **Figure IV.7**, on peut remarquer que le monomère d'épicatéchine (a) est observé dans des conditions acceptables de rapport signal/bruit, mais que ce n'est pas le cas des deux autres composés, lutéoline (b) et catéchine (c), noyés dans le bruit de fond (pour des concentrations compatibles avec notre stratégie).



Dans ces conditions d'analyse dites « moyennes » cinq composés seulement sont retenus sur le seul critère de la sensibilité de la réponse en spectrométrie de masse dans les conditions choisies (spectres présentés **Figure IV.8**, structures moléculaires encadrées dans l'échelle d'affinité en phase gazeuse rappelée **Figure IV.9**) :

- AN (apigénine-7-O-néohesperidoside) (a)
- AG (apigénine-7-O-glucoside) (b)
- NN (naringénine-7-O-néhespéridoside) (c)
- QR2 (quercétine-3-O-rutinoside) (d)
- Epi (épicatéchine) (**Figure IV.7**)

L'un des intérêts présentés par ces molécules vient de la variété structurale induite par des substitutions différentes d'un noyau flavane commun. Elles diffèrent par :

- Le degré d'oligomérisation des groupements sucres en périphérie du noyau flavane : deux pour QR2, AN et NN, un pour AG, zéro pour l'épicatéchine.
- La nature des sucres : NN et AN sont des neohesperidosides, QR2 un rutinoside et AG un glucoside.
- La position des sucres : substitution du noyau flavane en 3 du cycle C (QR2) ou en 7 du cycle A (AG, AN, NN).

La signature spectrale de chacun de ces composés sera décrite ultérieurement. Ces molécules sélectionnées ne représentent que quatre des six familles de flavanoïdes :

- Flavones : représentés par AN, AG
- Flavanol : Epi
- Flavonols : QR2
- Flavanones : NN

Deux familles manqueront donc à notre étude : les anthocyanidines (déjà absentes de l'étude d'affinité en phase gazeuse) et les isoflavones. Deux isoflavones (daidzéine et daidzéine-7-O-glucoside) avaient été étudiées en phase gazeuse et avaient montré une faible affinité pour le peptide IB7₁₄. Leur absence dans notre étude ne semble donc pas préjudiciable pour une première approche, à moins d'observer un bouleversement radical de l'ordre relatif d'affinité obtenu en phase gazeuse.

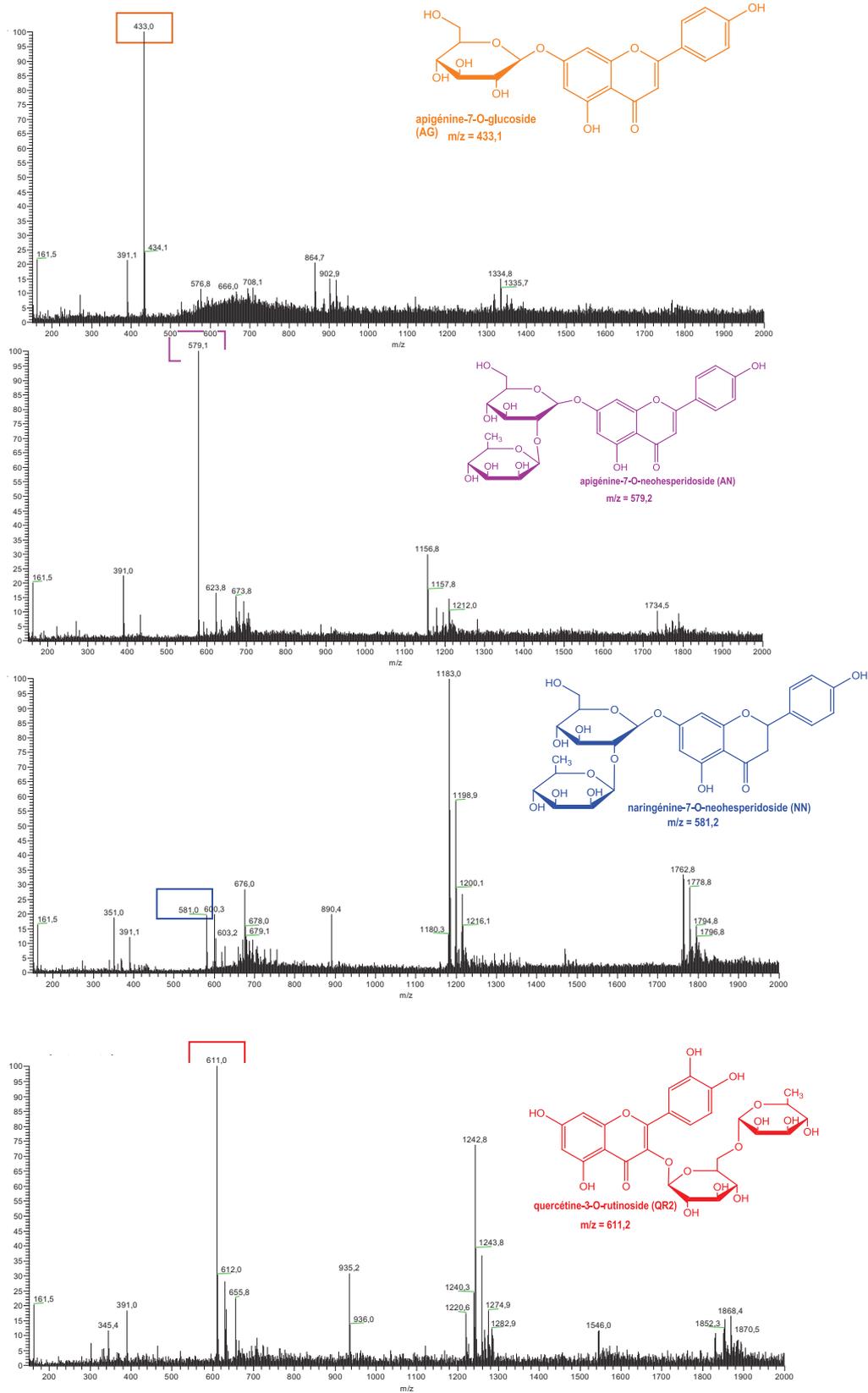


Figure IV.8 : Signature spectrale des composés retenus par spectrométrie de masse ESI-piège ionique (les pics encadrés correspondent au pic $[M + H]^+$).

Les caractéristiques de structure des cinq composés retenus peuvent soit défavoriser l'interaction avec la sonde peptidique (en raison de l'encombrement stérique que les groupements sucres engendrent), soit la favoriser (en fonction du nombre de sites donneurs de liaisons hydrogènes que constituent les hydroxyles des sucres). Les caractéristiques de structure sont reprises sous la forme du **Tableau IV.3**, pour évaluer le potentiel à interagir avec la sonde en fonction du nombre de degré de liberté et du nombre total de sites donneurs de protons.

Polyphénols Masse molaire (g.mol ⁻¹)	Nombre de degrés de liberté	Sites donneurs de protons
QR2 (610)	213	10
NN (580)	213	8
AN (578)	207	8
AG (432)	147	6
Epi (290)	99	5

Tableau IV.3 : Caractéristiques des 5 polyphénols modèles

La **Figure IV.9** permet de visualiser la position de ces polyphénols sur l'échelle d'affinité établie en phase gazeuse. Les cinq composés présentent des affinités différentes pour le peptide IB7₁₄ et sont répartis de façon homogène sur l'échelle d'affinité relative (en 3^{ème}, 6^{ème}, 8^{ème}, 11^{ème} et 14^{ème} position).

L'étude de l'interaction des composés retenus avec la sonde peptidique peut alors être menée en deux temps : sur les composés seuls dans un premier temps, puis avec des mélanges de ces mêmes composés.

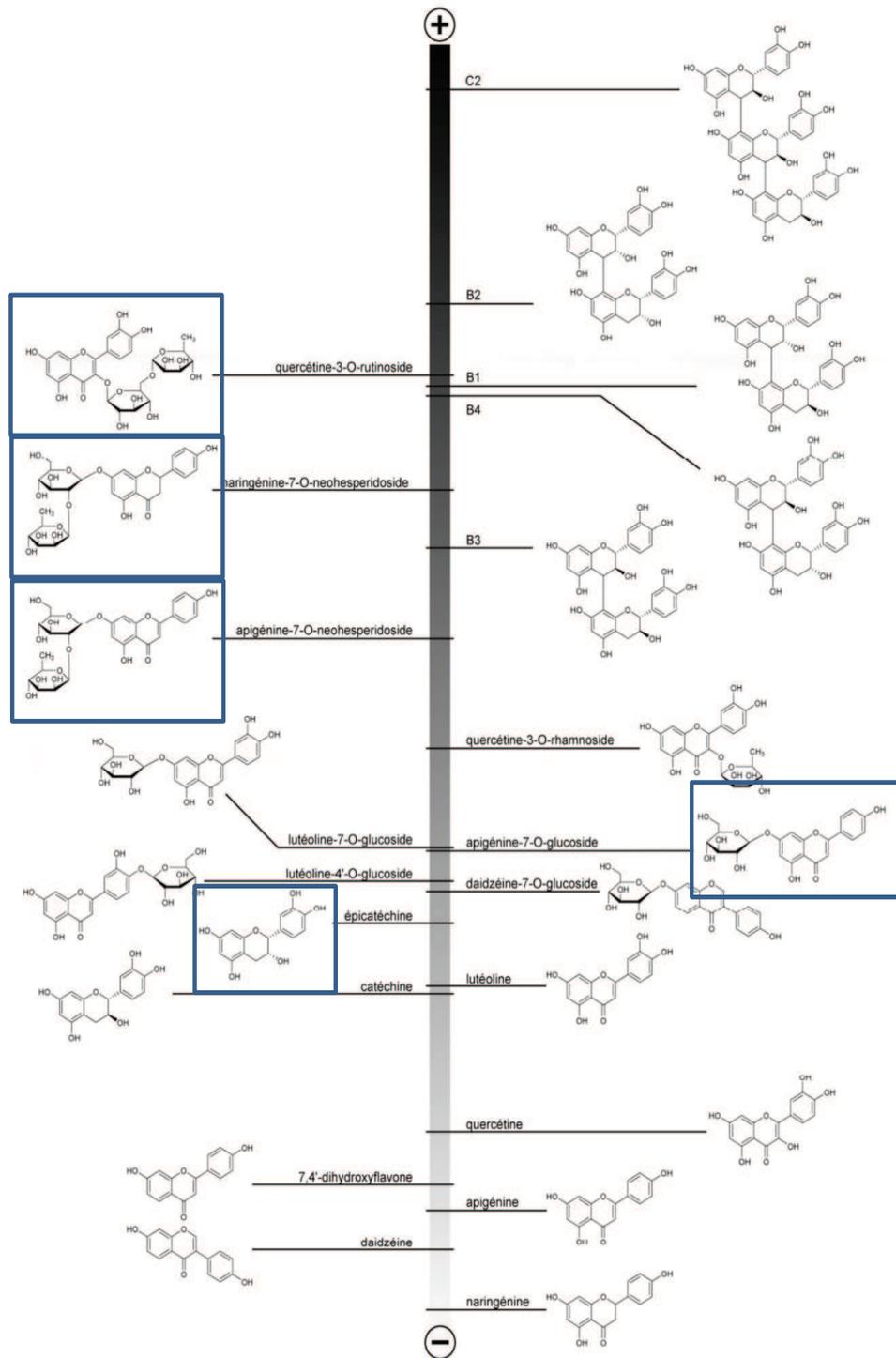


Figure IV.9 : Echelle d'affinité établie en phase gazeuse par ERMS [1]. Les polyphénols retenus pour l'étude sont encadrés en bleu

III. Etude de l'interaction sonde peptidique/polyphénols

III.1. Principe de l'étude de l'interaction

L'interaction sonde peptidique / polyphénols a dans un premier temps été étudiée avec les composés phénoliques pris séparément.

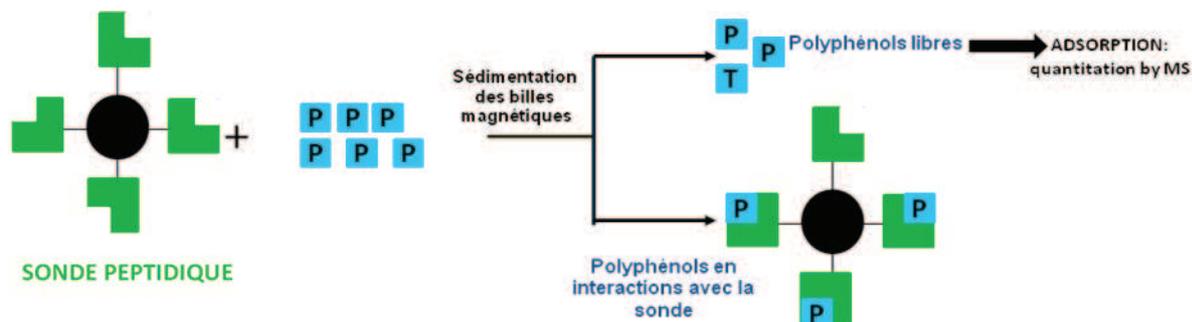


Figure IV.10 : Principe de l'étude de l'interaction sonde peptidique/polyphénol

Nous avons choisi d'utiliser un rapport molaire sonde peptidique/polyphénols de 3/1, garantissant ainsi un excès de peptide (favorisant l'interaction). Ce rapport molaire est gardé constant pour toutes les expériences d'interaction : une expérience standard d'interaction engage 18 nmoles de peptide IB714 greffé et 6 nmoles de polyphénols purs. Ceci revient à utiliser entre 0,47 et 1 mg de sonde peptidique selon que le taux de greffage du peptide varie de 18 à 38 nmoles par milligramme de billes. La quantité souhaitée de sonde peptidique (équivalente à 18 nmoles de peptide) est remise en suspension directement dans 173 μ L de chaque solution de polyphénols (soit 6 nmoles de polyphénol).

Avant utilisation, 3 mg de sonde peptidique sont lavés dix fois par 500 μ L d'un mélange eau/éthanol (50/50) afin d'éliminer les réactifs utilisés lors de l'étape de greffage et d'éviter ainsi tout relargage de composés susceptibles d'interférer lors de l'analyse par spectrométrie de masse. Des solutions fraîches des cinq polyphénols purs (AN, AG, NN, QR2, Epi) sont préparées avant chaque expérience à la concentration de $35 \cdot 10^{-6}$ mol/L dans un mélange eau/éthanol/Acide acétique (89/10/1%).

Après 60 minutes d'agitation mécanique à 37°C, les billes sont isolées par centrifugation et le surnageant contenant les polyphénols non retenus par la sonde peptidique (polyphénols libres) est récupéré (Figure IV.10).

Les polyphénols libres sont alors dosés par spectrométrie de masse. La quantité de polyphénols captés par la sonde sera obtenue par différence entre la quantité totale de polyphénols utilisés pour l'interaction (avant addition à la sonde peptidique) et la quantité de polyphénols libres, selon l'équation simple :

$$\text{Polyphénols retenus} = \text{Polyphénols totaux} - \text{Polyphénols libres}$$

III.2. Quantification par spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse n'est pas une méthode quantitative au sens strict. L'intensité du signal obtenu en spectrométrie de masse pour un même échantillon (par exemple une molécule pure en solution dans un solvant adéquat) peut varier d'une analyse à l'autre alors que les paramètres d'analyse restent inchangés. L'état de propreté de certains organes du spectromètre (notamment le cône métallique, le capillaire chauffé ou encore le capillaire en silice dans le cas du spectromètre LCQ) peuvent alors être incriminés pour expliquer ce phénomène. Par ailleurs ce phénomène est encore plus marqué quand la composition de l'échantillon devient plus complexe (augmentation du nombre d'espèces, phénomène d'ionisation sélective), quand le rapport des espèces analysées varie ou quand la composition du solvant est modifiée.

Il est néanmoins possible de s'affranchir de ces limitations en ayant recours à un étalon interne.

III.2.1. Choix de l'étalon interne

Idéalement l'étalon interne doit présenter des propriétés chimiques et physico-chimiques les plus proches possibles des molécules à quantifier afin que ses conditions idéales d'analyse en spectrométrie de masse soient proches de celles des molécules à quantifier. Notre choix s'est porté sur un flavonol, la quercétine (**Figure IV.11**), présent sur l'échelle d'affinité en phase gazeuse comme ayant une affinité moyenne envers le peptide. Ce composé présente l'avantage de donner une signature simple en spectrométrie de masse sous la forme d'une seule espèce ionique $[M + H]^+$. De plus ce composé n'interfère pas avec les autres composés phénoliques retenus pour l'étude dans la mesure où aucun hétéro-complexe non-covalent n'est détecté.

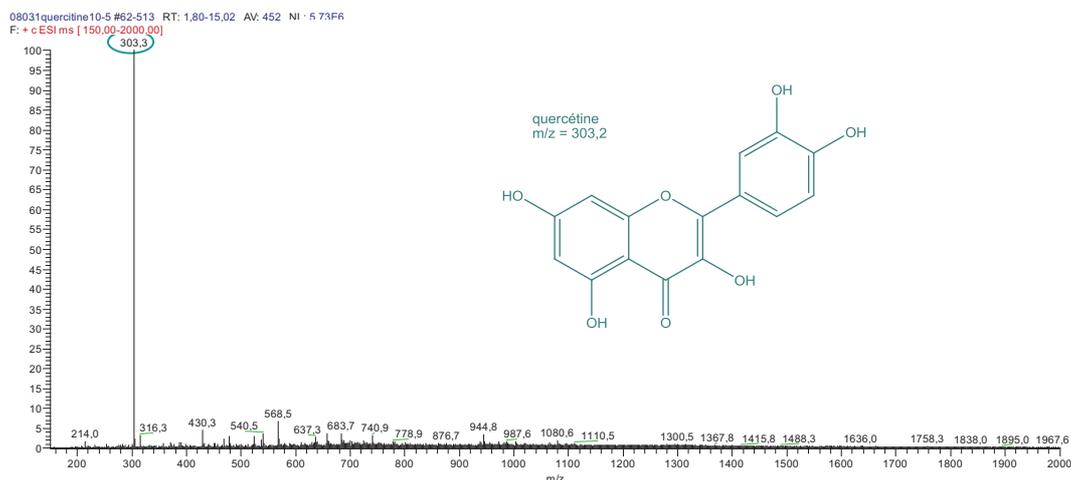


Figure IV.11 : Spectre de masse en mode positif de la quercétine $[M + H] = 303,3$ Th

Il s'agit donc de quantifier les polyphénols totaux (contenus dans les 173 μ L engagés dans l'expérience d'interaction) et les polyphénols non retenus après l'expérience d'interaction (contenus dans les 173 μ L du surnageant). L'analyse par spectrométrie de masse a été menée sur 20 μ L de chacun de ces deux échantillons. Avant analyse, une quantité connue et fixe de standard (20 μ L à $35 \cdot 10^{-6}$ M) est ajoutée à chaque échantillon. Les

concentrations en standard et en polyphénol dans le mélange sont alors identiques : 17,5 μM . L'analyse est menée au moyen d'un spectromètre de masse ESI-Piège ionique (Thermo) sur la totalité de chaque échantillon (40 μL) amené en infusion au moyen d'une seringue.

Le spectre de masse exploité pour la quantification correspond à la somme des spectres de masse individuels enregistrés au cours de l'analyse de la totalité de l'échantillon (40 μL). Ce spectre est alors normalisé par rapport à l'intensité du signal obtenu pour le standard (c'est-à-dire par rapport à l'intensité du pic correspondant à la quercétine, à m/z 303,3).

III.3. Signature spectrale des polyphénols étudiés

La signature spectrale des polyphénols est souvent complexe : en plus de la forme $[\text{M}+\text{H}]^+$, l'observation d'adduits de Na, K, d'oligomères (dimères, trimères), voire d'ions fragments, est fréquente. Ainsi pour que la quantification d'un polyphénol donné soit fiable il est indispensable de prendre en compte l'ensemble de ces espèces.

La signature spectrale (dans les conditions d'analyse utilisées) des polyphénols étudiés est présentée dans ce qui suit. Dans un premier temps, l'étude de l'interaction sonde peptidique/polyphénols n'a été réalisée que sur trois composés phénoliques (Epi, NN et QR2). Suivant les résultats obtenus, nous pourrions ou non valider l'ordre d'affinité établi en phase gazeuse, et décliner notre méthode aux deux autres polyphénols restants.

III.3.1. Signature spectrale de NN

L'analyse du polyphénol NN (dont le spectre est présenté **Figure IV-13**) illustre bien cette complexité.

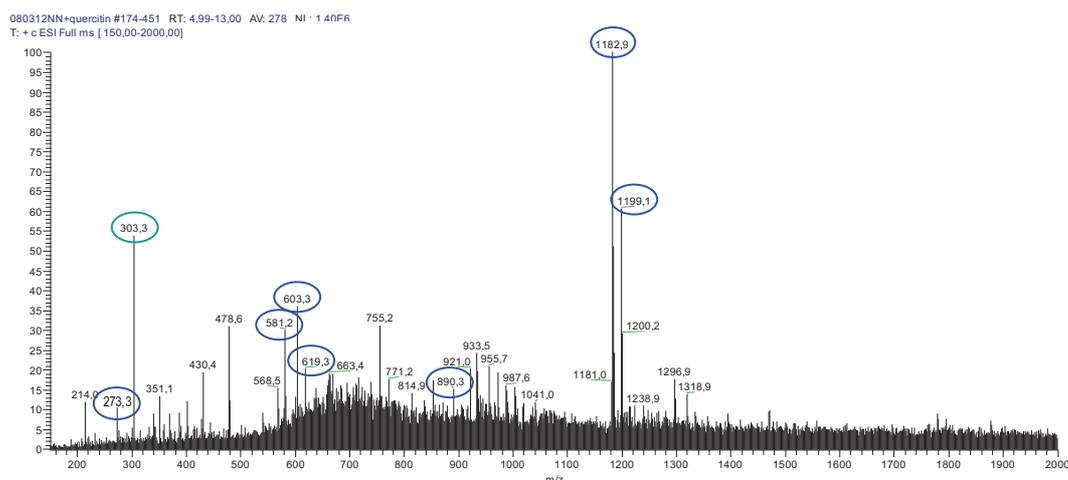
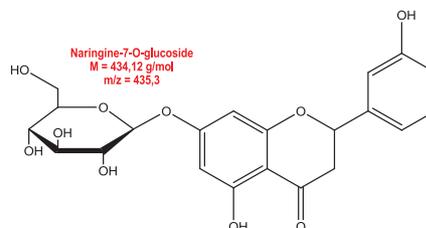


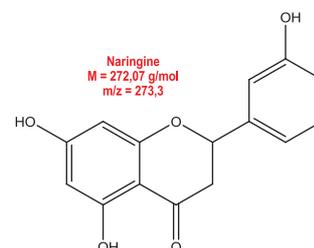
Figure IV.12: Analyse par spectrométrie de masse ESI-Piège ionique du mélange [quercétine + NN]. Les espèces corrélées à NN sont entourées en bleu, celle de la quercétine est en vert.

En plus du pic caractéristique correspondant au standard ($M+H = 303,3$), 10 espèces observées peuvent être reliées au polyphénol analysé:

- 1 : $[M+H] = 581,3$ ion moléculaire de NN
- 2 : $[M+Na] = 603,6$ adduit de sodium
- 3 : $[M + K] = 619,5$ adduit de potassium
- 4 : $[2 M + Na] = 1183,9$ dimère + adduit de sodium
- 5 : $[2M + K] + = 1199,3$ dimère + adduit de potassium
- 6 : $[3M + Na]^+ = 1763,3$ trimère + adduit de sodium
- 7 : $[naringénine-7-0-glucoside + H]^+$: 435,3



- 8 : $[naringénine-7-0-glucoside - (OH) + H]^+ = 419,3$ perte d'un OH
- 9 : $[naringénine + H]^+ = 273,3$
- 10 : fragment non identifié* = 891,3
- 11: fragment non identifié* = 1470,3



* fragment non identifié= observé dans le spectre des ions fragments mais non corrélé à un élément de structure

Une telle complexité impose l'identification de toutes les espèces corrélées au polyphénol analysé afin de ne pas fausser la quantification. Cependant le fait que notre stratégie de quantification soit basée sur une différence d'abondance (entre « polyphénols totaux » et « polyphénols non retenus après interaction ») limite les risques d'erreurs dans la mesure où cette différence sera réalisée sur des espèces observées dans les deux échantillons.

Cette complexité est l'une des raisons pour lesquelles, à terme, la stratégie devra absolument inclure une étape de fractionnement en amont du spectromètre de masse sous la forme d'un couplage chromatographie liquide-ESI-MS. La capacité d'adapter cette stratégie à des mélanges complexes passe par ce type de couplage, sans quoi l'identification dans le spectre de chaque polyphénol et des espèces qui lui sont corrélées s'avèrerait irréalisable.

III.3.2. Signature spectrale de QR2

Le même type d'analyse a été réalisé pour QR2 (**Figure IV.13**). Au total sept espèces sont observées pour ce polyphénol.

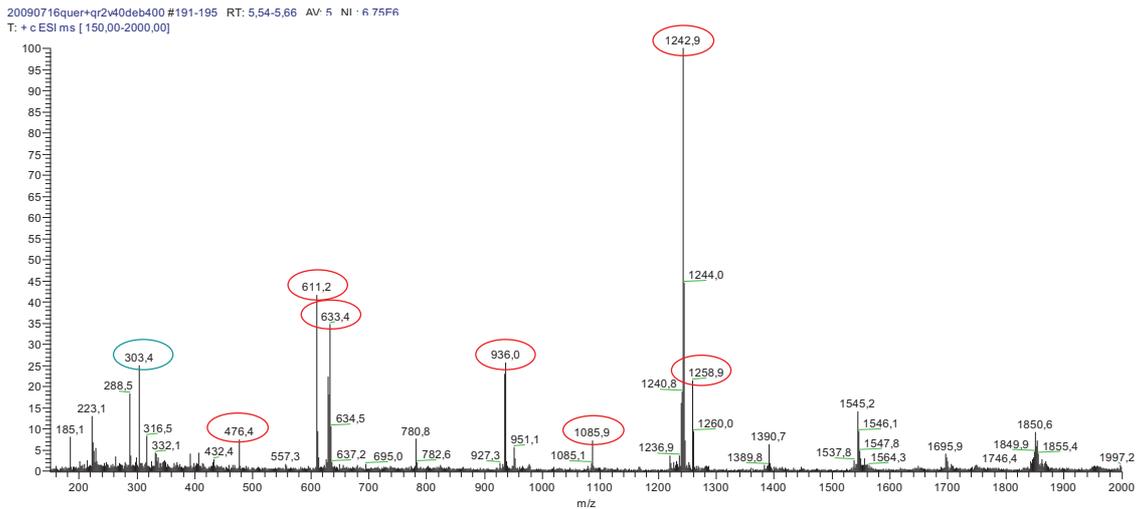


Figure IV.13: Analyse par spectrométrie de masse ESI-Piège Ionique du mélange [quercétine + QR2]. Les espèces corrélées à QR2 sont encadrées en rouge, celle de la quercétine est en vert.

- 1 : $[M+H] = 611,3$ ion moléculaire de QR2
- 2 : $[M+Na] = 633,6$ adduit de sodium
- 3 : $[2M + Na] = 1243,5$ dimère + adduit de sodium
- 4 : $[2M + K] = 1259,3$ dimère + adduit de potassium
- 5 : fragment non identifié* = 476,3
- 6 : fragment non identifié* = 935,3
- 7 : fragment non identifié* = 1086,3

* fragment non identifié= observé dans le spectre des ions fragments mais non corrélé à un élément de structure

III.3.3 Signature spectrale de l'Épicatéchine

Pour l'épicatéchine, seul le pic pseudo-moléculaire à m/z 291 est pris en compte (sur la Figure IV.14 apparaît la quercétine, étalon interne, à m/z 303,3).

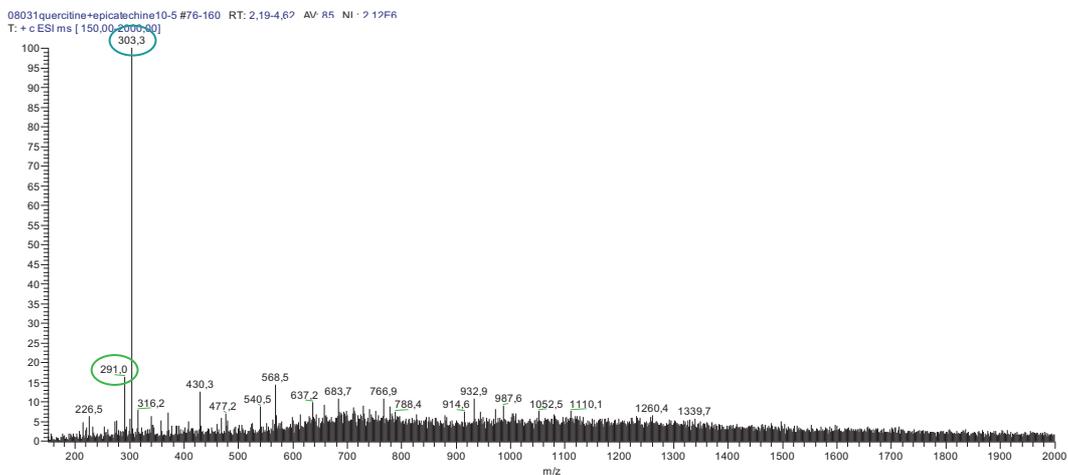


Figure IV.14: Analyse par spectrométrie de masse ESI-Piège Ionique du mélange [quercétine + Epi]. Le pic de l'épicatéchine est entouré en vert clair, celui de la quercétine en vert.

III.4. Etude de l'affinité des polyphénols choisis pour la sonde peptidique

III.4.1. Principe de la quantification des polyphénols et calcul d'affinité

Une fois la signature spectrale de chaque composé établie et les spectres normalisés par rapport au standard interne (la quercétine), il est possible de passer à l'étape de quantification des polyphénols retenus sur la sonde. Cela revient en fait à calculer la différence entre les intensités de pics selon :

[Somme des Intensités de pics polyphénols retenus] = [Somme des Intensités de pics polyphénols totaux] – [Somme des Intensités de pics polyphénols non retenus]

L'affinité du polyphénol pour la sonde peut alors être exprimée comme un rapport entre polyphénols retenus et polyphénols totaux :

$$\text{Affinité} = \frac{\sum I_{\text{retenus}}}{\sum I_{\text{totaux}}} * 100 \quad I = \text{Intensité de pic}$$

La détermination des intensités de pic pour des espèces comme les polyphénols dont certains présentent une signature spectrale complexe peut être réalisée selon deux méthodes qui conduisent sensiblement au même résultat :

- Première méthode : calculer l'intensité de pic totale pour le polyphénol étudié en établissant la somme des intensités de pic de chacune des espèces qui lui sont reliées. Appliquée aux polyphénols totaux et aux polyphénols non retenus, cette méthode permettra de déduire l'intensité de pic des polyphénols retenus par la sonde peptidique.
- Deuxième méthode : pour chaque espèce corrélée aux polyphénols étudiés, effectuer la différence entre **l'intensité de pic_{total}** – **l'intensité de pic_{non retenus}**. Ceci donne les intensités de pic retenus pour chaque espèce corrélée. La somme de ces intensités de pic correspond aux intensités de pics retenus du polyphénol.

La première méthode étant la plus simple à mettre en œuvre, c'est celle que nous avons retenue.

a. Etude de l'interaction sonde peptidique/NN

Les essais d'interaction et les analyses par spectrométrie de masse ont été réalisés dans les conditions établies précédemment. Le spectre normalisé ci-dessous correspond à la quantité de NN totale, avant mise au contact de la sonde peptidique (**Figure IV.15**).

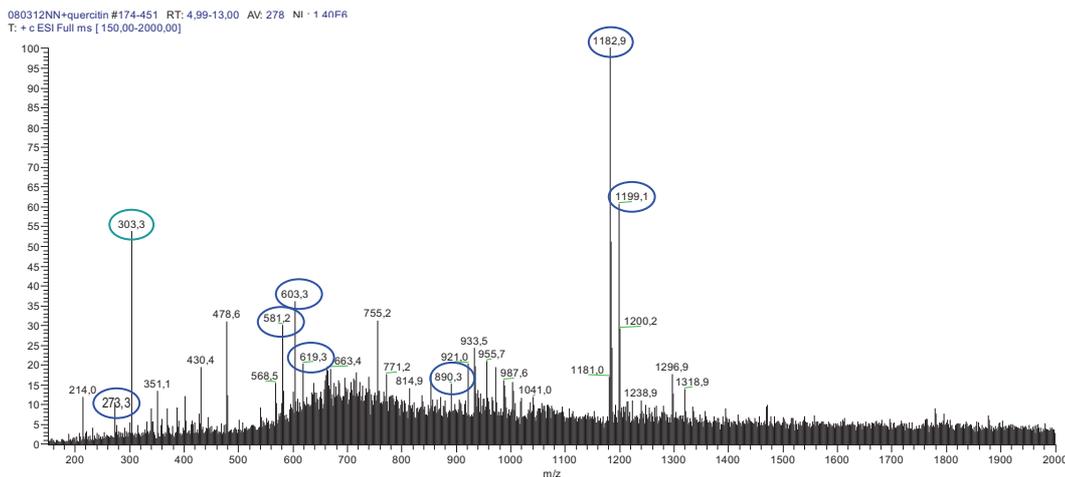


Figure IV.15 : Spectre normalisé correspondant à la quantité de NN totale(en bleu) avant mise au contact de la sonde peptidique.

Le spectre présenté ci-dessous correspond à la fraction de NN contenue dans le surnageant des billes (Figure IV.16).

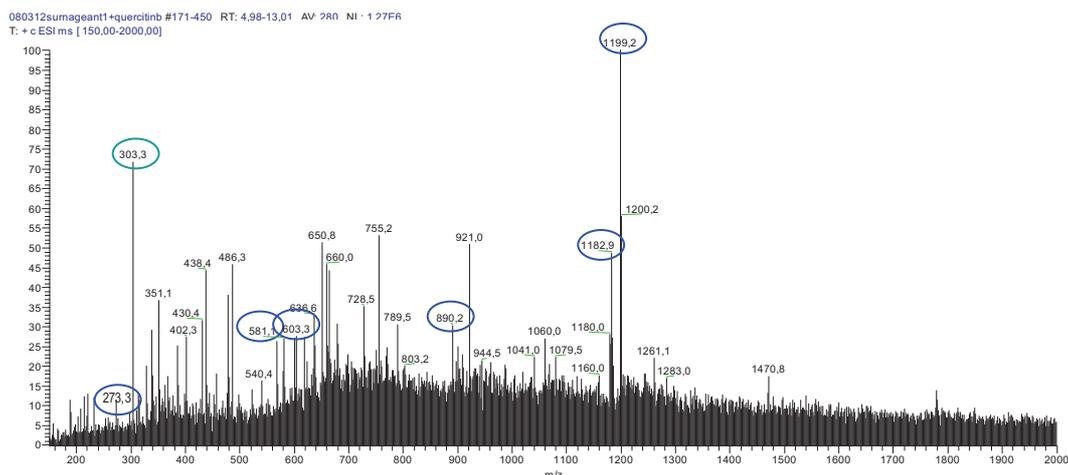


Figure IV.16 : Spectre correspondant à la fraction de NN (en bleu) contenue dans le surnageant en présence de la quercétine (en vert).

Les données expérimentales de chaque expérience (avant et après mise en contact avec les billes) seront détaillées dans la partie expérimentale (chapitre VII). Nous avons ainsi obtenu pour cette expérience une valeur d'affinité de 20 %, avec une incertitude de mesure estimée à environ 3 %. La sonde peptidique permet donc effectivement d'observer une interaction avec le polyphénol NN.

En tenant compte de la variabilité de réponse que peut introduire d'une part la possibilité de greffage en deux points de la molécule de peptide, et d'autre part la densité de fonctions réactives en surface des billes, nous avons reproduit cette expérience dans les mêmes conditions d'interaction (temps de contact, température, et rapport sonde peptidique/polyphénols identiques) avec un deuxième lot de billes magnétiques greffées avec le peptide. Cette deuxième expérience nous a donné une mesure d'affinité de NN envers la sonde peptidique

d'environ 36%, soit 1,8 fois plus que lors de l'expérience précédente. Une telle différence nous impose en conséquence de travailler strictement avec le même lot de billes pour comparer les affinités des polyphénols modèles envers la sonde peptidique.

b. Etude de l'interaction sonde peptidique/QR2

Les essais d'interaction et les analyses par spectrométrie de masse ont été réalisés dans les conditions établies précédemment pour le composé QR2. Les intensités des pics de chacune des espèces reliées à QR2 ont été extraites et utilisées pour calculer l'affinité.

En utilisant le premier lot de billes, nous avons obtenu une valeur d'affinité de 28 % (avec une incertitude d'environ 3%).

c. Etude de l'interaction sonde peptidique/Epicatéchine

Pour ce composé dont la signature spectrale est simple, puisqu'une seule espèce est observée, la quantification est simplifiée. La valeur d'affinité déterminée est de 4%, avec une incertitude de l'ordre de 1%.

d. Contrôle : utilisation d'une sonde peptidique dite « témoin négatif »

Dans le but de s'assurer que les interactions mises en évidence précédemment ne sont pas artefactuelles (dues à l'interaction anarchique entre les polyphénols et les billes), une sonde peptidique témoin a été construite. Nous avons choisi de greffer selon le protocole utilisé précédemment un peptide (l'Angiotensine I) dont la séquence est éloignée de celle du peptide IB7₁₄ ou de motifs conservés des protéines PRRb. Cette sonde témoin a été testée avec le polyphénol QR2, qui présente la meilleure affinité pour la sonde peptidique IB7₁₄. L'expérience a montré que QR2 n'est pas capté par la sonde de manière détectable (**Figure IV.17**).

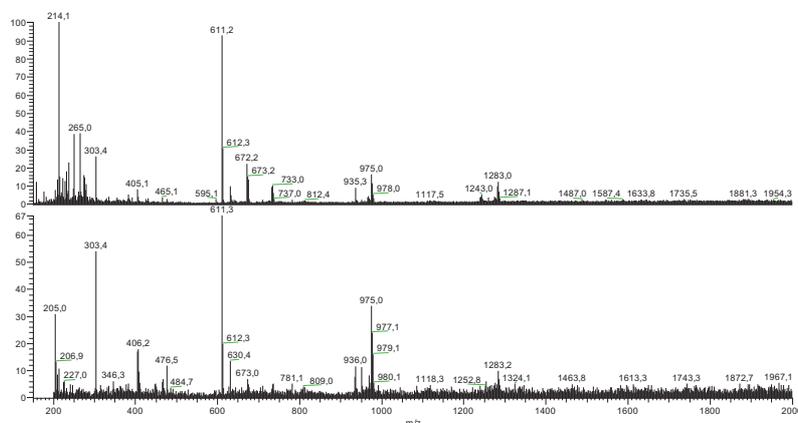


Figure IV.17 : Spectres correspondant au contrôle « témoin » d'une sonde peptidique avec de l'Angiotensine et mise en interaction avec QR2.

III.5. Influence de certains paramètres sur l'interaction

III.5.1 Influence de la température

L'interaction en bouche entre polyphénols du vin et protéines salivaires se produisant à une température proche de 37 °C, cette température avait été choisie pour nos tests *in vitro*. Dans le but d'étudier l'effet de ce paramètre sur l'interaction, nos expériences ont également été réalisées à température ambiante. Les résultats se sont révélés variables selon les polyphénols modèles : faible influence pour NN, mais forte variation pour QR2 qui ne semble se lier efficacement à la sonde qu'à 37°C. Pour cette raison nos expériences d'interactions ont été maintenues systématiquement à 37 °C.

III.5.2. Influence du temps d'interaction

En bouche l'interaction entre les polyphénols du vin et les protéines salivaires semble être très rapide dans la mesure où la sensation d'astringence est ressentie presque immédiatement. Dans nos conditions expérimentales nous avons montré que l'interaction entre la sonde peptidique et les polyphénols nécessitait un temps de contact d'au moins vingt minutes pour être quantifiable. Des tests réalisés en parallèle pour différents temps de contact (20, 30 et 60 minutes) ont montré que la quantité de polyphénol captée par la sonde peptidique augmente jusqu'à t= 60 minutes.

a. Discussion sur les conditions d'interaction

Dans nos conditions d'étude de l'interaction, la concentration de chacun des polyphénols est très inférieure à la concentration en polyphénols en bouche lors de la dégustation d'un vin. Cette dernière n'est pas très éloignée de 8 mM, ce qui correspond à la concentration moyenne en polyphénols de 2 à 4 g.L⁻¹ généralement admise pour le vin (en considérant une masse molaire moyenne de polyphénols de 500 g.mol⁻¹). La concentration de 35 µM utilisée lors de nos essais est donc environ 200 fois inférieure.

En ce qui concerne la salive, la concentration moyenne des protéines salivaires est de l'ordre de 3 g.L⁻¹, ce qui correspond approximativement à une valeur de 0,1 mM en considérant une masse molaire moyenne de 30 kDa. En ce qui concerne plus particulièrement les PRP basiques, leur proportion dans la salive est estimée aux environs de 9 % des protéines salivaires totales. Dans nos conditions d'interaction des polyphénols avec le peptide greffé sur les billes, la concentration en sonde peptidique a été établie à 105 µM (correspondant à la concentration du peptide greffé lui-même) afin d'établir un rapport polyphénol/peptide constant de 1/3. La concentration en « partenaire protéique » est donc proche de celle des protéines salivaires, mais plus élevée que celle des PRP.

Cette gamme de concentration permet de s'adapter aux quantités de peptides greffées sur les billes magnétiques et à la pratique de la spectrométrie de masse.

III.6. Conclusions

Nous avons étudié dans un premier temps le comportement de la sonde peptidique envers un seul polyphénol. La méthode de quantification mise en place permet de déterminer une « affinité » en phase liquide. Les résultats obtenus montrent le caractère opérationnel d'une sonde moléculaire reposant sur le greffage d'un peptide mime de PRP. Néanmoins, les expériences menées sur trois polyphénols (NN, QR2 et Epi), nous ont indiqué qu'il était impératif d'opérer avec un lot de billes unique pour établir une comparaison d'affinité, ce qui représente une limitation certaine du concept.

De manière globale, nous pouvons constater que l'ordre d'affinité établi en phase gazeuse par la méthode ERMS^[1] est respecté (Epi << NN < QR2), bien que les écarts constatés en phase liquide soient sensiblement différents de ce qui avait été mis en évidence en phase gazeuse (**Figure IV.9**). Ceci amène à penser que la contribution des effets hydrophobes à l'interaction entre polyphénols et PRP n'est pas négligeable.

III.7. Interaction de la sonde peptidique avec des mélanges de polyphénols

L'étude d'interaction précédente réalisée avec des polyphénols pris séparément a permis de valider la fonctionnalité de l'outil moléculaire que nous avons créé : la sonde peptidique obtenue par greffage du peptide IB7₁₄ sur des billes magnétiques a montré une capacité à interagir de manière différenciée avec les polyphénols étudiés. De même, le protocole de quantification que nous avons mis en place, basé sur une analyse par spectrométrie de masse, a été validé pour les polyphénols purs. Cependant, le fait que ce protocole ne comporte aucune étape de séparation le rend *a priori* difficilement adaptable à l'analyse de mélanges de polyphénols, nous l'avons néanmoins testé avec des mélanges simples de polyphénols allant de deux à quatre.

Adaptation du test d'interaction *in vitro* à des mélanges de polyphénols

Comme précédemment, des solutions fraîches des cinq polyphénols purs (AN, AG, NN, QR2, Epi) sont préparées avant chaque expérience à la concentration de $35 \cdot 10^{-6}$ mol/L dans un mélange eau/éthanol/acide acétique (89/10/1).

L'expérience standard d'interaction engage toujours 18 nmoles de peptide IB7₁₄ greffé et 6 nmoles de polyphénols totaux soit un rapport molaire constant Peptide/Polyphénols de 3/1. Dans le cas de mélanges, la quantité de polyphénol engagée (polyphénol totaux, 6 nmoles) correspond à la somme de chacun des polyphénols en quantité équivalente dans le mélange (soit par exemple 2 nmoles de chaque polyphénol dans le cas d'un mélange ternaire). Les essais d'interactions sont alors réalisés dans des conditions en tous points

identiques à celles utilisées précédemment pour des polyphénols purs. La méthode de quantification est elle aussi inchangée, l'introduction des échantillons dans la source se faisant par simple infusion.

Dans ce qui suit les valeurs d'affinités obtenues dans le cas de mélange de deux, trois ou quatre polyphénols seront données directement. Les spectres ne sont pas présentés par souci de concision.

III.7.1. Mélange de 2 polyphénols

Les affinités relatives déterminées pour le mélange binaire [QR2 + NN] sont de 38% pour QR2 et 32% pour NN.

III.7.2. Mélange ternaire [AN+ NN+QR2]

Les expériences ont été réalisées avec deux lots de billes différents :

	Lot1	Lot 2
AN :	3%	0%
NN :	0%	9%
QR2 :	18 %	20%

III.7.3. Mélange ternaire [AG+ NN+QR2] :

AG :	0%
NN :	2%
QR2 :	17%

III.7.4. Mélange quaternaire [AG+ AN+ NN+ QR2]

AG :	2%
AN :	1,2%
NN :	1,5%
QR2 :	9,5%

Pour les différents mélanges testés, QR2 a toujours la plus forte affinité pour la sonde peptidique. AN et NN ne diffèrent que par une double liaison et donnent une valeur d'affinité similaire dans les différents mélanges, bien que le test réalisé avec deux lots de billes différentes apporte une contradiction. Ce comportement est analogue à celui qui a été mis en évidence par ERMS en phase gazeuse, QR2 étant le composé le plus affiné pour tous les mélanges. Ce résultat peut être relié au fait que ce composé est celui qui possède la masse la plus élevée parmi les molécules testées, mais aussi et surtout le plus grand nombre de degrés de liberté et de sites donneurs de protons.

Cependant, nos études de mélanges de polyphénols par spectrométrie de masse ont été réalisées dans un mode d'analyse (infusion directe) qui peut être biaisé par un phénomène d'ionisation sélective des composés analysés. Pour confirmer les affinités obtenues, une étude complémentaire utilisant la chromatographie liquide couplée au spectromètre a donc été envisagée. Cette modification du protocole d'analyse va nous permettre de tester également la possibilité de classer l'affinité des polyphénols dans une phase de « décrochage » du support, et de préparer l'étude de mélanges complexes de polyphénols naturels.

IV. Désorption des complexes non-covalents formés en phase liquide

Dans ce qui précède, l'interaction polyphénols-sonde peptidique a été abordée selon un angle d'affinité. L'« accrochage » différentiel de polyphénols choisis sur la sonde a en effet permis de connaître leur affinité en phase liquide. La corrélation entre l'identité chimique du polyphénol et son affinité pour la sonde a également permis de dégager des tendances/hypothèses quant à la nature des interactions. Ayant abordé l'aspect « on » de l'interaction, il était bien sûr intéressant d'aborder l'aspect « off » *via* la dissociation du complexe formé. Nous nous attendions cependant à quelques difficultés, les données bibliographiques indiquant que les complexes entre PRP et polyphénols sont réputés quasi indissociables, puisque résistant notamment au passage à travers l'ensemble du tractus digestif et intestinal [2-4]. Plusieurs axes ont été explorés : des variations de force ionique, des changements de pH et l'utilisation d'agents chaotropiques et de solvants organiques.

La quantification des polyphénols décrochés est réalisée au moyen d'un couplage chromatographie liquide – spectrométrie de masse. L'introduction d'une étape de séparation par chromatographie liquide permet de se débarrasser de composés pouvant interférer avec l'analyse par spectrométrie de masse (sels, urée, guanidine) et d'adapter cette stratégie à des mélanges de polyphénols plus complexes. Dans la mesure où la quantification porte sur un seul échantillon (polyphénols décrochés) il n'est plus possible de raisonner comme nous l'avons fait précédemment par différence entre deux échantillons (total et non retenu), et nous avons en conséquence utilisé des courbes d'étalonnages.

IV.1. Couplage chromatographie liquide-Spectrométrie de masse

Le spectromètre de masse (Piège ionique LCQ Advantage, Thermo) est couplé à une colonne de chromatographie liquide à polarité de phase inversée (colonne C18, 15 cm x 2,1 mm, débit de 0,2 mL/min). Un gradient linéaire de solvant B (99,9 % Méthanol 0,1 % acide formique) est utilisé, le solvant A étant constitué de 99,9 % Eau et 0,1 % d'acide formique.

Le gradient utilisé est inspiré de travaux publiés sur la purification des polyphénols [5-7] et a été optimisé afin d'assurer une séparation efficace de tous les polyphénols de notre étude (**Tableau IV.4**).

Temps en minutes	Solvant A (%)	Solvant B (%)
0	100	0
25	50	50
28	20	80
30	20	80
35	20	80
40	50	50
50	100	0
60	100	0

Tableau IV.4 : Gradient linéaire utilisé pour la séparation des polyphénols

L'élution est suivie par le détecteur UV-visible (longueur d'onde fixée à 280 nm et 320 nm) et par spectrométrie de masse. Le **Tableau IV.5** précise les temps de rétention observés (injection de 10 µL d'une solution à 180 µM) de chacun des polyphénols dans les conditions de chromatographie décrites précédemment.

Composés	Masse (g/mol)	Temps de rétention (min)
Quercétine	302	Tr = 19,85 +/- 0,06
NN	580	Tr = 17,67 +/- 0,05
QR2	610	Tr = 17,76 +/- 0,04
AG	432	Tr = 18,42 +/- 0,05
AN	578	Tr = 18,61 +/- 0,05

Tableau IV.5 : Masse moléculaire et temps de rétention de chaque polyphénol (3 mesures distinctes)

IV.1.1. Principe de quantification relative par couplage LC/MS

Cette méthode de quantification est basée sur la comparaison de l'intensité du signal correspondant au produit à quantifier avec celui d'un étalon interne. Nous avons conservé le même standard interne que pour l'établissement de l'échelle d'affinité relative en phase liquide : la quercétine. L'étalon interne, ajouté à l'échantillon de polyphénols à doser (décrétés de la sonde peptidique) subit donc la même étape de séparation chromatographique et les mêmes conditions d'analyse par spectrométrie de masse. L'étalon interne est donc exposé aux mêmes risques de perte de matériel que chacun des polyphénols présents dans le mélange à quantifier.

Cette méthode repose sur la réalisation préalable de courbes d'étalonnage établies par l'analyse (dans les conditions de couplage LC-MS décrites précédemment) de concentrations/quantités croissantes de chaque polyphénol pur auquel a été ajouté une même quantité connue d'étalon interne (**Figure IV.18**).

Remarque : le mode d'ionisation par électrobulbation (ESI) produisant fréquemment de multiples entités chargées pour un même composé (adduits, ions à charges multiples, fragments corrélés au composé), toutes les espèces associées à chaque composé sont répertoriées et prises en compte pour la quantification.

a. Etablissement des courbes d'étalonnage

Pour chaque polyphénol étudié, la courbe d'étalonnage est établie pour les mêmes sept rapports (quantité de polyphénol/quantité de standard interne) : 0,25, 0,5, 0,75, 1, 1,25, 1,5, et 1,75. Ces rapports correspondent à des quantités de polyphénols allant de 225 pmoles à 1575 pmoles (5 μ L) ajoutés à une quantité constante de quercétine (900 pmoles dans 5 μ L) pour un volume final de 10 μ L. Chaque analyse a été répétée trois fois.

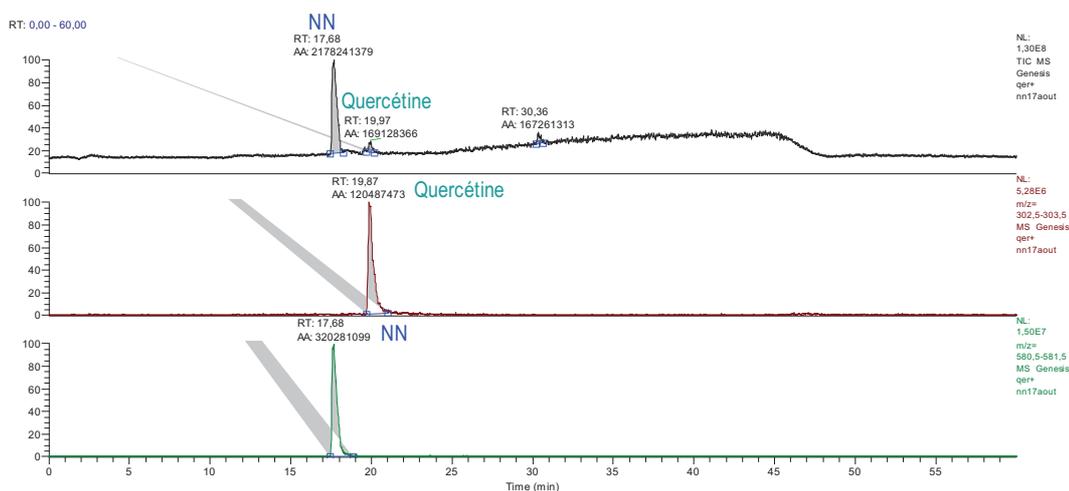


Figure IV.19 : De haut en bas : courant ionique total et chromatogrammes de masse du standard et de NN

Trois expériences identiques sont conduites pour chaque point du graphe d'étalonnage. Les droites d'étalonnage sont obtenues avec des coefficients de corrélation supérieurs à 0,9.

b. Courbe d'étalonnage pour des mélanges de composés

La mise en place des courbes d'étalonnage pour des mélanges nous permet de savoir si les polyphénols en mélange se comportent différemment des composés isolés. En toute logique les droites d'étalonnage déterminées pour des mélanges devraient nous donner pour chaque composé le même coefficient directeur que celui déterminé pour un composé isolé. La quantité d'étalon interne restant fixe, la quantité des polyphénols a été ajustée afin que le rapport (polyphénol 1 + polyphénol 2)/Standard interne varie de 0,25 à 1,75. Dans le mélange les polyphénols (1 et 2) se trouvent en quantités équivalentes. Nous n'avons pas observé de différences significatives pour les droites d'étalonnage (coefficients de corrélation supérieurs à 0,9).

IV.2. Etude de la désorption des polyphénols en interactions avec la sonde peptidique

Au terme d'une expérience de mise en contact entre la sonde peptidique et un mélange de polyphénols, les billes magnétiques sont sédimentées à l'aide d'un barreau aimanté. Ces billes sont réutilisées pour essayer

de déterminer les conditions de désorption des composés phénoliques. Comme pour les études d'ajout de polyphénols, les essais de désorption ont été réalisés à 37°C sous agitation mécanique.

IV.2.1. Etude de désorption avec les solvants

Les complexes formés entre la sonde peptidique et les polyphénols (billes magnétiques) sont repris dans différents solvants comme le méthanol et l'acétonitrile pour tenter de rompre l'interaction. Par exemple la sonde peptidique en interaction avec NN est reprise dans un volume de 200 µL de méthanol, puis laissée sous agitation à 37 °C pendant une heure. Le surnageant est ensuite prélevé et analysé en présence du standard interne (quantité fixée) dans les mêmes proportions que pour l'établissement de la courbe d'étalonnage de NN.

Les rapports des aires correspondantes à NN et au standard sont ensuite reportés sur la courbe d'étalonnage de [quercétine + NN] (**Figure IV.20**). Suivant l'équation de la droite, la quantité de NN récupérée dans le surnageant est ainsi obtenue.

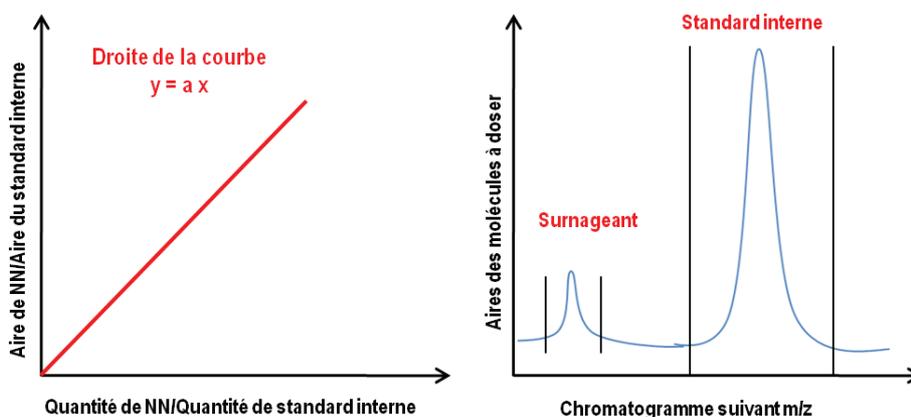


Figure IV.20 : Principe de la détermination des polyphénols « décrochés » de la sonde peptidique

Ni le méthanol, ni l'acétonitrile n'ont permis d'observer la désorption des polyphénols, ce qui confirme la forte interaction entre la sonde peptidique et les composés phénoliques.

a. Effet de l'acétate d'ammonium

Le protocole utilisé est le même que celui mis en place pour l'étude avec des solvants. Les essais ont été réalisés en utilisant de l'acétate d'ammonium (sel volatil) à différentes concentrations (**Tableau IV.6**).

Acétate d'ammonium	100 mM	200 mM	300 mM
pH	6	6	7-8

Tableau IV.6 : Différentes concentrations de l'acétate d'ammonium

Cette étude a été réalisée dans le cas de sonde peptidique en interaction avec un seul tanin ou plusieurs. Les tests sont réalisés avec la Naringénine-7-O-neohesperidoside (NN) et la quercétine-3-O-rutinoside (QR2) seuls et avec les mélanges ((NN+ QR2) et (NN+QR2+AG)).

Les sondes peptidiques en interaction avec les polyphénols sont amenées à sec, puis reprises dans une solution d'acétate d'ammonium. Après trente minutes d'agitation, les billes sont sédimentées pour récupérer le surnageant, puis analysé en chromatographie liquide couplée au spectromètre de masse en présence du standard interne.

IV.2.2 Etude de la désorption d'un polyphénol isolé

Les sondes peptidiques mises en interaction avec un seul polyphénol sont testées dans des solutions d'acétate d'ammonium de concentrations et de forces ioniques différentes (**Tableau IV.7**).

Acétate d'ammonium	100 mM	200 mM	300 mM
Force ionique calculée	0,1 mol/l	0,2 mol/L	0,3 mol/L
pH	6	6	7-8
Rendement pour NN seul	14 %	43 %	8 %
Rendement pour QR2 seul	2 %	3 %	4 %

Tableau IV.7 : Rendement des polyphénols décrochés en utilisant l'acétate d'ammonium à différentes concentrations et pH

NN et QR2 sont les deux polyphénols qui ont la plus grande affinité en phase liquide pour la sonde peptidique. Comme le montre le tableau, il s'avère difficile de rompre les interactions entre la sonde peptidique et ces polyphénols par la seule augmentation de la force ionique. Néanmoins, on remarque que pour une solution d'acétate d'ammonium à 200 mM on obtient un résultat intéressant. En effet, 43 % de NN en interaction avec la sonde peptidique sont récupérés, ainsi que 3 % du composé QR2. L'écart observé confirme que le complexe formé entre la sonde peptidique et QR2 est plus stable que le complexe formé avec NN.

IV.2.3. Etude de la désorption pour un mélange de polyphénols

Au vu du résultat précédent, les complexes sonde peptidique/polyphénol ont été traités avec de l'acétate d'ammonium à 200 mM, pour trente et soixante minutes de temps de contact (**Tableau IV.8**).

Composés phénoliques	Mélange NN + QR2	Mélange NN + QR2
Acétate d'ammonium	200 mM	200 mM
Température	37°C	37°C
Temps de contact	30 minutes	60 minutes
Proportion de NN récupérée (par rapport au départ)	0,2 %	0,8 %
Proportion de QR2 récupérée (par rapport au départ)	2,3 %	3,6 %

Tableau IV.8 : Etude pour deux temps de contact pour le mélange NN et QR2

Cette étude montre que le temps de contact est un paramètre à prendre en compte, puisque la quantité de polyphénol libérée est plus importante pour soixante minutes que pour trente minutes. Néanmoins cette étude réalisée sur le mélange NN + QR2 montre dans les deux cas que QR2 est récupéré majoritairement par rapport à NN. Ce résultat (en apparence contradiction avec l'étude « on ») peut s'expliquer par le fait que la quantité de QR2 en interaction avec le peptide sonde est plus importante que celle de NN. Cependant les quantités de polyphénols récupérées sont très modestes, dans tous les cas inférieures à 10%.

De même, une étude a été réalisée sur un mélange de trois polyphénols (AG, NN, QR2), en traitant les billes par de l'acétate d'ammonium 200 mM pendant soixante minutes à 45°C. Les résultats obtenus (**Tableau IV.9**) pour cette expérience sont les suivants, montrant que NN est le composé majoritairement récupéré, suivi de QR2 et AG :

Composés phénoliques	AG	NN	QR2
Proportions récupérées	9 %	20 %	12 %

Tableau IV.9 : Proportions des polyphénols dits « décrochés » de la sonde peptidique

L'augmentation de la force ionique n'a pas permis d'améliorer le décrochage des polyphénols. En effet, les complexes sonde peptidique/mélange (AG + NN + QR2) traités par de l'acétate d'ammonium (500 mM, force ionique 0,5 mol/L) et du chlorure de calcium (500 mM, force ionique 1,25 mol/L) sous agitation mécanique pendant soixante minutes à 37°C s'avèrent toujours fortement résistants à la dissociation (**Tableau IV.10**).

Sel utilisé	Acétate d'ammonium	Chlorure de calcium
Proportion de AG récupérée	1 %	1 %
Proportion de NN récupérée	8 %	7 %
Proportion de QR2 récupérée	3 %	4%

Tableau IV.10 : Etude comparative pour un même mélange de deux solutions de force ionique différente

Une étude similaire a été réalisée en utilisant de l'urée à une concentration de 2 M pour le mélange (AG + NN + QR2). Les résultats obtenus sont similaires à ceux obtenus avec l'acétate d'ammonium, confirmant la stabilité des complexes PRP/polyphénols. Il nous faut donc nous contenter de la version « on » de l'interaction.

V. Conclusion et perspectives

La sonde peptidique élaborée par greffage d'un fragment de PRP sur des billes magnétiques permet de caractériser l'interaction en solution avec des polyphénols modèles. Néanmoins, dans nos conditions d'étude, nous avons dû étendre le temps de réaction à soixante minutes, alors que la sensation d'astringence est perçue avec une échelle de temps beaucoup plus brève (secondes). Cette différence est vraisemblablement liée aux

concentrations relatives des espèces en présence : en bouche, lors de la dégustation d'un vin, les polyphénols sont présents à une concentration largement saturante par rapport à celle des PRP. D'autre part, la grande stabilité des complexes obtenus ne permet pas de caractériser de manière propice la désorption sélective des polyphénols.

Les premiers résultats obtenus avec un petit nombre de polyphénols sont globalement en accord avec l'échelle d'affinité qui a été élaborée à partir des expériences d'ERMS. Le rôle prépondérant tenu par les liaisons hydrogènes dans la formation des complexes entre polyphénols et PRP est donc confirmé. Cependant, les comportements observés en phase liquide laissent supposer que les effets hydrophobes peuvent intervenir pour une part non négligeable. Il faudra donc compléter l'étude avec un plus grand nombre de composés polyphénoliques.

D'autre part, cette sonde peptidique possède un potentiel analytique intéressant pour l'étude de mélanges complexes de polyphénols naturels, à condition de l'utiliser en association avec un couplage LC/MS. L'étude avec des polyphénols extraits du vin, plus représentatifs que les polyphénols modèles utilisés jusqu'ici, est un passage obligé pour faire progresser notre connaissance de l'astringence.

VI. Bibliographie

1. Plet, B., *La spectrométrie de masse dans l'étude de l'interaction entre protéines de la salive humaine et polyphénols. Vers une approche analytique de l'astringence du vin*. 2007, Université de Bordeaux I.
2. Bennick, A., *Salivary proline-rich proteins*. *Mol. Cell. Biochem.*, 1982. **45**(2): p. 83-99.
3. Lu, Y., & al., *Interaction of tannin with human salivary proline-rich proteins*. *Arch. Oral Biol.*, 1998. **43**(9): p. 717-728.
4. Naurato, N., & al., *Interaction of Tannin with Human Salivary Histatins*. *J. Agric. Food Chem.*, 1999. **47**(6): p. 2229-2234.
5. Abad-García, B., & al., *Optimization and validation of a methodology based on solvent extraction and liquid chromatography for the simultaneous determination of several polyphenolic families in fruit juices*. *J. Chromatogr. A*, 2007. **1154**(1-2): p. 87-96.
6. Alonso Borbalán, Á.M., & al., *Study of the polyphenol content of red and white grape varieties by liquid chromatography-mass spectrometry and its relationship to antioxidant power*. *J. Chromatogr. A*, 2003. **1012**(1): p. 31-38.
7. Sun, B., & al., *Fractionation of red wine polyphenols by solid-phase extraction and liquid chromatography*. *J. Chromatogr. A*, 2006. **1128**(1-2): p. 27-38.

CHAPITRE V :

ETUDE DE L'ASTRINGENCE EN PHASE LIQUIDE AU MOYEN D'UNE SONDE POLYPHENOLIQUE

Dans le chapitre précédent nous avons présenté la conception et l'utilisation d'une sonde peptidique pour l'étude des bases moléculaires de la sensation d'astringence. Cette sonde a la capacité d'interagir de manière différentielle avec des polyphénols modèles, offrant ainsi la possibilité de classer ces derniers sur une échelle d'affinité relative. Il s'agit donc d'un outil précieux dans une perspective de criblage en phase liquide de polyphénols naturels, pouvant être exploité pour l'identification directe dans le vin des polyphénols présentant la meilleure affinité pour un peptide salivaire modèle.

Afin de tirer un profit plus important des stratégies basées sur l'utilisation de sondes, nous avons décidé de décliner le concept en créant un outil complémentaire : une sonde polyphénolique obtenue par l'immobilisation sur des billes magnétiques d'un polyphénol modèle. Cette sonde pourrait permettre de rechercher les protéines salivaires présentant l'affinité la plus forte pour le polyphénol étudié. Le concept pourrait être enrichi en concevant une sonde obtenue par greffage de différents types de polyphénols à la surface des billes magnétiques.

I. Elaboration de la sonde polyphénolique

Cette sonde est réalisée à partir de billes magnétiques fonctionnalisées en surface par des groupements amines. Ces billes ont par ailleurs les mêmes propriétés que celles utilisées pour la sonde peptidique. L'originalité de notre stratégie repose sur la création d'un espaceur permettant d'éloigner de la surface des billes les groupements hydroxyles du polyphénol qui semblent essentiels pour l'interaction avec les protéines. Pour ce faire le polyphénol sera dans un premier temps modifié chimiquement pour construire l'espaceur. Cet espaceur repose sur l'ouverture du sucre du polyphénol, permettant ainsi de conserver le noyau flavanol intact et de l'éloigner des billes.

La stratégie suivie pour obtenir l'immobilisation du polyphénol repose sur la présence des sucres (simple ou comportant une ramification), qui vont permettre, par une réaction d'oxydation, de former une poignée réactionnelle. Cette poignée di-aldéhyde permettra de fixer le polyphénol de manière covalente aux billes magnétiques fonctionnalisées par réaction groupements amino. Le fait que notre stratégie soit basée sur une réaction d'oxydation périodique limite aux polyphénols qui possèdent au moins un sucre, en orientant la recherche d'affinité sur la seule partie phénolique de la sonde moléculaire.

C'est la raison pour laquelle, parmi les cinq composés phénoliques étudiés précédemment, l'épicatéchine (qui ne porte pas de sucre) ne peut pas être prise en considération pour cette stratégie. Les quatre autres polyphénols, AN, QR2, AG, et NN, offrent cette possibilité de greffage. Afin d'offrir un éloignement maximal du noyau flavane par rapport aux billes, les composés possédant une ramification sur le sucre ont été préférés: QR2, NN et AN.

Au moment où nous avons débuté cette stratégie nous ne disposions pas encore des résultats de l'étude d'affinité menée avec la sonde peptidique en phase liquide. Nous ne connaissons donc pas le positionnement de ces trois composés AN, NN et QR2 sur notre échelle d'affinité relative. La seule information d'affinité disponible provenait de l'échelle d'affinité établie en phase gazeuse entre ces composés et le peptide IB7₁₄ (déterminée par l'étude ERMS réalisée antérieurement à notre travail) [1].

Afin de choisir les conditions les plus favorables pour prouver la faisabilité de notre approche, nous avons retenu celui des trois polyphénols qui tout en possédant une bonne affinité en phase gazeuse pour le peptide IB7₁₄ présentait un encombrement stérique moindre: la naringénine-7-O-neohesperidoside (NN) (**Figure V.1**).

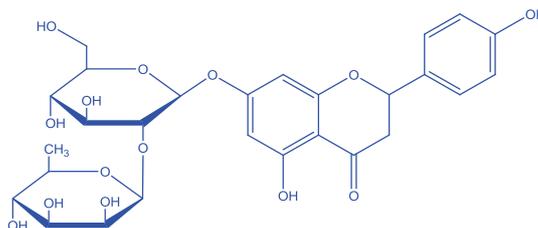


Figure V. 1 : Structure de la naringénine-7-O-neohesperidoside (NN)

1.1. Synthèse du polyphénol modifié

Dans un premier temps, le polyphénol NN est soumis à une oxydation par le periodate de sodium [2, 3] pour ouvrir le glycone et obtenir un di-aldéhyde. L'oxydation periodique est réalisée en présence de 2 équivalents de NaIO₄ pour 1 équivalent de NN (**Figure V.2**).

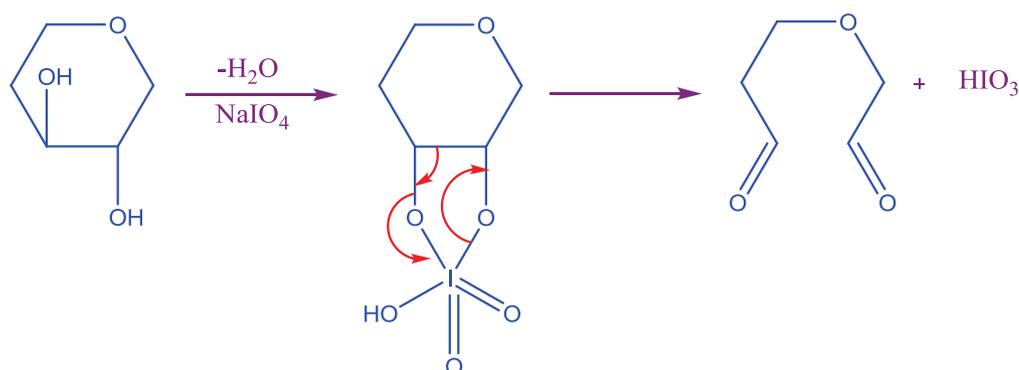


Figure V.2 : mécanisme de l'oxydation periodique

Le suivi de la réaction se fait par chromatographie sur couche mince en phase inversée, pendant quatre heures à température ambiante.

Cependant, la coupure des liaisons carbone-carbone peut se faire à plusieurs endroits de la molécule. Le periodate peut couper un ou deux groupements glycanes en même temps, donnant naissance à deux ouvertures de cycle, mais peut aussi rompre une liaison carbone-carbone en libérant une molécule de formol. La coupure d'une seule liaison conduit à la formation de trois molécules de même poids moléculaire (isomères de position de fonction, **Figure V.3**).

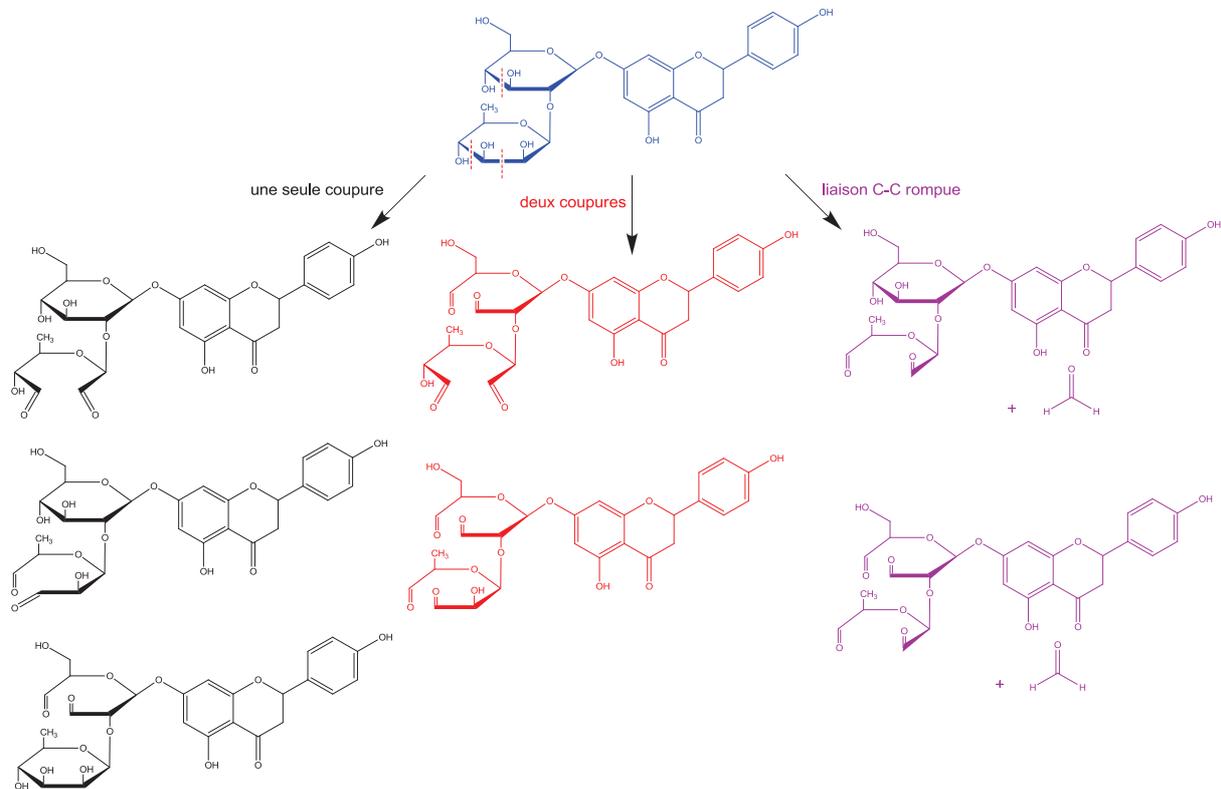


Figure V.3 : Structures des sept polyphénols modifiés pouvant être obtenus par l'oxydation periodique de NN

Ce mélange de composés est analysé par chromatographie en phase liquide (colonne C18, 15 cm * 2,1 mm, même gradient que celui utilisé pour isoler les composés phénoliques ; cf Chapitre 4) couplée au spectromètre de masse, ce qui a permis de confirmer l'oxydation totale du polyphénol et l'obtention de multiples espèces d'aldéhydes (Figure V.4).

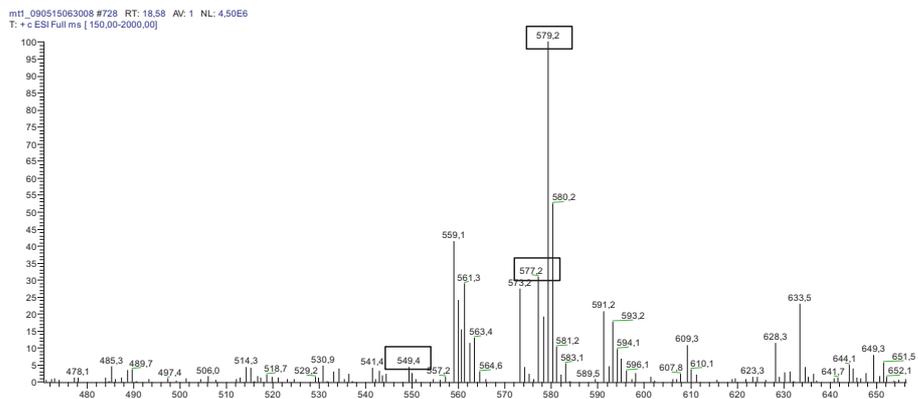


Figure V.4 : Spectre de masse (ESI, mode positif) du mélange de polyphénols NN modifiés. On distingue les masses m/z à 549,4 Th, 577,2 Th et 579,2 Th correspondant aux trois ouvertures de cycles de NN (m/z = 581,3).

Le fait d'obtenir un mélange pouvant contenir jusqu'à sept polyphénols NN modifiés n'est pas considéré comme un problème pour l'étape de greffage dans la mesure où toutes les espèces sont susceptibles de se lier aux billes magnétiques en maintenant un noyau flavane intact.

1.2. Fonctionnalisation, greffage des billes magnétiques et détermination du rendement de couplage

Nous avons choisi des billes de petites tailles qui permettent d'offrir une surface de contact élevée, portant en surface des groupements amines primaires (Ademtech, granulométrie 300 nm). Le couplage du polyphénol modifié (sous forme de dialdéhyde, en solution dans du méthanol) sur le groupement NH_2 présenté par les billes se fait par une amination réductrice [4] (**Figure V.5**).

Cette réaction utilise un excès de cyanoborohydrure de sodium (NaBH_3CN , 2heures à 37°C), permettant de réduire la base de Schiff formée pour conduire à l'amine finale (**Figure V.5**).

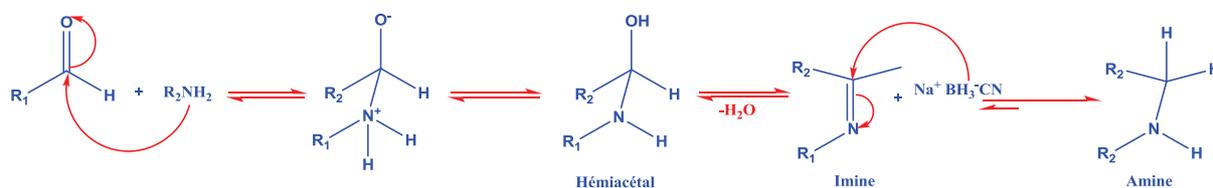


Figure V.5 : Mécanisme réactionnel de l'amination réductrice

Les fonctions amines n'ayant pas réagi sont bloquées au moyen d'une solution de glycine et les sous-produits de réaction sont éliminés par des étapes de lavage.

Sachant que les billes présentent une capacité de fixation de 10 à 50 μg de polyphénol par milligramme (selon les données du fabricant), nous avons engagé de 30 à 150 μg de polyphénol modifié pour 3 mg de billes. Comme pour la sonde peptidique, l'évaluation du rendement de greffage du polyphénol modifié se fait par mesure d'absorbance dans l'UV. Dans un premier temps le coefficient d'extinction molaire du polyphénol modifié a été déterminé grâce à la loi de Beer-Lambert pour une longueur d'onde de 222 nm, maximum d'absorbance du spectre (**Figure V.6**).

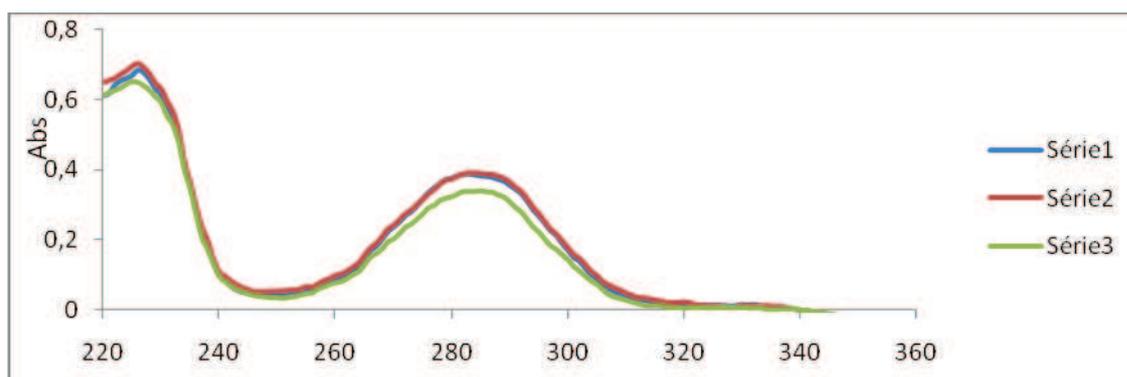


Figure V.6: Spectres d'absorption UV du polyphénol ouvert (trois mesures séparées)

Le coefficient d'extinction molaire moyen pour le polyphénol NN oxydé est de $3630 \pm 52 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ à 20°C . Le rendement de greffage du polyphénol est déterminé de la même façon que dans le chapitre 4 par le dosage de la quantité de polyphénols non greffés.

Le **Tableau V.1** regroupe les rendements de greffage obtenus pour deux quantités de polyphénol NN oxydé ($60 \mu\text{g}$ et $112,5 \mu\text{g}$). Le rendement moyen de greffage est de $(97,7 \pm 0,5) \%$.

Quantité de Polyphénols modifiés pour 3 mg de billes	60 μg	60 μg	112,5 μg	112,5 μg
Rendement de greffage moyen	$98,0 \pm 0,1\%$	$97,0 \pm 0,2 \%$	$97,8 \pm 0,2 \%$	$98,0 \pm 0,2\%$
Pour 1 mg de billes	33,9 nmoles	33,6 nmoles	63,4 nmoles	63,6 nmoles

Tableau V.1: Tableau récapitulatif des taux de greffage du polyphénol NN oxydé sur les billes magnétiques avec 1mg de billes par essai

1.3. Conclusion

L'objectif de cette partie, à savoir la création d'une sonde polyphénolique par immobilisation d'un polyphénol modifié sur des billes, a été atteint. Il faut cependant noter que la création d'un espaceur a conduit à un mélange pouvant contenir jusqu'à sept composés distincts, qui possèdent néanmoins tous la capacité à se greffer aux billes magnétiques en conservant un noyau flavane intact. Il est donc possible que la modification du polyphénol permettant son greffage conduise à une perte non homogène de sites qui sont des potentiels donneurs de liaisons hydrogènes. En effet, sur les sept composés possibles, certains possèdent deux, trois, quatre ou cinq groupements OH de moins que le polyphénol d'origine. La proportion de ces différentes formes étant susceptible de varier d'une expérience de greffage à l'autre, nous avons choisi de mener les expériences d'interaction avec un seul et même lot de sonde polyphénolique. Cette contrainte est également justifiée par l'absence de contrôle de la densité des groupements fonctionnels amino en surface des billes magnétiques en fonction des lots du fabricant, ce dernier fournissant uniquement une fourchette de concentration.

II. Etude de l'interaction entre la sonde polyphénolique et le peptide IB7₁₄

La sonde polyphénolique a été conçue dans le but de disposer d'un outil permettant d'étudier les interactions polyphénols-protéines salivaires. L'efficacité de cet outil doit donc tout d'abord être validée avec un système simple comme un peptide modèle.

II.1. Choix et caractérisation par spectrométrie de masse du peptide modèle

Nous avons choisi de conserver comme premier modèle le peptide IB7₁₄ (Figure V.7). L'étude de l'interaction est la même que celle utilisée pour la « sonde peptidique »; nous pourrions ainsi tirer profit des informations obtenues sur l'interaction en phase liquide entre ce peptide et le polyphénol NN.



Figure V.7 : Structure primaire de la protéine riche en proline IB7, la délimitation en rouge indique la structure du peptide IB7₁₄

L'analyse du peptide est réalisée au moyen du spectromètre de masse LCQ Advantage (Thermo) en mode positif (concentration ajustée à $11,2 \cdot 10^{-12}$ mol/ μ L). Les signaux des ions mono et di-chargés sont pris en compte pour la quantification du peptide (Figure V.8).

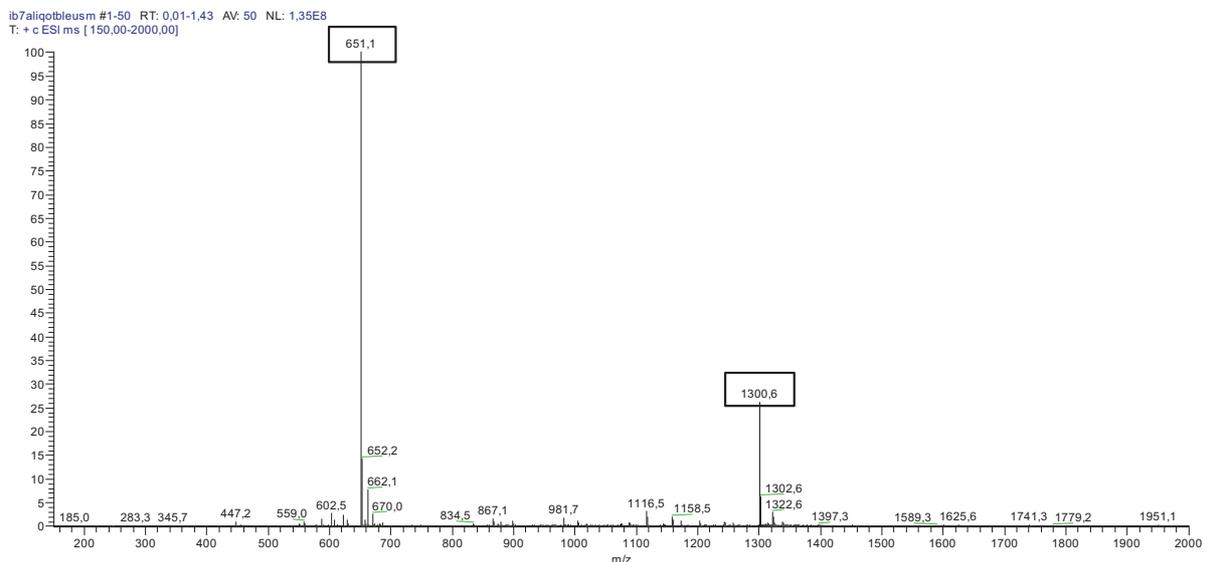


Figure V.8 : Spectre de masse du peptide IB7₁₄ en mode electrospray. Le peptide apparaît sous deux formes : l'ion dichargé majoritaire $[M+2H]^{2+}$ à 651,1 Th et l'ion monochargé $[M+H]^+$ (à 1300,6 Th).

II.2. Principe de l'étude de l'interaction

Avant utilisation, 3 mg de billes greffées avec la sonde polyphénolique sont lavées dix fois par 500 μL d'eau, afin d'éliminer toute espèce susceptible d'interférer avec l'analyse par spectrométrie de masse. Avant chaque expérience d'interaction une solution fraîche de peptide IB7₁₄ est préparée à une concentration de $112 \cdot 10^{-12}$ mol/ μL dans un mélange eau/ éthanol (80/20).

Nous avons choisi d'utiliser un rapport molaire sonde/partenaire identique à celui utilisé dans le cas de la sonde peptidique, soit un rapport molaire polyphénol NN présenté par la sonde/peptide de 3, garantissant un excès de polyphénols. Ce rapport est gardé constant pour toutes les expériences d'interaction. Dans une expérience standard d'interaction, nous avons engagé 27 nmoles de polyphénol greffé et 9 nmoles de peptide purifié (de 0,42 à 0,80 mg de sonde polyphénolique, selon que le taux de greffage est de 63,6 ou 33,6 nmoles par milligramme de billes) et 80,3 μL d'une solution de peptide à $112 \cdot 10^{-12}$ mol/ μL). Après soixante minutes d'agitation mécanique à 37°C, les billes sont sédimentées et le surnageant contenant le peptide non capté par la sonde polyphénolique (peptide libre) est prélevé. 20 μL de ce surnageant ont été utilisés pour la quantification par spectrométrie de masse. La différence entre la quantité totale de peptide et la quantité de peptide libre donne la quantité de peptide retenu par la sonde polyphénolique (schéma de la **Figure V.9**).

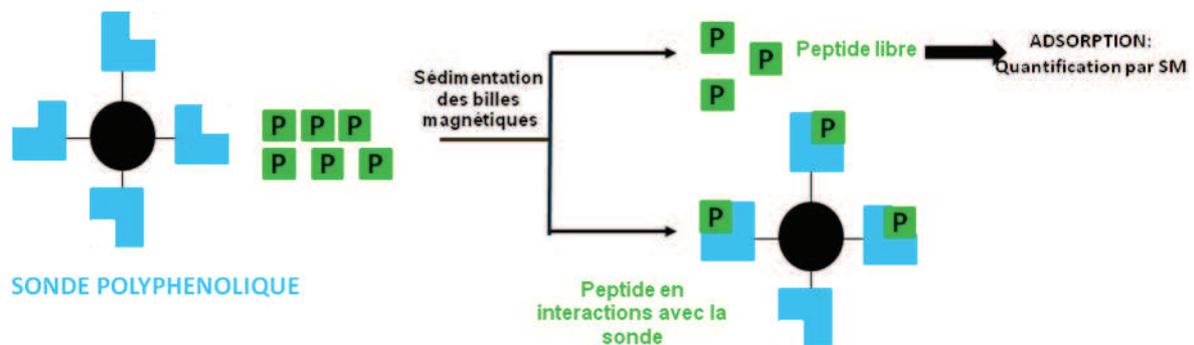


Figure V.9 : Principe de l'étude de l'interaction sonde polyphénolique/peptide salivaire IB7₁₄

II.3. Quantification par spectrométrie de masse

II.3.1. Choix de l'étalon interne

Le choix du standard interne s'est porté sur un peptide de masse voisine de celle d'IB7₁₄ : l'Angiotensine I (séquence DRVYIHPFHL, Sigma). L'Angiotensine apparaît sous trois formes ioniques qui seront prises en compte pour la quantification (**Figure V.10**) : $[M+H]^+ = 1296,8$ Th, $[M+2H]^{2+} = 649,5$ Th et $[M+3H]^{3+} = 433,7$ Th.

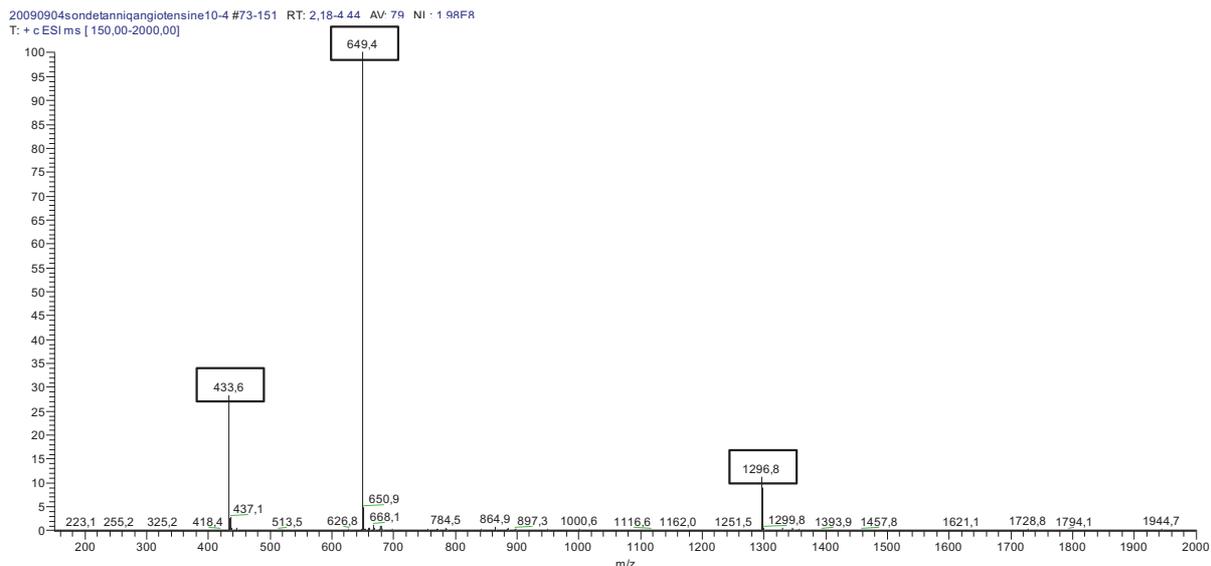


Figure V.10 : Signature spectrale de l'Angiotensine I par spectrométrie de masse ESI-Piège ionique. Le peptide apparaît sous trois formes : l'ion dichargé majoritaire $[M+2H]^{2+}$ à 641,4 Th, l'ion trichargé $[M + 3H]^{3+}$ à 433,6 Th et l'ion monochargé $[M+H]^+$ (à 1296,8 Th).

II.3.2. Principe de la quantification relative

Une quantité fixe d'étalon interne (20 μ L à 5,4.10⁻⁶M) est ajoutée à chaque échantillon à doser par spectrométrie de masse, permettant ainsi de normaliser chaque spectre par rapport à l'intensité du standard interne. Il s'agit de doser le peptide total (concentration 112.10⁻⁶ M) et le peptide non retenu par la sonde (surnageant prélevé après interaction). L'analyse est effectuée avec 20 μ L de chacun des ces deux échantillons. La quantité de peptide captée par la sonde polyphénolique est obtenue par la différence entre la quantité totale de peptide et la quantité de peptide non retenu. Il s'agit plus précisément de faire la différence entre la somme des intensités des ions mono- et doublement chargés du peptide IB7₁₄.L'affinité du peptide pour la sonde est déduite de l'équation :

$$\text{Affinité} = \frac{\sum I_{\text{ion}}}{\sum I_{\text{total}}} \times 100$$

I = intensité de pic

$\sum I$ = somme des intensités des ions mono et

doublément chargé

II.4. Etude de l'affinité du peptide IB7₁₄ pour la sonde polyphénolique

Les essais d'interaction et les analyses par spectrométrie de masse ont été réalisés dans les conditions établies précédemment. Le spectre ci-dessous (Figure V.11) correspond au peptide « total », avant mise en contact avec la sonde.

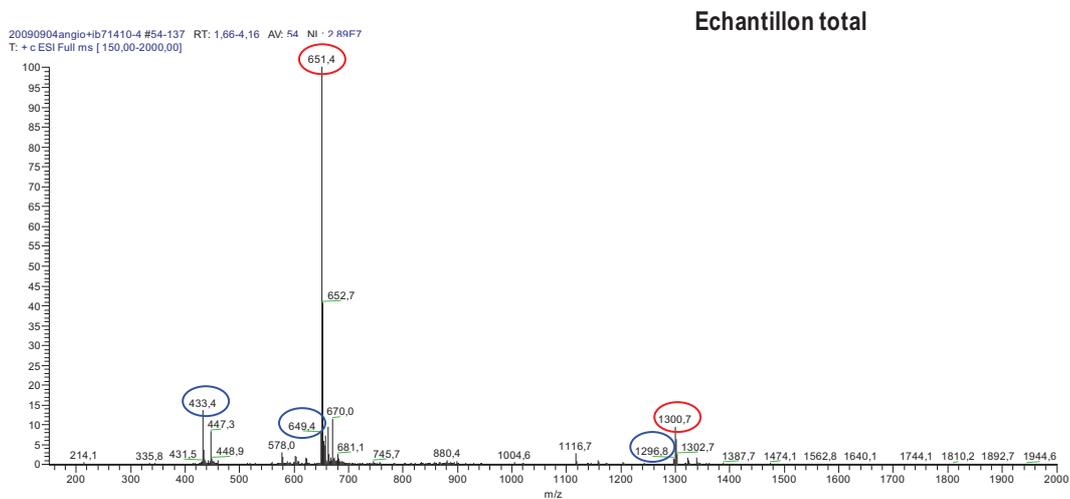


Figure V.11 : Spectre de masse de l'échantillon total (avant interaction avec la sonde). Les espèces corrélées à l'Angiotensine sont entourées en bleu, celles du peptide en rouge.

De même le spectre de la Figure V.12 correspond au peptide non retenu après interaction avec la sonde polyphénolique (surnageant des billes).

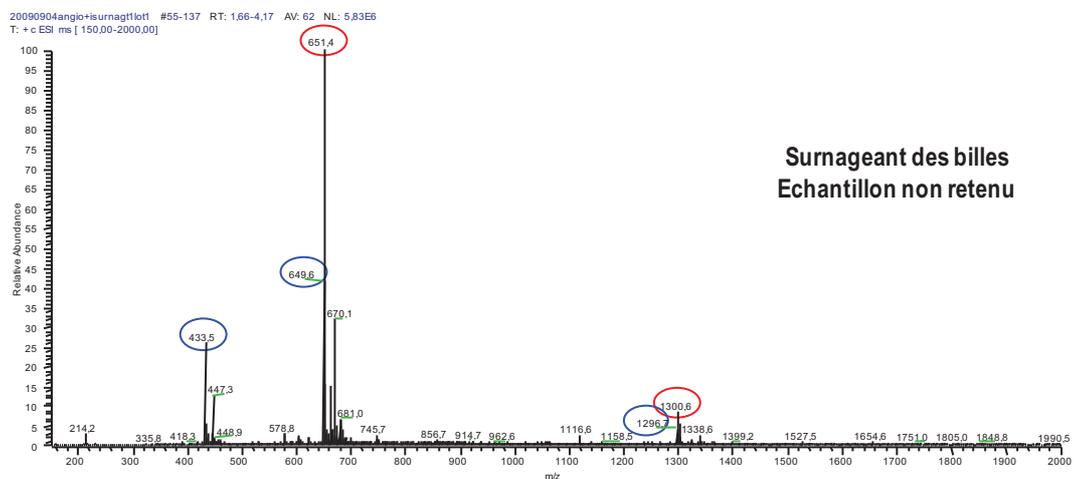


Figure V.12 : Spectre de masse du surnageant (peptide non retenu par la sonde). Les espèces corrélées à l'angiotensine sont entourées en bleu, celles du peptide sont en rouge.

L'exploitation des données expérimentales est détaillée dans la partie expérimentale (chapitre VII). La somme de trois ions est utilisée pour obtenir le signal de l'angiotensine I. Après normalisation et application d'un facteur correctif tenant compte des variations de signal entre les analyses, la quantité d'IB7₁₄ retenue par la sonde polyphénolique NN est déterminée. Ce résultat peut alors être traduit comme une affinité pour la sonde :

$$\text{Affinité} = \text{TIC IB7}_{14} \text{ «retenu »} / \text{TIC IB7}_{14} \text{ « total »} \times 100$$

$$\text{Affinité}_{\text{sonde NN/IB714}} = 68 \%, \text{ incertitude de mesure estimée à } 2\%$$

L'expérience répétée à l'identique avec le même lot de sonde polyphénolique a donné une valeur d'affinité de

$$\text{Affinité}_{\text{sonde NN/IB714}} = 65 \%, \text{ incertitude de mesure estimée à } 2\%$$

Cette expérience d'interaction fournit plusieurs niveaux d'informations.

Il indique tout d'abord que la sonde moléculaire polyphénolique interagit bien avec le peptide IB7₁₄. Une expérience contrôle identique à celle-ci mais réalisée avec des billes ne portant aucun greffage (absence de polyphénol) a permis de confirmer ce résultat. Aucune interaction du peptide avec les billes n'a en effet pu être mise évidence dans la mesure où la totalité du peptide engagé dans l'expérience se retrouve sous forme libre. Il semble donc que l'espaceur créé soit suffisant pour garantir l'interaction entre la partie polyphénolique et le peptide, plus des 2/3 du peptide engagé dans l'expérience étant retenus par la sonde. De plus, un contrôle consistant à réaliser la même expérience d'interaction avec le même lot de billes mais avec d'autres peptides qu'IB7₁₄ a révélé une affinité bien inférieure pour ces derniers.

Nous avons par ailleurs répété l'expérience à l'identique avec un autre lot de billes préparé dans des conditions identiques au premier lot. Le résultat de cette expérience a été décevant, puisque la valeur d'affinité d'IB7₁₄ pour la sonde qui en a été déduite est seulement de l'ordre de 29 %.

$$\text{Affinité}_{\text{sonde NN/IB714}} = 29. \%$$

Cette valeur d'affinité est radicalement différente de celles obtenues précédemment (68 % et 65 %). Les conditions d'interactions (temps de contact, température, quantités engagées de chaque partenaire, rapport molaire sonde polyphénolique/peptide) sont pourtant inchangées. Le test d'interaction ne semble donc pas devoir être remis en cause. Une des hypothèses envisagées pour expliquer ce résultat est l'hétérogénéité des lots de sonde polyphénolique utilisés. Les deux premiers essais ont été réalisés avec un seul et même lot provenant de la même réaction de greffage, tandis que le troisième essai a été mené sur un autre lot. Nous avons déjà évoqué ce risque au terme de la partie consacrée à la conception de la sonde polyphénolique. Le greffage du polyphénol modifié revient à greffer les sept formes distinctes produites par la modification, sans qu'il soit possible de contrôler la proportion de ces différentes formes. Ce point est crucial dans la mesure où toutes les formes ne possèdent pas le même nombre de groupements donneurs de liaisons H. Ces différentes formes peuvent ne pas présenter la même affinité pour le même peptide.

III. Conclusion

A ce jour, ce problème n'a pas été résolu, et nous l'avons contourné en menant l'intégralité d'un test d'interaction sur un seul et même lot de sonde polyphénolique. Pour que ce type de sonde moléculaire soit opérationnel, il faudra accepter de comparer entre eux des résultats de tests d'interaction menés sur des lots de sonde différents en utilisant parmi les molécules testées systématiquement le même peptide afin de pouvoir normaliser les variations d'affinité constatées. Ce contrôle systématique devrait permettre de pondérer l'hétérogénéité des lots de sonde.

Par ailleurs nous n'avons préparé à ce jour qu'un seul type de sonde polyphénolique, la sonde NN, avec une stratégie limitée aux polyphénols possédant des sucres en périphérie du noyau flavane. Elle n'est pas applicable à des composés phénoliques simples, comme la catéchine ou ses oligomères, pour laquelle une modification chimique entraînerait une perte totale de sa capacité à interagir avec le peptide.

Les expériences réalisées indiquent pour l'instant que cette sonde reconnaît de manière préférentielle un segment de PRP. Pour aller plus loin, et rendre la sonde polyphénolique plus universelle il faudrait la tester en présence d'autres polypeptides issus du fractionnement des protéines salivaires totales. Ainsi, cette sonde aurait un potentiel de criblage des protéines salivaires. L'identification de ces protéines pourrait permettre la conception d'une sonde peptique multiplexe, portant à sa surface une sélection de polypeptides greffés ayant une forte affinité envers les polyphénols.

IV. Bibliographie

1. Plet, B., La spectrométrie de masse dans l'étude de l'interaction entre protéines de la salive humaine et polyphénols. Vers une approche analytique de l'astringence du vin. Université de Bordeaux I, 2007.
2. Goldstein, I.J., & al., *Reduction of the products of periodate oxidation of carbohydrates. The constitution of cellulose.* J. Am. Chem. Soc., 1957. 79: p. 6469-6473.
3. Cescutti, P., & al., *Periodate oxidation of cyclosophoraoses: a quantitative analysis of the reaction products by ionspray mass spectrometry.* Carbohydr. Res., 1998. 309(1): p. 11-16.
4. Cho, B.T. and S.K. Kang, *Direct and indirect reductive amination of aldehydes and ketones with solid acid-activated sodium borohydride under solvent-free conditions.* Tetrahedron, 2005. 61(24): p. 5725-5734.

CHAPITRE VI :

VERS DES MELANGES PLUS COMPLEXES DE POLYPHENOLS ET DE PROTEINES

Dans les deux chapitres précédents, nous avons essayé de mieux comprendre la sensation d'astringence en construisant deux outils moléculaires : la sonde peptidique et la sonde polyphénolique.

Ces deux sondes complémentaires l'une de l'autre nous ont permis d'étudier les interactions entre un peptide modèle IB7₁₄ et 5 polyphénols (sonde peptidique) et d'établir une échelle d'affinité relative en phase liquide, et d'étudier le comportement d'un polyphénol immobilisé envers le peptide modèle IB7₁₄. Ces deux outils offrent des perspectives de développement à plus grande échelle en s'approchant des conditions réelles d'interaction entre polyphénols et protéines salivaires. Dans le cas de la sonde peptidique, cette dernière pourrait permettre le criblage de polyphénols extraits du vin rouge, et ainsi d'établir une relation avec la typicité des vins de Bordeaux. Quant à la sonde polyphénolique, elle pourrait être étudiée avec des protéines salivaires différentes des PRP, et extraites directement de la salive.

Dans ce chapitre, nous allons dans un premier temps entreprendre de fractionner les protéines salivaires selon un critère de taille, dans l'objectif d'étudier le comportement de ces fractions avec la sonde polyphénolique. Dans un second temps, les polyphénols extraits du vin rouge seront fractionnés, pour préparer leur étude avec la sonde peptidique.

I. Les protéines salivaires

La salive humaine est une solution constituée d'électrolytes et de protéines, produite principalement par les glandes parotide, submandibulaire et sublinguale. Elle forme ainsi la première ligne de défense de la cavité orale contre les bactéries et les attaques virales ^[1, 2]. Des approches biochimiques traditionnelles (électrophorèse 1D et 2D) ont permis d'identifier plus d'un millier de protéines ^[3-5] (**Figure VI.1** et **Figure VI.2**).

Il est cependant bien connu que ce type de méthodologie conduit principalement à l'identification des protéines majoritaires, et il convient de noter que les protéines salivaires de tailles inférieures à 10 kDa sont sous-représentées dans ce répertoire. Ceci est notamment dû aux conditions utilisées de manière classique en électrophorèse, et aux difficultés de clivage protéolytique au moyen de la trypsine, qui est l'enzyme la plus communément utilisée pour obtenir des peptides analysables par spectrométrie de masse.

Pour notre étude nous avons envisagés de faire appel à une méthode de fractionnement des protéines salivaires selon un critère de taille en visant l'isolement de trois fractions : a) taille inférieure à 10 kDa, b) taille comprise entre 10 et 30 kDa et c) taille supérieure à 30 kDa.

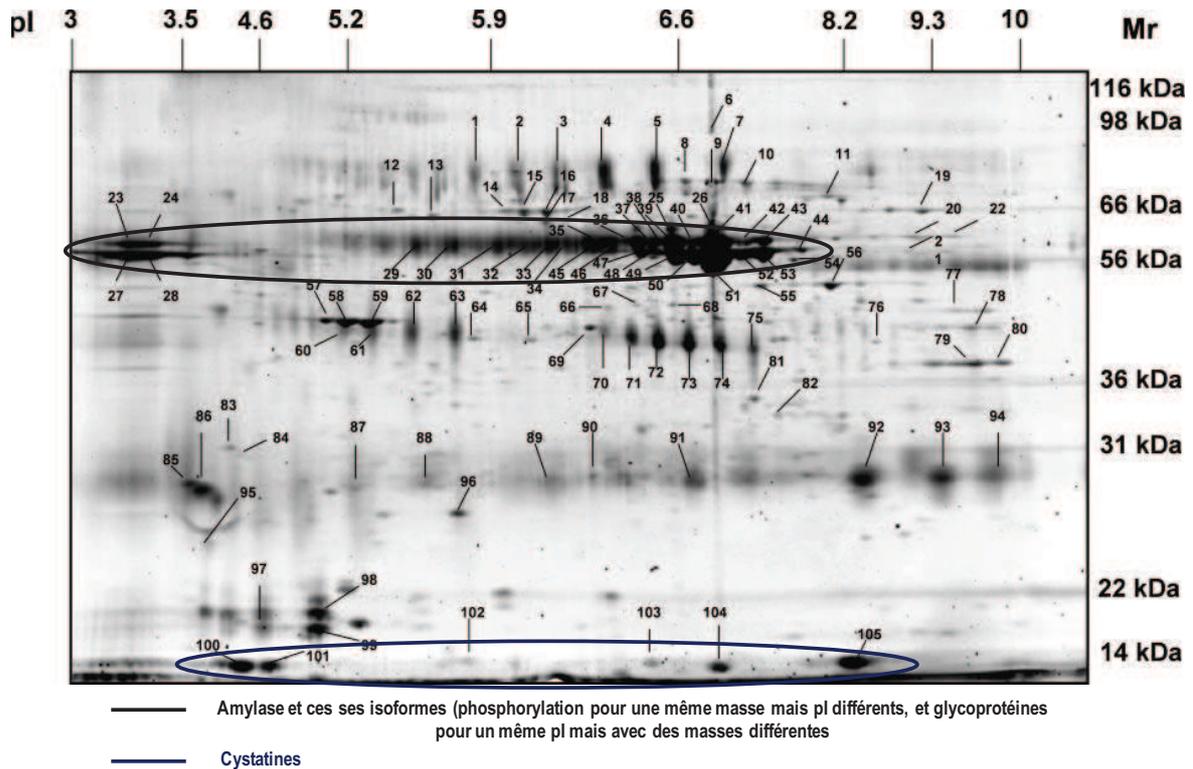


Figure VI.1 : Gel 2D de la salive humaine. Les protéines sont séparées sur un gel à 12,5% de polyacrylamide (11 cm de migration). Les spots de protéines sont visualisés par coloration rouge SYPRO. Figure modifiée d'après la référence [5]

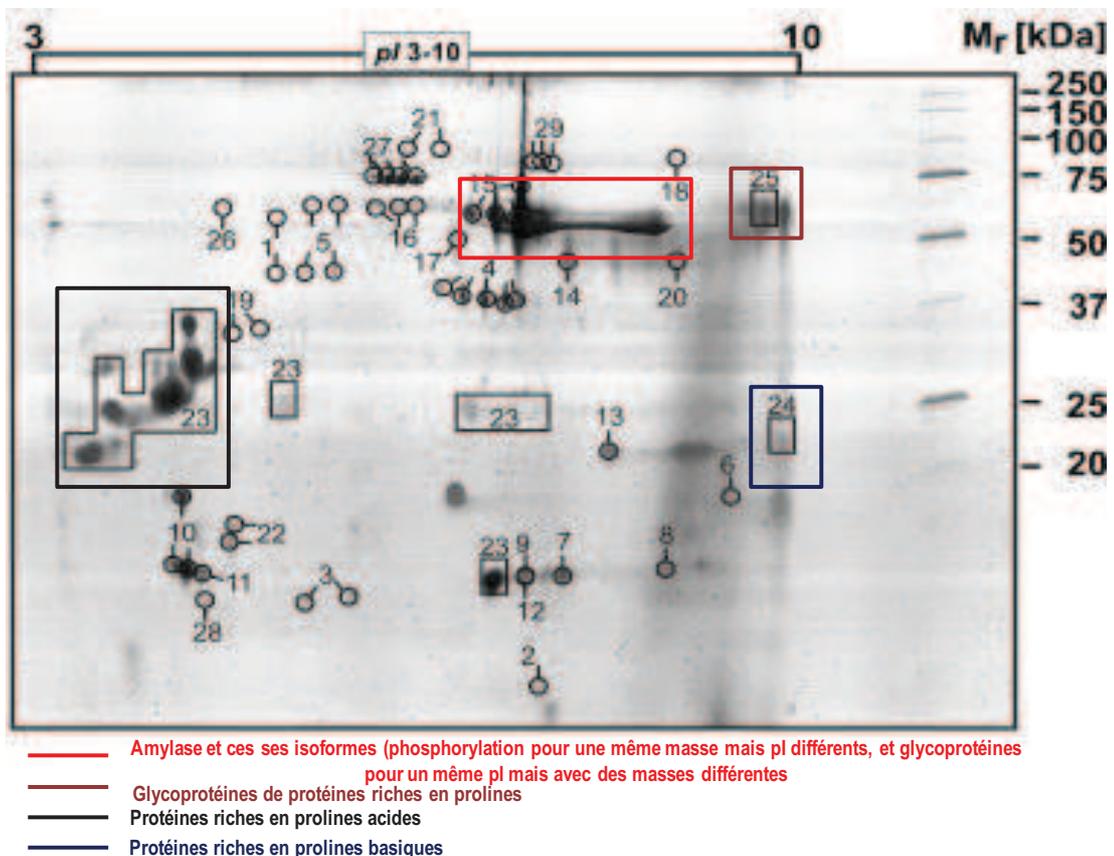


Figure VI.2 : Gel 2D de la salive humaine. Le gel est coloré au Bleu de Coomassie R250. Figure modifiée d'après la référence [4].

1.1. Prélèvement d'échantillons et traitement

Le protocole pour la collecte de salive humaine a été établi d'après différentes publications [3, 5-7]. Les prélèvements salivaires ont été effectués sur sept adultes volontaires (non-fumeurs et ne suivant aucun traitement médical). Après collecte, les échantillons de salive ont été centrifugés pendant quinze minutes à 4°C, puis les surnageants ont été stockés à -80°C (aucun cocktail d'inhibiteurs de protéase n'a été ajouté)[6, 8]. Pour certaines expériences, des aliquots de prélèvements réalisés sur plusieurs individus ont été mélangés. Les protéines salivaires sont ensuite dosées par la méthode de Bradford (Test BioRad) pour déterminer leur concentration.

1.2. Dosage des protéines salivaires totales

Cette méthode repose sur un dosage colorimétrique, basé sur l'adsorption du colorant de Coomassie G250. Ce colorant se complexe avec les protéines et provoque un changement de couleur passant du rouge (DO mesurée à 465 nm) au bleu (DO mesurée à 595 nm). Ce changement de couleur résulte de la complexation du réactif de dosage avec les acides aminés aromatiques ou les résidus hydrophobes des protéines. L'intensité mesurée pour l'échantillon est proportionnelle à sa concentration de protéines. Un graphe d'étalonnage est établi à l'aide d'une solution de BSA (Bovine Serum Albumine) de concentration connue. Ce dosage, dit de Bradford [9], ne change pas l'environnement des protéines à doser et est préféré au dosage de Lowry qui utilise du SDS et qui dénature les protéines. Les concentrations de protéines totales obtenues sont comprises entre 2,7 à 4,4 µg/µL soit une concentration moyenne de 3,6 µg/µL. Les concentrations obtenues sont en accord avec celles de la bibliographie [1, 10].

1.3. Etude par électrophorèse 1D des protéines salivaires

La séparation des protéines salivaires a été effectuée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de sodium dodécyl sulfate (technique SDS-PAGE) [11]. Cette technique utilise la liaison du SDS (agent dénaturant) aux protéines, qui leur confère une charge négative uniforme en fonction de leur longueur. Les protéines ainsi dénaturées migrent sous l'action d'un champ électrique et se séparent en fonction de leur taille. Le protocole utilisé pour la réalisation de gel SDS-PAGE est détaillé dans le chapitre VIII (partie expérimentale).

1.3.1. Optimisation des conditions expérimentales

a) Les différentes colorations

Dans un premier temps, un test a été réalisé pour déterminer la limite de détection des protéines salivaires sur gel SDS-PAGE à différentes concentrations (5,4 µg à 162 µg pour une concentration moyenne des protéines salivaires de 3,6 µg/µL).

La coloration d'un gel SDS-PAGE est l'étape qui permet de révéler les différentes protéines présentes sur le gel. Le choix de la coloration va déterminer la sensibilité de la technique et ainsi définir la coloration la plus adaptée pour notre étude.

La coloration au Bleu de Coomassie est une technique quantitative et peu sensible, qui permet de réaliser des études comparatives. Dans notre étude nous nous sommes intéressés à deux méthodes de coloration au Bleu de Coomassie :

- 0,1% Bleu de Coomassie R250/ 25% MeOH/ 10% Acide acétique/ 65% eau milliQ
- 0,1% Bleu de Coomassie R250/ 50% EtOH/ 10% Acide acétique/ 40% eau milliQ

La dernière de ces deux colorations permet une mise en évidence des protéines possédant des résidus hydrophobes en grand nombre, caractérisées par des bandes allant du violet foncé au rose (phénomène métachromatique).

La coloration testée au nitrate d'argent est connue pour être plus sensible que la coloration au Bleu. Cette technique de coloration dépend des propriétés intrinsèques des protéines, et ne permet donc pas de révéler toutes les protéines avec le même facteur de réponse (**Figure VI.3**).

Les trois colorations nous montrent que certaines protéines comme l'amylase ne fixent pas bien la coloration au nitrate d'argent. Cependant, les protéines de basses masses sont mieux visualisées avec cette dernière coloration, plutôt qu'avec la coloration au Bleu de Coomassie.

Les deux colorations réalisées avec le Bleu de Coomassie permettent de distinguer les protéines salivaires de manière quantitative. Une quantité déposée de 54 µg de protéines salivaires totales permet d'obtenir une bonne détection des bandes de protéines. La coloration au Bleu contenant 50% d'éthanol est caractérisée par le phénomène métachromatique [12]. On peut ainsi distinguer les protéines riches en prolines (bandes roses) et les formes glycosylées de ces protéines (dans la zone des hauts poids moléculaires) [13, 14].

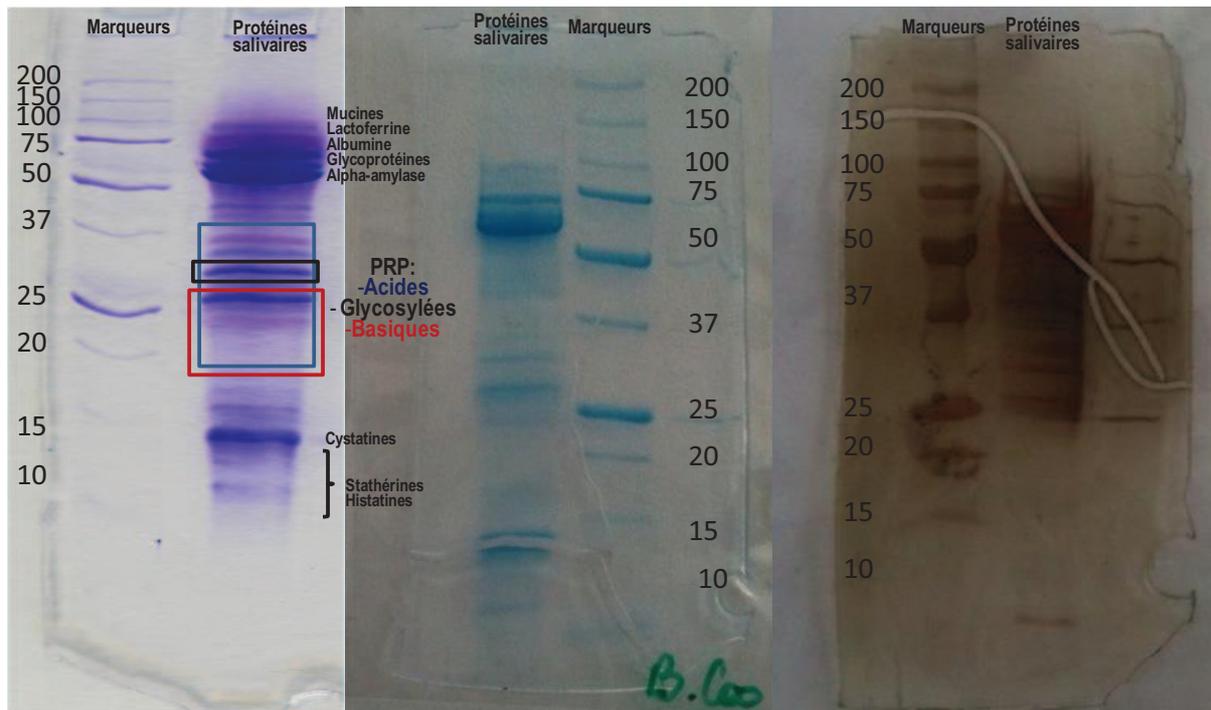


Figure VI.3 : Gels SDS-PAGE (15 % acrylamide) des protéines salivaires. A gauche coloration au Bleu (contenant de l'éthanol), on distingue des bandes roses révélatrices de la présence des protéines riches en prolines, au milieu coloration standard au Bleu de Coomassie, et à droite coloration au nitrate d'argent (les marqueurs de masse moléculaire vont de 10 kDa à 200 kDa).

D'après les données de la littérature, certaines bandes de protéines salivaires peuvent être attribuées sur les gels obtenus :

- les protéines supérieures à 100 kDa sont les mucines [5] [4]
- la lactoferrine est détectée aux environs de 80 kDa [4, 7]
- l'albumine est présente vers 69 kDa [3, 7]
- Les formes fortement glycosylées des protéines riches en prolines sont présentes entre 75 et 50 kDa [3, 6]
- L'alpha-amylase glycosylée et non glycosylée apparaît à 55 et 57 kDa [15, 16]
- Les protéines riches en prolines basiques glycosylées entre 31 et 32 kDa [4, 10, 12]
- Les protéines riches en prolines basiques entre 20 et 25 kDa [4, 12]
- Les protéines riches en prolines acides entre 17 et 37 kDa [4, 12]
- Les cystatines entre 11 et 16 kDa [5, 15, 16]
- Les stathérines vers 7 kDa [7]
- Les histatines vers 6 kDa [4, 7]

Cette analyse nous sera utile pour caractériser les fractions issues des essais de séparation.

b) Résolution des gels SDS-PAGE

En jouant sur la teneur en acrylamide du gel de séparation, on peut espérer mieux séparer les protéines de basses masses. Pour cela, on utilise un gel à 18% d'acrylamide au lieu de 15%. Deux gels ont été utilisés avec deux colorations différentes : une au nitrate d'argent, et une au bleu de Coomassie. Dans les deux cas les protéines salivaires sont déposées après précipitation au TCA (explication dans ce qui suit) (**Figure VI.4**). Les protéines de basses masses sont mieux distinguées avec la coloration au nitrate d'argent, mais on constate un problème de fixation, la coloration au Bleu de Coomassie sera donc systématiquement utilisée par la suite. Cependant, le gel à 18% d'acrylamide coloré au Bleu n'apporte pas d'amélioration significative pour les protéines de basses masses; nous conserverons donc une préparation des gels avec 15% d'acrylamide.

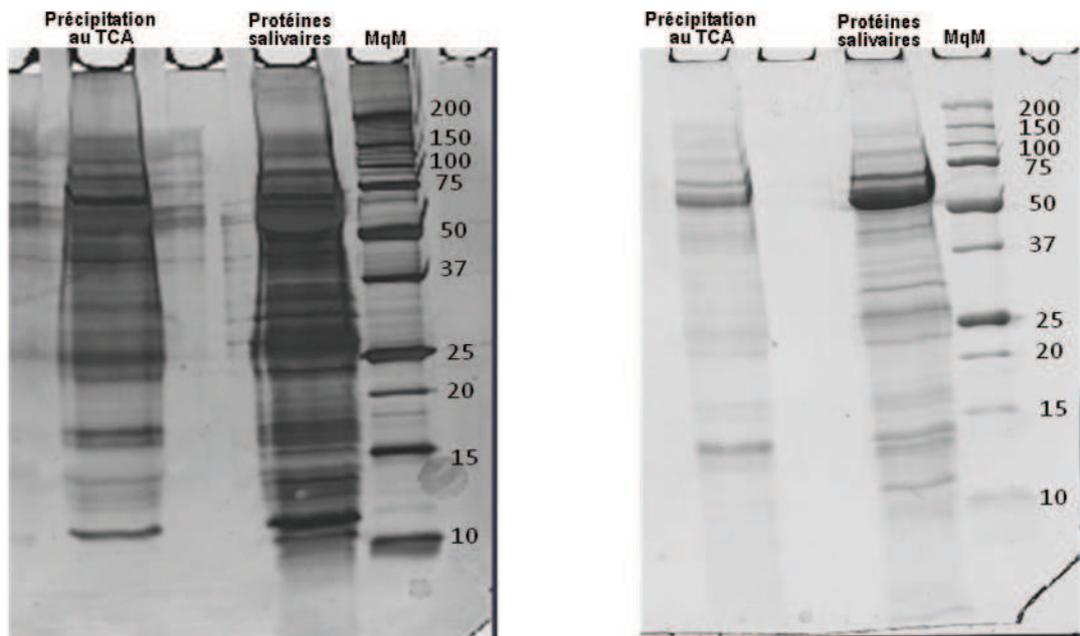


Figure VI.4 : Gels SDS-PAGE (18% acrylamide). A gauche coloration au nitrate d'argent, à droite coloration au Bleu de Coomassie.

1.3.2. Etape de précipitation au TCA

Une expérience est réalisée en parallèle en déposant les protéines salivaires préalablement précipitées au TCA à une concentration finale de 10% de TCA. L'échantillon est ensuite centrifugé pendant dix minutes à 10000g, puis le culot est repris et déposé sur le gel.

Dans notre cas les protéines salivaires précipitent bien avec le TCA à différentes concentrations, mais cette étape préliminaire conduit à une distorsion de la migration pour une grande quantité de matériel. Cette distorsion a peut être pour origine le TCA résiduel, car les culots repris et déposés sur le gel n'ont pas été lavés. Ce problème de migration pourrait être contourné en lavant les culots précipités au TCA avec de l'éther ou de l'acétone glaciale.

1.3.3. Tests de précipitation des protéines salivaires en présence de vin rouge ou d'eau

Compte tenu de la diversité des tailles et des concentrations des protéines salivaires, nous avons cherché à savoir si toutes les protéines salivaires précipitent lorsqu'elles sont mises en présence de vin rouge. Parallèlement à ce test, un contrôle a été effectué en remplaçant le vin par de l'eau. Dans les deux cas, après centrifugation des échantillons, les culots ont été remis en solution et déposés sur gel, alors que les surnageants ont été précipités au TCA, remis en solution, puis analysés par SDS-PAGE.

Le vin rouge provoque la précipitation quantitative de toutes les protéines salivaires sans discrimination, car le surnageant repris au TCA ne contient plus de protéines. En remplaçant le vin par l'eau, on constate que le culot de centrifugation ne contient qu'une très faible proportion de protéines salivaires. De plus, ces mêmes tests ont été réalisés à différentes vitesses de centrifugation (800g et 10000 g). Dans les deux cas, on obtient le même résultat : le vin rouge précipite quantitativement les protéines salivaires, alors que l'eau ne conduit à aucune précipitation. En particulier, il n'y a pas d'effet de ségrégation de protéines particulières (telles que les PRP) lors de la précipitation au contact des polyphénols du vin.

D'après la bibliographie, la composition de la salive humaine varie d'un individu à un autre; les différences dépendent de manière significative du régime alimentaire ^[1, 2]. On pourrait donc s'attendre à observer une variation de composition des protéines salivaires entre un individu isolé, et un « pool » de salives provenant de plusieurs individus. L'analyse par gel SDS-PAGE dans les deux cas ne montre cependant aucune différence notable dans les quantités de protéines salivaires, et dans leur répartition.

1.4. Fractionnement des protéines salivaires

1.4.1 Utilisation des Vivaspin

Nous avons cherché à fractionner les protéines salivaires au moyen de concentrateurs Vivaspin, dont la membrane en polyéthersulfone permet un seuil de coupure (cut-off) à 30, 10 et 3 kDa pour un volume d'échantillon limité à 500 µL. Pour cela, les échantillons sont d'abord concentrés sur un Vivaspin de 30 kDa, puis le filtrat contenant les protéines de masses inférieures à 30 kDa est repris sur un concentrateur à 10 kDa et ensuite de suite pour obtenir les protéines salivaires de masses inférieures à 3 kDa.

Au départ 100 µL de protéines salivaires non diluées ont été centrifugées à 4°C sur une membrane ayant un cut-off de 30 kDa pendant 20 minutes. Le concentrat (protéines supérieures à 30 kDa) et le filtrat (protéines de moins de 30 kDa) sont prélevés. Le filtrat est repris sur la membrane de cut-off de 10 kDa, selon le schéma de traitement présenté sur la **Figure VI.5**.

Les différents filtrats et concentrats sont analysés sur gel SDS-PAGE.

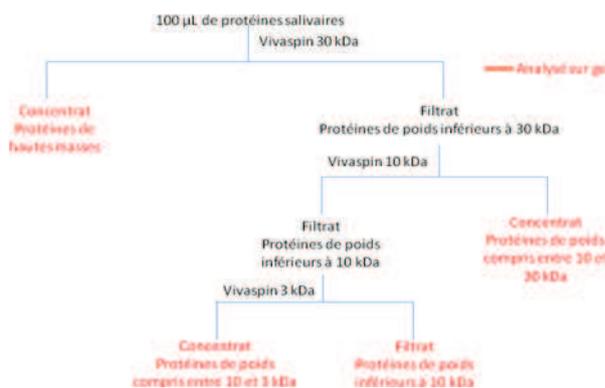


Figure VI.5 : Méthode de fractionnement des protéines salivaires en cascade à l'aide de systèmes de membranes (30 kDa, 10 kDa et 3 kDa).

La révélation des différentes pistes des gels a montré que les protéines salivaires (non diluées) sont toutes présentes dans le concentrat à 30 kDa, et notamment que les protéines de basses masses se retrouvent dans ce même concentrat. Le système en cascade (trois coupures successives) n'est donc pas opérationnel pour séparer les protéines salivaires.

Nous avons tenté de contourner ce problème en passant au préalable par une étape de dilution des protéines salivaires, tenant ainsi compte de la forte viscosité de la salive humaine. Des essais ont été réalisés en mettant en place une ou deux étapes successives de dilution des protéines salivaires, et en appliquant ensuite le même protocole en cascade (Figure VI.5). Les résultats se sont révélés identiques.

Nous avons par ailleurs comparé le système d'ultrafiltration Amicon au Vivaspin en choisissant le cut-off à 10 kDa comme point de comparaison. Les résultats obtenus pour ces deux systèmes sont identiques : toutes les protéines salivaires se retrouvent dans le concentrat. Nous avons donc abandonné ce procédé.

1.5. Elimination de l'amylase

Sachant que l'amylase représente à elle seule 30 % des protéines salivaires totales, elle pourrait être susceptible d'avoir un effet d'entraînement lors de la précipitation des protéines par les polyphénols (tout comme la pratique de laboratoire qui consiste à utiliser une protéine « carrier » telle que la BSA lorsqu'il s'agit de précipiter des protéines en faible concentration). Nous avons donc cherché à nous débarrasser de cette protéine majoritaire.

Une des méthodes connue pour piéger l'amylase est l'emploi d'une chromatographie d'affinité sur un support d'amidon (féculé de pomme de terre) [17]. Nous avons utilisé ce moyen pour tenter de récupérer les protéines salivaires déplétées en amylase et isoler l'amylase (conditions expérimentales décrites dans le chapitre VIII). Ce protocole nous permet ainsi d'obtenir des fractions riches en amylase et des « éluions » déplétées.

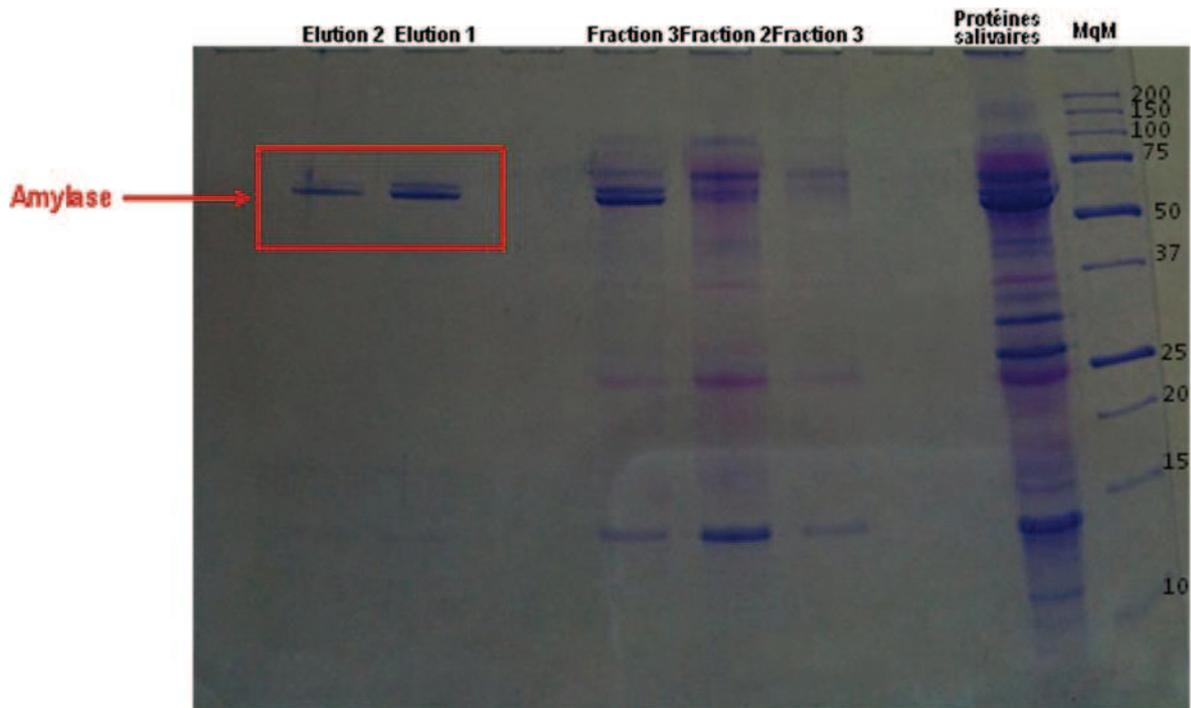


Figure VI.6 : Gel SDS-PAGE (15% acrylamide) des différentes fractions obtenues en utilisant le protocole de déplétion de l'amylase avec de la féculé de pomme de terre. Les fractions 1, 2 et 3 contiennent les protéines déplétées en amylase, les élutions 1 et 2 contiennent l'amylase (coloration au Bleu de Coomassie, MqM marqueurs de masse moléculaire en kDa).

Sur le gel obtenu (Figure VI.6) on remarque qu'une déplétion efficace de l'amylase est réalisée (fraction 2 du lavage). L'amylase n'a été récupérée qu'en ajoutant du SDS dans le tampon d'élution.

Nous avons alors repris notre protocole de fractionnement par des protéines salivaires par ultrafiltration en utilisant la fraction déplétée en amylase. L'analyse sur gel SDS-PAGE a révélé qu'il n'y avait toujours pas de fractionnement efficace selon un critère de taille, sur une membrane ayant un cut-off à 30 kD, tant pour les protéines salivaires non diluées que pour les protéines déplétées en amylase.

Nous avons cherché à savoir si la déplétion en amylase affectait la précipitation des protéines par le vin rouge. Nous avons donc repris le même test de précipitation du vin rouge avec les trois fractions 1 à 3, déplétées en amylase (Figure VI.7). On remarque que les fractions déplétées en amylase précipitent toutes avec le vin rouge. L'amylase ne tient donc pas de rôle majeur dans le phénomène de précipitation, et en particulier n'a pas d'effet d'entraînement sur les autres protéines salivaires.

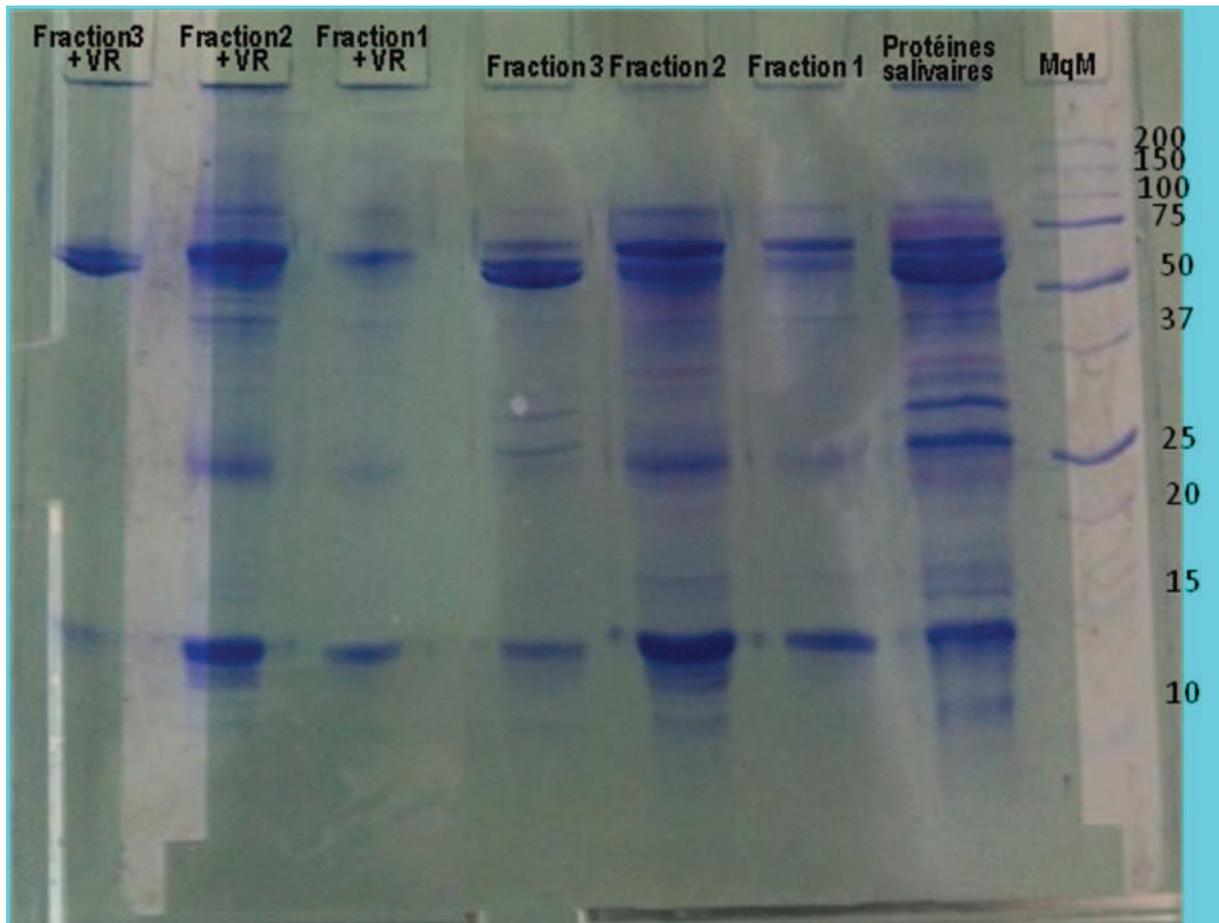


Figure VI.7 : Gel SDS-PAGE (15% acrylamide) des fractions dépletedes en amylase. A droite les fractions dépletedes, à gauche les mêmes fractions précipitées avec du vin rouge (coloration au Bleu de Coomassie, MqM marqueurs de masse moléculaire en kDa).

1.6. Conclusion et perspectives

L'étude sur les protéines salivaires a permis de confirmer dans un premier temps les données relatées dans la bibliographie sur la concentration totale des protéines salivaires. Les essais de précipitation par un vin rouge nous indiquent que toutes les protéines salivaires précipitent au contact des polyphénols, sans effet de précipitation préférentielle d'un type de protéine donnée. Pour peu encourageante qu'elle soit, cette constatation ne remet cependant pas en cause le choix d'immobilisation d'un fragment de PRP pour réaliser une sonde d'affinité.

Une des perspectives pour essayer de fractionner les protéines salivaires seraient d'essayer d'autres systèmes d'ultrafiltration (membranes verticales et horizontales), ou de manière plus conventionnelle une séparation par chromatographie d'exclusion selon la taille. La déplétion de l'amylase peut être exploitée dans ce contexte. On pourrait ainsi envisager de préparer une sonde « protéique » en greffant sur billes magnétiques une fraction de protéines salivaires selon le protocole utilisé pour immobiliser IB7₁₄. Néanmoins, l'observation de la précipitation globale des protéines par un vin rouge ne nous incite pas à poursuivre dans cette direction.

Par ailleurs, nous avons envisagé de développer un fractionnement de vin rouge pour disposer de polyphénols naturels, si possible dans des mélanges pas trop complexes.

II. Fractionnement d'un vin rouge

La stratégie choisie pour fractionner un vin rouge (Château Petit Verdot, Bordeaux 2007) débute par une extraction en phase solide sur Sep-Pack C18.

II.1. Protocole par Sep-Pack C18

Dans une première étape, le vin est mis sous pression réduite pour éliminer l'éthanol présent (dé-alcoolisation du vin) et le concentrer. L'échantillon est ensuite repris sur une cartouche Sep-Pack C18 pour obtenir trois fractions distinctes (Figure VI.8) [18]:

- La fraction (a) contient les ellagitanins issus du bois d'élevage du vin rouge,
- La fraction (b) les polyphénols qui sont supposés impliqués dans le phénomène d'astringence [19-21]
- La fraction (c) les pigments responsables de la couleur du vin.

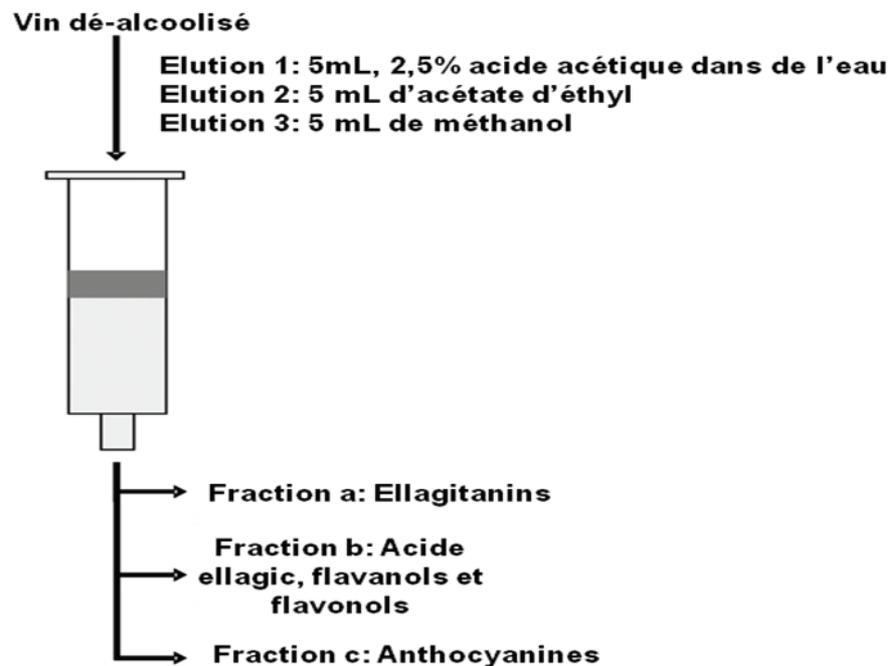


Figure VI.8 : Schéma de fractionnement du vin rouge en utilisant une cartouche Sep-Pack C18 [18]

II.2. Analyse par spectrométrie de masse ESI-LC-MS

Cette première étape nous permet d'obtenir trois fractions qui sont analysées par ESI-LC-MS (colonne en C18 phase inversée, analyse des ions positifs). Le gradient employé a été choisi à partir de différentes publications [18, 22-24]. Les essais ont été réalisés pour des concentrations moyennes estimées de 2 µg/µL (la teneur des composés phénoliques présents dans le vin étant de 1 à 4 g/L). La détection UV est réalisée aux longueurs d'onde de 280, 350 et 520 nm [22-24]. Comme nous l'indique le spectre ci-dessous les chromatogrammes en UV obtenus sont complexes (**Figure VI.9**), certaines espèces possédant des temps de rétention très proches. Une simple mesure de masse en mode *full scan* ne nous permet pas d'identifier tous les composés présents dans l'échantillon.

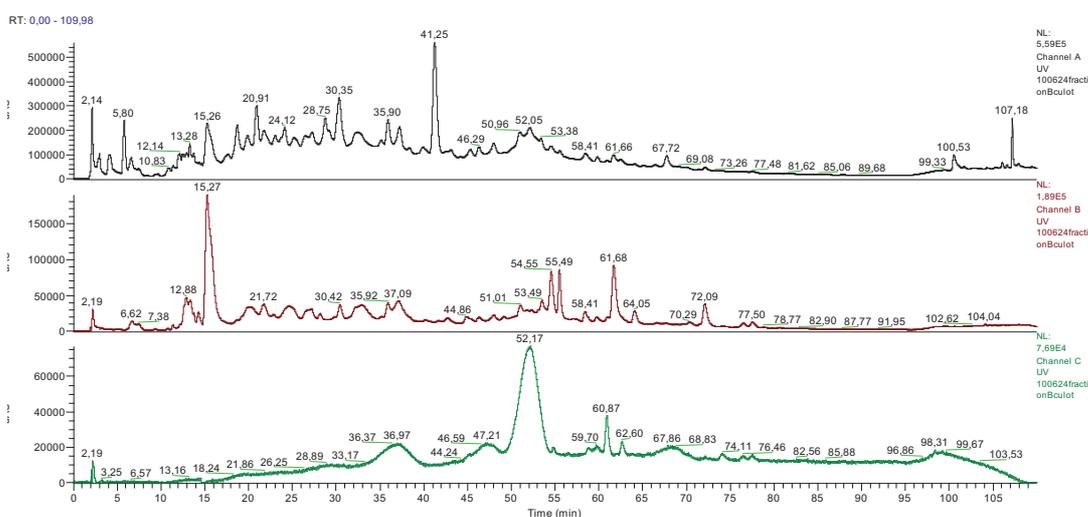


Figure VI.9 : Chromatogrammes d'absorbance (280, 350 et 520 nm) de la fraction contenant les flavanols et les flavonols avec un gradient de 110 minutes

Pour notre étude la fraction la plus intéressante est la fraction b, qui se révèle contenir effectivement les flavanols et autres polyphénols d'intérêt pour l'étude de l'astringence. Cette fraction est reprise et analysée en mode MS/MS automatique (sélection des ions précurseurs les plus intenses à l'aide du piège ionique) pour essayer d'identifier par exemple les dimères de tannins condensés. En effet, les composés qui nous intéressent le plus sont les dimères de tannins condensés B1, B2, B3 et B4, car ils sont connus pour être impliqués dans le phénomène d'astringence [21, 25, 26]. De plus, comme nous l'avons évoqué dans le chapitre IV, ces composés font partie des composés les plus affins pour le peptide IB7₁₄ d'après l'échelle d'affinité établie en phase gazeuse, et ces dimères n'ont pu être étudiés avec notre sonde peptidique (synthèse chimique en plusieurs étapes à rendement total faible). Une fois ces composés identifiés nous pourrions envisager de les collecter.

Effectivement, les dimères résultant de la polymérisation de la catéchine ou de l'épicatéchine sont identifiés dans la fraction b, sur la base de leurs spectres d'ions fragments (**Figure VI.10**).

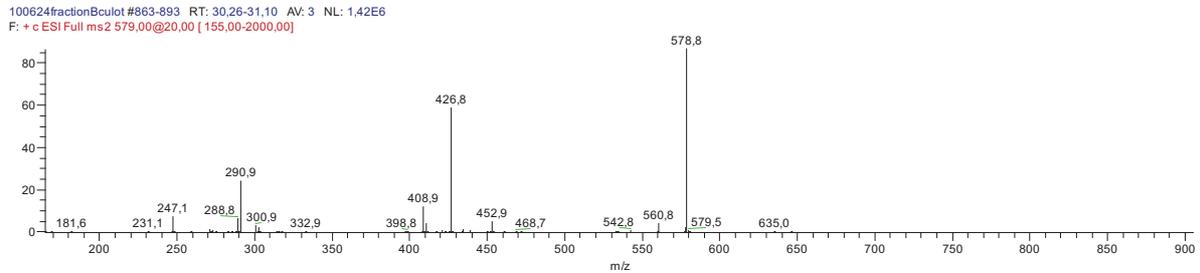
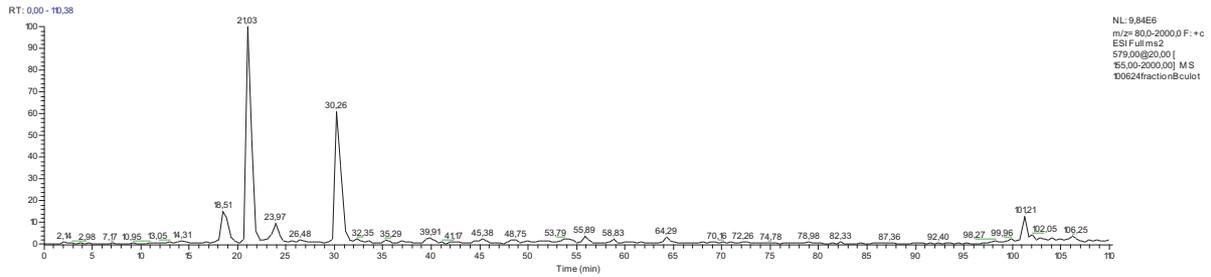


Figure VI.10 : Spectre MS/MS (mode positif) réalisé sur l'ion parent $m/z = 579$ Da correspondant à un dimère de tannins. On remarque d'après le chromatogramme quatre signaux distincts correspondant aux quatre dimères, sans pouvoir pour autant faire une attribution de structure précise pour chacun d'entre eux.

Le schéma ci-dessous présente les différentes fragmentations [27-29](Figure VI.11).

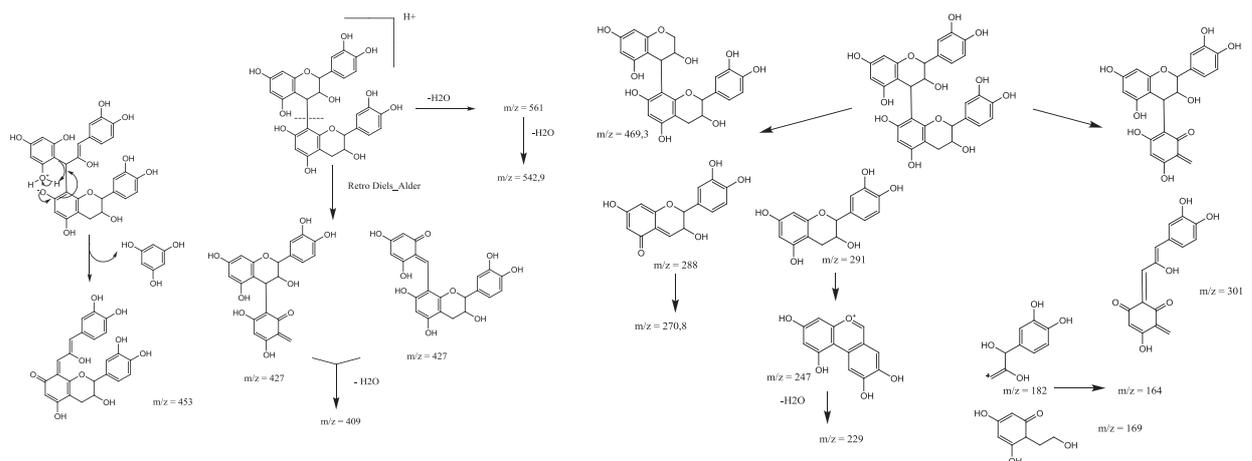


Figure VI.11 : Schéma de fragmentation d'un dimère. Au total quatorze fragments sont identifiés sur le spectre MS/MS (Figure VI.9).

En accord avec différentes publications, plusieurs polyphénols ont été identifiés dans la fraction b issue de la Sep-Pack : épicatechine, catéchine, dimères, trimères, quercétine, rutine.

A plus long terme, après avoir identifié tous les polyphénols présents dans cette fraction, une étape de récolte des composés pourra être mise en place, ce qui nous permettrait de disposer d'une palette complémentaire de composés phénoliques purs.

III. Conclusion générale et perspectives

Dans un premier temps, nous avons essayé de fractionner les protéines salivaires à l'aide de systèmes de coupures. Les différentes expériences réalisées ne nous ont pas permis d'atteindre notre objectif. Une étape de dilution et l'élimination de l'amylase des protéines salivaires n'ont pas permis de contourner le problème lié à l'utilisation des concentrateurs Vivaspin et Amicon. D'autres systèmes dotés de membranes différentes pourraient être envisagés, mais la chromatographie classique sur colonne d'exclusion par la taille serait peut-être la meilleure solution à mettre en œuvre. L'obtention de fractions bien délimitées en taille pourrait être exploitée pour la préparation de sondes à plus large spécificité que le peptide de PRP IB7₁₄.

Le fractionnement d'un vin rouge pour obtenir une fraction enrichie en flavanols et flavonols est facile à réaliser. L'obtention de polyphénols purifiés, et notamment d'oligomères à divers degrés de condensation, permettrait de compléter l'étude de l'affinité en phase liquide avec la sonde peptidique, de comparer les résultats à l'échelle établie en phase gazeuse, et d'affiner la connaissance des divers types d'interaction qui interviennent dans la formation des complexes entre protéines et polyphénols, pour tenter de mieux approcher les aspects moléculaires de l'astringence.

IV. Bibliographie

1. Oppenheim, F.G., & al., *Salivary Proteome and Its Genetic Polymorphisms*. Ann. NY. Acad. Sci., 2007. **1098**(1): p. 22-50.
2. Humphrey, S.P. and R.T. Williamson, *A review of saliva: Normal composition, flow, and function*. J. Prothet. Dent., 2001. **85**(2): p. 162-169.
3. Wilmarth, P.A., & al., *Two-Dimensional Liquid Chromatography Study of the Human Whole Saliva Proteome*. J. Proteome Res., 2004. **3**(5): p. 1017-1023.
4. Walz, A., et al., *Proteome analysis of glandular parotid and submandibular-sublingual saliva in comparison to whole human saliva by two-dimensional gel electrophoresis*. Proteomics, 2006. **6**(5): p. 1631-1639.
5. Hu, S., & al., *Large-scale identification of proteins in human salivary proteome by liquid chromatography/mass spectrometry and two-dimensional gel electrophoresis-mass spectrometry*. Proteomics, 2005. **5**(6): p. 1714-1728.
6. Hardt, M., & al., *Toward Defining the Human Parotid Gland Salivary Proteome and Peptidome: Identification and Characterization Using 2D SDS-PAGE, Ultrafiltration, HPLC, and Mass Spectrometry*. Biochemistry, 2005. **44**(8): p. 2885-2899.
7. Vitorino, R., et al., *Identification of human whole saliva protein components using proteomics*. Proteomics, 2004. **4**(4): p. 1109-1115.
8. Ghafouri, B., C. Tagesson, and M. Lindahl, *Mapping of proteins in human saliva using two-dimensional gel electrophoresis and peptide mass fingerprinting*. Proteomics, 2003. **3**(6): p. 1003-1015.
9. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding*. Anal. Chem., 1976. **72**: p. 248-254.
10. Gambuti, A., & al., *Evaluation of aglianico grape skin and seed polyphenol astringency by SDS-PAGE electrophoresis of salivary proteins after the binding reaction*. Food Chem., 2006. **97**(4): p. 614-620.
11. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**: p. 680-685.

12. Beeley, J.A., & al., *Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis of human parotid salivary proteins: Comparison of dansylation, Coomassie Blue R-250 and silver detection methods.* Electrophoresis, 1996. **17**(3): p. 505-506.
13. Canon, F., & al., *Characterization, stoichiometry, and stability of salivary protein-tannin complexes by ESI-MS and ESI-MS-MS.* Anal. Biol. Chem., 2009. **395**(8): p.2535-2545
14. Rademacher, T.W., & al, *Glycobiology.* Ann. Rev. Biochem, 1988. **57**: p. 785-838.
15. Quintana, M., & al., *Inter-individual variability of protein patterns in saliva of healthy adults.* J. Proteomics, 2009. **72**(5): p. 822-830.
16. Giusti, L., et al., *Proteome analysis of whole saliva: A new tool for rheumatic diseases - the example of Sjögren's syndrome.* Proteomics, 2007. **7**(10): p. 1634-1643.
17. Deutsch, O., & al., *An approach to remove alpha amylase for proteomic analysis of low abundance biomarkers in human saliva.* Electrophoresis, 2008. **29**(20): p. 4150-4157.
18. Abad-García, B., & al., *Optimization and validation of a methodology based on solvent extraction and liquid chromatography for the simultaneous determination of several polyphenolic families in fruit juices.* J. Chromatogr. A, 2007. **1154**(1-2): p. 87-96.
19. Haslam, E., *Natural Polyphenols (Vegetable Tannins) as Drugs: Possible Modes of Action.* J. Nat. Prod., 1996. **59**(2): p. 205-215.
20. Gawel, R., *Red wine astringency: A review.* Aust. J. Grape. Wine. R., 1998. **4**(2): p. 74-95.
21. Bate-Smith, E.C., *Haemanalysis of tannins: the concept of relative astringency.* Phytochemistry, 1973. **12**(4): p. 907-912.
22. Laaksonen, O., & al., *Chemical factors contributing to orosensory profiles of bilberry (Vaccinium myrtillus) fractions.* Eur. Food Res. Tech., 2010. **231**: p. 271-285.
23. Hufnagel, J.C., & al., *Orosensory-Directed Identification of Astringent Mouthfeel and Bitter-Tasting Compounds in Red Wine.* J. Agric. Food Chem., 2008. **56**(4): p. 1376-1386.
24. Revilla, E., & al, *Analysis of several phenolic compounds with potential antioxidant properties in grape extracts and wines by high-performance liquid chromatography–photodiode array detection without sample preparation.* J. Chromatogr. A, 2000. **881**: p. 461-469.
25. Plet, B., *La spectrométrie de masse dans l'étude de l'interaction entre protéines de la salive humaine et polyphénols. Vers une approche analytique de l'astringence du vin.* 2007, Université de Bordeaux I.
26. Simon, C., & al., *Three-Dimensional Structure and Dynamics of Wine Tannin-Saliva Protein Complexes. A Multitechnique Approach.* Biochemistry, 2003. **42**(35): p. 10385-10395.
27. Friedrich, A.W., & al., *Investigation of proanthocyanidins by HPLC with electrospray ionization mass spectrometry* Eur. Food Res. Tech., 2000. **211**: p. 56-64.
28. Cuyckens, F., & al., *Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids.* J. Mass Spectrom., 2004. **39**(1): p. 1-15.
29. Pati, S., & al., *Simultaneous separation and identification of oligomeric procyanidins and anthocyanin-derived pigments in raw red wine by HPLC-UV-ESI-MSn.* J. Mass Spectrom., 2006. **41**: p. 861-871.

CHAPITRE VII :

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Les composés phénoliques sont présents chez tous les végétaux, et ils jouent un rôle important dans les qualités sensorielles de nombreux aliments. Ces composés, qui sont à l'origine de la couleur des vins rouges et de leur caractère tannique, induisent la sensation d'astringence. Cette sensation résulte de la précipitation des composés phénoliques avec les protéines salivaires. L'astringence pouvant être considérée comme une qualité ou un défaut d'un vin rouge, il semble donc important pour la communauté œnologique de comprendre et de maîtriser ce phénomène. A l'heure actuelle, bien que les différentes interactions permettant la complexation des protéines de la salive et des composés phénoliques soient connues, il existe toujours un débat sur le mécanisme de complexation et sur l'importance relative des interactions qui gouvernent la formation des complexes. Au niveau moléculaire, l'étude de l'astringence est difficile, car les deux partenaires (le vin et la salive) impliqués dans cette sensation sont des milieux complexes. De plus, les acteurs participant au phénomène d'astringence n'ont pas tous été identifiés à ce jour.

Afin d'essayer de mieux comprendre les interactions entre les composés phénoliques et les protéines de la salive à l'échelle moléculaire, nous avons mis en place un modèle d'interaction simple. Ce modèle utilise d'une part un fragment de protéines riches en prolines, IB7₁₄, ayant fait l'objet de différentes études (RMN, DC, SM, Modélisation moléculaire), et d'autre part des polyphénols modèles.

Un travail préliminaire réalisé par B. Plet a permis d'établir une échelle d'affinité en phase gazeuse des polyphénols pour le peptide IB7₁₄, grâce à une méthodologie analytique basée sur la spectrométrie de masse résolue en énergie (ERMS). Cette méthodologie est donc une forme d'évaluation du caractère astringent d'un polyphénol à partir d'une l'échelle établie en phase gazeuse. Cette approche a confirmé le rôle majeur tenu par la formation de liaisons hydrogène dans la complexation des polyphénols par un fragment de PRP ou une PRP entière. Cependant cette méthodologie présente des inconvénients non négligeables :

- Les complexes IB7₁₄/polyphénols sont analysés en phase gazeuse ; les effets hydrophobes sont donc très affaiblis
- Cette méthode est plutôt limitée à l'analyse de polyphénols isolés, et donc peu adaptée aux mélanges naturels, complexes, de polyphénols.

Tenant compte de ces deux limitations, nous avons décidé de mettre en place deux stratégies pour tenter de mieux comprendre le phénomène d'astringence en nous approchant des conditions d'interaction en phase liquide. Notre modèle d'étude fait appel à deux types de sondes moléculaires immobilisées sur un support solide par greffage covalent : une sonde peptidique et une sonde polyphénolique, dans l'objectif d'isoler et d'identifier par spectrométrie de masse les composés qui présentent le plus d'affinité pour la sonde immobilisée. Cette stratégie d'interaction entre les composés phénoliques et le peptide IB7₁₄ est réalisée en phase liquide hydro alcoolique, mimant ainsi les conditions trouvées lors de la dégustation d'un vin rouge. Cette stratégie pourra être déclinée à des mélanges plus complexes de polyphénols et de salive humaine, pour au final être au plus près des « vraies » conditions de l'astringence.

Dans un premier temps, nous avons construit une sonde moléculaire en immobilisant le peptide IB7₁₄ sur des billes magnétiques. La réalisation de cette sonde, dite peptidique, n'a pas posé de difficulté particulière. Bien que deux points d'ancrage possibles sur le support existent (via le groupement N-terminal et la chaîne latérale de la Lysine 5), cette sonde s'est révélée fonctionnelle. Cependant, comme nous l'avons évoqué dans le chapitre IV, cet aspect du greffage, conjugué au manque d'information sur la densité de fonctions réactives en surface des billes, nous impose la contrainte stricte de travailler sur un même lot de sonde peptidique. Le comportement vis-à-vis de cette sonde de trois polyphénols (QR2, NN et Epi) permet de les classer suivant leur affinité. Les études sur un ou plusieurs polyphénols en mélange nous ont permis de constater qu'au sein d'une sélection de cinq composés QR2 est le composé le plus affiné pour la sonde peptidique, qu'il soit pris isolément ou en mélange. Ces résultats montrent que l'ordre d'affinité établi en phase gazeuse est respecté en phase liquide, ce qui confirme l'importance des sites donneurs de liaisons hydrogènes du peptide. Néanmoins, les écarts d'affinités observés en phase liquide sont sensiblement différents de ceux qui ont été trouvés en phase gazeuse. Ceci incline à penser que les effets hydrophobes peuvent intervenir de manière non négligeable dans l'interaction entre un peptide et un polyphénol en phase liquide. Ce point mérite d'être approfondi avec une sélection plus complète de polyphénols modèles, puis de polyphénols en mélanges issus de vins rouges, incluant des oligomères de tanins. Par ailleurs, les tentatives de dissociation des complexes établis entre des polyphénols et la sonde peptidique se sont avérées globalement infructueuses, confirmant le caractère quasi-indissociable de ces complexes, réputés capables de traverser le tractus intestinal.

Dans un second temps, nous avons construit, sur le même principe que la sonde peptidique, un outil moléculaire complémentaire, la sonde polyphénolique. Le greffage d'un polyphénol glycosylé sur des billes magnétiques fonctionnalisées a été obtenu en tirant parti d'une modification chimique des glycanes pour réaliser le greffage covalent. Cette sonde nous a permis d'observer la complexation du peptide IB7₁₄, et est donc opérationnelle. Cependant, comme dans le cas de la sonde peptidique, pour espérer établir des mesures d'affinité relative, il est impératif de travailler sur un même lot de sonde polyphénolique. De plus, cette approche est restreinte aux composés possédant un ou plusieurs sucres en périphérie du noyau flavane. Néanmoins, ce type de sonde polyphénolique a un bon potentiel pour cribler l'affinité des protéines salivaires envers certains polyphénols.

L'idée d'un crible des protéines salivaires était justifiée par le fait que nos études étaient restreintes au seul cas des PRP. Or, dans le mélange très complexe des protéines salivaires, d'autres protéines sont présentes en concentration importante, et notamment l'amylase (aux environs de 30%). De plus, lorsque l'ensemble des protéines salivaires est mis au contact d'un vin rouge, on constate qu'il n'y a pas de précipitation préférentielle de l'une ou l'autre classe de protéines, telles que PRP, cystatines ou encore histatines. L'effet de « transporteur » de l'amylase lors de cette précipitation pouvait éventuellement être mis en cause. Nous avons donc cherché à fractionner les protéines salivaires selon un critère de taille, permettant entre autres d'obtenir des fractions déplétées en amylase (qui a une masse aux environs de 50 kDa). Deux systèmes de séparation selon un critère

de taille par ultrafiltration se sont révélés totalement inopérants dans le cas de la salive. Par contre, la méthode ancienne utilisant la rétention de l'amylase par l'amidon a permis de caractériser des fractions de protéines salivaires déplétées en amylase et de constater que cette dernière n'avait pas d'influence sur la précipitation de ces protéines par un vin rouge (analyse par électrophorèse SDS-PAGE des fractions de protéines salivaires avant et après précipitation par un vin rouge). En conséquence, une sonde constituée par l'immobilisation d'un fragment de PRP est certes une représentation minimaliste des protéines salivaires, mais reste pertinente. Par ailleurs, au vu de ces résultats, nous pouvons conclure qu'une entreprise de criblage fin des protéines salivaires selon un critère d'affinité pour une sonde polyphénolique est une tâche longue et délicate, qui risque fort de produire peu de résultats qui soient de nature à faire progresser notre connaissance de l'astringence.

Le fractionnement des polyphénols réalisé sur un vin rouge offre sans doute des perspectives plus intéressantes. Un fractionnement rapide permet un enrichissement des tanins condensés. L'accès à ces oligomères, qui peuvent être purifiés de manière plus optimale par chromatographie en phase liquide, permettrait de tester leur affinité pour la sonde peptidique. Il serait ainsi possible d'enrichir les échelles d'affinité déjà élaborées et de disposer de données supplémentaires pour caractériser les forces principales impliquées dans l'interaction entre PRP et polyphénols. De plus, une sonde protéique simple (IB7₁₄ immobilisé sur billes magnétiques reste un bon modèle d'étude) ou complexe (immobilisation d'une fraction de protéines salivaires) doit permettre d'étudier des mélanges complexes de polyphénols et de les classer suivant leur caractère « astringent ». Il faudra pour cela disposer d'une source de billes magnétiques fonctionnalisées qui soit de qualité reproductible.

CHAPITRE VIII :

PARTIE EXPERIMENTALE

I. Synthèse peptidique sur support solide

I.1. Matériel

La synthèse peptidique a été réalisée à l'aide d'un synthétiseur semi-automatique Applied Biosystems 433A. La résine utilisée, les acides aminés, les activateurs HOBt et HBTU proviennent de chez Novabiochem. La pipéridine, l'anhydride acétique, le dichlorométhane, la DMF et la DIEA sont fournis par SDS (Peypin, France). La NMP a été achetée chez Accros (Geel, Belgique), le TFA chez Applied Biosystems, le méthanol et l'acétonitrile chez VWR, l'éther éthylique et l'acide acétique chez Fisher. L'azote provient de la société Air Liquide.

La résine utilisée pour la synthèse du peptide IB714 est préchargée avec l'acide C-Terminal est :

Fmoc-Gly-Wang Resin 100-200 Mesh à 0,63 mmol.g⁻¹, soit une masse de 158mg pour 0,1 mmol.

I.2. Synthèse

Les réactifs de synthèse qui sont délivrés par le synthétiseur grâce à des modules programmés pour l'ouverture de l'électrovanne sont préparés de la façon suivante :

Déprotection : 100% pipéridine

Capping : anhydride acétique/DIEA/HOBt (19 mL/9 mL/ 0,8 g) dans 400 mL de NMP

Activation : HBTU/HOBt (37,9 g/13,6 g) dans 200 mL de DMF

Couplage : 35% de DIEA dans NMP

Lavage : dichlorométhane et NMP

La stratégie FastMoc est programmée selon la méthode F_{As}tMoc-Ω-CondMonPrevPeak. L'échelle appliquée à cette stratégie est de 0,1 (acides aminés libres en excès de 10 fois par rapport à la résine).

I.3. Protocole post-synthèse : le clivage

Une fois le peptide synthétisé, la résine ainsi que les groupements protecteurs des chaînes latérales doivent être clivés. Le peptide lié à la résine est d'abord lavé sur un fritté de porosité 4 avec du DCM/ MeOH (1/ 1, v/ v), puis mis à sécher au dessiccateur. Le peptide est ensuite libéré du support solide par un mélange TFA/ Thioanisole/ Eau (95/ 3/ 2, v/ v) à 0°C. Le mélange est ensuite laissé sous agitation mécanique pendant 1h30 à température ambiante (l'agitation par un barreau magnétique pourrait casser la résine). La solution est ensuite filtrée sur un fritté de porosité 4, puis lavée avec quelques millilitres de TFA/ DCM (9/ 1, v/v), puis filtrée. Le filtrat est précipité dans 10 fois son volume d'éther froid. Le peptide est enfin filtré et solubilisé dans une solution d'acide acétique 5%, puis lyophilisé. Le rendement brut de la synthèse est de 59 % (soit 93 mg de peptide), ce qui équivaut à un rendement de 97% de greffage par acide aminé. Après purification par chromatographie liquide

et contrôle de pureté par spectrométrie de masse, le rendement total (synthèse + clivage + purification) est de 22 % (obtention de 35 mg de peptide).

I.4. Purification par HPLC

La colonne employée est de type semi-préparatif (greffage C18, particules de 15 μm et d'une porosité de 100 Å, 300 mm de long, 7,8 mm de diamètre interne). La purification du peptide est réalisée avec un gradient binaire avec comme solvants :

- Solvant A : Eau milliQ + 0,1 % TFA
- Solvant B : ACN + 0,1 % TFA

Le gradient de séparation est présenté ci-dessous :

Temps (minutes)	% A	% B
0	100	0
1	100	0
6	93	7
11	90	10
26	88	12
31	0	100
33	0	100
35	100	0
40	100	0

Tableau VII.1 : Gradient binaire pour la purification de IB7₁₄ en mode semi-préparatif

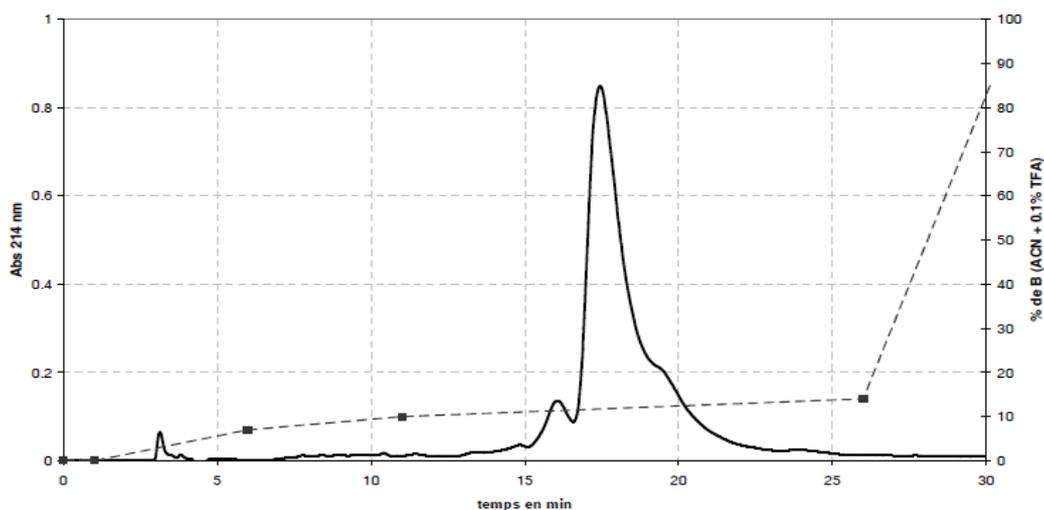


Figure VIII.1 : Chromatogramme du mélange brut de synthèse de IB7₁₄. Le gradient est figuré en pointillés.

II. Préparation de la sonde peptidique

II.1. Fonctionnalisation des billes magnétiques et immobilisation du peptide IB7₁₄

Les billes magnétiques utilisées proviennent de la société Ademtech (Pessac, France). L'activation des billes se fait en suivant le protocole proposé par Ademtech.

Les solutions tampons fournies, à savoir le Storage Buffer (SB) et l'Activation Buffer (AB), sont diluées dix fois dans de l'eau distillée. Les billes magnétiques sont resuspendues par vortex dans une solution à 1% de tampon AB (100 µL de billes + 200 µL de AB), et elles sont sédimentées grâce à un séparateur magnétique. Elles sont ensuite remises en suspension avec 200 µL de AB. Cette opération est répétée trois fois, à la fin les billes sont resuspendues dans 200µL de AB. Une solution à 4 mg/mL d'EDC dans le tampon AB est préparée, pour 1 mg de billes magnétiques engagées, 80 µL de cette solution d'EDC sont nécessaires. Le milieu est ensuite agité dix minutes à 37°C. Les billes sont sédimentées pour prélever 100 µL de surnageant pour l'analyse en UV.

Le peptide IB7₁₄ est mis en solution dans le tampon AB (30 µg à 150 µg pour 3 mg de billes). Le milieu est mis sous agitation pendant 2h à 37°C. Les billes sont sédimentées, le surnageant est prélevé pour déterminer le taux de peptide non greffé par mesure d'absorbance dans l'UV.

Afin de bloquer les groupements acides carboxyliques qui n'ont pas réagi avec le peptide, l'ensemble est incubé 30 min à 37°C sous agitation avec une solution de Tris dans AB (200 µL de Tris pour 100 µL de billes/protéines). Les billes sont lavées deux fois par la solution de SB diluée.

II.2. Mesure de l'absorbance en UV

Pour mesurer l'absorbance, des cellules en quartz d'une longueur de 1 mm sont utilisées. Le blanc est effectué dans une cellule remplie de solution AB utilisée lors de l'activation des billes. Le peptide IB7₁₄ dilué dans la solution AB est analysé. Connaissant la concentration du peptide et la longueur de la cuve, le coefficient d'extinction molaire est déterminé d'après la loi de Beer-Lambert :

$$\text{Abs} = C * l * \epsilon$$

C = concentration en mol/L

l = longueur de la cuve en cm

ε = coefficient d'extinction molaire

Pour une cuve de 1 cm l'absorbance obtenue est supérieure à 1, le système est saturé. Pour rester dans la gamme et obtenir le coefficient d'extinction molaire des cuves de 1 mm sont plus appropriées.

Les surnageants sont utilisés pour déterminer le taux de greffage du peptide sur les billes magnétiques.

Chapitre VIII : Partie expérimentale

II.3. Protocole de l'étude de l'interaction sonde peptidique/polyphénols

Avant utilisation, 3 mg de sonde peptidique sont lavés dix fois par 500 μL d'un mélange eau/éthanol (50/50) afin d'éliminer les réactifs utilisés lors de l'étape de greffage et d'éviter ainsi tout relargage de composés susceptibles d'interférer lors de l'analyse par spectrométrie de masse. Une expérience standard d'interaction engage 18 nmoles de peptide IB7₁₄ greffé et 6 nmoles de polyphénols purs. La quantité souhaitée de sonde peptidique (équivalente à 18 nmoles de peptide) est remise en suspension directement dans 173 μL de chaque solution de polyphénols (soit 6 nmoles de polyphénol).

Après 60 minutes d'agitation mécanique à 37°C, les billes sont isolées par centrifugation et le surnageant contenant les polyphénols non retenus par la sonde peptidique (polyphénols libres) est récupéré.

II.4. Calcul des valeurs d'« affinités »

A titre d'exemple, pour l'étude de l'interaction entre la sonde peptidique et NN, les données expérimentales de chaque expérience (avant et après interaction) sont présentées dans le tableau ci-dessous. Les intensités des pics de chacune des espèces reliées à NN sont extraites des deux spectres (présentés dans le chapitre IV) de masses obtenus (polyphénols totaux et non retenus).

	m/z	Intensités « total »		Totaux normalisés à 10000	Intensités « Non retenu »		Non retenus normalisés à 10000
standard	303	753467	753467	10000	907482	907482	10000
ion M+H	581	420684		5583,3	339654		3742,8
adduit Na	603	505232		6705,4	349517		3851,5
adduit K	619	283893		3767,8	346015		3812,9
2M +Na	1184	1401523		18601,0	615424		6781,7
2M+K	1199	849364		11272,7	1265624		13946,5
3M+Na	1763	31314		415,6	103852		1144,4
Fragment	273	148266		1967,8	144479		1592,1
Fragment	419	77585		1029,7	136683		1506,2
Fragment	435	27566		365,8	101841		1122,2
Fragment	891	207607		2755,3	344625		3797,6
Fragment	1470	130882		1737,1	167402		1844,7
NN				54201,7			43142,6

Tableau VIII.2 : Valeurs des intensités de pics correspondant à l'échantillon de NN total (avant interaction) et non retenu

A partir de ce tableau nous allons pouvoir déterminer l'affinité de NN pour la sonde peptidique, en calculant l'intensité de pic de NN dans l'échantillon total :

Intensité de pic NN totaux = Somme des intensités de pic des différentes formes reliées à NN observées dans l'échantillon de NN totaux (avant interaction)

Intensité de pic de NN totaux = Intensité de pic du monomère + Intensité de pic de l'adduit de sodium

Intensité de pic NN totaux = 54201,7 (total après normalisation à 10000)

Ainsi que l'intensité de pic de NN dans l'échantillon NN non retenu :

Intensité de pic de NN non retenus = Somme des intensités de pic des différentes formes reliées à NN observées dans l'échantillon de NN non retenus (avant interaction)

Intensité de pic de NN non retenus = Intensité de pic du monomère + Intensité de pic de l'adduit de sodium

Intensité de pic de NN non retenus = 43142,6 (total après normalisation à 10000)

L'intensité de pic de NN_{retenu} est déduite :

$$\begin{aligned} & (\text{Intensité de pic de NN}_{\text{totaux}} - \text{Intensité de pic de NN}_{\text{non retenus}}) \\ & = 54201,7 - 43142,6 \end{aligned}$$

Ainsi que l'affinité : $\frac{\sum I_{\text{retenus}}}{\sum I_{\text{totaux}}} * 100$
= 20%

II.5. Graphes de calibrations par LC/MS

Comme nous l'avons décrit dans le chapitre IV, des graphes de calibration ont été établis pour l'étude de la « désorption » des polyphénols en interaction avec notre sonde peptidique. Cet étalonnage est réalisé pour les mêmes sept rapports (quantité de polyphénol/quantité de standard interne) : 0,25, 0,5, 0,75, 1, 1,25, 1,5, et 1,75. Ces rapports correspondent à des quantités de polyphénols allant de 225 pmoles à 1575 pmoles (5 μ L) ajoutés à une quantité constante de quercétine (900 pmoles dans 5 μ L) pour un volume final de 10 μ L. Chaque analyse est répétée trois fois afin de vérifier la robustesse de la méthode et de garantir une meilleure fiabilité aux mesures. Pour toutes droites d'étalonnage les coefficients de corrélations sont supérieurs à 0,9.

III. Préparation de la sonde polyphénolique

III.1. Synthèse du polyphénol modifié

Dans un tube de 1,5 mL, 2,43 mg, soit 4,18 micromoles de NN (naringénine-7-O-nehesperidoside) sont introduits dans 220 μ L de méthanol. A cette solution est ajouté 1,3 équivalent de periodate de sodium (1,31 mg, 5,43 micromoles), dilué dans 200 μ L d'eau distillée. L'addition de periodate de sodium sur l'eau étant exothermique le milieu est plongé quelques minutes dans un bain de glace sous agitation. Ce mélange est additionné à NN dilué, et mis sous agitation pendant trois heures à température ambiante. Le milieu est ensuite extrait en ajoutant de l'acétate d'éthyle pour séparer les deux phases. La phase aqueuse est récupérée puis évaporée au Speed Vac. Le suivi de réaction se fait sur des plaques chromatographiques sur couche mince à

polarité inversée dans un mélange eau/méthanol 50/50. Le rapport frontal du composé formé est de 0,13 (distance parcourue par le composé/ distance parcourue par le solvant).

Le polyphénol modifié est ensuite analysé par couplage LC/MS, avec le gradient binaire eau/méthanol utilisé précédemment.

III.2 Fonctionnalisation des billes magnétiques et immobilisation du polyphénol modifié

La sonde modifiée par le polyphénol est synthétisée en deux étapes en solution. Les billes magnétiques utilisées proviennent de la société Ademtech. L'activation des billes magnétiques se fait selon un protocole adapté à partir de celui proposé par Ademtech, en utilisant les solutions tampons fournies, à savoir le Storage Buffer (SB) et l'Amino-activation Buffer (AB). Les billes magnétiques sont resuspendues par vortex dans une solution à 1% de tampon AB (100 μ L de billes + 200 μ L de AB). Les billes sont sédimentées grâce à un séparateur magnétique. Elles sont ensuite remises en suspension avec 200 μ L de AB. Cette opération est répétée trois fois. A la fin les billes sont amenées à sec. Une solution d'hydrure à 0,26 mg/mL de NaBH_3CN dans du méthanol est préparée. Pour 1 mg de billes magnétiques engagées, 150 μ L de solution d'hydrure sont nécessaires. Le polyphénol oxydé est dilué dans du méthanol à raison de 9mg/mL. L'hydrure et NN en solution sont ajoutés aux billes magnétiques. Le milieu est mis sous agitation pendant 2 heures à 37°C. Les billes sont sédimentées pour prélever le surnageant qui permettra de déterminer le taux de polyphénol non greffé (par spectrophotométrie UV). Afin de bloquer les groupements amines qui n'ont pas réagi avec le polyphénol ouvert, l'ensemble est incubé trente minutes à 37 °C sous agitation mécanique avec une solution de glycine dans AB (1,54 mg/mL). Les billes sont ensuite lavées deux fois par la solution de SB.

III.3. Mesure de l'absorbance

La méthode utilisée pour déterminer le rendement de réaction est la mesure d'absorbance (Nanodrop 1000). Cet appareil n'emploie pas de cellules en quartz. L'échantillon à analyser est directement en contact (2 μ L) avec un système optique, permettant d'obtenir la densité optique (absorbance) du composé. Le coefficient d'extinction molaire est déterminé d'après la loi de Beer-Lambert :

$$\text{Abs} = C * l * \epsilon$$

C = concentration en mol/L ; l = trajet optique de 1 cm ; ϵ = coefficient d'extinction molaire

Les composés à analyser sont en solution dans du méthanol, solvant fortement volatil. Les 2 μ l de solvant ne suffisent pas pour faire une mesure. Les mesures sont faites dans un mélange eau/méthanol 50/50 pour contourner le problème du méthanol seul. Le surnageant contenant le polyphénol modifié n'ayant pas réagi avec la sonde est analysé pour obtenir le rendement de greffage sur les billes magnétiques.

III.4. Calcul d' « affinité »

Les essais d'interaction et les analyses par spectrométrie de masse ont été réalisés avec les mêmes paramètres d'ionisation que ceux présentés dans le chapitre IV. Les spectres ci-dessous correspondent au peptide « total », (avant mise en contact avec la sonde) et non retenu.

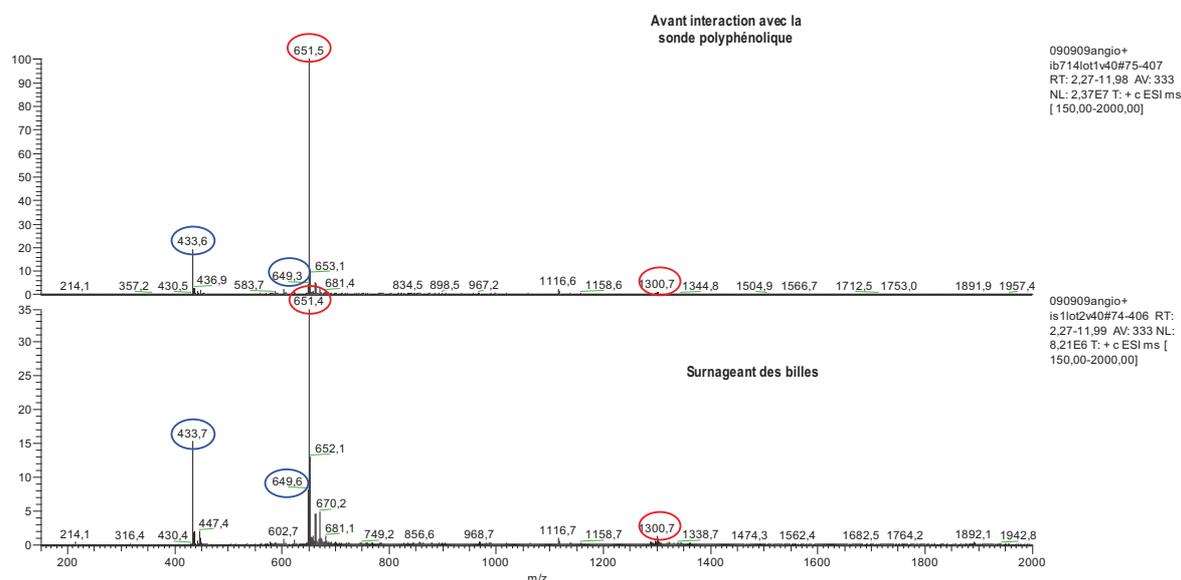


Figure VIII.2: Spectres de masse de l'échantillon total (avant interaction avec la sonde) et non retenu. Les espèces corrélées à l'Angiotensine sont entourées en bleu, celles du peptide en rouge.

Comme nous l'avons expliqué dans le chapitre V, l'affinité du peptide pour la sonde polyphénolique est calculée à partir des intensités des pics. Le tableau ci-dessous présente (fond rouge) les intensités de pics de chacune des espèces reliées à IB7₁₄ extraites des deux spectres précédents. En fond bleu sont présentées les intensités de pics des espèces reliées au standard interne (angiotensine I).

	Espèces observées	m/z	Echantillon total Courant lonique	Echantillon non retenu Courant lonique	C _{norm} = Coefficient de correction pour la normalisation	Echantillon non retenu CI normalisé
Angiotensine I	[M+3H] ³⁺	433,5	4524201	3640198		
	[M+2H] ²⁺	649,5	1066028	1946049		
	[M+H] ⁺	1296,8	116471	165020		
	Somme		5706700	5751267	0,99	5706700
IB7 ₁₄	[M+2H] ²⁺	651,4	23724857	8205665		
	[M+H] ⁺	1300,6	288789	305846		
	Somme		24013646	8511511	0.99	8445554

Tableau VIII.1 : Valeurs des intensités de pics des espèces corrélées à l'Angiotensine et à IB7₁₄ des échantillons « total » et « non retenu »

Il s'agit dans un premier temps de comparer la quantité de standard interne (Angiotensine I) observée dans les deux analyses indépendantes. Celle-ci est représentée par la somme des intensités de pics des espèces reliées à l'angiotensine I (formes mono, di et trichargées) soit :

$$\text{Intensité de pic}_{\text{monochargé}} + \text{Intensité de pic}_{\text{dichargé}} + \text{Intensité de pic}_{\text{trichargé}}$$

On obtient ainsi pour l'échantillon total (avant interaction avec la sonde) l'intensité de pic de l'Angiotensine « total » et pour l'échantillon non retenu par la sonde l'intensité de pic Angiotensine « non retenu ».

Cela justifie une étape nécessaire de normalisation. La normalisation, toujours menée en fonction de l'échantillon « total », passe par la détermination d'un coefficient de correction :

$$C_{\text{norm}} = \text{Intensité de pic Angiotensine « total »} / \text{Intensité de pic Angiotensine « non retenu »}.$$

Ce coefficient de correction sera utilisé pour corriger les quantités de peptide d'intérêt IB7₁₄ observées.

Dans un second temps il faut comparer les quantités d' IB7₁₄ observées dans ces deux mêmes analyses. Comme précédemment, la quantité d' IB7₁₄ est représentée par la somme des intensités de pic des espèces reliées à IB7₁₄ (formes mono et dichargées) soit :

$$\text{Intensité de pic}_{\text{monochargé}} + \text{Intensité de pic}_{\text{dichargé}}.$$

On obtient ainsi pour l'échantillon total (avant interaction avec la sonde) l'intensité de pic IB7₁₄ « total » et pour l'échantillon non retenu par la sonde l'intensité de pic IB7₁₄ « non retenu ».

L'intensité de pic IB7₁₄ « non retenu » est alors corrigée par le facteur de correction utilisé pour la normalisation :

$$\text{Intensité de pic de IB7}_{14} \text{ « non retenu » } \underline{\text{normalisé}} = \text{Intensité de pic IB7}_{14} \text{ « non retenu » } \times C_{\text{norm}}.$$

Il est alors possible de déduire la quantité d' IB7₁₄ « retenu » par la sonde polyphénolique NN

Intensité de pic IB7₁₄ «retenu » = (Intensité de pic de IB7₁₄ « total ») - (Intensité de pic de IB7₁₄ « non retenu » normalisé)

Il est alors possible d'exprimer ce résultat différemment, comme la part de peptide IB7₁₄ total effectivement retenue par la sonde que nous définissons comme une affinité :

$$\text{Affinité} = \text{Intensité de pic IB7}_{14} \text{ «retenu »} / \text{Intensité de pic IB7}_{14} \text{ « total »} \times 100$$

Selon cette démarche, les données présentées dans le tableau ci-dessus permettent de dégager :

Somme des Intensités de pic de l'Angiotensine « total » = (Intensité de pic_{monochargé} + Intensité de pic_{dichargé} + Intensité de pic_{trichargé}) «total » = 5706700

Somme des Intensité de pic de l'Angiotensine « non retenu » = (Intensité de pic_{monochargé} + Intensité de pic_{dichargé} + Intensité de pic_{trichargé}) « non retenu » = 5751267

Soit un coefficient de normalisation = Intensité de pic Angiotensine « total »/ Intensité de pic Angiotensine « non retenu » (5706700/5751267 = 0,99).

Ensuite on calcule les intensités de pic C d' IB7₁₄ (total et non retenu) :

$$\text{Intensité de pic IB7}_{14} \text{ total} = (\text{Intensité de pic}_{\text{monochargé}} + \text{Intensité de pic}_{\text{dichargé}}) \text{ «total »} = 24013646$$

Chapitre VIII : Partie expérimentale

Intensité de pic IB7₁₄ non retenu = (Intensité de pic monochargé + Intensité de pic dichargé) « non retenu » = 8511511

Ainsi que l'intensité de pic IB7₁₄ « non retenu » normalisé = (8511511*0,99)= 8445554

L'intensité de pic IB7₁₄ «retenu » est déduit :

Intensité de pic IB7₁₄ «retenu » = (Intensité de pic IB7₁₄ « total ») - (Intensité de pic IB7₁₄ « non retenu » normalisé)
= (24013646 - 8445554) = 15568092

L'« affinité » peut alors être exprimée :

Affinité sonde NN/IB714 = Intensité de pic IB7₁₄ «retenu » / Intensité de pic IB7₁₄ « total » x100

Affinité sonde NN/IB714 = (15568092/24013646)* 100

Affinité sonde NN/IB714 = 64,8 %

IV. Les protéines salivaires

IV.1. Dosage par la méthode de Bradford

Pour déterminer la concentration des protéines salivaires, on réalise dans un premier temps le graphe d'étalonnage pour la BSA (Bovine Serum Albumine) à différentes concentrations connues (mesure de la DO à 595 nm). La concentration de la solution de standard interne vaut 1,56 mg/mL

BSA en µg	0	0	7,8	15,6	23,4	31,2	39
BSA volume prélevé en µL	0	0	5	10	15	20	25
DO mesurée	0	0,017	0,28	0,51	0,69	0,89	1,07

Tableau VIII.4 : Valeurs des DO de la BSA pour différentes concentrations

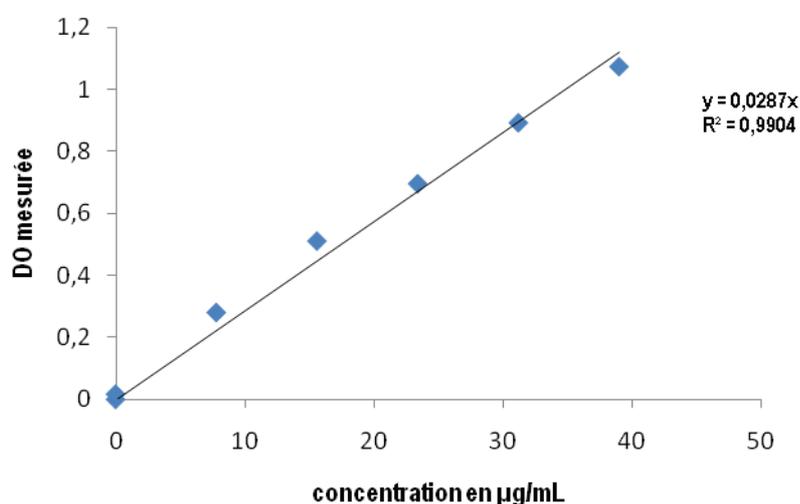


Figure VIII.3 : Droite d'étalonnage avec la BSA

Protéines salivaires en µL	5	5	5	10	10	10	20	20	20
DO mesurée	0,656	0,618	0,625	1,116	1,058	1,025	1,655	1,588	1,500

Tableau VIII.5 : Valeurs de la DO mesurée pour les protéines salivaires

On en déduit les concentrations en protéines salivaires pour les différents volumes. Les concentrations en protéines salivaires sont comprises entre 2,75 et 4,41 µg/µL, soit une concentration moyenne de 3,6 µg/µL.

IV.2. Electrophorèse SDS-PAGE

Les protéines salivaires, ainsi que les différentes fractions obtenues sont analysées sur gel d'électrophorèse de polyacrylamide en présence de SDS. Avant dépôt sur le gel, les échantillons sont repris dans une solution tampon « Laemmli 3X » (Tris-HCl 0,5M pH 6,7/SDS 2%/ β -mercaptoéthanol 2%/ glycérol 10%/ bleu de bromophénol 0,02%), puis chauffés à 95°C pendant cinq minutes. Pour les précipitations, le culot et le surnageant sont repris dans une solution tampon Laemmli 1X.

Les gels SDS-PAGE sont composés de deux couches distinctes :

- Le gel de migration (Tris-HCl 1.5 M pH 8,8 ; Acrylamide 30/Bisacrylamide 0,8 ; Glycérol 1,375g ; Eau milliQ)
- Le gel de concentration (Tris-HCl 0.5 M Ph 6,8 ; Acrylamide 30/ Bisacrylamide 0,8 ; Eau milliQ)

La polymérisation du gel est induite par l'addition de N,N,N',N'-tétraméthylethane-1,2-diamine (TEMED, catalyseur), en présence de persulfate d'ammonium ((NH₄)₂ (S₂O₈) 40mg/100 μ L eau milliQ, initiateur de la polymérisation.

Gel	Gel de concentration	Gel de migration 15%	Gel de migration 18 %
Acrylamide/Bisacrylamide (30/0,8)	1 mL	5 mL	6 mL
Tris HCl 1,5M pH 8,8		2,5 mL	2,5 mL
Tris HCl 0,5M pH 6,8	1,5 mL		
Glycérol		1,375 g	1,375 g
Eau milliQ	1,25 mL	1,4 mL	0,4 mL
TEMED	6 μ L	8 μ L	8 μ L
(NH ₄) ₂ (S ₂ O ₈)	9 μ L	12 μ L	12 μ L

Tableau VIII.6 : Conditions de préparations des gels électrophorèse 1D

Après migration, les protéines du gel sont révélées par une technique de coloration.

IV.3. Techniques de colorations

a) Coloration au Bleu de Coomassie R250

Pour ce type de coloration les gels sont d'abord repris dans un bain de fixation (Eau milliQ 50%/ EtOH 40%/ Acide acétique 10%) pendant une heure, puis colorés au Bleu de Coomassie pendant au moins deux heures.

Pour notre étude nous avons testé deux types de coloration au Bleu :

- 0,1% Bleu de Coomassie R250/ 25% MeOH/ 10% Acide acétique/ 65% eau milliQ
- 0,1% Bleu de Coomassie R250/ 50% EtOH/ 10% Acide acétique/ 40% eau milliQ

Les gels sont ensuite décolorés dans une solution Acide acétique 30%/Eau milliQ 70 % dans le cas de la coloration au MeOH, et dans une solution ne contenant que 10% acide acétique dans le cas de la coloration à l'EtOH.

b) Coloration à l'argent

Après migration, le gel SDS-PAGE est placé dans la solution de fixation (eau milliQ/ Ethanol/ Acide acétique, 50/40/10) pendant 30 minutes sous agitation. Après 5 minutes de lavage dans de l'eau milliQ, le gel est traité pendant 30 minutes sous agitation dans 125 mL d'une solution de sensibilisation (EtOH 37,5 mL/ Glutardialdéhyde 25 % 0,65 mL/ Thiosulfate de sodium 5% 5 mL/ Acétate de sodium 8,5 g/ eau milliQ, 125 mL). Le gel est ensuite rincé trois fois à l'eau milliQ, pour ensuite être traité 20 minutes avec la solution de nitrate d'argent (solution de AgNO₃ 2,5 % 12,5 mL, Formaldéhyde 37 % 50 µL/ Eau milliQ 125 mL). Le gel est ensuite repris dans une solution de développement (Carbonate de sodium 3,15 g/ Formaldéhyde 37 % 2,5% µL/ eau milliQ 125 mL). Suivant le développement des bandes, la fixation au nitrate d'argent varie entre deux et cinq minutes. La fixation à l'argent est stoppée par une solution contenant de l'EDTA (EDTA-Na₂ 2H₂O 1,8 g/ Eau MilliQ 125 mL) pendant dix minutes. Le gel est ensuite rincé trois fois dans de l'eau milliQ.

IV.4. Protocole des précipitations des protéines salivaires

Les échantillons de protéines salivaires sont mis en présence de vin rouge pour un même rapport de volume. Dans notre cas nous avons mélangé 15 µL de protéines salivaires avec 15 µL de vin rouge. Le mélange est centrifugé pendant 10 minutes, les surnageants sont éliminés et les culots sont déposés sur gel SDS-PAGE. Le même protocole est utilisé pour réaliser les contrôles protéines salivaires + eau milliQ.

IV.5. Protocole de l'élimination de l'amylase

Pour dépléter l'amylase des protéines salivaires, le protocole emploie de la fécule de pomme de terre (origine commerciale). Le protocole fait appel à une seringue de 1 mL dans laquelle est inséré un filtre de 0,45 µm, avant de la garnir avec l'adsorbant, soit 500 mg de fécule de pomme de terre. La fécule de pomme de terre est sédimentée avec 600 µL d'eau milliQ.

500 µL de protéines salivaires sont déposées sur le filtre. L'éluat récupéré à la sortie de la seringue contient les protéines salivaires déplétées en amylase. Deux lavages de 500 µL d'eau milliQ sont effectués pour récupérer toutes les protéines salivaires. L'amylase est éluée par 500 µL d'une solution contenant 10 % SDS/ 3% de mercaptoéthanol.

V. Paramètres utilisés en spectrométrie de masse pour l'identification des polyphénols

Dans un premier temps, les polyphénols fractionnés par Sep Pack sont analysés en infusion simple en mode MS et MS/MS (énergie de collision fixée à 30%, sélection manuelle des ions à fragmenter). Les paramètres d'analyse de l'appareil sont les mêmes que ceux utilisés dans les chapitres IV et V.

Source ESI	Mode positif
Gaz de nébulisation (u.a)	20
Gaz auxiliaire (u.a)	0
Tension de spray	4,5 kV
Température du capillaire de transfert	200 °C
Tension du capillaire de transfert	10 V
Lentille de tube	0

Tableau VIII.7 : Paramètres d'ionisation ESI en mode positif

Cette première analyse nous a permis de constater qu'une étape de séparation par chromatographie liquide était nécessaire pour identifier un maximum de polyphénols présents dans la fraction.

Lors des analyses réalisées en LC/MS une méthode utilisant de la MS/MS (énergie de collision 30%) en mode automatique (sélection des deux ions les plus intenses associée à une exclusion dynamique au bout de 1 minute), a été utilisée, permettant d'identifier certains polyphénols et notamment les dimères B1 à B4, caractérisés par des pics chromatographiques bien séparés (chapitre VI).

