

Université Victor Segalen Bordeaux 2

Année 2010

Thèse n°1703

THESE

pour le

DOCTORAT DE L'UNIVERSITE BORDEAUX 2

Mention Sciences Biologiques et Médicales

Option Œnologie et Ampélogie

Présentée et soutenue le 29 mars 2010 par

Grégory SCHMAUCH

Né le 28 Janvier 1982 à Metz

INTERACTIONS TANINS PROTEINES EN ŒNOLOGIE

Membres du jury

M. Victor. DE FREITAS, Professeur, Universidade do Porto..... Rapporteur, Président
M. Sylvain. GUYOT, Chargé de Recherche, INRA, le Rheu.....Rapporteur
M. Pierre-Louis TEISSEDRE, Professeur, Université Victor Segalen Bordeaux 2.....Examinateur
M. Hervé. THIS, Ingénieur de Recherche, INRA AgroParisTech, Paris.....Examinateur
Mme. Virginie. MOINE-LEDOUX, Directrice Scientifique, Laffort Œnologie.....Membre Invité
M. Cédric. SAUCIER, Professeur Associé, University of British Columbia.....Directeur

Remerciements

Je voudrais tout d'abord remercier Cédric Saucier, directeur de cette thèse, qui a accepté de me confier ce travail.

Je souhaite également remercier Pierre-Louis Teissedre, Professeur à la Faculté d'œnologie, Directeur du Laboratoire de Chimie Appliquée, de m'avoir accueilli dans son laboratoire, encouragé et soutenu.

Victor de Freitas m'a fait l'honneur d'être président du jury. Il a également été rapporteur de cette thèse, aux côtés de Sylvain Guyot. Je leur suis très reconnaissant d'avoir accepté cette tâche d'avoir permis d'améliorer la qualité de ce manuscrit, par leurs remarques pertinentes et leurs suggestions.

Hervé This, m'a fait la joie d'être également présent dans ce jury. En apportant une grande expertise et des remarques constructives, il a pris une part active à la qualité de ce manuscrit.

Je souhaite bien sûr remercier Jean François et Luc Laffort d'avoir soutenu cette thèse financièrement, mais également moralement. Je tiens à les remercier chaleureusement, ainsi que Phillipe Guillomet, pour leur accueil, leur confiance et leur sympathie durant ces trois ans de thèse.

Virginie Moine-Ledoux, Directrice scientifique chez Laffort Œnologie, m'a accompagné durant ces trois ans. Je la remercie pour ses nombreux conseils et encouragements ainsi que sa présence durant cette thèse.

D'une manière générale, je voudrais remercier l'ensemble des employés de Laffort Œnologie pour leur accueil et leur sympathie.

Je souhaite également remercier le Conseil Interprofessionnel des Vins de Bordeaux pour son soutien financier ainsi que l'Union des Producteurs de Saint-Emilion pour leur accueil.

Au cours de ce projet, j'ai pu profiter des conseils et de l'aide de Patrick Lucas et de Stéphanie Marchand, maîtres de conférences à la faculté d'œnologie. Je leur en suis extrêmement reconnaissant.

Un grand merci à mes stagiaires Clothilde, Nelly et Claire, qui ont apporté beaucoup d'aide mais aussi beaucoup de bonne humeur.

Au laboratoire, j'ai pu croiser Hélène, Julien, Mickael, Isabelle, Bénédicte et sans doute d'autres que j'oublie. Cela a toujours été très plaisant de travailler à leurs côtés, et je les en remercie. Bien sur, je pense aussi à Sandy et Kléopatra, avec qui nous avons partagé trois ans de thèse... A la faculté, je pense à Eric, Igor, Davide, Sophie mais aussi tous les autres thésards, l'équipe de Microflora et de Amarante Process.

Grâce à Armin, Geoffrey, Andréa, Guilherm et Damien, cette thèse restera réellement un très bon souvenir

Katharina a toujours été là pour me soutenir, me motiver et beaucoup plus encore. Merci !

Enfin, si un seul nom devait figurer ici, ce serait bien sur celui de Maria. Merci pour ton aide, tes remarques et tes conseils, ton incroyable efficacité dans les moments difficiles, ces situations totalement improbables "à la Maria", ces discussions sur la science et tous les bons moments.

Valorisation des Travaux de Recherche

COMMUNICATIONS ORALES

Tannin-protein interactions in relation to wine mouthfeel: Is there any specificity in tannin-protein interactions?

Grégory Schmauch, Pierre-Louis Teissedre, Cédric Saucier
Polyphenols 2010, Montpellier, 2010

Study of the interaction of four proteins and grape seed tanins by two complementary analytical methods

Grégory Schmauch, Pierre-Louis Teissedre, Cédric Saucier
In Vino Analytica Scientia, Angers, 2009

Etude des interactions tanins / protéines dans le raisin et le vin

Grégory Schmauch, Pierre-Louis Teissedre, Cédric Saucier
Journée Scientifique de l'Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé, 2009, Arcachon, France

Anthocyanins evolution and Wine Colour

Grégory Schmauch, Pierre-Louis Teissedre, Cédric Saucier
Vinitech 2009, Bordeaux, France

COMMUNICATIONS POSTERS

Bioavailability of wine polyphenols,

Grégory Schmauch, Agnese Taticchi, Michel Castroviejo, Pierre-Louis Teissedre and Cédric Saucier
Congrès Scientifique de l'OIV, Budapest, 2007

Grape seed tanins – Model proteins precipitation

Grégory Schmauch, Agnese Taticchi, Michel Castroviejo, Pierre-Louis Teissedre and Cédric Saucier
Oeno 2007, Bordeaux

The Non Stoichiometric tannin/Bovine Serum Albumin Interactions,

Grégory Schmauch, Pierre-Louis Teissedre and Cédric Saucier
Wine Active Compounds, Beaunes, 2008

A kinetic and stoichiometric approach of the tanins/bovine serum albumin interaction,

Grégory Schmauch, Pierre-Louis Teissedre and Cédric Saucier
Polyphenols, Salamanque, 2008

A kinetic and stoichiometric approach of the tanins/bovine serum albumin interaction,

Grégory Schmauch, Pierre-Louis Teissedre and Cédric Saucier
Macrowine, Montpellier 2008

A kinetic and stoichiometric study of the grape seed tanins/BSA interactions

Grégory Schmauch, Pierre-Louis Teissedre and Cédric Saucier
Congrès Scientifique de l'OIV, Zagreb, 2009

PUBLICATIONS

Kinetics and stoichiometry of grape seed tanins/BSA interactions

Grégory Schmauch, Clotilde Chamault, Pierre-Louis Teissedre and Cédric Saucier
Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin, in press

Grape variety effect on proanthocyanidin composition and sensory perception of skin and seed tannin extracts from bordeaux wine grapes (Cabernet Sauvignon and Merlot) for two consecutive vintages (2006 and 2007)

Kleopatra Chira.; Grégory Schmauch, Cédric Saucier, Sandy Fabre, Pierre-Louis Teissedre
Journal of Agricultural and Food Chemistry 57 (2), 545-553

The effect of micro-oxygenation on the color and anthocyanin related compounds of wines with different phenolic content.

Marta Cano-López, Francisco Pardo, Grégory Schmauch, Cédric Saucier, Pierre-Louis Teissedre, Lopez-Roca, Encarna Gomez-Plaza
Journal of Agricultural and Food Chemistry 56 (14), pp. 5932-5941

Sommaire

INTRODUCTION GENERALE	2
CHAPITRE I : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	4
I. LES TANINS	5
A. <i>Introduction</i>	5
B. <i>Classification des tanins</i>	8
C. <i>Les tanins condensés du vin</i>	13
II. LES PROTEINES DU VIN ET DE LA SALIVE	22
A. <i>Les protéines du vin rouge</i>	22
B. <i>Les protéines de la salive</i>	25
III. INTERACTIONS TANINS / PROTEINES.....	27
A. <i>Caractéristiques des protéines et des tanins</i>	28
B. <i>Conditions d'interactions</i>	32
C. <i>Mécanisme d'interaction</i>	37
IV. CONCLUSION.....	38
CHAPITRE II - MATERIEL ET METHODES	40
I. SOLVANTS ET REACTIFS.....	41
II. SOLUTION MODELE VIN.....	42
III. PURIFICATION ET CARACTERISATION DES TANINS DE PEPINS UTILISES	42
A. <i>Purification des tanins commerciaux</i>	42
B. <i>Caractérisation des tanins commerciaux</i>	42
IV. PROTOCOLE DE L'INTERACTION TANINS / PROTEINES POUR L'ETUDE A L'EQUILIBRE.....	47
A. <i>Principe de la technique utilisée</i>	47
B. <i>Préparation des échantillons</i>	47
C. <i>Centrifugation des échantillons et prélèvement du surnageant</i>	47
D. <i>Analyse par HPLC</i>	48
V. TURBIDIMETRIE.....	51
A. <i>Matériel utilisé</i>	51
B. <i>Protocole</i>	51

VI.	ANALYSE DES TANINS ET DES PROTEINES LORS DE LA DEGUSTATION.....	51
A.	<i>Prélèvement de salive</i>	51
B.	<i>Création d'une salive « moyenne »</i>	52
C.	<i>Dégustation « in vitro »</i>	52
VII.	ANALYSE DES TANINS ET DES PROTEINES LORS DE LA VINIFICATION.....	53
A.	<i>Microvinification</i>	53
B.	<i>Analyse des tanins du moût</i>	55
C.	<i>Analyse des protéines du moût</i>	56
CHAPITRE II : ETUDE DE L'INTERACTION TANINS CONDENSES / BSA.....		58
I.	INTRODUCTION.....	59
II.	ETUDE A L'EQUILIBRE	59
A.	<i>Influence du ratio tanin-protéine</i>	60
B.	<i>Influence de l'éthanol</i>	70
C.	<i>Influence du pH</i>	74
D.	<i>Etude à l'équilibre: conclusion</i>	81
III.	ETUDE CINETIQUE.....	82
A.	<i>Préambule : Interprétation des résultats de turbidimétrie</i>	82
B.	<i>Influence du ratio tanins / BSA</i>	84
C.	<i>Influence du pourcentage d'éthanol</i>	93
D.	<i>Influence du pH</i>	97
E.	<i>Etude cinétique: conclusion</i>	100
IV.	INTERACTION TANIN PROTEINE: PROPOSITION D'UN MODELE.....	101
CHAPITRE III - SUIVI DES TANINS ET DES PROTEINES DURANT LA VINIFICATION ET LA DEGUSTATION :		
VISUALISATION DE LEUR INTERACTION.....		104
I.	INTRODUCTION.....	105
II.	LES PROTEINES DU VIN ROUGE.....	106
III.	DU RAISIN AU VIN : SUIVI DES INTERACTIONS TANINS / PROTEINES LORS DE LA VINIFICATION	107
A.	<i>Suivi des protéines</i>	107
B.	<i>Suivi des tanins</i>	109
IV.	TANINS ET PROTEINES SALIVAIRES : SUIVI DE L'INTERACTION LORS DE LA DEGUSTATION.....	111
A.	<i>Détermination du ratio vin / salive lors de la dégustation</i>	111
B.	<i>Suivi de l'interaction par HPLC</i>	111
C.	<i>Suivi de l'interaction par gel 2D</i>	116
D.	<i>Interactions tanins / salive : discussion</i>	121
E.	<i>Vers un test d'astringence ?</i>	122
V.	CONCLUSION.....	124

CONCLUSION GENERALE	126
PERSPECTIVES	128
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	130
LISTE DES ABREVIATIONS	160

Liste des Figures

Figure 1: Classification des polyphénols selon la structure du squelette de base	6
Figure 2: Classement des polyphénols du vin en flavonoïdes et non-flavonoïdes	- 7 -
Figure 3 : Les principaux phlorotanins.....	8
Figure 4 : Les principaux gallotanins	9
Figure 5: Ellagitanins	10
Figure 6: Accutissimine A	10
Figure 7 : Structure générale des proanthocyanidines de raisin	11
Figure 8 : Monomères de flavan-3-ol trouvés dans le raisin	14
Figure 9 : Réactivité des noyaux flavanols	16
Figure 10 : Sites possibles pour la chélation des métaux par les tanins	19
Figure 11 : Evolution des flavanols dans le vin	20
Figure 12 : les rôles principaux de la salive en relation avec ses constituants	25
Figure 13 : Pourcentages approximatifs des principales classes de protéines salivaires	27
Figure 14: Différents modes d'action possibles des polysaccharides sur les complexes tanins / protéines	37
Figure 15 : Les différents mécanismes de réaction	38
Figure 16 : Séparation des tanins commerciaux par taille moléculaire	43
Figure 17 : Chromatogramme illustratif de la séparation des unités terminales et des adduits des tanins commerciaux après phloroglucinolyse.....	46
Figure 18: chromatogramme représentatif de l'analyse du surnageant de l'interaction entre l'extrait de tanins de pépins et la protéine.	49
Figure 19 : Correspondance entre l'aire du pic de tanin et la valeur de l'indice de Folin-Ciocalteu obtenus pour une même quantité de tanins.	50
Figure 20: Suivi de la densité lors des microvinifications	54
Figure 21: Chromatogramme obtenu lors de l'analyse des moûts par phloroglucynolise.	55
Figure 22 : Pourcentage de BSA précipitée lorsque 37,5 μ M de BSA sont mis en contact avec différentes quantités de tanins.....	60
Figure 23 : Pourcentage de BSA précipitée lorsque différentes quantités de BSA réagissent avec les tanins.	61
Figure 24 : Quantité de tanins précipités par 75 μ M de BSA selon la quantité de tanins ajouté.....	61
Figure 25 : Pourcentage de tanins précipités par différentes quantités de BSA	61
Figure 26 : Quantité de BSA précipitée en fonction de la quantité de BSA ajoutée à différentes concentrations de tanins. La concentration [BSA]* est indiquée par un astérisque pour chaque concentration en tanin.	63
Figure 27 : Quantité de tanins précipités lorsque la concentration en BSA augmente.....	64

Figure 28 : Ratio tanin/protéine dans le précipité (T/P) en fonction du ratio tanin / protéine initial.....	65
Figure 29: Décomposition de l'isotherme de Scatchard correspondante à l'adsorption des tanins sur la BSA.....	67
Figure 30 : Isothermes d'adsorption de Scatchard selon les conditions d'interaction.....	69
Figure 31 : Influence de l'éthanol sur le profil de précipitation de la BSA par les tanins.	70
Figure 32 : Profil de précipitation des tanins à différents pourcentages d'éthanol..	71
Figure 33 : Quantité de tanins précipités selon le pourcentage d'éthanol	71
Figure 34: Evolution de la stoechiométrie avec le pourcentage d'éthanol.....	72
Figure 35 : Aire du pic de protéine (base 100) selon la quantité de tanins ajoutés pour les différents pH.....	75
Figure 36: Protéines ayant réagi avec les tanins à différents pH.....	76
Figure 37: Quantités de tanins ayant réagi avec 15 μM de BSA selon le pH.....	76
Figure 38: Pourcentage de tanins ayant réagi avec 15 μM de BSA selon le pH	76
Figure 39: Quantités de tanins formant des complexes solubles selon la quantité initiale à différents pH.....	77
Figure 40: Pourcentage de tanins formant des complexes solubles	77
Figure 41: Stoechiométrie dans le précipité selon le pH.....	78
Figure 42: Stoechiométrie dans le précipité selon le pH.....	78
Figure 43: Espèces présentes aux différents pH utilisés lors des interactions tanins / BSA	79
Figure 44: Représentation des diverses formes de la BSA ³¹⁹	79
Figure 45: Evolution du trouble avec le temps.....	82
Figure 46: Trouble formé par des tanins et de la BSA. Comportement courant (gauche) et initial (droite).	83
Figure 47: Trouble final selon la concentration initiale en tanins. L'astérisque indique la concentration T*.	85
Figure 48: Aggrégats correspondants aux différents troubles observés, selon Siebert et al.....	85
Figure 49 : Vitesse de développement du trouble selon la concentration en tanin.....	86
Figure 50 : Trouble formé entre les tanins (5g/L) et la BSA (15 μM)	87
Figure 51: Vitesse initiale de développement du trouble selon la quantité de tanin initiale.	88
Figure 52: Détermination de l'ordre cinétique partiel par rapport aux tanins.....	89
Figure 53: Valeur de b° , représentant le trouble à l'instant $t=0$	89
Figure 54 : Trouble maximal formé par différentes quantité de tanins et de BSA.....	90
Figure 55 : Vitesse de développement du trouble pour 1,5, 15 et 150 μM de BSA	91
Figure 56: Vitesse initiale de développement du trouble pour 1,5, 15 et 150 μM de BSA	93
Figure 57: Evolution au cours du temps du trouble selon le pourcentage d'éthanol.	94
Figure 58: Trouble final entre les tanins et la BSA (15 μM) selon le pourcentage d'éthanol.....	95
Figure 59: Influence du pourcentage d'éthanol sur le trouble final entre 700 mg/L de tanins et 1g/l de BSA.	95
Figure 60: Evolution de la vitesse de réaction entre les tanins et la BSA à 20%	95
Figure 61: Influence de l'éthanol sur la vitesse de développement du trouble entre les tanins à la BSA.....	95
Figure 62: Influence de l'éthanol sur la formation du trouble au cours du temps.....	96
Figure 63: influence du pH sur le trouble final entre les tanins et la BSA (15 μM).....	98
Figure 64: Influence du pH sur la vitesse de développement du trouble selon la concentration initiale en tanin..	98
Figure 65: Influence du pH sur la vitesse initiale de développement du trouble.....	99
Figure 66 : Valeur de b° , représentant le trouble à l'instant $t=0$	100
Figure 67 : Schéma illustratif de l'interaction entre la BSA et les tanins condensés en milieu vin	103

Figure 68: Gels 2D d'un vin contaminé.....	106
Figure 69: Détermination de la limite de détection de la BSA dans du vin par gels 1D.	106
Figure 70: Suivi de la concentration en protéine dans le moût par HPLC.	108
Figure 71 : Gels 1D de protéines de la pulpe et du moût.	108
Figure 72: Suivi de la concentration en tannin pour les cuves témoins et tanisées.	110
Figure 73: Suivi du DPM des tanins.....	110
Figure 74: Suivi du pourcentage d'unité gallate pour les cuves témoins et tanisées.....	111
Figure 75: Pic de salive obtenu en HPLC (230 nm).....	112
Figure 76: Calibration de la salive par HPLC	112
Figure 77 : Pic obtenu lors l'analyse de vin par HPLC (280 nm).....	113
Figure 78 : Calibration de l'analyse de vin par HPLC.....	113
Figure 79: chromatogramme du surnageant résultant de l'interaction tanins / salive	113
Figure 80: Titration de la salive par les tanins par HPLC	114
Figure 81: Stœchiométrie de l'interaction tanin / salive	114
Figure 82: chromatogramme du surnageant résultant de l'interaction vin / salive (vin dilué au 1/100e).....	116
Figure 83: Suivi de la titration de la salive par du vin à différentes dilutions	116
Figure 84: Gels2D de salive obtenus à partir de 25 mL de solution vin additionnés de salive	117
Figure 85 : Gels 2D des protéines des salives n'ayant pas précipité.....	118
Figure 86 : Quantité de tanins nécessaires pour faire précipiter 15 µM de protéine	120

Liste des Tableaux

Tableau 1 : Quantités de tanins condensés dans certains aliments.....	12
Tableau 2 : Caractéristiques des tanins de pépins et de pellicules	15
Tableau 3 : Concentration en mg/L de monomères, dimères et tanins dans des vins.....	16
Tableau 4 : Protéines utilisées.....	41
Tableau 5 : Conditions d'analyse des tanins commerciaux par LC en phase normale.....	43
Tableau 6 : Composés formés lors de la réaction de phloroglucinolyse.	44
Tableau 7: Conditions chromatographiques.....	45
Tableau 8 : Caractérisation des tanins commerciaux par phloroglucinolyse.....	46
Tableau 9: Conditions de l'analyse des tanins et des protéines du surnageant.	48
Tableau 10: Propriétés des courbes de calibrationsdes tanins.....	49
Tableau 11: Propriétés des courbes de calibration des protéines	50
Tableau 12: Composés de phloroglucynolise.....	56
Tableau 13 : Intervalle de concentration en tanin auquel appartient [T]*	61
Tableau 14 : Valeurs de force ionique selon le pH	81
Tableau 15: Valeurs du trouble final, $A_{T,P}$ et $B_{T,P}$	84
Tableau 16 : Valeurs de a° , b°	87
Tableau 17 : Valeurs du trouble final, $A_{T,P}$ et $B_{T,P}$	97
Tableau 18 : Comparaison entre ratio expérimental et théorique dans le précipité.....	115
Tableau 19 : Caractéristiques des protéines étudiées	120

Introduction générale

"L'harmonie et l'équilibre en bouche sont les signes d'un bon vin, mais ce sont les tanins qui déterminent les grands vins". Cette citation d'Emile Peynaud résume toute l'importance des tanins dans la dégustation, mais également dans le vin et l'œnologie en général, puisque le profil que les tanins donneront au vin quelques mois, quelques années, quelques décennies plus tard se dessine dès la mise en cuve des grappes. Mais ce parcours qui les mène du raisin à la bouche est semé d'obstacles, le plus important étant peut-être la présence de protéines. Par définition, les tanins sont en effet des polyphénols ayant la capacité de précipiter les protéines.

Au cours de la vinification, les occasions pour les tanins de réagir avec les protéines sont nombreuses et ce dès le début de l'extraction des composés de la baie, parmi lesquels figurent tanins et protéines. Ce sont ensuite les protéines des levures, introduites pendant la fermentation alcoolique, puis les produits de collage utilisés pour la clarification du vin. Pendant ce temps, les conditions du milieu évoluent, le degré alcoolique et le pH particulièrement. Lors de la dégustation, ce sont les protéines de la salive qui piègent les tanins, provoquant la sensation bien connue d'astringence. Une fois passée cette barrière, les tanins se retrouvent alors dans l'organisme où ils peuvent révéler d'autres propriétés, notamment antioxydantes.

Mais alors, quels sont les facteurs importants dans l'interaction tanins / protéines? Et comment agissent-ils? Quels sont les mécanismes de l'interaction?

Le but de cette étude est d'essayer de répondre à ces questions en tentant d'apporter des éléments clés du mécanisme d'interaction entre les tanins et les protéines, à travers une étude fondamentale et un suivi en conditions réelles pendant la vinification.

Dans une première partie, la place des tanins condensés du vin rouge au sein de la famille des polyphénols, leur structure chimique et leur réactivité dans la thématique œnologique

permettent d'apprécier l'importance de ces composés dans le vin. Les protéines susceptibles d'interagir avec les tanins, à savoir celles du vin et de la salive sont ensuite présentées dans leur contexte. Enfin, la complexité des interactions entre les tanins et les protéines ressort de l'étude des différents aspects de ce phénomène.

Le matériel ainsi que les méthodes utilisées sont détaillées dans le deuxième chapitre

L'impact des principaux facteurs entrant en compte dans l'interaction tanin / protéine est ensuite présentée au chapitre trois. Pour cela, les caractéristiques cinétiques et stoechiométriques de l'interaction sont d'abord dégagées de l'étude entre de la BSA, utilisée comme protéine modèle, et des tanins de raisin à l'aide de différents outils analytiques. L'influence sur ces caractéristiques de l'éthanol et du pH est alors étudiée pour comprendre le rôle joué par les différentes forces intermoléculaires. Un mécanisme d'interaction entre la BSA et les tanins condensés dans les conditions du vin peut ainsi être proposé.

Le chapitre quatre concerne le suivi des interactions entre les tanins et les protéines depuis la mise en cuve du raisin jusqu'à la dégustation. La composition du moût en tanins et protéines au cours de la vinification est étudiée, ainsi que l'influence du tanisage, pratique œnologique extrêmement répandue, sur cette composition. Les résultats obtenus permettent de préciser la façon dont les protéines disparaissent du moût. La réaction entre le vin et la salive est ensuite analysée pour qualifier et quantifier la précipitation des protéines salivaires. C'est alors l'occasion de discuter ces résultats en termes d'astringence et de proposer un test pour la prédire.

Chapitre I : Etude Bibliographique

I. Les tanins

A. Introduction

1. Origine du mot « tanin »

Issu du radical gaulois tann (chêne), le mot tan désigne l'écorce de chêne moulue utilisée pour le tannage végétal. Il est à l'origine du mot tanin¹, « substance amorphe très répandue dans le bois, l'écorce, les feuilles et/ou les racines de nombreux végétaux, apte à transformer la peau en cuir »¹.

En effet, le tannage des peaux, apparu -7000 et -3000 en Asie du sud et toujours d'actualité, consiste à traiter des peaux fraîches avec des extraits végétaux ou des métaux qui jouent le même rôle : en complexant le collagène de la peau, ils conduisent à sa précipitation, rendant les peaux imputrescibles.

Une étape importante de la recherche sur les tanins est franchie en 1920 lorsque Freudenberg les sépare en deux grandes classes, hydrolysables et non hydrolysables². A partir de 1945 apparaissent de nouveaux thèmes de recherches qui ne sont plus reliés exclusivement au tannage du cuir³, principalement dans les travaux de Bate-Smith⁴⁻⁹, qui définit les tanins comme des polyphénols solubles capables de précipiter les protéines.

2. Les polyphénols

a) Les polyphénols : généralités

Caractérisés par la présence d'un ou plusieurs cycles aromatiques comportant des groupements hydroxyles, les polyphénols sont les métabolites secondaires les plus répandus parmi les végétaux¹⁰. A ce jour plus de 8000 structures différentes sont connues dont plusieurs centaines au sein des seuls végétaux comestibles¹¹.

Du fait de cette abondance, leur classement n'est pas aisé et peut varier selon les publications. Certains dénombrent 9 familles en se basant sur les squelettes de bases (C6-C1, C6-C2, C6-C3, C6-C4, C6-C1-C6, C6-C2-C6, C6-C3-C6)¹² (figure 1), tandis que d'autres considèrent que 5 familles suffisent pour les expliquer en totalité¹¹ : les acides hydroxybenzoïques, les acides hydroxycinnamiques, les stilbènes, les flavonoïdes, les lignanes.

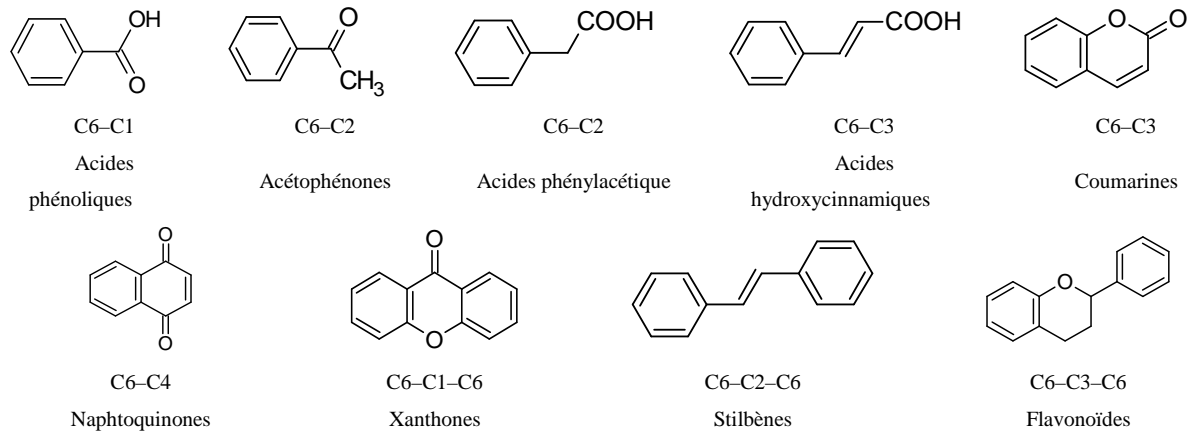


Figure 1: Classification des polyphénols selon la structure du squelette de base¹²

b) Polyphénols et vin

Les polyphénols contenus dans le vin sont généralement classés en flavonoïdes (représentés dans la figure 1) et non-flavonoïdes. On trouve ainsi les stilbènes et les acides phénols (non-flavonoïdes) d'une part, les flavones, flavonols, flavan-3-ols et anthocyanes (flavonoïdes) d'autre part. La figure 2 présente les polyphénols du vin selon cette classification.

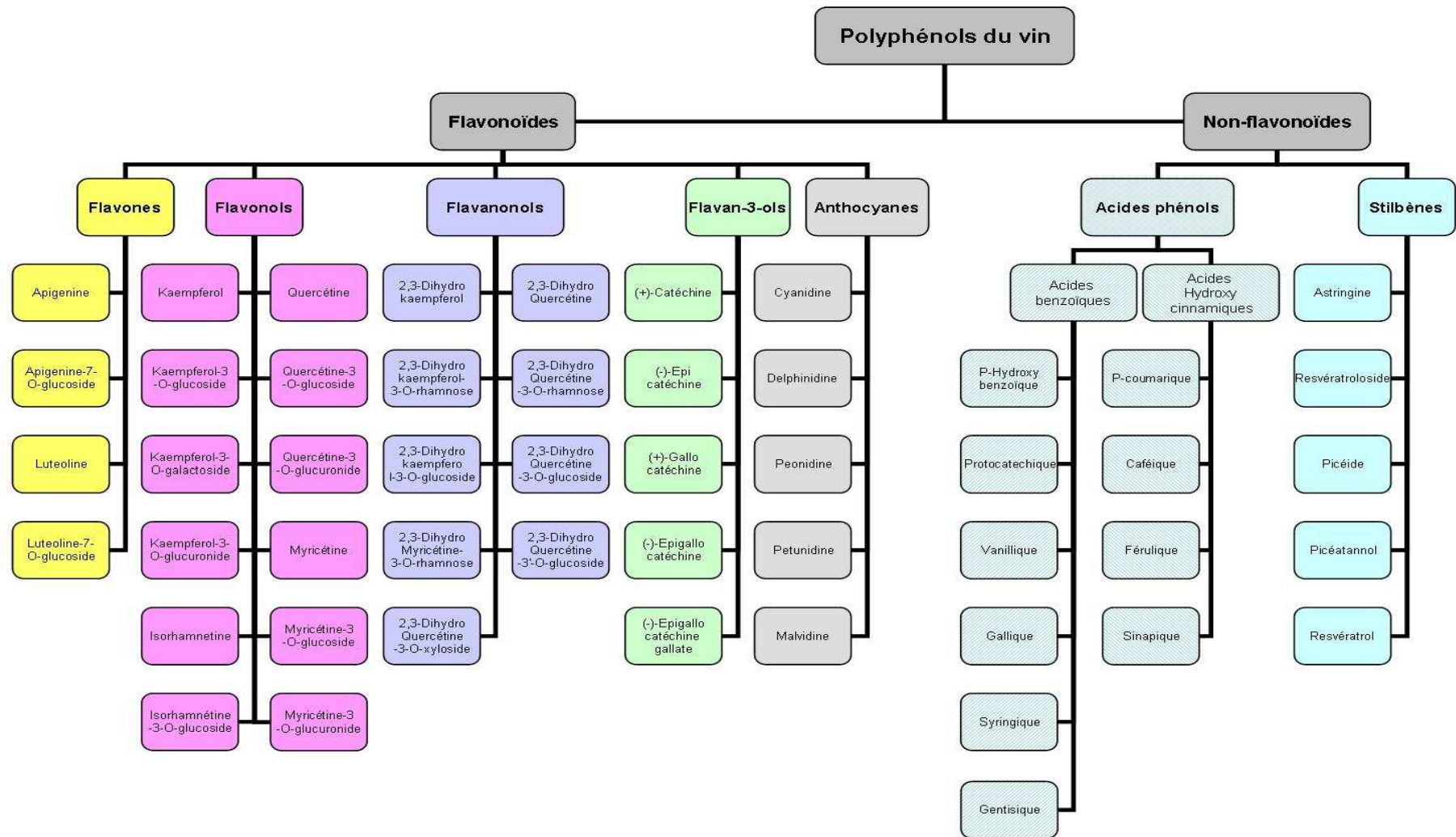


Figure 2: Classement des polyphénols du vin en flavonoïdes et non-flavonoïdes

B. Classification des tanins

Il existe cinq grandes catégories de tanins. Aux quatre sortes connues et intensivement étudiées (ellagitanins et gallotanins, qui font partie des tanins hydrolysables, tanins condensés et tanins complexes)¹³, s'est ajoutée récemment une famille supplémentaire, les phlorotanins (le premier travail les concernant est paru en 1977¹⁴).

1. Phlorotanins

Les phlorotanins sont des oligomères ou polymères d'unités dérivées du phloroglucinol dont la différenciation s'effectue sur la base de la nature des liaisons inter-monomères et des profils de substitution de ces derniers. Tandis que les fucols sont liés par des liaisons aryl-aryl, les phloréthols, hydroxyphloréthols et fuhalols sont liés par des liaisons éther et les fucophloréthols par les deux précédents types de liaison¹⁵.

Les phlorotanins se trouvent exclusivement dans les algues brunes, comme *Bifurcaria*, *Carpophyllum*, *Cystophora*, *Cystoseira*, *Eisenia*, *Fucus* et *Sargassum spp*¹⁶.

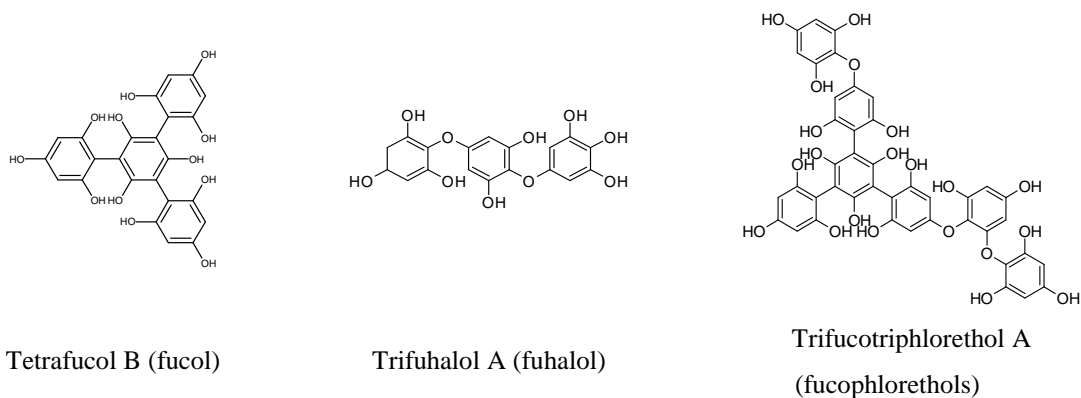


Figure 3 : Les principaux phlorotanins

2. Tanins hydrolysables

Les tanins hydrolysables doivent leur nom à leur capacité de libérer sous hydrolyse acide l'acide gallique (gallotanin) ou l'acide ellagique (ellagitanins). Ils sont produits par des arbres et plantes comme le sumac, l'acacia, le chêne, le châtaignier ou le terminalia¹⁷.

a) *Gallotanins*

Les gallotanins (présentés en figure 4) résultent de la combinaison d'un acide gallique et d'un polyol [D-glucose dans la plupart des cas¹³] dont les fonctions hydroxyles peuvent être substituées par un ou plusieurs groupements galliques.

Présents dans de nombreuses espèces végétales, le TGG (2,3,4,6-tetra-*O*-galloyl-D-glucopyranose) et le β -PGG (1,2,3,4,6-penta-*O*-galloyl- β -D-glucopyranose) peuvent être considérés comme les gallotanins les plus importants : ce sont les composés de bases pour la synthèse de quasiment tous les tanins hydrolysables¹³.

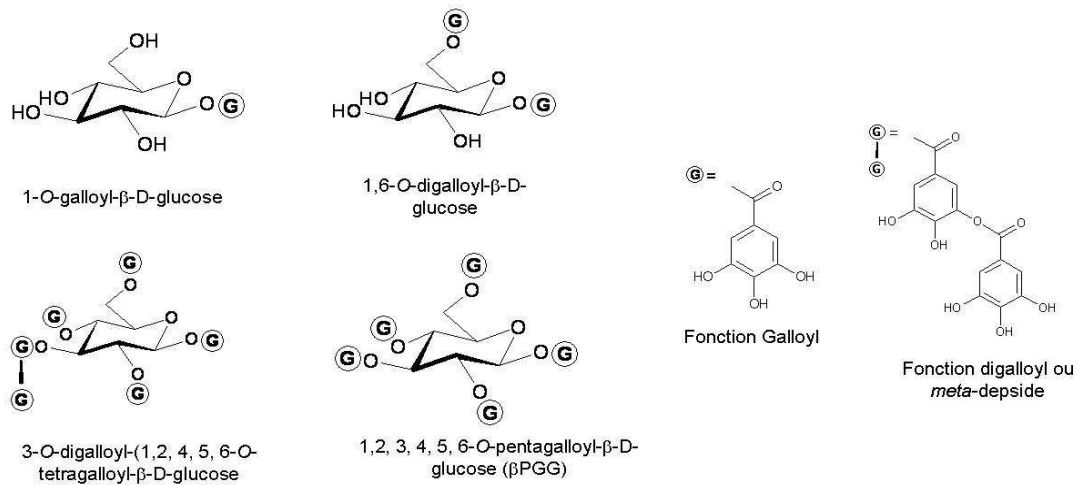


Figure 4 : les principaux gallotanins

b) *Ellagitanins*

Les ellagitanins (présentés en figure 5) proviennent du couplage oxydatif d'au moins deux unités galliques d'un gallotanin, couplage qui conduit à la formation d'un groupement hexahydroxydiphénol (HHDP) chiral. Les principales variations entre ellagitanins proviennent du degré de galloylation, des couplages oxydatifs existants, de la formation de C-glycosides aromatiques et de la polymérisation à travers des couplages oxydatifs C-O¹⁸.

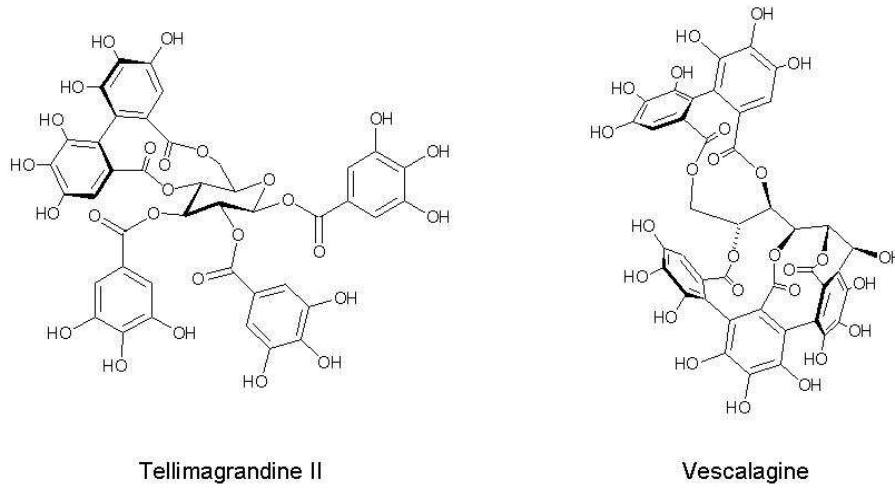


Figure 5: Ellagitanins

3. Tanins complexes

Les tanins complexes sont des tanins hydrolysables (gallotanins ou ellagitanins) reliés à un groupement flavonoïde par une liaison C-glycosidique¹³. Les tanins complexes peuvent se former dans le vin élevé en barrique lorsque les flavonoïdes entrent en contact avec les tanins hydrolysables libérés par le bois¹⁹. L'acutissimine A (figure 6) est le plus connu des tanins complexes²⁰

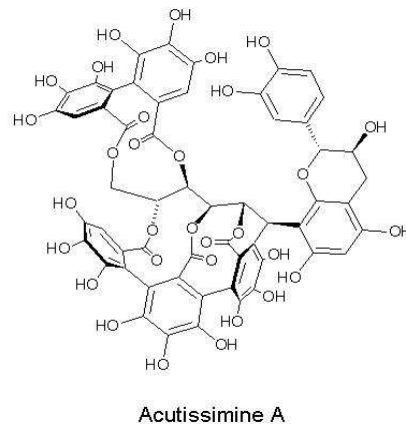


Figure 6: Acutissimine A

4. Tanins condensés

a) Nomenclature

Les tanins condensés sont molécules issues de la polymérisation des flavan-3-ols, sous classe des flavonoïdes (figure 7). Les monomères de flavan-3-ols ne sont donc pas des tanins au sens strict du terme, mais ils sont souvent englobés dans l'appellation.

Recherchant les synonymes utilisés dans la littérature, Aron et Kennedy ont trouvé les expressions suivantes²¹ : tanins végétaux, flavanes, flavolanes, polyflavanes, catéchines, leucoanthocyanidines condensés, proanthocyanidines condensées, procyanidines, polyphénols de plante ... C'est la désignation « proanthocyanidine » qui fait référence.

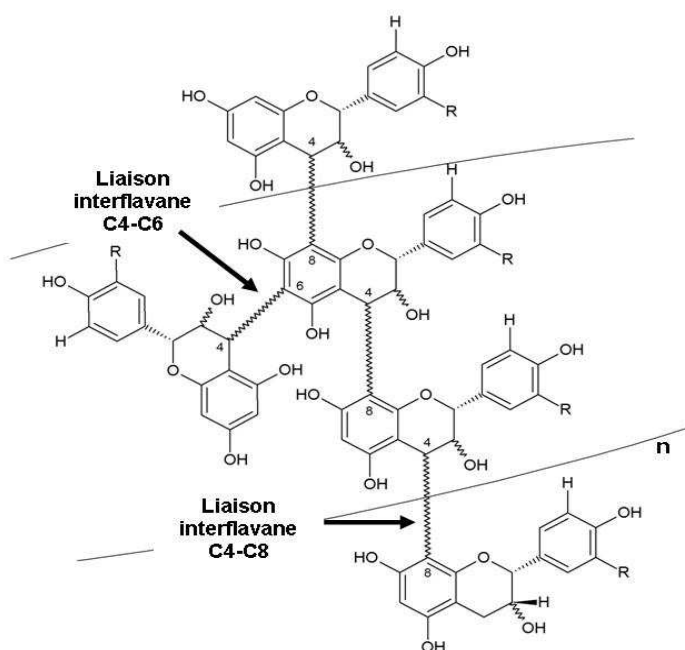


Figure 7 : Structure générale des proanthocyanidines de raisin

b) Source

De nombreux fruits, légumes, graines ou épices contiennent des proanthocyanidines. Les plus faibles quantités se trouvent dans la pêche, le kiwi ou la banane tandis que c'est la cannelle qui est la plus riche en proanthocyanidines (8108,2 mg / 100 g)²². Quelques valeurs, issues également de²², sont présentées dans le tableau 1.

Tableau 1 : Quantités de tanins condensés dans certains aliments

Produit	mg/100g ou mg/L
Pêche	2.9
Kiwi	3.7
Banane	4
Avocat	7.4
Haricot noir	8.1
Cerises	8.2
Noix de cajou	8.7
Mûre	8.9
Jus de pommes	9
Dattes	10.7
Mangue	12.8
Beurre de cacahuètes	13.2
Abricots	15.6
Nectarines	22.8
Bières	23
Mûres	27
Framboise	30.2
Poire	31.9
Raisin rouge	61
Pêches	67.3
Noix	67.3
Orgeat	74.2
Curry	74.2
raisin vert	81.5
Fraises	145
Cassis	147.8
Amandes	184
Chocolat au lait	192
Pistaches	237.3
Chocolat noir	246
Vin rouge	313
Canneberges	418.8
Sorghum	447.3
Noix de pékans	494.1
Noisettes	500.7
Jus de raisin	524
Chocolat à cuir	1635.9
Pépins de raisins	3532.3
Cannelle	8108.2

La présence de tanins dans de nombreux aliments génère parfois un problème en agroalimentaire, où leur précipitation avec les protéines nécessite de prendre certaines

précautions lors de la mise au point de procédés de fabrication. Un cas un peu particulier est celui de la gelée de thé²³.

C. Les tanins condensés du vin

1. Origine des tanins du vin

Les tanins du vin peuvent être naturellement présents (tanins endogènes) ou ajoutés en cours de vinification ou d'élevage (tanins exogènes).

a) Les tanins endogènes

Les tanins endogènes proviennent du raisin, ils sont extraits durant la vinification. On trouve ainsi des tanins condensés²⁴ et parfois quelques tanins hydrolysables provenant des rafles²⁵.

b) Les tanins exogènes

Des tanins peuvent être ajoutés lors de la vinification pour, par exemple, modifier ou protéger les arômes et la couleur, protéger la structure redox²⁶. Ces ajouts sont limités par la réglementation propre à chaque pays tant dans les doses d'ajout que sur la qualité des tanins utilisés²⁷.

Les tanins exogènes ont trois origines principales.

- Les tanins de vinification ou d'élevage peuvent être ajoutés dans le moût ou le vin, ce sont des tanins condensés de pépins ou de pellicules, des tanins hydrolysables ou un mélange selon l'effet voulu²⁸⁻³⁰.
- Si le vin passe en barrique, les tanins du bois vont être extraits³¹⁻³³, il s'agit alors d'ellagitanins.
- En fin, lorsque des alternatives à la barrique sont utilisées (copeaux, staves ...), les tanins hydrolysables qu'ils contiennent sont également extraits dans le vin³⁴.

2. Les tanins du raisin

Les tanins du raisin sont contenus dans les pépins et la pellicule et possèdent des structures différentes selon leur localisation. Leurs unités de base sont la catéchine, l'épicatéchine, l'épigallocatechine, l'épicatéchine gallate, présentées sur la figure 8. Les

proanthocyanidines résultantes seront des procyanidines ou des prodelfphinidines, selon leur capacité à libérer les anthocyanines correspondantes par hydrolyse acide.

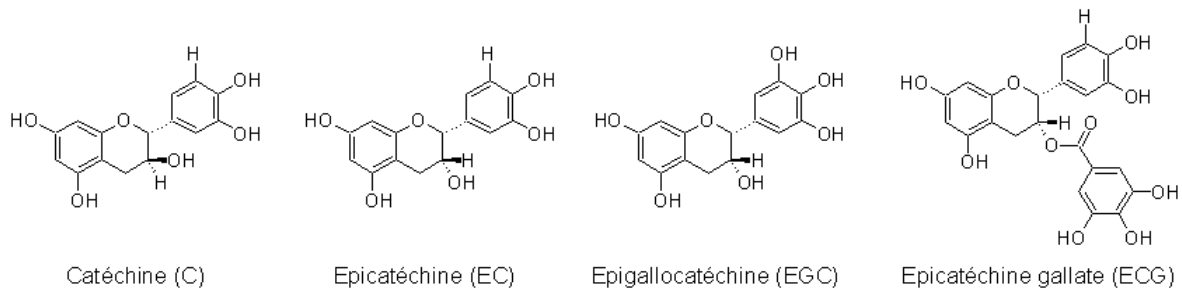


Figure 8 : Monomères de flavan-3-ol trouvés dans le raisin

Les tanins condensés sont caractérisés par leur degré de polymérisation moyen en nombre (DPM) et leur pourcentage de galloylation³⁵.

De nombreux facteurs influencent la concentration en proanthocyanidines des raisins comme le sol³⁶, les facteurs météorologiques, les traitements apportés à la vigne^{37, 38}....

a) *Tanins de pellicules*

Les tanins de pellicules se caractérisent par un DPM élevé (proche de 30 selon Souquet *et al.*³⁹, compris entre 2,1 et 8 selon Mattivi *et al.*⁴⁰)

b) *Tanins de pépins*

Les tanins de pépins contiennent des unités (-)-Epicatechine-3-O-Gallate en quantités beaucoup plus importantes que les pellicules (20 à 30% contre 2 à 3% environ). Leur DPM est plus faible que les tanins de pellicules (autour de 10 selon Prieur *et al.*⁴¹, entre 2 et 4 pour d'autres⁴⁰).

c) *Ratio tanins de pépins / tanins de pellicules*

Le ratio tanins de pépin / tanin de pellicule dans le raisin varie selon les cépages de 70 / 30 à 96 / 4^{40,42}.

3. Les tanins du vin

a) Extraction des tanins du raisin dans le vin, influence des techniques de vinification

La totalité des tanins ne sont pas extraits dans le vin. Travaillant dans une solution hydroalcoolique, Fournand *et al* trouvent que 23% des tanins du raisin sont extraits dans le vin⁴³. D'autres études sont plus pessimistes, avec 9% de tanins extraits⁴². Toujours selon ce travail, 6% des tanins de pépins et 29% des tanins de pellicule sont extraits dans le vin. Au final, dans l'exemple étudié par ces auteurs, les tanins du vin sont composés à 36% de tanins de pellicule et à 64% de tanins de pépin. Ces caractéristiques sont regroupées dans le tableau 2.

Les tanins de pellicules sont extraits plus rapidement et plus facilement que ceux des pépins, en raison d'une plus grande accessibilité, mais également d'une plus grande solubilité⁴⁴.

Tableau 2 : Caractéristiques des tanins de pépins et de pellicules(ref)

	Pellicules	Pépins
Unités terminales	C, EC, EGC	C, EC, ECG
Unités d'extension	EC, EGC	C, EC, ECG
DPM	Jusque 10	Jusque 30
% dans le raisin	15	85
% dans le vin	36	64
% extrait dans le vin	29	6

Les techniques de vinification jouent un grand rôle sur l'extraction des tanins. Il est ainsi possible de trouver des travaux sur l'influence de la macération (durée, température⁴⁴), du collage²⁸, de l'oxygénation⁴⁵, de la micro-oxygénation³⁴, de l'addition ou de l'élimination de pépins⁴⁶, de la réfrigération⁴⁷, de l'utilisation de champs électriques autour de la cuve⁴⁸, de l'addition de manoprotéines⁴⁹, de la flash détente⁵⁰... De manière générale, Sacchi *et al* tirent les conclusions suivantes⁵¹ : la température de fermentation, les thermovinifications, l'utilisation de carboglace, les saignées, l'utilisation d'enzymes pectolytiques et une macération plus longue favorisent l'extraction des tanins.

b) Composition en tanins condensés du vin

- Oligomères identifiés

Si de nombreux dimères, trimères et tétramères de flavan-3-ols ont été identifiés dans le raisin, la plupart d'entre eux n'ont pas encore été décelés dans le vin⁵².

- Distribution des tanins dans le vin

Il est généralement admis que le vin rouge contient entre 1 et 5 g/L de tanins à un DPM d'environ 7, soit entre 0,5 et 1 mM⁵³.

Pour avoir une meilleure idée des concentrations possibles en différents monomères, oligomères et tanins dans le vin, les données de 48 publications^{22, 32, 33, 46, 47, 49, 50, 54-95} concernant approximativement 400 vins, ont été regroupées. Les principaux résultats sont présentés dans le tableau 3. Il est cependant nécessaire de garder à l'esprit que la concentration trouvée dans un vin est d'une part dépendante de la technique utilisée^{90, 96}, d'autre part sans doute largement sous-estimée, notamment pour des raisons d'extraction non optimisée des tanins⁹⁷.

Tableau 3 : Concentration en mg/L de monomères, dimères et tanins dans des vins^{22, 32, 46, 47, 49, 50, 54-95, 98}.

Concentration (mg/l)	Minimum	Maximum	Moyenne	Nombre d'échantillons
Catéchine	1	1000	82	178
Epicatechine	0,015	560	43	136
B1	0,5	99	23	48
B2	0,43	288	33	78
Tanins totaux	22	5600	700	158
DPM	1,75	13	4,95	58

c) Evolution chimique des tanins dans le vin

i. Réactivité des tanins condensés

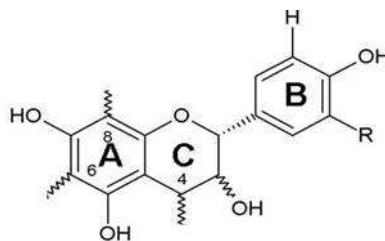


Figure 9 : Réactivité des noyaux flavanols

La réactivité des tanins condensés est liée aux noyaux aromatiques A et B, au cycle pyrane C et aux liaisons interflavanes.

- Noyaux aromatiques A et B

La présence d'un groupement hydroxyle sur un noyau aromatique renforce la densité électronique de ce dernier par l'effet mésomère du doublet libre des oxygènes. La densité électronique est plus particulièrement renforcée en *ortho* et en *para* du carbone portant le groupement -OH, rendant les atomes de carbone sensibles à des substitutions électrophiles aromatiques et plus acides, ce qui est le cas du noyau A⁷².

Dans le cas du noyau B, deux groupements OH sont situés en α d'une double liaison, ce qui les rend sensibles à l'oxydation, à travers laquelle ils évoluent en orthoquinone⁷².

- Noyau C

La réactivité du noyau C apparaît sous forme de carbocation lors de la rupture de la liaison interflavane⁷².

ii. Polymérisation tanins / tanins

- Polymérisation directe

Le réarrangement des chaînes de tanins condensés a été observé au cours de l'élevage du vin⁹⁹ ainsi qu'en milieu modèle^{100, 101}.

Les oligomères et polymères extraits des raisins peuvent, en l'absence d'oxygène et en milieu acide, rompre la liaison interflavane C4-C6 ou C4-C8, libérant ainsi un carbocation en C4 qui va réagir en C6 ou C8 du noyau A, provoquant une re-polymérisation.

- Polymérisation indirecte

La polymérisation peut également se faire de manière indirecte par l'intermédiaire d'aldéhydes. Cette réaction suit un mécanisme de Friedel et Crafts pour l'alkylation de l'aldéhyde sur le noyau A du flavanol¹⁰². La déshydratation de l'alcool benzylique résultant donne naissance à un carbocation qui peut subir l'attaque électrophile d'un nouveau flavanol.

Plusieurs aldéhydes ont été identifiés dans le vin comme possibles participants à cette polymérisation : l'acétaldéhyde (éthanal)^{103, 104} (réaction la plus rapide¹⁰⁵), l'acide glyoxylique^{106, 107}, le furfural et l'hydroxyfurfural¹⁰⁸. Lors de ces réactions, il existe une compétition entre les aldéhydes¹⁰⁹ et les monomères¹¹⁰.

Il est également intéressant de noter que la condensation par acétaldéhyde peut être corrélée avec l'âge du vin^{111, 112}.

iii. Réaction avec les anthocyanes : stabilisation de la couleur

Les tanins peuvent réagir de plusieurs manières avec les anthocyanes : les condensations directes anthocyane-tanin (AT) et tanin-anthocyane (TA) ou par l'intermédiaire d'un pont alkyl.

- Condensations directes

Dans la condensation anthocyane-tanin, l'anthocyane sous forme flavylum agit en tant qu'électrophile pour réagir avec le noyau aromatique nucléophile A du flavonol. Le flavène incolore résultant peut être oxydé en flavylum (rouge) puis en sel de xanthylum^{113, 114}. La présence de ces composés dans le vin a été confirmée en 2000¹¹⁵.

Dans le cas de la condensation tanin-anthocyane, l'anthocyane, sous forme hémicétal hydratée, est un nucléophile qui va réagir avec le noyau C (électrophile) du flavanol¹¹⁶.

Il semblerait que des oligomères de faible DPM (2-3) soient meilleurs agents de condensation¹¹⁷.

- Condensation indirecte

La condensation par l'intermédiaire d'un pont alkyle suit le même principe que la polymérisation indirecte des tanins. Une grande attention a été portée sur le rôle de l'acétaldéhyde^{104, 118, 119}, celui-ci étant un produit apparaissant naturellement dans le vin suite à l'oxydation de l'éthanol¹²⁰. Le furfural peut également intervenir dans cette réaction¹⁰⁸ et, en solution modèle, plusieurs autres aldéhydes (propionaldéhyde, isovaléraldéhyde, formaldéhyde, isobutyraldéhyde, benzaldéhyde)¹²¹ se condensent avec les flavanols, favorisant nettement la position 8 par rapport à la 6, contrairement aux flavanols.

- Influence sur la couleur du vin

En réagissant avec les tanins, les propriétés colorantes des anthocyanes sont modifiées. Dans le cas de la condensation directe, on observe un effet bathochrome dépendant du poids moléculaire des tanins¹²². La condensation indirecte a également un effet bathochrome, d'environ 15 nm, la solution arborant une couleur un peu plus violette¹²³.

iv. Antioxydant : protection de la structure du vin

Un antioxydant est une substance qui retarde ou inhibe significativement les dégâts d'une molécule cible¹²⁴, et ceci même à une concentration 100 fois inférieure à celle de cette molécule cible¹²⁵.

Les propriétés antioxydantes des tanins (et des polyphénols en général) s'expriment de trois manières¹²⁶ : en piégeant les espèces réactives de l'oxygène, en chélatant les ions

métalliques initiateurs des phénomènes d'oxydation ou en inhibant des enzymes impliquées dans la production d'espèces réactives de l'oxygène.

- Chélation des ions

Plusieurs sites de chélation sont possibles (figure 10), mais c'est le groupement catéchol qui apporte la plus grande contribution¹²⁷.

Les métaux complexés sont entre autres le manganèse¹²⁸, l'aluminium¹²⁹ et le fer^{130, 131}.

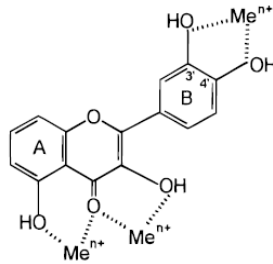


Figure 10 : Sites possibles pour la chélation des métaux par les tanins¹²⁷

- Espèces réactives de l'oxygène

L'oxydation des tanins condensés pourrait théoriquement se faire sur le noyau A et B, mais, sachant que B a le potentiel réducteur le plus bas, c'est ce dernier qui est actif¹³². De cette oxydation du noyau B résulte une orthoquinone. Dans le cas de la catéchine, un voltampérogramme cyclique donne un potentiel à mi-parcours de 160 mV pour la catéchine, ce qui en fait un très bon oxydant ($EP/2 < 0,2V$)¹³³. Cependant, en solution modèle vin, cette capacité est un peu moindre ($EP/2 = 380 \text{ mV}$)¹³⁴.

Si le nombre de groupement hydroxyles est très important dans ces phénomènes d'oxydation, l'arrangement spatial est déterminant¹³⁵. Ainsi, l'augmentation du degré de polymérisation ne signifie pas toujours augmentation de l'oxydabilité, sans doute un effet protecteur de la structure compacte des oligomères envers les sites hydroxyles¹³⁶.

Toutefois, la catéchine peut s'oxyder lentement en quinone qui va se réorganiser rapidement selon une polymérisation dite « désordonnée »¹³⁷, aboutissant entre autre à l'apparition de pigments bruns insolubles, les phlobaphènes¹³⁸.

Cette action antioxydante des tanins pourrait être à l'origine d'effets positifs sur la santé assez variés allant de la protection contre les caries à celle contre le cancer^{12, 139-142}. Dans cet optique, beaucoup d'études mettent en relation la composition en tannin et leur action antioxydante^{58, 83, 143, 144} ...

- Inhibition d'enzymes impliquées dans la production d'espèces réactives de l'oxygène.

L'inhibition de ces enzymes se fait au travers de l'interaction tanin / protéine « classique », discutée plus loin de ce manuscrit^{145, 146}.

v. Agrégation avec d'autres molécules

Les possibilités d'agrégation des tanins dans le milieu vin sont nombreuses. Illustrées dans la figure 11, elles sont maintenant détaillées.

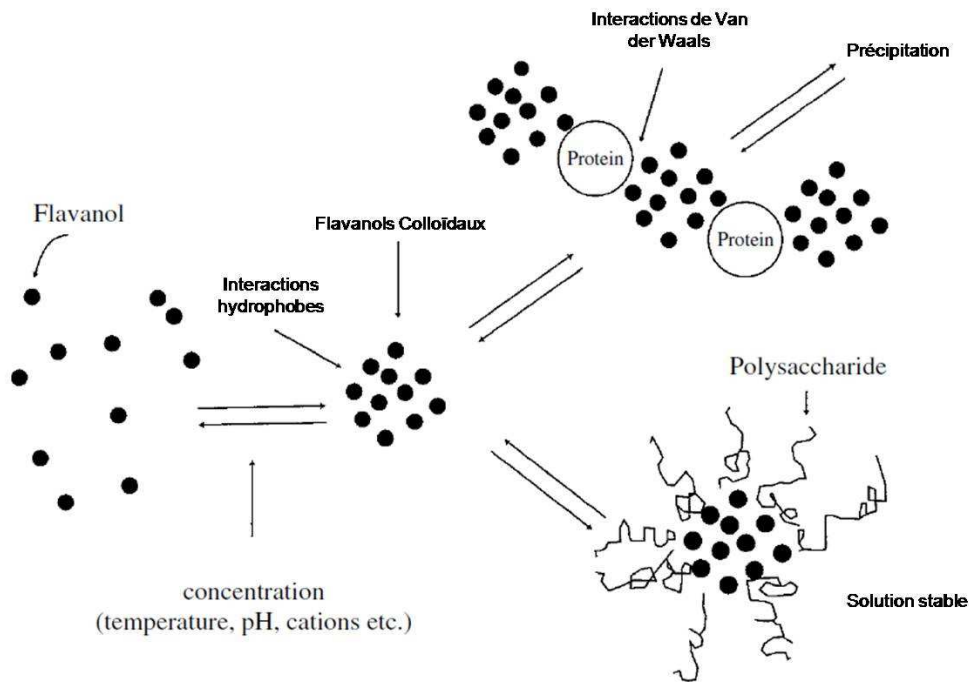


Figure 11 : Evolution des flavanols dans le vin (Saucier et al)

- Tanins / tanins

Des phénomènes d'agrégation ont été observés sur la catéchine¹⁴⁷ ou l'EGCG (favorisée par une diminution de température¹⁴⁸). Il semble exister une grande différence de comportement entre les monomères (concentration micellaire critique aux environs de 5g/L en solution alcoolique) d'une part et les dimères et trimères d'autre part (CMC aux alentours de 25 g/L)¹⁴⁹. A travers leurs différents résultats, ces auteurs proposent que des forces de stacking π - π assurent la cohésion des micelles, rejoignant les conclusions de Baxter *et al*¹⁵⁰.

Concernant les tanins condensés, Saucier *et al* furent parmi les premiers à montrer leur capacité à l'agrégation, notamment pour les produits de la polymérisation catéchine / acétaldéhyde¹⁰³. Riou *et al*¹⁵¹ ont constaté que, en solution modèle, les tanins condensés ont tendance à s'agréger au cours du temps pour se stabiliser avec une taille de particule

augmentant avec la concentration et le degré de polymérisation. Cependant, travaillant sur des tanins condensés de pépins de raisin mais également de pommes, Poncet-Legrand *et al* montrent que si ces relations existent, elles sont loin d'être triviales¹⁵², d'autres facteurs entrant en effet en jeu. Ainsi, la force ionique promeut l'agrégation, ainsi qu'une diminution du pourcentage d'éthanol, confortant le caractère hydrophobe de l'interaction tanins / tanins¹⁵².

Dans une étude récente et complète, Zanchi *et al*¹⁵³ notent que des tanins condensés purifiés de DPM 11, 27% de galloylation, se répartissent en plusieurs composants : une première fraction (2%), hydrophobe mais non amphiphile, forme des particules colloïdales dès que le pourcentage d'éthanol est inférieur à 60%. Ces colloïdes sont métastables grâce à la répulsion ionique existant entre des molécules d'acides organiques (acide tartrique par exemple) adsorbées à la surface des tanins. Une seconde fraction, comptant pour 33%, reste dissoute jusque 12% d'éthanol. La dernière composante (65%) reste dissoute quelque soit le pourcentage d'éthanol en solution.

- Tanins / polysaccharides

La relation entre tanins et polysaccharides est assez ambiguë. Ainsi, après avoir mis en contact des rhamnogalacturonan II (RGII) avec des tanins condensés, Carvalho *et al.* ne détectent aucune agrégation¹⁵⁴. Cependant, des constantes d'affinités entre des tanins condensés de pépins de raisin, de pommes et de poires et différents polysaccharides sont disponibles¹⁵⁵. Il en ressort que les polysaccharides possédant des zones hydrophobes ont plus d'affinité pour les tanins, à côté d'autres paramètres structuraux.

A travers une étude prenant en compte la taille des polysaccharides, leur concentration, la force ionique et le pourcentage d'éthanol, il semblerait que des polysaccharides de faibles masses peuvent prévenir l'agrégation des tanins par stabilisation stérique, tandis que ceux de taille trop importante augmente la taille des agrégats par floculation pontante¹⁵⁶.

- Tanins / protéines

La capacité des tanins d'interagir avec les protéines est leur caractéristique principale. Cette propriété est l'objet de la partie « interactions tanins / protéines ».

II. Les protéines du vin et de la salive

A. Les protéines du vin rouge

L'étude des protéines au cours de la vinification et dans le vin rouge a longtemps été considérée comme non avenante, de par la certitude de leur précipitation immédiate. Le sujet commence cependant à être investigué, d'autant qu'il est relié à des thématiques actuelles comme le potentiel allergène du vin, mais également sa traçabilité.

1. Présence des protéines dans le vin

De nombreuses études apportent la preuve de l'existence des protéines dans le vin blanc¹⁵⁷⁻¹⁶³. On en trouve par exemple 40 mg/L dans le gewürztraminer¹⁶⁴ et jusqu'à 500 mg/L dans des vins blancs portugais¹⁶⁵. Il est également possible de différencier des cépages blancs en comparant leur profil protéique¹⁶⁶. Cependant, leur présence dans le vin rouge a longtemps été mise en doute^{167, 168} à cause de leur propension à précipiter en présence de tanins. Ainsi, dans leur étude bibliographique consacrée aux protéines du vin, Ferreira *et al* s'intéressent exclusivement aux vins blancs¹⁶⁹. De plus, les protéines peuvent également former des complexes avec les polysaccharides, induisant des artefacts lors des analyses¹⁷⁰.

2. Problématiques liées à la présence des protéines dans le vin

a) Interaction avec les tanins

L'interaction avec les tanins est susceptible de diminuer le potentiel antioxydant des tanins⁷³ mais également d'influer sur les caractères organoleptiques du vin¹⁷¹.

b) Limpidité du vin

L'instabilité protéique est due à la précipitation des protéines suite à des évolutions de température. Ce problème majeur des vins blancs, influencé par de multiples paramètres^{172, 173}, pourrait également exister dans les vins rouges. En effet, les protéines engagées dans ce phénomène ont été identifiées dans la baie¹⁷⁴.

c) Potentiel allergène du vin

Plusieurs cas d'allergie et d'anaphylaxie aux vins sont décrits dans la littérature¹⁷⁵⁻¹⁷⁷. Ces cas ne sont pas liés aux histamines¹⁷⁸ : les agents de collage dérivés du poisson, des œufs ou du lait sont montrés du doigt¹⁷⁹ mais des protéines endogènes du vin pourrait également être

responsables de certaines allergies. Des études ont ainsi montré que l'endochitinase 4, une protéine de transfert de lipide, et la thaumatine étaient des allergènes potentiels^{180, 181}. De plus, les protéines reliées aux pathogènes (PR protéines), identifiées comme sources de troubles dans les vins blancs¹⁷⁴ sont également allergènes¹⁸².

3. Caractéristiques des protéines du vin rouge

a) *Masse moléculaire*

Pour du pinot noir, on observe sur gel SDS-Page monodimensionnel des bandes de 6 à 200 kDa. 60% des protéines sont concentrées sur les bandes 28-30 kDa, qui apparaissent durant la vinification, tandis que la bande à 35 kDa disparaît¹⁸³.

Cette bande entre 25 et 30 kD apparaît dans plusieurs autres vin rouges, accompagnées de bandes à 60 et 70 kDa¹⁸⁴. Le portugieser présente également une bande à 12 kDa¹⁸⁵.

b) *Origine*

Les protéines du vin rouge proviennent de la baie (lipid transfer protein, thaumatin like proteins, endochitinase, vacuolar invertase), des levures (avec entre autre des glycoprotéines) et des agents de collage¹⁸⁵.

Pour tenter d'identifier au mieux l'origine des protéines, Fukui et Yokotsuka ont vinifié du jus ultracentrifugé, levuré ou non, du jus ultracentrifugé avec les pépins, la pellicule ou les deux, et, bien sur, du vin dans des conditions normales. Ils arrivent à la conclusion que la majorité des protéines du vin sont déjà présentes dans le jus¹⁸⁶.

c) *Quantités*

Sur des vins de Muscat Bailey A vinifiés sur 10 années consécutives puis vieillis jusque 12 ans, la teneur en protéines solubles varie de 33 à 87 mg/L, avec une moyenne de 57 mg/L. Aucune corrélation n'est possible entre teneur en protéine et âge du vin. Toujours selon les mêmes auteurs, on trouve 70 mg/L de protéines dans le Cabernet Sauvignon, 77 dans le Pinot Noir et 48 dans le Merlot¹⁸⁷.

d) *Propriétés*

Les protéines du pinot noir peuvent être divisées en deux groupes selon leur pI : les protéines acides (pI de 3,6 à 4,8) sont résistantes à la vinification tandis que les protéines plus basiques disparaissent¹⁸³. Dans le cas du Muscat Bailey, le pI des protéines est compris entre 3,6 et 4,7.

Il semble de plus que les protéines du vin rouge soient assez stables, que ce soit à la bentonite ou à la chaleur^{184, 186}.

e) *Composition*

Des premières études s'intéressant à la composition en acide aminée des protéines du vin rouge, il ne ressort pas de différences structurales significatives entre les protéines^{188, 189}. Dans le cas du Muscat Bailey A, il semblerait pourtant que la majorité des protéines soient des glycoprotéines, avec 0,3 à 33% de sucres¹⁹⁰.

En comparant la composition des protéines de moût de 14 variétés (5 rouges, 9 blancs), il apparaît que 18 acides aminés sont présents de manière très homogène, les plus représentés étant l'aspartate, le glutamate, la sérine, la thréonine et l' α -alanine¹⁹¹.

4. Evolution des protéines lors de la vinification

Une diminution de la teneur en protéine au cours de la vinification a été notée par certains auteurs¹⁸⁴. Travaillant avec du pinot noir, Santoro note une diminution de la teneur en protéine de 45% entre le moût et le vin¹⁸³. Cette évolution a été quantifiée dans le cas du Muscat Bailey A avec 83 mg/l dans le jus, 72 dans le moût, 69 dans le vin¹⁹⁰.

En ce qui concerne les peptides, leur concentration dans le vin diminue au cours de la fermentation malolactique, avant de réaugmenter lors de la maturation. Cette augmentation, expliquée selon les auteurs par une activité protéase résiduelle, est plus importante lors du vieillissement sur lies¹⁹².

Lors du vieillissement en bouteille, la concentration en protéine diminue après deux mois dans le cas du Muscat Bailey A avant de rester stable, alors qu'elle n'évolue quasiment pas dans le cas du Cabernet Sauvignon. Cependant, les bandes correspondantes à ces protéines disparaissent progressivement sur gel polyacrylamide.

5. Les Arabinogalactanes-protéines.

Les protéines arabinogalactanes (AGP) ont été décrites pour la première fois dans la pulpe de raisin en 1989¹⁹³. Il s'agit en fait d'un polysaccharide colloïdal comportant environ 6% en masse de protéine riche en hydroxyproline (30%). On note également la présence de sérine, d'alanine, de thréonine et d'acide glutamique¹⁹⁴. Les AGP ont également été identifiées dans le vin¹⁹⁵ où plusieurs fractions peuvent être séparées. Le pourcentage de protéine se situe entre 0,8 et 3,4 % pour une masse moléculaire fluctuant entre 184 000 et 262 000 Da¹⁹⁶. Une fois purifiée et additionnée à du vin, les AGP pourraient réduire le trouble dû à la chaleur¹⁹⁷.

A partir de 265 g d'extrait sec de Carignan noir représentant 600 L initiaux, il est possible d'extraire 17 g d'AGP¹⁹⁸. Il semble que la teneur en AGP augmente pendant la fermentation alcoolique avant de diminuer à partir de la fermentation malolactique¹⁹⁹. Cette baisse avec le vieillissement du vin se confirme lors de l'étude de plusieurs millésimes²⁰⁰.

B. Les protéines de la salive

1. La salive : généralités

Produite par trois glandes (parotide, sous-maxillaires et sublinguales), la salive a pour fonction principale de maintenir l'homéostasie dans la bouche²⁰¹. Elle joue 5 grands rôles : lubrification et protection de la cavité buccale, nettoyage, protection des dents, activité antibactérienne, goût et digestion²⁰².

Un individu adulte sain produit entre 0,5 et 1,5 litre de salive par jour, avec en moyenne 0,3 mL/min pour la salive non stimulée et jusque 7 mL/min pour la salive stimulée²⁰³.

La figure 12, reprise de²⁰⁴, présente les rôles principaux de la salive en relation avec ses constituants.

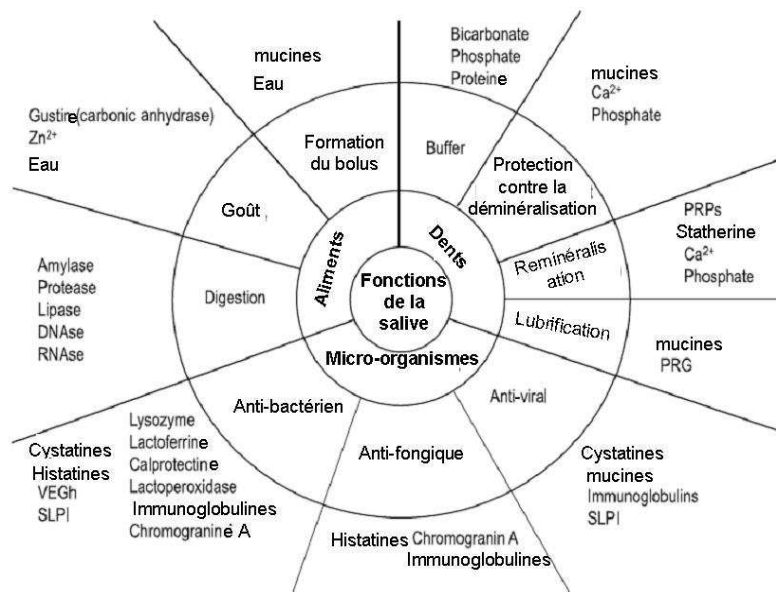


Figure 12 : les rôles principaux de la salive en relation avec ses constituants²⁰⁴

2. Composition de la salive

a) Composition globale

Constituée à 99% d'eau, la salive contient un grand nombre d'électrolytes (sodium, potassium, calcium, chlore, magnésium, bicarbonate, phosphate), des protéines, du glucose et des composés azotés²⁰⁵.

La composition de la salive évolue au cours du temps, mais également en fonction des éléments avec lesquels elle est mise en contact²⁰⁶. Ainsi, non seulement la concentration de certaines protéines diffère avant et après l'ingestion d'aliments sucrés, amers, acides ou umami²⁰⁷, mais également le débit salivaire²⁰⁸.

b) Les protéines de la salive

La concentration en protéine peut être estimée aux alentours de 80 μM ⁵³, ou 1,5 mg/mL²⁰⁹. Concernant leur identification, elle est l'objet de nombreux travaux et l'apparition de techniques analytiques toujours plus performantes a permis d'augmenter considérablement le nombre de protéines identifiées au cours des dernières années. Certaines équipes ont ainsi identifiées 43 protéines²¹⁰, d'autres 102²¹¹, 309 protéines²¹² puis 437²¹³ ont été identifiées. Enfin, un consortium affirme avoir réussi à identifier plus de 1000 protéines différentes²¹⁴.

Malgré ce nombre impressionnant de protéines dans la salive, il est possible de les classer en grandes catégories.

- Protéines riches en proline

Les protéines riches en proline (PRP) se répartissent en trois groupes selon leur charge et leur degré de glycosylation : PRP acides, PRP basiques, PRP glycosylées. Elles représentent 70% des protéines parotidiennes²¹⁵. Un de leur rôle serait de précipiter les tanins pour prévenir leur ingestion²¹⁶. Leur concentration augmente ainsi chez des rongeurs soumis à un régime riche en tanins²¹⁷.

- Histatines

Les histatines sont des protéines de faibles masses (3-5 kDa), riches en histidines et présentant une activité antifongique²¹⁸. On en trouve environ 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dans la salive²¹⁹.

- Statherines

Les statherines sont des phosphopeptides riches en tyrosines²²⁰. Ils permettent notamment à la salive de rester en sursaturation de calcium et phosphate²²¹ et protègent les dents²²²

- Cystatines

Les cystatines salivaires assurent sans doute un rôle de protection de la cavité buccale. Elle existe sous trois formes (S, SN, SA).

- Mucines

Les mucines sont des glycoprotéines impliquées dans la lubrification de la cavité buccale de par leur viscoélasticité²²³. Elles sont divisées en deux groupes selon leur taille : MG1 (103 kDa) et MG2 (130-150 kDa)

- α -amylase

L' α -amylase est une enzyme d'environ 60KDa, qui peut donner jusqu'à 140 spots différents sur des gels 2D²²⁴. Elle représente 20% en masse de la salive totale²²⁵.

La figure 13, reprise de Messana *et al*²²⁶ présente la composition en protéine de la salive.

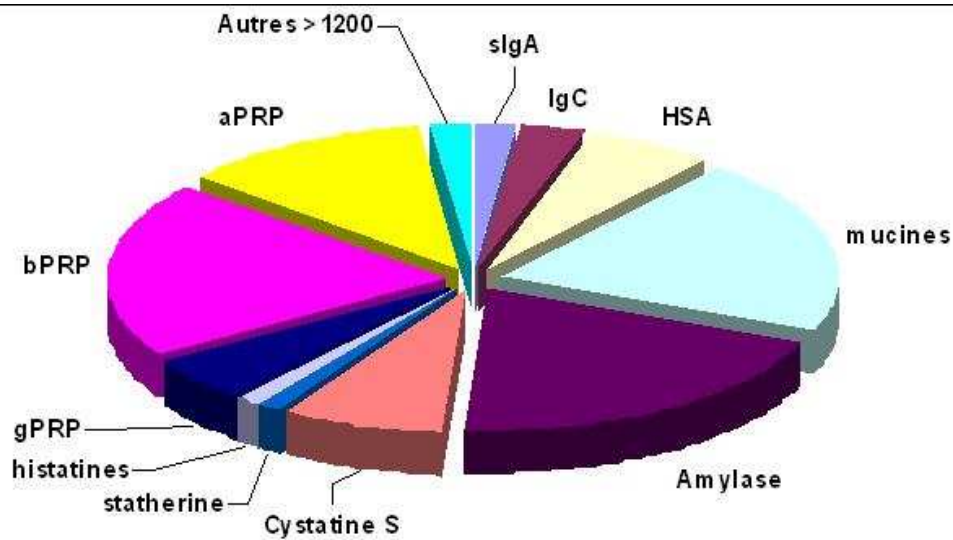


Figure 13 : Pourcentages approximatifs des principales classes de protéines salivaires²²⁶

III. Interactions Tanins / Protéines

Sachant qu'extrêmement peu de publications s'intéressent à la cinétique des interactions tanins-protéines (une seule à notre connaissance²²⁷) et que les différences d'affinités observées seraient dues à des phénomènes thermodynamiques plutôt que cinétiques²²⁸, cette partie concernera uniquement l'aspect thermodynamique de l'interaction.

A. Caractéristiques des protéines et des tanins

Les conséquences des propriétés des tanins et des protéines vont être maintenant présentées. En effet, les deux molécules influencent l'interaction et, selon certains auteurs, la structure et la flexibilité des tanins déterminent l'énergie et la stœchiométrie de l'interaction, alors que le mécanisme de cette interaction trouve son origine dans la nature de la protéine²²⁹.

1. Les protéines

De nombreuses études notent que si l'on fait réagir plusieurs protéines avec le même tanin, certaines sont beaucoup plus efficaces que d'autres pour la précipitation. A titre d'exemple par rapport à l'acide tannique, le lysozyme est plus efficace que la salive, la BSA et la gélatine (par ordre décroissant)²³⁰. Quand il s'agit de la quercétine, l'ordre est HSA, glycine, BSA, lysozyme²³¹.

a) Existence de sites d'interactions spécifiques

Certaines études concordent sur l'existence simultanée de sites d'interactions spécifiques et non spécifiques sur les protéines. Les sites d'interactions forts réagissent en premier, lorsqu'ils sont saturés, les sites d'interactions plus faibles entrent en jeu²³².

Le nombre de sites de liaison est proportionnel à la masse moléculaire de la protéine²³³, ce qui fait que la BSA (67000 Da) est moins efficace que la lysozyme (14300 Da)²³³. Des études avancent l'idée que certaines protéines comme la BSA ne possèdent pas de sites spécifiques²³⁴, l'interaction avec les tanins serait alors essentiellement un phénomène de surface²³⁵. Dans le cas de l'interaction des tanins hydrolysables avec la BSA, l'apparente non spécificité pourrait en fait cacher une étape d'interaction spécifique suivi d'une aggrégation non-spécifique des complexes formés²²⁹.

D'autres protéines, comme la gélatine, possèdent des sites de liaison très spécifiques²³⁶. Lorsque des sites spécifiques existent, les liaisons peuvent s'étendre sur les résidus autour^{150, 237}.

Cherchant à identifier ces sites, plusieurs auteurs arrivent à la conclusion que la présence de proline est essentielle pour former un trouble lors de l'interaction avec les tanins^{228, 238}. La propension des caséines α , β et κ à masquer l'activité antioxydante de la catéchine est proportionnelle à leur pourcentage de proline²³⁹ et le trouble formé par la polyproline est proportionnel au pourcentage de proline²⁴⁰. De manière générale, de nombreuses études arrivent à la conclusion que les PRP sont les plus efficaces pour précipiter les tanins²³⁶.

L'arginine et la phénylalanine sont aussi des sites de liaison, mais la phénylalanine est souvent cachée, donc non accessible. L'arginine serait quant à elle un site secondaire, capable de renforcer l'interaction, mais pas de la créer¹⁴⁸.

Dans le cas du vin, l'étude de la composition des protéines du raisin responsables du trouble montre qu'elles sont effectivement plus riches en proline que les autres (9,49%) et font environ 45 kDa²⁴¹.

Les explications concernant le mode d'action de la proline diffèrent selon les auteurs. Elles sont d'une part de bons accepteurs de liaisons hydrogènes, et pourraient renforcer l'interaction²²⁸, mais, d'autre part, le noyau pyrrolidine est source d'interactions hydrophobes²⁴².

Toutes les PRP ne sont cependant pas égales : alors que les PRP basiques précipitent efficacement les tanins, les PRP acides sont sans effet²⁴³. La déphosphorylation des PRP ne change rien²⁴³. Par contre, suite à une réaction avec la trypsine, divisant une PRP acide en trois peptides, on s'aperçoit que deux d'entre eux, riches en proline, précipitent efficacement les tanins, tandis que le troisième, pauvre en proline, est sans effet²⁴³.

Cependant, certains auteurs montrent que les histatines sont bien plus efficaces que les PRP pour précipiter les tanins. Ils rappellent que les histatines ont une composition en PRP pauvre et en acides aminés basiques très riche²⁴⁴.

L'importance des acides aminés basiques est soulignée par Naurato *et al*, qui montrent que la réactivité de deux histatines possédant une composition en acides aminés basiques semblables est identique²⁴⁵.

b) Glycosylation des protéines

La glycosylation des protéines laisse les auteurs divisés. Pour certains, la présence d'oligosaccharides sur une protéine augmente non seulement son affinité mais également sa sélectivité pour les tanins, en la maintenant dans une conformation relativement ouverte²⁴⁶. Pour autant, selon d'autres études, la glycosylation préviendrait l'aggrégation²⁴², tandis que certains remarquent qu'elle n'est pas un obstacle à l'affinité pour les tanins.

c) *Structure spatiale des protéines*

La structure spatiale de la protéine semble être de première importance dans les interactions avec les tanins.

Une masse moléculaire minimale est nécessaire pour réagir avec les tanins, à l'exception des PRP²²⁸. En effet, une taille moléculaire plus importante permettrait à la protéine de s'enrouler autour du tanin augmentant ainsi les possibilités d'interaction²⁴⁷. L'exception concernant les PRP est clairement démontrée : une PRP de 61 résidus se lie à plus de tanins que l' α -amylase (560 résidus)¹⁵⁴. Pourtant, de travaux portant sur le collage du vin par des protéines de plantes (blé et lupin), il ressort que les protéines de faibles masses précipitent les tanins plus efficacement⁷⁵.

Enfin, la structure des protéines joue un grand rôle dans l'interaction. La plus grande affinité des tanins pour les PRP viendrait de leur structure en pelote aléatoire et d'un plus grand nombre de sites que les protéines globulaires, comme la BSA ou l' α -amylase²³¹. Dans cette dernière structure, les oxygènes des carbonyles sont moins disponibles pour des liaisons hydrogènes²²⁸. Dans la même optique, la flexibilité supérieure de la gélatine face à la BSA expliquerait sa plus grande affinité face à certains tanins hydrolysables²³².

La supériorité des prolines et des histatines se retrouverait ici : les prolines renforceraient la structure ouverte de la protéine, augmentant ainsi la surface disponible pour les interactions¹⁵⁰ et les histatines n'ont pas de structures secondaires²⁴⁴

2. Les tanins

L'interaction tanins / protéine est également extrêmement dépendante de la structure des tanins. Par exemple, alors que ECG et EGCG s'agrègent avec la polyproline quelque soit la concentration, il faut un certain ratio catéchine / polyproline pour que l'agrégation ait lieu et rien ne se passe avec EGC et EC²⁴⁸.

Lors de tests de collage avec des protéines de plantes⁷⁵, dérivées de gélatine⁷⁴ ou agent de collage²⁴⁹, il apparaît que les tanins prioritairement précipités sont ceux de plus grandes masses et de plus haut degré de galloylation.

a) *Influence de la masse moléculaire*

L'influence de la masse (ou du DPM) des tanins apparaît dans de nombreuses études, et les tanins de masses moléculaires élevées semblent privilégiés lors des interactions, bien que, dans le cas de certains tanins hydrolysables, elle ne semble pas influencer l'interaction²³².

Pourtant, lorsque des tanins de raisin sont mis en contact avec des protéines salivaires, ceux de plus faibles masses moléculaires ne sont pas précipités²⁵⁰. Les monomères peuvent toutefois se lier aux protéines, mais sans générer de trouble²⁵¹.

Plus la masse des tanins est élevée, plus la quantité de protéine précipitée est importante²⁵², et, dans le cas des tanins condensés, le nombre d'agrégats insolubles augmente avec le DPM^{253, 254}. De même, la constante d'affinité de dimères pour la BSA est largement inférieure à celle de trimères²⁵⁵.

Les tanins sont capables d'établir des liaisons multidentates avec les protéines²⁵⁶ et l'augmentation de leur masse permettrait d'accentuer ce phénomène²⁵⁷. Cependant, au-delà d'une certaine masse, la quantité de protéines globulaires précipitées reste constante²⁵³.

b) *Impact de la galloylation*

La présence de noyaux galloylés favorise l'interaction²⁵⁸. Cette influence de la galloylation ressort également dans d'autres travaux^{231, 233, 259}. Il semblerait que les monomères non-galloylés n'interagissent pas avec la polyproline²⁵⁷ et que le nombre de groupement galloyls soit plus important que la structure chimique du galloylglucose pour faire précipiter la BSA²⁶⁰. Lorsque deux ou trois groupement galloyls sont présents (dans le cas de tanins hydrolysables), leurs positions respectives (minimisant la gêne stérique) vont différencier l'affinité pour la BSA²⁶¹.

L'existence d'un nombre suffisant de groupements OH phénoliques peut permettre l'interaction^{230, 258}, et, en augmentant le nombre d'OH sur le noyau A, on augmente la constante d'association avec la BSA²⁶². Leur position est également déterminante²⁶³ et il a été montré que deux OH en ortho apportaient une meilleure interaction que séparés²⁶⁴. Dans certains cas, aucune influence de ces propriétés ne peut cependant être mise en avant²⁶⁵.

c) *Impact des groupements gallates*

En comparant l'affinité de flavan-3-ols du thé pour la BSA avec ou sans traitement tannase (qui rompt les liaisons gallates), il apparaît que le témoin est beaucoup plus réactif,

mettant ainsi en avant le rôle des gallates sur l'interaction. Cet apport favorable à l'interaction des groupements gallates a été montré dans de nombreuses études^{236, 239}.

Le mode d'interaction est en fait différent selon la présence ou non de gallates. Ainsi, l'épicatéchine et l'épigallocatechine s'approchent de la ribonucléase par les hydroxyles du noyau A, tandis que l'épicatéchine gallate et l'épigallocatechine gallate interagissent par leur noyau gallate²⁶⁶.

d) Autres particularités

D'autres particularités structurales ont été étudiées : la glycosylation des flavonoïdes diminue leur interaction²⁶⁷, la présence d'un groupe phosphate renforce leur aptitude à former des complexes avec les protéines²⁶⁸.

La structure dans l'espace des tanins est également importante, notamment leur flexibilité qui favorise leur interaction^{232, 264}. En effet, une trop grande rigidité de la molécule la restreint à certaines géométries pour l'interaction²⁶⁹.

Dans un même point de vue, la différence de réactivité entre différents dimères est attribuée à des différences stéréoisomériques²³⁶.

e) Polarité des tanins

Toutes ces caractéristiques des tanins se répercutent sur leur polarité, qui a donc été étudiée. Les monomères les moins solubles dans l'eau, donc les plus hydrophobes, sont les plus enclins à interagir avec les protéines²⁵⁷. Comparant le dimère EC-C et le pentagalloylglucose, Hagerman *et al* suggèrent que la polarité des tanins va déterminer le mode d'interaction avec la protéine. Si le tanin est polaire, l'interaction se fera selon une liaison hydrogène, s'il est apolaire, l'interaction sera hydrophobe. Dans le cas d'une interaction hydrophobe, la force de l'interaction est directement liée à l'hydrophobie du tanin²⁷⁰.

B. Conditions d'interactions

1. Température

Plusieurs études se sont intéressées à l'influence de la température du milieu réactionnel sur l'intensité de l'interaction, celle-ci favorisant les interactions hydrophobes²⁷¹ mais pouvant également dénaturer la protéine.

Si la constante d'affinité de la réaction augmente avec la température, les auteurs concluent généralement à des interactions hydrophobes. C'est le cas pour la BSA, la gélatine, la polyproline avec des tanins condensés²⁷², entre la BSA et le galloylglucose²⁷³ ou entre l'acide tannique et la polyproline, la papaine, la gliadine²³⁸.

La constante d'affinité peut également diminuer avec la température, comme pour la quercétine et la BSA²⁷⁴, PGG et EGCG avec une PRP basique¹⁴⁸ ou HSA et EGCG²⁷⁵. Les auteurs concluent alors sur une contribution significative des liaisons hydrogènes.

Il semble donc qu'une même protéine ou qu'un même tannin peut dans certains cas établir des interactions hydrophobes, dans d'autres des liaisons hydrogènes. C'est le cas dans les travaux de Artz *et al*, qui montrent que la constante d'affinité de trimères avec la BSA augmente avec la température, alors qu'elle diminue entre ces mêmes trimères et de la globuline de haricot²⁵⁵.

Les investigations concernant la température permettent donc une approche des forces mises en jeu, mais elles doivent être complétées pour avoir une idée plus précise. La BSA et PGG ont par exemple une affinité réciproque qui augmente avec la température, indiquant des forces hydrophobes. Mais si cette même affinité est mesurée dans le méthanol, solvant qui annihile les interactions hydrophobes, la tendance s'inverse alors, montrant l'existence d'interactions hydrogènes²⁷⁶.

2. Influence de la force ionique

La force ionique s'exprime selon la formule suivante : $I = \frac{1}{2} \sum_i C_i z_i^2$, où c est la concentration en espèces ioniques, z leur charge absolue. Dans la plupart des cas, les auteurs utilisent du NaCl ou du KCl pour la faire varier. Il est donc important de noter que la présence de NaCl ne provoque pas d'auto-agrégation des tanins ou des protéines dans les conditions étudiées²⁷⁷.

Le trouble formé par l'interaction catéchine / gliadine augmente drastiquement avec l'ajout de NaCl²³⁸. De même dans le cas des tanins condensés avec l' α -amylase¹⁵⁴ ou la polyproline et la gélatine²⁷². Dans ce dernier cas, les auteurs concluent à une augmentation des interactions hydrophobes.

Un ajout de NaCl à un mélange BSA / oligomères conduit à une diminution du trouble. Pour les auteurs, cela peut être dû à la fixation des ions sur la surface hydrophobe des tanins, limitant ainsi les liaisons hydrogènes, mais également à une fixation des ions sur la surface du complexe tanin protéine, conduisant à sa solubilisation²⁷⁷, suggérant le caractère hydrophile de l'interaction. La force ionique conduit à une diminution faible du trouble entre des tanins condensés et IB8, une protéine salivaire¹⁵⁴.

Suite à une augmentation de la force ionique, l'interaction BSA / quercétine est fortement défavorisée, mais pas complètement annulée²⁷⁴. Ceci pourrait être dû à un résidu d'interaction hydrophobe, mais également à un changement de structure de la BSA, qui exposerait ainsi des acides aminés hydrophobes, normalement protégés.

Enfin, il pourrait exister une force ionique optimum : lorsque la concentration en NaCl augmente, l'interaction entre la BSA et le galloylglucose est tout d'abord inhibée avant d'être fortement favorisée²⁷³.

3. Influence du pH

L'effet du pH sur les interactions tanins / protéines est extrêmement dépendant des tanins et des protéines utilisés. Alors que le trouble formé par l'interaction d'oligomères avec la PRP ou l' α -amylase n'évolue pas avec le pH, l'inverse est observé avec la BSA²⁵³. De même, l'interaction PRP / tanins condensés est corrélée au pH^{228, 278}.

De plus, si le pH a un effet sur l'interaction, il n'est pas toujours identique à tanin ou protéine constante. A protéine constante (cytochrome *c*), il faut plus d'EGCG à pH 7 qu'à pH 4 pour précipiter la même quantité de protéine, alors qu'il faut moins de catéchine²⁷⁹. Concernant les tanins condensés, augmenter le pH de 4,9 à 7,8 augmente leur affinité avec l'histone de veau, mais diminue celle avec la gélatine²²⁸.

Enfin, pour un couple tannin / protéine donné, l'influence du pH n'est pas linéaire et il existe souvent un pH optimum^{256, 273}. En modélisant l'adsorption des protéines sur des tanins immobilisés, on obtient effectivement une équation de parabole : $\Phi = \alpha(pH)^2 + \beta(pH) + \gamma$ ²⁸⁰, où Φ représente le ratio de protéine qui a réagi, α , β , γ des constantes propres à chaque protéine.

Les premières études s'intéressant au pH ont remarqué que cet optimum correspondait au pI de la protéine²⁸¹, et plusieurs travaux rapportent les mêmes conclusions concernant la BSA avec EC-C²⁷⁶, des tanins condensés^{252, 282} ou leurs oligomères²⁵³, le TGG²⁷³ ou des polyphénols d'huile d'olive²⁸³, de la pepsine avec les tanins²⁸⁰. Cependant, ce n'est pas le cas pour la BSA avec la quercétine²⁸⁴, ou encore, dans leur réaction avec les tanins, de l' α -Amylase, de la mucine, de l'ovalbumine ou du lysozyme²⁸⁰.

Tous les auteurs se rejoignent pour affirmer que le pH influence l'interaction. Celui-ci influe la charge des protéines, mais également celles des groupements hydroxyles des tanins. En observant à quel pH se situe les optimums d'interactions, il est possible de savoir quelles fonctions sont impliquées dans les interactions électrostatiques²⁸⁵.

La concentration joue également un rôle, et Kawamoto suggère que le pH n'influe pas la complexation des tanins et des protéines, mais uniquement la précipitation des complexes formés, tant que le ratio tanin / protéine initial est supérieur au nombre de site de liaison²⁷³. Cette influence de la concentration est également notée dans l'interaction EGCG / mucine : à 180 nmol d'EGCG par g de mucine, la complexation est identique aux pH 7 et 8, alors qu'à 700 nmol d'EGCG, la complexation est plus importante à pH 7 qu'à pH 8²⁸⁶. De même, un changement de pH lors de l'interaction entre des peptides riches en proline et l'EGCG induit un changement de la taille des agrégats mais pas de la constante de dissociation¹⁴⁸.

4. Influence des solvants

En modifiant les solvants du milieu d'interaction, il est possible de modifier les forces mises en jeu. L'utilisation de solvant non-ioniques, anioniques ou cationiques est par exemple efficace pour dissocier les complexes tanins condensés / cytochrome C, amenant le fait que les forces ioniques ne sont pas impliquées dans l'interaction²⁷².

Le N,N-diméthylformamide (DMF - accepteur de liaison hydrogène) et le dioxane (solvent non polaire) dissolvent très bien le trouble formé par la catéchine et la gliadine²³⁸. Ce rôle du DMF, retrouvé également dans l'interaction BSA / tanins condensés, est synonyme de la présence de liaison hydrogène entre tanins et protéines²⁸². Dans cette même étude, l'ajout de méthanol stimule la précipitation et les auteurs concluent à la présence d'une autre force

existante. Pourtant, lorsque l'éthanol, qui affaiblit les liaisons hydrophobes, diminue le trouble formé par l'EGCG et une PRP (II-1)²⁴², il est conclu que les liaisons sont hydrophobes.

A partir des déplacements chimiques obtenus en RMN pour l'interaction entre différents tanins et la prolyproline, il est montré que l'ajout de DMSO diminue l'interaction générale, qui est donc hydrophobe, mais promeut quelques interactions spécifiques sur les prolines, qui sont donc des liaisons hydrogènes¹⁵⁰.

Les paramètres force ionique, pH, température et solvant sont à considérer sous plusieurs angles, et pour ce faire, Siebert propose une équation reliant le trouble formé par l'interaction acide tannique / gliadine au pourcentage d'alcool et au pH²⁸⁷.

5. Influence des polysaccharides

Plusieurs études sont disponibles concernant l'influence des polysaccharides, notamment grâce à son intérêt dans la thématique de la dégustation²⁸⁸. A l'exception du dextrane, la plupart d'entre eux (glucose, arabinogalactan, β -cyclodextrine, gomme arabique, pectine, gomme de xanthane, acide polygalacturonique) conduisent à une solubilisation des complexes tanins / protéines à divers degrés^{277, 289}. Manifestement, les complexes formés avec des tanins condensés de degré de polymérisation élevé sont plus sensibles à l'action des polysaccharides²⁹⁰. Une combinaison de plusieurs approches analytiques (fluorescence, néphélométrie et diffusion de la lumière) a permis de postuler le mécanisme suivant²⁹¹ : dans certains cas, les polysaccharides forment un complexe ternaire en « enveloppant » le complexe tanin / protéine existant. Ceci conduit à une augmentation de la taille des particules en solution, et peut, selon les propriétés du polysaccharide, aboutir à la solubilisation du complexe. Le polysaccharide peut également être en compétition avec les protéines pour complexer les tanins. Le complexe tanin protéine existant est détruit au profit d'un complexe tanin / polysaccharide, la taille des agrégats diminue (figure 14).

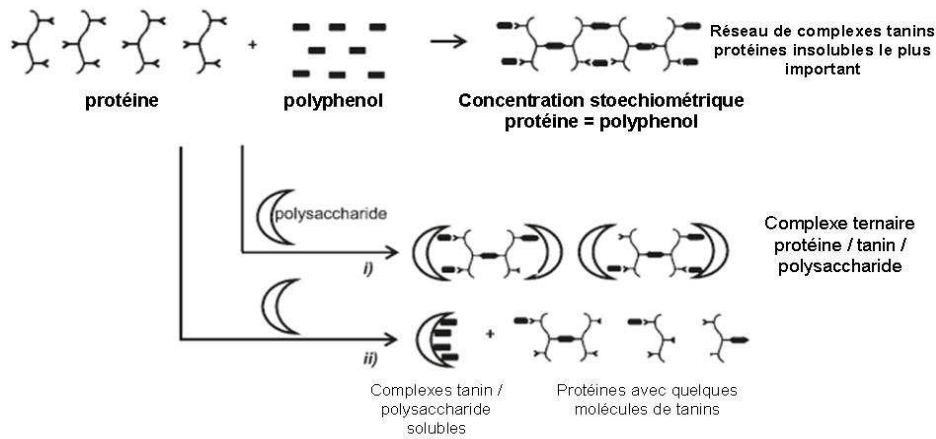


Figure 14: Différents modes d'action possibles des polysaccharides sur les complexes tanins / protéines²⁹¹

C. Mécanisme d'interaction

La quasi-totalité des travaux portant sur l'influence de la concentration en tanin ou en protéine sur l'interaction arrivent à la conclusion que plusieurs phénomènes prennent place selon la quantité de tanins ou de protéines. Quelques uns de ces mécanismes sont repris en figure 15.

Pour beaucoup d'auteurs, l'interaction se déroule en deux parties : une première complexation des tanins avec les protéines, suivie d'une agrégation des complexes à travers les polyphénols, conduisant à leur précipitation^{148, 292-294}. La première étape peut s'accompagner d'une compaction de la taille de la protéine²⁹⁵.

Certains estiment que la précipitation serait due à la création d'une monocouche de tanin autour de la protéine, réduisant la solubilité du complexe²⁵³.

Le trouble formé par la gélatine et l'acide tannique ou encore la gliadine et la catéchine forme une parabole : il augmente jusqu'à une certaine concentration avant de diminuer²³⁸. Selon les auteurs, la concentration correspondant au trouble maximum est celle où la concentration en site d'interaction tanin et protéine est égale, le réseau formé est alors le plus dense. En s'éloignant de cette concentration, tous les sites ne peuvent être occupés, on obtient des agrégats de plus petite taille.

En se basant sur le fait que la taille des agrégats EGCG / PRP augmente subitement à une certaine concentration pour atteindre une taille finie, Pascal *et al* proposent le mécanisme suivant: $mP + nT \leftrightarrow P_m T_n$, correspondant en fait à un équilibre de micellisation, la concentration correspondant à l'augmentation de taille est alors la concentration micellaire critique²⁴².

Dans ces phénomènes d'aggrégation / précipitation, les paramètres importants sont la concentration en protéine et le ratio tanin / protéine.

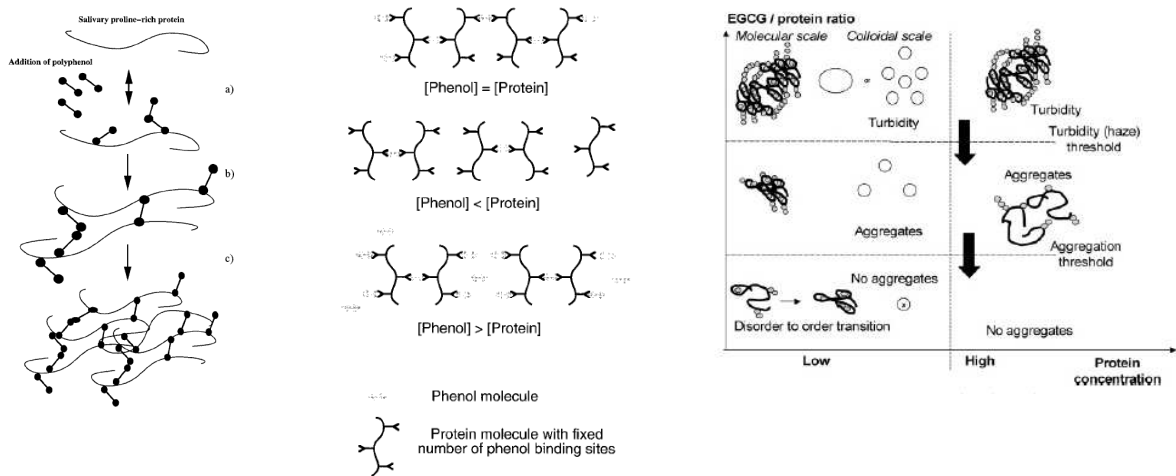


Figure 15 : Les différents mécanismes de réaction proposés (de gauche à droite) par Baxter *et al*¹⁵⁰, Siebert²³⁸ et Pascal *et al*²⁹⁶

IV. Conclusion

La présentation des tanins condensés du vin permet de mieux saisir les spécificités de ces molécules dans ce milieu et la multiplicité de leur rôle. On se demande alors s'il est possible de protéger les tanins condensés du raisin et de sélectionner par l'interaction avec des protéines ceux correspondant à l'effet voulu dans le vin.

L'influence de différents facteurs internes ou externes aux tanins et aux protéines sur leur interaction réciproque montre toute la complexité présentée par ces phénomènes, mêlant divers types de forces et molécules aux multiples propriétés.

La première partie de ces travaux va donc essayer de mettre en avant le mécanisme existant entre la BSA (protéine globulaire) et les tanins condensés, d'étudier l'influence du ratio tanins / protéines, de l'éthanol et du pH sur cette interaction.

Il a été vu qu'il est possible de déterminer l'origine des protéines analysées dans le moût ou le vin, et de remonter aux pratiques conduisant à leur présence. Comprendre la manière dont ces protéines agissent avec les tanins permet ainsi de disposer de meilleurs outils pour la compréhension de leur parcours.

La complexité de la salive, sa composition, l'évolution de ses propriétés avec le temps ou sa grande richesse en protéines peuvent être déroutantes au premier abord. Il est pourtant possible de dégager quelques grands groupes de protéines avec des rôles semble-t-il définis. La question de savoir si la fonction d'une d'entre elles est de précipiter les tanins est cruciale dans la thématique de l'astringence et de la biodisponibilité des tanins.

La deuxième partie de cette étude s'intéresse donc à l'étude de l'interaction entre les tanins et les protéines lors de la vinification, mais surtout lors de la dégustation.

Chapitre II - Matériel et Méthodes

I. Solvants et réactifs

L'eau distillée est purifiée en utilisant un système Milli-Q (Millipore, Bedford, USA).

L'acétone (>95%), l'acétonitrile (HPLC grade, $\geq 99\%$), le chloroforme (HPLC grade, $\geq 99\%$), l'éthanol (HPLC grade, $\geq 99\%$), le butanol (HPLC grade, $\geq 99\%$) et le méthanol (HPLC grade, $\geq 99\%$), proviennent de chez VWR (Fontenay-sous-Bois, France).

L'hydroxyde de sodium, l'acide L-tartrique ($\geq 99,0\%$), l'acide chlorhydrique ($\geq 99,0\%$), l'acide sulfurique ($\geq 99,0\%$), l'acide acétique (> 99.5%), l'acide L-ascorbique, l'acide malique, l'acide lactique, l'acide trichloroacétique (TCA) et l'acide trifluoroacétique (TFA) sont fournis par Sigma Aldrich (St. Quentin Fallavier, France).

Le phloroglucinol, l'acétate de sodium, l'iode, le thiodène et le bleu de bromophenol sont fournis par Sigma Aldrich (St. Quentin Fallavier, France).

Les protéines utilisées (tableau 4) sont des protéines commerciales obtenues chez Sigma Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France) ou chez Laffort Œnologie (Bordeaux, France).

Tableau 4 : Protéines utilisées

Protéine	Masse	Description	Référence	CAS	Fournisseur
BSA	67000	>98%	A7906	9048-46-8	Sigma Aldrich
α -Amylase	60000	10%	A1031	9000-90-2	Sigma Aldrich
Ovalbumine	43000	>98%	A2512	9006-59-1	Sigma Aldrich
β -Glucosidase	135000	≥ 6 unités/mg	49290	9001-22-3	Sigma Aldrich
Thyroglobuline	660000	$\geq 90\%$	T1001	9010-34-8	Sigma Aldrich
Fétuine	48400	>99%	F3004	9014-81-7	Sigma Aldrich
Gélatine	15400		GE 1	9000-70-8	Laffort Œnologie

Les tanins utilisés sont la (+)-catéchine (>98%), Sigma Aldrich (St. Quentin Fallavier, France) et des tanins œnologiques commerciaux *Biotan* fournis par Laffort Œnologie (Bordeaux, France). A fin de les purifier, les tanins œnologiques subissent une extraction liquide-liquide. Cette extraction est suivie d'une caractérisation par phloroglucinolyse (Chapitre IV – Matériel et Méthodes, section I. B), qui permet de les décrire comme présentant une masse moléculaire de 1240 g/mol et un DPm d'environ 4,1.

II. Solution modèle vin

La solution modèle de vin est une solution hydroalcoolique (12% d'éthanol), avec une concentration de 5 g/L en acide L-tartrique. Le pH est ajusté à 3.5 par adition qsp d'une solution d'hydroxyde de sodium 1N.

III. Purification et caractérisation des tanins de pépins utilisés

A. Purification des tanins commerciaux

Les tanins commerciaux de pépin *Biotan* sont extraits selon le protocole suivant : 10 g de tanins sont solubilisés successivement dans un mélange de 15 mL d'éthanol et 200 mL d'eau. Une extraction au chloroforme (3x200 ml) permet d'éliminer les lipides et les chlorophylles et de conserver l'ensemble des polymères, oligomères et monomères de tanins dans la phase aqueuse. La phase aqueuse récupérée est alors concentrée par évaporation sous vide partiel et lyophilisée.

B. Caractérisation des tanins commerciaux

1. Analyse par chromatographie liquide en phase normale

Les analyses en phase normale sont réalisées sur un système de chromatographie Beckman Gold 126 (Beckman Coulter, Roissy, France) équipé avec un autosampler Beckman Gold 508 (Beckman Coulter, Roissy, France) suivi d'un détecteur UV-Vis à barrette de diodes Beckman 168 (Beckman Coulter, Roissy, France), commandé par le logiciel 32Karat 5.0.

La méthode utilisée est celle de Labarbe *et al.* Les conditions d'analyse sont présentées dans le tableau 5.

Tableau 5 : Conditions d'analyse des tanins commerciaux par LC en phase normale

Conditions d'Analyse

Détection	UV-Vis – DAD ($\lambda = 280 \text{ nm}$)														
Colonne	Lichrospher Si 60 (250 x 4 mm, 5 μM) équipée d'une pré-colonne remplie de la même phase (Merck, Allemagne)														
Débit (mL/min)	1,0														
Volume d'injection (μL)	20														
Phase mobile	A : $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}/\text{TFA}$ (10:87,995:2:0,005, v/v) B : $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}/\text{TFA}$ (82:18:2:0,005, v/v)														
Gradient	<table border="1"> <thead> <tr> <th>t, min</th> <th>0</th> <th>50</th> <th>55</th> <th>60</th> <th>65</th> <th>68</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>%B</td> <td>0</td> <td>40</td> <td>55</td> <td>100</td> <td>100</td> <td>0</td> </tr> </tbody> </table>	t, min	0	50	55	60	65	68	%B	0	40	55	100	100	0
t, min	0	50	55	60	65	68									
%B	0	40	55	100	100	0									

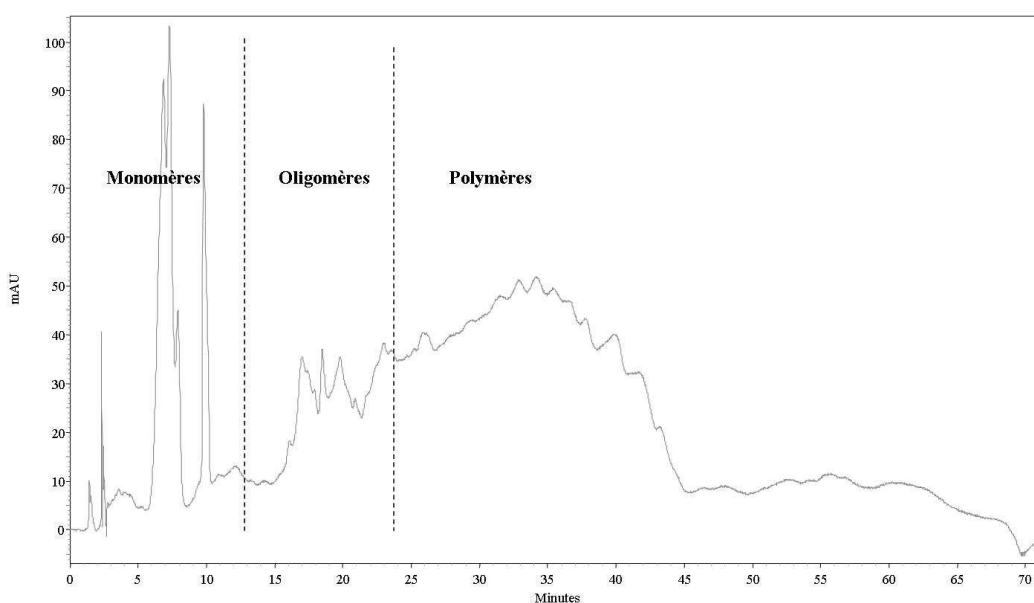


Figure 16 : Séparation des tanins commerciaux par taille moléculaire

Le chromatogramme en phase normale des tanins utilisés est présenté en figure 16. Ce profil est extrêmement semblable à celui de tanins de pépins (Fontoin *et al*). Il est donc possible de considérer les tanins utilisés comme des tanins de pépins de raisins.

2. Caractérisation des tanins utilisés par phloroglucinolyse

a) Préparation du réactif de phloroglucinolyse

La méthode utilisée est adaptée de celle décrite par Kennedy et Jones²⁹⁷.

Le réactif de phloroglucinolyse est préparé en solubilisant 2,5 g de phloroglucinol et 0,5 g de acide L-ascorbique dans 25 mL d'une solution de méthanol acidifié avec de l'acide chlorhydrique (0,1 N).

b) Réaction de phloroglucinolyse

5 mg de tanins sont solubilisés dans 1 mL de réactif de phloroglucinolyse. 200 μ L de ce mélange sont mis à l'étuve à 50°C pendant 20 min. Immédiatement à la sortie de l'étuve, 1 mL de solution d'acétate de sodium (23,6 g/L) est ajouté pour stopper la réaction.

c) Analyse par HPLC-MS

Les analyses sont réalisées sur un appareil de chromatographie liquide Hewlett Packard série 1100 (Hewlett Packard, Agilent, Massy, France) suivi d'un détecteur UV monocanal et d'un spectromètre de masse quadripôle Micromass Plateforme II (Micromass-Waters, St. Quentin en Yvelines, France) équipé d'une source d'ionisation electrospray. Le système HPLC – MS est commandé par le logiciel MassLynx 5.0.

Le détecteur UV enregistre le spectre à une longueur d'onde de 280 nm.

La source ESI est programmée pour opérer à 120°C, en mode négatif, avec un voltage de capillaire de -3.5 kV et une tension de cône de -30 eV.

Les spectres de masses sont enregistrés en *full scan* de 100 à 1500 m/z. L'identification des différents composés est accomplie en recherchant, en SIM, les masses moléculaires d'ionisation spécifiques de chaque molécule (tableau 6) et en vérifiant l'ordre d'élution publiée dans la littérature³⁶⁹.

Tableau 6 : Composés formés lors de la réaction de phloroglucinolyse et ses temps de rétention et masses moléculaires d'ionisation spécifiques.

Temps de rétention, min	Composés	$[M-H]^-$ m/z	ϵ , L mol ⁻¹ cm ⁻¹
3.42	adduit (+)-catéchine-phloroglucinol (C-P)	313	4218
3.85	adduit (-)-épicatéchine-phloroglucinol (EC-P)	313	4218
4.55	(+)-catéchine (C)	289	3988

5.80	(-)-épicatéchine (EC)	289	3988
7.83	adduit (-)-épicatéchine gallate-phloroglucinol (ECG-P)	581	14766
9.90	(-)-épicatéchine gallate (ECG)	441	12611

D'autres conditions d'analyse sont présentées dans le tableau 7.

Tableau 7: Conditions chromatographiques

Conditions d'Analyse																	
Colonne	Waters® XTerra RP18 (4,6 mm x 100 mm x 3,5 µm) (Fisher Bioblock, France)																
Débit (mL/min)	0,5																
Volume d'injection (µL)	20																
Phase mobile	A : H ₂ O/CH ₃ COOH (99:9, v/v) B : CH ₃ CN/ CH ₃ COOH (99:9, v/v)																
Gradient	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left;">t, min</th> <th style="text-align: center;">0</th> <th style="text-align: center;">6</th> <th style="text-align: center;">14</th> <th style="text-align: center;">15</th> <th style="text-align: center;">18</th> <th style="text-align: center;">19</th> <th style="text-align: center;">23</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <th style="text-align: left;">%B</th> <td style="text-align: center;">5</td> <td style="text-align: center;">15</td> <td style="text-align: center;">40</td> <td style="text-align: center;">100</td> <td style="text-align: center;">100</td> <td style="text-align: center;">5</td> <td style="text-align: center;">5</td> </tr> </tbody> </table>	t, min	0	6	14	15	18	19	23	%B	5	15	40	100	100	5	5
t, min	0	6	14	15	18	19	23										
%B	5	15	40	100	100	5	5										

Le chromatogramme correspondant à l'analyse des tanins commerciaux après phloroglucinolyse est représenté dans la figure 17.

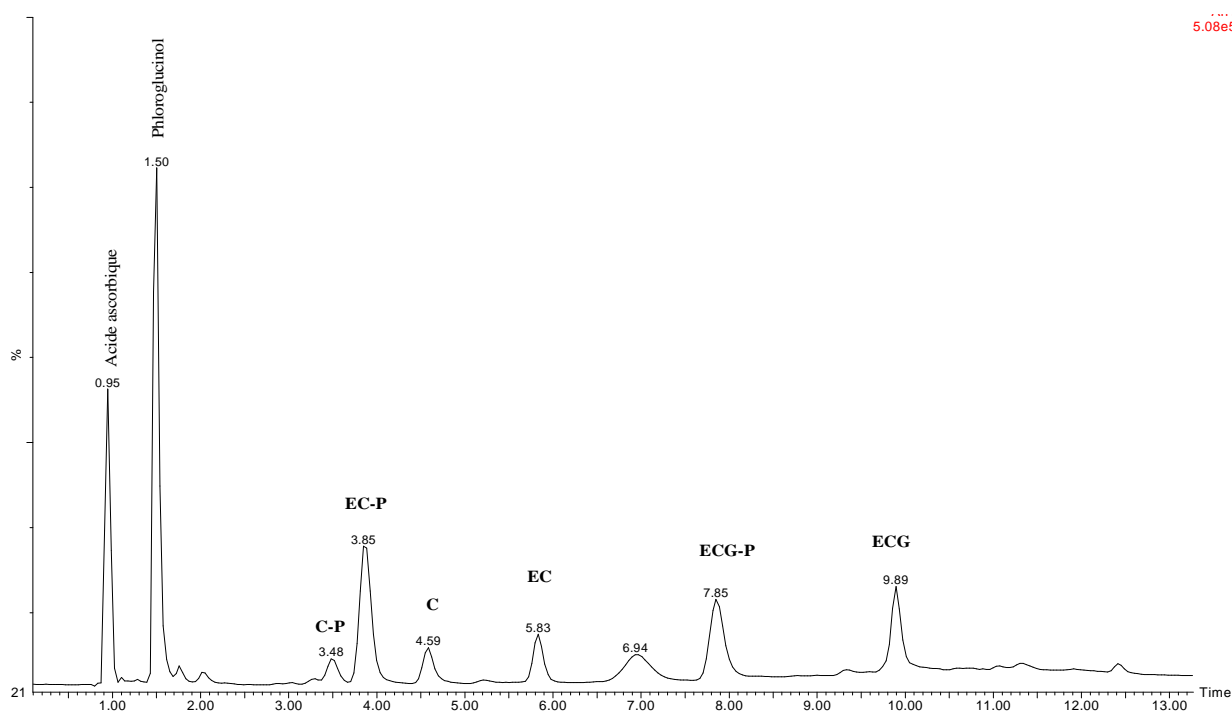


Figure 17 : Chromatogramme illustratif de la séparation des unités terminales et des adduits des tanins commerciaux après phloroglucinyse.

vi. Calcul du DPm et du pourcentage de gallates

La détermination de la concentration de chaque composé est réalisée utilisant les coefficients de réponse déterminés par Kennedy et Jones³⁶⁹ (tableau 6). Pour la validation analytique, la (+)-catéchine est considéré comme référence et les autres composés sont dosés par rapport à celle-ci.

Le calcul du DPm e du pourcentage de gallates se fait à partir des équations suivantes :

$$DPm = \frac{\Sigma[\text{adduits}] + \Sigma[\text{unités terminales}]}{\Sigma[\text{unités terminales}]}$$

$$\% \text{ gallates} = \frac{\Sigma[\text{composés galates}]}{\Sigma[\text{adduits}] + \Sigma[\text{unités terminales}]}$$

La caractérisation de l'extrait de tanins de pépins utilisé est présentée dans le tableau 8.

Tableau 8 : Caractérisation des tanins commerciaux par phloroglucinyse.

Composition générale, %		Unités terminales, %			Unités d'extension, %					
Masse moléculaire	DPm	C	EC	ECG	C	EC	ECG	C	EC	ECG
1240 g/mol	4.1	17.2	40.8	42.0	38.7	47.9	13.4	6.4	36.7	57.2

IV. Protocole de l'interaction tanins / protéines pour l'étude à l'équilibre

L'étude des interactions tanins / protéines à l'équilibre est faite en utilisant l'extrait de tanins de pépins et les protéines présentées dans le tableau 8.

A. Principe de la technique utilisée

Le principe de l'analyse est le suivant:

1. Chacune des protéines est amenée à réagir avec l'extrait de tanins de pépins à différentes concentrations
2. Au bout de 24 heures, les échantillons sont centrifugés, le surnageant est analysé par HPLC-UV/Vis
3. L'analyse HPLC donne accès aux quantités de tanins et de protéines qui n'ont pas précipité sur un même chromatogramme. Par différence, il est possible de déterminer les quantités qui ont précipité.

B. Préparation des échantillons

Pour l'étude à l'état stationnaire, des solutions de tanins et de protéine dont la concentration est le double de la concentration finale désirée sont préparées en solution modèle vin.

500 μ L de solution de tanins et 500 μ L de solution de protéine sont pipetés dans un Eppendorf de 1,5 mL. Les échantillons sont alors agités et laissés au repos, à l'abri de la lumière et à température ambiante pendant 24 heures. Cette procédure est répétée pour chacune de protéines étudiées.

C. Centrifugation des échantillons et prélèvement du surnageant

Les échantillons sont centrifugés 5 min à 4500 rpm dans une centrifugeuse Sigma 2.15 (Sigma Aldrich, St. Quentin Fallavier, France).

Le surnageant est alors prélevé à l'aide d'une seringue Terumo de 1 mL (ADL Prochilab, Bordeaux, France) et filtré sur des filtres pour seringue Minisart, Sartorius (ADL Prochilab, Bordeaux, France) en cellulose régénérée de 0,45 μ M avant d'être analysé par HPLC-UV/Vis.

D. Analyse par HPLC

Les analyses sont réalisées soit sur un système HPLC Beckman décrit précédemment soit sur un appareil de chromatographie liquide Finnigan série Surveyor (Thermo, Electron Corporation, USA) composé d'un module de pompes Finnigan 82026, d'un passeur d'échantillons Finnigan, 82067, d'un détecteur à barrette de diodes PDA - Finnigan, 81021. Le système est commandé par le logiciel Xcalibur (Thermo, Electron Corporation). Les conditions d'analyses sont décrites dans le tableau 9.

Tableau 9: Conditions de l'analyse des tanins et des protéines du surnageant.

Conditions d'Analyse																							
Détection	UV-Vis – DAD ($\lambda = 210, 230$ et 280 nm)																						
Colonne	PLRP-S (4000 Å, 50 x 2,1 mm, 5 μ m, Polymer Labs, UK)																						
Débit (mL/min)	0,5																						
Volume d'injection (μL)	20																						
Phase mobile	A : H ₂ O/TFA (99,9:0,1, v/v) B : CH ₃ CN/ TFA (99,9:0,1, v/v)																						
Gradient	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left;">t, min</th> <th>0</th> <th>1</th> <th>3</th> <th>8</th> <th>10</th> <th>14</th> <th>16</th> <th>22</th> <th>24</th> <th>27</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: left;">%B</td> <td>3</td> <td>3</td> <td>30</td> <td>30</td> <td>50</td> <td>50</td> <td>97</td> <td>97</td> <td>3</td> <td>3</td> </tr> </tbody> </table>	t, min	0	1	3	8	10	14	16	22	24	27	%B	3	3	30	30	50	50	97	97	3	3
t, min	0	1	3	8	10	14	16	22	24	27													
%B	3	3	30	30	50	50	97	97	3	3													

Chaque analyse des surnageants par HPLC est accompagnée d'une calibration (injection de 5 standards de concentrations croissantes) des tanins et de la protéine en question.

1. Chromatogramme obtenu par détection UV

Le chromatogramme (figure 18) présente deux pics, le premier pour les tanins à $t = 7$ minutes, le second pour les protéines à $t = 13$ minutes.

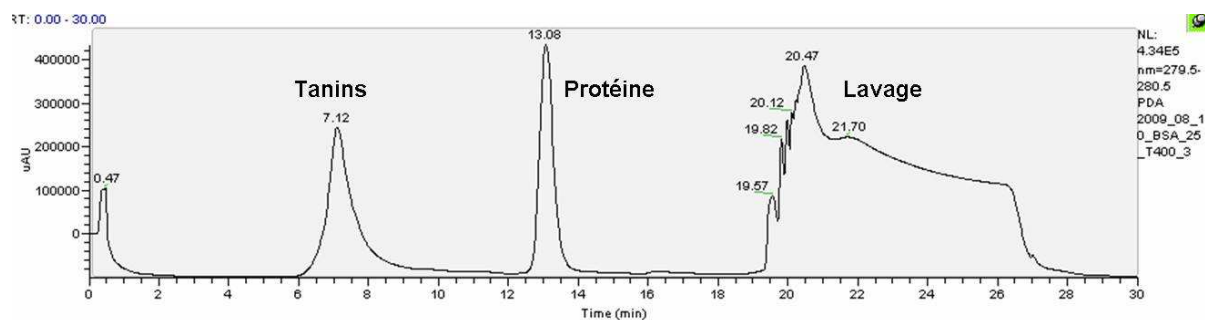


Figure 18: chromatogramme représentatif de l'analyse du surnageant de l'interaction entre l'extrait de tanins de pépins et la protéine.

2. Calibration des tanins

Une courbe de calibration est réalisée sur chaque appareil (Tableau 10). Dix solutions de concentration croissante sont injectées en triplicat.

Lors de chaque série d'analyses, 5 points de cette courbe de calibration sont réalisés pour en vérifier la cohérence.

Tableau 10: propriétés des courbes de calibrations des tanins. Les limites de détection (LD) et limites de quantification (LQ) sont déterminées selon la résolution Oeno 7/2000 de l'OIV.

Appareil	Equation	LD, mg/L	LQ, mg/L	R ²
Beckman	25462x - 2E+06	1.22	4.07	0.99
Thermo	9.26E-06x + 5.67E+00	2.16	7.19	0.99

3. Calibration des protéines

Une courbe de calibration est réalisée pour chaque protéine lors de chaque titration. 5 solutions de concentrations croissantes sont injectées en triplicata.

Les propriétés des courbes de calibration pour les différentes protéines utilisées sont présentées dans le tableau 11.

Tableau 11: Propriétés des courbes de calibration des différentes protéines. Les limites de détection (LD) et limites de quantification (LQ) sont déterminées selon la résolution Oeno 7/2000 de l'OIV.

Composé	Appareil	Equation	LD, μM	LQ, μM	R ²
BSA	Thermo	$9.26\text{E-}06x + 5.67\text{E+}00$	0.41	1.34	0.99
Gélatine	Thermo	$6.44\text{E-}07x - 2.84\text{E+}00$	0.08	0.27	0.99
α -Amylase	Thermo	$8.92\text{E-}05x + 5.54\text{E-}01$	0.78	2.60	0.97
Ovalbumine	Beckmann	$4.26\text{E-}05x + 4.63\text{E+}00$	0.45	1.50	0.99
β -Glucosidase	Beckmann	$5.45\text{E-}06x - 3.87\text{E+}00$	0.42	1.40	0.96
Thyroglobuline	Beckmann	$7.23\text{E-}06x + 3.76\text{E-}01$	0.81	2.70	0/97
Fétuine	Thermo	$6.09\text{E-}06x + 1.16\text{E-}01$	0.17	0.57	0.98

4. Validation de la méthode utilisée

Pour vérifier la cohérence de la méthode utilisée, le dosage des tanins avant et après réaction avec la BSA a également été suivi par l'indice de Folin-Ciocalteu. La relation obtenue permet de montrer que l'aire du pic est bien corrélée avec la concentration en tanin.

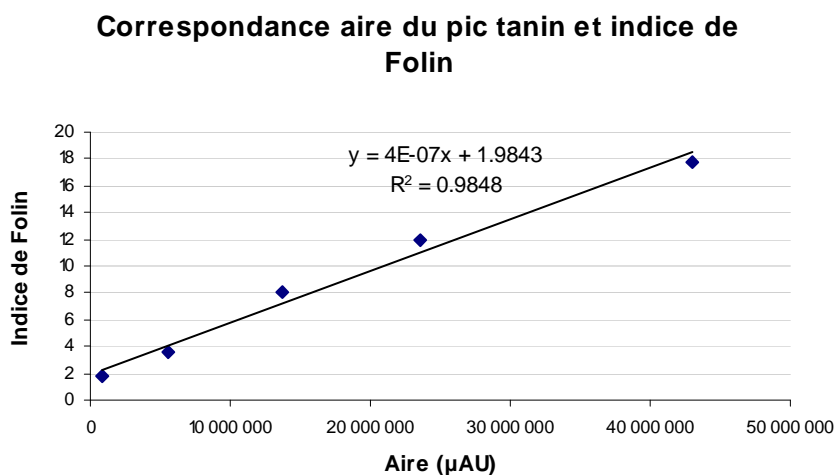


Figure 19 : Correspondance entre l'aire du pic de tanin et la valeur de l'indice de Folin-Ciocalteu obtenus pour une même quantité de tanins.

V. Turbidimétrie

A. Matériel utilisé

Les analyses sont réalisées sur un turbidimètre Hach 2100 N (Hach Company, Loveland, USA). Les étalons sont des solutions de formazine fournies avec l'appareil correspondant à 0,1 / 20/ 200/ 1000 et 4000 NTU.

B. Protocole

Des solutions d'extraits de tanins de pépins et de protéines dont la concentration est le double de la concentration finale désirée sont préparées en solution modèle vin.

15 mL de la solution de tanin est versée dans un tube de 30 mL. Celui-ci est inséré dans le turbidimètre. 15 mL de la solution de protéine sont alors ajoutés, le moment de cet ajout correspondant au temps 0. La valeur de turbidité est alors relevé au temps suivant : 10, 20, 30, 40, 50, 60, 90 secondes, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 30 minutes, 1, 2, 3, 4, 8, 24, 48 ... heures.

Les tubes sont agités 30 secondes avant chaque mesure à partir de la première minute.

VI. Analyse des tanins et des protéines lors de la dégustation

A. Prélèvement de salive

La salive est prélevée sur 30 sujets volontaires, tous étudiants à la Faculté d'Œnologie de Bordeaux. Les prélèvements on lieu à la fin d'une séance de détermination de seuil olfactif, avant laquelle il est demandé aux étudiants de ne pas boire de café ou de fumer, pour ne pas perturber leur perception olfactive.

Les sujets sont invités à se rincer tout d'abord trois fois la bouche avec de l'eau du robinet. Ils doivent ensuite produire environ 2 mL de salive dans un pot en plastique avec une indication du volume idéal à fournir.

Les personnes le désirant avaient la possibilité de mastiquer un morceau de parafilm pour les aider à saliver.

Il a également été demandé à chaque personne de signer une décharge concernant l'utilisation de sa salive à fin de recherche scientifique et de publication.

B. Création d'une salive « moyenne »

Chaque échantillon de salive a ensuite été filtré sur des filtres pour seringue Minisart, Sartorius (ADL Prochilab, Bordeaux, France) en cellulose régénérée de 0,45 µM. 200 µL de chaque échantillon de salive ont alors été mis en commun. Environ 5 mL de salive « moyenne » ont ainsi été obtenus.

C. Dégustation « in vitro »

1. Réalisation de la dégustation

Le protocole de dégustation « in vitro » est le suivant: 500 µL de salive sont ajoutés à 25 mL de solution d'extraits de tanins de pépins ou de vin à différentes dilutions dans des tubes de 100 mL en verre résistant à la centrifugation (Fischer Bioblock, Strasbourg, France) qui sont alors agités. Après 24h de repos, les échantillons sont centrifugés pendant 5 minutes à 4500 rpm et le surnageant est prélevé.

2. Extraction des protéines de la salive

3,75 mL d'acide trichloroacétique sont ajoutés à chaque échantillon qui, après 30 minutes dans un bain de glace, est laissé au repos pendant 8 h minimum. Les échantillons sont alors de nouveau centrifugés pendant 5 minutes, à 4500 rpm. Le précipité est lavé à l'acétone puis séché à l'air libre.

3. Analyse des protéines de salive

Les gels 2D de protéines ont été réalisés par le Pôle Protéomique de l'Université Bordeaux 2 selon le protocole suivant.

Environ 200 mg de protéines sont mixés dans 160 mL de tampon IPG (7 M urée, 2 M thiourée, 2% 3-[N,N-diméthyl(3-myristoylamino)propyl]ammonium]propanesulfonate (ASB-14), 25 mM dithiothreitol, 0.01% bleu de bromophénol, 1 %, v/v, carrier ampholytes 3-10 Invitrogen).

Les échantillons ont alors été soniqués puis centrifugés (5000 g, 5 min, 20 uC), chargés sur des bandes IPG ZOOM 3-10 NL (Invitrogen) et laissés migrer pour la nuit, avec les paramètres FIE suivant: (i) 200 V pour 20 min, (ii) 450 V pour 15 min, (iii) 750 V pour 15 min, et (iv) 2000 V pour 30 min.

Les bandes ont ensuite été équilibrées dans le tampon I (6 M urea; 50 mM Tris; 2% SDS; 30% glycerol; 50 mM dithiothreitol) puis le tampon II (6 M urea; 50 mM, Tris; 2% SDS; 30% glycerol; 125 mM iodoacetamide)

La séparation dans la seconde dimension a été réalisée sur SDS-PAGE (12% polyacrylamide) pendant 2 heures sous une tension constante de 120 V.

Les gels contenant des protéines ont alors été teinté avec du bleu de Coomassie brillant G-250.

VII. Analyse des tanins et des protéines lors de la vinification

A. Microvinification

1. Premier essai

Le premier essai de vinification s'est déroulé en Septembre 2008 avec du Cabernet Franc provenant de l'Union des Producteurs de Saint-Émilion, vendange manuelle. 4 cuves (20 litres) ont été remplies de 10 kg de raisin foulé et éraflé chacune. Dans deux d'entre elles, 4 g de tanin œnologique commerciaux Laffort Œnologie ont été ajoutés immédiatement après encuvage (40 g/h). 24 heures après encuvage, 2 g de levure X15, Laffort Œnologie sont ajoutés à chaque cuve.

2. Second essai

Un second essai de vinification s'est déroulé en Février 2009. Le raisin était du Cabernet Sauvignon provenant d'une propriété Sud-Africaine, vendange manuelle. Ce raisin a été sulfité avant d'être envoyé par avion dans des caisses isothermes avec de la carboglace. A la réception, les grappes ont été immédiatement triées, entreposées en chambre froide à 4°C avant la microvinification.

5 cuves ont été remplies de 10 kg de raisin foulé et éraflé chacune. Dans deux d'entre elles, 4 g de tanin œnologique commerciaux Laffort Œnologie ont été ajoutés immédiatement après encuvage (40 g/hl). 24 heures après encuvage, 2 g de levure X15, Laffort Œnologie sont ajoutés à chaque cuve.

De plus, les cuves ont été inoculées avec des bactéries Laffort Œnologie à la fin de la fermentation alcoolique pour permettre à la fermentation malolactique de démarrer.

3. Prélèvements

100 mL de moût ont été prélevés à plusieurs reprises à intervalles réguliers. Immédiatement après encuvage, 30 minutes, 1h, 2h, 3h, 5h, 8h après encuvage et tous les jours ensuite. De plus, un prélèvement a systématiquement été effectué avant et après chaque opération œnologique (tanisage, levurage, inoculation).

Le moût prélevé est immédiatement centrifugé (4500 rpm, 5 min) et 5 mg de pimariscine sont ajoutés avant congélation à -20°C

Lors de ces prélèvements, une quantité de marc a été retirée de la cuve pour conserver un ratio marc / moût constant.

a) Suivi de la densité

Le suivi de la densité a été effectué chaque jour à l'aide d'un densimètre manuel.

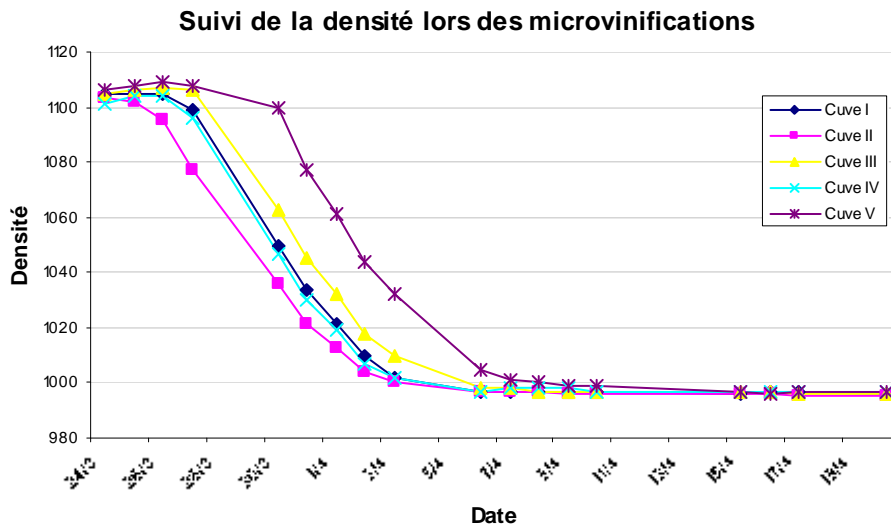


Figure 20: Suivi de la densité lors des microvinifications

b) Dosage du SO_2 libre

Le SO_2 libre a été dosé par la méthode de Rippert, selon le traité d'œnologie. Pour cela on détermine la différence d'iode nécessaire pour titrer 10 ml de vin avec 1 mL de thiodène et 1 mL d'acide sulfurique et la même solution supplémentée de quelques gouttes d'eau oxygénée.

c) Dosage de l'acide malique

Le dosage de l'acide malique (suivi de la fermentation malolactique) est réalisé par chromatographie sur couche mince selon le traité d'œnologie. Le solvant d'élution est

composé de 40 mL de butanol à 1 g/L de BBP et 20 mL d'acide acétique à 50%. Les témoins sont de l'acide malique à différentes concentrations.

B. Analyse des tanins du moût

1. Purification des tanins du moût : SPE

Pour pouvoir analyser les tanins, chaque prélèvement de moût a tout d'abord été purifié par extraction sur phase solide, adaptée de ²⁹⁸. Des colonnes de 6 mL contenant 1 mL de gel C18 sont utilisées (Supelclean LC18, Supelco). La colonne est conditionnée au méthanol (5mL) et lavée à l'eau (8 mL) avant que ne soit déposés 3 mL de moût (après centrifugation, comme expliqué précédemment). Celui-ci est premièrement élué avec 8 mL d'eau, puis 5 mL de méthanol. La fraction méthanol est récupérée puis concentrée 5 fois sur un évaporateur speed vac.

2. Analyse des tanins du moût par phloroglucynolise

100 µL d'extraits de moûts préparés comme indiqué précédemment sont additionnés de 100 µL de réactif de phloroglucinolyse. Ce mélange est placé à l'étuve à 50°C pendant 20 min. Immédiatement à la sortie de l'étuve, 1 mL de solution d'acétate de sodium (23,6 g/L) est ajouté pour stopper la réaction.

L'analyse HPLC-MS est alors la même que celle décrite pour la phloroglucynolise des tanins commerciaux.

Un exemple de chromatogramme obtenu est présenté en figure 21 . Les temps de rétention correspondant aux différents composés sont donnés dans le tableau 12. Ces temps de rétention évoluent au cours de la microvinification, et on été confirmé par spectrométrie de masse lorsque cela s'est avéré nécessaire.

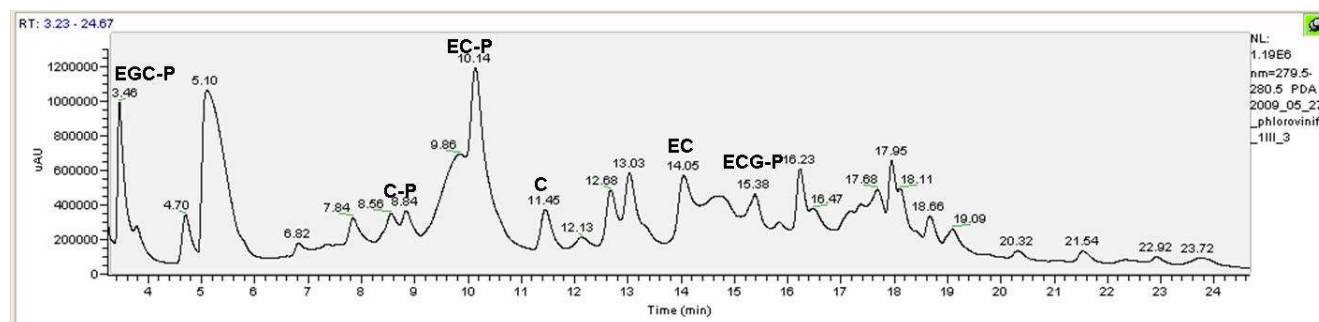


Figure 21: Chromatogramme obtenu lors de l'analyse des moûts par phloroglucynolise.

Tableau 12: Composés de phloroglucynolise

Temps de retention, min	Composés	$[M-H]^-$ m/z	ϵ , L mol ⁻¹ cm ⁻¹
3.45	adduit (+)-catéchine-phloroglucinol (C-P)	313	4218
3.85	adduit (-)-épicatéchine-phloroglucinol (EC-P)	313	4218
4.55	(+)-catéchine (C)	289	3988
5.80	(-)-épicatéchine (EC)	289	3988
7.83	adduit (-)-épicatéchine gallate-phloroglucinol (ECG-P)	581	14766
9.90	(-)-épicatéchine gallate (ECG)	441	12611

C. Analyse des protéines du moût

1. Dosage des protéines du moût par tamisage moléculaire

Le dosage des protéines par tamisage moléculaire a été réalisé par le laboratoire SARCO. La méthode employée est celle du tamisage moléculaire (Dubourdiou et al, 1986). Le moût est injecté directement.

Les macromolécules sont fractionnées selon leur poids moléculaire par HPLC sur gel TSK G2000 SW (LKB) (0,75 x 60 cm, 10 μ M) précédé d'une colonne de dessalage (gel Trisacryl GF05, IBF) au seuil d'exclusion de 3000 Da. La zone de fractionnement est de 10 à 70 000 Da. Les macromolécules sont ainsi séparées des autres constituants par chromatographie d'exclusion sur la première colonne puis par chromatographie de tamisage moléculaire sur la seconde. Les protéines sont détectées par spectrophotométrie à 22 nM.

Les conditions d'analyse sont les suivantes:

Volume injecté : 100 μ L

Débit 0,6 mL/min

Pression : 10 bars

Eluant: NaCl 0,1 M

La concentration en protéine des échantillons est évaluée par une droite étalon obtenue à l'aide de la BSA.

2. Analyse des protéines du moût sur gel monodimensionnel

a) *Extraction des protéines*

L'extraction des protéines se fait à partir des 25 mL de moût centrifugés (traitement décrit précédemment). 3,75 mL de TCA sont ajoutés à l'échantillon qui est laissé 30 minutes dans la glace avant de reposer pour 8 heures minimum.

Les échantillons sont alors centrifugés (4500 rpm, 5 minutes) et le précipité est alors lavé avec 25 mL d'acétone puis séché à l'air libre.

b) *Analyse des protéines*

Les gels monodimensionnels de protéines ont été réalisés par le Pôle Protéomique de l'Université Bordeaux 2 selon le protocole suivant.

Environ 200 mg de protéines sont mixés dans 160 mL de tampon IPG (7 M urée, 2 M thiourée, 2% 3-[N,N-diméthyl(3-myristoylamino)propyl]ammonium]propanesulfonate (ASB-14), 25 mM dithiothreitol, 0.01% bleu de bromophénol, 1 %, v/v, carrier ampholytes 3-10 Invitrogen).

Les échantillons ont alors été soniqués puis centrifugés (5000 g, 5 min, 20 uC), chargés sur des bandes IPG ZOOM 3-10 NL (Invitrogen) et laissés migrer pour la nuit, avec les paramètres FIE suivant: (i) 200 V pour 20 min, (ii) 450 V pour 15 min, (iii) 750 V pour 15 min, et (iv) 2000 V pour 30 min.

Chapitre III : Etude de l'interaction tanins condensés / BSA

I. Introduction

L'albumine sérique bovine (BSA) est une protéine globulaire de 583 acides aminés pauvre en proline²⁹⁹, largement utilisée en recherche de par son analogie structurale avec l'albumine sérique humaine³⁰⁰. C'est également le cas dans les études des interactions tanins / protéines, où il semblerait qu'elle soit un bon modèle pour prédire l'interaction²⁵². Elle est souvent utilisée comme référence pour comparer la réactivité de différent tanins^{231, 252, 283}, l'influence de leur structure (degré de polymérisation^{74, 255}, glycosylation^{267, 301}, hydroxylation^{262, 302}). Elle a été utilisée pour la comparaison de plusieurs protéines⁷⁴ ou la mise au point de méthodes^{303, 304}. L'influence de plusieurs facteurs sur l'interaction tanin / protéine comme le pH²⁷³ ou l'influence des sucres³⁰⁵ a été établie en utilisant la BSA.

Cependant, à notre connaissance, aucune étude ne s'est attachée à étudier précisément le mode d'interaction entre la BSA et les tanins condensés. Pour essayer de déterminer plus exactement le mécanisme de cette interaction, l'influence du ratio tanin / protéine, du pH, du pourcentage d'éthanol sur la cinétique et l'équilibre de la réaction vont être étudiés.

Dans une première partie consacrée à l'état à l'équilibre, l'étude du ratio tanins / BSA dans le précipité selon le ratio initial est couplée à l'utilisation d'isothermes d'adsorption. Ceci permet de mettre en avant l'existence d'un ratio de part et d'autre duquel les mécanismes d'interaction diffèrent. La cinétique de l'interaction abordée ensuite montre l'influence de ce même ratio sur les ordres cinétiques partiels de réaction, permettant de compléter la compréhension des mécanismes, particulièrement en ce qui concerne la dénaturation de la BSA sous l'effet des tanins. Enfin, toutes les données obtenues sont intégrées pour aboutir à une proposition de mécanisme entre les tanins condensés et la BSA selon leurs quantités respectives dans les conditions du vin.

II. Etude à l'équilibre

Toutes les expériences décrites dans cette partie ont été réalisées en solution modèle vin (12% éthanol, 5g/L d'acide tartrique, pH 3,5). Pour être sûr d'être à l'équilibre, tanins et protéines sont laissés en contact pendant 24 heures au minimum. Ils sont ensuite centrifugés et le surnageant analysé par HPLC, comme décrit au chapitre matériel et méthodes.

A. Influence du ratio tanin-protéine

Pour étudier l'influence des quantités de tanins et de protéines initiales, l'interaction a été réalisée entre 8 concentrations en BSA (de 1,5 à 150 μM) et 11 concentrations en tanins (de 8 à 4000 μM).

1. Ajout de tanin à une quantité fixe de BSA

Dans cette partie, est considérée une quantité fixe de protéine à laquelle sont ajoutées des concentrations croissantes de tanins.

a) Détermination de la BSA précipitée

La Figure 22 présente le pourcentage de BSA précipitée lorsque 37,5 μM de BSA sont mis en contact avec différentes quantités de tanins. Ce pourcentage augmente avec la concentration en tanin, pour atteindre 100%, c'est-à-dire que l'intégralité de la BSA est précipitée lorsque 4 mM de tannin sont ajoutés.

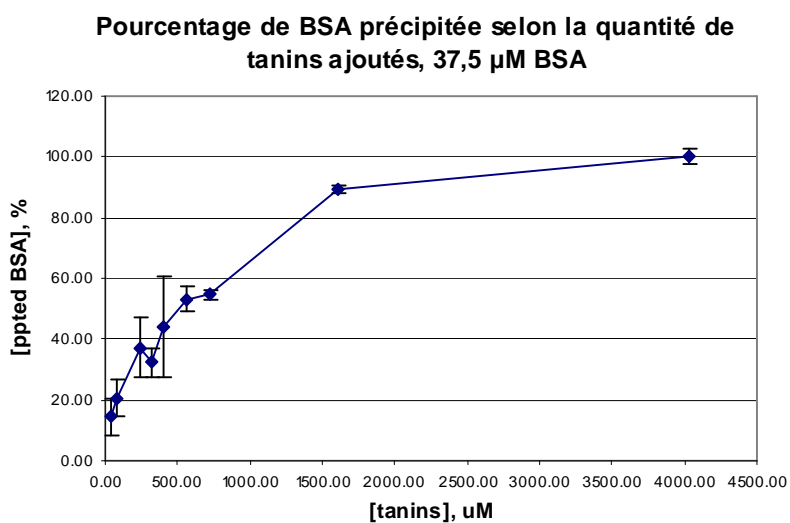


Figure 22 : Pourcentage de BSA précipitée lorsque 37,5 μM de BSA sont mis en contact avec différentes quantités de tanins

Lorsque la quantité initiale de BSA augmente, la quantité de tanin nécessaire à la précipitation totale augmente également, comme cela peut se constater sur la Figure 23. Cependant, dans notre gamme de concentration en BSA, il est toujours possible de précipiter l'intégralité de la BSA présente.

La concentration en tanin minimum requise pour faire précipiter l'intégralité de la BSA est désigné $[T]^*$. Les valeurs de $[T]^*$, reprises dans le tableau 13, permettent de visualiser l'évolution de cette quantité nécessaire selon la quantité de BSA.

Tableau 13 : Intervalle de concentration en tanin auquel appartient $[T]^*$, la quantité nécessaire pour précipité l'intégralité de la protéine

$[BSA]$ (μM)	$[T]^*$ appartient à (μM)
1.5	80-240
3.75	80-240
7.5	320-400
15	560-725
37.5	1600-4000
75	1600-4000
112.5	1600-4000
150	1600-4000

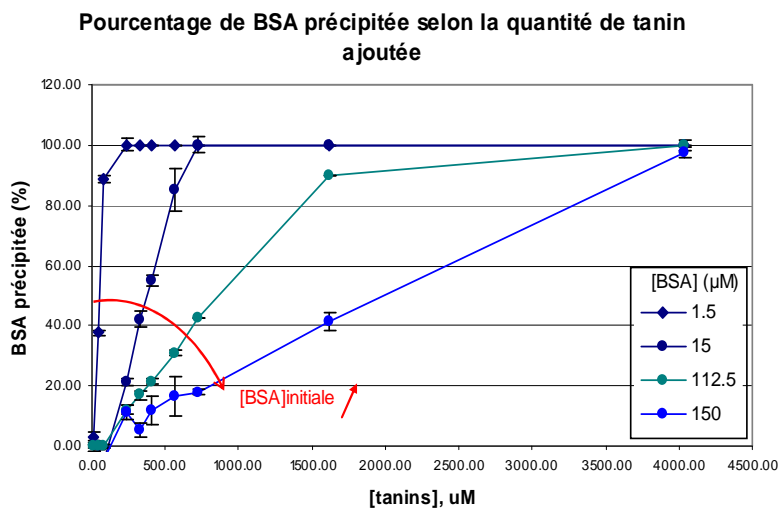


Figure 23 : Pourcentage de BSA précipitée lorsque différentes quantités de BSA réagissent avec les tanins.

b) Détermination des tanins précipités

La quantité de tanins précipités évolue quasiment linéairement en fonction de la quantité de tanin initiale pour 37,5 μM BSA (figure 24). Le même comportement est observé avec une plus ou moins bonne corrélation pour toutes les concentrations en protéine. Dans tous les cas, le pente de la courbe est inférieure à 1 (0,8 au maximum), ce qui traduit le fait que la totalité des tanins n'est pas précipité, et ce quelque soit la concentration en tannin ou en protéine.

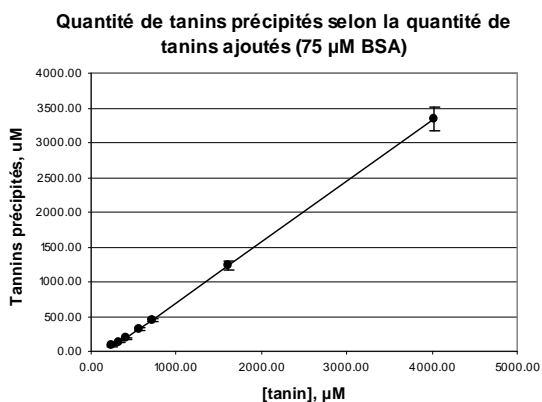


Figure 24 : Quantité de tanins précipités par 75 μM de BSA selon la quantité de tanins ajoutés.

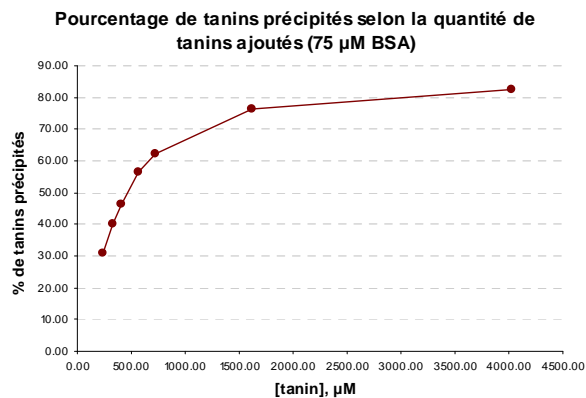


Figure 25 : Pourcentage de tanins précipités par différentes quantités de BSA selon la quantité de tanins ajoutés

Pour mieux appréhender ce phénomène, le pourcentage de tanin précipité est tracé en fonction de la quantité de tanin initiale en figure 25. Il ressort que le pourcentage de tanins précipités atteint une valeur constante à partir d'une certaine concentration en tanins. Cette stabilisation peut se prévoir à partir de la figure 24, car c'est une droite d'équation $[T]_p = a.[T]_i + b$, ce qui donne $\frac{[T]_p}{[T]_i} = a + \frac{b}{[T]_i}$, $[T]_p$ étant la quantité de tanins précipités, $[T]_i$ la quantité de tanins initiale. La valeur de $b / [T]_i$ va donc très vite tendre vers 0, et le pourcentage devient constant.

Ce résultat évoque l'idée d'un équilibre entre tanins précipités avec la BSA et tanins en solution.

Les conclusions suivantes peuvent être tirées:

- Il n'existe pas de quantité de tanin fixe précipitant sous l'effet d'une quantité fixe de BSA : l'augmentation de la quantité initiale provoque toujours une augmentation de la quantité précipitée
- Il est impossible de précipiter la totalité des tanins présents

c) Ajout de tanins à une quantité fixe de BSA : conclusion

Lorsque des tanins sont ajoutés à une quantité fixée de BSA,

- La quantité de BSA précipitée augmente graduellement avec la concentration en tanin, et il est possible de précipiter l'intégralité de la BSA lorsque la concentration en tanin est supérieure à $[T]^*$.
- Quelque soit la concentration en BSA, il est toujours possible d'augmenter la quantité de tanins précipités en augmentant la quantité de tanins ajoutés
- Lorsque la concentration en tanins augmente, le pourcentage de tanin précipité est constant quelque soit la quantité de tanin ajoutés.

2. Ajout de BSA à une quantité fixe de tanin

Considérons maintenant une quantité fixe de tanins à laquelle est ajoutée de la BSA.

a) Détermination de la BSA précipitée

La courbe de la quantité de BSA précipitée en fonction de la quantité de BSA ajoutée (figure 26) peut se diviser en deux parties. Pour des concentrations en BSA inférieure à une concentration $[BSA]^*$, la quantité précipitée est égale à la quantité initiale. Puis, lorsque la

concentration initiale est supérieure à $[BSA]^*$, la quantité précipitée augmente légèrement et reste stable. Plus la concentration en tanin est élevée, plus la quantité $[BSA]^*$ est grande, elle n'apparaît plus sur le graphique.

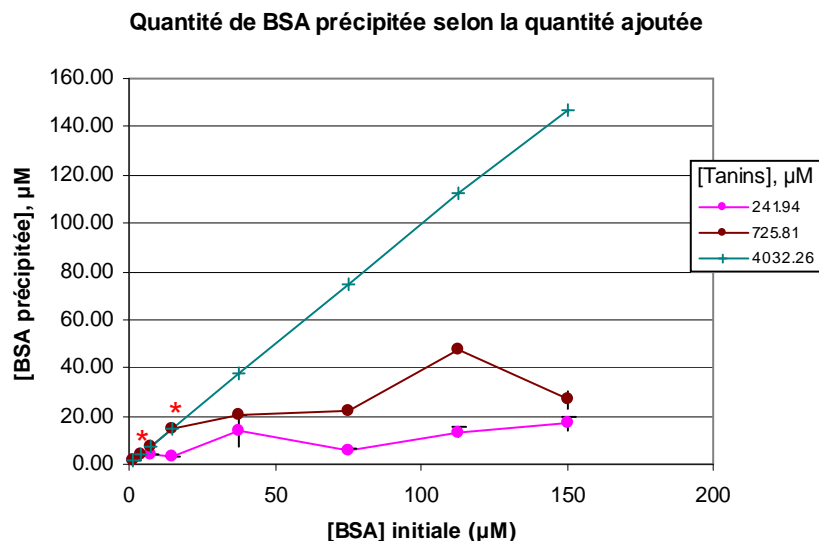


Figure 26 : Quantité de BSA précipitée en fonction de la quantité de BSA ajoutée à différentes concentrations de tanins. La concentration $[BSA]^*$ est indiquée par un astérisque pour chaque concentration en tanin.

b) Précipitation des tanins

Lors de l'ajout de BSA à une quantité fixe de tanin, la quantité de tanins précipités augmente jusqu'à une certaine concentration, correspondant à la concentration $[BSA]^*$ déterminée précédemment. Lorsque la quantité de BSA devient supérieure à $[BSA]^*$, le pourcentage de tanins précipités diminue avec l'augmentation de la concentration en BSA (figure 27).

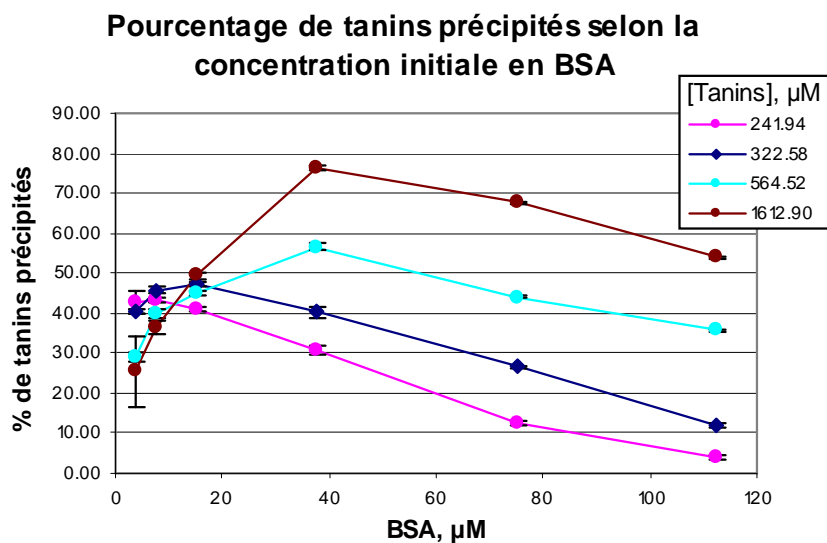


Figure 27 : Quantité de tanins précipités lorsque la concentration en BSA augmente

c) Ajout de BSA à une quantité fixe de tanins : conclusion

En étudiant la titration des tanins par la BSA il est possible de conclure sur l'existence d'une concentration $[\text{BSA}]^*$ telle que:

- $[\text{BSA}]$ inférieure à $[\text{BSA}]^*$

Toute la BSA ajoutée précipite, le pourcentage de tanins précipités augmente avec la quantité de BSA ajoutée.

- $[\text{BSA}]$ supérieure à $[\text{BSA}]^*$

La quantité de BSA précipitée est égale à $[\text{BSA}]^*$, le pourcentage de tanins précipités diminue avec la quantité de BSA ajoutée.

3. Stoechiométrie

Pour étudier la stoechiométrie du complexe tanin / protéine, la stoechiométrie obtenue dans le précipité (T/P) est tracée en fonction du ratio initial dans le vial $(\text{T/P})_i$ sur la figure 28. Le tracé a été effectué en utilisant une échelle linéaire et une échelle logarithmique pour faciliter la visualisation des valeurs correspondant aux faibles ratios initiaux. Il s'agit bien de la stoechiométrie T/P, à savoir le nombre de mole de tanin pour une mole de protéine.

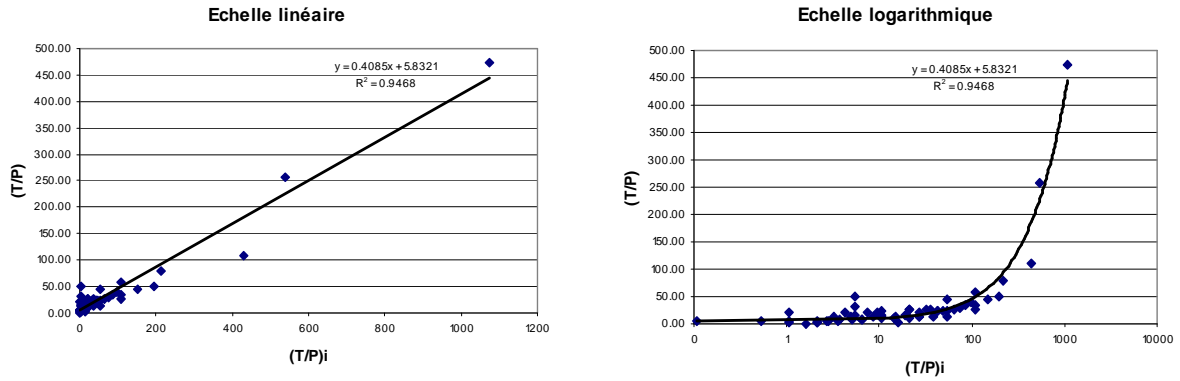


Figure 28 : Ratio tanin/protéine dans le précipité (T/P) en fonction du ratio tanin / protéine initial. Les deux courbes présentent les mêmes résultats, mais la courbe de droite est représentée avec une échelle logarithmique pour une meilleure visualisation des faibles ratios initiaux.

La première constatation est évidemment la confirmation de la non stoechiométrie de la réaction entre les tanins et la BSA. On sait en effet, que, dans une réaction stoechiométrique, le ratio final est une constante indépendante de la composition du mélange réactionnel. Ici, la quantité de tanins fixés sur la BSA dépend des quantités respectives de chacun des composés.

Il est de plus possible d'écrire:

$$\frac{[T]_p}{[BSA]_p} = 0,4085 \frac{[T]_i}{[BSA]_i} + 5,9 \quad (1)$$

$[T]_p$ et $[BSA]_p$ correspondent aux tanins et la BSA dans le précipité, $[T]_i$ et $[BSA]_i$ aux concentrations initiales. Cette équation est une indication de ce qui se passe entre les tanins et la BSA, et il est intéressant de la replacer dans le contexte des situations étudiées précédemment pour vérifier sa cohérence.

a) Ajout de BSA à une quantité de tanin constante

- $[BSA]_i < [BSA]^*$

Quand $[BSA]_i < [BSA]^*$, $[BSA]_p = [BSA]_i$ et (1) devient:

$$[T]_p = 0,4085 \times [T]_i + 5,9 \times [BSA]_i$$

d'où:

$$\frac{[T]_p}{[T]_i} = 0,4085 + 5,9 \times \frac{[BSA]_i}{[T]_i}$$

On retrouve bien l'augmentation du pourcentage de tanins précipités avec l'augmentation de la concentration en BSA observée en figure 29.

- $[BSA]_i > [BSA]^*$

Quand $[BSA]_i > [BSA]^*$, alors $[BSA]_p = [BSA]^*$, (1) devient:

$$\frac{[T]_p}{[T]_i} = 0,4085 \frac{[BSA]^*}{[BSA]_i} + 5,9 \times \frac{[BSA]^*}{[T]_i}$$

Lorsque $[BSA]_i$ augmente, son inverse diminue, donc, $[BSA]^*$ et $[T]_i$ étant des constantes, on retrouve bien la diminution du pourcentage de tanins précipités avec l'augmentation de la concentration en BSA observée en figure 27.

b) *Ajout de tanins à une quantité de BSA constante*

- $[T] < [T]^*$

Quand $[T] < [T]^*$, alors $[BSA]_p = q[T]_i$, et (1) devient:

$$\frac{[T]_p}{[T]_i} = 0,4085 \frac{[T]_i}{[BSA]_i} \cdot q + 5,9 \cdot q$$

On retrouve bien une augmentation du pourcentage de tanins précipités avec l'augmentation de la concentration initiale en tanin, comme vu figure 25.

- $[T] > [T]^*$

Quand $[T] > [T]^*$, alors $[BSA]_p = [BSA]_i$, (1) devient

$$\frac{[T]_p}{[T]_i} = 0,4085 + 5,9 \cdot \frac{[BSA]_i}{[T]_i}$$

On retrouve bien une stabilisation du pourcentage de tanins précipités avec l'augmentation de la concentration initiale en tanin, comme vu figure 25.

4. Isothermes d'adsorption

En considérant la protéine comme une surface, l'interaction tanin / protéine peut être vu comme l'adsorption des tanins sur cette surface. Il est donc possible de tracer des isothermes d'adsorptions, et, en comparant ces isothermes avec ceux établis dans la littérature, des modèles d'adsorption types peuvent être proposés.

Pour chaque concentration en protéines, ces isothermes d'adsorption ont été établies. Les isothermes de Scatchard sont présentées ici, car ce sont elles les plus représentatives (figure 30). Ces isothermes semblent évoluer "naturellement" avec l'augmentation de la concentration en protéines de celle à 3,75 μM à celle à 112,5 μM . Aux plus grandes concentrations, les isothermes correspondent assez bien à de la coopération positive. Aux plus faibles concentrations, l'isotherme ne correspond pas à un modèle connu, mais il semble possible de le décomposer en deux isothermes, comme montré sur la figure 29. L'isotherme apparaît alors comme la superposition de deux isothermes selon la quantité initiale de tanin. La première

(faibles quantités adsorbées) est une isotherme de coopération positive, la seconde pourrait correspondre à une isotherme de deux classes de sites.

De plus, dans tous les cas, la concentration en tanin séparant ces deux isothermes correspond à la concentration $[T]^*$, à partir de laquelle toutes les protéines présentes sont précipitées. Il apparaît donc l'existence de deux modes d'adsorption, selon la réaction totale de la protéine ou non.

Décomposition de l'isotherme de Scatchard

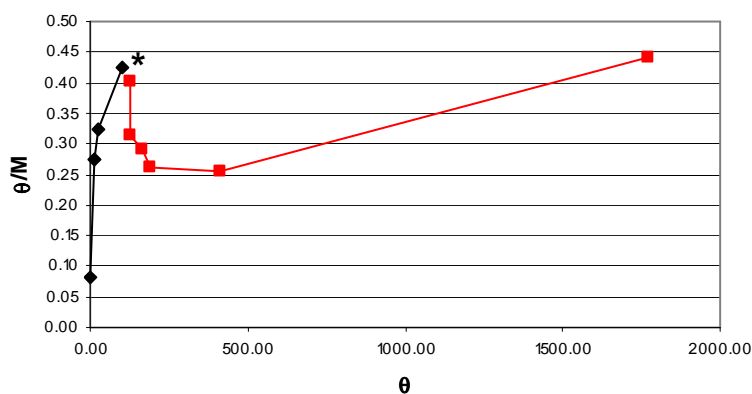


Figure 29: Décomposition de l'isotherme de Scatchard correspondante à l'adsorption des tanins sur la BSA (3,75 μ M). θ est la quantité de tanins fixés, M la quantité de tanins disponibles.

Dans les cas où la protéine disponible ne réagit pas complètement avec les tanins, l'interaction se fait par coopération positive. Dans le cas où la quantité de tanin disponible est suffisante pour faire précipiter l'intégralité de la protéine, l'adsorption se fait par deux sites différents.

5. Influence du ratio: conclusion

Il a été mis en évidence l'existence de concentration BSA* et T* jouant un grand rôle dans l'interaction entre la BSA et les tanins. Ces concentrations décrivent en fait le ratio entre tanin

et BSA et montrent l'existence de deux possibilités. Si $\frac{[T]_i}{[P]_i} < \frac{[T]^*}{[P]^*}$, c'est-à-dire $[T]_i < [T]^*$ et

$[P]_i > [P]^*$, la BSA n'est pas précipité dans son intégralité. Si $\frac{[T]_i}{[P]_i} > \frac{[T]^*}{[P]^*}$, soit $[T]_i > [T]^*$ et

$[P]_i < [P]^*$, la BSA précipite entièrement. Plusieurs travaux rapportent le même phénomène. Hagerman et Butler notent ainsi une quantité de protéine maximum précipitable par les

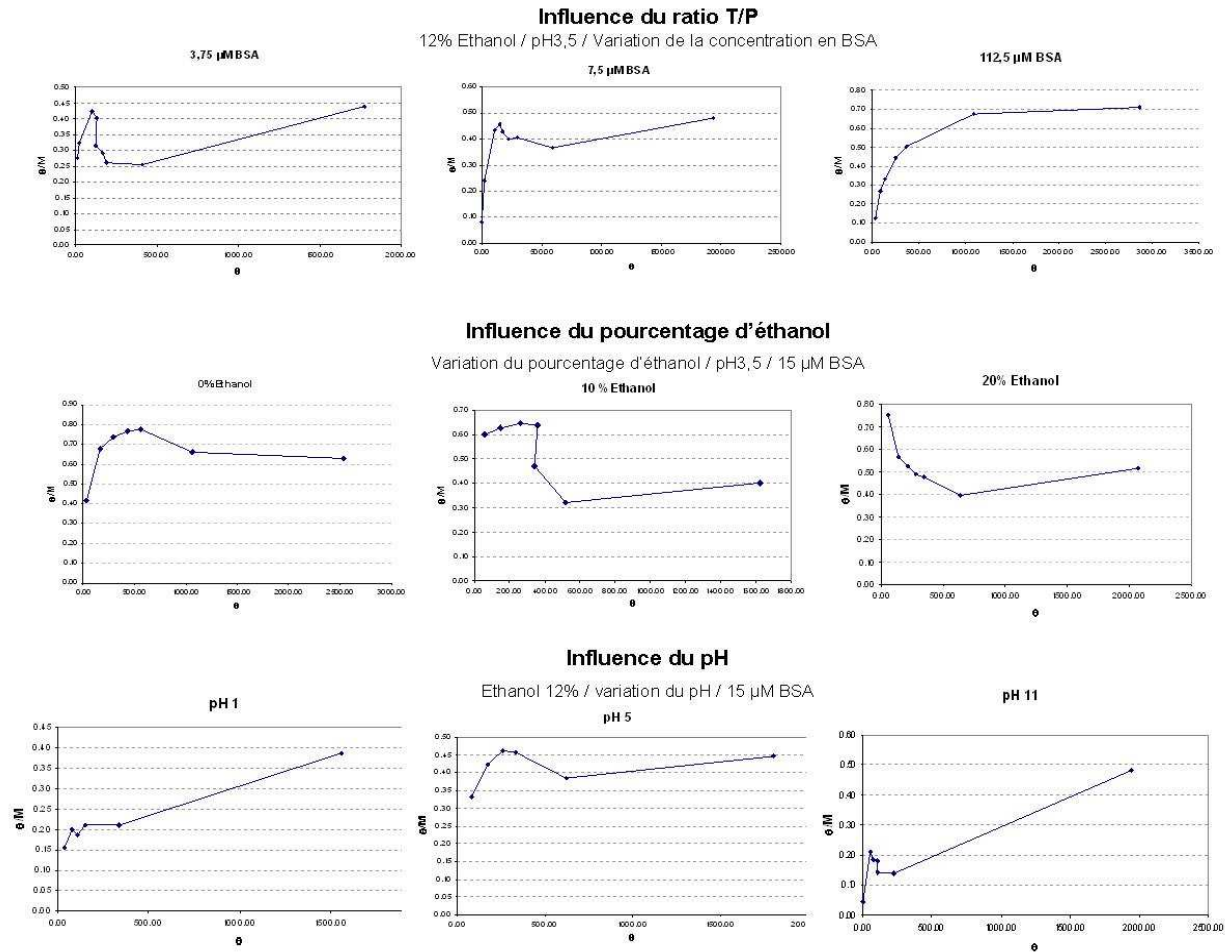
tanins²⁸², et observant la précipitation de l'acide tannique lors de l'ajout de gélatine, Van Buren et Robinson obtiennent exactement le même profil que celui présenté ici²⁵⁶.

Les valeurs de ratio sont en corrélation avec les sites de liaison existant sur la protéine²⁶⁰ et l'accroissement constant de la stoechiométrie avec le ratio initial traduit un phénomène d'adsorption des tanins à la surface²³⁵ mais aussi un phénomène colloïdal²⁴⁸.

L'utilisation des isothermes d'adsorption montre l'existence de deux modes d'interactions différents selon que le ratio initial tanin / BSA. Ceci a été observé dans quelques travaux en utilisant la calorimétrie, mais uniquement avec des tanins hydrolysables^{229, 232}.

Ces résultats seront interprétés plus de manière plus approfondie à la lumière de ceux observés avec l'éthanol et le pH.

Influence des conditions de l'interaction sur les isothermes d'adsorption de Scatchard



Pour toutes les isothermes, θ est la quantité de tanins fixés, M la quantité de tanins disponibles.

Figure 30 : Isothermes d'adsorption de Scatchard entre les tanins condensés et la BSA selon les conditions d'interaction

B. Influence de l'éthanol

Pour mesurer l'influence du pourcentage d'éthanol sur l'interaction entre les tanins et les protéines, la réaction entre 1g/L de BSA d'une part et 100, 300, 500, 700, 900, 2000 et 5000 mg de tanins d'autre part a été réalisée dans de la solution modèle vin (5 g/L d'acide tartrique, pH 3,5) à différent pourcentage d'éthanol (0, 5, 10, 15, 20 %).

1. Précipitation des protéines

En traçant la quantité de BSA précipitée en fonction de la quantité de tanins ajoutés pour les différents pourcentages d'éthanol (figure 31), il est possible de constater que le pourcentage d'éthanol n'influence pas le profil général de la titration, ni les valeurs. En effet, toutes les courbes sont identiques, et la valeur de $[T]^*$, définie précédemment comme la quantité de tanin nécessaire pour précipiter l'intégralité de la protéine est comprise entre 700 et 900 mg/L pour toutes les modalités.

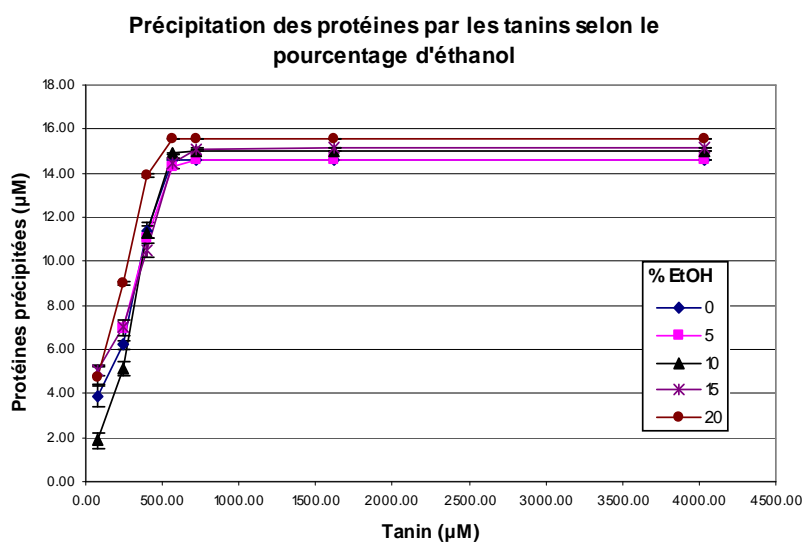


Figure 31 : Influence de l'éthanol sur le profil de précipitation de la BSA par les tanins.

2. Précipitation des tanins

La figure 32 présente la quantité de tanins précipités selon la quantité de tanins initiale en présence de 15 µM BSA pour différents pourcentages d'éthanol. L'influence de l'éthanol apparaît après 700 mg/L, c'est-à-dire $[T]^*$. En effet, après cette valeur, alors que les courbes à 0 et 5% d'éthanol continuent d'augmenter linéairement avec la concentration en tanin initiale,

les valeurs pour 10, 15 et 20 % d'éthanol présentent un décroché. A partir de 1700 μM , les pentes des courbes sont identiques, mais les valeurs de tanins précipités diffèrent.

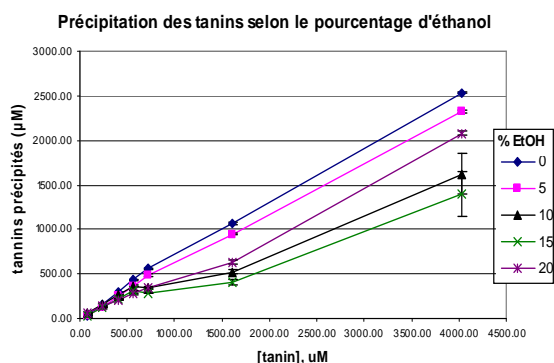


Figure 32 : Profil de précipitation des tanins selon la quantité de tanin initiale à différents pourcentages d'éthanol. La quantité $[T]^*$ est représentée par un astérisque.

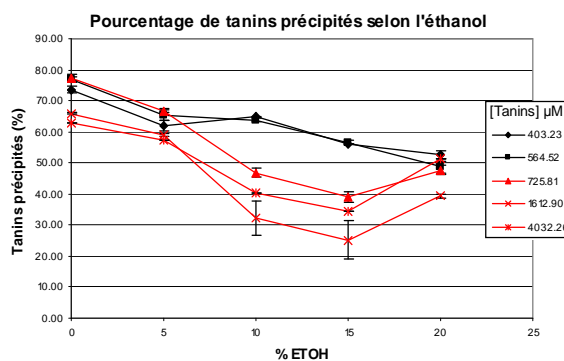


Figure 33 : Quantité de tanins précipités selon le pourcentage d'éthanol pour deux concentrations initiales différentes. Les courbes représentant des valeurs de $[T]$ inférieures à $[T]^*$ sont en noir, celles supérieures en rouge.

La quantité de tanins précipités diminue avec l'augmentation du pourcentage d'éthanol pour toutes les quantités de tanins (figure 36). Cependant, pour 10 et 15 % d'éthanol, cette diminution est nettement plus forte pour les concentrations en tanin supérieures à $[T]^*$.

3. Stoechiométrie

En se basant sur le fait que la quantité de BSA précipitée reste constante avec le pourcentage d'éthanol en solution, l'évolution de la stoechiométrie doit logiquement être la même que celle des tanins précipités. Ceci est confirmé par la figure 34, où il apparaît que la stoechiométrie de la réaction diminue avec le pourcentage d'éthanol, mais que cette diminution est marquée de manière plus importante pour 10 et 15% d'éthanol et les concentrations en tanins supérieures à $[T]^*$.

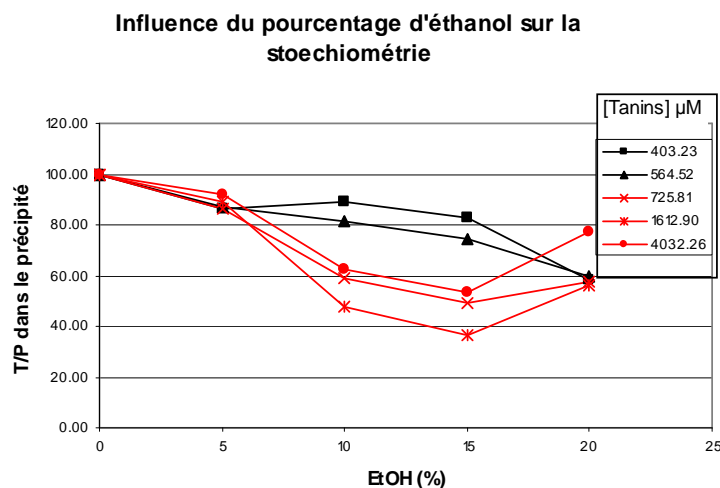


Figure 34: Evolution de la stoechiométrie avec le pourcentage d'éthanol pour différentes quantités de tanins. Les courbes représentant des valeurs de $[T]$ inférieures à $[T]^*$ sont en noir, celles supérieures en rouge.

4. Isothermes d'adsorption

Les isothermes d'adsorption ont été établies pour chaque pourcentage d'éthanol. Les isothermes de Scatchard, représentées en figure 30, diffèrent selon pourcentage d'éthanol, ce qui implique que le mode d'adsorption des tanins sur la BSA est influencé par l'éthanol. Ensuite, des rapprochements peuvent être faits entre isothermes semblables, à savoir 0 et 5%, 10 et 15% et enfin 20%.

Pour 0 et 5%, les courbes se rapprochent à celles observées dans la partie pour les concentrations en protéine les plus importantes. A 20%, l'isotherme pourrait être celle d'une adsorption selon deux classes de sites.

A 10 et 15% d'éthanol, l'isotherme est la même que celle décrite plus haut dans les mêmes conditions d'éthanol et de ratio T/P. Au vu des isothermes "entourant" ce pourcentage d'éthanol, il semble logique de proposer que cette isotherme soit en fait la somme de deux isothermes, confirmant la proposition faite plus haut. La première partie correspondrait alors à de la coopération positive, puis, au-delà de 350 μM de tanins adsorbés, l'adsorption évolue en deux classes de sites.

5. Influence de l'éthanol : conclusion

D'un point de vue quantitatif, l'ajout d'éthanol provoque une diminution de la précipitation des tanins mais pas des protéines. Cette diminution est plus marquée pour les concentrations en tanin supérieures à T^* . L'influence de l'éthanol sur la précipitation a été étudiée dans peu de travaux, mais les résultats obtenus sont similaires, puisqu'il n'affecte pas la précipitation de la BSA par le dimère EC-C²⁷⁶. Des travaux quantifiant la précipitation des tanins du vin à des

concentrations inférieures à T^* sous l'effet de la BSA montrent également une diminution linéaire de la précipitation avec l'éthanol³⁰⁶. Pour essayer de comprendre cette diminution de l'affinité des tanins pour la BSA avec l'éthanol, il est important de s'intéresser à l'influence de l'éthanol sur chacune des espèces présentes.

En absence d'éthanol, les isothermes d'adsorption révèlent l'existence d'un seul mode d'adsorption quelque soit le ratio tanin / protéine. Il paraît évident qu'à la fois les tanins et les protéines ont intérêt à engager leurs sites hydrophiles dans des liaisons avec l'eau. L'interaction tanin protéine se fait donc sans doute au travers de liaisons hydrophobes, comme cela a été constaté pour la BSA et les trimères dans l'eau²³⁹. Les stoechiométries observées sont du même ordre que celles décrites entre la BSA et l'épicatéchine dans l'eau²⁹², amenant les auteurs à conclure à des liaisons hydrophobes faibles, ce qui confirmerait notre hypothèse.

L'observation de comportements similaire pour 0 et 5% d'éthanol peut s'expliquer par une stabilisation de la structure globulaire de la BSA aux faibles quantités d'alcool, comme cela se passe avec l'albumine de sérum humain³⁰⁷. Cette stabilisation se fait par des liaisons de l'éthanol dans des poches hydrophobes de la BSA³⁰⁸.

A 20% d'éthanol, les isothermes d'adsorption décrivent une adsorption des tanins selon deux classes de sites, et ce quelque soit la quantité de tanins (dans la gamme de nos expériences). Avec ces 20% d'éthanol, les caractéristiques du solvant, de la BSA, des tanins mais également de l'acide tartrique ont changé.

En effet, les propriétés interfaciales des mélanges eau / éthanol sont bien entendu dépendante du pourcentage d'éthanol³⁰⁹. De plus, l'éthanol est un dénaturant connu pour les protéines³¹⁰ et, à 20% d'éthanol, la BSA est complètement dépliée³¹¹. Les tanins sont eux connus pour s'agréger via des forces hydrophobes¹⁵². L'ajout d'éthanol réduit donc cette auto agrégation, et à 20%, elle est très faible¹⁰³. Enfin, le pKa de l'acide tartrique est influencé par l'éthanol³¹², la force ionique du milieu est par conséquent affectée par ce changement.

En plus de briser jusqu'à 396 liaison hydrogène par molécule³¹³, le processus de dénaturation de la BSA conduit à l'exposition d'acides aminés hydrophobes²⁷⁴. Il est donc possible que les tanins établissent des liaisons hydrophobes avec la BSA, immédiatement renforcées par des liaisons hydrogènes, comme cela a été suggéré dans certaines études¹⁴⁸.

Lorsque $[T]$ est supérieur à $[T]^*$, la stoechiométrie augmente. Devant un phénomène identique, Kawamoto *et al* concluent sur l'existence de deux sortes de sites²⁶⁰. Les sites forts sont utilisés en premier, les sites faibles par la suite. Les sites forts étant spécifiques, la

stoechiométrie y est quasi constante. Cependant, il est ici possible qu'une fois tous les sites de la protéine utilisés, les tanins continuent à s'agréger sur les tanins déjà liés par des liaisons hydrophobes²²⁹.

Entre 5 et 20 % d'éthanol, le système est dans une gamme de pourcentage d'éthanol critique pour l'organisation des molécules d'eau et d'éthanol entre elles. Il existe dans cette gamme un point de transition où l'eau perd ses propriétés particulières³¹⁴. C'est à partir de ce point que le mélange ne se comporte plus comme un θ -solvant pour les protéines³¹⁵. Concernant la BSA, le pourcentage de dénaturation selon l'éthanol n'est pas parfaitement établi. Alors qu'aucun changement de structure secondaire ou tertiaire n'est observé par dichroïsme circulaire à 10% dans certains travaux³¹⁶, d'autres amènent des preuves de cette dénaturation par DSC³¹⁷. Il apparaît cependant logique de considérer que le processus de dénaturation est amorcé, surtout à pH 3,5. Cette dénaturation se traduit par l'apparition de feuillets β ³⁰⁸, et donc de possibilité de liaisons hydrogènes.

La première partie des isothermes (entre 0 et $[T]^*$) est identique à celles obtenues à 0 et 5 % d'éthanol, il y a donc tout lieu de penser que le phénomène est le même. Les tanins commencent par se fixer par des liaisons hydrophobes à la protéine. Il est alors tout à fait envisageable que, comme dans le cas du galloylglucose avec la BSA²³³, les tanins provoquent la dénaturation de la protéine, aidés en cela par le solvant. Le système se retrouve alors dans la même configuration qu'à 20% d'éthanol, comme le montre la seconde partie des isothermes de 10 et 15%, identique à l'isotherme de 20%.

Les différences de mode d'adsorption des tanins sur les protéines sont donc dues à la conformation de la protéine et aux forces disponibles. La baisse de la stoechiométrie avec l'apparition des liaisons hydrogènes montre que celles-ci utilisent des sites plus forts.

C. Influence du pH

Pour étudier l'influence du pH sur l'interaction tanins / BSA, l'interaction a été suivie dans des solutions modèles vin dont le pH a été ajusté à 1-3,5-5-7-9-11. Les solutions de tanins et de BSA ont été préparées dans ce milieu avant d'interagir.

1. Influence du pH sur la précipitation des protéines

a) Présence de complexes solubles

Lors du traitement des données correspondant à l'influence du pH, il est apparu que, à pH 7; 9 et 11, l'aire du pic correspondant à la protéine augmentait avec la quantité de tanins ajoutés, comme le montre la figure 35.

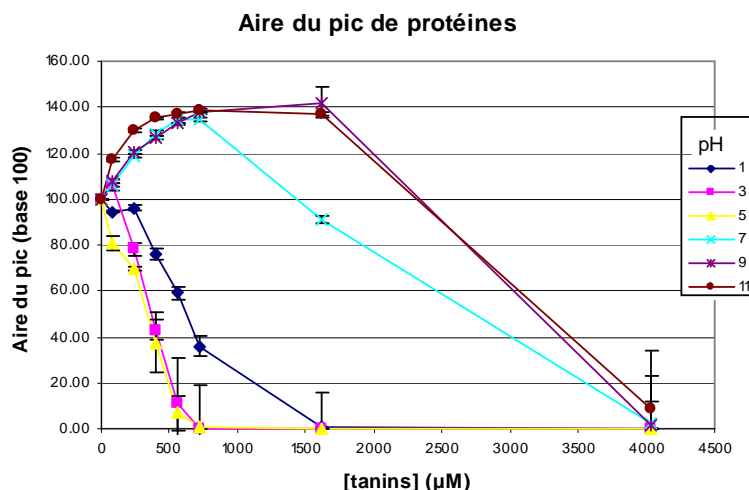


Figure 35 : Aire du pic de protéine (base 100) selon la quantité de tanins ajoutés pour les différents pH.

Ceci a été interprété comme la présence de complexes tanins protéines solubles dont la masse moléculaire totale, proche de celle de la protéine, fait qu'ils sont élués avec elle et augmentent ainsi l'aire du pic correspondant.

En utilisant une longueur d'onde propre aux tanins et en procédant par différence avec l'aire totale, il est cependant possible d'arriver à la quantité de protéines non complexées.

b) Quantité de protéines ayant réagi

Le profil de réaction de la protéine en fonction de la quantité de tanins ajoutés a la même allure générale quelque soit le pH (figure 36). Cependant, la quantité de tanin requise pour faire précipiter l'intégralité de la protéine ($[T]^*$) varie un peu avec le pH.

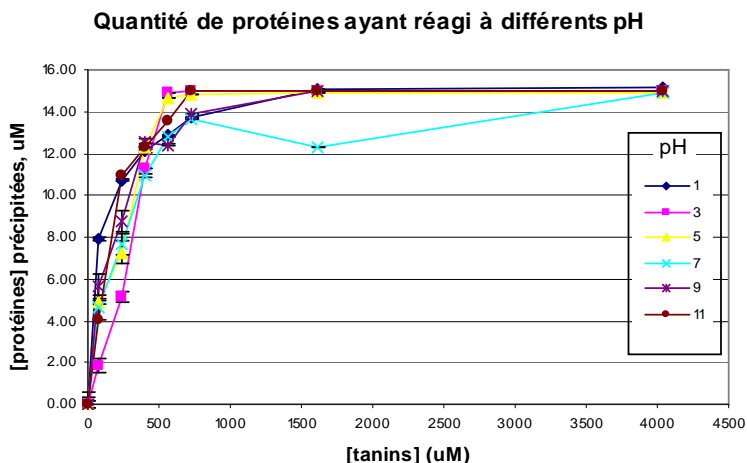


Figure 36: Protéines ayant réagi avec les tanins à différents pH

2. Influence du pH sur la quantité de tanins ayant réagi

Comme il a été montré précédemment, la solubilité des complexes tanins / protéines dépend du pH. Il est donc utile de s'intéresser à la quantité de tanins ayant réagi avec les protéines, puis de regarder parmi ces tanins lesquels ont formé des complexes solubles et lesquels ont précipités.

a) Quantité de tanins ayant réagi avec 15 uM de BSA

Les profils d'évolution de la quantité de tanin ayant réagi avec les protéines (figure 37) suivent la règle suivante: la quantité de tanins ayant réagi augmente linéairement avec la quantité de tanin initiale jusque $[T]=[T]^*$. La relation entre tanins ajoutés et tanins précipités est alors toujours linéaire, mais la pente change.

Il est intéressant de noter que la pente ne change pas à pH 5.

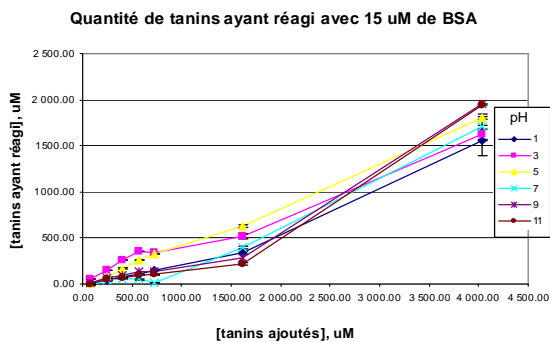


Figure 37: Quantités de tanins ayant réagi avec 15 μ M de BSA selon le pH

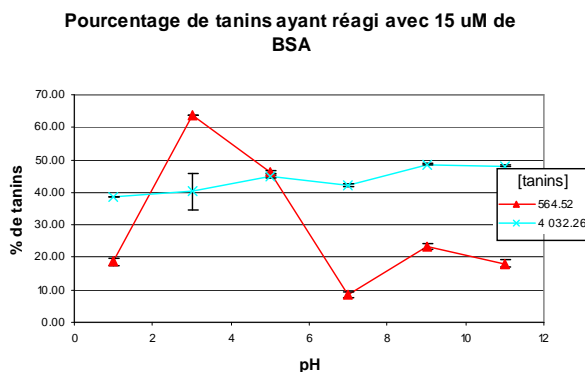


Figure 38: Pourcentage de tanins ayant réagi avec 15 μ M de BSA selon le pH

Pour mieux visualiser les différences entre les différents pH, le pourcentage de tanins ayant réagi par rapport au pH est représenté en figure 38 pour deux quantités de tanins initiales. Cette figure montre bien que la réaction des tanins est très affectée par le pH aux faibles concentrations, tandis qu'à 5g/L, la réaction est indépendante du pH. Le pourcentage de tanin précipité est alors d'environ 45%.

b) Influence du pH sur la formation de complexes solubles

La figure 39 présente la quantité de tanin formant des complexes solubles en fonction de la quantité de tanins ajoutés. Aucun complexe soluble ne se forme à pH 3,5 et 5, et, pour les autres pH, la quantité de complexes solubles formés est reliée à la quantité de tanins ajoutés par une parabole. La quantité maximum de tanins engagés dans des complexes solubles est la plus faible à pH 1 (19 μM), suivi par pH 7 (28 μM). Cette quantité est identique pour pH 9 et 11 (50 μM), mais il semblerait que la quantité maximum possible n'apparaisse pas dans nos expériences.

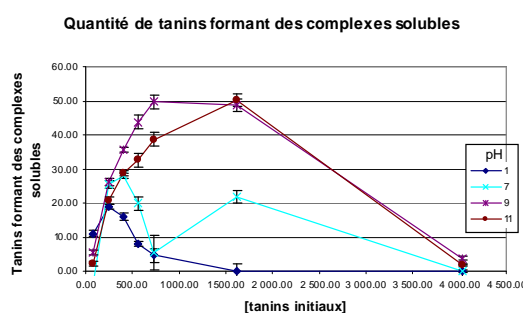


Figure 39: Quantités de tanins formant des complexes solubles selon la quantité initiale à différents pH

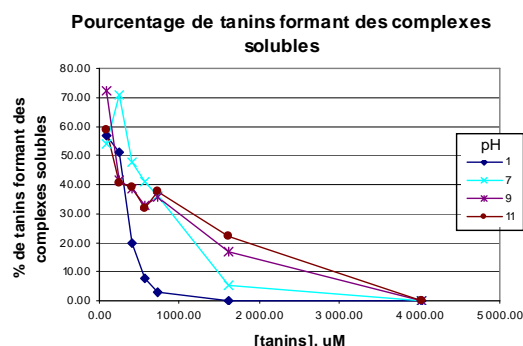


Figure 40: Pourcentage de tanins formant des complexes solubles par rapport à la quantité de tanins ayant réagi

Le pourcentage de tanins formant des complexes solubles par rapport à la quantité totale de tanins qui réagissent est présenté à la figure 40. Dans toutes les modalités, le pourcentage de tanins engagés dans les complexes solubles par rapport à la quantité de tanins ayant réagi diminue lorsque la concentration en tanins initiaux augmente. Cette diminution est la plus rapide à pH 1, suivi de pH 7 et pH 9 et 11, présentant des similarités.

3. Influence du pH sur la stœchiométrie

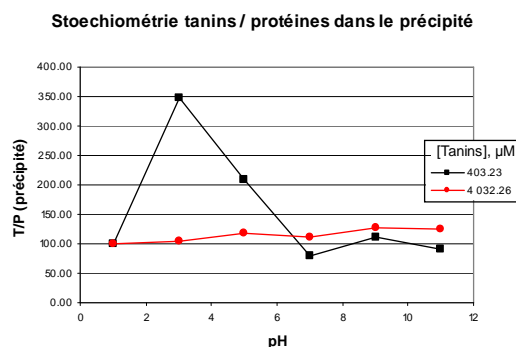
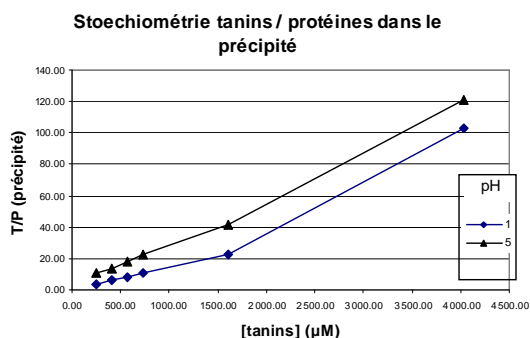


Figure 41: Stœchiométrie dans le précipité selon le pH Figure 42: Stœchiométrie dans le précipité selon le pH

L'évolution de la stœchiométrie dans le précipité selon le pH rejoint l'évolution observée pour les tanins. Présentée en figure 41 et 42, elle montre également une influence plus marquée du pH pour les faibles concentrations en tanins. A pH 5, l'évolution de la stœchiométrie est linéaire avec la concentration en tanins.

4. : Influence du pH : isothermes d'adsorption

Les isothermes d'adsorption (figure 30) présentent des différences selon le pH. L'isotherme de pH 5 est très ressemblante avec celle obtenue à 0% d'éthanol, et montre l'existence d'une seule classe de site.

Les isothermes obtenues aux autres pH peuvent toutes être décrites comme la juxtaposition de deux isothermes, le premier de coopération positive, le second de deux classes de sites. Les isothermes obtenues à pH 9 et 11 sont identiques, semblables à celle de pH 1. Les isothermes à pH 1, 7, 9 et 11 ne sont pas de très bonne qualité, ce que l'on peut sans doute attribuer à la présence de complexes solubles.

5. Influence du pH : discussion

L'influence du pH se traduit principalement par l'apparition de complexes solubles à pH 1, 7, 9 et 11, et une stœchiométrie moins élevée à ces pH. Le mode d'adsorption des tanins sur la BSA est également lié au pH

a) *Espèces présentes selon le pH*

L'impossibilité de tirer une loi générale concernant l'effet du pH sur l'interaction tanins / protéines a été soulignée dans l'étude bibliographique. Pour pouvoir interpréter et discuter les résultats obtenus sur l'influence du pH, il est donc tout d'abord indispensable de savoir sous quelle forme existent les espèces présentes en solution (acide tartrique, éthanol, BSA et tanins). Mis à part l'éthanol, dont le pKa est 15,8, le pH influence la forme de toutes les autres, comme représenté sur la figure 43. L'acide tartrique est un diacide de pKa₁ = 3,4 et de pKa₂ = 4,37, il est donc présent sous trois formes.

- Tanins

Les tanins peuvent être considérés comme des acides faibles de pKa compris entre 8 et 9¹⁵². Cependant, aux faibles valeurs de pH, les tanins condensés peuvent s'oxyder, et se comporter alors de manière très différente³¹⁸.

- BSA

Le pH influence bien sûr la charge globale de la BSA (pI=4,9), mais également sa structure, dont certaines formes sont montrées en figure 44.

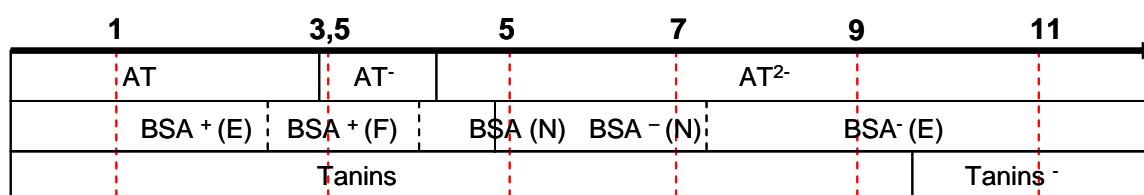


Figure 43: Espèces présentes aux différents pH utilisés lors des interactions tanins / BSA



Figure 44: Représentation des diverses formes de la BSA³¹⁹

b) *Formation de complexes solubles*

Dans les résultats présentés ici (figure 39), les complexes solubles ne sont observés qu'à pH 1, 7, 9 et 11, soulignant l'effet du pH sur leur formation. En effet, le pH joue un rôle

majeur dans la solubilité, puisqu'il permet l'apparition ou la disparition de sites hydrophiles³²⁰. Lorsqu'une quantité suffisante de tanins recouvre la BSA, la solubilité diminue, comme cela a été observé dans d'autres cas²⁴⁸. L'agrégation de plusieurs complexes solubles peut également conduire à la précipitation²⁹⁵.

c) *Mode d'adsorption de la BSA sur les tanins*

Les isothermes d'adsorption révèlent des processus identiques à pH 9 et 11, sans doute du au fait que la BSA est sous la même forme (extension basique). La similarité avec pH 1 peut alors s'expliquer par le fait que la BSA y est aussi sous forme étendue (extension basique). A pH 3,5, la BSA est sous forme F, d'où une isotherme différente. Enfin, les isothermes sont différentes à pH 5 et 7, alors que la BSA est dans sa forme N dans les deux cas. La différence vient sans doute de l'absence de charge à pH 5, alors que la BSA est faiblement chargée négativement à pH 7 (domaine I, -11; domaine II, -7; domaine III, +1). Il est donc possible de conclure que le mode d'interaction entre les tanins et la BSA est déterminé par la structure de cette dernière.

d) *Quantités de tanins et protéines précipités*

Dans nos expériences, les capacités de précipitation des tanins par la BSA en fonction du pH peuvent être classées de la manière suivante : $3,5 > 5 > 1 \approx 7 \approx 9 \approx 11$. L'optimum de la précipitation n'est donc pas obtenu au point isoélectrique, comme cela était supposé dans les premiers travaux²⁸¹. Cependant, les résultats obtenus ici sont en parfaite adéquation avec ceux obtenus par Naczki *et al* dans leur étude de l'influence du pH sur l'interaction tanins condensés / BSA³²¹.

Une stoechiométrie plus faible indique des sites plus forts²⁶⁰. La présence de ceux-ci est confirmée par les isothermes d'adsorption décrivant deux classes de sites.

En regardant ces résultats sous l'angle de la force ionique, dont les valeurs sont données dans le tableau 14, il ressort que la précipitation diminue avec son augmentation. Etudiant également l'influence de la force ionique sur l'interaction entre les tanins et la BSA, De Freitas *et al* observent aussi une diminution de la précipitation avec la force ionique²⁷⁷ et en déduisent l'existence de liaison hydrophiles.

Tableau 14 : Valeurs de force ionique selon le pH

pH	I
3.5	2.43E-02
5	8.69E-02
7	9.98E-02
1	1.00E-01
9	1.00E-01
11	1.01E-01

e) Conclusion

L'influence du pH sur l'interaction tanins / BSA se manifeste donc de plusieurs manières.

- La conformation de la BSA, dirigée par le pH, détermine le mode d'adsorption des tanins sur la protéine.
- La charge résiduelle sur la BSA, fonction du pH, provoque l'apparition de complexes tanins / protéines solubles, engagés dans un équilibre avec les tanins libres.
- La force ionique, contrôlée par le pH, influence la stoechiométrie de réaction.

Il serait bien sûr extrêmement intéressant de connaître avec précision les formes des tanins à pH 1 pour pouvoir interpréter les résultats.

D. Etude à l'équilibre: conclusion

De nombreuses caractéristiques de l'interaction entre les tanins condensés et la BSA ressortent de son étude à l'équilibre.

Tout d'abord, l'interaction n'est pas stoechiométrique, mais le ratio dans le précipité est proportionnel au ratio initial entre les tanins et la BSA. Ce ratio initial est extrêmement important, puisqu'il va décider du mode d'adsorption des tanins sur la protéine. Dans les conditions du vin, un ratio T/P faible est à l'origine d'une adsorption par coopération positive. Si le ratio est supérieur aux nombres de sites disponibles sur la BSA, l'adsorption des tanins semble provoquer une dénaturation de la protéine une interaction via deux classes de sites.

En faisant varier le pH et l'éthanol, la complémentarité des forces hydrophiles et hydrophobes dans l'interaction apparaît. Ces résultats concernant l'équilibre vont maintenant être une aide dans la compréhension de la cinétique de ces interactions.

III. Etude cinétique

A. Préambule : Interprétation des résultats de turbidimétrie

La turbidimétrie et la néphélométrie permettent de quantifier un trouble dans une solution. La différence entre ces deux techniques est la méthode de mesure : la lumière transmise pour la turbidimétrie, la lumière diffusée à un certain angle pour la néphélométrie. Les bases des techniques pour l'analyse de l'interaction entre composés phénoliques et protéines ont été posées par Chapon³²².

A notre connaissance, les travaux traitant les tanins par la turbidimétrie ou la néphélométrie ne s'intéressent qu'au trouble maximum formé durant la réaction et aucun n'a utilisé ces résultats en termes de cinétique. Celle-ci est pourtant évoquée dans les travaux de Chapon³²² et le profil du trouble en fonction du temps apparaît dans une étude de De Freitas et Mateus³²³. Ces deux courbes sont montrées en figure 45.

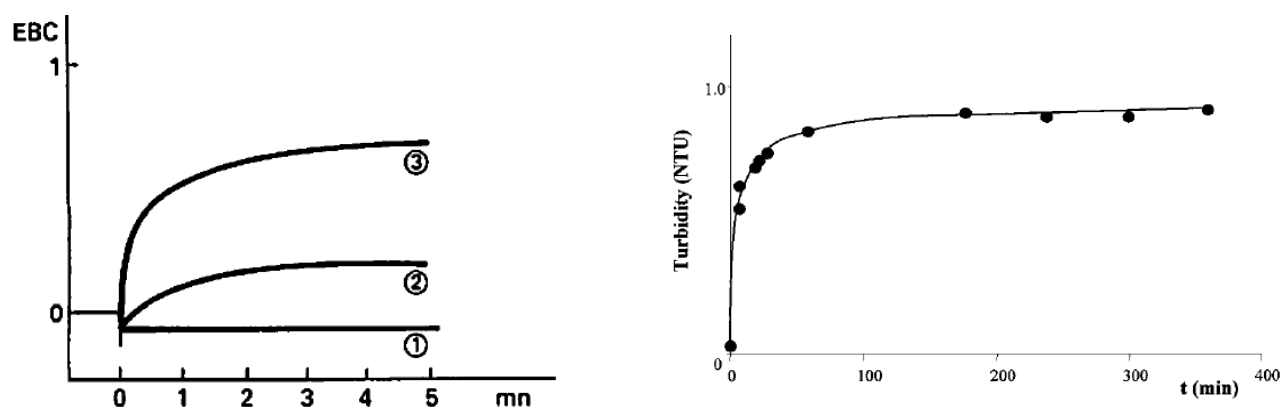


Figure 45: Evolution du trouble avec le temps entre (gauche) du sulfate de cinchonine et de la bière³²² et (droite) des procyanidines et des PRPs³²³

La courbe de la figure 46 est un exemple typique de courbe obtenue dans ces travaux, les différentes valeurs qui vont être utilisées dans ce chapitre y sont présentées. Il est possible d'y distinguer le comportement courant et le comportement initial.

Evolution du trouble formé par des tanins (565 μM) et de la BSA (15 μM)

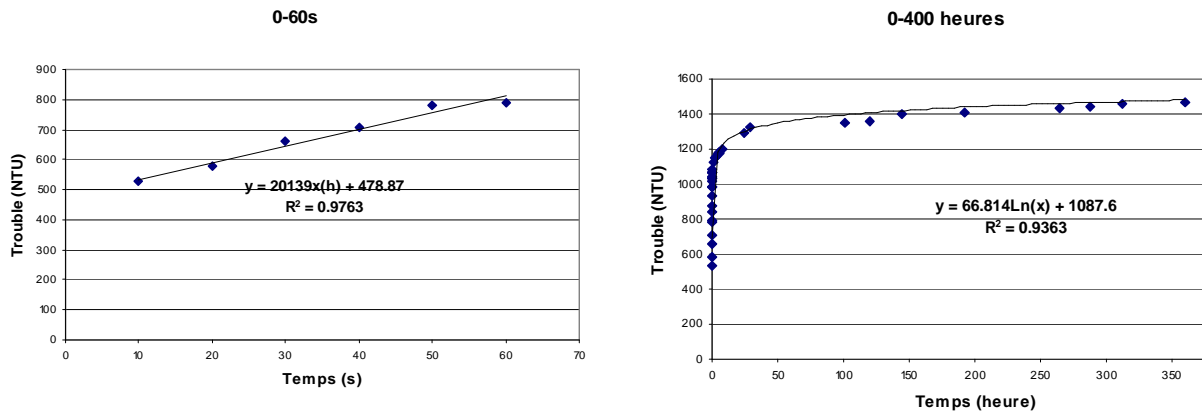


Figure 46: Trouble formé par des tanins et de la BSA. Comportement courant (gauche) et initial (droite).

1. Comportement initial

Dans les 60 premières secondes, le développement du trouble suit une droite, et il est possible d'écrire la relation (1).

$$[NTU]_{P,T,t \rightarrow 0} = a_{T,P}^0 \times t + b_{T,P}^0 \quad (1)$$

où $a_{T,P}^0$ est la vitesse initiale de développement du trouble en $\text{NTU} \cdot \text{s}^{-1}$, $b_{T,P}^0$ peut être interprété comme la somme des troubles des tanins et des protéines à la mise en contact.

2. Comportement courant

L'évolution du trouble avec le temps ressemble très fortement à ce qui est observé dans les travaux évoqués précédemment. De plus, cette évolution est parfaitement corrélée à un logarithme, et il est possible d'écrire la relation (2)

$$[NTU]_{T,P}(t) = A_{T,P} \ln(t) + B_{T,P} \quad (2)$$

$B_{T,P}$ est une constante représentant la turbidité atteinte au bout d'une unité de temps. La vitesse courante de développement du trouble s'écrit alors selon 3.

$$\left. \frac{d[NTU]}{dt} \right)_{T,P}(t) = \frac{A_{T,P}}{t} \quad (3)$$

3. Autres types de trouble

Si l'évolution du trouble ne suit pas la relation (2), elle sera alors détaillée.

B. Influence du ratio tanins / BSA

Le trouble formé entre différentes quantités de tanins et de BSA est étudié dans les conditions de solution modèle vin : 12% EtOH, pH 3,5.

1. Quantité de BSA fixe

Les différents paramètres présentés en préambule sont étudiés pour 15 μ M de BSA avec différentes quantités de tanins.

a) Comportement courant

Le comportement courant présente deux profils différents selon la concentration initiale en tanins

- $0 < [T] < 2000$ mg/L

Entre 0 et 2 g/L de tanins, le trouble est lié au temps de manière logarithmique selon la relation (2). Les valeurs du trouble final, $A_{T,P}$ et $B_{T,P}$ ainsi que les coefficients de corrélation correspondants sont présentés dans le tableau 15.

Tableau 15: valeurs du trouble final, $A_{T,P}$ et $B_{T,P}$ selon $[NTU]_{T,P}(t) = A_{T,P} \ln(t) + B_{T,P}$ et des coefficients de corrélation correspondant pour l'interaction entre différentes concentrations en tanins et de la BSA (15 μ M)

[Tanins]	Trouble final	a	b	r ²
10	11	0.55	7.5	0.8263
50	30.2	2.42	15.4	0.9373
100	59.5	4.85	25.3	0.9157
300	424	26.19	108.9	0.9912
400	589	41.24	357.3	0.9926
500	867	54.76	623.8	0.957
700	1467	66.81	1087.6	0.9363
900	1421	53.27	1181.6	0.9166
2000	1222	26.98	1073.6	0.9814

▪ Trouble final

La figure 47 présente l'évolution du trouble final en fonction de la concentration initiale en tanin. Le trouble augmente jusque 700 mg/L avant de diminuer. On retrouve ici la concentration $[T]^*$ définie précédemment, correspondant à la stoechiométrie. Observant le même phénomène de stabilisation du trouble lors de l'ajout de protéine à des tanins, De

Freitas et Mateus proposent la TSA, Tannin Specific Activity, correspondant à la quantité de protéines aboutissant à ce trouble maximum³²³.

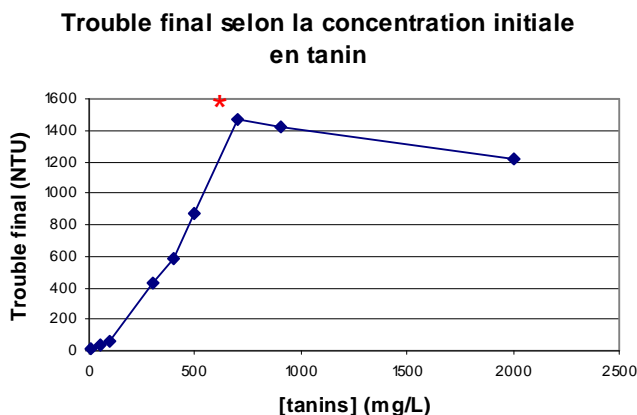


Figure 47: Trouble final selon la concentration initiale en tanins. L'astérisque indique la concentration T^* .

Ce phénomène est expliqué par Siebert *et al*²³⁸ selon le schéma correspondant ajouté en figure 48. Lorsque $[T] < [T]^*$, les tanins s'adsorbent sur la BSA, sans aucun doute de manière multidentate, comme vu précédemment. Au fur et à mesure que la concentration en tannin augmente, la quantité de protéine qui agit augmente également, le trouble augmente. Lorsque $[T] = [T]^*$, toutes les protéines sont liées à des tanins. A partir de ce point, les tanins ajoutés se fixent aux protéines, mais pour cela, des sites doivent se libérer, et le nombre de protéine par tannin diminue, le trouble aussi.

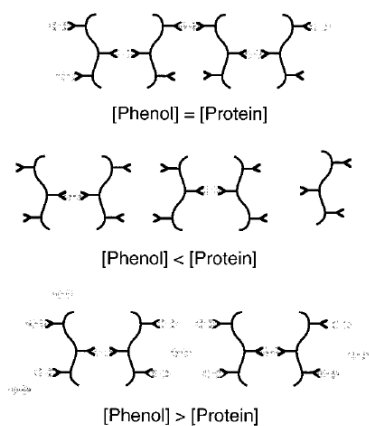


Figure 48: agrégats correspondants aux différents troubles observés, selon Siebert *et al*

■ **Vitesse de développement du trouble**

Comme vu en préambule, la vitesse de développement du trouble satisfait la relation (3):

$$\left. \frac{d[NTU]}{dt} \right)_{T,P}(t) = \frac{A_{T,P}}{t} \quad (3)$$

La valeur de $A_{T,P}$ en fonction de la concentration initiale en tanin est donnée en figure 49. La vitesse de formation du trouble augmente pour atteindre son maximum en 700 mg/L de tanin avant de diminuer.

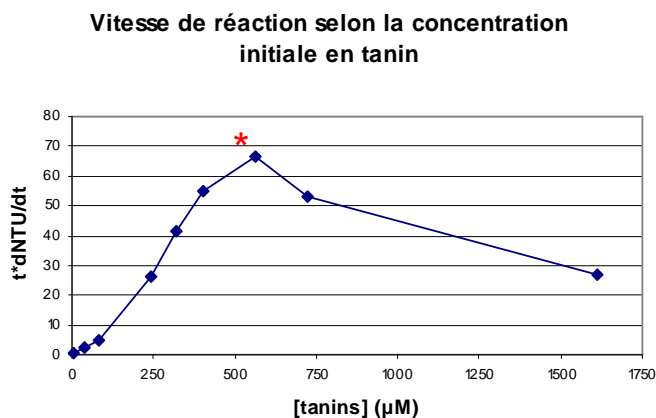


Figure 49 : Vitesse de développement du trouble selon la concentration en tanin. L'astérisque indique la concentration en tannin générant le trouble maximum.

On sait que la vitesse de réaction peut s'écrire selon:

$$v = k[T]^\theta [P]^\Pi$$

où k est la constante de vitesse, θ et Π les ordres cinétiques partiels par rapport aux tanins et la protéine.

Lorsque $[T] < [T]^*$, l'ordre est supérieur à 1 par rapport aux tanins, c'est-à-dire qu'une augmentation de leur concentration se traduit par une augmentation de la vitesse de réaction. Par contre, lorsque $[T] > [T]^*$, l'ajout de tanin provoque une diminution de la vitesse de réaction, l'ordre est inférieur à 1.

- 5000 mg/L < [T]

A 5000 mg/L de tanins pour 15 µM de BSA, le profil du trouble avec le temps, présenté en figure 50, est clairement différent de celui observé aux concentrations inférieures. En effet, lors de la mise en contact des tanins et des protéines, le trouble commence d'abord par diminuer. Après une minute, et la première agitation du tube, la valeur du trouble augmente de manière assez importante pour diminuer de nouveau. Il faut attendre 30 minutes pour que le trouble augmente avec le temps. L'étude de l'influence de l'éthanol effectuée plus loin essaiera d'expliquer ce comportement.

Evolution du trouble entre les tanins (5g/L) et la BSA (1g/L)

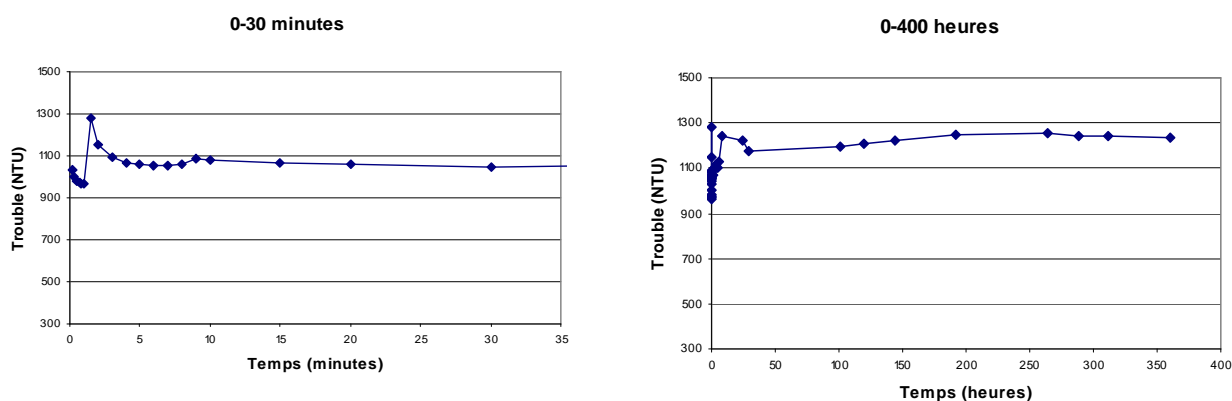


Figure 50 : Trouble formé entre les tanins (5g/L) et la BSA (15 μ M) durant les premières 30 minutes (gauche) et 400 heures (droite)

I-1-b. Comportement initial

De même que le comportement courant, le comportement initial diffère selon la concentration en tanin.

- $0 < [T] < 2000$ mg/L

Pour des concentrations inférieures à 2 g/L de tanins, le trouble suit la loi linéaire (2) indiquée en préambule. Les valeurs de a° et b° ainsi que les coefficients de corrélation correspondants sont présentés dans le tableau 16.

Tableau 16 : valeurs de a° , b° et des coefficients de corrélation correspondant pour l'interaction entre différentes concentrations en tanins et de la BSA (15 μ M) selon $NTU = a^\circ \cdot xt + b$

[Tanins]	a°	b°	r^2
50	56.54	4.94	0.9856
100	86.91	6.73	0.9928
300	2664	108.93	0.9912
400	4361.1	108.27	0.9965
500	8897.1	249.67	0.9967
700	20139	478.87	0.9763
900	19687	662.93	0.9265
2000	4114.3	891.67	0.9647

▪ **Vitesse initiale de développement du trouble**

Le graphique du facteur a° , vitesse initiale de développement du trouble, selon la quantité de tanin initiale est représenté en figure 51. La courbe présente sensiblement le même profil que pour la vitesse courante, à savoir une augmentation de la vitesse initiale avec la concentration en tanin jusque 700 mg/L, puis une diminution. La vitesse de réaction est identique à 700 et 900 mg/L.

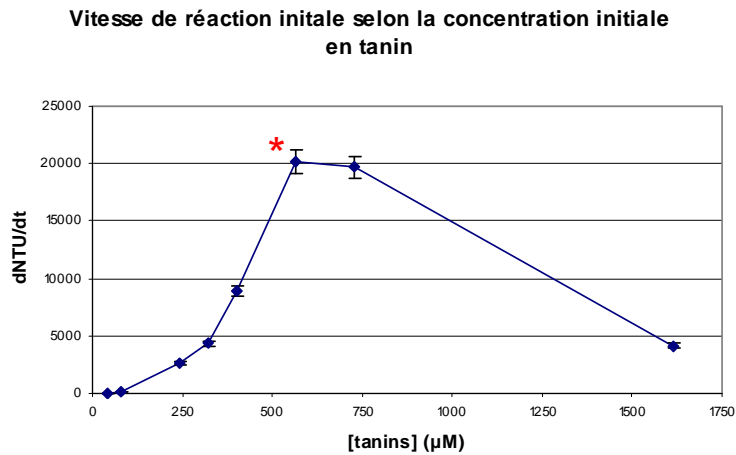


Figure 51: Vitesse initiale de développement du trouble selon la quantité de tanin initiale.

Il a été vu que la vitesse de réaction peut s'écrire $v = k[T]^\Theta [P]^\Pi$

soit, en passant en logarithme: $\ln(v) = \ln(k) + \Theta \ln([T]) + \Pi \ln([P])$

et, lorsque $t \rightarrow 0$

$$\ln(v) = \ln(k) + \Theta \ln([T]^\circ) + \Pi \ln([P]^\circ)$$

La courbe $\ln(v) = f(\ln([T]^\circ))$ est donc une droite de pente θ . Pour déterminer θ , il est possible d'utiliser la vitesse de réaction en NTU/s, car le coefficient la reliant à la vitesse en mol/s³²² se retrouve dans l'ordonnée à l'origine de la courbe tracée en figure 52.

Détermination de l'ordre cinétique initial partiel par rapport au tanin

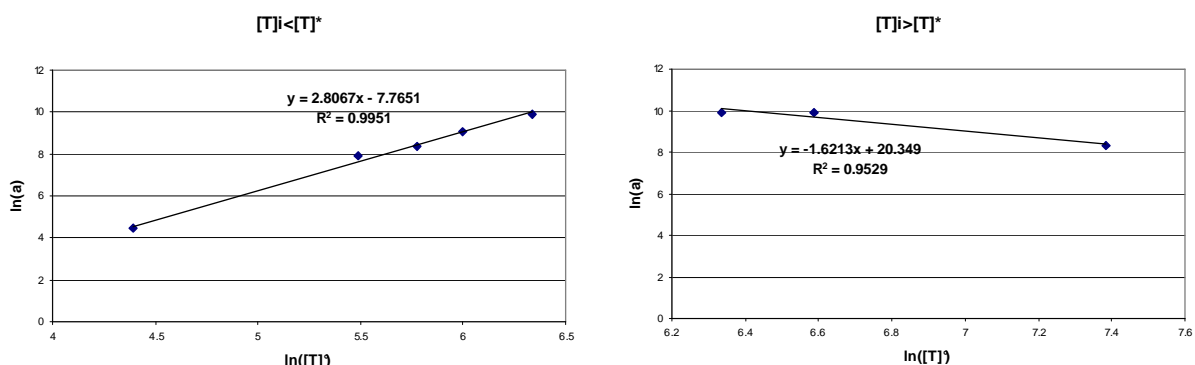


Figure 52: Détermination de l'ordre cinétique partiel par rapport aux tanins

L'ordre cinétique partiel par rapport aux tanins est donc de 2,81 pour $[T]_i < [T]^*$ et -1,62 pour $[T]_i > [T]^*$. Ces ordres ne peuvent pas être généralisés à la réaction, car l'ordre initial et l'ordre courant sont souvent différents³²⁴.

■ Trouble initial

Le facteur b° représente le trouble formé à l'instant $t=0$, il peut être considéré comme la somme du trouble lié à la protéine et de celui lié aux tanins. Comme il apparaît sur la figure 53, cette valeur augmente avec la concentration initiale en tanin, même si, après 900 mg/L de tanin, cette hausse n'est plus linéaire. Le fait que la valeur de trouble à T^* ne soit pas le maximum confirme que la particularité liée à cette valeur trouve bien son origine dans le mécanisme de la réaction.

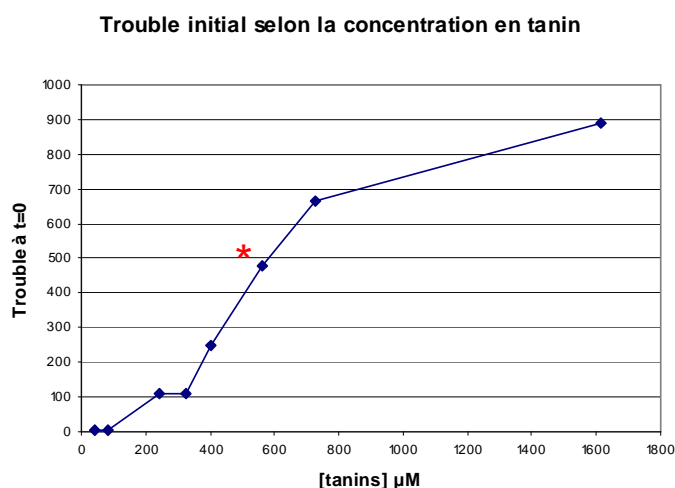


Figure 53: valeur de b° , représentant le trouble à l'instant $t=0$, selon la concentration initiale en tanin. L'astérisque représente la valeur correspondant au trouble final maximal obtenu.

b) Conclusion

L'étude du trouble créé en fonction du temps pour 1g/L de BSA et des quantités croissantes de tanins met en avant la quantité T^* observée durant l'étude à l'équilibre. En dessous de cette quantité, l'ordre cinétique partiel par rapport au tanin est supérieur à un. Lorsque que $[T]_i$ est supérieur à $[T]^*$, l'ordre cinétique partiel est inférieur à 1. Ceci est confirmé par l'étude au temps initial.

2. Variation de la concentration en protéine

Les mêmes manipulation que précédemment sont réalisées avec trois concentrations en BSA (0,1 / 1/ 10 g/L)

a) Comportement courant

- Trouble maximum

Le trouble maximum obtenu lors de l'interaction entre les différentes quantités de protéines étudiées selon la quantité de tanin ajouté est présenté en figure 54. La valeur du trouble pour 150 μM de BSA et 5g/L de tanin n'apparaît pas car elle est supérieure à la limite de l'appareil (4500 NTU).

Les trois courbes présentent une augmentation du trouble avec la concentration initiale en tanin. Dans le cas de 1,5 μM en BSA, l'augmentation s'arrête entre 80 et 240 μM de tanins, c'est donc là que se situe $[T]^*$. Pour 150 μM de BSA, cette stabilisation du trouble n'est pas observée. L'explication donnée pour 15 μM de BSA s'applique donc bien aux trois concentrations.

Trouble maximal obtenu pour différente concentration en tanins et BSA

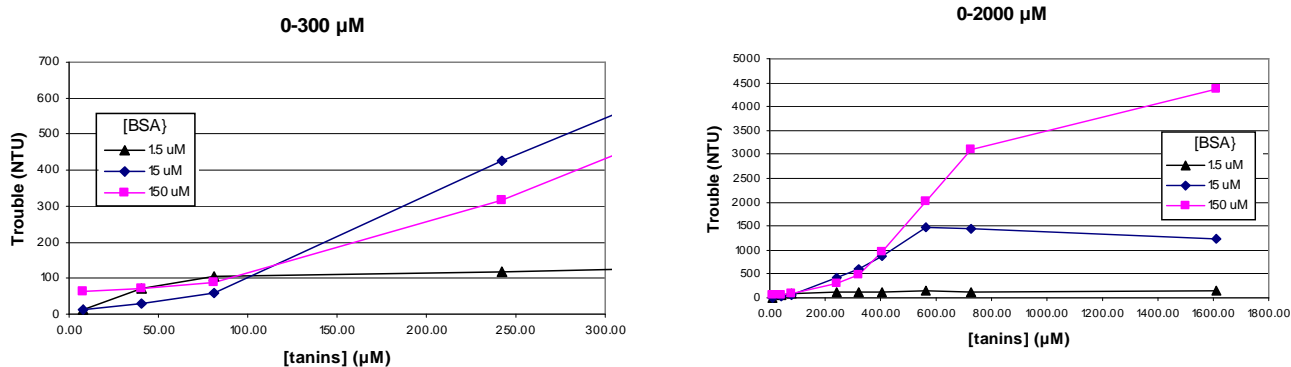


Figure 54 : Trouble maximal formé par différentes quantité de tanins et de BSA. Le graphique de gauche ne s'intéresse qu'aux plus faibles concentrations en tanin.

- Vitesse courante de développement du trouble

La valeur de $A_{T,P}$, reliée à la vitesse de développement du trouble selon la relation (3), en fonction de la concentration initiale en tanin pour les trois concentrations en protéine, est donnée en figure 55.

Le profil pour 1,5 et 150 μM est construit de la même façon que celui à 15 μM : la vitesse de développement du trouble augmente tout d'abord avec la concentration initiale en tannin jusqu'à une certaine concentration, avant de diminuer. Cette valeur, qui était de 700 mg/L pour 15 μM de BSA, est de 100 mg/L pour 1,5 μM en BSA et 900 mg/L pour 150 μM de BSA.

Il est intéressant de noter que jusque 10 mg/L, l'évolution de la vitesse de développement du trouble est identique pour les trois concentrations en protéine, puis, entre 100 et 400 mg/l de tanins, la vitesse est la même pour 15 et 150 μM . Cela implique que, dans certaines conditions de concentration, la vitesse de développement du trouble est indépendante de la concentration en protéine, c'est-à-dire que l'ordre partiel est nul.

Si l'on reprend l'équation $v = k[T]^\theta [P]^\pi$ de la cinétique, elle devient à ces concentrations $v = k[T]^\theta$.

Vitesse de développement du trouble pour différentes quantités de tanins et de protéines

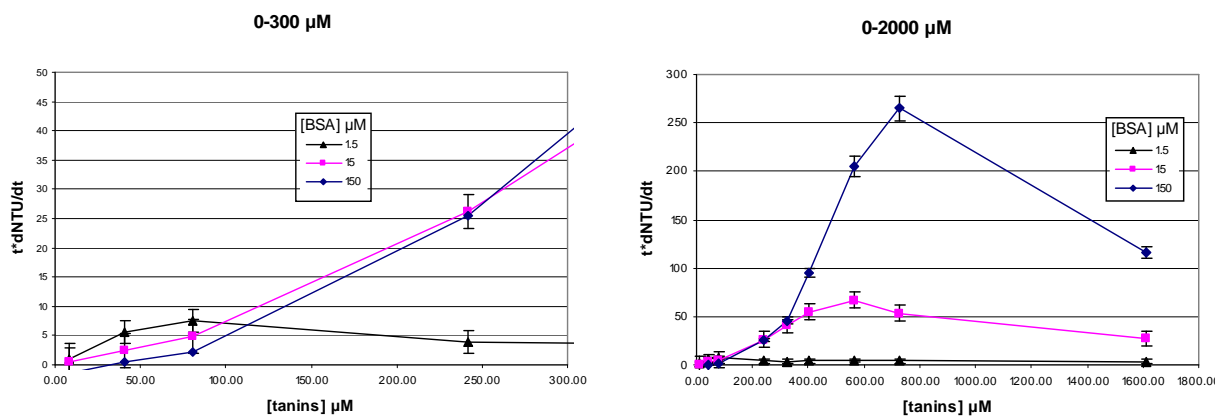


Figure 55 : Vitesse de développement du trouble pour 1,5, 15 et 150 μM de BSA en présence de différentes concentrations en tannin. La graphique de droite est un agrandissement aux plus faibles valeurs.

b) *Comportement initial*

- Vitesse initiale de développement du trouble

La vitesse initiale de développement du trouble en fonction de la quantité de tanin initiale (figure 56) suit la même tendance pour les trois concentrations en protéines, à savoir une augmentation jusqu'à une certaine concentration en tanin, puis une décroissance / stabilisation. La concentration en tanin correspondant à la vitesse initiale maximale est la même que pour la vitesse courante.

Cependant, l'évolution de la vitesse selon la quantité de protéine est très différente de ce qui a été observé pour la vitesse courante. En effet, tant que la vitesse de réaction maximale n'a pas été atteinte, c'est toujours la concentration en protéine la plus basse qui donne le développement du trouble le plus rapide

Vitesse de réaction initiale entre différentes quantités de tanins et de protéines

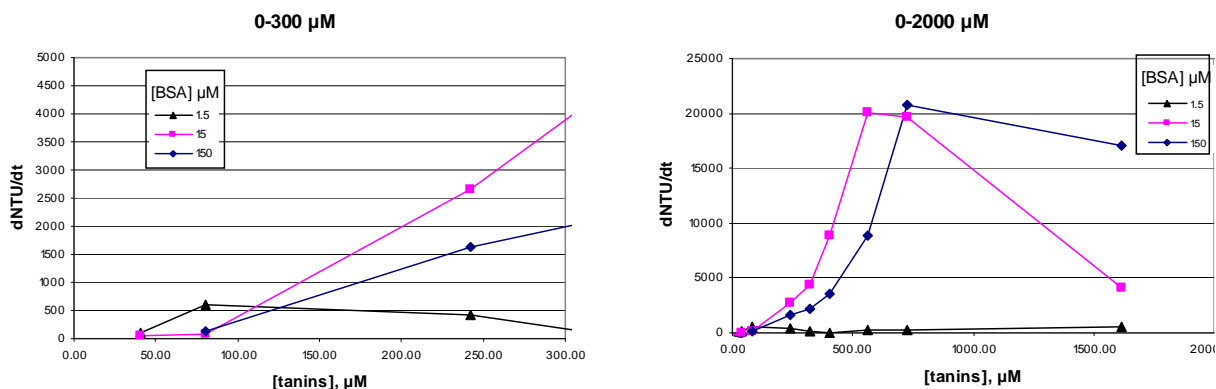


Figure 56: Vitesse initiale de développement du trouble pour 1,5, 15 et 150 µM de BSA en présence de différentes concentrations en tannin. Le graphique de droite est un agrandissement aux plus faibles valeurs.

En appliquant la même méthode que précédemment, il est possible de déterminer les ordres partiels par rapport aux tanins. On trouve respectivement pour 1,5 et 150 µM 2,02 et 2,23, à comparer avec 2,81 pour 15 µM.

3. Influence du ratio : conclusion

L'étude de la cinétique d'interaction entre les tanins et les protéines permet de suggérer un mécanisme d'interaction semblable à ceux décrits dans la littérature. De plus, lorsque $[T]$ est inférieur à $[T]^*$, l'ordre cinétique partiel par rapport est supérieur à 1, celui concernant les protéines semble nul. Ensuite, l'ordre partiel est négatif par rapport aux tanins (une augmentation de leur concentration ralentit la réaction) et devient positif par rapport à la BSA

Dans les 60 premières secondes, l'ordre cinétique partiel par rapport à la BSA est négatif.

Ces résultats sont difficilement comparables avec la littérature puisque dans les travaux s'intéressant à la cinétique de l'interaction tanins / protéines utilisent de la BSA greffée à un support et assument une dégénérescence de l'ordre. Cependant, ils n'observent aucune variation du phénomène cinétique avec la concentration en tanin²²⁷.

C. Influence du pourcentage d'éthanol

Pour mesurer l'influence du pourcentage d'éthanol sur l'interaction entre les tanins et les protéines, la réaction entre 15 µM de BSA d'une part et 100, 300, 500, 700, 900, 2000 et 5000 mg de tanins d'autre part a été suivi dans de la solution modèle vin (5 g/L d'acide tartrique, pH 3,5) à différent pourcentage d'éthanol (0, 5, 10, 15, 20).

1. Comportement courant

a) $0 < [T] < 2000 \text{ mg/L}$

Pour des concentrations en tanins inférieures à 2 g/L, l'éthanol n'influence pas le profil général du trouble en fonction du temps, un exemple est donné en figure 57 pour 700 mg/L de tanins, qui obéit toujours à la relation $[NTU]_{T,P}(t) = A_{T,P} \ln(t) + B_{T,P}$. Il est donc possible d'effectuer une comparaison des paramètres de vitesse et de trouble en fonction du pourcentage d'éthanol.

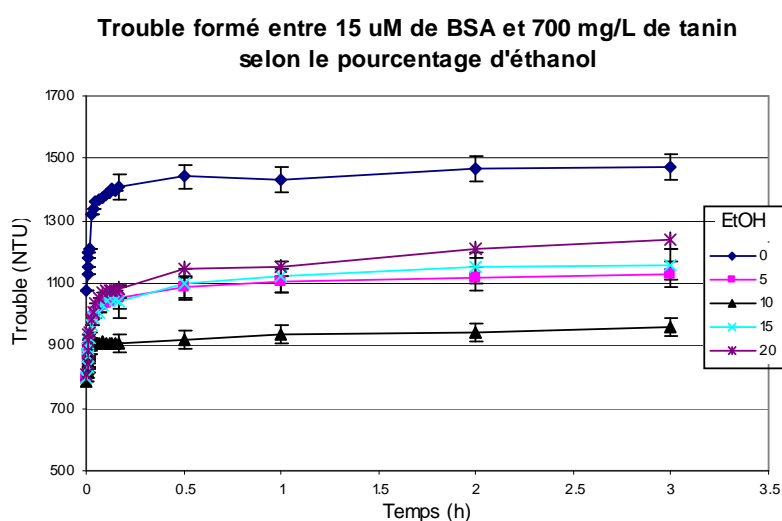


Figure 57: Evolution au cours du temps du trouble formé par 700 mg/L de tanins et 15 μM de BSA à différents pourcentage d'éthanol. les écart-types ne sont pas représentés au temps inférieurs à 20 minutes pour plus de lisibilité.

- Trouble final

Le profil du trouble final selon la concentration initiale en tanin (figure 58) présente la même allure quelque soit le pourcentage d'éthanol : une augmentation avec la concentration initiale en tanin, puis une baisse / stabilisation. La valeur de la concentration en tanin conduisant au trouble maximum n'est donc pas dépendante du pourcentage d'éthanol.

Il est cependant intéressant de remarquer que pour 0% d'éthanol, le trouble reste constant lorsque $[T] > [T]^*$. Sachant qu'à ce pourcentage d'éthanol, l'interaction entre tanin et BSA est purement hydrophobe, cela peut dire que le phénomène qui provoque cette baisse de turbidité est lié à des interactions hydrophiles.

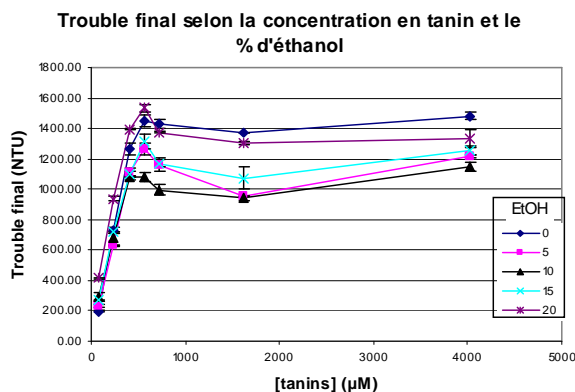


Figure 58: Trouble final entre les tanins et la BSA (15 µM) selon la concentration initiale en tannin et le pourcentage d'éthanol.

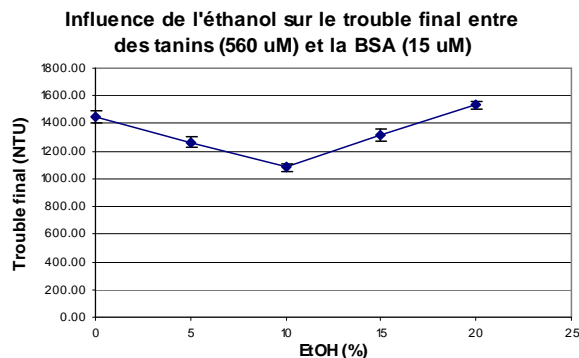


Figure 59: Influence du pourcentage d'éthanol sur le trouble final entre 700 mg/L de tanins et 1g/l de BSA. Le même profil est observé pour 100, 300, 500, 900, 2000 et 5000 mg/L de tanins.

Comme le montre la figure 59 pour 700 mg/L de tanins, le pourcentage d'éthanol influence le trouble final. En partant de l'eau pure, le trouble final diminue avec l'addition d'éthanol jusque 10%, avant d'augmenter par la suite, des tendances similaires étant observées pour toutes les concentrations en tannin. Cela correspond aux valeurs obtenues lors de l'étude stœchiométrique.

- Vitesse courante de développement du trouble

L'influence du pourcentage d'éthanol sur la vitesse courante de développement du trouble à 500mg/L de tannin apparaît dans la figure 60. La vitesse forme une parabole en fonction du pourcentage d'éthanol, avec un minimum à 10% (figure 61). Le même comportement est observé quelque soit la concentration en tannin.

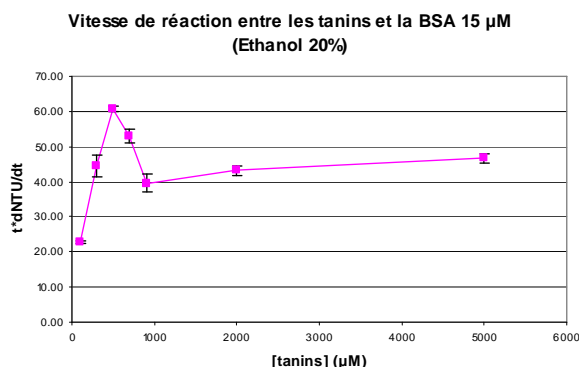


Figure 60: Evolution de la vitesse de réaction entre les tanins et la BSA à 20%

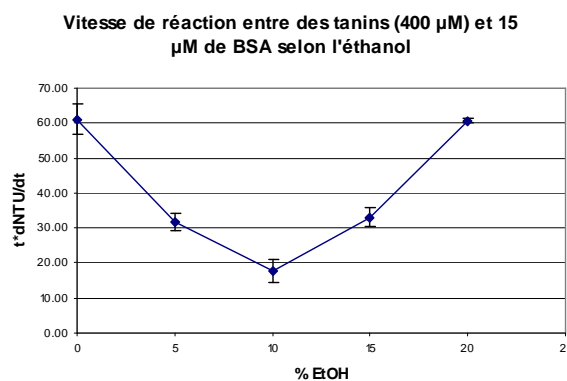


Figure 61: Influence de l'éthanol sur la vitesse de développement du trouble entre les tanins à la BSA

b) $[T] = 5000 \text{ mg/L}$

Il a été vu précédemment que l'évolution du trouble à 5g/L de tanin et 15 μM de BSA diffère fortement de celle des concentrations inférieures en tanin, la principale particularité étant une diminution du trouble avec le temps combinée à une augmentation brutale après la première agitation. Ce comportement se retrouve exacerbé à 0% d'éthanol et revient progressivement jusque la courbe logarithmique "normale" à 20% d'éthanol, comme cela peut se voir en figure 62.

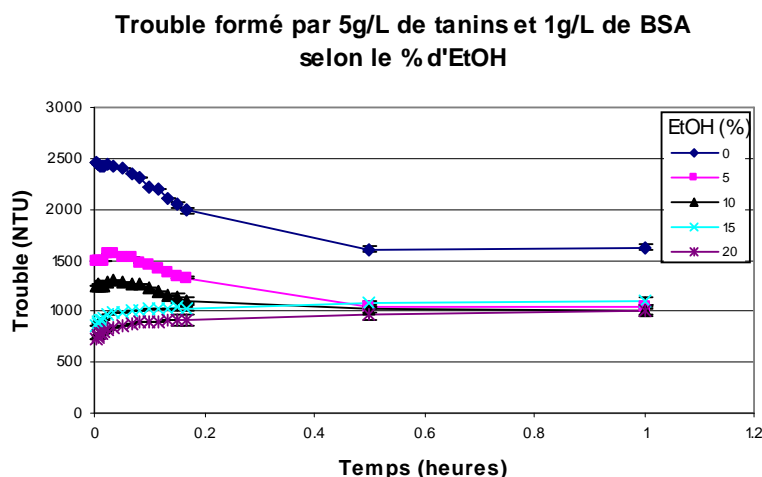


Figure 62: Influence de l'éthanol sur la formation du trouble au cours du temps à 5g/L de tanins et 1g/L de BSA.

Comme décrit dans la partie stœchiométrique, la dénaturation de la BSA augmente avec le pourcentage d'éthanol et les molécules de départ ne sont pas identiques. Or, le fait d'arriver à un trouble final identique laisse supposer que le complexe formé est identique et donc que la BSA s'est bien dénaturée sous l'effet de l'adsorption des tanins. La cinétique observée 0 à 15% représente donc l'effet cumulé de l'agrégation des tanins et de la dénaturation de la BSA.

2. Influence de l'éthanol: conclusion

On observe tout d'abord une évolution du trouble maximal avec l'éthanol, correspondant à l'évolution de la quantité de tanin fixée sur la protéine étudiée précédemment. D'autres travaux observent un tel comportement du trouble³²⁵. La vitesse de réaction est également influencée par l'éthanol.

L'un des points les plus importants est l'évolution du trouble au cours du temps à 5 g/L de tanins, qui peut sans doute être relié à la dénaturation de la protéine.

D. Influence du pH

Pour mesurer l'influence du pH sur l'interaction entre les tanins et les protéines, la réaction entre 15 μM de BSA d'une part et 100, 300, 500, 700, 900, 2000 et 5000 mg de tanins d'autre part a été suivie dans de la solution modèle vin (5 g/L d'acide tartrique, 12,5% EtOH) à pH 1, 3,5 (témoin) et 5. Cependant, les résultats obtenus à pH présentent un trouble extrêmement faible et leur répétabilité est médiocre, ainsi ils ne seront pas utilisés. L'explication de ce phénomène se situe peut-être dans la présence de complexes solubles observés à l'équilibre.

1. Comportement courant

a) $0 < [T] < 2000 \text{ mg/L}$

A pH 5, entre 0 et 2 g/L de tanins, le trouble est lié au temps de manière logarithmique selon la relation (2). Les valeurs du trouble final, $A_{T,P}$ et $B_{T,P}$ ainsi que les coefficients de corrélation correspondants sont présentés dans le tableau 17.

Tableau 17 : Valeurs du trouble final, $A_{T,P}$ et $B_{T,P}$ (selon) et des coefficients de corrélation correspondant pour l'interaction entre différentes concentrations en tanins et de la BSA (15 μM)

[Tanins]	Trouble final	a	b	r^2
10	9.96	0.1639	6.0362	0.8871
50	42.6	3.4362	23.25	0.957
100	109	7.2548	65.654	0.9456
300	397	13.567	293.09	0.9605
400	477	16.251	359.94	0.9864
500	567	17.203	461.86	0.9916
700	955	30.566	753.78	0.9818
900	948	23.949	808.87	0.9948
2000	990	23.606	761.02	0.8997

- Trouble final

Les valeurs obtenues pour le trouble finale selon la concentration initiale en tanin à pH 5 suivent la même tendance qu'à pH 3,5. Le trouble augmente avec la concentration en tanin jusque $[T]^*$ (figure 63). La valeur de cette concentration est la même (700 mg/L) pour les deux pH. Si les valeurs de trouble final sont assez semblables au début, elles sont moins importantes pour pH 5 à partir de 500 mg/L. On retrouve tout à fait les observations effectuées dans la partie stœchiométrie.

De même qu'à 0 % d'éthanol, le trouble formé par les tanins et la BSA reste stable après [T]*. Ceci est encore à mettre en parallèle avec l'origine purement hydrophobe des interactions et sera discuté plus loin.

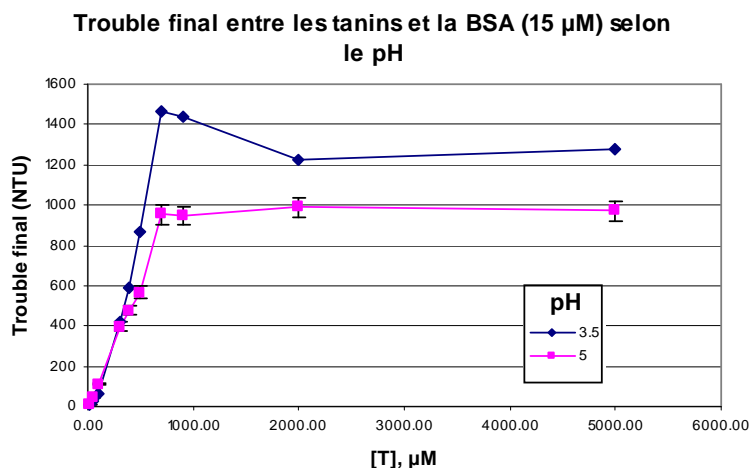


Figure 63: influence du pH sur le trouble final entre les tanins et la BSA (15 µM)

- Vitesse de réaction courante

En augmentant le pH de 3,5 à 5, la vitesse courante de développement du trouble diminue, mais suit la même tendance (figure 64). Elle augmente jusqu'à la concentration [T]* puis diminue.

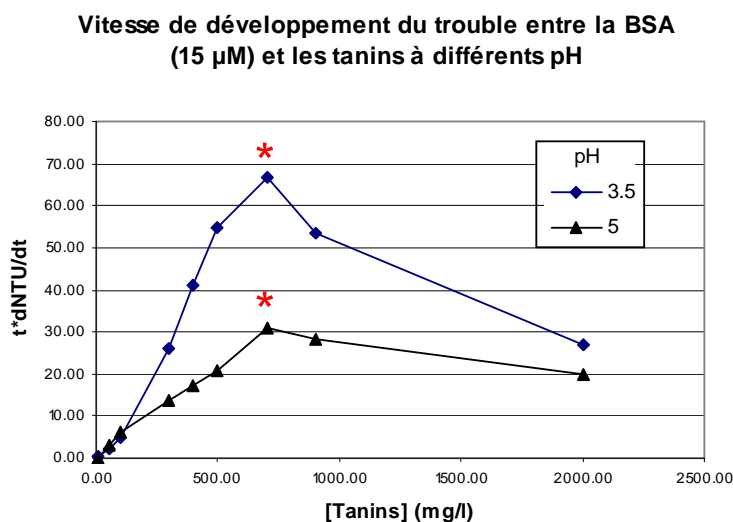


Figure 64: Influence du pH sur la vitesse de développement du trouble selon la concentration initiale en tanin. L'astérisque indique la concentration de trouble final maximum dans ces conditions.

La différence entre l'interaction à pH 3,5 et pH 5 est la présence de liaison hydrogène. Il semble donc que celle-ci permette d'augmenter la vitesse de l'interaction

b) $[T] = 5000 \text{ mg/L}$

Il a été vu précédemment que l'évolution du trouble à 5g/L de tanin et 15 μM de BSA, pH 3,5, diffère fortement de celle des concentrations inférieures en tanin. La principale particularité étant une diminution du trouble avec le temps combinée à une augmentation brutale après la première agitation. Lorsque le pH passe à 5, le trouble à 5g/L suit de nouveau une loi logarithmique.

En se basant sur ce qui a été observé pour l'influence de l'éthanol, ceci s'explique par l'absence de dénaturation de la BSA à pH 5.

2. Comportement initial

a) *Vitesse initiale*

L'influence du pH sur la vitesse de développement initial du trouble est montrée sur la figure 65. Alors qu'aux faibles concentrations, la vitesse est indépendante du pH, est elle ensuite beaucoup plus faible à pH 5 (figure 65). De plus, le profil de cette vitesse avec la concentration initiale en tanin est très différent.

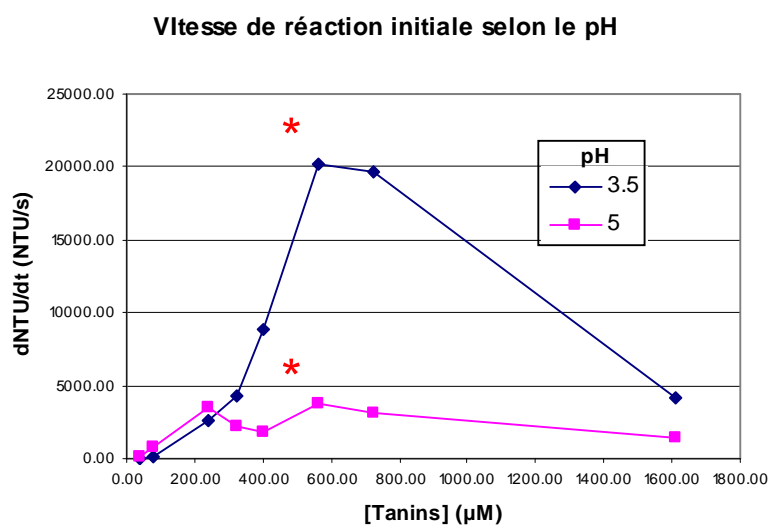


Figure 65: Influence du pH sur la vitesse initiale de développement du trouble. L'astérisque indique la concentration de trouble final maximum dans ces conditions.

Il apparaît donc que l'importance des liaisons hydrogènes sur l'augmentation de la vitesse d'interaction est encore plus marquée pour le comportement initial.

b) Trouble initial

De même que pour pH 3,5, la valeur de b° (trouble à l'instant $t=0$) augmente avec la concentration en tanin. Toutefois, elle semble se stabiliser après 900 mg/L, contrairement à pH 3,5 (figure 66). Dans l'ensemble, à l'exception de 2g/L, les valeurs obtenues à pH 5 sont légèrement supérieures à celle de pH 3,5.

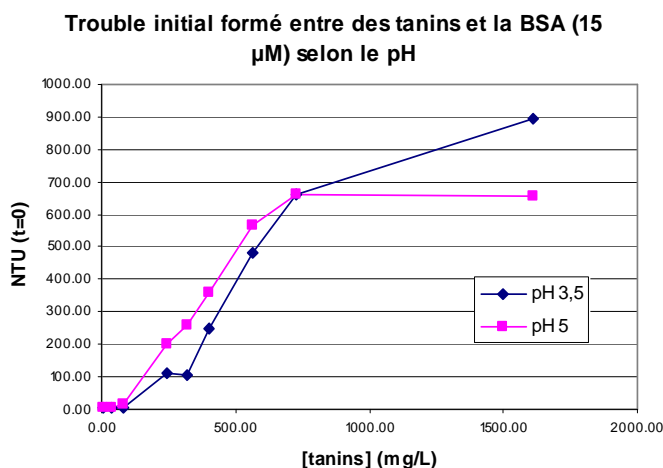


Figure 66 : Valeur de b° , représentant le trouble à l'instant $t=0$, selon la concentration initiale en tanin à pH 3,5 et 5.. L'astérisque représente la valeur correspondant au trouble final maximal obtenu.

3. Influence du pH: conclusion

De même que le pH influence l'état à l'équilibre, il influence la cinétique de la réaction entre les tanins et les protéines. Il semble que, pour le temps initial à pH, l'ordre cinétique partiel par rapport aux tanins soit nul. Malheureusement, l'absence de résultats interprétables à pH 1 ne permet pas d'interpréter pleinement ces résultats.

E. Etude cinétique: conclusion

L'utilisation de la turbidimétrie a permis plusieurs avancées. Le suivi du développement du trouble au cours du temps a permis de mettre en avant le changement d'ordre cinétique partiel par rapport aux tanins lorsque $[T]$ atteint $[T]^*$. L'ordre 0 obtenu par rapport aux protéines montre que la cinétique de réaction est dirigée par les tanins. Il semble que également que la présence de liaisons hydrogène renforce cette vitesse.

En s'intéressant aux troubles finaux, il est possible de suggérer un mécanisme qu'il faut maintenant rapprocher de ce qui a été observé dans la partie précédente.

Enfin, la dénaturation de la protéine supposée lors de l'étude de l'influence de l'éthanol est confirmée par l'évolution du trouble au cours du temps à différent pourcentage d'éthanol.

L'observation de la cinétique durant les 60 premières secondes rappelle l'astringence et il serait intéressant de savoir si une corrélation existe entre les valeurs de vitesse de réaction et l'apparition de la sensation d'astringence.

IV. Interaction tanin protéine: proposition d'un modèle

Au terme de cette étude concernant l'influence du ratio, du pH et de l'éthanol sur l'interaction entre les tanins condensés et la BSA, il est possible de proposer un mécanisme d'interaction entre ces molécules dans les conditions du vin (5 g/L d'acide tartrique, 12% éthanol, pH 3,5). Celui-ci est dépendant d'un ratio $\frac{[T]^*}{[P]^*}$ tel que:

- Si $\frac{[T]_i}{[P]_i} < \frac{[T]^*}{[P]^*}$, c'est-à-dire $[T]_i < [T]^*$ et $[P]_i > [P]^*$,

L'interaction se fait par une adsorption des tanins sur les sites hydrophobes de surface de la BSA.

La BSA n'est pas précipitée entièrement et celle ajoutée ne précipite pas et provoque une baisse du pourcentage des tanins précipités. L'ajout de tanin provoque lui une augmentation du trouble suite à la création de liaisons multidentates avec plusieurs protéines.

L'ordre cinétique partiel par rapport aux tanins se situe aux environs de 2,5. Il semblerait que celui par rapport à la BSA soit nul dans certaines conditions: la concentration de la protéine n'a alors aucune influence sur la cinétique.

- Si $\frac{[T]_i}{[P]_i} > \frac{[T]^*}{[P]^*}$, c'est-à-dire $[T]_i > [T]^*$ et $[P]_i < [P]^*$,

La BSA est vraisemblablement dénaturée et entièrement précipitée et son ajout en solution entraîne sa précipitation. L'interaction avec les tanins se fait selon deux classes de sites: des interactions hydrophobes sont renforcées par des liaisons H.

L'ajout de tanin diminue le trouble, car en libérant des liaisons multidentates pour permettre au maximum de tanins de se lier à la BSA, il entraîne la diminution de la taille des agrégats. Quelque soit la quantité de tanin ajoutée, le pourcentage de tanins précipités atteint un équilibre.

Enfin, l'ordre partiel de réaction est négatif par rapport aux tanins.

L'existence d'une équation reliant linéairement le ratio dans le précipité au ratio initial montre la continuité du phénomène de part et d'autre de $\frac{[T]^*}{[BSA]^*}$.

Toutes ces caractéristiques sont résumées dans la figure 67.

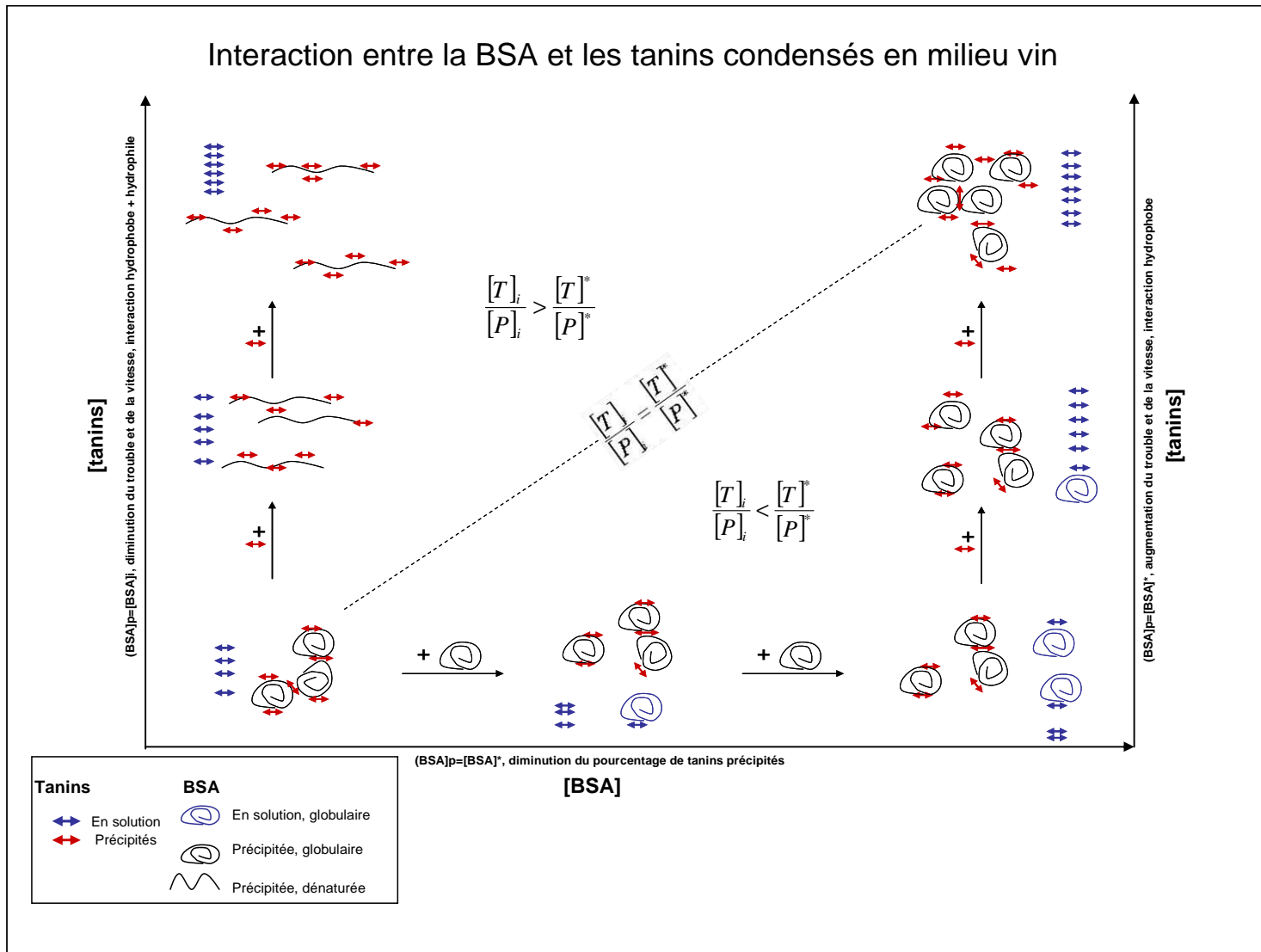


Figure 67 : Schéma illustratif de l'interaction entre la BSA et les tanins condensés en milieu vin

**Chapitre III - Suivi des tanins et des protéines
durant la vinification et la dégustation :
visualisation de leur interaction**

I. Introduction

Lors de la vinification parmi les composés du raisin extraits dans le moût se trouvent bien sûr des tanins²⁵ et des protéines¹⁶⁶. Le milieu dans lequel ils vont évoluer est extrêmement complexe, de par sa composition, mais aussi de son évolution en termes de pH, degré alcoolique, température qui vont influencer l'extraction des composés⁵¹.

Quant à la salive, en plus de comprendre des centaines de protéines et de posséder des propriétés viscoélastiques bien particulières, sa composition évolue également au cours du temps et selon les individus^{205, 207}. Lors de la dégustation, les tanins du vin se retrouvent donc de nouveau dans un milieu complexe.

Dans ces conditions, les résultats obtenus en utilisant des solutions modèles ne peuvent pas prendre en compte tous les paramètres, et il est impératif d'observer les interactions *in situ* pour comprendre réellement les phénomènes.

Le suivi des tanins durant la vinification a déjà fait l'objet de travaux, portant tant sur les composés phénoliques dans leur ensemble^{73, 143} que sur l'étude précise de la composition en proanthocyanidines³²⁶. De même, quelques études s'intéressent à l'évolution des protéines durant la vinification¹⁸⁶. Cependant, à notre connaissance, aucun travail ne s'est intéressé à suivre tanins et protéines en même temps.

L'interaction des tanins avec les protéines de la salive a été grandement étudiée, sous plusieurs aspects. Les raisons de l'existence de cette interaction, qui serait une protection des animaux contre certains aliments riches en tanins³²⁷ et ses conséquences sur le transport de certains flavanols dans l'organisme³²⁸ ont été abordées. Cependant, la plus grande partie des publications s'intéressant aux interactions entre tanins et protéines salivaires sont dirigées vers l'astringence³²⁹. Mais, à la lecture de ces publications, il apparaît qu'aucune, à notre connaissance, n'a étudié l'interaction directement avec du vin et de la salive.

Dans ce chapitre, constatant l'absence de protéines dans le vin rouge alors qu'elles sont présentes dans le raisin, des vinifications sont réalisées pour suivre leur évolution ainsi que celle des tanins et corréler les deux comportements. Ensuite, la dégustation est recrée directement entre des solutions de tanins ou du vin et la salive pour visualiser l'interaction entre tanins et les protéines. Enfin, les méthodes et les résultats sont éclairés dans la perspective d'un test d'astringence.

II. Les protéines du vin rouge

L'objectif de cette partie est d'appliquer la méthode de précipitation des protéines au TCA à un vin rouge pour essayer d'en visualiser les protéines. Ces protéines pourraient être des protéines du raisin, mais également dériver d'agents de collage.

Lors d'essais préliminaires, une grande quantité de protéines a été révélée sur le gel 2D (figure 68). Cependant, l'analyse de ces spots par LC-MS/MS a révélé qu'il s'agissait de protéines provenant du métabolisme de bactéries acétiques, liées à l'oxydation du vin. Dans le cas d'une bouteille fraîchement ouverte, aucune protéine n'a pu être détectée, même si le vin est concentré avant la précipitation des protéines.

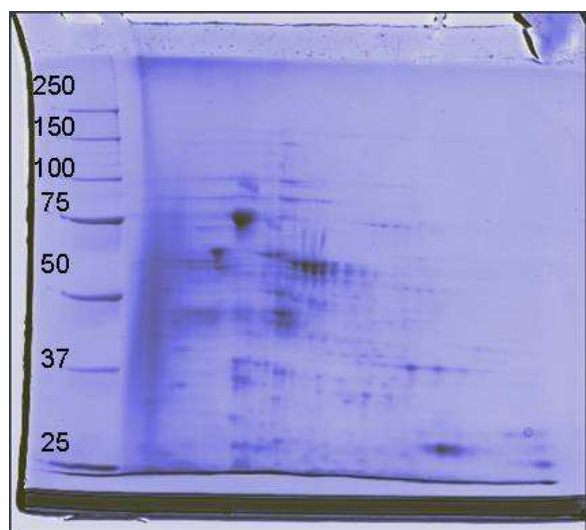


Figure 68: Gels 2D d'un vin contaminé.

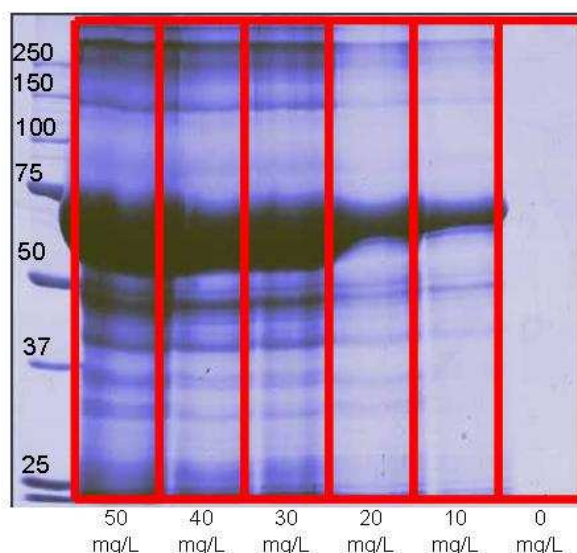


Figure 69: Détermination de la limite de détection de la BSA dans du vin par gels 1D.

Pour s'assurer de la validité de notre méthode et en déterminer la limite de détection, du vin supplémenté de différentes quantités de BSA (10, 20, 30, 40, 50 mg/L) est analysé. La présence de BSA apparaît sans équivoque dès 10 mg/L (figure 69).

L'absence de protéines détectées dans le vin et dans le vin concentré tendrait à montrer qu'il n'y a pas de protéines ou que leur quantité est trop faible pour être détectée. Cependant, la limite de détection de la BSA est inférieure aux concentrations apparaissant dans les quelques publications s'intéressant au sujet³³⁰. Il est également possible que des protéines soient présentes dans les vins analysés, mais qu'elles soient couplées à d'autres

macromolécules comme les tanins ou les polysaccharides, empêchant ainsi leur précipitation¹⁷⁰.

Il a été montré au chapitre précédent que, s'il existe toujours un pourcentage résiduel de tanins qui ne réagissent pas, les protéines précipitent toujours intégralement, à condition qu'il y ait suffisamment de tanins. Il est donc tout à fait probable qu'il n'y ait plus de protéine dans le vin rouge. Des analyses par ultracentrifugation ou même un dépôt de vin directement sur gel pourraient confirmer ces résultats.

Pour essayer de répondre à ces questions, il est donc utile de suivre l'évolution des protéines durant la vinification.

III. Du raisin au vin : suivi des interactions tanins / protéines lors de la vinification

Pour suivre l'extraction des tanins et des protéines dans le moût et essayer de quantifier leurs interactions, deux séries de microvinifications ont été réalisées au laboratoire, avec deux modalités étudiées : témoin et tanisage (40g/hL). Lors des prélèvements, en plus des paramètres classiques (pH, SO₂, degré alcoolique ...), les concentrations en protéine et en tanin ont été recherchées. Il est utile de noter que les résultats obtenus en microvinification peuvent être comparés à ceux obtenus en cave³³¹.

A. Suivi des protéines

- Cuves témoins

Le suivi des protéines a été réalisé par gels 2D et analyse HPLC. En l'absence de tanisage (témoin), la concentration en protéine du moût est tout d'abord légèrement inférieure à celle de la pulpe, avant d'augmenter et de redescendre. Elle reste ensuite constante pendant quelques heures avant de décliner (70 heures) (figure 70). Les gels 1D, obtenus après précipitation directe de la pulpe et du moût témoin (sans tanisage) montrent la même tendance (figure 71).

Ces résultats correspondent sans doute à l'extraction des protéines dans un premier temps, d'où une concentration dans le moût légèrement inférieure à celle de la baie. La concentration observée par la suite, supérieure à la teneur initiale dans le moût, peut s'expliquer par la complexation des protéines avec les tanins, sans toutefois entraîner la précipitation. Le même phénomène a été observé dans l'étude des interactions entre la BSA et

les tanins, entraînant également un artéfact de mesure. Durant le plateau, les quantités de protéines extraites et précipitées sont identiques. Finalement, lorsque l'extraction des protéines est terminée, la quantité restante précipite et elles disparaissent du moût.

Suivi des protéines du moût

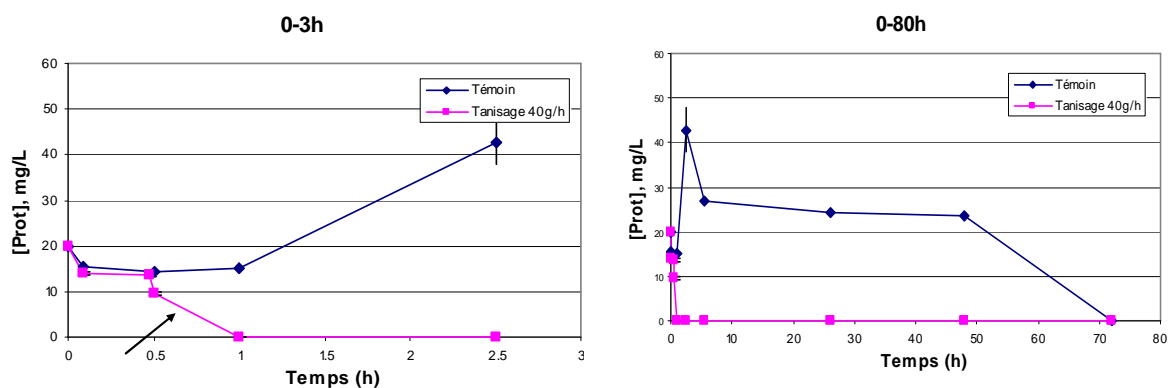


Figure 70: Suivi de la concentration en protéine dans le moût par HPLC. Le graphique de droite reprend les 3 premières heures, la flèche indique l'ajout de tanins.

Il n'est pas possible d'identifier les protéines à partir du gel 1D, on peut toutefois remarquer que les bandes sont comprises entre 25 et 75 kDa, correspondant à ce qui a été observé dans des travaux consacrés à l'étude des protéines de la baie³³². Les premières protéines extraites sont situées sur une bande aux alentours de 30 kDa. Ces protéines appartiennent sans doute à la pellicule, et il est possible de retrouver des spots assez importants pouvant correspondre sur des gels 2D du protéome de pellicule³³³. De plus ces bandes correspondent à celles observées dans le cas du pinot noir¹⁸³.

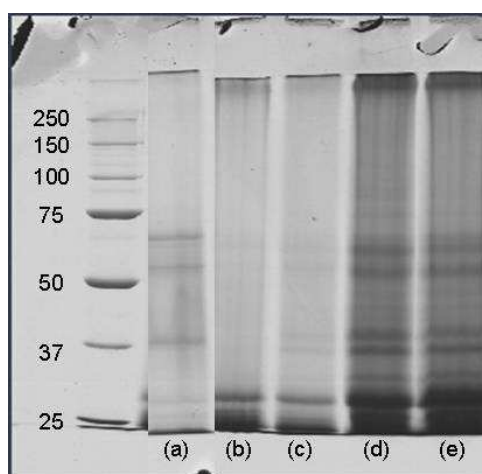


Figure 71 : Gels 1D de protéines de la pulpe (a) et du moût après 5 minutes (b), 30 minutes (c), 1 heure (d), 2h30 (e). Les marqueurs sont indiqués en kDa.

-
- Cuves tanisées

Dans le cas des cuves tanisées, la concentration en protéine chute immédiatement après l'ajout de tanins. On peut donc logiquement supposer une précipitation des protéines par les tanins ajoutés.

De plus, on peut remarquer que, quelque soit la modalité, le levurage, effectué au bout de 24 heures, n'a pas d'influence sur la concentration en protéine.

Lors de la seconde série de microvinifications, aucune protéine n'a été détectée en HPLC et les bandes observées en gel 1D étaient extrêmement faibles. Ceci peut s'expliquer par le fait que, lors de la réception des raisins, ceux-ci, issus de vendanges mécaniques, étaient déjà dans le jus à la réception. Celui-ci a été immédiatement retiré pour conserver les raisins en bon état, mais, comme présenté dans le chapitre bibliographie, il semblerait que la majeure partie des protéines du mout soit déjà extraite dans le jus¹⁸⁶.

B. Suivi des tanins

Le suivi des tanins a été réalisé par purification sur colonne, phloroglucynolise, HPLC-MS/MS lors de la seconde micro-vinification.

En absence de tanisage, la concentration en tanin dans la cuve augmente la première heure puis reste stable avant de diminuer au bout de 6 heures (figure 72). Le degré de polymérisation moyen des tanins, situé aux alentours de 3,5 lors des premières minutes de la vinification, se stabilise ensuite vers 2,5 durant les 6 heures suivantes avant de fluctuer à nouveau (figure 73). Enfin, le pourcentage d'unités gallates diminue fortement au début de la microvinification avant de rester assez stable (figure 74).

La diminution puis la stabilisation du degré de polymérisation et du pourcentage de gallate peuvent s'expliquer par la complexation avec les protéines. En effet, il a été montré dans la littérature que les tanins du vin précipitant avec les protéines sont préférentiellement ceux de DPm et de pourcentage de gallate le plus importants²⁴⁹. Cette précipitation avec les protéines s'accompagne naturellement d'une diminution de la teneur en tanin. Une fois que toutes les protéines ont réagi, alors que les tanins continuent d'être extraits, leur concentration peut de nouveau augmenter.

L'ajout de tanin exogène provoque une baisse immédiate de la concentration en tanin dans les cuves. La concentration en tanin suit ensuite exactement la même tendance que dans la cuve témoin, mais à un niveau inférieur. A l'ajout des tanins de vinification, le DPm augmente lui immédiatement, avant de baisser graduellement pour atteindre un niveau

semblable à la cuve témoin au bout de 6 heures. Concernant le pourcentage de gallates, le tanisage ne provoque pas d'effet immédiat, mais ralentit la diminution observée dans la cuve témoin. Là encore, le profil des courbes est identique entre les cuves témoins et tanisées, mais le pourcentage de gallate reste supérieur dans le second cas.

La baisse lente du D_{Pm} et du pourcentage de gallates observée ensuite peut laisser penser que les tanins précipitant sont ceux ajoutés. Les études disponibles sur l'influence du tanisage s'intéressent souvent à des temps de vinification plus longs^{73, 144}, il est donc difficile de comparer ces résultats, même si, dans le même intervalle de temps, aucune influence de l'ajout de tanin n'est observé dans certains travaux³⁰. Vivas et Glories constatent également une diminution des phénols totaux en ajoutant 1 g/L d'ellagitanin à du Merlot³³⁴.

Concentration en tanins au cours de la vinification

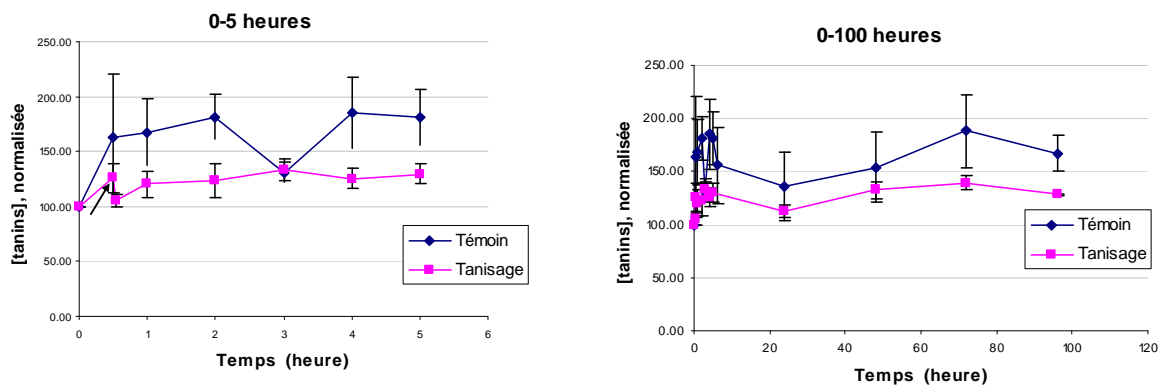


Figure 72: suivi de la concentration en tannin (normalisée à 100 à t_0) pour les cuves témoins et tanisées. Le tanisage est indiqué par une flèche. .

Evolution du D_{Pm} au cours de la vinification

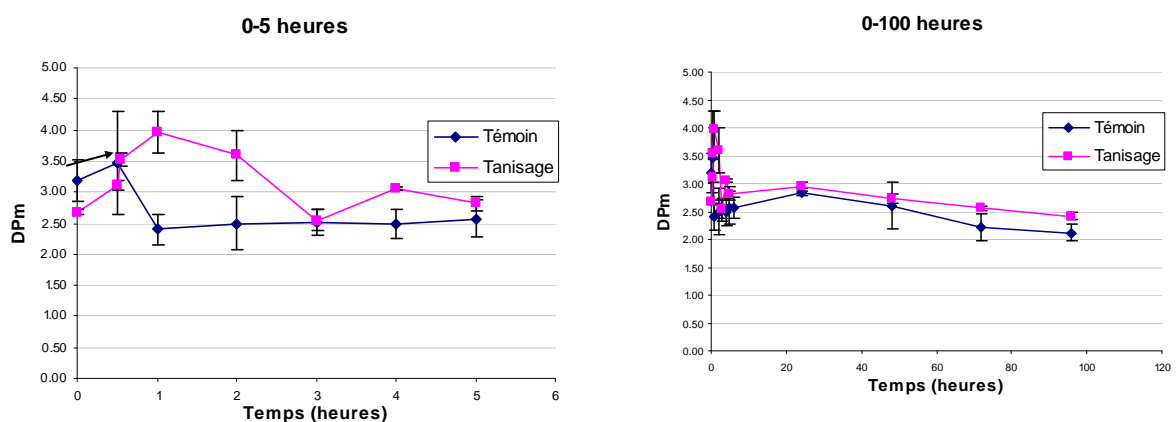


Figure 73: suivi du D_{Pm} des tanins (normalisée à 100 à t_0) pour les cuves témoins et tanisées. Le tanisage est indiqué une flèche.

Evolution du pourcentage de gallate au cours de la vinification

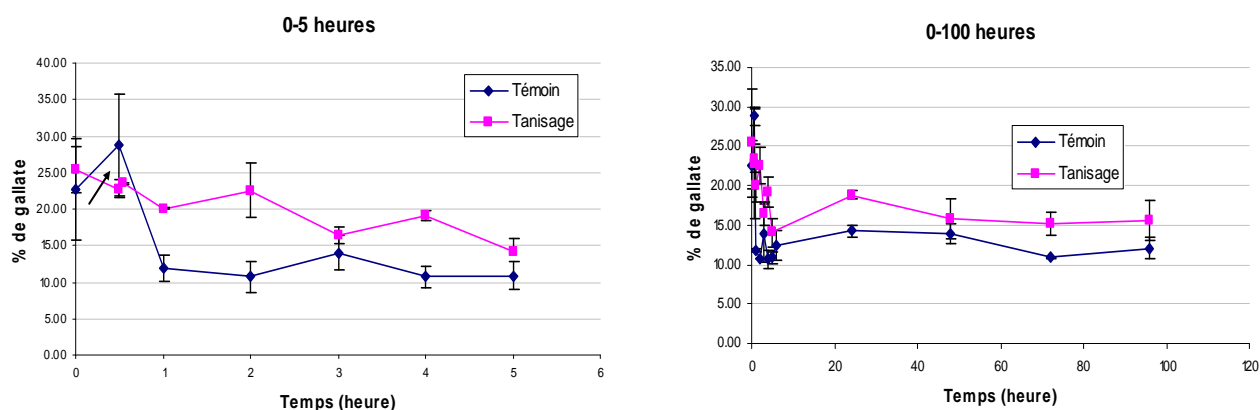


Figure 74: suivi du pourcentage d'unité gallate (normalisée à 100 à t_0) pour les cuves témoins et tanisées. Le graphique de droite reprend les 6 premières heures, le tanisage est indiqué par une flèche.

IV. Tanins et protéines salivaires : suivi de l'interaction lors de la dégustation

Pour suivre l'interaction entre les tanins et les protéines salivaires, des expériences de titration salive-tanin mimant la dégustation de vin ont été réalisées. L'objectif était de comparer la composition de la salive avant et après la dégustation par HPLC ou gels 2D.

A. Détermination du ratio vin / salive lors de la dégustation

Pour réaliser les expériences dans les conditions les plus proches de la réalité, le ratio vin / salive lors de la dégustation a tout d'abord été estimé. Pour cela, il est demandé à un volontaire de boire une gorgée dans un verre rempli d'eau, préalablement pesé, et de recracher cette gorgée dans un second verre, préalablement taré. Le volume moyen d'une gorgée a été établi à 30 mL tandis que celui de la salive est de 1 mL.

B. Suivi de l'interaction par HPLC

Une première étude a été menée pour essayer de quantifier la quantité de protéine salivaire précipitant avec du vin. Pour cela, la méthode HPLC développée pour étudier l'interaction tanins / protéines est reprise, en remplaçant les protéines par de la salive directement. Pour les tanins, ce sont soit les tanins commerciaux utilisés dans l'étude en milieu modèle, soit du vin.

L'emploi de la salive et du vin rend nécessaire la réalisation de courbes de calibration pour ces deux composés pour valider leur utilisation.

1. Analyse de salive par HPLC

Pour vérifier la possibilité de réaliser cette manipulation, de la salive filtrée a été injectée directement dans les mêmes conditions (colonne, HPLC, solvants, gradient) que les analyses tanins / protéines présentées au chapitre précédent. Le chromatogramme obtenu (figure 75) présente un pic à 13 minutes, comme il a été observé pour les protéines. La bonne corrélation de la courbe de calibration (figure 76) valide l'utilisation directe de la salive. Les intégrations ont été faites en prenant en compte l'ensemble des pics présents.

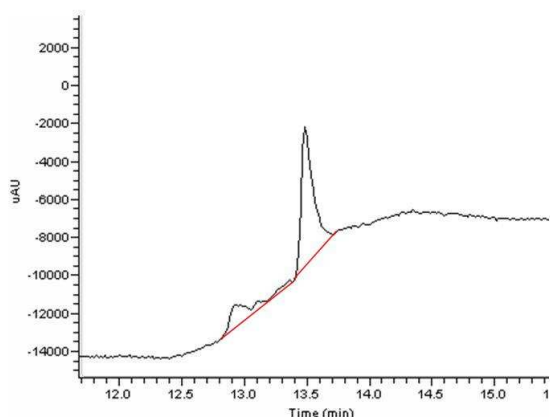


Figure 75: Pic de salive obtenu en HPLC (230 nm)

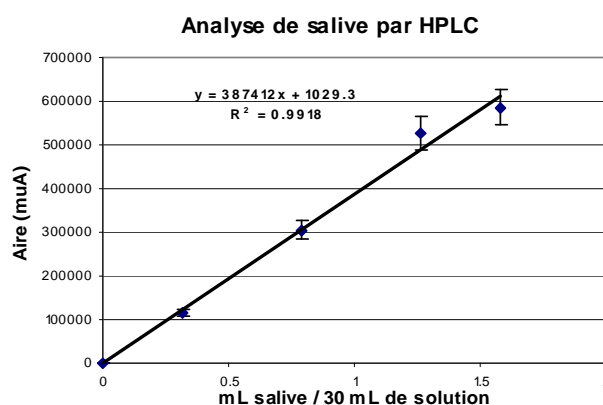


Figure 76: calibration de la salive par HPLC

2. Analyse de vin par HPLC

De même que pour la salive, des essais d'analyse de vin en injection directe avec la méthode développée dans le cadre de ces travaux ont été réalisés. Pour cela, du vin préalablement filtré sur 0,45 μM a été injecté. Le résultat étant un seul pic dans la zone « tanin » du chromatogramme (figure 77), une courbe de calibration se basant sur du vin à différentes dilutions a été réalisée (figure 78). La bonne corrélation de la courbe de calibration permet de valider l'injection directe de vin.

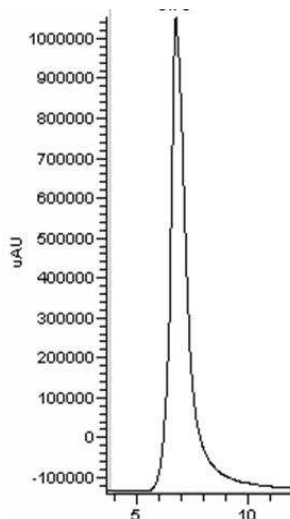


Figure 77 : Pic obtenu lors de l'analyse de vin par HPLC (280 nm)

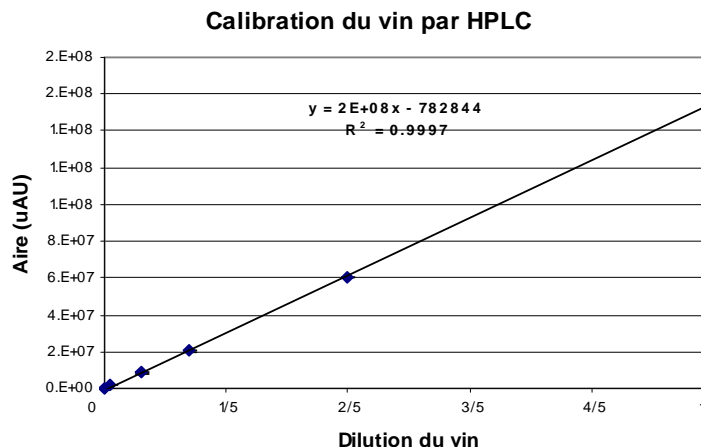


Figure 78 : Calibration de l'analyse de vin par HPLC

3. Suivi de l'interaction salive / tanin par HPLC

Pour titrer la salive par les tanins, 50 μ L de salive sont ajoutés à 900 μ L de tanins dont la concentration varie entre 0 et 5 g/L (0/10/50/100/300/400/500/700/900/2000/5000 mg/L). La réaction est faite en milieu vin synthétique (pH 3,5 / Ethanol 12% / acide tartrique 5g/L).

Les chromatogrammes (figure 79) présentent bien deux pics dont les aires évoluent comme attendus au cours de la titration, il est donc possible de suivre l'interaction tanins / salive avec cette méthode.

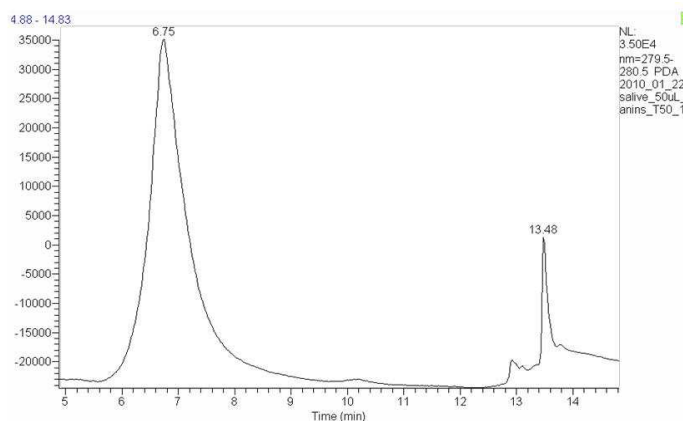


Figure 79: chromatogramme du surnageant résultant de l'interaction tanins / salive

La courbe de titration de la salive par les tanins (figure 80) est tout à fait semblable à celles des titrations de la BSA par les tanins observées au paragraphe précédent. Il apparaît que la totalité des protéines salivaires sont précipitées en présence de 700 mg/L de tanins.

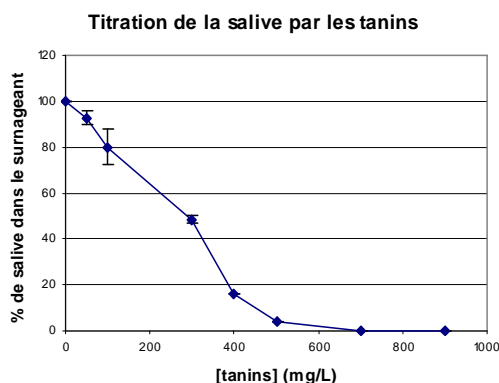


Figure 80: Titration de la salive par les tanins par HPLC

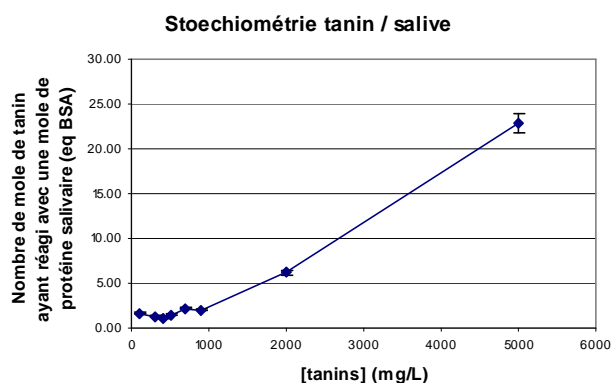


Figure 81: Stœchiométrie de l'interaction tanin / salive

Pour pouvoir comparer de manière un peu plus approfondie ces résultats avec ceux obtenus pour les protéines pures, la stœchiométrie de cette interaction a été étudiée, en considérant que la salive contient 80 μM de protéines⁵³. Le profil de stœchiométrie (figure 81) a la même allure que ceux obtenus avec la BSA, avec toutefois une certaine stabilité de la stœchiométrie tant que toute la salive n'est pas précipitée. Les valeurs de stœchiométrie rejoignent la littérature (où le ratio EGCG/IB5 est par exemple estimé entre 1 et 5³³⁵).

En utilisant l'équation établie pour la BSA au chapitre précédent,

$$\frac{[T]_p}{[BSA]_p} = 0,4085 \frac{[T]_i}{[BSA]_i} + 5,9$$

pour calculer le ratio du précipité en fonction du ratio initial, on observe que les valeurs théoriques et expérimentales sont dans le même ordre de grandeur lorsque la concentration en tanin est supérieure à 900 mg/L, comme cela peut se voir dans le tableau 18.

Tableau 18 : comparaison entre ratio expérimental et théorique dans le précipité

T/P dans le précipité		
[T]	Expérimental	Théorique
50.00	2.37	6.11
100.00	1.67	6.31
300.00	1.32	7.14
400.00	1.10	7.55
500.00	1.47	7.96
700.00	2.21	8.78
900.00	2.00	9.61
2000.00	6.18	14.14
5000.00	22.85	26.49

Cette expérience montre donc que les protéines de la salive précipitent de manière graduelle, avec une stœchiométrie finalement semblable à celle de la BSA.

4. Suivi de l'interaction salive / vin par HPLC

Pour vérifier la faisabilité du suivi de l'interaction salive / vin par HPLC, du vin et de la salive ont tout d'abord été incubés à différents ratios (Vin / salive : 90/10 – 50/50 – 10/90), puis le surnageant a été analysé après centrifugation. Les chromatogrammes obtenus (figure 82) présentant bien deux pics vin et salive distincts, une série de titrations de la salive par le vin dans les conditions de dégustation a été réalisée. Pour cela, 50 µL de salive ont été ajoutés à 900 µL de vin à différentes dilutions (1 / 0,4 / 0,18 / 0,14 / 0,1 / 0,08 / 0,06 / 0,02 / 0,01 / 0,002) réalisées dans de la solution modèle vin. Les aires des pics évoluent comme attendu au cours de la titration ; il est donc possible de suivre l'interaction tanins / salive avec cette méthode.

Cette titration a été réalisée pour les deux vins A (témoin) et B (tanisé) issus de la microvinification présentée précédemment.

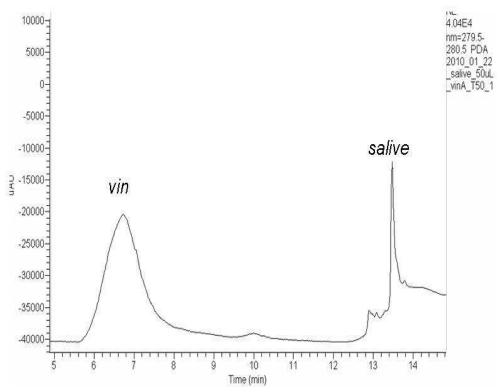


Figure 82: chromatogramme du surnageant résultant de l'interaction vin / salive (vin dilué au 1/100e)

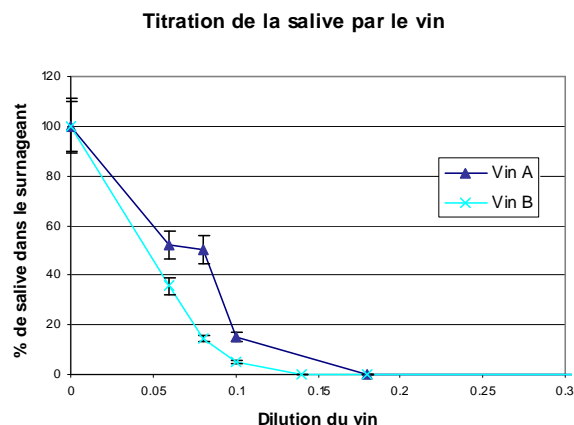


Figure 83: Suivi de la titration de la salive par du vin à différentes dilutions

Le profil de titration des protéines de la salive par le vin est assez proche pour les deux vins même si le vin B (tanisé) précipite les protéines salivaires un peu plus efficacement que le témoin (figure 83). De plus, alors qu'aucun dégustateur (jury de 30 personnes) n'a jugé les vins comme particulièrement astringents, il semble que les deux font précipiter l'intégralité des protéines de la salive.

Le suivi des interactions salive / vin par HPLC se révèle être un outil efficace pour quantifier la précipitation des protéines de la salive par le vin. Cependant, cette méthode traite la salive dans sa globalité, et il serait intéressant de pouvoir visualiser la titration de chaque protéine salivaire.

C. Suivi de l'interaction par gel 2D

Pour analyser le comportement de chaque protéine de la salive face aux tanins et au vin, la technique de précipitation des protéines au TCA / gels 2D a été appliquée.

1. Détermination du ratio salive / vin idéal pour l'expérience

Pour affiner la méthode d'analyse, des gels 2D ont été réalisés à partir de 25 mL de solution modèle vin à laquelle ont été ajoutés 125, 250 et 1250 μ L de salive. Dans le premier cas, le gel résultant était trop « léger », trop « chargé » dans le dernier, le ratio choisi est donc 250 μ L de salive pour 25 mL de solution (figure 84).

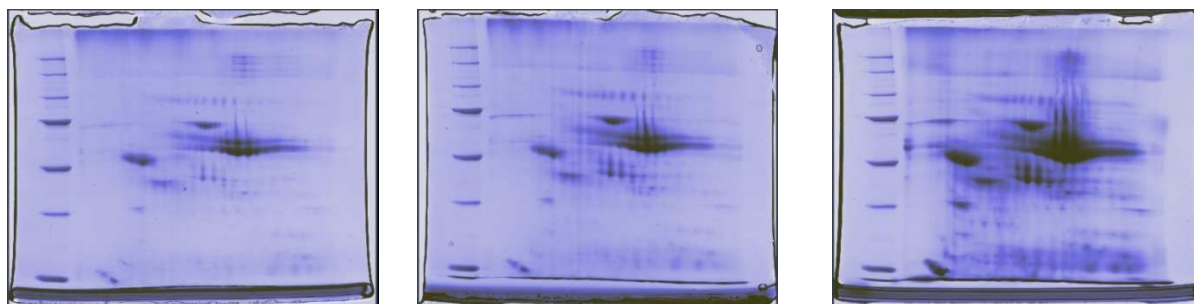


Figure 84: Gels2D de salive obtenus à partir de 25 mL de solution vin additionnés de 125 (gauche), 250 (centre) ou 1250 (droite) μ L de salive

2. Validation de la méthode : interaction de la salive avec la catéchine, les tanins et le vin

Pour vérifier qu'il est possible de suivre l'évolution des protéines de la salive lors de l'interaction avec des tanins, des essais ont été réalisés avec du vin, de la catéchine et des tanins. Pour cela, 500 μ L de salive ont été ajoutés à 50 mL de solution de tanin (400mg/L), de catéchine (400 mg/L) ou de vin. Après vingt quatre heure de repos, les solutions ont été centrifugées et le surnageant prélevé. L'analyse de ce surnageant permet donc d'identifier les protéines **qui n'ont pas précipité** lors du contact avec le vin ou les tanins. Les résultats sont présentés dans la figure 85.

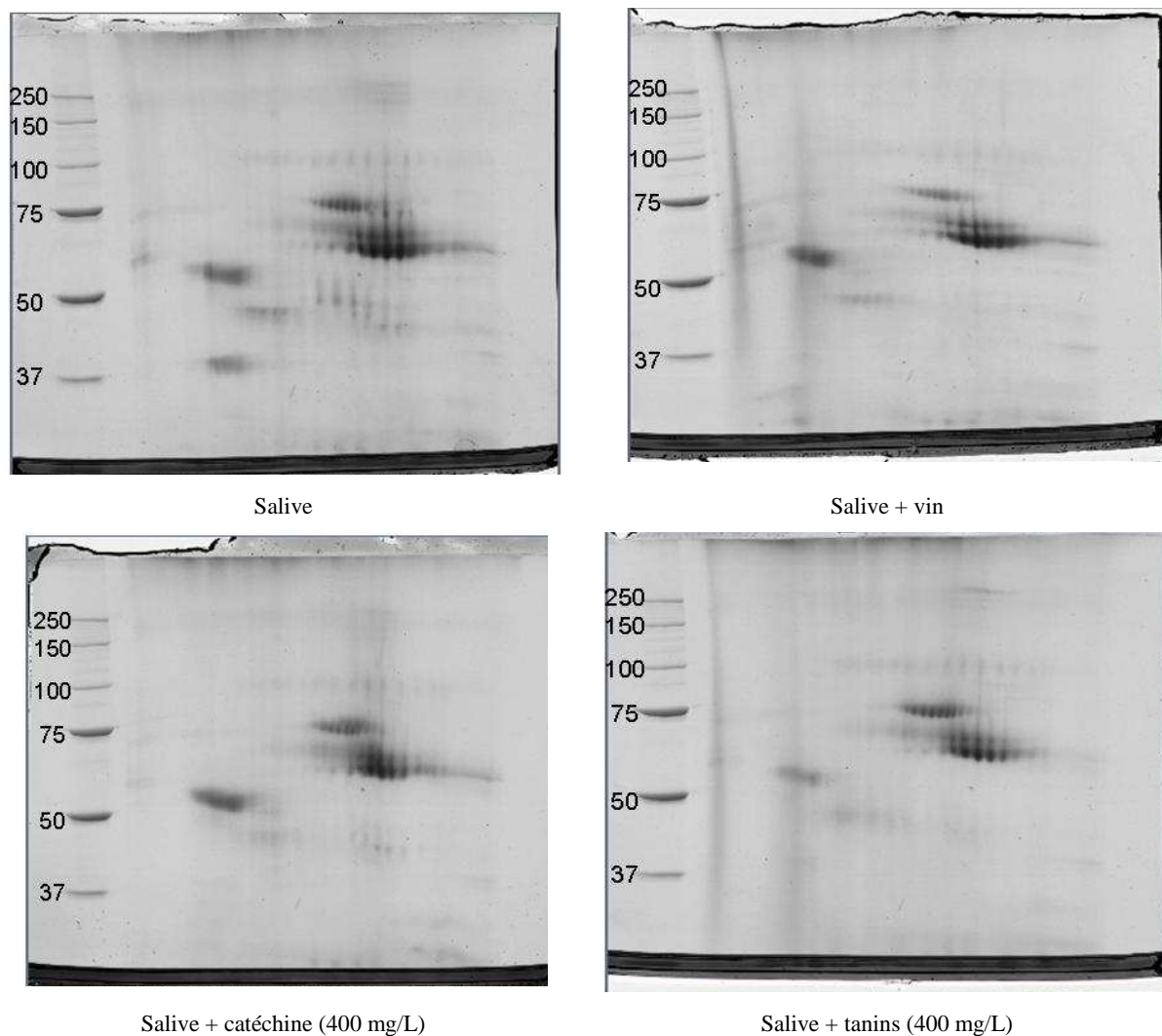


Figure 85 : Gels 2D des protéines des salives n'ayant pas précipité sous l'effet du vin, de la catéchine ou des tanins. Les masses des marqueurs moléculaires sont en kDa.

Pour les trois modalités (vin, tanins, catéchine), il est possible de visualiser la disparition de certaines protéines. Dans les trois conditions, les protéines de masses moléculaires inférieures à 45 kDa environ ont disparu. Le groupe de protéines acides de masse aux alentours de 50 kDa n'a quasiment pas précipité sous l'effet de la catéchine, faiblement réagi avec le vin, et beaucoup plus fortement avec les tanins. Ce groupe correspond à des PRP. Enfin, le groupe restant est l' α -amylase³³⁶, qui semble avoir interagi de la même façon dans les trois modalités, confirmant sa moindre réactivité envers les tanins²⁵³.

Ces résultats rejoignent tout à fait ceux obtenus par d'autres travaux, le spot autour de 60 kDa pouvant correspondre aux PRP glycosylées, réagissant graduellement avec les tanins²⁵⁰.

La glycosylation des protéines salivaires de rongeur augmente leur affinité avec les tanins²⁴⁶ mais prévient leur précipitation³³⁷. Enfin, les protéines de faibles masses disparaissant les premières sont sans doute des histatines qui précipitent très bien les tanins²⁴⁵, avec plus d'efficacité que les PRP²⁴⁴.

Le suivi de l'interaction entre les protéines de la salive et le vin ou les tanins par précipitation du surnageant présente des résultats intéressants. Ceci permet par exemple de se rendre compte que la catéchine entraîne une disparition de certaines protéines. Cette disparition est très intéressante, car la catéchine est en dessous de son seuil d'astringence dans nos conditions^{338, 339}.

3. Recherche d'un facteur de spécificité de l'interaction tanin / protéine dans les conditions de dégustation

Comme le montre le suivi de l'interaction entre la salive et des composés astringents, toutes les protéines de la salive ne présentent pas la même affinité. Une raison souvent avancée à cela est la présence de PRP, qui sont les plus réactives²⁴³.

Pour essayer de déterminer un facteur responsable pour cette affinité supérieure, la titration de plusieurs protéines par les tanins a été réalisée. Ces protéines sont l'ovalbumine, l' α -amylase, la fétuine, la β -glucosidase, la thyroglobuline, la gélatine et la BSA, leurs propriétés sont indiquées dans le tableau 19. Entre autres caractéristiques, le pourcentage de glycosylation et de proline sont présentés.

Tableau 19 : caractéristiques des protéines étudiées

Nom	Masse	Type	Particularité	pI
Ribonucléase	13700	globulaire		9,6
Gélatine	15400	globulaire	16,1 % Proline	6
Ovalbumine	43000	globulaire	4% glycosylée	4,8
Fétuine	48400	globulaire	22% glycosylée	3,3
α -Amylase	60000	globulaire		5,3
BSA	67000	globulaire	0% glycosylée	4,9
β -glucosidase	135000	globulaire		3,8
Thyroglobuline	660000	globulaire		4,5

La figure 86 présente la quantité de tanin nécessaire pour faire précipiter 50% de la quantité initiale de protéine (15 μ M) pour les différentes protéines étudiées.

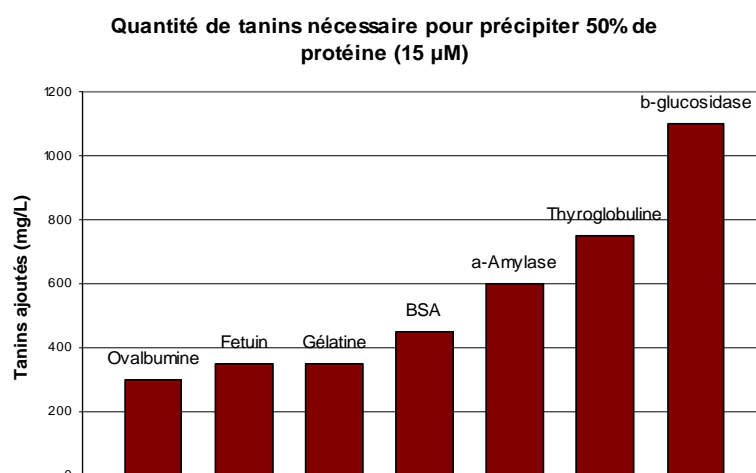


Figure 86 : Quantité de tanins nécessaires pour faire précipiter 15 μ M de protéine

Mise à part l'influence de la masse de la protéine sur sa précipitation, il ne ressort pas de ces expériences un facteur susceptible de promouvoir l'interaction entre les tanins et les protéines. Ceci rejoint les résultats de Bacon et Rhodes qui montrent une affinité beaucoup plus importante des tanins pour les protéines de la parotide mais quasiment identique pour la BSA, l'ovalbumine, l' α -amylase ou la gélatine²⁶³.

D. Interactions tanins / salive : discussion

1. Spécificité de l'interaction

L'étude des interactions entre les tanins et la salive par analyse des surnageants par HPLC et gels 2D permet d'apporter deux visions complémentaires sur ce phénomène. En visualisant les protéines n'ayant pas réagi sur gels, on se rend compte que toutes les protéines ne précipitent pas selon le même schéma, puisque certaines de faibles masses (vraisemblablement des histatines) disparaissent alors que d'autres, comme l' α -amylase, sont encore fortement présentes. Il peut s'agir de précipitations successives, liées à des constantes de réaction très en faveur des histatines, ou des précipitations simultanées, mais la grande concentration en α -amylase de la salive empêche la visualisation de ce phénomène. Il peut être intéressant d'éliminer l' α -amylase avant interaction avec les tanins³³⁶ ou de suivre la titration par des protéines de la salive par les tanins par gels 2D. Cette titration a été réalisée mais le manque de répétabilité des résultats n'a pas permis une analyse.

Le suivi de la titration par HPLC révèle une stœchiométrie et un comportement de la salive dans son ensemble semblable à une seule protéine, qui semblerait montrer la possibilité d'étudier toute la salive comme une seule protéine. En effet, l'étude de plusieurs protéines présentant des particularités similaires à celles de la salive ne permet pas de mettre en avant un facteur expliquant l'affinité.

2. Astringence

Pour discuter ces résultats en termes d'astringence, il est d'abord important de comprendre ce phénomène. L'American Society for Testing and Material décrit l'astringence comme l'ensemble des sensations de rétrécissement, d'étirement ou de plissement de l'épithélium buccal³⁴⁰. La question de savoir si l'astringence est un goût ou une sensation à longterm fait débat. A l'inverse des goûts, dont la perception diminue suite des ingestions répétées³⁴¹, l'astringence s'accroît dans les mêmes conditions³⁴², et certains travaux cherchent d'ailleurs à comprendre comment limiter ce phénomène³⁴³. Mais la preuve qu'il s'agit d'une sensation tactile est donnée très simplement par le fait que des surfaces dépourvues de capteurs gustatifs comme l'intérieur des lèvres permettent de ressentir l'astringence³⁴⁴.

La relation entre précipitation des protéines salivaires et la sensation d'astringence a été prouvée³⁴⁵, les résultats de cette partie confirment clairement la diminution de ces protéines. De même, la lubrification³⁴⁶ et la force de cisaillement de la salive sont affectées par des

tanins³⁴⁷. L'hypothèse la plus souvent évoquée est donc une détérioration du film salivaire par les tanins, conduisant la sensation de dessèchement.

Pourtant, nous observons ici la précipitation complète des protéines salivaires par un vin sans qu'une astringence particulière ne ressorte de la description des dégustateurs et, de manière beaucoup plus objective, la catéchine entraîne la disparition de protéines salivaires, alors qu'elle est en dessous de son seuil d'astringence. Il est possible qu'il existe une protéine salivaire aux propriétés particulières dont la précipitation entraîne à l'astringence. Il est également possible que la précipitation des protéines de la salive soit un phénomène accompagnant l'astringence. De nombreux travaux récents rejoignent cette hypothèse en montrant que l'astringence serait plutôt la conséquence de la fixation des tanins avec des protéines de la muqueuse³⁴⁸ et plus particulièrement sur des cellules épithéliales³⁴⁹. Dans ce cas, il se pourrait même que l'astringence ne soit pas due aux tanins complexés avec les protéines de la salive mais au contraire, à ceux qui ne précipitent pas²⁸⁶.

E. Vers un test d'astringence ?

Plus qu'une base de la sensation en bouche du vin (46 descripteurs sur 53 y sont reliés³⁵⁰), l'astringence est un critères d'acceptation intrinsèques du vin par le consommateur³⁵¹, qu'il soit dégustateur averti ou non³⁵². Pouvoir prédire cette astringence serait donc extrêmement intéressant.

Deux grandes approches peuvent être suivies pour cela. Certains utilisent le concept de la « boîte noire », qui consiste à corréliser le signal donné par un appareil dans l'analyse de l'échantillon avec l'astringence exprimée par un jury. De ce concept découlent les langues électroniques, appliquées au vin^{353, 354} ou au thé³⁵⁵⁻³⁵⁷. Certains utilisent également de l'infrarouge à transformée de Fourier³⁵⁸.

La seconde approche de modélisation de l'astringence consiste à mimer l'interaction avec la salive et d'en analyser le résultat. Si une minorité des travaux s'intéresse à la tribologie de l'interaction³⁴⁷, la majorité proposent de prédire l'astringence à partir d'analyse des composés phénoliques³⁵⁹. Corrélant les résultats de plusieurs méthodes de mesure des tanins avec l'astringence des vins analysés, Kennedy *et al*³⁶⁰ concluent que les meilleurs tests sont ceux faisant réagir une protéine modélisant la salive. Cette protéine peut être la gélatine, considérée comme modèle de PRP³⁶¹, la mucine³⁶²⁻³⁶⁴ ou encore l'ovalbumine³⁶⁵ et la réaction se fait

souvent par turbidimétrie³⁶⁶. L'utilisation d'une protéine modèle est évidemment un facteur limitant, et il serait intéressant d'identifier une protéine de la salive.

Les travaux réalisés dans ce chapitre trouvent ici une application. Le suivi de la titration de la salive par les tanins et le vin par gel 2D, permettra sans aucun doute l'identification d'une ou plusieurs protéines représentative du protéome salivaire. En effet, dans une récente étude, Gambutti *et al*, suivant une démarche semblable, ont isolé quatre protéines : la lactoferrine, deux PRP et l' α -amylase³⁶⁷. Cependant, ce résultat est limité par le ratio qu'ils ont utilisé : moitié tanin, moitié salive. De plus, l'utilisation de gel 1 D ne permet pas une grande précision sur l'identification des protéines. La titration de la salive par gels 2D proposée ici permettra donc sans doute de suivre le comportement d'une protéine représentant la salive dans son interaction avec des substances astringentes, ou de l'évolution du ratio entre plusieurs protéines, peut être plus à même de reproduire l'astringence³⁶⁸.

Toutefois, ces techniques présentent un handicap, à savoir qu'elles sont intimement liées à l'idée que c'est la précipitation des protéines de la salive qui est à l'origine de l'astringence. En effet, si l'astringence est liée à l'interaction des tanins qui n'ont pas réagi avec la salive sur d'autres cellules (comme évoqué plus haut), ces tests pourraient s'avérer caduques.

Le suivi de l'interaction entre salive et vin par HPLC présenté dans ce chapitre prend ici un grand intérêt, puisqu'il permet d'avoir accès à la quantité de tanins qui n'ont pas réagi avec la salive. Plus largement, il inclut tous les composés du vin, ce qui n'est pas négligeable quand on sait qu'une vingtaine de molécules (comme des acides cinnamiques ou benzoïques) autres que les tanins ont été identifiés comme astringents dans le vin³²⁹. Enfin, de nombreux facteurs liés au vin (pH, éthanol, acidité³⁶⁹, polysaccharides^{154, 370}) ou à la salive (pH³⁷¹, viscosité³⁷²) influent sur l'astringence. Ils sont entièrement pris en compte avec cette méthode.

Vu la faible quantité de salive (50 μ L par échantillon) nécessaire dans cette méthode, il est tout à fait envisageable de réunir un jury de dégustateurs, de lui faire déguster des vins plus ou moins astringents, puis, de faire réagir la salive moyenne de ce jury avec chacun des vins pour établir une corrélation entre vin précipité, salive précipitée et astringence. Il est alors facile d'analyser un vin et de prédire son astringence face à ce jury. Pour un jury de trente personnes, en prélevant 5 mL de salive à chacun, il sera alors possible d'effectuer ... 3000 analyses !

V. Conclusion

L'extraction des protéines et des tanins du raisin dans le moût a pu être visualisée. Leurs comportements respectifs permettent de mettre en lumière une première interaction tanins / protéine dès cette instant, ce qui, à notre connaissance, n'avait pas encore été réalisé. Il serait maintenant utile de réaliser ces manipulations à taille réelle, pour disposer ainsi d'une plus grande quantité de protéines et faciliter leur précipitation par le TCA. Suivre la composition en protéine de moûts de vin rouge, rosé et blanc en parallèle et dans les mêmes conditions permettrait également d'attribuer la disparition des protéines à l'interaction avec les tanins ou à d'autres facteurs liés au raisin. L'influence du tanisage apparaît très clairement, et il sera intéressant d'investiguer plus avant les résultats obtenus, pour adapter les pratiques de tanisages rencontrées sur le terrain.

Cette visualisation de la disparition des protéines peut expliquer qu'aucune protéine n'ait été trouvée dans le vin rouge. Toutefois, des analyses par ultracentrifugation par exemple pourraient confirmer ces résultats.

La titration des protéines de la salive par les tanins et le vin a été réalisée par HPLC. La méthode par injection directe du surnageant de l'interaction donne accès aux quantités de tanins et protéines n'ayant pas précipité. Les courbes de titration et de stœchiométrie montrent un mécanisme d'interaction identique à celui observé en solution modèle. La précipitation des protéines n'ayant pas réagi au TCA et leur analyse par gel SDS-PAGE offre de très jolies perspectives pour suivre le comportement de chaque protéine individuellement face aux tanins.

Les résultats permettent de penser que l'astringence est bien reliée à la précipitation des protéines de la salive, mais sans doute à travers à un phénomène plus complexe.

Conclusion Générale

L'interaction entre les tanins et les protéines est un des phénomènes les plus importants en Œnologie. Depuis l'extraction des composés du raisin dans le moût jusqu'à la dégustation, et même l'assimilation des composés du vin par l'organisme, cette réaction se produit à plusieurs étapes. Pour mieux comprendre l'interaction entre les tanins et les protéines, une étude fondamentale de son mécanisme mais également une compréhension de la manière dont elle se déroule dans le milieu œnologique (vinification et dégustation) sont requises.

Les travaux concernant l'interaction entre l'albumine de sérum bovin (BSA) et des tanins de pépins dans un milieu reprenant les caractéristiques du vin (pH 3,5 / 12% d'éthanol / 5 g/L d'acide tartrique) a mis en avant des propriétés essentielles.

La réaction n'est pas stœchiométrique mais il existe une relation liant le ratio final dans le précipité au ratio initial.

Un ratio initial optimum sépare deux modes d'adsorption des tanins sur la BSA.

En dessous de ce ratio, les tanins s'adsorbent à travers de la coopération positive principalement des sites hydrophobes. La quantité de BSA précipitée est alors limitée et son ajout provoque une diminution des tanins précipités. Dans ce cas, l'ordre cinétique partiel est nul par rapport à la BSA, supérieur à 1 par rapport aux tanins.

Au dessus de ce ratio, l'adsorption des tanins pourrait se faire via deux classes de sites, profitant de la dénaturation de la protéine qu'ils provoquent lors de l'interaction. Les liaisons sont ici hydrophobes, renforcées par des liaisons hydrogènes. L'intégralité de la BSA ajoutée précipite, mais son ordre partiel cinétique étant inférieur à 1, elle ralentit la réaction.

Dans tous les cas, il existe un équilibre entre tanins ajoutés et tanins précipités.

Lorsque les conditions de pH et d'éthanol évoluent, les mécanismes d'adsorptions des tanins sur la BSA évoluent également. L'interaction entre les tanins et les protéines se fait sans doute suivant des mécanismes différents au cours de la vinification et de la dégustation.

Au tout début de la vinification, les tanins et les protéines du raisin interagissent et il est possible de suivre l'extraction et la disparition des protéines au bout de quelques heures. Tant qu'elles sont présentes dans le moût, ces protéines limitent l'extraction des tanins. Cette disparition des protéines explique l'impossibilité de les détecter dans le vin rouge, malgré l'utilisation d'une méthode dont la limite de détection est très basse. L'ajout de tanins en début de vinification permet de précipiter les protéines au fur et à mesure de leur extraction.

Deux méthodes ont été mises au point pour suivre l'interaction entre les tanins et les protéines de la salive.

La première, utilisant l'HPLC, permet en visualisant la salive dans sa globalité, de montrer qu'elle se comporte comme une seule protéine dont le mode de réaction est semblable à celui de la BSA.

La seconde méthode, une analyse des protéines n'ayant pas réagi par gels bidimensionnel, montre que certaines protéines salivaires de faible masse moléculaire sont précipitées entièrement mais ne permet pas d'affirmer une spécificité de la précipitation.

La disparition de certaines protéines en présence de composés non astringents pose la question de la relation directe entre la détérioration du film salivaire et la sensation d'astringence.

Perspectives

A l'issue de ces travaux, plusieurs axes de recherche apparaissent en perspective.

L'étude des interactions entre les tanins et la BSA a permis de proposer un mécanisme d'agrégation. Poursuivre les investigations avec d'autres outils comme la microcalorimétrie ou le dichroïsme circulaire permettra de quantifier les énergies mises en jeu et de confirmer les phénomènes de dénaturation.

La cinétique de la réaction donne également des informations sur le mécanisme et pourrait expliquer des différences d'affinité observées entre protéines. Il faudra compléter ces expériences, à l'aide de méthodes quantitatives si possible.

Pour comprendre l'évolution des protéines et des tanins au cours de la vinification, une étude plus importante, se basant sur les résultats obtenus ici, peut permettre de comprendre la manière dont les protéines disparaissent. Il serait par exemple envisageable d'extraire des protéines et des tanins de raisin, puis d'appliquer les méthodes développées dans ces travaux pour comprendre leur interaction en milieu modèle, et comparer les résultats avec ceux obtenus en vinification.

L'analyse de salive par HPLC, en donnant accès à la fois aux quantités de produits précipités et restant en solution, peut être un outil utile dans la compréhension de l'astringence. Il faudra pour cela déterminer si des corrélations existent entre l'astringence d'un produit ressenti par un panel et les quantités de tanins précipités ou non. De même, il serait intéressant d'étudier par gel bidimensionnel la précipitation de protéines induites par des molécules au dessus et en dessous de leur seuil d'astringence.

L'idée d'une relation existante entre le ratio tanins / protéines initial et final est séduisante: serait-il possible de choisir la quantité de tanins que l'on souhaite donner à un vin ?

Références Bibliographiques

1. *Petit Larousse*. Larousse: 2009.
2. Freudenberg, K., *Die Chemie der Natürlichen Gerbstoffe*. J. Springer: Berlin, 1920.
3. Haslam, E., Vegetable tannins - Lessons of a phytochemical lifetime. *Phytochemistry* 2007, 68, (22-24), 2713-2721.
4. Bate-Smith, E. C., Plant phenolics into phytochemistry. *Nature* 1965, 207, (4997), 581-582.
5. Bate-Smith, E. C.; Swain, T., Recent developments in the chemotaxonomy of flavonoid compounds. *Lloydia* 1965, 28, (4), 313-331.
6. Bate-Smith, E. C.; Ribéreau-Gayon, P., Leuco-anthocyanins in seeds. *Qualitas Plantarum et Materiae Vegetabiles* 1959, 5, (3), 189-198.
7. Bate-Smith, E. C., The contribution of phenolic substances to quality in plant products. *Qualitas Plantarum et Materiae Vegetabiles* 1958, 3-4, (1), 440-455.
8. Bate-Smith, E. C.; Westall, R. G., Chromatographic behaviour and chemical structure I. Some naturally occurring phenolic substances. *BBA - Biochimica et Biophysica Acta* 1950, 4, (C), 427-440.
9. Bradfield, A. E.; Bate-Smith, E. C., Chromatographic behaviour and chemical structure II. The tea catechins. *BBA - Biochimica et Biophysica Acta* 1950, 4, (C), 441-444.
10. Bravo, L., Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews* 1998, 56, (11), 317-333.
11. Manach, C.; Scalbert, A.; Morand, C.; Rémésy, C.; Jiménez, L., Polyphenols: Food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition* 2004, 79, (5), 727-747.
12. Crozier, A.; Jaganath, I. B.; Clifford, M. N., Dietary phenolics: Chemistry, bioavailability and effects on health. *Natural Product Reports* 2009, 26, (8), 1001-1043.
13. Khanbabaee, K.; Van Ree, T., Tannins: Classification and definition. *Natural Product Reports* 2001, 18, (6), 641-649.

14. Glombitza, K. W.; Koch, M.; Eckhardt, G., Chlorierte phlorethole aus *Laminaria ochroleuca*. *Phytochemistry* 1977, 16, (6), 796-798.
15. Parys, S.; Rosenbaum, A.; Kehraus, S.; Reher, G.; Glombitza, K. W.; KÄ¶nig, G. M., Evaluation of quantitative methods for the determination of polyphenols in algal extracts. *Journal of Natural Products* 2007, 70, (12), 1865-1870.
16. Ragan, M. A.; Glombitza, K. W., Phlorotannins, brown algal polyphenols. *Prog. Phycol. Res.* 1986, 4, 129-241.
17. Mueller-Harvey, I., Analysis of hydrolysable tannins. *Animal Feed Science and Technology* 2001, 91, (1-2), 3-20.
18. Quideau, S.; Feldman, K. S., Ellagitannin chemistry. *Chemical Reviews* 1996, 96, (1), 475-503.
19. Quideau, S.; Jourdes, M.; Saucier, C.; Glories, Y.; Pardon, P.; Baudry, C., DNATopoiso­merase Inhibitor Acutissimin A and Other Flavano-Ellagitannins in Red Wine. *Angewandte Chemie International Edition* 2003, 42 (48), 6012-6014.
20. Saucier, C.; Jourdes, M.; Glories, Y.; Quideau, S., Extraction, detection, and quantification of flavano-ellagitannins and ethylvescalagin in a Bordeaux red wine aged in oak barrels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2006, 54, (19), 7349-7354.
21. Aron, P. M.; Kennedy, J. A., Flavan-3-ols: Nature, occurrence and biological activity. *Molecular Nutrition and Food Research* 2008, 52, (1), 79-104.
22. Gu, L.; Kelm, M. A.; Hammerstone, J. F.; Beecher, G.; Holden, J.; Haytowitz, D.; Gebhardt, S.; Prior, R. L., Concentrations of Proanthocyanidins in Common Foods and Estimations of Normal Consumption. *Journal of Nutrition* 2004, 134, (3), 613-617.
23. This, H., La gelée de thé. *Pour la Science* 2004, (326).
24. Ortega-Regules, A.; Romero-Cascales, I.; Ros García, J. M.; Bautista-Ortín, A. B.; López-Roca, J. M.; Fernández-Fernández, J. I.; Gómez-Plaza, E., Anthocyanins and tannins in four grape varieties (*Vitis vinifera* L.) evolution of their content and extractability. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin* 2008, 42, (3), 147-156.
25. Del Llaudy, M. C.; Canals, R.; Canals, J. M.; Zamora, F., Influence of ripening stage and maceration length on the contribution of grape skins, seeds and stems to phenolic composition and astringency in wine-simulated macerations. *European Food Research and Technology* 2008, 226, (3), 337-344.
26. Keith Grainger, H. T., *Wine Production: Vine to Bottle*. Wiley-Blackwell: 2005.
27. Résolution Oeno 12/2002. In *Vin*, O. I. d. l. V. e. d., Ed. 2002.

28. Cichova, M.; Petricek, J.; Fiala, J., Influence of tannin addition on the content and composition of polyphenolic compounds in wines. *Czech Journal of Food Sciences* 2008, 26, (SPEC. ISS.).
29. Obreque-Slír, E.; Peña-Neira, A.; López-Solís, R.; Ramírez-Escudero, C.; Zamora-Marín, F., Phenolic characterization of commercial enological tannins. *European Food Research and Technology* 2009, 229, (6), 859-866.
30. Bautista-Ortína, A. B.; Fernández-Fernández, J. I.; López-Rocaa, J. M.; Gómez-Plaza, E., The effects of enological practices in anthocyanins, phenolic compounds and wine colour and their dependence on grape characteristics. *Journal of Food Composition and Analysis* 2007, 20, (7), 546-552.
31. De Rosso, M.; Cancian, D.; Panighel, A.; Dalla Vedova, A.; Flamini, R., Chemical compounds released from five different woods used to make barrels for aging wines and spirits: Volatile compounds and polyphenols. *Wood Science and Technology* 2009, 43, (5-6), 375-385.
32. Fernández de Simon, B.; Hernández, T.; Cadahía, E.; Dueñas, M.; Estrella, I., Phenolic compounds in a Spanish red wine aged in barrels made of Spanish, French and American oak wood. *European Food Research and Technology* 2003, 216, (2), 150-156.
33. Cadahíaa, E.; Fernández de Simóna, B.; Sanza, M.; Povedaa, P.; Coliob, J., Chemical and chromatic characteristics of Tempranillo, Cabernet Sauvignon and Merlot wines from DO Navarra aged in Spanish and French oak barrels. *Food Chemistry* 2009, 115, (2), 639-649.
34. Pérez-Magariño, S.; Ortega-Heras, M.; Cano-Mozo, E.; González-Sanjosé, M. L., The influence of oak wood chips, micro-oxygenation treatment, and grape variety on colour, and anthocyanin and phenolic composition of red wines. *Journal of Food Composition and Analysis* 2009, 22, (3), 204-211.
35. Hanlin, R. L.; Downey, M. O., Condensed tannin accumulation and composition in skin of shiraz and cabernet sauvignon grapes during berry development. *American Journal of Enology and Viticulture* 2009, 60, (1), 13-23.
36. Chira, K.; Schmauch, G.; Saucier, C.; Fabre, S.; Teissedre, P. L., Grape variety effect on proanthocyanidin composition and sensory perception of skin and seed tannin extracts from Bordeaux wine grapes (cabernet Sauvignon and merlot) for two consecutive vintages (2006 and 2007). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2009, 57, (2), 545-553.
37. Downey, M. O.; Dokoozlian, N. K.; Krstic, M. P., Cultural practice and environmental impacts on the flavonoid composition of grapes and wine: A review of recent research. *American Journal of Enology and Viticulture* 2006, 57, (3), 257-268.
38. Mateus, N.; Marques, S.; Gonçalves, A. C.; Machado, J. M.; De Freitas, V., Proanthocyanidin composition of red *Vitis vinifera* varieties from the Douro valley

- during ripening: Influence of cultivation altitude. *American Journal of Enology and Viticulture* 2001, 52, (2), 115-121.
39. Souquet, J. M.; Cheynier, V.; Brossaud, F.; Moutounet, M., Polymeric proanthocyanidins from grape skins. *Phytochemistry* 1996, 43, (2), 509-512.
40. F. Mattivi, U. V. D. M. D. T., Differences in the amount and structure of extractable skin and seed tannins amongst red grape varieties. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 2009, 15, (1), 27-35.
41. Prieur, C.; Rigaud, J.; Cheynier, V.; Moutounet, M., Oligomeric and polymeric procyanidins from grape seeds. *Phytochemistry* 1994, 36, (3), 781-784.
42. Kennedy, J. A., Grape and wine phenolics: Observations and recent findings. *Ciencia e Investigacion Agraria* 2008, 35, (2), 77-90.
43. Fournand, D.; Vicens, A.; Sidhoum, L.; Souquet, J. M.; Moutounet, M.; Cheynier, V., Accumulation and extractability of grape skin tannins and anthocyanins at different advanced physiological stages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2006, 54, (19), 7331-7338.
44. Koyama, K.; Goto-Yamamoto, N.; Hashizume, K., Influence of maceration temperature in red wine vinification on extraction of phenolics from berry skins and seeds of grape (*Vitis vinifera*). *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 2007, 71, (4), 958-965.
45. De Beer, D.; Joubert, E.; Marais, J.; Manley, M., Effect of oxygenation during maturation on phenolic composition, total antioxidant capacity, colour and sensory quality of pinotage wine. *South African Journal of Enology and Viticulture* 2008, 29, (1), 13-25.
46. Canals, R.; Del Carmen Llaudy, M.; Canals, J. M.; Zamora, F., Influence of the elimination and addition of seeds on the colour, phenolic composition and astringency of red wine. *European Food Research and Technology* 2008, 226, (5), 1183-1190.
47. Heredia, F. J.; Escudero-Gilete, M. L.; Hernanz, D.; Gordillo, B.; Meléndez-Martínez, A. J.; Vicario, I. M.; González-Miret, M. L., Influence of the refrigeration technique on the colour and phenolic composition of syrah red wines obtained by pre-fermentative cold maceration. *Food Chemistry* 2010, 118, (2), 377-383.
48. López, N.; Puértolas, E.; Condón, S.; Álvarez, I.; Raso, J., Effects of pulsed electric fields on the extraction of phenolic compounds during the fermentation of must of Tempranillo grapes. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 2008, 9, (4), 477-482.
49. Guadalupe, Z.; Ayestarán, B., Effect of commercial mannoprotein addition on polysaccharide, polyphenolic, and color composition in red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2008, 56, (19), 9022-9029.

50. Morel-Salmi, C.; Souquet, J. M.; Bes, M.; Cheynier, V., Effect of flash release treatment on phenolic extraction and wine composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2006, 54, (12), 4270-4276.
51. Sacchi, K. L.; Bisson, L. F.; Adams, D. O., A review of the effect of winemaking techniques on phenolic extraction in red wines. *American Journal of Enology and Viticulture* 2005, 56, (3), 197-206.
52. Monagas, M.; Bartolomé, B.; Gómez-Cordovés, C., Updated knowledge about the presence of phenolic compounds in wine. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 2005, 45, (2), 85-118.
53. Sarni-Manchado, P.; Cheynier, V., Study of non-covalent complexation between catechin derivatives and peptides by electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* 2002, 37, (6), 609-616.
54. Peña-Neira, A.; Hernández, T.; García-Vallejo, C.; Estrella, I.; Suarez, J. A., A survey of phenolic compounds in Spanish wines of different geographical origin. *European Food Research and Technology* 2000, 210, (6), 445-448.
55. Rastija, V.; Mornar, A.; Jasprica, I.; Srečnik, G.; Medić-Šarić, M., Analysis of phenolic components in Croatian red wines by thin-layer chromatography. *Journal of Planar Chromatography - Modern TLC* 2004, 17, (1), 26-31.
56. Sánchez-Moreno, C.; Cao, G.; Ou, B.; Prior, R. L., Anthocyanin and proanthocyanidin content in selected white and red wines. Oxygen radical absorbance capacity comparison with nontraditional wines obtained from highbush blueberry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2003, 51, (17), 4889-4896.
57. Cliff, M. A.; King, M. C.; Schlosser, J., Anthocyanin, phenolic composition, colour measurement and sensory analysis of BC commercial red wines. *Food Research International* 2007, 40, (1), 92-100.
58. Anli, R. E.; Vural, N., Antioxidant phenolic substances of Turkish red wines from different wine regions. *Molecules* 2009, 14, (1), 289-297.
59. Arts, I. C. W.; Van De Putte, B.; Hollman, P. C. H., Catechin contents of foods commonly consumed in The Netherlands. 2. Tea, wine, fruit juices, and chocolate milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2000, 48, (5), 1752-1757.
60. Rosso, M. D.; Panighel, A.; Vedova, A. D.; Stella, L.; Flamini, R., Changes in chemical composition of a red wine aged in acacia, cherry, chestnut, mulberry, and oak wood barrels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2009, 57, (5), 1915-1920.
61. Kallithraka, S.; Salacha, M. I.; Tzourou, I., Changes in phenolic composition and antioxidant activity of white wine during bottle storage: Accelerated browning test versus bottle storage. *Food Chemistry* 2009, 113, (2), 500-505.

62. La Torre, G. L.; La Pera, L.; Rando, R.; Lo Turco, V.; Di Bella, G.; Saitta, M.; Dugo, G., Classification of Marsala wines according to their polyphenol, carbohydrate and heavy metal levels using canonical discriminant analysis. *Food Chemistry* 2008, 110, (3), 729-734.
63. Faustino, R. S.; Sobrattee, S.; Edel, A. L.; Pierce, G. N., Comparative analysis of the phenolic content of selected Chilean, Canadian and American Merlot red wines. *Molecular and Cellular Biochemistry* 2003, 249, (1-2), 11-19.
64. Tian, R. R.; Pan, Q. H.; Zhan, J. C.; Li, J. M.; Wan, S. B.; Zhang, Q. H.; Huang, W. D., Comparison of phenolic acids and flavan-3-ols during wine fermentation of grapes with different harvest times. *Molecules* 2009, 14, (2), 827-838.
65. Minuti, L.; Pellegrino, R., Determination of phenolic compounds in wines by novel matrix solid-phase dispersion extraction and gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 2008, 1185, (1), 23-30.
66. Del Rio, J. L. P.; Kennedy, J. A., Development of proanthocyanidins in *Vitis vinifera* L. cv. Pinot noir grapes and extraction into wine. *American Journal of Enology and Viticulture* 2006, 57, (2), 125-132.
67. De Freitas, V. A. P.; Glories, Y.; Monique, A., Developmental changes of procyanidins in grapes of red *Vitis vinifera* varieties and their composition in respective wines. *American Journal of Enology and Viticulture* 2000, 51, (4), 397-403.
68. Lee, J.; Kennedy, J. A.; Devlin, C.; Redhead, M.; Rennaker, C., Effect of early seed removal during fermentation on proanthocyanidin extraction in red wine: A commercial production example. *Food Chemistry* 2008, 107, (3), 1270-1273.
69. Ducasse, M. A.; Canal-Llauberes, R. M.; de Lumley, M.; Williams, P.; Souquet, J. M.; Fulcrand, H.; Doco, T.; Cheynier, V., Effect of macerating enzyme treatment on the polyphenol and polysaccharide composition of red wines. *Food Chemistry* 2010, 118 (2), 369-376.
70. Hernanz, D.; Gallo, V.; Recamales, A. F.; Meléndez-Martínez, A. J.; González-Miret, M. L.; Heredia, F. J., Effect of storage on the phenolic content, volatile composition and colour of white wines from the varieties Zalema and Colombard. *Food Chemistry* 2009, 113, (2), 530-537.
71. Monagas, M.; Bartolomé, B.; Gómez-Cordovés, C., Effect of the modifier (Graciano vs. Cabernet Sauvignon) on blends of Tempranillo wine during ageing in the bottle. I. Anthocyanins, pyranoanthocyanins and non-anthocyanin phenolics. *LWT - Food Science and Technology* 2006, 39, (10), 1133-1142.
72. Pérez-Magariño, S.; González-San José, M. L., Evolution of Flavanols, Anthocyanins, and Their Derivatives during the Aging of Red Wines Elaborated from Grapes Harvested at Different Stages of Ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2004, 52, (5), 1181-1189.

73. Burns, J.; Gardner, P. T.; Matthews, D.; Duthie, G. G.; Lean, M. E. J.; Crozier, A., Extraction of phenolics and changes in antioxidant activity of red wines during vinification. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2001, 49, (12), 5797-5808.
74. Maury, C.; Sarni-Manchado, P.; Lefebvre, S.; Cheynier, V.; Moutounet, M., Influence of fining with different molecular weight gelatins on proanthocyanidin composition and perception of wines. *American Journal of Enology and Viticulture* 2001, 52, (2), 140-145.
75. Maury, C.; Sarni-Manchado, P.; Lefebvre, S.; Cheynier, V.; Moutounet, M., Influence of fining with plant proteins on proanthocyanidin composition of red wines. *American Journal of Enology and Viticulture* 2003, 54, (2), 105-111.
76. Cortell, J. M.; Halbleib, M.; Gallagher, A. V.; Righetti, T. L.; Kennedy, J. A., Influence of vine vigor on grape (*Vitis vinifera* L. Cv. Pinot noir) and wine proanthocyanidins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2005, 53, (14), 5798-5808.
77. Monagas, M.; Gómez-Cordovés, C.; Bartolomé, B.; Laureano, O.; Ricardo Da Silva, J. M., Monomeric, Oligomeric, and Polymeric Flavan-3-ol Composition of Wines and Grapes from *Vitis vinifera* L. Cv. Graciano, Tempranillo, and Cabernet Sauvignon. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2003, 51, (22), 6475-6481.
78. Karagiannis, S.; Economou, A.; Lanaridis, P., Phenolic and volatile composition of wines made from *Vitis vinifera* cv. Muscat lefko grapes from the island of Samos. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2000, 48, (11), 5369-5375.
79. Castillo-Sánchez, J. X.; García-Falcón, M. S.; Garrido, J.; Martínez-Carballo, E.; Martins-Dias, L. R.; Mejuto, X. C., Phenolic compounds and colour stability of Vinhão wines: Influence of wine-making protocol and fining agents. *Food Chemistry* 2008, 106, (1), 18-26.
80. Minussi, R. C.; Rossi, M.; Bologna, L.; Cordi, L.; Rotilio, D.; Pastore, G. M.; Durán, N., Phenolic compounds and total antioxidant potential of commercial wines. *Food Chemistry* 2003, 82, (3), 409-416.
81. Monagas, M.; Núñez, V.; Bartolomé, B.; Gómez-Cordovés, C., Phenolic content of blends of tempranillo with graciano or Cabernet Sauvignon wines produced in Spain. *Food Technology and Biotechnology* 2006, 44, (4), 507-513.
82. Rastija, V.; Srećnik, G.; Medić-Šarić, M. S., Polyphenolic composition of Croatian wines with different geographical origins. *Food Chemistry* 2009, 115, (1), 54-60.
83. Li, H.; Wang, X.; Li, Y.; Li, P.; Wang, H., Polyphenolic compounds and antioxidant properties of selected China wines. *Food Chemistry* 2009, 112, (2), 454-460.
84. Nikfardjam, M. S. P.; Márk, L.; Avar, P.; Figler, M.; Ohmacht, R., Polyphenols, anthocyanins, and trans-resveratrol in red wines from the Hungarian Villány region. *Food Chemistry* 2006, 98, (3), 453-462.

85. Kallithraka, S.; Tsoutsouras, E.; Tzourou, E.; Lanaridis, P., Principal phenolic compounds in Greek red wines. *Food Chemistry* 2006, 99, (4), 784-793.
86. De Pascual-Teresa, S.; Santos-Buelga, C.; Rivas-Gonzalo, J. G., Quantitative analysis of flavan-3-ols in Spanish foodstuffs and beverages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2000, 48, (11), 5331-5337.
87. Holt, H. E.; Francis, I. L.; Field, J.; Herderich, M. J.; Iland, P. G., Relationships between wine phenolic composition and wine sensory properties for Cabernet Sauvignon (*Vitis vinifera* L.). *Australian Journal of Grape and Wine Research* 2008, 14, (3), 162-176.
88. Monagas, M.; Suárez, R.; Gómez-Cordovés, C.; Bartolomé, B., Simultaneous determination of nonanthocyanin phenolic compounds in red wines by HPLC-DAD/ESI-MS. *American Journal of Enology and Viticulture* 2005, 56, (2), 139-147.
89. Cosme, F.; Ricardo-da-Silva, J. M.; Laureano, O., Tannin profiles of *Vitis vinifera* L. cv. red grapes growing in Lisbon and from their monovarietal wines. *Food Chemistry* 2009, 112, (1), 197-204.
90. Mercurio, M. D.; Smith, P. A., Tannin quantification in red grapes and wine: Comparison of polysaccharide- and protein-based tannin precipitation techniques and their ability to model wine astringency. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2008, 56, (14), 5528-5537.
91. Parker, M.; Smith, P. A.; Birse, M.; Francis, I. L.; Kwiatkowski, M. J.; Lattey, K. A.; Liebich, B.; Herderich, M. J., The effect of pre- and post-ferment additions of grape derived tannin on Shiraz wine sensory properties and phenolic composition. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 2007, 13, (1), 30-37.
92. Kwiatkowski, M. J.; Skouroumounis, G. K.; Lattey, K. A.; Waters, E. J., The impact of closures, including screw cap with three different headspace volumes, on the composition, colour and sensory properties of a Cabernet Sauvignon wine during two years' storage. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 2007, 13, (2), 81-94.
93. Harbertson, J. F.; Hodgins, R. E.; Thurston, L. N.; Schaffer, L. J.; Reid, M. S.; Landon, J. L.; Ross, C. F.; Adams, D. O., Variability of tannin concentration in red wines. *American Journal of Enology and Viticulture* 2008, 59, (2), 210-214.
94. Álvarez, I.; Aleixandre, J.; García, M.; Lizama, V.; Aleixandre-Tudó, J., Effect of the prefermentative addition of copigments on the polyphenolic composition of Tempranillo wines after malolactic fermentation. *European Food Research and Technology* 2009, 228, (4), 501-510.
95. González-Manzano, S.; Santos-Buelga, C.; Pérez-Alonso, J. J.; Rivas-Gonzalo, J. C.; Escribano-Bailón, M. T., Characterization of the mean degree of polymerization of proanthocyanidins in red wines using Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (LC-MS). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2006, 54, (12), 4326-4332.

96. Rusjan, D.; Korosec-Koruza, Z., A comparison of extraction methods for selected phenolic compounds from grape berry skins using liquid chromatography and spectrophotometry. *Acta Chimica Slovenica* 2007, 54, (1), 114-118.
97. Pérez-Jiménez, J.; Arranz, S.; Saura-Calixto, F., Proanthocyanidin content in foods is largely underestimated in the literature data: An approach to quantification of the missing proanthocyanidins. *Food Research International* 2009, 42, (10), 1381-1388
98. CadahÃ-a, E.; FernÃ¡ndez de SimÃ³n, B.; Sanz, M.; Poveda, P.; Colio, J., Chemical and chromatic characteristics of Tempranillo, Cabernet Sauvignon and Merlot wines from DO Navarra aged in Spanish and French oak barrels. *Food Chemistry* 2009, 115, (2), 639-649.
99. Edwin, H., In vino veritas: Oligomeric procyanidins and the ageing of red wines. *Phytochemistry* 1980, 19, (12), 2577-2582.
100. Hemingway, R. W.; McGraw, G. W., Kinetics of acid-catalyzed cleavage of procyanidins *Journal of Wood Chemistry and Technology* 1983, 3, (4), 421-435.
101. Vidal, S.; Cartalade, D.; Souquet, J. M.; Fulcrand, H.; Cheynier, V., Changes in proanthocyanidin chain length in winelike model solutions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2002, 50, (8), 2261-2266.
102. Fulcrand, H.; Dueñas, M.; Salas, E.; Cheynier, V., Phenolic reactions during winemaking and aging. *American Journal of Enology and Viticulture* 2006, 57, (3), 289-297.
103. Saucier, C.; Bourgeois, G.; Vitry, C.; Roux, D.; Glories, Y., Characterization of (+)-Catechin-Acetaldehyde Polymers: A Model for Colloidal State of Wine Polyphenols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1997, 45, (4), 1045-1049.
104. Fulcrand, H.; Doco, T.; Es-Safi, N. E.; Cheynier, V.; Moutounet, M., Study of the acetaldehyde induced polymerisation of flavan-3-ols by liquid chromatography-ion spray mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1996, 752, (1-2), 85-91.
105. Es-Safi, N. E.; Cheynier, V.; Moutounet, M., Role of aldehydic derivatives in the condensation of phenolic compounds with emphasis on the sensorial properties of fruit-derived foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2002, 50, (20), 5571-5585.
106. Es-Safi, N. E.; Le Guernevé, C.; Cheynier, V.; Moutounet, M., New phenolic compounds obtained by evolution of (+)-catechin and glyoxylic acid in hydroalcoholic medium. *Tetrahedron Letters* 2000, 41, (12), 1917-1921.
107. Es-Safi, N. E.; Le Guernevé, C.; Cheynier, V.; Moutounet, M., 2D NMR analysis for unambiguous structural elucidation of phenolic compounds formed through reaction between (+)-catechin and glyoxylic acid. *Magnetic Resonance in Chemistry* 2002, 40, (11), 693-704.

108. Es-Safi, N. E.; Cheynier, V.; Moutounet, M., Study of the reactions between (+)-catechin and furfural derivatives in the presence or absence of anthocyanins and their implication in food color change. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2000, 48, (12), 5946-5954.
109. Drinkine, J.; Glories, Y.; Saucier, C., (+)-Catechin-aldehyde condensations: Competition between acetaldehyde and glyoxylic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2005, 53, (19), 7552-7558.
110. Es-Safi, N. E.; Fulcrand, H.; Cheynier, V.; Moutounet, M., Competition between (+)-catechin and (-)-epicatechin in acetaldehyde- induced polymerization of flavanols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1999, 47, (5), 2088-2095.
111. Saucier, C.; Guerra, C.; Pianet, I.; Laguerre, M.; Glories, Y., (+)-Catechin-acetaldehyde condensation products in relation to wine- ageing. *Phytochemistry* 1997, 46, (2), 229-234.
112. Drinkine, J.; Lopes, P.; Kennedy, J. A.; Teissedre, P. L.; Saucier, C., Ethylidene-bridged flavan-3-ols in red wine and correlation with wine age. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2007, 55, (15), 6292-6299.
113. Jurd, L., Review of Polyphenol Condensation Reactions and their Possible Occurrence in the Aging of Wines. *American Journal of Enology and Viticulture* 1969, 20, (3), 191-195.
114. Somers, T. C., The polymeric nature of wine pigments. *Phytochemistry* 1971, 10, (9), 2175-2186.
115. Remy, S.; Fulcrand, H.; Labarbe, B.; Cheynier, V.; Moutounet, M., First confirmation in red wine of products resulting from direct anthocyanin-tannin reactions. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2000, 80, (6), 745-751.
116. Salas, E.; Atanasova, V.; Poncet-Legrand, C.; Meudec, E.; Mazaauric, J. P.; Cheynier, V., Demonstration of the occurrence of flavanol-anthocyanin adducts in wine and in model solutions. *Analytica Chimica Acta* 2004, 513, (1), 325-332.
117. González-Manzano, S.; Mateus, N.; De Freitas, V.; Santos-Buelga, C., Influence of the degree of polymerisation in the ability of catechins to act as anthocyanin copigments. *European Food Research and Technology* 2008, 227, (1), 83-92.
118. Timberlake, C. F.; Bridle, P., Anthocyanins: colour augmentation with catechin and acetaldehyde. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 1977, 28, (6), 539-544.
119. Escribano-Bailón, T.; Dangles, O.; Brouillard, R., Coupling reactions between flavylum ions and catechin. *Phytochemistry* 1996, 41, (6), 1583-1592.
120. Wildenradt, H. L.; Singleton, V. L., The Production of Aldehydes as a Result of Oxidation of Polyphenolic Compounds and its Relation to Wine Aging. *American Journal of Enology and Viticulture* 1974, 25, (2), 119-126.

121. Pissarra, J.; Mateus, N.; Rivas-Gonzalo, J.; Santos Buelga, C.; De Freitas, V., Reaction between malvidin 3-glucoside and (+)-catechin in model solutions containing different aldehydes. *Journal of Food Science* 2003, 68, (2), 476-481.
122. Saucier, C.; Lopes, P.; Mirabel, M.; Guerra, C.; Glories, Y., Tannin-anthocyanin interactions: Influence on wine color. In *ACS Symposium Series*, Waterhouse, A. L.; Kennedy, J. A., Eds. 2004; Vol. 886, pp 265-273.
123. De Freitas, V. A. P.; Mateus, N., Chemical transformations of anthocyanins yielding a variety of colours (Review). *Environmental Chemistry Letters* 2006, 4, (3), 175-183.
124. Gutteridge JM, H. B., Antioxidants in Nutrition, Health and Disease. 1994.
125. Galan, P.; Preziosi, P.; Triol, I.; Valeix, P.; Vasquez, C.; Alfarez, M. J.; Hercberg, S., Antioxydants et prévention. *Cahiers de Nutrition et de Dietetique* 1997, 32, (6), 359-370.
126. Lorrain, B., Modélisation chimique du pouvoir antioxydant des polyphénols dans le compartiment gastrique. *Thèse de doctorat*.
127. Pietta, P. G., Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products* 2000, 63, (7), 1035-1042.
128. Navarro, R. E.; Santacruz, H.; Inoue, M., Complexation of epigallocatechin gallate (a green tea extract, egcg) with Mn²⁺: Nuclear spin relaxation by the paramagnetic ion. *Journal of Inorganic Biochemistry* 2005, 99, (2), 584-588.
129. Inoue, M. B.; Inoue, M.; Fernando, Q.; Valcic, S.; Timmermann, B. N., Potentiometric and 1H NMR studies of complexation of Al³⁺ with (-)-epigallocatechin gallate, a major active constituent of green tea. *Journal of Inorganic Biochemistry* 2002, 88, (1), 7-13.
130. Hynes, M. J.; Coinceanainn, M., The kinetics and mechanisms of the reaction of iron(III) with gallic acid, gallic acid methyl ester and catechin. *Journal of Inorganic Biochemistry* 2001, 85, (2-3), 131-142.
131. Ryan, P.; Hynes, M. J., The kinetics and mechanisms of the complex formation and antioxidant behaviour of the polyphenols EGCg and ECG with iron(III). *Journal of Inorganic Biochemistry* 2007, 101, (4), 585-593.
132. Jovanovic, S. V.; Steenken, S.; Hara, Y.; Simic, M. G., Reduction potentials of flavonoid and model phenoxyl radicals. Which ring in flavonoids is responsible for antioxidant activity? *Journal of the Chemical Society. Perkin Transactions 2* 1996, 0, (11), 2497-2504.
133. Van Acker, S. A. B. E.; Van Den Berg, D. J.; Tromp, M. N. J. L.; Griffioen, D. H.; Van Bennekom, W. P.; Van Der Vijgh, W. J. F.; Bast, A., Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free Radical Biology and Medicine* 1996, 20, (3), 331-342.

134. Makhotkina, O.; Kilmartin, P. A., Uncovering the influence of antioxidants on polyphenol oxidation in wines using an electrochemical method: Cyclic voltammetry. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 2009, 633, (1), 165-174.
135. Heim, K. E.; Tagliaferro, A. R.; Bobilya, D. J., Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry* 2002, 13, (10), 572-584.
136. De Freitas, V. A. P.; Glories, Y.; Laguerre, M., Incidence of Molecular Structure in Oxidation of Grape Seed Procyanidins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1998, 46, (2), 376-382.
137. Guyot, S.; Vercauteren, J.; Cheynier, V., Structural determination of colourless and yellow dimers resulting from (+)-catechin coupling catalysed by grape polyphenoloxidase. *Phytochemistry* 1996, 42, (5), 1279-1288.
138. Glories, Y.; Maujean, A.; Dubourdieu, D.; Ribéreau-Gayon, P., *Traité d'Oenologie - tome 2 : Chimie du vin, Stabilisation et traitement* 5e ed.; Dunod: Paris, 2004.
139. Chung, K. T.; Wong, T. Y.; Wei, C. I.; Huang, Y. W.; Lin, Y., Tannins and human health: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 1998, 38, (6), 421-464.
140. Santos-Buelga, C.; Scalbert, A., Proanthocyanidins and tannin-like compounds - Nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2000, 80, (7), 1094-1117.
141. Okuda, T., Systematics and health effects of chemically distinct tannins in medicinal plants. *Phytochemistry* 2005, 66, (17 SPEC. ISS.), 2012-2031.
142. Ferreira, D.; Gross, G. G.; Hagerman, A. E.; Kolodziej, H.; Yoshida, T., Tannins and related polyphenols: Perspectives on their chemistry, biology, ecological effects, and human health protection. *Phytochemistry* 2008, 69, (18), 3006-3008.
143. Esparza, I.; Santamaría, C.; Calvo, M. I.; Fernández, J. M., Composition and analysis of colloidal matter along wine-making. Exploitation of its antioxidant activity in final stabilisation residues. *Microchemical Journal* 2009, 91, (1), 32-39.
144. Baiano, A.; Terracone, C.; Gambacorta, G.; La Notte, E., Phenolic content and antioxidant activity of primitivo wine: Comparison among winemaking technologies. *Journal of Food Science* 2009, 74, (3).
145. Hanasaki, Y.; Ogawa, S.; Fukui, S., The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids. *Free Radical Biology and Medicine* 1994, 16, (6), 845-850.
146. Goldstein, J. L.; Swain, T., The inhibition of enzymes by tannins. *Phytochemistry* 1965, 4, (1), 185-192.

147. Monteiro, C.; Maechling, C.; Hervé Du Penhoat, C., Monitoring the non-specific interactions of catechin through diffusion measurements based on pulsed-field gradients. *Magnetic Resonance in Chemistry* 2002, 40, (SPEC. ISS.).
148. Charlton, A. J.; Baxter, N. J.; Khan, M. L.; Moir, A. J. G.; Haslam, E.; Davies, A. P.; Williamson, M. P., Polyphenol/peptide binding and precipitation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2002, 50, (6), 1593-1601.
149. Pianet, I.; Andre, Y.; Ducasse, M. A.; Tarascou, I.; Lartigue, J. C.; Pinaud, N.; Fouquet, E.; Dufourc, E. J.; Laguerre, M., Modeling procyanidin self-association processes and understanding their micellar organization: A study by diffusion NMR and molecular mechanics. *Langmuir* 2008, 24, (19), 11027-11035.
150. Baxter, N. J.; Lilley, T. H.; Haslam, E.; Williamson, M. P., Multiple interactions between polyphenols and a salivary proline-rich protein repeat result in complexation and precipitation. *Biochemistry* 1997, 36, (18), 5566-5577.
151. Riou, V.; Vernhet, A.; Doco, T.; Moutounet, M., Aggregation of grape seed tannins in model wine - Effect of wine polysaccharides. *Food Hydrocolloids* 2002, 16, (1), 17-23.
152. Poncet-Legrand, C.; Cartalade, D.; Putaux, J. L.; Cheynier, V.; Vernhet, A., Flavan-3-ol aggregation in model ethanolic solutions: Incidence of polyphenol structure, concentration, ethanol content, and ionic strength. *Langmuir* 2003, 19, (25), 10563-10572.
153. Zanchi, D.; Vernhet, A.; Poncet-Legrand, C.; Cartalade, D.; Tribet, C.; Schweins, R.; Cabane, B., Colloidal dispersions of tannins in water-ethanol solutions. *Langmuir* 2007, 23, (20), 9949-9959.
154. Carvalho, E.; Mateus, N.; Plet, B.; Pianet, I.; Dufourc, E.; De Freitas, V., Influence of wine pectic polysaccharides on the interactions between condensed tannins and salivary proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2006, 54, (23), 8936-8944.
155. Le Bourvellec, C.; Bouchet, B.; Renard, C. M. G. C., Non-covalent interaction between procyanidins and apple cell wall material. Part III: Study on model polysaccharides. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* 2005, 1725, (1), 10-18.
156. Poncet-Legrand, C.; Doco, T.; Williams, P.; Vernhet, A., Inhibition of grape seed tannin aggregation by wine mannoproteins: Effect of polysaccharide molecular weight. *American Journal of Enology and Viticulture* 2007, 58, (1), 87-91.
157. Okuda, T.; Fukui, M.; Takayanagi, T.; Yokotsuka, K., Characterization of major stable proteins in chardonnay wine. *Food Science and Technology Research* 2006, 12, (2), 131-136.
158. Monteiro, S.; Piçarra-Pereira, M. A.; Mesquita, P. R.; Loureiro, V. B.; Teixeira, A.; Ferreira, R. B., The wide diversity of structurally similar wine proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2001, 49, (8), 3999-4010.

159. Koch, J.; Sajak, E., A Review and Some Studies on Grape Protein. *American Journal of Enology and Viticulture* 1959, 10, (3), 114-123.
160. Marangon, M.; Van Sluyter, S. C.; Haynes, P. A.; Waters, E. J., Grape and wine proteins: Their fractionation by hydrophobic interaction chromatography and identification by chromatographic and proteomic analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2009, 57, (10), 4415-4425.
161. Somers, T. C.; Ziemelis, G., Direct Determination of Wine Proteins. *American Journal of Enology and Viticulture* 1973, 24, (2), 47-50.
162. Cilindre, C.; Jégou, S.; Hovasse, A.; Schaeffer, C.; Castro, A. J.; Clément, C.; Van Dorsselaer, A.; Jeandet, P.; Marchal, R., Proteomic approach to identify champagne wine proteins as modified by *Botrytis cinerea* infection. *Journal of proteome research* 2008, 7, (3), 1199-1208.
163. Kwon, S. W., Profiling of soluble proteins in wine by nano-high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2004, 52, (24), 7258-7263.
164. Hsu, J.-C.; Heatherbell, D. A., Isolation and Characterization of Soluble Proteins in Grapes, Grape Juice, and Wine. *American Journal of Enology and Viticulture* 1987, 38, (1), 6-10.
165. Dorrestein, E.; Ferreira, R. B.; Laureano, O.; Teixeira, A. R., Electrophoretic and FPLC Analysis of Soluble Proteins in Four Portuguese Wines. *American Journal of Enology and Viticulture* 1995, 46, (2), 235-242.
166. Pueyo, E.; Dizy, M.; Polo, M. C., Varietal Differentiation of Must and Wines by Means of Protein Fraction. *American Journal of Enology and Viticulture* 1993, 44, (3), 255-260.
167. Singleton, V. L.; Trousdale, E. K., Anthocyanin-tannin interactions explaining differences in polymeric phenols between white and red wines. *American Journal of Enology and Viticulture* 1992, 43, (1), 63-70.
168. Singleton, V. L.; Esau, P., Phenolic substances of grapes and wine, and their significance. *Advances in Food Research* 1969, 1 SUPPL., 176-179.
169. Ferreira, R. B.; Piçarra-Pereira, M. A.; Monteiro, S.; Loureiro, V. B.; Teixeira, A. R., The wine proteins. *Trends in Food Science and Technology* 2001, 12, (7), 230-239.
170. Brillouet J.-M., B. M.-P., Moutounet M, Possible protein-polysaccharide complexes in red wines. *American Journal of Enology and Viticulture* 1991, 42, (2), 150-152.
171. Peng, Z.; Pocock, K. F.; Waters, E. J.; Francis, I. L.; Williams, P. J., Taste Properties of Grape (*Vitis vinifera*) Pathogenesis-Related Proteins Isolated from Wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1997, 45, (12), 4639-4643.

172. Dawes, H.; Boyes, S.; Keene, J.; Heatherbell, D., Protein Instability of Wines: Influence of Protein Isoelectric Point. *American Journal of Enology and Viticulture* 1994, 45, (3), 319-326.
173. Mesquita, P. R.; Picarra-Pereira, M. A.; Monteiro, S.; Loureiro, V. B.; Teixeira, A. R.; Ferreira, R. B., Effect of wine composition on protein stability. *American Journal of Enology and Viticulture* 2001, 52, (4), 324-330.
174. Waters, E. J.; Shirley, N. J.; Williams, P. J., Nuisance Proteins of Wine Are Grape Pathogenesis-Related Proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1996, 44, (1), 3-5.
175. Clayton, D. E.; Busse, W., Anaphylaxis to wine. *Clinical Allergy* 1980, 10, (3), 341-343.
176. Borghesan, F.; Basso, D.; Chieco Bianchi, F.; Favero, E.; Plebani, M., Allergy to wine. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2004, 59, (10), 1135-1136.
177. Armentia, A.; Pineda, F.; Fernández, S., Wine-induced anaphylaxis and sensitization to hymenoptera venom [16]. *New England Journal of Medicine* 2007, 357, (7), 719-720.
178. Kanny, G.; Gerbaux, V.; Olszewski, A.; FrÃ©mont, S.; Empereur, F.; Nabet, F.; Cabanis, J. C.; Moneret-Vautrin, D. A., No correlation between wine intolerance and histamine content of wine. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2001, 107, (2), 375-378.
179. Rolland, J. M.; Apostolou, E.; Deckert, K.; de Leon, M. P.; Douglass, J. A.; Glaspole, I. N.; Bailey, M.; Stockley, C. S.; O'Hehir, R. E., Potential food allergens in wine: Double-blind, placebo-controlled trial and basophil activation analysis. *Nutrition* 2006, 22, (9), 882-888.
180. Pastorello, E. A.; Farioli, L.; Pravettoni, V.; Ortolani, C.; Fortunato, D.; Gabriella Giuffrida, M.; Perono Garoffo, L.; Marianna Calamari, A.; Brenna, O.; Conti, A., Identification of grape and wine allergens as an endochitinase 4, a lipid-transfer protein, and a thaumatin. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2003, 111, (2), 350-359.
181. Sbornik, M.; Rakoski, J.; Mempel, M.; Ollert, M.; Ring, J., IgE-mediated type-I-allergy against red wine and grapes. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2007, 62, (11), 1339-1340.
182. Hoffmann-Sommergruber, K., Pathogenesis-related (PR)-proteins identified as allergens. *Biochemical Society Transactions* 2002, 30, (6), 930-935.
183. Santoro, M., Fractionation and characterization of must and wine proteins. *American Journal of Enology and Viticulture* 1995, 46, (2), 250-254.

184. Gabetta, B.; Fuzzati, N.; Griffini, A.; Lolla, E.; Pace, R.; Ruffilli, T.; Peterlongo, F., Characterization of proanthocyanidins from grape seeds. *Fitoterapia* 2000, 71, (2), 162-175.
185. Wigand, P.; Tenzer, S.; Schild, H.; Decker, H., Analysis of protein composition of red wine in comparison with RosÃ© and white wines by electrophoresis and High-Pressure Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (HPLC-MS). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2009, 57, (10), 4328-4333.
186. Fukui, M.; Yokotsuka, K., Content and origin of protein in white and red wines: Changes during fermentation and maturation. *American Journal of Enology and Viticulture* 2003, 54, (3), 178-188.
187. Yokotsuka, K.; Nozaki, K.; Takayanagi, T., Characterization of Soluble Glycoproteins in Red Wine. *American Journal of Enology and Viticulture* 1994, 45, (4), 410.
188. Nozaki, K.; Yokotsuka, K., Composition of protein fractions from precipitates formed in Muscat Bailey A red wines during aging *Journal of the Brewing Society of Japan* 1995, 90, 57-64.
189. Nozaki, K.; Saito, N.; Hosaka, T.; Yokotsuka, K., Isolation of soluble proteins from juice, must and wines from Muscat Bailey A grapes *Journal of the Brewing Society of Japan* 1995, 90, 646-653.
190. Yokotsuka, K.; Singleton, V.L., Glycoproteins: Characterization in a Hybrid Grape Variety (Muscat Bailey A) Juice, Fermenting Must, and Resultant Red Wine. *American Journal of Enology and Viticulture* 1997, 48, (1), 100.
191. Anelli, G., The Proteins of Musts. *American Journal of Enology and Viticulture* 1977, 28, (4), 200-203.
192. Alcaide-Hidalgo, J. M.; Moreno-Arribas, M. V.; Polo, M. C.; Pueyo, E., Partial characterization of peptides from red wines. Changes during malolactic fermentation and ageing with lees. *Food Chemistry* 2008, 107, (2), 622-630.
193. Saulnier, L.; Brillouet, J. M., An arabinogalactan-protein from the pulp of grape berries. *Carbohydrate Research* 1989, 188, (C), 137-144.
194. Saulnier, L.; Brillouet, J. M.; Moutounet, M.; Herve du Penhoat, C.; Michon, V., New investigations of the structure of grape arabinogalactan-protein. *Carbohydrate Research* 1992, 224, 219-235.
195. Pellerin, P.; Waters, E.; Brillouet, J. M., Characterization of two arabinogalactan-proteins from red wine. *Carbohydrate Polymers* 1993, 22, (3), 187-192.
196. Pellerin, P.; Vidal, S.; Williams, P.; Brillouet, J. M., Characterization of five type II arabinogalactan-protein fractions from red wine of increasing uronic acid content. *Carbohydrate Research* 1995, 277, (1), 135-143.

197. Waters, E. J.; Pellerin, P.; Brillouet, J. M., A wine arabinogalactan-protein that reduces heat-induced wine protein haze. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 1994, 58, (1), 43-48.
198. Vidal, S.; Williams, P.; Doco, T.; Moutounet, M.; Pellerin, P., The polysaccharides of red wine: Total fractionation and characterization. *Carbohydrate Polymers* 2003, 54, (4), 439-447.
199. Guadalupe, Z.; Ayestarán, B., Polysaccharide profile and content during the vinification and aging of tempranillo red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2007, 55, (26), 10720-10728.
200. Doco, T.; Quéllec, N.; Moutounet, M.; Pellerin, P., Polysaccharide patterns during the aging of Carignan noir red wines. *American Journal of Enology and Viticulture* 1999, 50, (1), 25-32.
201. Lamkin, M. S.; Oppenheim, F. G., Structural features of salivary function. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine* 1993, 4, (3-4), 251-259.
202. Humphrey, S. P.; Williamson, R. T., A review of saliva: Normal composition, flow, and function. *Journal of Prosthetic Dentistry* 2001, 85, (2), 162-169.
203. Edgar, W. M., Saliva and dental health. Clinical implications of saliva: report of a consensus meeting. *British dental journal* 1990, 169, (3-4), 96-98.
204. Nieuw Amerongen, A. V.; Veerman, E. C. I., Saliva - The defender of the oral cavity. *Oral Diseases* 2002, 8, (1), 12-22.
205. De Almeida, P. D. V.; Grégio, A. M. T.; Machado, M. A. N.; De Lima, A. A. S.; Azevedo, L. R., Saliva composition and functions: A comprehensive review. *Journal of Contemporary Dental Practice* 2008, 9, (3), 072-080.
206. Turner, R. J.; Sugiya, H., Understanding salivary fluid and protein secretion. *Oral Diseases* 2002, 8, (1), 3-11.
207. Neyraud, E.; Sayd, T.; Morzel, M.; Dransfield, E., Proteomic analysis of human whole and parotid salivas following stimulation by different tastes. *Journal of Proteome Research* 2006, 5, (9), 2474-2480.
208. Neyraud, E.; Heinzerling, C. I.; Bult, J. H. F.; Mesmin, C.; Dransfield, E., Effects of different tastants on parotid saliva flow and composition. *Chemosensory Perception* 2009, 2, (2), 108-116.
209. Yavuzylmaz, E.; Yumak, A.; Akdog̃anlı, T.; Yamalik, N.; Ãzer, N.; Ersoy, F.; Yeniay, I., The alterations of whole saliva constituents in patients with diabetes mellitus. *Australian Dental Journal* 1996, 41, (3), 193-197.
210. Vitorino, R.; Lobo, M. J. C.; Ferrer-Correira, A. J.; Dubin, J. R.; Tomer, K. B.; Domingues, P. M.; Amado, F. M. L., Identification of human whole saliva protein components using proteomics. *Proteomics* 2004, 4, (4), 1109-1115.

211. Wilmarth, P. A.; Riviere, M. A.; Rustvold, D. L.; Lauten, J. D.; Madden, T. E.; David, L. L., Two-dimensional liquid chromatography study of the human whole saliva proteome. *Journal of Proteome Research* 2004, 3, (5), 1017-1023.
212. Hu, S.; Xie, Y.; Ramachandran, P.; Loo, R. R. O.; Li, Y.; Loo, J. A.; Wong, D. T., 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), 1714-1728.
213. Xie, H.; Rhodus, N. L.; Griffin, R. J.; Carlis, J. V.; Griffin, T. J., A catalogue of human saliva proteins identified by free flow electrophoresis-based peptide separation and tandem mass spectrometry. *Molecular and Cellular Proteomics* 2005, 4, (11), 1826-1830.
214. Hu, S.; Loo, J. A.; Wong, D. T., Human saliva proteome analysis. In *Annals of the New York Academy of Sciences*, Malamud, D.; Niedbala, R. S., Eds. 2007; Vol. 1098, pp 323-329.
215. Kauffman, D. L.; Keller, P. J., The basic proline-rich proteins in human parotid saliva from a single subject. *Archives of Oral Biology* 1979, 24, (4), 249-256.
216. Skopec, M. M.; Hagerman, A. E.; Karasov, W. H., Do salivary proline-rich proteins counteract dietary hydrolyzable tannin in laboratory rats? *Journal of Chemical Ecology* 2004, 30, (9), 1679-1692.
217. Shimada, T.; Saitoh, T.; Sasaki, E.; Nishitani, Y.; Osawa, R., Role of tannin-binding salivary proteins and tannase-producing bacteria in the acclimation of the Japanese wood mouse to acorn tannins. *Journal of Chemical Ecology* 2006, 32, (6), 1165-1180.
218. Oppenheim, F. G.; Salih, E.; Siqueira, W. L.; Zhang, W.; Helmerhorst, E. J., Salivary proteome and its genetic polymorphisms. In *Annals of the New York Academy of Sciences*, Malamud, D.; Niedbala, R. S., Eds. 2007; Vol. 1098, pp 22-50.
219. Campese, M.; Sun, X.; Bosch, J. A.; Oppenheim, F. G.; Helmerhorst, E. J., Concentration and fate of histatins and acidic proline-rich proteins in the oral environment. *Archives of Oral Biology* 2009 54, (4), 345-353.
220. Schlesinger, D. H.; Hay, D. I., Complete covalent structure of statherin, a tyrosine rich acidic peptide which inhibits calcium phosphate precipitation from human parotid saliva. *Journal of Biological Chemistry* 1977, 252, (5), 1689-1695.
221. Hay, D. I.; Smith, D. J.; Schluckebier, S. K.; Moreno, E. C., Relationship between concentration of human salivary statherin and inhibition of calcium phosphate precipitation in stimulated human parotid saliva. *Journal of Dental Research* 1984, 63, (6), 857-863.
222. Schwartz, S. S.; Hay, D. I.; Schluckebier, S. K., Inhibition of calcium phosphate precipitation by human salivary statherin: Structure-activity relationships. *Calcified Tissue International* 1992, 50, (6), 511-517.

223. Slomiany, B. L.; Murty, V. L. N.; Piotrowski, J.; Slomiany, A., Salivary mucins in oral mucosal defense. *General Pharmacology* 1996, 27, (5), 761-771.
224. Hirtz, C.; Chevalier, F.; Centeno, D.; Rofidal, V.; Egea, J. C.; Rossignol, M.; Sommerer, N.; De Périère, D. D., MS characterization of multiple forms of alpha-amylase in human saliva. *Proteomics* 2005, 5, (17), 4597-4607.
225. Scannapieco, F. A.; Torres, G.; Levine, M. J., Salivary $\hat{\pm}$ -amylase: Role in dental plaque and caries formation. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine* 1993, 4, (3-4), 301-307.
226. Messana, I.; Inzitari, R.; Fanali, C.; Cabras, T.; Castagnola, M., Facts and artifacts in proteomics of body fluids. What proteomics of saliva is telling us? *Journal of Separation Science* 2008, 31, (11), 1948-1963.
227. Gao, X.; Ge, S.; Cai, Q.; Zeng, K.; Grimes, C. A., Kinetic study on the interaction between tannin and bovine serum albumin with a wireless magnetoelastic biosensor. *Sensors and Actuators, B: Chemical* 2008, 129, (2), 929-933.
228. Hagerman, A. E.; Butler, L. G., The specificity of proanthocyanidin-protein interactions. *Journal of Biological Chemistry* 1981, 256, (9), 4494-4497.
229. Frazier, R. A.; Papadopoulou, A.; Mueller-Harvey, I.; Kisson, D.; Green, R. J., Probing protein-tannin interactions by isothermal titration microcalorimetry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2003, 51, (18), 5189-5195.
230. Fickel, J.; Pitra, C.; Joest, B. A.; Hofmann, R. R., A novel method to evaluate the relative tannin-binding capacities of salivary proteins. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Pharmacology Toxicology and Endocrinology* 1999, 122, (2), 225-229.
231. Soares, S.; Mateus, N.; De Freitas, V., Interaction of different polyphenols with Bovine Serum Albumin (BSA) and Human Salivary $\hat{\pm}$ -Amylase (HSA) by fluorescence quenching. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2007, 55, (16), 6726-6735.
232. Deaville, E. R.; Green, R. J.; Mueller-Harvey, I.; Willoughby, I.; Frazier, R. A., Hydrolyzable tannin structures influence relative globular and random coil protein binding strengths. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2007, 55, (11), 4554-4561.
233. Kawamoto, H.; Mizutani, K.; Nakatsubo, F., Binding nature and denaturation of protein during interaction with galloylglucose. *Phytochemistry* 1997, 46, (3), 473-478.
234. Feldman, K. S.; Sambandam, A.; Lemon, S. T.; Nicewonger, R. B.; Long, G. S.; Battaglia, D. F.; Ensel, S. M.; Laci, M. A., Binding affinities of gallotannin analogs with bovine serum albumin: Ramifications for polyphenol-protein molecular recognition. *Phytochemistry* 1999, 51, (7), 867-872.

235. Spencer, C. M.; Cai, Y.; Martin, R.; Gaffney, S. H.; Goulding, P. N.; Magnolato, D.; Lilley, T. H.; Haslam, E., Polyphenol complexation-some thoughts and observations. *Phytochemistry* 1988, 27, (8), 2397-2409.
236. De Freitas, V. A. P.; Mateus, N., Structural features of procyanidin interactions with salivary proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2001, 49, (2), 940-945.
237. Murray, N. J.; Williamson, M. P.; Lilley, T. H.; Haslam, E., Study of the interaction between salivary proline-rich proteins and a polyphenol by ¹H-NMR spectroscopy. *European Journal of Biochemistry* 1994, 219, (3), 923-935.
238. Siebert, K. J.; Troukhanova, N. V.; Lynn, P. Y., Nature of Polyphenol-Protein Interactions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1996, 44, (1), 80-85.
239. Arts, M. J. T. J.; Haenen, G. R. M. M.; Wilms, L. C.; Beetstra, S. A. J. N.; Heijnen, C. G. M.; Voss, H. P.; Bast, A., Interactions between flavonoids and proteins: Effect on the total antioxidant capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2002, 50, (5), 1184-1187.
240. Asano, K.; Shinagawa, K.; Hashimoto, N., Characterization of haze-forming proteins of beer and their roles in chill haze formation *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 1982, 40, (4), 147-154.
241. Wu, L. C.; Lu, Y. W., Electrophoretic Method for the Identification of a Haze-Active Protein in Grape Seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2004, 52, (10), 3130-3135.
242. Pascal, C.; Poncet-Legrand, C.; Cabane, B.; Vernhet, A., Aggregation of a proline-rich protein induced by epigallocatechin gallate and condensed tannins: Effect of protein glycosylation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2008, 56, (15), 6724-6732.
243. Lu, Y.; Bennick, A., Interaction of tannin with human salivary proline-rich proteins. *Archives of Oral Biology* 1998, 43, (9), 717-728.
244. Yan, Q.; Bennick, A., Identification of histatins as tannin-binding proteins in human saliva. *Biochemical Journal* 1995, 311, (1), 341-347.
245. Naurato, N.; Wong, P.; Lu, Y.; Wroblewski, K.; Bennick, A., Interaction of tannin with human salivary histatins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1999, 47, (6), 2229-2234.
246. Asquith, T. N.; Uhlig, J.; Mehansho, H.; Putman, L.; Carlson, D. M.; Butler, L., Binding of condensed tannins to salivary proline-rich glycoproteins: The role of carbohydrate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1987, 35, (3), 331-334.
247. Adrian J, C.; Baxter, N. J.; Lilley, T. H.; Haslam, E.; McDonald, C. J.; Williamson, M. P., 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), 289-292.

248. C.Poncet-Legrand; A.Edelmann; J-L. Putaux; D.Cartalade; P.sarni-Manchado; A.Vernhet, Poly(L-prolin) interactions with flavan-3-ols units: Influence of the molecular structure and the polyphenol/protein ratio. *Food Hydrocolloids* 2005, 20, 687-697.
249. Sarni-Manchado, P.; Deleris, A.; Avallone, S.; Cheynier, V.; Moutounet, M., Analysis and characterization of wine condensed tannins precipitated by proteins used as fining agent in enology. *American Journal of Enology and Viticulture* 1999, 50, (1), 81-86.
250. Sarni-Manchado, P.; Cheynier, V.; Moutounet, M., Interactions of grape seed tannins with salivary proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1999, 47, (1), 42-47.
251. Siebert, K. J.; Lynn, P. Y., Comparison of polyphenol interactions with polyvinylpyrrolidone and haze-active protein. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 1998, 56, (1), 24-31.
252. Osborne, N. J. T.; McNeill, D. M., Characterisation of Leucaena condensed tannins by size and protein precipitation capacity. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2001, 81, (11), 1113-1119.
253. De Freitas, V. A. P.; Mateus, N., Nephelometric study of salivary protein-tannin aggregates. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2002, 82, (1), 113-119.
254. Mulkay, P.; Jerumanis, J., Effects of molecular weight and degree of hydroxylation of proanthocyanidins on the colloidal stability of beer. *Cerevisia* 1983, 8, (1), 29-35.
255. Artz, W. E.; Bishop, P. D.; Dunker, A. K.; Schanus, E. G.; Swanson, B. G., Interaction of synthetic proanthocyanidin dimer and trimer with bovine serum albumin and purified bean globulin fraction G-1. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1987, 35, (3), 417-421.
256. Van Buren, J. P.; Robinson, W. B., Formation of complexes between protein and tannic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1969, 17, (4), 772-777.
257. Poncet-Legrand, C.; Gautier, C.; Cheynier, V.; Imberty, A., Interactions between flavan-3-ols and poly(L-proline) studied by isothermal titration calorimetry: Effect of the tannin structure. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2007, 55, (22), 9235-9240.
258. Aguié-Béghin, V.; Sausse, P.; Meudec, E.; Cheynier, V.; Douillard, R., Polyphenol- β -Casein Complexes at the Air/Water Interface and in Solution: Effects of Polyphenol Structure. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2008, 56, (20), 9600-9611.
259. Bacon, J. R.; Rhodes, M. J. C., Binding affinity of hydrolyzable tannins to parotid saliva and to proline-rich proteins derived from it. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2000, 48, (3), 838-843.
260. Kawamoto, H.; Nakatsubo, F.; Murakami, K., Stoichiometric studies of tannin-protein co-precipitation. *Phytochemistry* 1996, 41, (5), 1427-1431.

261. Kawamoto, H.; Nakatsubo, F.; Murakami, K., Quantitative determination of tannin and protein in the precipitates by high-performance liquid chromatography. *Phytochemistry* 1995, 40, (5), 1503-1505.
262. Zhao, J.; Ren, F., Influence of hydroxylation and glycosylation in ring A of soybean isoflavones on interaction with BSA. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 2009, 72, (3), 682-685.
263. Bacon, J. R.; Rhodes, M. J. C., Development of a Competition Assay for the Evaluation of the Binding of Human Parotid Salivary Proteins to Dietary Complex Phenols and Tannins Using a Peroxidase-Labeled Tannin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1998, 46, (12), 5083-5088.
264. McManus, J. P.; Davis, K. G.; Beart, J. E.; Gaffney, S. H.; Lilley, T. H.; Haslam, E., Polyphenol interactions. Part 1. Introduction; some observations on the reversible complexation of polyphenols with proteins and polysaccharides. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2* 1985, (9), 1429-1438.
265. Guyot, S.; Pellerin, P.; Brillouet, J. M.; Cheynier, V., Inhibition of β -glucosidase (*Amygdalae dulces*) by (+)-catechin oxidation products and procyanidin dimers. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 1996, 60, (7), 1131-1135.
266. Ghosh, K. S.; Maiti, T. K.; Debnath, J.; Dasgupta, S., Inhibition of ribonuclease A by polyphenols present in green tea. *Proteins: Structure, Function and Genetics* 2007, 69, (3), 566-580.
267. Cao, H.; Wu, D.; Wang, H.; Xu, M., Effect of the glycosylation of flavonoids on interaction with protein. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 2009, 73, (5), 972-975.
268. Chen, X. L.; Qu, L. B.; Zhang, T.; Liu, H.; Yu, F.; Yu, Y. Z.; Zhao, Y. F., Direct Observation of Non-covalent Complexes Formed Through Phosphorylated Flavonoid Protein Interaction by Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Supramolecular Chemistry* 2004, 16, (1), 67-75.
269. Hofmann, T.; Glabasnia, A.; Schwarz, B.; Wisman, K. N.; Gangwer, K. A.; Hagerman, A. E., Protein binding and astringent taste of a polymeric procyanidin, 1,2,3,4,6-penta-O-galloyl-D-glucopyranose, castalagin, and grandinin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2006, 54, (25), 9503-9509.
270. Richard, T.; Lefeuvre, D.; Descendit, A.; Quideau, S.; Monti, J. P., Recognition characters in peptide-polyphenol complex formation. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* 2006, 1760, (6), 951-958.
271. Hjertén, S.; Rosengren, J.; Phlman, S., Hydrophobic interaction chromatography. The synthesis and the use of some alkyl and aryl derivatives of agarose. *Journal of Chromatography A* 1974, 101, (2), 281-288.

272. Oh, H. I.; Hoff, J. E.; Armstrong, G. S.; Haff, L. A., Hydrophobic interaction in tannin-protein complexes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1980, 28, (2), 394-398.
273. Kawamoto, H.; Nakatsubo, F., Effects of environmental factors on two-stage tannin-protein co-precipitation. *Phytochemistry* 1997, 46, (3), 479-483.
274. Rawel, H. M.; Meidtner, K.; Kroll, J., Binding of selected phenolic compounds to proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2005, 53, (10), 4228-4235.
275. Maiti, T. K.; Ghosh, K. S.; Dasgupta, S., Interaction of (-)-epigallocatechin-3-gallate with human serum albumin: Fluorescence, Fourier transform infrared, circular dichroism, and docking studies. *Proteins: Structure, Function and Genetics* 2006, 64, (2), 355-362.
276. Hagerman, A. E.; Rice, M. E.; Ritchard, N. T., Mechanisms of Protein Precipitation for Two Tannins, Pentagalloyl Glucose and Epicatechin16 (4'8) Catechin (Procyanidin). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1998, 46, (7), 2590-2595.
277. De Freitas, V. A. P.; Carvalho, E.; Mateus, N., Study of carbohydrate influence on protein-tannin aggregation by nephelometry. *Food Chemistry* 2003, 81, (4), 503-509.
278. Mateus, N.; Pinto, R.; Ruáo, P.; De Freitas, V., Influence of the addition of grape seed procyanidins to Port wines in the resulting reactivity with human salivary proteins. *Food Chemistry* 2004, 84, (2), 195-200.
279. Hatano, T.; Hori, M.; Hemingway, R. W.; Yoshida, T., Size exclusion chromatographic analysis of polyphenol-serum albumin complexes. *Phytochemistry* 2003, 63, (7), 817-823.
280. Chatterjee, S.; Chowdhury, R.; Bhattacharya, P., A mathematical analysis of the effect of pH and protein concentration on adsorption of proteins on immobilised tannin. *Biochemical Engineering Journal* 2000, 5, (1), 77-82.
281. Hagerman, A. E.; Butler, L. G., Protein precipitation method for the quantitative determination of tannins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1978, 26, (4), 809-812.
282. Hagerman, A. E.; Butler, L. G., Determination of protein in tannin-protein precipitates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1980, 28, (5), 944-947.
283. Pripp, A. H.; Vreeker, R.; Van Duynhoven, J., Binding of olive oil phenolics to food proteins. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2005, 85, (3), 354-362.
284. Papadopoulou, A.; Green, R. J.; Frazier, R. A., Interaction of flavonoids with bovine serum albumin: A fluorescence quenching study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2005, 53, (1), 158-163.
285. Prigent, S. V. E.; Gruppen, H.; Visser, A. J. W. G.; Van Koningsveld, G. A.; De Jong, G. A. H.; Voragen, A. G. J., Effects of non-covalent interactions with 5-O-

- caffeylquinic acid (chlorogenic acid) on the heat denaturation and solubility of globular proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2003, 51, (17), 5088-5095.
286. Schwarz, B.; Hofmann, T., Is there a direct relationship between oral astringency and human salivary protein binding? *European Food Research and Technology* 2008, 227, (6), 1693-1698.
287. Siebert, K. J., Effects of protein-polyphenol interactions on beverage haze, stabilization, and analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1999, 47, (2), 353-362.
288. Vidal, S.; Francis, L.; Williams, P.; Kwiatkowski, M.; Gawel, R.; Cheynier, V.; Waters, E., The mouth-feel properties of polysaccharides and anthocyanins in a wine like medium. *Food Chemistry* 2004, 85, (4), 519-525.
289. Carvalho, E.; Póvoas, M. J.; Mateus, N.; De Freitas, V., Application of flow nephelometry to the analysis of the influence of carbohydrates on protein-tannin interactions. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2006, 86, (6), 891-896.
290. Mateus, N.; Carvalho, E.; Luís, C.; De Freitas, V., Influence of the tannin structure on the disruption effect of carbohydrates on protein-tannin aggregates. *Analytica Chimica Acta* 2004, 513, (1), 135-140.
291. Soares, S. I.; Gonçalves, R. M.; Fernandes, I. V. A.; Mateus, N.; De Freitas, V., Mechanistic approach by which polysaccharides inhibit $\hat{\alpha}$ -amylase/ procyanidin aggregation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2009, 57, (10), 4352-4358.
292. Frazier, R. A.; Papadopoulou, A.; Green, R. J., Isothermal titration calorimetry study of epicatechin binding to serum albumin. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2006, 41, (5), 1602-1605.
293. Chen, Y.; Hagerman, A. E., Characterization of soluble non-covalent complexes between bovine serum albumin and β -1,2,3,4,6-Penta-O-galloyl-D-glucopyranose by MALDI-TOF MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2004, 52, (12), 4008-4011.
294. Zanchi, D.; Narayanan, T.; Hagenmuller, D.; Baron, A.; Guyot, S.; Cabane, B.; Bouhallab, S., Tannin-assisted aggregation of natively unfolded proteins. *Europhysics Letters* 2008, 82, (5).
295. Jobstl, E.; O'Connell, J.; Fairclough, J. P. A.; Williamson, M. P., Molecular model for astringency produced by polyphenol/protein interactions. *Biomacromolecules* 2004, 5, (3), 942-949.
296. Pascal, C.; Poncet-Legrand, C.; Imbert, A.; Gautier, C.; Sarni-Manchado, P.; Cheynier, V.; Vernhet, A., Interactions between a non glycosylated human proline-rich protein and flavan-3-ols are affected by protein concentration and polyphenol/protein ratio. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2007, 55, (12), 4895-4901.

297. James A.Kennedy; P.Jones, G., Analysis of Proanthocyanidin Cleavage Products Following Acid-Catalysis in the Presence of Excess Phloroglucinol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2001, 49, 1740-1746.
298. .
299. Hirayama, K.; Akashi, S.; Furuya, M.; Fukuhara, K., Rapid confirmation and revision of the primary structure of bovine serum albumin by ESIMS and Frit-FAB LC/MS. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1990, 173, (2), 639-646.
300. Jr, T. P., *All About Albumin: Biochemistry, Genetics, and Medical Applications*. San Diego, 1996.
301. Xiao, J.; Cao, H.; Wang, Y.; Zhao, J.; Wei, X., Glycosylation of dietary flavonoids decreases the affinities for plasma protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2009, 57, (15), 6642-6648.
302. Xiao, J.; Suzuki, M.; Jiang, X.; Chen, X.; Yamamoto, K.; Ren, F.; Xu, M., Influence of B-ring hydroxylation on interactions of flavonols with bovine serum albumin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2008, 56, (7), 2350-2356.
303. Fulcrand, H.; Mane, C.; Preys, S.; Mazerolles, G.; Bouchut, C.; Mazauric, J. P.; Souquet, J. M.; Meudec, E.; Li, Y.; Cole, R. B.; Cheynier, V., Direct mass spectrometry approaches to characterize polyphenol composition of complex samples. *Phytochemistry* 2008, 69, (18), 3131-3138.
304. Zhang, Y.; Wang, M.; Xie, Q.; Wen, X.; Yao, S., Monitoring of the interaction of tannin with bovine serum albumin by electrochemical quartz-crystal impedance system and fluorescence spectrophotometry. *Sensors and Actuators, B: Chemical* 2005, 105, (2), 454-463.
305. Carvalho, E.; Po?voas, M. J.; Mateus, N.; De Freitas, V., Application of flow nephelometry to the analysis of the influence of carbohydrates on protein-tannin interactions. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2006, 86, (6), 891-896.
306. Serafini, M.; Maiani, G.; Ferro-Luzzi, A., Effect of Ethanol on Red Wine Tannin - Protein (BSA) Interactions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1997, 45, (8), 3148-3151.
307. Michnik, A.; Drzazga, Z., Effect of ethanol on the thermal stability of human serum albumin. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* 2007, 88, (2), 449-454.
308. Avdulov, N. A.; Chochina, S. V.; Daragan, V. A.; Schroeder, F.; Mayo, K. H.; Wood, W. G., Direct binding of ethanol to bovine serum albumin: A fluorescent and ¹³C NMR multiplet relaxation study. *Biochemistry* 1996, 35, (1), 340-347.
309. Enders, S.; Kahl, H., Interfacial properties of water + alcohol mixtures. *Fluid Phase Equilibria* 2008, 263, (2), 160-167.

-
310. Buxbaum, E., *Fundamentals of Protein Structure and Function*. Springer Verlag: 2007.
311. Elysée-Collen, B.; Lencki, R. W., Effect of ethanol, ammonium sulfate, fatty acids, and temperature on the solution behavior of bovine serum albumin. *Biotechnology Progress* 1997, 13, (6), 849-856.
312. Azab, H. A.; Ahmed, I. T.; Mahmoud, M. R., Potentiometric determination of the apparent dissociation constants of some dicarboxylic acids in various hydroorganic media. *Journal of Chemical and Engineering Data* 1997, 42, (3), 593-596.
313. Li, Y.; Lee, J.; Lal, J.; An, L.; Huang, Q., Effects of pH on the interactions and conformation of bovine serum albumin: Comparison between chemical force microscopy and small-angle neutron scattering. *Journal of Physical Chemistry B* 2008, 112, (12), 3797-3806.
314. Tanaka, S. H.; Yoshihara, H. I.; Ho, A. W. C.; Lau, F. W.; Westh, P.; Koga, Y., Excess partial molar enthalpies of alkane-mono-ols in aqueous solutions. *Canadian Journal of Chemistry* 1996, 74, (5), 713-721.
315. Westh, P.; Koga, Y., Intermolecular interactions of lysozyme and small alcohols: A calorimetric investigation. *Journal of Physical Chemistry B* 1997, 101, (29), 5755-5758.
316. Rodríguez Niño, M. R.; Wilde, P. J.; Clark, D. C.; Husband, F. A.; Rodríguez Patino, J. M., Rheokinetic Analysis of Protein Films at the Air-Aqueous Phase Interface. 1. Bovine Serum Albumin Adsorption on Ethanol Aqueous Solutions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1997, 45, (8), 3010-3015.
317. Dussaud, A.; Vignes-Adler, M., Surface Properties of Protein Alcoholic Solutions. III. Aging Effect. *Journal of Colloid And Interface Science* 1994, 167, (2), 266-274.
318. Guyot, S.; Cheynier, V.; Souquet, J. M.; Moutounet, M., Influence of pH on the enzymatic oxidation of (+)-catechin in model systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1995, 43, (9), 2458-2462.
319. Lee Jr, C. T.; Smith, K. A.; Hatton, T. A., Photocontrol of protein folding: The interaction of photosensitive surfactants with bovine serum albumin. *Biochemistry* 2005, 44, (2), 524-536.
320. Kawamoto, H.; Nakatsubo, F., Solubility of protein complexed with galloylglucoses. *Phytochemistry* 1997, 46, (3), 485-488.
321. Naczek, M.; Oickle, D.; Pink, D.; Shahidi, F., Protein Precipitating Capacity of Crude Canola Tannins: Effect of pH, Tannin, and Protein Concentrations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1996, 44, (8), 2144-2148.
322. Chapon, L., Nephelometry as a method for studying the relations between polyphenols and proteins. *Journal of the Institute of Brewing* 1993, 99, 49-56.
-

323. De Freitas, V.; Mateus, N., Structural features of procyanidin interactions with salivary proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2001, 49, (2), 940-945.
324. House, J., *Principles of chemical kinetics*. 2 ed.; Academic Press: 2007; p 336.
325. Siebert, K. J.; Carrasco, A.; Lynn, P. Y., Formation of Protein-Polyphenol Haze in Beverages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1996, 44, (8), 1997-2005.
326. Aron, P. M.; Kennedy, J. A., Compositional investigation of phenolic polymers isolated from *Vitis vinifera* L. Cv. pinot noir during fermentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2007, 55, (14), 5670-5680.
327. Takahashi, A.; Shimada, T., Selective consumption of acorns by the Japanese wood mouse according to tannin content: A behavioral countermeasure against plant secondary metabolites. *Ecological Research* 2008, 23, (6), 1033-1038.
328. Cai, K.; Hagerman, A. E.; Minto, R. E.; Bennick, A., Decreased polyphenol transport across cultured intestinal cells by a salivary proline-rich protein. *Biochemical Pharmacology* 2006, 71, (11), 1570-1580.
329. Gawel, R., Red wine astringency: A review. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 1998, 4, (2), 73-95.
330. Yokotsuka, K.; Ebihara, T.; Sato, T., Comparison of soluble proteins in juice and wine from Koshu grapes. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 1991, 71, (4), 248-253.
331. Sampaio, T. L.; Kennedy, J. A.; Vasconcelos, M. C., Use of microscale fermentations in grape and wine research. *American Journal of Enology and Viticulture* 2007, 58, (4), 534-539.
332. Marsoni, M.; Vannini, C.; Campa, M.; Cucchi, U.; Espen, L.; Bracale, M., Protein extraction from grape tissues by two-dimensional electrophoresis. *Vitis - Journal of Grapevine Research* 2005, 44, (4), 181-186.
333. Deytieux, C.; Geny, L.; Lapaillerie, D.; Claverol, S.; Bonneau, M.; Donéche, B., Proteome analysis of grape skins during ripening. *Journal of Experimental Botany* 2007, 58, (7), 1851-1862.
334. Vivas, N.; Glories, Y., Role of Oak Wood Ellagitannins in the Oxidation Process of Red Wines During Aging. *Am. J. Enol. Vitic.* 1996, 47, (1), 103-107.
335. Canon, F.; Pate, F.; Meudec, E.; Marlin, T.; Cheynier, V.; Giuliani, A.; Sarni-Manchado, P., Characterization, stoichiometry, and stability of salivary protein-tannin complexes by ESI-MS and ESI-MS/MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2009, 395, (8), 2535-2545.
336. Deutsch, O.; Fleissig, Y.; Zaks, B.; Krief, G.; Aframian, D. J.; Palmon, A., An approach to remove alpha amylase for proteomic analysis of low abundance biomarkers in human saliva. *Electrophoresis* 2008, 29, (20), 4150-4157.

337. Sarni-Manchado, P.; Canals-Bosch, J. M.; Mazerolles, G.; Cheynier, V., Influence of the glycosylation of human salivary proline-rich proteins on their interactions with condensed tannins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2008, 56, (20), 9563-9569.
338. Peleg, H.; Gacon, K.; Schlich, P.; Noble, A. C., Bitterness and astringency of flavan-3-ol monomers, dimers and trimers. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 1999, 79, (8), 1123-1128.
339. Kallithraka, S.; Bakker, J.; Clifford, M. N., Evaluation of bitterness and astringency of (+)-catechin and (-)-epicatechin in red wine and in model solution. *Journal of Sensory Studies* 1997, 12, (1), 25-37.
340. ASTM, *Standard definitions of terms relating to sensory evaluation of materials and products*. American Society for Testing and Materials: Philadelphia, 2004.
341. O'Mahony, M., Who told you the triangle test was simple? *Food Quality and Preference* 1995, 6, (4), 227-238.
342. Hersleth, M.; Mevik, B. H.; Naes, T.; Guinard, J. X., Effect of contextual factors on liking for wine - Use of robust design methodology. *Food Quality and Preference* 2003, 14, (7), 615-622.
343. Ross, C. F.; Hinken, C.; Weller, K., Efficacy of palate cleansers for reduction of astringency carryover during repeated ingestions of red wine. *Journal of Sensory Studies* 2007, 22, (3), 293-312.
344. Breslin, P. A. S.; Gilmore, M. M.; Beauchamp, G. K.; Green, B. G., Psychophysical evidence that oral astringency is a tactile sensation. *Chemical Senses* 1993, 18, (4), 405-417.
345. Kallithraka, S.; Barker, J.; Clifford, M. N., Evidence that salivary proteins are involved in astringency. *Journal of Sensory Studies* 1998, 13, (1), 29-43.
346. Prinz, J. F.; Lucas, P. W., Saliva tannin interactions. *Journal of Oral Rehabilitation* 2000, 27, (11), 991-994.
347. Rossetti, D.; Yakubov, G. E.; Stokes, J. R.; Williamson, A. M.; Fuller, G. G., Interaction of human whole saliva and astringent dietary compounds investigated by interfacial shear rheology. *Food Hydrocolloids* 2008, 22, (6), 1068-1078.
348. Nayak, A.; Carpenter, G. H., A physiological model of tea-induced astringency. *Physiology and Behavior* 2008, 95, (3), 290-294.
349. Payne, C.; Bowyer, P. K.; Herderich, M.; Bastian, S. E. P., Interaction of astringent grape seed procyanidins with oral epithelial cells. *Food Chemistry*.

350. Gawel, R.; Oberholster, A.; Francis, I. L., A 'Mouth-feel Wheel': Terminology for communicating the mouth-feel characteristics of red wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 2000, 6, (3), 203-207.
351. Gawel, R.; Iland, P. G.; Francis, I. L., Characterizing the astringency of red wine: A case study. *Food Quality and Preference* 2001, 12, (1), 83-94.
352. Lattey, K. A.; Bramley, B. R.; Francis, I. L., Consumer acceptability, sensory properties and expert quality judgements of Australian Cabernet Sauvignon and Shiraz wines. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 2009, 9999, (9999).
353. Fontoin, H.; Rudnitskaya, A.; Saucier, C.; Legin, A.; Teissedre, P. L.; Glories, Y. In *Chemical and sensorial characterization of tannin extracts in model wine solution using an electronic tongue*, In *Vino Analytica Scientia*, Melbourne, Australia, 2007; Melbourne, Australia, 2007.
354. Petrovic, S. C., Correlation of perceived wine astringency to cyclic voltammetric response. *American Journal of Enology and Viticulture* 2009, 60, (3), 373-378.
355. Scampicchio, M.; Benedetti, S.; Brunetti, B.; Mannino, S., Amperometric electronic tongue for the evaluation of the tea astringency. *Electroanalysis* 2006, 18, (17), 1643-1648.
356. He, W.; Hu, X.; Zhao, L.; Liao, X.; Zhang, Y.; Zhang, M.; Wu, J., Evaluation of Chinese tea by the electronic tongue: Correlation with sensory properties and classification according to geographical origin and grade level. *Food Research International* 2009, 42, (10), 1462-1467.
357. Hayashi, N.; Ujihara, T.; Kohata, K., Reduction of catechin astringency by the complexation of gallate-type catechins with pectin. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 2005, 69, (7), 1306-1310.
358. Cozzolino, D.; Cowey, G.; Lattey, K. A.; Godden, P.; Cynkar, W. U.; Damberg, R. G.; Janik, L.; Gishen, M., Relationship between wine scores and visible-near-infrared spectra of Australian red wines. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2008, 391, (3), 975-981.
359. S. Preys, G. M., P. Courcoux, A. Samson, U. Fischer, M. Hanafi, D. Bertrand, V. Cheynier, Relationship between polyphenolic composition and some sensory properties in red wines using multiway analyses. *Analytica Chimica Acta* 2006, 563, 126-136.
360. Kennedy, J. A.; Ferrier, J.; Harbertson, J. F.; Peyrot Des Gachons, C., Analysis of tannins in red wine using multiple methods: Correlation with perceived astringency. *American Journal of Enology and Viticulture* 2006, 57, (4), 481-485.
361. Naish, M.; Clifford, M. N.; Birch, G. G., Effect of gelatin (a model for salivary PRP) on the sensory astringency of 5-O-caffeoylquinic acid and tannic acid. In *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1998; Vol. 855, pp 823-827.

362. Monteleone, E.; Dinnella, C.; Condelli, N., Perceived astringency in wine: A predictive model. In *Acta Horticulturae*, 2007; Vol. 754, pp 523-532.
363. Monteleone, E.; Condelli, N.; Dinnella, C.; Bertuccioli, M., Prediction of perceived astringency induced by phenolic compounds. *Food Quality and Preference* 2004, 15, (7-8 SPEC.ISS.), 761-769.
364. Fia, G.; Dinnella, C.; Bertuccioli, M.; Monteleone, E., Prediction of grape polyphenol astringency by means of a fluorimetric micro-plate assay. *Food Chemistry* 2009, 113, (1), 325-330.
365. Llaudy, M. C.; Canals, R.; Canals, J. M.; Rozés, N.; Arola, L.; Zamora, F., New Method for Evaluating Astringency in Red Wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2004, 52, (4), 742-746.
366. Horne, J.; Hayes, J.; Lawless, H. T., Turbidity as a measure of salivary protein reactions with astringent substances. *Chemical Senses* 2002, 27, (7), 653-659.
367. Gambuti, A.; Rinaldi, A.; Pessina, R.; Moio, L., Evaluation of aglianico grape skin and seed polyphenol astringency by SDS-PAGE electrophoresis of salivary proteins after the binding reaction. *Food Chemistry* 2006, 97, (4), 614-620.
368. Kallithraka, S.; Bakker, J.; Clifford, M. N.; Vallis, L., Correlations between saliva protein composition and some T-I parameters of astringency. *Food Quality and Preference* 2001, 12, (2), 145-152.
369. Fontoin, H.; Saucier, C.; Teissedre, P. L.; Glories, Y., Effect of pH, ethanol and acidity on astringency and bitterness of grape seed tannin oligomers in model wine solution. *Food Quality and Preference* 2008, 19, (3), 286-291.
370. Taira, S.; Ono, M.; Matsumoto, N., Reduction of persimmon astringency by complex formation between pectin and tannins. *Postharvest Biology and Technology* 1997, 12, (3), 265-271.
371. Siebert, K. J.; Euzen, C., The relationship between expectorant ph and astringency perception. *Journal of Sensory Studies* 2008, 23, (2), 222-233.
372. Smith, A. K.; June, H.; Noble, A. C., Effects of viscosity on the bitterness and astringency of grape seed tannin. *Food Quality and Preference* 1996, 7, (3-4), 161-166.

Liste des Abréviations

AGP	Arabinogalactane protéine
BSA	Albumine de Serum Bovin
C	(+)-Catéchine
DPm	Degré de polymérisation moyen
EC	(-)-Epicatéchine
ECG	Epicatéchine gallate
EC-P	(-)-Epicatéchine phloroglucinol
EGC	(-)-Epigallocatechine
EGCG	Epigallocatechine gallate
EGC-P	(-)-Epigallocatechine–phloroglucinol
EtOH	Ethanol
HPLC	Chromatographie liquide haute performance
MS	Spectrométrie de masse
PGG	Pentagalloylglucose
pI	Point isoléctrique
PRP	Protéines riches en proline
RG	Rhamnogalcturonane
SIM	Single Ion Monitorization
TCA	Acide Trichloroacétique
TGG	TetraGalloylglucose