

N° d'ordre :

THÈSE

PRÉSENTÉE A

L'UNIVERSITÉ BORDEAUX 1

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES

Par Aurélien FURLAN

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR

SPÉCIALITÉ : Chimie-Physique

Interactions entre les tannins et les lipides : impact possible sur le goût du vin.

Directeurs de recherche : Dr. Erick J. Dufourc / Dr. Julie Géan

Soutenue prévue le : 19 Décembre 2013

Devant la commission d'examen formée de :

Mme Catherine Sarrazin
M. Jean-Paul Douliez
M. Arnaud Bondon
Mme Isabelle Pianet
M. Erick J. Dufourc
Mme Julie Géan

Professeur, Université d'Amiens
Directeur de recherche INRA, Université de Bordeaux
Directeur de recherche CNRS, Université de Rennes 1
Ingénieur de recherche CNRS, Université de Bordeaux
Directeur de recherche CNRS, Université de Bordeaux
Maître de conférences, Université de Bordeaux IV

Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Directeur de thèse
Directeur de thèse

Remerciement

Ce travail de thèse a été réalisé au sein de laboratoire « Chimie et Biologie des Membranes et des Nanoobjets » (CBMN, UMR 5248) dirigé par M. Erick J. Dufourc, je tiens donc dans un premier temps à remercier M. Erick J. Dufourc pour son accueil au sein de ce laboratoire. De même, une partie importante de cette thèse a été réalisée à l'Institut Européen de Chimie et Biologie (IECB), je me permets donc de remercier les trois co-directeurs de cet institut, MM. Ivan Huc, Jean-Louis Mergny et Jean-Jacques Toulmé pour m'avoir permis d'utiliser leurs locaux.

Je tiens tout particulièrement à remercier le Conseil Interprofessionnel du Vin de Bordeaux (CIVB) pour le soutien financier accordé à ces travaux sans quoi l'élaboration de ce manuscrit n'aurait pas été possible.

Je remercierais ensuite l'ensemble de mon jury de thèse pour l'intérêt scientifique porté à ce travail. Je commencerais à remercier mes deux rapporteurs, Mme Catherine Sarazin et M. Jean-Paul Douliez qui ont pris de leurs temps pour juger ce manuscrit, leurs avis et leurs corrections ont été enrichissants. Je remercierais ensuite mes deux examinateurs, Mme Isabelle Pianet et M. Arnaud Bondon pour vos remarques pertinentes, M. Arnaud Bondon ayant en outre accepté d'être le président de ce jury.

Il est maintenant temps pour moi de remercier mes deux co-directeurs de thèse, Julie Géan et Erick J. Dufourc. Je commencerais par Julie Géan qui a été mon encadrante « au quotidien ». Julie, bien que l'on n'ait pas été en accords sur tout durant cette thèse (ah, les bicelles isotropes...), j'ai particulièrement apprécié de travailler avec vous durant ces trois ans. J'ai l'habitude de penser qu'une thèse n'est faisable que s'il y a une bonne entente et une confiance mutuelle entre le thésard et son directeurs de thèse, vos qualités humaines (diplomatie, gentillesse, persévérance) ont permis cela, ne changez rien. En outre, je vous remercie sincèrement pour le temps accordé pour la correction de ce manuscrit. Erick, bien que ton mandat de directeur du laboratoire fasse que tu as, fort naturellement, moins de temps à accorder à tes étudiants, ta porte a toujours été ouverte pour d'éventuelles questions scientifiques ou problèmes, j'ai apprécié cela. De même, j'ai beaucoup apprécié nos réunions qui ont toujours su faire avancer le projet. De manière générale, vos qualités humaines, à vous deux, ont grandement participé à l'avancé de ce projet et jouent un rôle dans la bonne ambiance au sein de l'équipe.

Il me paraît important de remercier mes différents collaborateurs qui sont intervenus à tour de rôle dans certaines parties de ce projet :

- Je commencerais par remercier Mme Maud Cansell avec qui nous avons entamé une collaboration sur l'influence des tannins sur des émulsions mimant l'organisation des lipides alimentaires. Sur ce même sujet, je remercie chaleureusement sa stagiaire, Lucie, qui a réussi en deux mois à mettre en évidence des résultats prometteurs.

- Je remercierais ensuite MM. Brice Kauffmann et Frédéric Nallet pour l'aide apportée sur les expériences de diffusion des rayons X aux petits angles.
- De même, je tiens à remercier Mme Reiko Oda, ses thésards Rumi et Robin, ainsi que M. Christophe Schatz pour l'aide et les conseils apportés dans le cadre des expériences de DLS.
- Je tiens de plus à remercier l'équipe du professeur Alain Brisson et plus particulièrement Mme Celine Gounou et M. Nicolas Arraud pour m'avoir initié au test phosphate et m'avoir permis d'utiliser leurs matériels.
- Remerciement à notre homme à tous faire du CBMN, Claude Manigand, pour son aide sur le plan logistique
- Enfin, remerciement tout particulier à Mme Isabelle Pianet ainsi qu'à son ancienne stagiaire Aurore pour avoir initié ce projet.

Un immense merci à notre ingénieur en chef Axelle Grelard pour m'avoir initié à l'aspect pratique de la RMN, que ce soit en thèse ou durant mon stage de Master 2. Le fait que tu aies pu répondre à une grande partie de mes questions et divers problèmes a été d'une grande aide. Je remercie de même les autres ingénieures qui se sont relayées aux côtés d'Axelle : Cécile, Vanessa et Estelle. Merci à vous trois.

Je remercie chaleureusement le reste de l'équipe RMN : Benoit qui a su garder son humour malgré de multiples railleries. De plus, les discussions que nous avons eu sur des sujets de société (politique, économie) ont toujours été fort intéressante. Denis, mon humble collègue de bureau et de pause café, merci à toi pour ta gentillesse et ton humour, et courage, plus que deux ans. Nicole, qui part en même temps que moi, bonne chance à Strasbourg et tu verras que tu as eu raison de ne jamais lâcher. Vanessa U. qui a notamment inhumé deux cadavres en salle RMN et qui sera donc à l'origine de légendes qui se transmettront de génération en génération. Benoît F qui participe à la bonne humeur du laboratoire ainsi que notre post-doc indienne Shipra. Je n'oublie pas de remercier nos anciens stagiaires (Laura, Emmanuelle, Kevin, Alexandre) qui ont participé à la vie du laboratoire et plus précisément deux d'entre-elles que j'ai pu en partie encadrer : Marie-Lise, notre « traîtresse » qui a rejoint l'équipe infrarouge en thèse. Encore quelques mois avant que tu sois à ton tour docteur mais je ne me fais pas de soucis à ce sujet et Anaïs que j'ai encadré dans ces manip durant ma dernière année de thèse. Malgré que cela se soit fait dans une période assez pénible (début de rédaction), j'ai particulièrement apprécié travailler avec toi. Je remercie aussi les « glorieux anciens » que j'ai côtoyé durant ma thèse et mon stage de master : Jeannot, Olivier, Vanessa, Christian et Anna.

Un coucou enfin aux nombreuses personnes que j'ai côtoyé durant ces trois ans, que ce soit au CBMN ou à l'IECB, thésards, post-doc ou personnel permanents : Cameron, Gilmar, Aziz, Samir, Dorsun, Heddy, Sabine, Audrey, Isabelle A., Seydou, Vincent, Sophie, Etienne, Sarah, Jade, Vladimir, Hsiang-Hsing, Jérémie, Guillaume, Béatrice, Fanny, Julien, Romain L., Romain C., Nicolas, Alexis, Grégoire, Alexandre... et j'en oublie, désolé.

Enfin je souhaite remercier ma famille et l'ensemble de mes amis qui m'ont aidé, notamment par leurs encouragements, à faire en sorte que ces trois années soient positive. Leurs soutiens ont notamment été appréciés.

Sommaire

Liste des abréviations

Productions scientifiques

I. Introduction générale
I.A La dégustation d'un vin, notion d'astringence et d'amertume.....	3
I.A.1 L'amertume, une propriété gustative	3
I.A.2 L'astringence, une sensation tactile	4
I.A.3 Paramètres influant sur l'amertume et l'astringence	7
I.B Les tannins	7
I.B.1 Définition et localisation	7
I.B.2 Les tannins possèdent une grande variété structurale	9
I.B.2.a Les tannins hydrolysables	9
I.B.2.b Les tannins condensés	11
I.B.3 Propriétés physicochimiques : auto-association des tannins	13
I.C Lipides impliqués dans le goût du vin ; lipides des membranes buccales et lipides alimentaires	15
I.C.1 Les membranes buccales	15
I.C.1.a Description générale.....	15
I.C.1.b Fonction.....	17
I.C.1.c Composition lipidique	17
I.C.2. Les lipides issus de l'alimentation	19
I.C.3. Polymorphisme lipidique et modèles membranaires.....	20
I.C.3.a Polymorphisme lipidique	21
I.C.3.b Effet de la température sur la nature de la phase adoptée.....	23
I.C.3.d Présentation des modèles lipidiques utilisés au cours de cette thèse	24
I.D Interactions tannin-lipide, état de l'art	26
I.E Objectif et plan de thèse	30

II. Matériels et méthodes.....
II.A Produits chimiques.....	35
II.B Préparation des échantillons	35
II.B.1 Formation des vésicules multilamellaires et insertion des tannins par cosolubilisation (chapitre III.....	36
II.B.2 Obtention des modèles membranaires, MLV et LUV, utilisés lors des titrations et ajout des tannins par addition (chapitre IV.....	36
II.B.2.a Obtention des solutions tampons	37
II.B.2.b Obtention des solutions mixtes tannins-MLV par addition de tannins	37
II.B.2.c Obtention des solutions mixtes tannins-LUV par addition de tannins	38
II.B.3 Obtention des modèles de gouttelettes lipidiques (chapitre V) ..	39
II.B.3.a Cas des bicelles isotropes DMPC/DCPC.....	39
II.B.3.b Cas de l'émulsion huile dans eau.....	39
II.B.3.c Obtention des précipités dans le cas des bicelles isotropes DMPC/DCPC et des MLV de DMPC.....	40
II.B.4 Addition de tannin sur la phase lamellaire du DPoPE	41
II.C La spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN).....	41
II.C.1. Notions théoriques	41
II.C.1.a Généralités	41
II.C.1.b Comportement du noyau dans le champ magnétique statique \vec{B}_0 : effet Zeeman et fréquence de Larmor	43
II.C.1.c Comportement du noyau soumis à un champ radiofréquence B_1 – Le cas d'une expérience RMN simple	44
II.C.1.d Les interactions internes – Distinction entre la RMN des liquides et des solides.....	48
II.C.2 La RMN des solides – Applications à l'étude des biomembranes.....	50
II.C.2.a RMN du Phosphore ^{31}P	50
II.C.2.b RMN du deutérium ^2H.....	55
II.C.2.c La rotation à l'angle magique.....	58
II.D Acquisition et traitement des spectres RMN	59
II.D.1 Acquisition des données	59
II.D.1.a Une spécificité de la RMN des solides, les séquences d'écho....	59
III.D.1.b Paramètres d'acquisition.....	61

II.D.2 Traitement des données en RMN du solide	64
II.D.2.a Obtention du spectre – le sommet de l'écho	64
II.D.2.b Traitement des données – moments spectraux et paramètres d'ordre.....	66
II.D.2.c Obtention des paramètres d'ordre – « de-Pake-ing » et simulation.....	71
II.E La diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS).....	74

III. Les interactions tannin-lipide impliquées dans l'amertume ? Etude de l'effet des tannins sur la dynamique des membranes par RMN des solides.....

III.A Etude de l'effet des tannins sur des MLV de DMPC deutéré	85
III.A.1 Etude du système seul.....	85
III.A.2 Effet des tannins sur la dynamique du système	89
III.A.2.a Effet sur le thermotropisme des lipides.....	89
III.A.2.b Effet sur la dynamique locale des chaînes.....	92
III.A.2.c Influence de la concentration en tannin sur la dynamique de la membrane	95
III.A.3 Effet des tannins en présence d'éthanol.....	97
III.A.3.a Effet de l'éthanol sur la dynamique des MLV de DMPC-d ₅₄ .	97
III.A.3.b Effet de la catéchine sur la dynamique du modèle membranaire en présence d'éthanol	99
III.B Etude de l'effet du tannin sur des MLV de DMPC dopées avec du cholestérol (18% molaire).....	102
III.B.1 Etude du système seul	102
III.B.2 Effet de la catéchine sur la dynamique des MLV de DMPC + cholestérol	106
III.B.3 Effet de la catéchine sur le modèle de MLV de DMPC/CH (82/18) en présence d'éthanol.....	109
III.B.3.a Influence de l'éthanol sur la dynamique du système [DMPC/CH] (82/18)	109
III.B.3.b Effet de la catéchine sur la dynamique du système DMPC/CH (82/18) en présence d'éthanol	112
III.B.4 Effet de la catéchine sur la dynamique des chaînes acyles du système DMPC/CH (82/18)	114

III.B.5 Conclusion sur l'effet des tannins sur des MLV dopées avec du cholestérol (18% molaire)	118
III.C Effet de la catéchine sur un modèle de membrane buccale.....	119
III.C.1 Présentation et conception du modèle.....	119
III.C.2 Influence de la catéchine sur la dynamique du modèle de membrane buccale POPC-d ₃₁ /POPE/GSL/SM/CH (1.5/1.8/1.5/1.2/4) dans les conditions de la dégustation	121
III.D Discussion	124
III.E Conclusion et perspectives	128
IV. Etude de l'interaction tannin-lipide par RMN des liquides – Détermination de constantes d'association	
IV.A Caractérisation structurale du système par RMN ¹ H.....	135
IV.A.1 Caractérisation des vésicules multilamellaires.....	135
IV.A.2 Attribution par RMN ¹ H des résonances du tannin	137
IV.B Stratégie d'étude	139
IV.B.1 Mise en évidence du site d'interaction entre les tannins et les lipides	139
IV.B.2 Détermination de la concentration en tannin optimale pour l'étude des interactions tannin-lipide.....	140
IV.B.2.a Cas d'un rapport molaire tannin-lipide inférieur à 1	140
IV.B.2.b Cas d'un rapport molaire tannin-lipide inférieur à 1	141
IV.B.2.c Détermination des conditions d'étude.....	143
IV.C Etude de l'interaction de la catéchine avec des vésicules multilamellaires	144
IV.C.1 Modélisation des interactions tannins-lipides	144
IV.C.2 Etude du système C/MLV par RMN ¹ H	146
IV.C.3 Etude du système C/LUV par RMN ¹ H et comparaison avec le système C/MLV.....	146
IV.D Influence de l'auto-association du tannin sur l'interaction tannin-lipide.....	150
IV.D.1 Détermination des constantes d'auto-association de la catéchine pour T = 37°C à pH de 7.4 et 3.5	151
IV.E Paramètres influençant l'interaction tannin-lipide	153

IV.E.1 Détermination des constantes d'association tannin-lipide en fonction de la structure du tannin	153
IV.E.1.a Cas du système EC/MLV	153
IV.E.1.b Cas du système EGCG/MLV	155
IV.E.1.c Cas du système ECG/MLV	157
IV.E.2 Influence du milieu sur la constante d'association.....	159
IV.E.2.a Impact de la température	162
IV.E.2.b Impact du pH.....	162
IV.E.2.c Impact de l'éthanol.....	164
IV.E.3 Détermination de la constante d'association du système C/MLV de POPC.....	166
IV.F Discussion	168
IV.F.1 Localisation des tannins sur le modèle membranaire	171
IV.F.2 Discussion sur la pertinence de la méthode utilisée.....	172
IV.F.3 Influence de la structure des tannins sur leur affinité pour le modèle membranaire	173
IV.F.4 Influence de l'interaction tannin-lipide sur l'astringence et implication dans le goût du vin.....	175
IV.G Conclusion et perspectives	175
V. Effet des tannins sur des gouttelettes lipidiques.....	
V.A Effet des tannins sur les bicelles isotropes	185
V.A.1 Caractérisation structurale des bicelles.....	185
V.A.2 Effet de la catéchine sur les bicelles, formation d'un précipité à fortes concentration	185
V.A.2.a Composition du précipité	188
V.A.2.b Caractérisation du précipité	190
V.A.3 Influence du tannin, cas de l'EC et de l'EGCG	194
V.A.4 Influence du modèle lipidique, effet de la catéchine sur des vésicules multilamellaires.....	196
V.A.5 Influence de la phase du lipide, cas du DPoPE	196
V.A.5.a Etude de la transition de phase T_h du DPoPE par RMN du phosphore.....	199
V.A.5.b Effet de la catéchine sur le thermotropisme du DPoPE	199

V.A.6 Discussion	201
V.A.6.a Les tannins déstabilisent les bicelles isotropes et entraînent la formation d'une phase hexagonale de type II.....	201
V.A.6.b Les tannins stabilisent la phase lamellaire des phosphoéthanolamines en induisant une augmentation de la température de transition de phase lamellaire/hexagonale.....	204
V.A.6.c Implications possibles dans la dégustation d'un vin	206
V.B Effet de l'EGCG sur un modèle d'émulsion lipidique directe	207
V.B.1 Caractérisation structurale des constituants de l'émulsion.....	207
V.B.1.a Attribution par RMN ¹H de l'huile de tournesol oléique	209
V.B.1.b Attribution par RMN du tween 80	209
V.B.2 Etude de l'émulsion lipidique par RMN.....	211
V.B.2.a Emulsion seule	211
V.B.2.b Effet du tannin sur l'émulsion lipidique	213
V.B.2.c Discussion sur la pertinence du modèle utilisé.....	216
V.C Conclusion et perspectives.....	217
VI. Conclusion et perspectives.....	
VI.A Conclusion générale	220
VI.A.1 Effet des tannins sur la fluidité membranaire (chapitre III)..	221
VI.A.2 Effet des interactions tannins-lipides sur l'astringence – Détermination de constantes d'affinité tannin-lipide (chapitre IV).....	222
VI.A.3 Etude des interactions entre les tannins et des modèles de gouttelettes lipidiques (chapitre V)	223
VI.B Perspectives.....	224
Bibliographie.....	227
Liste des annexes	241

Liste des abréviations

Lipides

AG : Acides gras

CE : Esters de cholestérol

CH : Cholestérol

CS : Sulfate de cholestérol

DCPC : 1,2-dicaproyl-*sn*-glycéro-3-phosphocholine

DCPC-d₂₂ : DCPC deutéré sur les deux chaînes grasses

DGDG : digalactosyldiacylglycerol

DMPC : 1,2-dimyristoyl-*sn*-glycéro-3-phosphocholine

DMPC-d₂₇ : DMPC deutérés sur une chaîne grasse

DMPC-d₅₄ : DMPC deutéré sur les deux chaînes grasses

DPoPE : 1,2-dipalmitoleoyl-*sn*-glycéro-3-phosphoéthanolamine

GSL : Glucosylcéramides

IP3 : Inositol triphosphate

PC : Phosphatidylcholines

PE : Phosphatidyléthanolamines

PG : Phosphatidylglycérols

PI : Phosphatidylinositols

POPC : 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycéro-3-phosphocholine

POPC-d₃₁ : POPC deutéré sur une chaîne grasse

POPE : 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycéro-3-phosphoéthanolamine

POPS : 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycéro-3-phosphatidylsérine

PS : Phosphatidylsérines

SM : Sphingomyéline

TG : Triglycérides

Systemes lipidiques

LUV : Vésicules unilamellaires larges (Large Unilamellar Vesicles)

MLV : Vésicules multilamellaires (MultiLamellar Vesicles)

SUV : Petite vésicules unilamellaires (Small Unilamellar Vesicles)

Tannins

C : Catéchine

CG : Catéchine gallate

EC : Epicatéchine

ECG : Epicatéchine gallate

EGC : Epigallocatechine
EGCG : Epigallocatechine gallate
GCG : Gallocatechine gallate
PGG : 1,2,3,4,6-penta-*O*-galloyl- β -Dglucopyranose

Unités de mesure

μ L : Microlitre ; mL : Millilitre
 μ m : Micromètre ; nm : Nanomètre
 μ s : Microseconde
Å : Angström
dB : Debye
H : Hertz ; MHz : Mégahertz ; kHz : Kilohertz
M : Molaire ; mM : Millimolaire
ppm : Partie par million
rpm : Tour par minute

Autres

$\Delta\nu_Q$: Eclatement quadrupolaire
 $\Delta\delta$: Variation de déplacement chimique
 $\Delta\delta_{\max}$: Variation de déplacement chimique maximale
CMC : Concentration micellaire critique
CP-MAS : Polarisation croisée avec rotation à l'angle magique (Cross-Polarization Magic Angle Spinning)
CSA : Anisotropie de blindage électronique (Chemical Shielding Anisotropy)
COSY : COrrélation SpectroscopY
FID : Free Induction Decay
GPCR : Récepteurs couplés aux protéines G
 H_I : Phase hexagonale de type I
 H_{II} : Phase hexagonale de type II
HR-MAS : Haute résolution par rotation à l'angle magique (High-Resolution Magic Angle Spinning)
HRP : Protéines riches en histidine
ITC : Titration calorimétrique isotherme (Isothermal Titration Calorimetry)
 K_a : Constante d'association
 K_{a_a} : Constante d'auto-association
 K_d : Constante de dissociation
 L_α : Phase lamellaire fluide
 $L_{\beta'}$: Phase lamellaire gel
 L_o : Phase liquide ordonnée
 M_1 : Moment spectral d'ordre 1
 M_2 : Moment spectral d'ordre 2

NOE : Nuclear Overhauser Effect

NOESY : Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy

PRP : Protéines riches en proline

QCM : Microbalance à quartz (Quartz Crystal Microbalance)

RMN : Résonance magnétique nucléaire

ROESY : Rotating-frame nuclear Overhauser Effect correlation Spectroscopy

RPE : Résonance paramagnétique électronique

SAXS : Diffusion des rayons X aux petits angles (Small Angle X-rays Scattering)

S_{CD} : Paramètre d'ordre de la liaison S_{CD}

T/L : Rapport molaire tannin/lipide

TF : Transformée de Fourier

T_h : Température de transition de phase lamellaire (L_α) / hexagonale (H_{II})

T_m : Température de transition de phase gel/fluide

t_m : Temps de mélange

TMSP : Sodium-3-trimethylsilyl-2,2,3,3-d₄-propionate

Tris : Trishydroxyméthylaminométhane ou 2-amino-2-hydroxyméthyl-1,3-propanediol

Tris-d₁₁ : Tris deutéré

Production scientifiques et techniques

Ce travail a fait l'objet d'une publication, de deux communications orales et de trois communications écrites :

❖ Publication :

1/ Red wine tannins fluidify and precipitate lipid liposomes and bicelles. A role for lipids of wine tasting. **A.L. Furlan**, A.Castets, I.Pianet, A.Grélard, E.J.Dufourc, J.Géan, *Langmuir* (2013), submitted.

❖ Communications orales

1/ XV^e congrès du Groupe d'Etude des Membranes (GEM), Paris, France (2 au 4 avril 2012). **A.L. Furlan**, A. Castets, A. Grélard, I. Pianet, E.J. Dufourc and J. Géan.
Tannin effects on models of lipid droplets and buccal lipid membranes: a solid-state NMR study.

2/ 2nd EBSA Biophysics Course, Bordeaux-Lacanau, France (24-29 juin 2012)
A.L. Furlan, A. Castets, A. Grélard, I. Pianet, E.J. Dufourc and J. Géan.
Study of the tannin-lipid interaction by NMR: use of MLV of DMPC to mimic buccal membrane.

❖ Posters

1/ VIII^e congrès du GERLI (Groupe d'Etude et de Recherche en Lipodominique), Lyon, France, 26-28 octobre 2011.
A.L Furlan, A. Grélard¹, E.J. Dufourc and J. Géan.
Tannins and lipids, modification of sensory perception.ns induced by tannin red wine in the presence of buccal membrane lipids.

2/ XXVth ICMRBS (International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems), Lyon, France, 19-24 aout 2012.
A.L. Furlan, A. Castets, A. Grélard, I. Pianet, E.J. Dufourc and J. Géan.
Tannins and lipids, modification of sensory perceptions induced by tannin red wine in the presence of buccal membrane lipids.

3/ IX^e congrès du GERLI (Groupe d'Etude et de Recherche en Lipodominique), Paris, France, 17-19 octobre 2012.
A.L. Furlan, A. Castets, A. Grélard, I. Pianet, E.J. Dufourc and J. Géan.
Tannins and lipids, modification of sensory perceptions induced by tannin red wine in the presence of buccal membrane lipids.

CHAPITRE I

Introduction générale

I.A La dégustation d'un vin, notion d'astringence et d'amertume

Contrairement à l'eau, le vin n'est pas bu pour ses qualités désaltérantes ou nutritives mais plus pour le plaisir apporté par sa consommation. Ainsi, le vin n'est pas une substance essentielle à la vie mais davantage une gourmandise liquide que l'on ne boit pas mais que l'on déguste. La dégustation d'un vin en bouche se décompose en trois phases. (i) L'attaque (ou première impression), période correspondant aux trois-quatre secondes suivant le moment où une petite quantité de vin est mise en bouche. Le vin délivre alors ses premières sensations. L'attaque peut être agressive, rustique, élégante, ronde voire un peu molle selon les vins. Elle évalue principalement l'équilibre du vin. (ii) L'évolution, période où les différentes saveurs successives sont ressenties. C'est durant l'évolution que le dégustateur ressent notamment les effets tactiles. Cette phase permet de rendre compte de la structure du vin, sa « charpente ». (iii) La longueur, temps pendant lequel les arômes persistent en bouche après que le dégustateur ait avalé ou recraché le vin. La longueur est une qualité essentielle pour distinguer les grands vins.

La composition du vin est primordiale dans le goût qui sera ressenti. Le vin est composé essentiellement d'eau (80%) et d'éthanol (10 à 15%) mais c'est bien les 5% restant constitués de composés divers (acides, sels minéraux, sucres, tannins, vitamines, protéines, composés volatiles, etc...) à différentes proportions qui conditionnera l'identité d'un vin et sa spécificité (Taillandier & Bonnet, 2005). Dans les vins rouges, c'est la présence de tannins, des composés polyphénoliques, qui contribue grandement à la qualité du vin et à sa structure équilibrée (Blouin & Cruège, 2008). Ces molécules, dont une des propriétés phares est de se fixer aux protéines de la salive, sont la cause de deux sensations ressenties lors de la dégustation d'un vin : l'astringence et l'amertume.

I.A.1 L'amertume, une propriété gustative

L'amertume est un goût au sens strict car il résulte de l'interaction spécifique entre certaines molécules, tels les tannins, et des récepteurs localisés en bouche, au niveau des bourgeons du goût des papilles gustatives. Outre le goût amer, on distingue quatre autres goûts : le sucré, le salé, l'acide et l'umami (goût savoureux) (Ikeda, 2002). La perception de ces goûts permet d'évaluer les propriétés gustatives d'un aliment mais aussi de prévenir l'ingestion de molécules toxiques (Chandrashekar et al., 2006). Par exemple, le goût sucré permet l'identification d'un aliment riche en énergie alors qu'un goût acide ou amer peut alerter sur l'absorption d'un composé potentiellement toxique.

Les recherches effectuées lors de ces douze dernières années ont marqué un tournant dans la compréhension de la localisation du goût. En effet, il était communément admis que chaque goût était ressenti au niveau de différentes régions de la langue, le sucré sur le bout de la langue, l'amer à l'arrière et les saveurs acides et salées sur les côtés. Il en résultait la très célèbre mais néanmoins fausse carte des goûts. Or des travaux récents (Chandrashekar et al., 2006) montrèrent que les

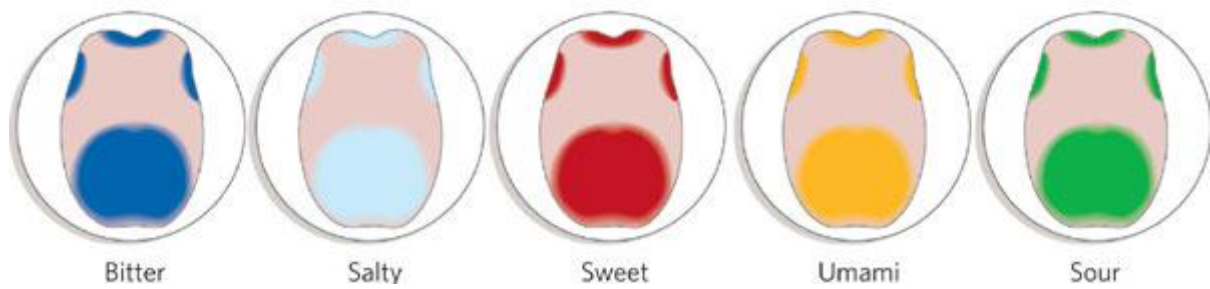


Figure 1.1 : Les cinq goûts, amer, salé, sucré, umami et acide sont répartis sur tous les bourgeons du goût, localisés sur toute la langue. D'après Chandrashekar et al., 2006.

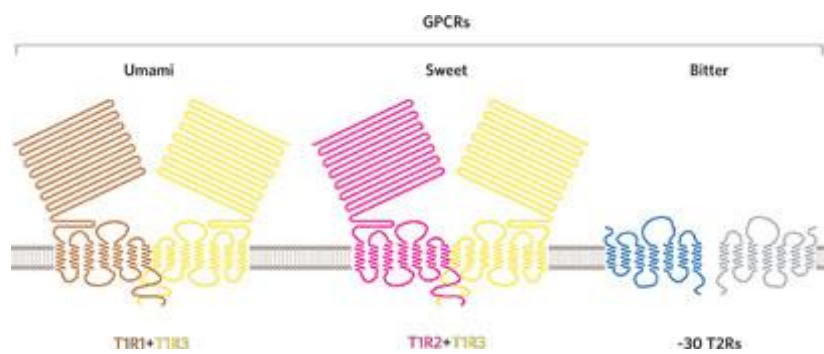


Figure 1.2 : Représentation schématique des récepteurs couplés aux protéines G intervenant dans la capacité à ressentir le sucré, l'amer et l'umami. D'après Chandrashekar et al., 2006.

récepteurs spécifiques à chaque goût étaient présents au niveau de tous les bourgeons du goût donc sur toute la langue (**figure I.1**).

Des études scientifiques ont permis de déterminer la famille de récepteurs impliquée dans la perception de l'amertume. Une perte de la capacité à reconnaître le goût amer a notamment été observé chez des souris dont la famille de récepteurs, T²R, a été préalablement inactivée (Mueller et al., 2005). Cette famille de récepteurs, comprenant 50 à 80 membres (Pandey et al., 2010), est donc à l'origine de la sensation d'amertume. Ces récepteurs de nature transmembranaire (**figure I-2**) sont principalement localisés au niveau des papilles foliaires et calciformes (Chandrashekar et al., 2000). Ils sont en outre couplés à une protéine G (Kinnamon & Margolskee, 1996 ; Lindemann, 1996 ; Matsunami et al., 2000).

Le mécanisme de la transduction du signal entraînant la perception de l'amertume a été grandement étudié dans la littérature (Kinnamon & Margolskee, 1996 ; Pandey et al., 2010) et est en grande partie connu. Les substances amères, comme certains tannins se lieraient aux récepteurs et activeraient la protéine G qui causerait l'activation de la phospholipase C. Il est proposé que l'hydrolyse par cette enzyme d'un phospholipide (phosphoinositol diphosphate PIP₂) génère deux messagers intracellulaires, de l'inositol triphosphate (IP₃) et du diacylglycérol, ce qui entraînerait l'ouverture du canal calcique, TRPM5. Dans ce mécanisme, la libération d'ions calcium Ca²⁺ dépolarise la cellule et entraîne la libération du neurotransmetteur et donc *in fine* la perception du goût. Toutefois, une éventuelle perturbation des récepteurs gustatifs que pourrait engendrer l'interaction entre les tannins et les membranes buccales dans lesquelles sont localisés ces récepteurs reste une voix peu explorée.

I.A.2 L'astringence, une sensation tactile

Contrairement à l'amertume, l'astringence est une sensation tactile (Breslin et al., 1993 ; Gawel., 1998) qui influe sur la qualité du vin (Boselli et al., 2004 ; Landon et al., 2008). Elle résulte de l'interaction entre les tannins et les protéines salivaires riches en proline (PRP) et en histidine (HRP), impliquées notamment dans la lubrification de la cavité buccale (Kallithraka et al., 1998). Ces interactions vont entraîner une diminution de la lubrification de la cavité orale et une augmentation des frottements entre les différents épithéliums buccaux (Luck et al., 1994 ; Baxter et al., 1997 ; Dinella et al., 2009 ; Rossetti et al., 2009). Il en résulte des sensations de plissement, de dureté et de dessèchement en bouche. Bien que sec ou encore rugueux soient les termes communément utilisés pour décrire un vin astringent (Lee & Lawless, 1991 ; Lawless et al., 1994), ils restent insuffisants pour décrire les subtiles nuances relatives à l'astringence. Ainsi, les œnologues établissent un vocabulaire riche et pertinent (Gawel et al., 2001) permettant de décrire toutes les sensations perçues lors de l'astringence. Les termes granuleux, poudreux ou encore crayeux sont ainsi utilisés pour

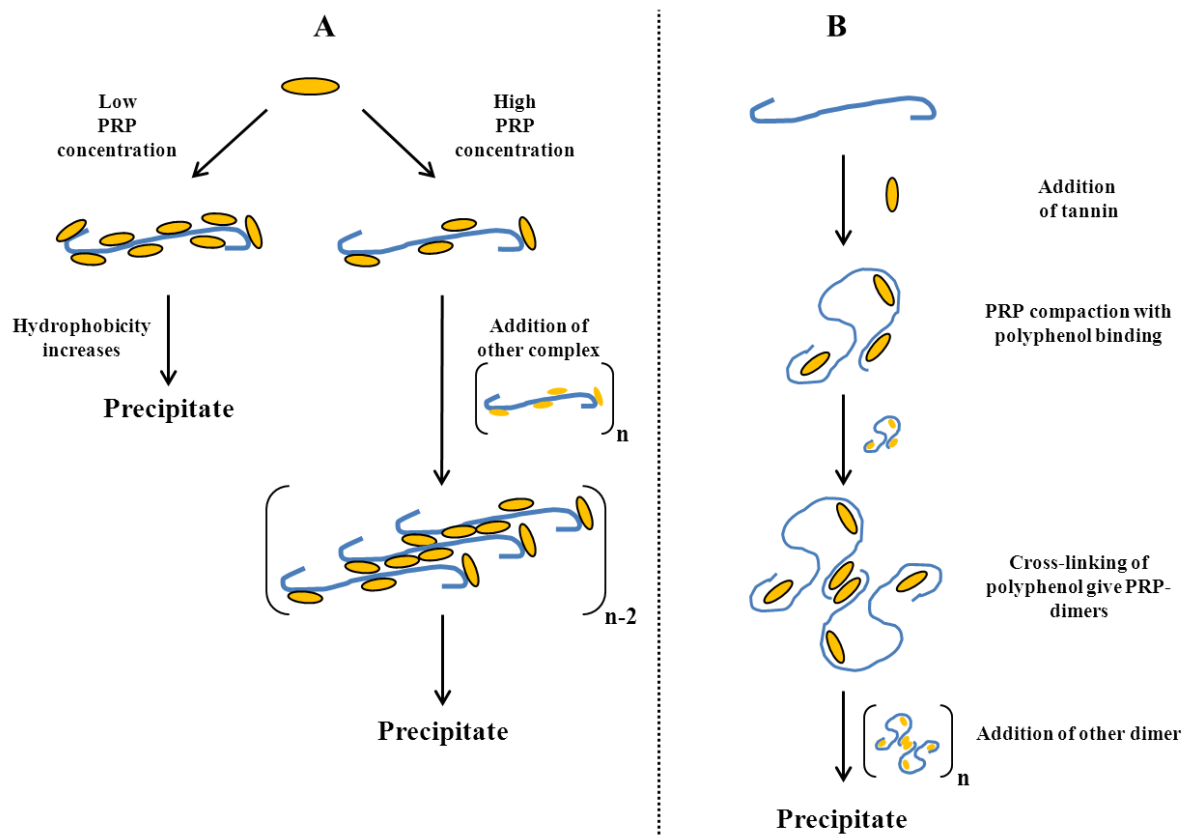


Figure 1.3 : Représentation schématique des principales étapes conduisant à la précipitation des protéines de la salive par interaction avec les tannins du vin qui donnera lieu à la sensation d’astringence. (A) Mécanismes selon Haslam et al., (1988). (B) Mécanisme selon Charlton et al., (2002).

décrire la sensation d'avoir de fines particules en bouche lors de la dégustation d'un vin. De même, des termes comme soyeux ou velouté se rapportent à la rugosité de la sensation perçue dans la bouche. Certains termes comme doux, souple, généreux ou charnu peuvent avoir une connotation positive alors que d'autres comme grossier ou dur renseignent sur les défauts du vin.

L'astringence est un processus complexe qui a été couramment étudié au cours de ces trente dernières années (McManus et al., 1981 ; Haslam, 1988 ; Charlton et al., 2002 ; Jobstl et al., 2004 ; Cala et al., 2010, 2011). Dans les années 80, Haslam proposa deux modèles pour expliquer ce phénomène à l'échelle moléculaire, selon la concentration en protéines dans le milieu (**figure I.3A**). A faible concentration, les tannins se lieraient aux protéines en surface et forment une couche moins hydrophile rendant les protéines insolubles, ce qui entraînerait la précipitation du système. A forte concentration, les tannins multidentates se lieraient à plusieurs protéines et formeraient des agrégats, ce qui provoquerait la précipitation. Cette tendance qu'ont les tannins à lier plusieurs molécules est reprise en 2002, par Charlton et al., qui proposèrent un autre mécanisme en trois étapes (**figure I.3B**). (i) Les tannins se lieraient à plusieurs sites de fixation au niveau la protéine, ce qui rendrait sa structure plus compacte. (ii) Le complexe tannin-protéine se lierait alors à un autre complexe pour former un dimère insoluble, les deux protéines étant liées par un « pont » formé par les tannins à l'aide de liaisons intermoléculaires faibles. (iii) Un certain nombre de ces dimères s'agrègeraient entre eux, ce qui favoriserait la précipitation. Enfin, un dernier modèle a été proposé par Cala et al. (2010) pour décrire l'interaction entre les tannins et les protéines salivaires riches en proline (PRP). (i) Les tannins en contact avec les protéines salivaires se fixerait de manière spécifique au niveau de leurs résidus proline pour former des complexes. (ii) Ces complexes seraient stabilisés par des interactions hydrophobes entre les cycles aromatiques des polyphénols entre eux d'une part et ceux des résidus proline d'autre part. (iii) Un réarrangement s'opérerait où les résidus proline s'enrouleraient autour des tannins donnant des sites de fixation différents. (iv) La formation de complexes contenant plusieurs protéines avec plusieurs tannins conduirait à la précipitation du système et donc à une diminution de la lubrification à l'origine de la sensation de sécheresse en bouche.

La nature de l'interaction entre les protéines salivaires et les tannins a longtemps fait débat au sein de la communauté scientifique. En effet, certaines études affirment que les liaisons hydrogène sont le moteur de l'interaction tannin-protéine (Hagerman & Butler., 1981 ; Simon et al., 2003) tandis que d'autres proposent que ce sont les interactions hydrophobes (empilement π - π , interactions de Van der Waals) qui sont à la base de la formation du complexe tannin-protéine (Ho et al., 1980 ; Murray et al., 1994 ; Baxter et al., 1997). En 1998, Hagerman et al. suggèrent que la polarité des tannins influence sur le type de liaison formée avec la protéine. Selon leurs travaux, les tannins polaires forment des liaisons hydrogène avec la protéine alors que l'interaction tannin apolaire-protéine implique principalement des interactions hydrophobes. Des études plus récentes (Cala et al., 2011) ont toutefois montré que le type de liaison mise en jeu dépend de l'état d'agrégation du tannin. Ainsi, sous forme

monomérique, le tannin se lie à la protéine par le biais de liaison hydrogène. A l'inverse, sous forme micellaire, ce sont les interactions hydrophobes qui prédominent entre micelles de tannins et protéines.

Les avancées scientifiques ont ainsi permis de comprendre le mécanisme principal donnant lieu à la sensation d'astringence. Toutefois, celle-ci est une sensation très complexe et il serait erroné de réduire l'astringence à une simple précipitation des protéines sous l'effet des tannins. Schwarz & Hoffman (2008) montrèrent notamment l'importance des tannins libres dans ce processus où ils agiraient comme des stimuli qui augmenteraient la perception de l'astringence.

I.A.3 Paramètres influant sur l'amertume et l'astringence

Il est intéressant de noter que la sensation d'amertume engendrée par les tannins dépend de plusieurs facteurs, comme le poids moléculaire du tannin, son degré de polymérisation, sa stéréochimie (Kallithraka et al., 1997 ; Thorngate & Noble, 1995). Ainsi, l'amertume ressentie sera importante pour des flavonoïdes monomériques tels que la catéchine ou l'épicatéchine mais sera faible pour les tannins du vin dont la masse molaire dépasse 500g/mol (Noble, 1994 ; Peleg et al., 1999 ; Drownoski & Gomez-Carneros, 2000). De même, le milieu joue un rôle sur l'amertume ressentie. Ainsi, un milieu riche en éthanol va augmenter l'amertume ressentie, alors qu'à l'inverse, la présence de sucre tend à la diminuer (Noble, 1994, 1998).

De même, l'astringence perçue en bouche peut varier avec la structure du tannin (Arnold et al., 1980 ; Kawamoto et al., 1995 ; Baxter et al., 1997 ; Kallithraka et al., 1997), la longueur des protéines (Hagerman & Butler, 1981 ; Charlton et al., 1996), les paramètres physicochimiques extérieurs tels que le pH, la température ou la force ionique (Kawamoto & Nakatsubo, 1997 ; Charlton et al., 2002), la présence de molécules externes au complexe tannin-protéine mais présentes en bouche lors de la dégustation d'un vin comme les sucres (Carvalho et al., 2006), l'éthanol (Fontoin et al., 2008) ou les lipides (He et al., 2006). Il est à noter que l'âge d'un vin influe aussi sur l'intensité de l'astringence ressentie, un vin âgé étant généralement moins astringent qu'un vin jeune (McRae & Kennedy, 2011).

Ainsi, l'amertume et l'astringence restent des sensations très complexes, leurs intensités perçues en bouche dépendant de nombreux paramètres. Au cours de cette thèse et afin d'aller plus loin dans la compréhension du goût d'un vin, nous nous sommes intéressés aux interactions entre les tannins et une autre classe de composés présents en quantité importante lors de la dégustation d'un vin, les lipides. Un état des lieux des connaissances sur ces différents acteurs et leurs interactions est dressé ci-après.

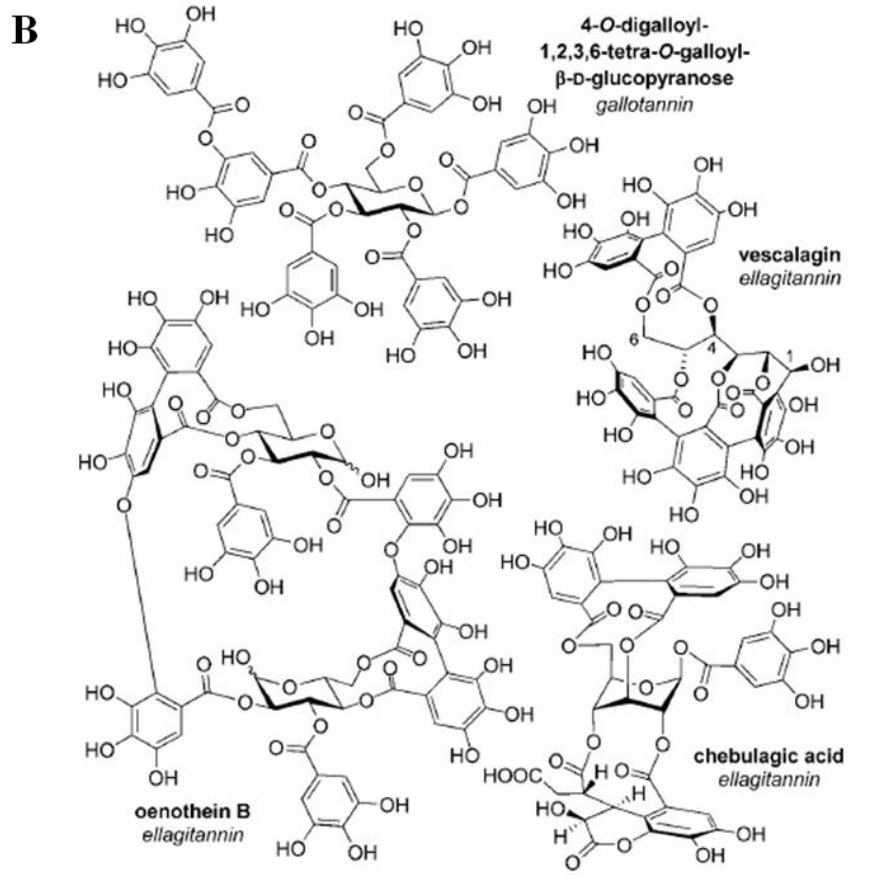
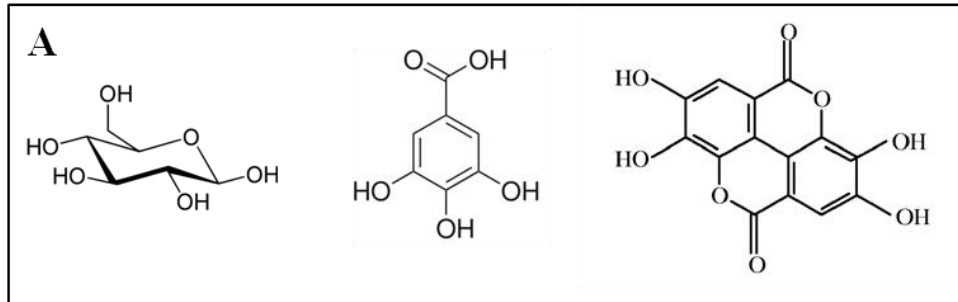


Figure 1.4 : (A) Structure des unités de base constituant les gallotannins et ellagitannins. De gauche à droite sont représentés, le β -1,2,3,4,6-pentagalloyl-D-glucose, l'acide gallique et l'acide ellagique. (B) Exemple de gallo et d'ellagitannins (l'image est extraite de Quideau et al., 2011).

I.B Les tannins

I.B.1 Définition et localisation

Le terme tannin a été utilisé pour la première fois par Seguin en 1796 pour caractériser les substances issues des plantes qui, en réagissant avec les protéines de la peau des animaux, empêchent sa putréfaction et la transforme en cuir. En 1957, White reprend ce terme pour décrire les composés polyphénoliques impliqués dans certaines réactions comme la précipitation de la gélatine ou l'oxydation de celle-ci par le permanganate (White, 1957). La première définition pour ce terme a été donnée en 1962 par Swain et Bate-Smith qui décrivent les tannins comme étant des composés solubles dans l'eau, dont la masse molaire est comprise entre 500 et 3000g/mol et qui sont capables de précipiter les alcaloïdes, la gélatine et d'autres protéines. Les tannins sont des polyphénols amphiphiles organisés principalement en deux classes suivant la nature chimique du polyphénol de base : les tannins hydrolysables et les tannins condensés.

Les tannins hydrolysables et les tannins condensés sont présents dans le vin mais ont une provenance différente. En effet, les tannins condensés proviennent des grains de raisin, pépins et pellicules, tandis que les tannins hydrolysables sont apportés par le bois des fûts lors de l'élevage ou ajoutés dans le vin lors de la vinification (tannins commerciaux). Ainsi, les tannins condensés sont majoritaires dans le vin comparés aux tannins hydrolysables (Singleton et Noble, 1976) avec des concentrations allant 1 à 5g/L dans certains vins. La catéchine et l'épicatéchine, deux molécules de base très répandues dans les tannins condensés sont retrouvées à des concentrations respectives de 0.1-0.2g/L et 0.08g/L (Quideau et al., 2011). A titre de comparaison, deux des tannins hydrolysables les plus abondants retrouvés dans le vin, la vescalagine et la castalagine, ont des concentrations respectives de 0.002-0.02g/L et 0.001-0.1g/L (Jourdes et al., 2011).

Les tannins condensés ne sont pas uniformément présents dans toute la structure du grain de raisin. On les retrouve dans la pellicule et les pépins (Thorngate et Singleton, 1994) mais ils ne sont pas présents dans la pulpe (Ricardo da Silva et al., 1992). De même, le type de tannins diffère suivant qu'ils sont localisés au niveau de la pellicule ou des pépins (Gawel, 1998) ; la peau présente un plus haut taux de tannins polymériques que les pépins alors qu'à l'inverse il y a plus de tannins galloylés, c'est-à-dire estérifiés par l'acide gallique (**figure I.4A**), dans les pépins (29%) que dans la pellicule (3%).

I.B.2 Les tannins possèdent une grande variété structurale

Nous avons donc vu que les tannins ont des structures très différentes selon leurs origines. La structure des deux catégories de tannins, hydrolysables et condensés, est décrite ci-après.

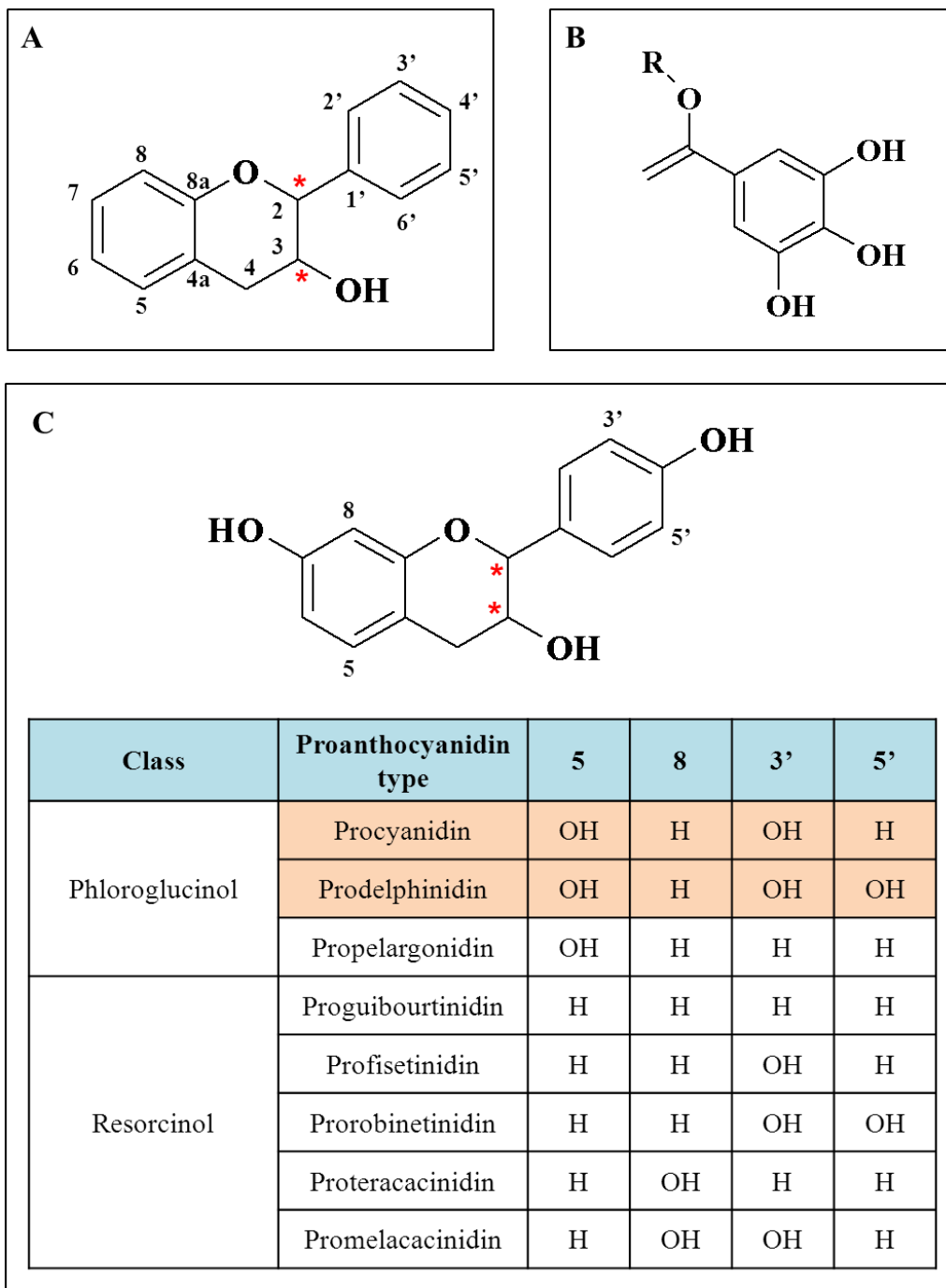


Figure 1.5: (A) Structure du squelette flavan-3-ol et numérotation utilisée pour les monomères de proanthocyanidines (nomenclature IUPAC). (B) Structure du groupement galloyle (C) Les différentes classes de proanthocyanidines présentant un squelette de type flavan-3-ol selon Hemingway & Karchesy (1989). Les centres chiraux sont représentés par le symbole *.

I.B.2.a Les tannins hydrolysables

La structure de base de tout tannin hydrolysable est le noyau β -1,2,3,4,6-pentagalloyl-D-glucose (Haslam et al., 1989). Ce sucre est ensuite estérifié au niveau de ses groupements hydroxyles soit par l'acide gallique, soit par l'acide ellagique, ceci donnant respectivement les gallo-tannins et les ellagi-tannins (**figure I.4A et I.4B**). Ces tannins influent peu sur le goût d'un vin (Pocock et al., 1994). Par conséquent, ils n'ont pas été étudiés au cours de cette thèse.

I.B.2.b Les tannins condensés

Les tannins condensés (ou proanthocyanidines) sont une sous-classe des flavonoïdes, terme regroupant la plupart des composés phénoliques dont le squelette, constitué de 15 carbones, est organisé en $C_6-C_3-C_6$. Ces tannins possèdent un squelette de type flavan-3-ol (**figure I.5A**) mais présentant des fonctions hydroxyles au niveau des positions 4' et 7. Ces tannins sont des composés tricycliques constitués de deux cycles aromatiques et d'un cycle central. Le cycle central (cycle C) est appelé cycle pyrane et possède deux centres chiraux en position 2 et 3. Dans le cas des tannins présents dans le vin, la stéréochimie du premier centre chiral est toujours de type R alors que celle du second peut être de type R ou de type S (Thorngate, 1993). Ces deux positions sont substituées respectivement par un cycle phénolique (cycle B) et un groupement hydroxyle ou galloyle dans le cas des tannins galloylés (**figure I.5B**). En outre, un cycle aromatique (cycle A) est accolé au cycle pyrane au niveau des positions 8a et 4a. La nature du substituant R en position 5 de ce cycle est à l'origine de la classification des proanthocyanidines en deux catégories (**figure I.5C**). Si $R = H$, les proanthocyanidines possèdent un cycle A de type résorcinol. Si $R = OH$, les proanthocyanidines possèdent un cycle A de type phloroglucinol. Les proanthocyanidines présentes dans le vin, les procyanidines et les prodéphinidines (Gawel, 1998), font partie de cette classe. Ces deux familles de tannins condensés se différencient suivant la nature du substituant R' en position 5'. Si $R' = H$, comme c'est par exemple le cas de la catéchine et de l'épicatéchine, on parle de procyanidine, le cycle B est dans ce cas appelé cycle catéchol. A l'inverse, si $R' = OH$ comme pour l'épigallocatechine (EGC), on parle de prodéphinidine et le cycle B se nomme cycle pyrogalloyle. Ainsi, les tannins condensés présentent une grande diversité structurale.

La polymérisation des différentes unités monomériques va encore multiplier la variété de proanthocyanidines que l'on peut retrouver dans le vin. Le taux de polymérisation peut être influencé par l'âge du vin. Ainsi, dans le cas des vins jeunes, les tannins possèdent en moyenne deux à trois unités de flavan-3-ols alors que la polymérisation atteint la dizaine d'unités dans les vins vieux (Blouin., 2008). La formation d'un dimère de tannins est complexe car ceux-ci peuvent se lier entre eux par plusieurs types de liaisons interflavane (**figure I.6**). On distingue ainsi deux types de dimères. Les dimères de types B, majoritaires dans le vin, présentent une seule liaison interflavane de type C_4-C_6 ou C_4-C_8 . A l'inverse, les dimères de type A, peu présents dans le vin, possèdent deux liaisons

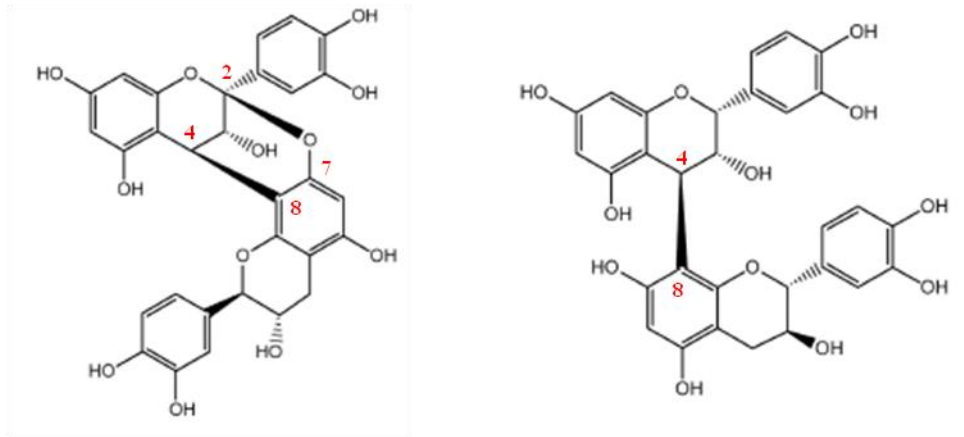


Figure I.6 : Procyanidines A₂ et B₁, deux exemples de dimères respectivement de type A et B.



Figure I.7 : Influence de la conformation du tannin sur la précipitation des protéines salivaires (d'après les travaux de Cala et al., 2011). **(A)** Dans le cas d'une conformation ouverte, le tannin peut se lier à deux protéines et induire une précipitation. **(B)** Dans le cas d'une conformation compacte, le tannin se lie à une seule protéine et n'induit pas de précipitation.

interflavanes, une de type C₄-C₆ ou C₄-C₈ et une autre, de type éther, entre le carbone 2 et les carbones 5 ou 7. Il est à noter, que lorsqu'il est impliqué dans une liaison interflavane, le carbone en position 4 devient chiral et les positions 3 et 4 sont toujours en position trans.

Dans le cas de deux unités liées entre elles par une unique liaison interflavane de type C₄-C₈, la rotation de celle-ci peut engendrer deux rotamères présentant deux conformations, compacte ou étendue (Foo & Porter, 1983). La proportion entre ces deux formes majoritaires dépend de la nature des substituants, de la nature du milieu (Hatano & Hemingway, 1997) et des unités monomériques mises en jeu (Tarascou et al., 2006). La conformation du tannin, compacte ou étendu, peut avoir une importance dans certains phénomènes biologiques, notamment dans la précipitation des protéines (Cala et al., 2011). En effet, lorsqu'il adopte une conformation ouverte (B₂, C₂ par exemple), les tannins peuvent se lier à deux protéines et initier la précipitation du complexe tannin-protéine (**figure I.7A**). A l'inverse, les tannins présentant une conformation compacte (B₁, B₃, B₄...) ne peuvent se lier qu'à une seule protéine et ne peuvent pas déclencher cette précipitation (**figure I.7B**).

I.B.3 Propriétés physicochimiques : auto-association des tannins

Les tannins ont la propriété de s'associer entre eux au-delà d'une certaine concentration, appelée concentration micellaire critique, ou CMC. Cette auto-association résulte d'interactions de type π -stacking entre les différents cycles aromatiques. Ce comportement a été décrit initialement par Baxter sur le tannin méthyl gallate (Baxter et al., 1996) selon le modèle isodesmique où l'association des tannins entre eux se fait de manière linéaire et indéfinie avec la même constante d'auto-association, K_a (**annexe 1**). En deçà de la CMC, les tannins sont à l'état monomérique et au-dessus de la CMC, ils se trouvent sous forme d'agrégats micellaires. La valeur de cette CMC dépend de l'état oligomérique du tannin (Pianet et al., 2008). Ainsi, la CMC du dimère est plus importante que celle du monomère correspondant (24±4mM pour le dimère B₃ catéchine-catéchine vs. 9±2mM pour la catéchine dans un milieu 100% D₂O). La valeur de la CMC dépend en outre du solvant. Ainsi, elle est plus importante dans un milieu D₂O + EtOD (88/12) que dans un milieu 100% D₂O (16±1mM vs. 9±2mM pour la catéchine). Durant cette thèse, les études seront principalement effectuées sur quatre monomères, C, EC, EGCG et ECG, qui ont respectivement des CMC de 9±2mM, inférieure à 5mM, 6±2mM et 2.8±0.3mM dans un milieu 100% D₂O.

Les tannins étant présents à l'état monomérique dans le vin (340-680µM pour la catéchine, Quideau et al., 2011), il est nécessaire de prendre en compte cette CMC si on veut rester dans les conditions de la dégustation. Par ailleurs, il est à noter que les polyphénols utilisés au cours de cette étude sont principalement des unités monomériques de tannins condensés retrouvés dans le vin (C, EC, EGCG, ECG) mais ne sont pas des tannins au sens strict de la définition de Bate-Smith et Swain, leurs masses molaires étant inférieures à 500g/mol. Ils seront toutefois appelés tannins au cours de cette thèse pour simplifier.

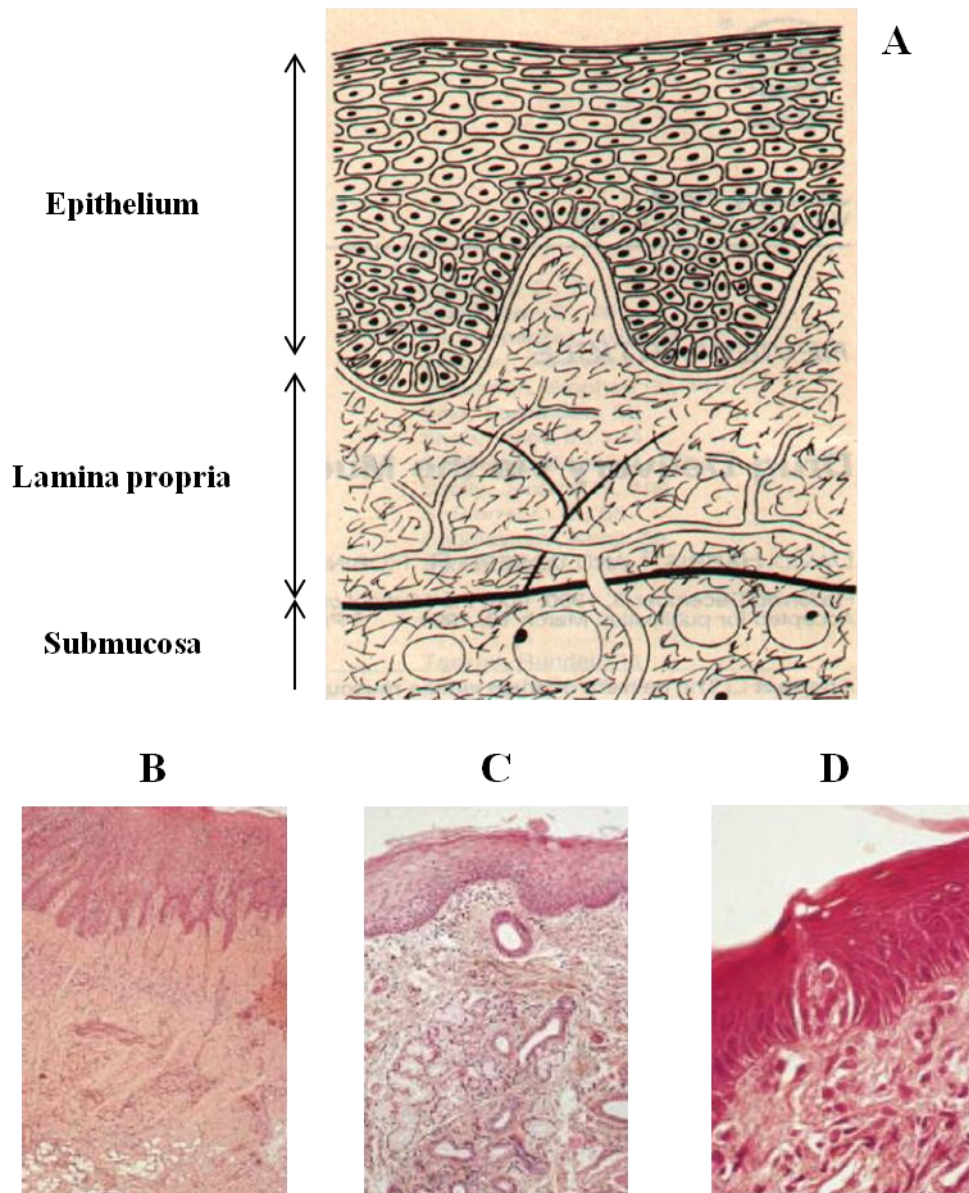


Figure 1.8 : (A) Schéma de la structure des membranes buccales (d'après Harris & Robinson, 1992). Coupes des muqueuses masticatrices (B), bordantes (C) et spécialisées (D). Les épithéliums sont localisés en haut de chaque coupe (d'après Auriol & Le Charpentier, 1998).

I.C Lipides impliqués dans le goût du vin : lipides des membranes buccales et lipides alimentaires

En bouche, les tannins peuvent interagir avec les lipides endogènes présents au niveau des membranes cellulaires de l'épithélium buccal et les lipides exogènes apportés par l'alimentation. Ceux-ci font partie d'assemblages moléculaires complexes. Pour étudier les interactions tannin-lipide à l'échelle moléculaire, il a été nécessaire d'utiliser des modèles lipidiques mimant les propriétés de ces assemblages lipidiques afin de faciliter l'analyse. Dans une première partie, nous décrirons les assemblages supramoléculaires susceptibles d'interagir avec les tannins, à savoir les membranes buccales ainsi que les gouttelettes lipidiques, forme sous laquelle les lipides se trouvent dans les aliments. Dans une seconde partie, nous décrirons les principaux modèles lipidiques utilisés pour mimer membranes et gouttelettes.

I.C.1 Les membranes buccales

I.C.1.a Description générale

On définit sous le terme de membranes buccales (ou muqueuses buccales) l'ensemble des tissus tapissant l'intérieur de la bouche (langue comprise). La couche supérieure de ces membranes, l'épithélium, est un assemblage de cellules aplaties organisées en différentes couches ; on parle dans ce cas d'épithélium stratifié pavimenteux (**figure I.8A**).

Ces muqueuses peuvent être classées en trois catégories en fonction de leur topographie (Ganem-Quintanar et al., 1997). (i) Les muqueuses masticatrices (**figure I.8B**) représentent 60% des tissus totaux et recouvrent les gencives et le palais dur et ont une épaisseur de 100 à 200 μ m (Shojaei, 1998). Elles possèdent un épithélium kératinisé et aide à la compression mécanique des aliments. Elles ont, en outre, une faible perméabilité (Squier et al., 1991). (ii) Les muqueuses bordantes (**figure I.8C**) représentent 25% des tissus totaux et revêtent le versant muqueux des lèvres, l'intérieur des joues, le plancher buccal, la face ventrale de la langue et le palais mou. L'épaisseur de ces muqueuses varie suivant le type de tissus, allant de 100-200 μ m pour le palais mou à 500-800 μ m pour l'intérieur des joues (Harris & Robinson., 1992). Elles possèdent un épithélium non kératinisé ce qui augmente leur perméabilité et en fait une cible de choix pour l'administration de molécules thérapeutiques, notamment dans le cas des muqueuses sublinguales (Shojaei., 1998). (iii) Les muqueuses spécialisées (**figure I.8D**) représentent 15% des tissus totaux et sont localisées sur la face dorsale de la langue. Elles possèdent des régions kératinisées et non kératinisées et se caractérisent surtout par la présence de papilles (surlévations de la muqueuse linguale) parmi lesquelles se trouvent les papilles gustatives.

Ils existent trois types de papilles linguales (Auriol & Le Charpentier, 1998). Les papilles filiformes sont les plus nombreuses et les plus variées. Elles sont localisées sur les deux tiers antérieurs de la face dorsale et confèrent au dos de la langue son aspect râpeux. Malgré leur nombre,

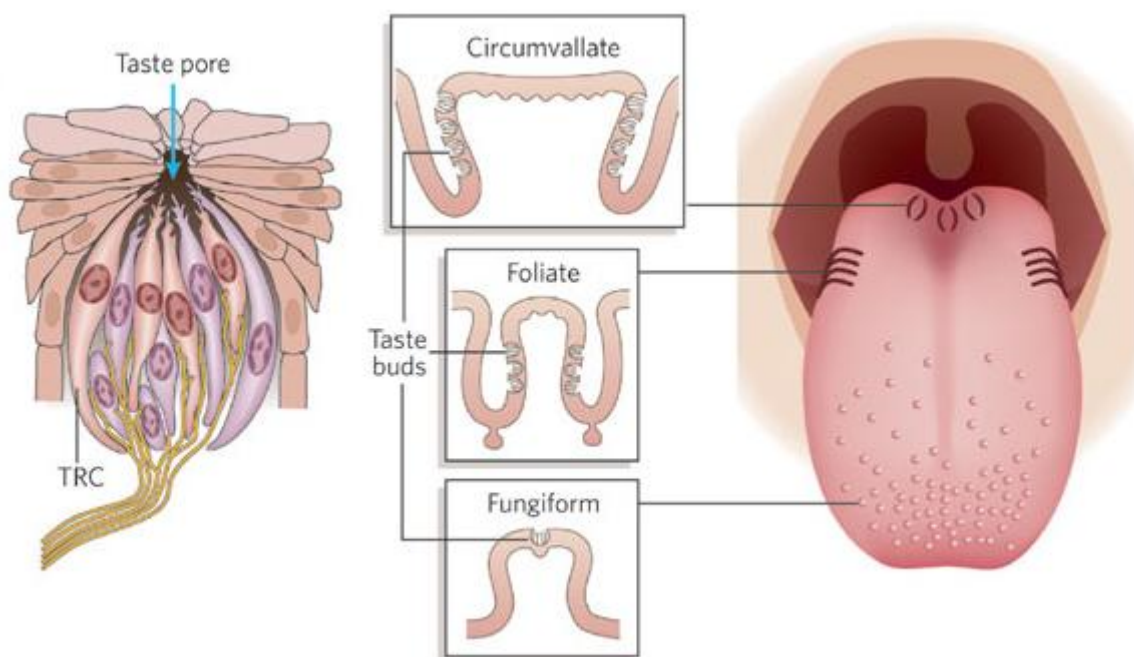


Figure 1.9 : (A) Schématisation d'un bourgeon du goût, constituée de 50 à 150 cellules réceptrices du goût et localisation des bourgeons et des papilles gustatives au niveau de la langue. D'après Chandrashekar et al., 2006.

ces papilles ne jouent aucun rôle dans la reconnaissance du goût. Les papilles fongiformes, légèrement kératinisées, sont localisées sur les bords de la langue. Celles-ci sont plus larges que les papilles filiformes mais moins nombreuses. Enfin, les papilles caliciformes, non kératinisées, sont les plus volumineuses mais les moins nombreuses sur la langue. Il en existe en effet qu'une dizaine qui sont disposées en V à l'arrière de la langue. C'est dans ces deux derniers types de papilles (caliciformes et fongiformes) que sont localisées les bourgeons du goût. Ils sont constitués d'un assemblage de 50 à 150 cellules (Beider, 1978) en forme d'oignon localisées sous la surface de la couche épidermique de la papille. De ce fait, ils sont sensibles à la saveur du contenu de la bouche par l'intermédiaire d'étroits et courts pores gustatifs (**figure I.9**). Les bourgeons du goût contiennent des cellules réceptrices non nerveuses (de 30 à 80) qui envoient les signaux correspondant aux différents goûts au système nerveux central *via* des terminaisons nerveuses. Il est à noter qu'on les retrouve aussi au niveau du palais mou et de la partie supérieure de l'œsophage mais en quantité bien moins importante que sur la langue.

I.C.1.b Fonction

Les membranes buccales ont des rôles multiples (Auriol & Le Charpentier, 1998). Elles assurent notamment dans le cas des membranes masticatrices, un rôle de protection contre les compressions et abrasions provoquées par les forces mécaniques mises en jeu dans la préhension et le mâchage des aliments. Elles possèdent aussi une fonction sensorielle (douleur, goût, température) assurée par de nombreux récepteurs qui nous permettent de ressentir la douleur, le goût et la température des aliments. Elles possèdent enfin une fonction de régulation thermique qui reste secondaire chez l'homme (contrairement au cas de l'animal).

I.C.1.c Composition lipidique

Les compositions lipidiques des membranes buccales varient en fonction des tissus considérés. Par exemple, les gencives et le palais dur ont un fort taux de céramides contrairement au plancher buccal (Ganem-Quintanar et al., 1997). Les muqueuses spécialisées, où sont situées la majorité des papilles gustatives, possèdent des régions kératinisées et non kératinisées et présentent ainsi une diversité tissulaire qui entraîne des différences de compositions lipidiques suivant les tissus. Aucune donnée n'ayant pu être obtenue sur la composition lipidique moyenne des muqueuses spécialisées, les muqueuses bordantes, qui possèdent aussi des papilles gustatives mais en quantité moins importantes, ont été choisies comme modèle pour décrire la composition lipidique des membranes buccales. Leur composition a été obtenue en recoupant les informations recueillies dans la littérature (Law et al., 1995, Squier et al., 1991, Diaz-del Consuelo et al., 2005, Thompson et al., 2001). Comme le montre la **figure I.10A**, cet épithélium est principalement composé de phospholipides de type phosphatidyléthanolamines (PE) et phosphatidylcholines (PC) (respectivement 15 et 14%), de cholestérol (17.6%), de glucosylcéramides (12.7%) et de sphingomyéline (10%).

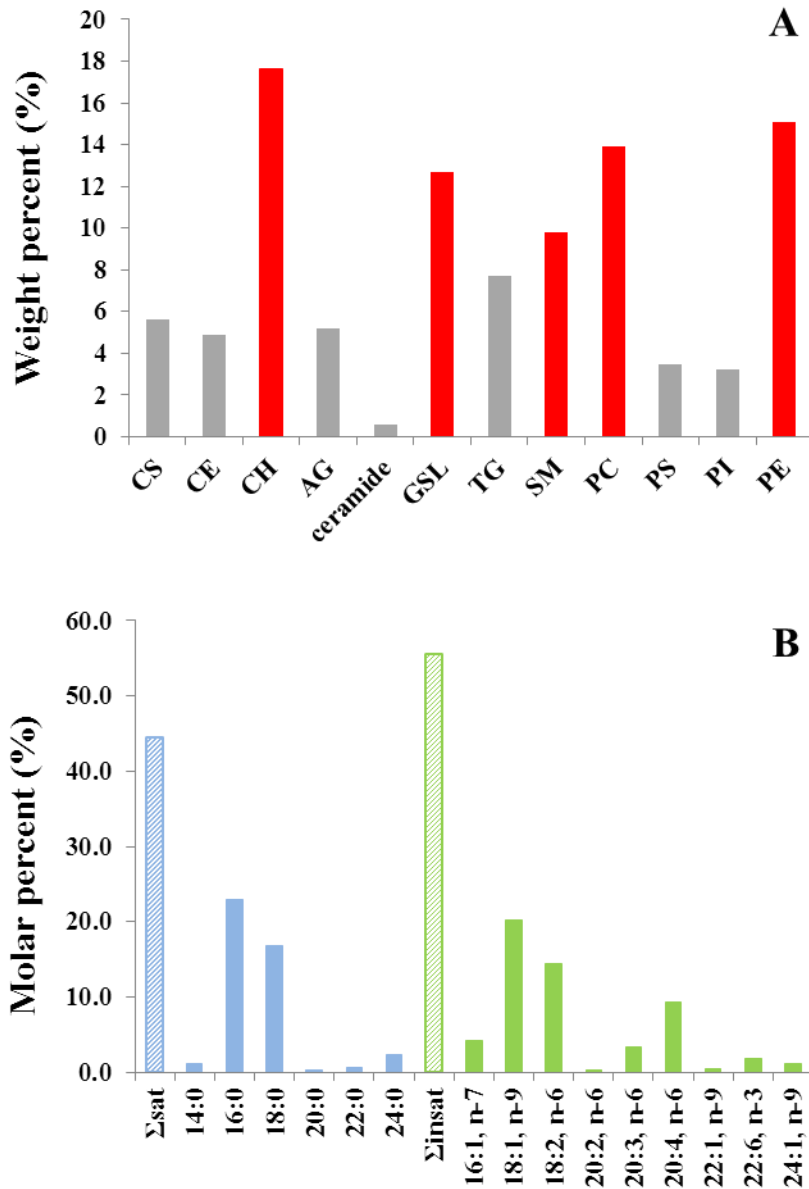


Figure 1.10 : Composition lipidique de l'épithélium buccal en fonction de la nature des lipides (% massique par rapport à la masse de lipides totale) (A) et des longueurs des chaînes acyles (% molaire) (B). CS : sulfate de cholestérol ; CE : esters de cholestérol ; CH : cholestérol ; AG : acides gras ; GSL : Glucosylcéramides ; TG : Triglycérides ; SM : Sphingomyéline ; PC : phosphatidylcholines ; PS : phosphatidylsérines ; PI : phosphatidylinositols ; PE : phosphatidyléthanolamines. Les classes de lipides prédominantes sont indiquées en rouge.

Concernant la nature des acides gras composant les lipides, la composition des membranes buccales n'est pas spécifique par comparaison aux autres membranes cellulaires (**figure I.10B**). Les acides gras majoritaires sont les mêmes que ceux retrouvés chez les lipides de l'épiderme (Terashi et al., 1999) et des globules rouges (Peet et al., 1998), à savoir : l'acide palmitique (C16:0, 23%), l'acide oléique (C18:1, 20.3%), l'acide stéarique (C18:0, 16.9%), l'acide linoléique (C18:2, 14.5%) et enfin l'acide arachidonique (C20:4, 9.3%) (Terashi et al., 1999 ; Connor et al., 2000 ; Yoshida et al., 2008). On peut remarquer que les lipides insaturés sont légèrement prédominants par rapport aux lipides saturés (55.5% contre 44.5%).

I.C.2. Les lipides issus de l'alimentation

Les lipides sont présents dans toutes les matières premières animales (viande, poisson, lait, œuf) et végétales (grains de céréales, graines d'oléagineux, fruits et légumes oléagineux). Ingérés au cours des repas, ils devraient représenter 35 à 40% de l'apport énergétique total et en moyenne 20% en masse de l'ensemble des macronutriments (protéines, glucides, lipides) consommés quotidiennement (chiffre AFSSA, 2010). Les lipides issus de l'alimentation vont participer à la structure des aliments et à leurs qualités sensorielles. Les lipides, lorsqu'ils sont consommés par l'organisme, sont sous forme d'assemblages supramoléculaires présentant une grande diversité de structure. Dans les aliments, les lipides peuvent soit conserver leur organisation originelle, soit être modifiés par divers traitements (cuisson, préparation alimentaire) (Genot & Michalski, 2010).

Dans le cas où les aliments ne subissent pas de traitement préalable, les lipides sont organisés selon leur structure supramoléculaire native. C'est le cas des globules gras du lait, des adipocytes (tissus adipeux) dans le cas de la viande ou du poisson ou encore des oléosomes (structure intracellulaire de stockage des lipides) dans le cas de graines oléagineuses. Dans les aliments transformés, les lipides sont soit sous forme d'une phase lipidique continue contenant éventuellement des particules solides (cas du chocolat en tablette) ou des gouttelettes d'eau (comme les émulsions eau dans huile dans le cas du beurre), soit présents sous forme de gouttelettes lipidiques dispersées dans une phase aqueuse (émulsion huile dans eau dans la mayonnaise ou les sauces), soit dispersés dans une matrice solide sous forme d'inclusions de taille très variable (allant d'un dizaine de μm jusqu'au mm) comme dans le cas des fromages ou de la charcuterie, ou encore encapsulés dans une matrice solide faiblement hydratée constituée de protéines et polysaccharides (Genot & Michalski, 2010 ; Raynal-Ljutovac et al., 2011). Cette diversité structurelle des assemblages lipidiques supramoléculaires est amplifiée par leur diversité de taille. A titre d'exemple, celle-ci est de 500nm à 10 μm dans le cas des globules gras du lait, de 1 à 5 μm dans le cas des globules gras du fromage et de 200 à 500nm dans le cas des assemblages lipidiques des graines oléagineuses (Sikorski & Kolakowska, 2002). Cependant, la taille de ces assemblages lipidiques va diminuer sous l'effet de la mastication.

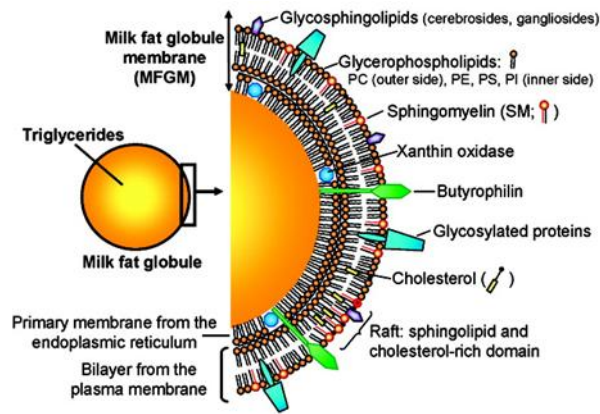


Figure I.11 : Exemple de structure adoptée par les lipides alimentaires : les globules gras du lait. D'après Lopez et al., 2008.

A l'échelle moléculaire, les lipides issus de l'alimentation sont principalement des triglycérides. On note toutefois la présence de phospholipides polaires (1 à 10% des lipides totaux dans l'alimentation), tels les phospholipides, glycolipides et sphingolipides cellulaires. Ceux-ci proviennent essentiellement des œufs, de la viande, du poisson ainsi que des lécithines de soja utilisées dans l'industrie agro-alimentaire pour leur propriété émulsifiante. Dans le cas de structures lipidiques présentant un fort taux de triglycérides, les lipides s'organisent sous la forme de gouttelettes composées d'un cœur hydrophobe de triglycérides et d'une surface hydrophile constituée des lipides polaires. Des lipides plus hydrophobes comme le cholestérol et des protéines peuvent aussi être présents à la surface des gouttelettes (**figure I.11**). En outre, les lipides polaires peuvent aussi former des petites micelles dans la phase aqueuse (Genot & Michalski, 2010).

Les acides gras majoritaires dans les aliments sont l'acide palmitique (C16:0) et l'acide oléique (C18:1). D'autres acides gras sont retrouvés en quantité importante que dans certains aliments, comme les acides gadoléique (C20:1) et érucique (C22:1) dans les poissons gras (harengs) ou encore l'acide stéarique (C18:0) dans le beurre de cacao ou la graisse de mouton (Raynal-Ljutovac et al., 2011). La proportion entre les acides gras saturés et insaturés diffère suivant les aliments. Par exemple, les acides gras saturés sont majoritaires dans le beurre (67% vs. 33%) alors qu'ils sont minoritaires dans le jaune d'œuf (38% vs. 62%). Cette composition en acides gras est importante car elle est le premier facteur conditionnant la qualité nutritionnelle des lipides alimentaires.

I.C.3. Polymorphisme lipidique et modèles membranaires

Les membranes biologiques et les gouttelettes lipidiques sont des systèmes complexes tant au niveau de leurs structures que de leurs compositions. Ainsi, afin de réaliser une analyse approfondie des propriétés et de la structure de ces objets, il est nécessaire d'utiliser des modèles simples pouvant être étudiés par des techniques spectroscopiques comme la RMN mais qui soient néanmoins représentatifs des systèmes lipidiques naturels. Dans cette partie, nous détaillerons le comportement et

l'organisation des lipides en phase aqueuse avant d'énumérer les principaux modèles lipidiques utilisés.

I.C.3.a Polymorphisme lipidique

En phase aqueuse, les lipides s'auto-assemblent pour des concentrations supérieures à la concentration micellaire critique (CMC, de l'ordre de 10^{-6} à 10^{-12} M). Néanmoins, contrairement aux tannins, les agrégats lipidiques formés s'organisent en phases structurées et compactes du fait des propriétés amphiphiles des lipides, telles que les répulsions entre la partie hydrophobe des lipides et l'eau soient minimisées (Cevc, 1993). Israelachvili et al. ont montré que la morphologie des phases lipidiques dépend des volumes respectifs des parties hydrophile et hydrophobe des lipides qui les constituent (Israelachvili et al., 1976, 1980) et est représentée par le paramètre de compactage p :

$$p = \frac{v}{a_0 l_c} \quad (\text{I.1})$$

où v , représente le volume de la partie hydrophobe, a_0 , le volume de la partie hydrophile et l_c , la longueur de la chaîne carbonée du lipide. Il est important de noter que le paramètre de compactage tient aussi compte de certains facteurs propres à chaque système lipidique, telles les charges éventuelles ou la présence de liaisons hydrogène (Cevc, 1993). Plusieurs types de phases sont obtenus en fonction de la valeur du paramètre de compactage (**figure I.12**) :

- pour $p < 1/3$, la tête hydrophile est plus grosse que la partie hydrophobe. Les lipides sont schématisés sous la forme d'un cône où la tête polaire est située à la base. Les lipides s'auto-assemblent dans ce cas sous la forme de micelles sphériques ou cylindriques. C'est le cas du lipide à chaîne courte, DCPC.
- pour $1/3 < p < 1/2$, le volume de la partie hydrophobe augmente légèrement. Les lipides s'inscrivent dans un cône tronqué et adoptent une phase hexagonale de type H_I , issue de l'association de micelles cylindriques. C'est le cas du digalactosyldiacylglycérol, DGDG.
- pour $1/2 < p < 1$, le sommet du cône représentant le lipide est plus évasé. Les lipides s'organisent en liposomes constitués de plusieurs bicouches, les MLV (Multilamellar Large Vesicles). Il est à noter que plus le paramètre de compactage augmente, plus le cône tend à devenir cylindrique ; la courbure devient plus faible et le rayon des liposomes plus important. La plupart des lipides biologiques, notamment les phosphatidylcholines (PC) et les phosphatidylglycérols (PG), adoptent ce type de phase. Elle est donc couramment rencontrée.
- pour $p \approx 1$, le lipide adopte une forme quasi-cylindrique. Le rayon de courbure tendant vers l'infini, la phase lipidique obtenue est un empilement de bicouches. Les phosphatidylsérines (PS) en présence de sels peuvent adopter ce type de phase.

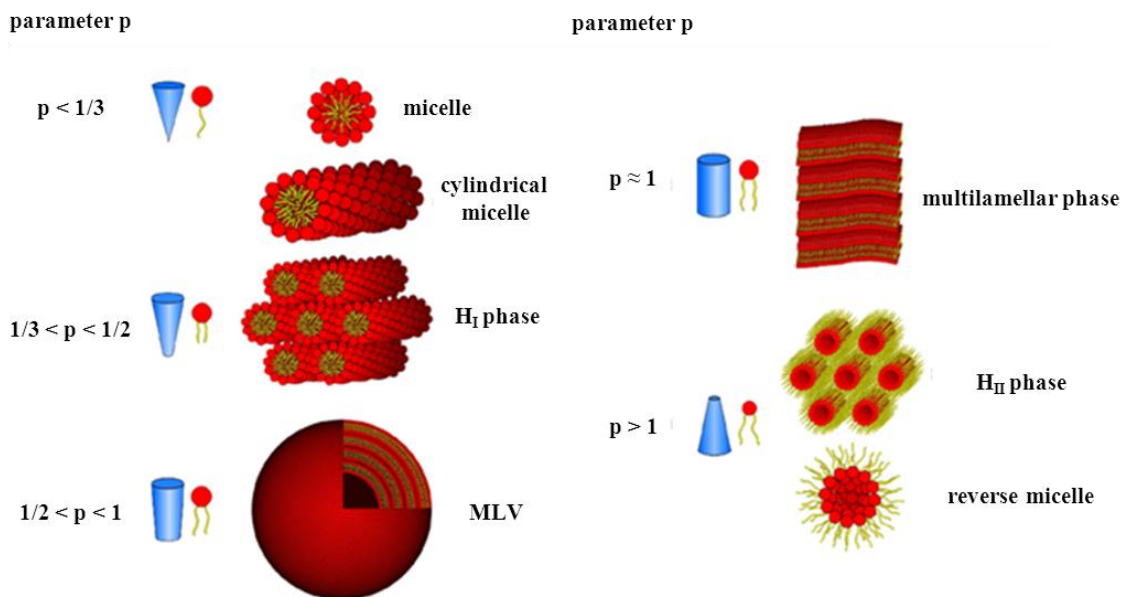


Figure 1.12 : Morphologie lipidique et phase formée en fonction du paramètre de compactage (image extraite de Buchoux, 2008)

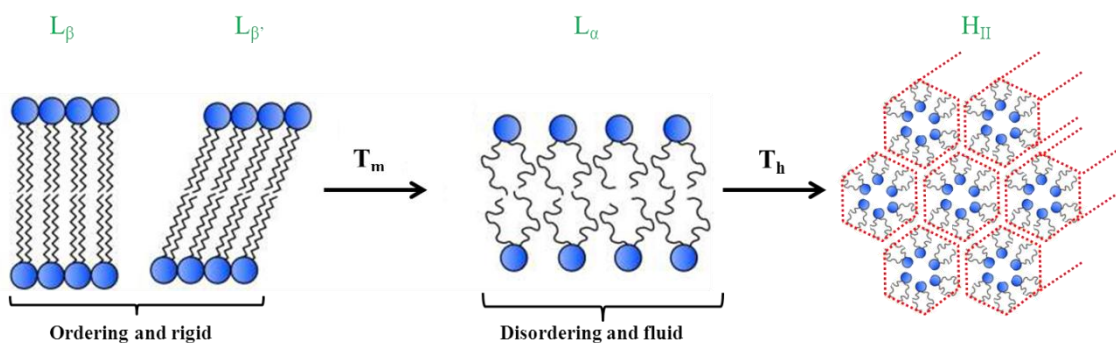


Figure 1.13 : Illustration de la transition de phase entre une phase lamellaire gel, L_{β} ou $L_{\beta'}$, et une phase lamellaire fluide, L_{α} à la température T_m et de la transition de phase entre une phase lamellaire fluide, L_{α} , et une phase hexagonale inverse, H_{II} à la température T_h .

- pour $p > 1$, la partie hydrophobe devient plus importante que la partie hydrophile. Les lipides adoptent une forme conique où cette fois la tête polaire est située au sommet. Une phase hexagonale inverse de type H_{II} est observée. Certains lipides adoptent naturellement ce type de phase, c'est notamment le cas des phosphoéthanolamines (PE).

Outre le paramètre de compactage, d'autres facteurs, comme la température ou la concentration lipidique, vont avoir une importance sur la nature de la phase observée. Il est à noter, que, pour un mélange de lipides présentant des morphologies différentes, un mélange de phases ou une nouvelle phase formée des différents lipides peut être observé. Par exemple, dans le cas d'un mélange de deux lipides adoptant respectivement une phase H_I et H_{II} , une phase lamellaire peut être obtenue par association des deux lipides entre eux.

I.C.3.b Effet de la température sur la nature de la phase adoptée

Dans le cas d'une phase lamellaire, les chaînes aliphatiques des lipides ne se structurent pas de la même manière à basse et à haute température (**figure I.13**). Cela se traduit par l'apparition d'une transition de phase qui correspond à un changement dans l'organisation et la mobilité des chaînes d'acides gras à l'intérieur de la bicouche. Ce changement organisationnel des chaînes va avoir une influence sur la dynamique du système lipidique mais aussi sur l'épaisseur de la bicouche.

A basse température, les chaînes adoptent la conformation la plus favorable dite « tout trans » où chaque liaison C-C est en conformation *trans*. De ce fait, les chaînes acyles sont alignées les unes par rapport aux autres et sont soumises à peu de mouvement, la bicouche est ainsi très rigide. On parle dans ce cas de phase lamellaire gel, L_{β} si les chaînes acyles sont parallèles au plan de la bicouche ou $L_{\beta'}$ si elles sont inclinées. A l'inverse, à haute température, plus de désordre est créé, ce qui entraîne l'apparition de défauts dit « gauche ». Il y a donc alternance entre les conformations « trans » et « gauche » au niveau des liaisons C-C. Les chaînes acyles adoptent ainsi une conformation dite « gauche-trans ». La bicouche est alors plus fluide et moins épaisse, les chaînes acyles n'étant plus étendues à leur maximum. On parle dans ce cas de phase lamellaire fluide, L_{α} .

La transition entre les phases lamellaire gel et fluide a lieu à partir d'une certaine température, notée T_m . Cette température dépend essentiellement de la longueur de la chaîne acyle et de la présence éventuelle d'une ou de plusieurs insaturations. Ainsi, la phase gel est d'autant plus stabilisée que les chaînes acyles sont longues ; T_m augmente donc avec la longueur des chaînes. A l'inverse, la présence d'une ou plusieurs insaturations va créer des défauts de compactage, ce qui va entraîner une diminution de T_m .

Une autre transition de phase induite par la température peut également être observée entre une phase lamellaire L_{α} et une phase hexagonale inverse H_{II} . En effet, à basse température, les lipides présentant une morphologie favorable à une phase hexagonale inverse ($p > 1$, comme vu plus haut) s'auto-assemblent en phase lamellaire L_{α} , la phase hexagonale H_{II} n'étant obtenue qu'à haute

température. La transition de phase entre ces deux morphologies a lieu à une certaine température, notée T_h (**figure I.13**). Comme pour la température de transition gel/fluide, la nature des chaînes acyles va avoir un impact sur la valeur de T_h . Ainsi, T_h diminue avec le nombre d'insaturations et la longueur des chaînes acyles. En effet, cela s'explique dans les deux cas par une augmentation du volume de la partie hydrophobe, ce qui favorise la morphologie de type H_{II} selon la théorie d'Israelachvili.

I.C.3.d Présentation des modèles lipidiques utilisés au cours de cette thèse

De nombreux modèles lipidiques membranaires, en passant des micelles aux extraits naturels de membranes, peuvent être utilisés afin de mimer les propriétés physico-chimiques et la structure des membranes biologiques. De même, les gouttelettes lipidiques que l'on retrouve en bouche lors de la consommation d'aliments peuvent être aussi mimées par bon nombre de modèles (émulsion eau dans huile, émulsion huile dans eau, bicelles). Nous présenterons ici les modèles utilisés pour mimer les membranes buccales et les gouttelettes lipidiques ingérées lors du repas (**figure I.14**).

Les vésicules multilamellaires (MLV) sont le modèle le plus couramment utilisé du fait de leur facilité de préparation (**figure I.14A**). Elles peuvent en outre être dopées facilement permettant d'obtenir une composition lipidique proche de celle de la membrane naturelle cible (Zhendre et al., 2011) et possèdent une structure en bicouche que l'on retrouve dans les membranes biologiques. Elles sont constituées d'un empilement de sphères concentriques de lipides organisés en bicouche (environ 4nm d'épaisseur dans le cas du DMPC) séparées par des couches d'eau (environ 6nm d'épaisseur). La taille des MLV est très variable, leur diamètre pouvant varier de 500 à 5000nm. Il est possible de former des liposomes unilamellaires, c'est-à-dire constituées d'une seule bicouche à partir de MLV soit par sonication (utilisation d'un bain ou sonde à ultrason) soit par extrusion (**cf. chapitre II**). Suivant la taille de l'objet obtenu, on parlera de SUV (Small Unilamellar Vesicles) pour des objets dont le diamètre est de l'ordre de la dizaine de nanomètres ou de LUV (Large Unilamellar Vesicles) pour des objets dont le diamètre est de l'ordre de quelques centaines de nanomètres.

Les bicelles isotropes (**figure I.14B**) sont des objets discoïdaux d'environ 10-15nm de diamètre qui sont constitués de deux phospholipides, l'un à chaîne courte, favorisant la courbure, l'autre à chaîne longue, situé principalement dans la partie plane du modèle membranaire (Arnold et al., 2002). Ces objets sont caractérisés par un taux d'hydratation ($H(\%) = \frac{m_{H_2O}}{m_{H_2O} + m_{lipide}}$) important et un rapport molaire q ($q = \frac{[lipide\ chaînes\ longues]}{[lipide\ chaînes\ courtes]}$) inférieur à 1, de sorte que le lipide à chaîne courte soit présent en quantité plus importante que le lipide à chaîne longue (Raffard et al., 2000). Les bicelles isotropes ont alors une morphologie quasi-sphérique. Pour $q > 1$, les bicelles sont dites anisotropes et possèdent la propriété de s'orienter dans le champ magnétique \vec{B}_0 . C'est pourquoi elles sont couramment utilisées comme modèle lipidique pour la caractérisation structurale de peptides et de

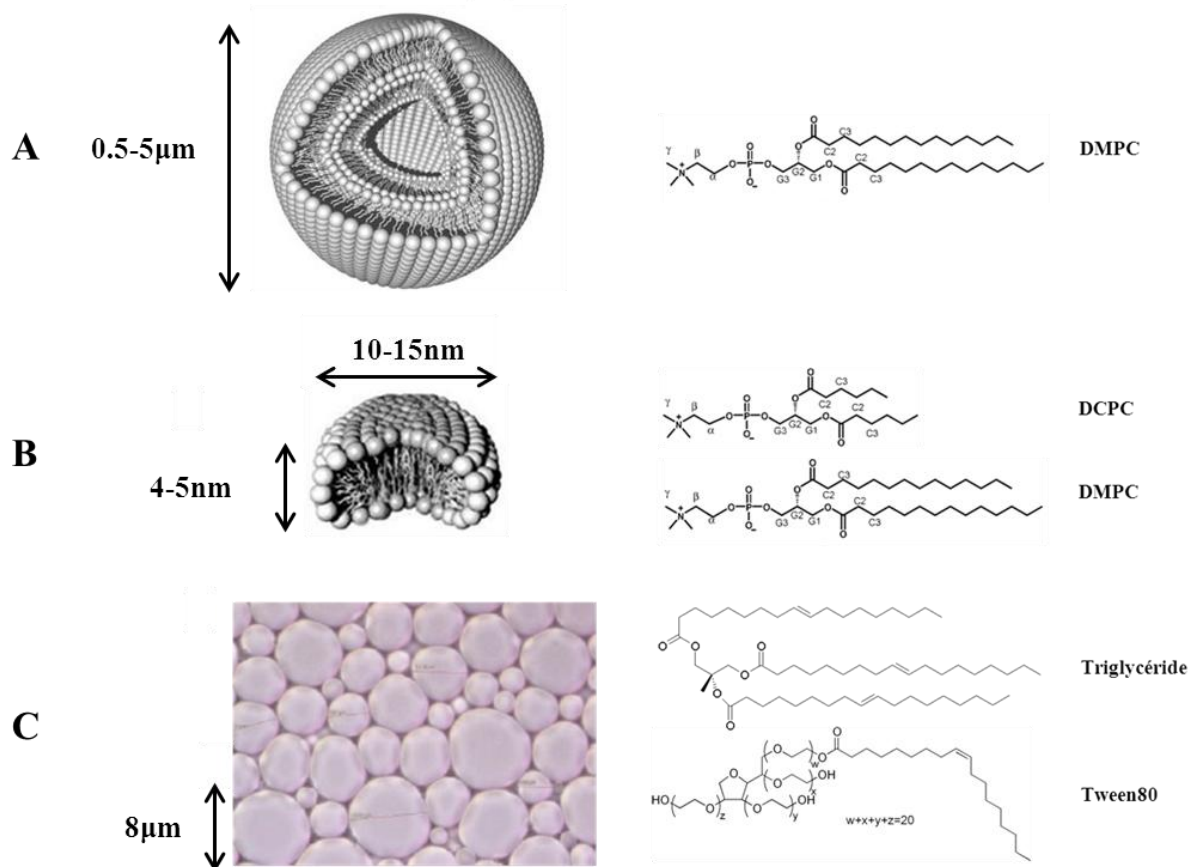


Figure I.14 : Modèles lipidiques utilisés au cours de cette thèse pour mimer les membranes buccales et les gouttelettes lipidiques ingérées lors du repas. **(A)** Vésicules multilamellaires (MLV); **(B)** Bicelles isotropes; **(C)** Emulsion huile dans eau.

protéines par RMN en milieu membranaire (Marcotte & Auger, 2004 ; Diller et al., 2009 ; Loudet et al., 2010).

Une émulsion est une dispersion de deux liquides non miscibles l'un dans l'autre sous forme de gouttelettes lipidiques (**figure I.14C**). Elles peuvent être de deux types selon la nature de la phase dispersée, directe dans le cas d'une émulsion eau dans huile ou indirecte pour une dispersion huile dans eau. Au cours de cette thèse, le modèle d'émulsion huile dans eau a été utilisé, l'huile constituant le cœur hydrophobe des gouttelettes. L'émulsion est stabilisée par un émulsifiant amphiphile qui en se localisant à l'interface eau/huile, va diminuer la tension interfaciale et l'énergie du système (Genot & Michalski, 2010). Cet émulsifiant peut être notamment de nature lipidique (lécithines de soja) ou protéique (caséines du lait).

I.D Interactions tannin-lipide, état de l'art

Peu étudiée au cours des années 90, l'étude des interactions entre tannins et lipides a connu un réel essor au cours des quinze dernières années (Nakayama et al., 1998 ; Tsuchiya, 2001 ; Tamba et al., 2007 ; Sirk et al., 2008), non pas dans le but de résoudre des problématiques liées au goût comme dans le cas de cette thèse mais plus pour comprendre certaines de leurs propriétés biologiques bénéfiques pour la santé humaine comme leurs activités antioxydante et antibactérienne (Kumazawa et al., 2004 ; Scheidt et al., 2004 ; Tamba et al., 2007 ; Sun et al., 2009 ; Abram et al., 2013).

De nombreux modèles lipidiques ont été utilisés au cours de ces diverses études (bicelles, monocouches), Toutefois, les liposomes qu'ils soient multilamellaires (Caturla et al., 2003 ; Scheidt et al., 2004 ; Ulrich et al., 2010 ; Yu et al., 2011) ou unilamellaires (Tamba et al., 2007 ; Sun et al., 2004) sont les modèles les plus répandus dans la littérature traitant des interactions tannin-membrane. En effet, le fait que ces modèles, en plus de mimer convenablement la membrane biologique, soient faciles à préparer peut expliquer cette importante utilisation. Concernant les tannins, les unités monomériques à la base des tannins condensés (C, EC, EGCG, EGC, ECG, CG, GCG) sont les plus couramment utilisées (Kajiya et al., 2001 ; Uekusa et al., 2007 ; Sirk et al., 2008 ; Abram et al., 2013). Ces tannins sont en effet très répandus dans l'alimentation, notamment dans les boissons comme le thé et le vin. Néanmoins, suivant la propriété étudiée, d'autres tannins, présentant des structures plus complexes, ont pu être étudiés. C'est le cas des travaux de Yu et al. (2011), qui en voulant déterminer l'influence de l'hydrophobicité des tannins sur la fluidité de la membrane, utilisèrent le PGG, un gallotannin plus hydrophobe que les tannins condensés et un trimère de catéchine dont l'hydrophilie est plus importante que celles des tannins monomériques. Il est à noter que certaines études ont été effectuées non pas sur des tannins au sens strict mais, sur des flavonoïdes (Arora et al., 2000 ; Olila et al., 2002 ; Ulrich et al., 2010), composés polyphénoliques de structures similaires, présents notamment dans le vin (Taillandier & Bonnet, 2004).

De nombreuses techniques analytiques ont été utilisées pour étudier les interactions entre tannins et membranes. Nous pouvons notamment citer la chromatographie en phase liquide (Nakayama et al., 1998 ; Kajiya et al., 2001, 2002 ; Uekusa et al., 2008), la résonance paramagnétique électronique (Ulrih et al., 2010 ; Abram et al., 2013), la calorimétrie différentielle à balayage (Caturla et al., 2003 ; Abram et al., 2013), la diffusion des rayons X (Tamba et al., 2007 ; Sun et al., 2009), la méthode par microbalance à cristal de quartz (Kamihira et al., 2008), la spectroscopie infrarouge (Caturla et al., 2003) ou encore la modélisation (Sirk et al., 2008). Néanmoins, les deux principales techniques analytiques utilisées dans l'étude des interactions entre tannins et lipides sont la résonance magnétique nucléaire (Scheidt et al., 2004 ; Kumazawa et al., 2004 ; Kajiya et al., 2008 ; Uekusa et al., 2007, 2011 ; Yu et al., 2011) et la spectroscopie de fluorescence (Hashimoto et al., 1999 ; Arora et al., 2000 ; Tsuchiya., 2001 ; Kajiya et al., 2001 ; Caturla et al., 2003 ; Tamba et al., 2007 ; Tsuchiya et al., 2008 ; Abram et al., 2013).

Plusieurs informations peuvent être tirées de l'ensemble de ces travaux. Celles-ci peuvent être classées en trois catégories : (i) celle s'intéressant à la localisation des tannins dans la membrane, (ii) celle s'intéressant à l'effet des tannins sur la dynamique des modèles membranaires et enfin (iii) celle s'intéressant à l'interaction tannin-lipide (nature des interactions, échelle d'affinité suivant les tannins, facteurs influant sur l'interaction).

Localisation des tannins dans la membrane

La majeure partie des études portant sur la localisation des tannins tend à conclure à leur localisation à la surface des différents modèles membranaires. Ainsi, Kajiya et ses collaborateurs montrèrent qu'un ajout de tannin sur des MLV présentant deux types de sondes fluorescentes localisées préférentiellement en surface et dans la partie hydrophobe entraîne une diminution de l'intensité de fluorescence de la sonde localisée plutôt à la surface du modèle membranaire (Kajiya et al., 2001). Des études similaires effectuées par les équipes de Kitano et d'Abram sont parvenues aux mêmes résultats (Kitano et al., 1997 ; Abram et al., 2013). De plus, les travaux de Uekusa et al. mirent en évidence par RMN des taches de corrélation en NOESY entre le tannin et la tête polaire du lipide, preuve d'une localisation en surface (Uekusa et al., 2007, 2011).

Néanmoins, les travaux de Caturla et al. montrèrent une localisation en surface des tannins non galloylés (catéchine et épicatechine) mais une localisation en profondeur pour les deux tannins galloylés étudiés, ECG et EGCG (Caturla et al., 2003). Un ancrage dans la membrane a aussi été constaté pour trois tannins, C, EC et EGCG, par Sirk et al. par modélisation moléculaire de l'interaction entre les tannins et un type de cellule cancéreuse, Hep₆₂ (Sirk et al., 2008). Toutefois, l'ancrage constaté pour EGCG est peu profond. Ces résultats ne confortent donc pas l'idée d'une localisation en profondeur des tannins galloylés comme proposée par Caturla et al. En revanche, ces travaux montrèrent une localisation pour ECG, CG, EGC et GCG à la surface du modèle membranaire.

Par ailleurs, certaines études suggèrent que la profondeur de pénétration des tannins dans la membrane dépend de leurs hydrophobicité (Scheidt et al., 2004 ; Yu et al., 2011). Par exemple, un tannin très hydrophobe comme PGG (**annexe 2**) se situe au niveau des chaînes acyles selon Yu et al. En conclusion, bien que la majorité des études soient en faveur d'une localisation des tannins à la surface des membranes, il n'y a pas de lien clairement établi entre leurs localisations et leurs structures.

Effet des tannins sur la dynamique de la membrane

Contrairement à la localisation du tannin, il n'y a pas de consensus au sein de la communauté scientifique concernant l'effet des tannins sur la fluidité membranaire. Deux écoles s'affrontent :

Pour la première, les tannins ont un effet fluidifiant sur la membrane (Kajiya et al., 2001 ; Uekusa et al., 2011 ; Yu et al., 2011). Ainsi, Yu et al. (2011) décrivent, lors d'une étude par RMN du deutérium sur des MLV de DMPC, une diminution des paramètres d'ordre S_{CD} au niveau des chaînes acyles permettant de conclure à une fluidification du cœur hydrophobe due à l'ajout d'EGCG. De plus, différentes études, ont montré par mesure de fuite de calcéine une augmentation de la perméabilité de plusieurs systèmes lipidiques lors de l'ajout de tannin (Kajiya et al., 2001 ; Tamba et al., 2007 ; Sun et al., 2009). Cet effet a été attribué à une fluidification de la membrane due au tannin. Les travaux de Iftime et al. (2010) qui ont montré que cet effet n'était pas la conséquence de la formation de pores sont également en faveur de ce résultat.

A l'inverse, pour la seconde école, les tannins ont un effet rigidifiant sur la membrane (Tsuchiya et al., 1999, 2001, 2008 ; Caturla et al., 2003 ; Abram et al., 2013). Cet effet a été établi notamment par des mesures d'anisotropie de fluorescence effectuées par Tsuchiya (1999) qui montrèrent, après addition de tannin sur des MLV, une augmentation de la polarisation de fluorescence d'un fluorophore localisé au niveau du cœur hydrophobe du modèle membranaire, traduisant une rigidification de cette partie de la membrane. En outre, il a été montré que cet effet est plus important pour les tannins galloylés (EGCG, ECG) et pour les tannins ayant une conformation *cis* au niveau du cycle pyrane comme c'est le cas de l'épicatéchine (Tsuchiya, 2001). L'impact de la structure du tannin sur la rigidification de la membrane est aussi retrouvé dans les travaux par résonance paramagnétique électronique d'Abram et al. (2013). En effet, alors qu'une rigidification de toute la chaîne acyle est constatée pour un ajout d'EGCG, seule la partie proche de la tête polaire est rigidifiée lors d'ajouts de C, EC et EGC. De plus, les travaux en résonance paramagnétique électronique effectués par Ulrich et al. (2010) établirent un lien direct entre l'effet fluidifiant/rigidifiant des tannins et la dynamique du modèle membranaire. En effet, en utilisant un modèle membranaire présentant une composition hétérogène (POPC/POPE/POPS/CH 4/2/1/3) avec des régions rigides et d'autres plus fluides, ces auteurs constatèrent qu'EGCG avait un effet rigidifiant sur des parties proches de l'interface des régions rigides et un effet fluidifiant au centre de la bicouche des régions plus fluides. Ces résultats doivent toutefois être à prendre avec des réserves, la résonance

paramagnétique électronique étant une technique invasive du fait de l'utilisation de marqueurs exogènes qui peuvent entraîner une perturbation de la membrane.

Ainsi, l'effet des tannins sur la dynamique des lipides membranaires n'est pas encore clairement établi.

Interactions tannin-lipide

Contrairement à l'effet des tannins sur la fluidité membranaire, la plupart des publications scientifiques se rejoignent sur le type d'interactions mise en jeu entre tannin et lipide. Ainsi, la présence de liaisons hydrogène a été suggérée par plusieurs auteurs (Sirk et al., 2008 ; Abram et al., 2013). Ces liaisons se feraient principalement entre les fonctions hydroxyles des tannins et le groupement phosphate dans le cas des tannins localisés à la surface (EGC, CG, ECG, GCG) et de la fonction carbonyle dans le cas des tannins s'ancrant légèrement dans la membrane (C, EC, EGCG). Dans ces travaux, Sirk et al. (2008) montrèrent que dans le cas des tannins galloylés, les liaisons hydrogène se forment préférentiellement avec les fonctions hydroxyles du groupement galloyle et du cycle pyrogalloyle (ou cycle catéchol suivant la nature du substituant en 5'). A l'inverse, dans le cas des tannins non galloylés, comme la catéchine ou l'épicatéchine, les liaisons hydrogène se formeraient principalement avec le cycle phloroglucinol. Ainsi, à l'exception notable d'ECG, les tannins galloylés formeraient généralement plus de liaisons hydrogène (jusqu'à trois) que les tannins non galloylés (seulement une ou deux). Outre la présence de liaison hydrogène, Uekusa et al. (2011) suggérèrent, notamment dans le cas des lipides présentant une tête choline, la présence d'interactions de type cation- π entre l'amine quaternaire chargée positivement du groupement choline du lipide et les cycles aromatiques des tannins. Enfin, dans le cas de tannins très hydrophobes, Yu et al. (2011) suggérèrent la présence possible d'interactions hydrophobes entre le tannin et les chaînes acyles.

Des études ont en outre été effectuées afin de déterminer l'influence de la structure du tannin sur son affinité avec différents modèles membranaires (Hashimoto et al., 1999 ; Kajiya et al., 2001, 2002 ; Uekusa et al., 2008). Ainsi, la stéréochimie des carbones chiraux (C2 et C3) du cycle pyrane, la présence d'un groupement galloyle en C3 et la présence d'une fonction hydroxyle en 5' sur le cycle B semblent influencer sur cette affinité. En effet, il a été montré que la conformation cis de la liaison C₂-C₃ sur le cycle pyrane et la présence d'un groupement galloyle en C3 augmentent l'affinité du tannin pour le modèle membranaire contrairement à la présence d'une fonction hydroxyle en 5' (Kajiya et al., 2001 ; Uekusa et al., 2008). La quantification de l'affinité entre tannin et lipide *via* la mesure de constante d'association a fait l'objet d'une seule étude (Kamihira et al., 2008). Cette étude, étudiant l'interaction de quatre tannin (C, EC, ECG, EGCG) sur une monocouche de DMPC montre des données qui corrobore les résultats précédents et a permis d'établir par des mesures piezoélectriques l'échelle d'affinité suivante : K_a (ECG) = $(3.75 \pm 0.9) \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ > K_a (EGCG) = $(2.1 \pm 0.8) \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ > K_a (EC) = $(1.86 \pm 0.12) \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$ > K_a (EGC) = $(1.33 \pm 0.12) \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$.

Enfin, l'influence de certains facteurs sur les interactions tannin-lipide a été étudiée (Kajiya et al., 2002 ; Kaneda et al., 2002). Ainsi, la charge à la surface de la membrane semblerait avoir une influence sur l'affinité avec le tannin (Kajiya et al., 2002). En effet, il a été montré que les membranes chargées négativement diminuent l'affinité entre tannin et lipide par rapport à une membrane non chargée, à l'inverse des membranes chargées positivement. De même, l'affinité entre les tannins et les modèles membranaires serait augmentée par la présence de sels ou de peptides dans le milieu (Kajiya et al., 2002 ; Kaneda et al., 2002). Ces derniers, en s'associant avec les tannins formeraient un complexe plus hydrophobe qui faciliterait l'interaction avec le modèle membranaire (Kaneda et al., 2002).

I.E Objectif et plan de thèse

Les tannins présents dans le vin induisent deux propriétés organoleptiques qui vont être ressenties lors de la dégustation, l'astringence et l'amertume. Grâce aux différentes études réalisées au cours des vingt dernières années, les mécanismes à l'origine de ses deux sensations commencent à être élucidés (Charlton et al., 2002 ; Chandrashekar et al., 2006). Dans le cas de l'amertume, l'origine de cette sensation proviendrait de l'interaction entre les tannins et les récepteurs du goût amer, tandis que dans le cas de l'astringence, la sensation est due à des interactions entre les tannins et les protéines salivaires qui vont entraîner une diminution de la lubrification de la cavité buccale. L'affinité entre les tannins et des modèles de protéines salivaires a d'ailleurs pu être quantifiée pour la première fois au sein du laboratoire grâce aux travaux réalisés par O. Cala au cours de sa thèse. Des constantes de dissociation tannin-protéine de la salive ont pu ainsi être déterminées (O. Cala et al., 2011).

Cependant, d'autres facteurs sont susceptibles d'influer sur ces interactions, comme des paramètres physico-chimiques (pH, température, force ionique, etc...) ou la présence d'autres composés présents en bouche qui pourraient interagir avec les tannins ; c'est le cas notamment des lipides. En effet, l'interaction entre les tannins et les lipides pourrait perturber les interactions tannin-protéine de la salive et/ou perturber les récepteurs gustatifs en induisant des variations au niveau de la dynamique des membranes buccales. **L'objectif de cette thèse a donc été d'étudier les interactions tannin-lipide dans les conditions mimant au mieux la dégustation afin de déterminer leur impact sur le goût ressenti lors de la consommation de vin.**

L'ensemble de cette étude ayant été réalisée essentiellement par résonance magnétique nucléaire, le chapitre II présente les bases théoriques de la spectroscopie RMN, les principaux traitements des spectres effectués ainsi que la préparation de différents échantillons, afin de permettre une meilleure compréhension des résultats. La partie résultats est divisée en trois chapitres.

Le chapitre III analyse par RMN du solide ^2H et ^{31}P l'effet des tannins sur la dynamique de vésicules multilamellaires utilisées comme modèle des membranes buccales. Cette étude a été effectuée sur des vésicules multilamellaires de DMPC dans un premier temps puis sur des vésicules

multilamellaires de composition lipidique plus complexe afin de se rapprocher de la composition des membranes buccales. La question de l'effet des interactions tannin-lipide sur l'amertume est considérée dans ce chapitre.

La question de l'effet des interactions tannin-lipide sur l'amertume a été aussi considérée dans le chapitre IV. Ce chapitre vise à quantifier les interactions tannin-lipide par la détermination de constante d'association par RMN du proton. Après avoir examiné l'influence de la structure du tannin, du milieu, de la nature du modèle lipidique et du lipide utilisé, les constantes d'association obtenues ont été comparées avec celles de la littérature (Kamihira et al., 2008) et celles obtenues pour les interactions tannin-protéine de la salive (Cala et al., 2011). Pour finir, l'impact des interactions tannin-lipide sur l'astringence est discuté.

Le chapitre V de cette thèse s'intéresse à l'étude par RMN du proton des interactions entre les tannins et les lipides alimentaires. Les résultats obtenus sur les bicelles isotropes et l'émulsion huile dans eau utilisées comme modèle des gouttelettes lipidiques sont présentés dans ce chapitre. La pertinence de ces deux modèles est également discutée.

Enfin, les principaux résultats obtenus au cours de cette thèse sont reliés à la problématique dans un dernier chapitre de synthèse (chapitre VI). Les conclusions portant sur les effets des interactions tannin-lipide sur l'amertume et sur l'astringence et donc, *in fine*, sur le goût du vin, y sont discutés.

CHAPITRE II

Matériel et méthodes

Dans le but de faciliter la compréhension des résultats qui seront présentés dans les chapitres III, IV et V de ce manuscrit, les principales techniques physico-chimiques utilisées lors de cette thèse sont présentées dans ce chapitre. Après avoir d'abord énuméré les produits chimiques utilisés, les méthodes de préparation des modèles lipidiques sont ensuite présentées. La spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN), principale technique expérimentale utilisée au cours de cette thèse, est décrite en détail dans une troisième partie. Enfin, la diffraction des rayons X aux petits angles, utilisée comme outil de caractérisation structurale d'une phase lipidique complémentaire de la RMN, est présentée à la fin de ce chapitre.

II.A Produits chimiques

Les lipides, 1,2-dicaproyl-*sn*-glycéro-3-phosphocholine (DCPC), 1,2-dimyristoyl-*sn*-glycéro-3-phosphocholine (DMPC), 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycéro-3-phosphocholine (DPPC), 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycéro-3-phosphocholine (POPC), 1,2-dicaproyl(d_{22})-*sn*-glycéro-3-phosphocholine (DCPC- d_{22}), 1-myristoyl(d_{27})-2-myristoyl-*sn*-glycéro-3-phosphocholine (DMPC- d_{27}), 1,2-dimyristoyl(d_{54})-*sn*-glycéro-3-phosphocholine (DMPC- d_{54}), 1-palmitoyl(d_{31})-2-oleoyl-*sn*-glycéro-3-phosphocholine (POPC- d_{31}), 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycéro-3-phosphoéthanolamine (POPE), 1,2-dipalmitoleoyl-*sn*-glycéro-3-phosphoéthanolamine (DPoPE), cholestérol (CH), sphingomyéline d'œuf (SM) et glucosylcéramides de soja (GSL) ont été achetés chez Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA). Les tannins eux, (+)-catéchine (C), (-)-épicatéchine (EC), (-)-Epicatéchine gallate (ECG) et (-)-Epigallocatechine gallate (EGCG) proviennent de chez Sigma-Aldrich (St-Louis, MO, USA).

Les solvants non deutérés, méthanol (CH_3OH , 99.9%), éthanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$, 99.8%), chloroforme (CHCl_3 , 99.5%) ainsi que le tampon Tris (99%) ont été aussi achetés chez Sigma-Aldrich (St-Louis, MO, USA). Les solvants et produits deutérés, éthanol- d_6 (99%), eau deutérée (99.9%), acide actétique- d_6 (99.5%), chloroforme deutéré CDCl_3 (99.7% avec 0.03% de TMS), Tris- d_{11} , sodium-3-trimethylsilyl-2,2,3,3- d_4 -propionate (TMSP, 99.9%) ainsi que l'eau déplétée en deutérium sont obtenus chez Eurisotop (St. Aubin, France). L'eau ultrapure, présentant une résistivité nominale de 18.2 M Ω .cm (MilliQ, Millipore, France) est utilisée pour la lyophilisation.

II.B Préparation des échantillons

Pour plus de clarté, les différents modes opératoires visant à la préparation des échantillons sont classés suivant les chapitres de la thèse où ceux-ci ont été utilisés. Il est important de noter que lipides et tannins sont préalablement lyophilisés avant la première pesée afin d'éliminer l'eau résiduelle. L'ensemble des pesées a été réalisé sur une balance Mettler Toledo (Viroflay, France) de ± 0.01 mg de précision. Les rotors (ZrO_2 , 4 mm de diamètre) et les tubes RMN en verre (5 mm de diamètre) utilisés au cours de cette thèse proviennent de Wilmad LabGlass (Vineland, NJ, USA).

II.B.1 Formation des vésicules multilamellaires et insertion des tannins par cosolubilisation (chapitre III)

11.11mg dans le cas du DMPC-d₂₇ ou 11.48mg dans le cas du DMPC-d₅₄ sont pesés et solvatés dans du chloroforme deutéré. Le solvant est ensuite évaporé sous vide poussé dans un concentrateur SpeedVac (Savant AES 1010, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) pour donner un film lipidique fin. Le film de lipide est alors hydraté avec une solution tannin/eau ultrapure présentant une quantité appropriée de tannin afin d'obtenir le rapport molaire tannin/lipide voulu (0.27mg de C ou d'EC ou 0.38mg d'EGCG pour un rapport molaire de 1/20, 0.63mg de C ou d'EC ou 1mg d'EGCG pour un rapport molaire 1/8). Le mélange est ensuite lyophilisé pendant 24h (Dura-Dry MP, Bioblock Scientific, Illkirch, France). Après lyophilisation, les mélanges sont hydratés avec 100µL d'eau déplétée et soumis à une homogénéisation par cinq cycles froid-chaud, précédés d'une agitation au vortex (2000rpm, 45s), correspondant à une congélation (-196°C, azote liquide, 2min) suivi d'un chauffage pendant 10min au bain-marie à une température de 40°C supérieure à la température de transition de phase gel/fluide des lipides (21.5 et 20.5°C respectivement pour le DMPC-d₂₇ et le DMPC-d₅₄) (Aussenac et al., 2003). Cette procédure conduit à l'obtention d'une phase laiteuse homogène constituée de vésicules multilamellaires de tailles supérieures à 1µm et ayant une concentration lipidique de 157mM. L'échantillon est alors inséré dans un rotor ayant une contenance de 100µL.

Les vésicules constituées d'un mélange de plusieurs lipides, DMPC-d₅₄/CH (82/18) et POPC-d₃₁/POPE/GSL/SM/CH (1.5/1.8/1.5/1.2/4), ont été préparés selon le même protocole. Pour ces systèmes, les lipides sont solubilisés dans du chloroforme (DMPC-d₅₄, POPC-d₃₁, POPE, cholestérol) ou dans un mélange chloroforme/méthanol 90/10 (sphingomyéline d'œuf, glucosylcéramides de soja), avant l'étape d'évaporation. Pour le modèle DMPC-d₅₄/CH, les masses préalablement pesées sont respectivement de 9.42mg pour le DMPC-d₅₄ et de 1.09mg pour le cholestérol. Tandis que celles de POPC-d₃₁, POPE, cholestérol, sphingomyéline d'œuf et de glucosylcéramides de soja sont respectivement de 1.92, 2.02, 2.36, 1.34 et 1.73mg. Dans les deux cas, la concentration lipidique finale est de 157mM.

II.B.2 Obtention des modèles membranaires, MLV et LUV, utilisés lors des titrations et ajout des tannins par addition (chapitre IV)

Deux modèles membranaires ont été utilisés lors des expériences décrites lors du chapitre IV, les vésicules multilamellaires (MLV) et celles unilamellaires de type LUV.

II.B.2.a Obtention des solutions tampons

La solution tamponnée à 7.4 ($[\text{Tris-d}_{11}] = 25\text{mM}$) est obtenue en solubilisant 16.52mg de Tris- d_{11} dans 4997 μL de D_2O et 3 μL de TMSP à une concentration finale de 1mM. Le pH est ajusté avec une solution de HCl 15mM à l'aide d'un pH-mètre à électrode de verre (HANNA Instrument, Tanneries, France).

La solution tamponnée à 3.5 ($[\text{Acide Acétique-d}_6] = 5\text{mM}$) est obtenue pour ajout de 1.5mg d'acide acétique deutéré dans 4997 μL de D_2O et 3 μL de TMSP à une concentration finale de 1mM. Si besoin, le pH est ajusté à l'aide d'une solution de NaOH.

II.B.2.b Obtention des solutions mixtes tannins-MLV par addition de tannins

Le mode opératoire pour une addition de tannin sur des MLV présentant une concentration lipidique finale de 4mM est décrit ci-dessous.

Une masse de lipide (2.82 et 3.16mg respectivement de DMPC et de POPC) est pesée puis solvatée avec 600 μL de solution tampon. La solution est ensuite vortexée pendant deux minutes (1500-2000rpm) puis soumise à cinq cycles chaud-froid comme précédemment. Du fait de sa faible concentration en lipide ($[\text{DMPC}] = 6.93\text{mM}$), la solution mère de MLV obtenue présente un aspect translucide. Les solutions mixtes tannin/MLV aliquotées à différentes concentrations en tannin ont été réalisées en mélangeant 30 μL de la solution mère de MLV à 6.93mM avec un volume donné de solution mère de tannin à 5mg/mL pour C et EGCG et à 2.5mg/mL pour EC et ECG obtenus en solubilisant respectivement 2.5 et 1.25mg de tannin dans 500 μL de tampon ($[\text{T}]_{\text{mère}} = 17\text{mM}$). Le volume de chaque échantillon est ensuite ajusté à 52 μL par de la solution tampon. Ceux-ci sont ensuite insérés dans un rotor de 52 μL de contenance. Le **tableau II.1** présente les différentes concentrations et volumes utilisés pour une titration de catéchine sur des vésicules multilamellaires présentant une concentration lipidique de 4mM.

Echantillon	[L] (mM)	[T] (mM)	[TMSP] (mM)	V _L (mL)	V _T (mL)	V _{D2O} (mL)
1	4	0	1	30	0	22
2	4	0.5	1	30	1.5	20.5
3	4	1	1	30	3	19
4	4	1.5	1	30	4.5	17.5
5	4	2	1	30	6	16
6	4	2.5	1	30	7.5	14.5
7	4	3	1	30	9	13
8	4	3.3	1	30	9.96	12.04
9	4	3.7	1	30	11.16	10.84
10	4	4	1	30	12.07	9.93

Tableau II.1 : Concentration et volume utilisés pour la préparation des solutions mixtes tannins-lipides en vue des expériences de titration. Cas d'une addition de catéchine sur des MLV de DMPC. $[\text{L}]_{\text{mère}} = 6.93\text{mM}$; $[\text{T}]_{\text{mère}} = 17\text{mM}$.

II.B.2.c Obtention des solutions mixtes tannins-LUV par addition de tannins

Les vésicules unilamellaires de type LUV que nous avons utilisées ont été obtenues par extrusion.

27.09mg de DMPC sont pesés et hydratés avec 2mL de solution tampon afin de former des vésicules multilamellaires ayant une concentration lipidique de 20mM. Celles-ci sont soumises à 5 cycles chaud-froid (même protocole que précédemment) et conservées au bain-marie à une température de 40°C, supérieure à la température de transition gel/fluide du DMPC de 23.5°C (Cevc, 1993). La solution lipidique est ensuite extrudée.

L'extrusion a été réalisée à l'aide d'une extrudeuse « Lipex extrudeur » (Northern Lipids Inc., Burnaby, Canada) équipée de filtres en polycarbonate de différentes porosités 800, 400 ou 200nm (VWR, Radnor, PA, USA). Le principe est de faire passer à travers les filtres la suspension de vésicules multilamellaires sous pression d'azote (0 à 30 bar) et à une température supérieure à la température de transition de phase du lipide constituant les vésicules. Pour cela, l'extrudeuse est reliée à un régulateur en température maintenant l'appareillage à 40°C.



Figure II.1 : Extrudeuse thermostatée utilisé pour la formation des LUV.

Trois porosités différentes ont été utilisées dans le but d'éviter de boucher les filtres de faible porosité et de monter trop fortement en pression dans l'extrudeuse. Deux passages à 800nm, deux à 400nm et enfin six passages avec un filtre de porosité de 200nm sont ainsi effectués. La taille des vésicules et la dispersité de la solution sont ensuite contrôlées par diffusion de la lumière. Celles-ci présentent un diamètre moyen de 200nm et un indice de polydispersité inférieure à 0.2 (0.17). Une solution monodisperse est donc obtenue.

Le principal désavantage de la méthode par extrusion réside dans la perte de matière à travers les filtres. La concentration lipidique de la solution va ainsi s'en trouver modifiée. Un test phosphate, selon le protocole de Rouser et al. (1970) doit donc être effectué sur 5µL de la solution de LUV afin de quantifier la quantité de lipide dans l'échantillon final. Le protocole du test phosphate est décrit dans l'**annexe 3**.

Une fois la concentration déterminée, la solution de LUV est diluée dans une solution tampon à pH 7.4 afin d'obtenir une concentration lipidique de 6.93mM. Comme pour le cas des titrations sur

des MLV, les solutions mixtes tannin/LUV aliquotées à différentes concentrations en tannin ont été réalisées en mélangeant 30 μ L de la solution mère de LUV avec un volume donné de solution mère de catéchine à 5mg/mL. Le volume de chaque échantillon est ensuite ajusté à 52 μ L par addition de la solution tampon. Les échantillons sont ensuite insérés dans un rotor de 4mm de diamètre et de 52 μ L de contenance.

II.B.3 Obtention des modèles de gouttelettes lipidiques (chapitre V)

Deux modèles de gouttelettes lipidiques présentes en bouche après ingestion et mastication d'aliments gras ont été utilisés au cours du chapitre V, les bicelles isotropes DMPC/DCPC ($q = [\text{DMPC}]/[\text{DCPC}] = 0.5$) et une émulsion huile dans eau.

II.B.3.a Cas des bicelles isotropes DMPC/DCPC

Les bicelles isotropes ont été obtenues à différentes concentrations (30,50, 60 et 120mM) selon la méthode décrite par Raffard et al. (2000). Le protocole entraînant la formation de bicelles isotropes est décrit ici pour une concentration lipidique (DMPC + DCPC) de 120mM et un volume final de 600 μ L.

16,7mg de DMPC sont pesés et solubilisés dans 1.08mL de chloroforme contenant le DCPC à 20mg/mL. La masse de DCPC correspondante est de 21.7mg. L'échantillon est ensuite évaporé sous vide poussé afin d'obtenir un film lipidique fin. Celui-ci est hydraté avec 500 μ L d'eau milli-Q et lyophilisé pendant 24h. La poudre blanche obtenue est ensuite hydratée avec 600 μ L d'eau deutérée et agitée vigoureusement au vortex (2000rpm, 2min). Cinq cycles chaud-froid (2min dans l'azote liquide à -196°C, 10min au bain-marie à 40°C) sont alors réalisés afin d'homogénéiser l'échantillon. Une centrifugation (3000rpm, 10min) suivie d'une agitation au vortex (2000rpm, 2min) sont réalisées entre chaque cycle. Une suspension transparente, garantissant la formation d'objets isotropes, est alors obtenue. Le taux d'hydratation de l'échantillon $\left(\frac{m_{\text{H}_2\text{O}}}{m_{\text{H}_2\text{O}} + m_{\text{L}}}\right)$ est de 94%.

Les bicelles isotropes marquées au deutérium sont obtenues *via* le même protocole. Les lipides sont dans ce cas hydratés avec de l'eau déplétée. De plus, une fraction (20, 25, ou 100%) de DMPC ou de DCPC est substituée respectivement par du DMPC-d₂₇ ou du DCPC-d₂₂.

II.B.3.b Cas de l'émulsion huile dans eau

4g de tween80 sont mélangés à 16g d'eau distillée grâce à un agitateur magnétique pendant 20 minutes. 80g d'huile de tournesol oléique sont ensuite ajoutés au mélange. Celui-ci subit alors une agitation mécanique pendant 15-25 minutes afin d'obtenir une première émulsion polydisperse dite « grossière ». La préparation est ensuite cisailée trois fois dans une cellule de Couette (Ademtech,

Pessac, France) afin d'obtenir une émulsion homogène en taille. La cellule de Couette (**figure II.2**) est composée d'un entrefer de 100 μ m formé par deux cylindres coaxiaux dans lequel est injectée la solution (capacité = 60g). Le cylindre extérieur (stator) est fixe et le cylindre interne (rotor) est entraîné par un moteur ayant une vitesse de 700rpm. Le taux de perte moyen après les trois cisaillements est de 25%. L'émulsion cisailée est récupérée dans la partie supérieure de l'appareil et présente une concentration lipidique de 870mM.

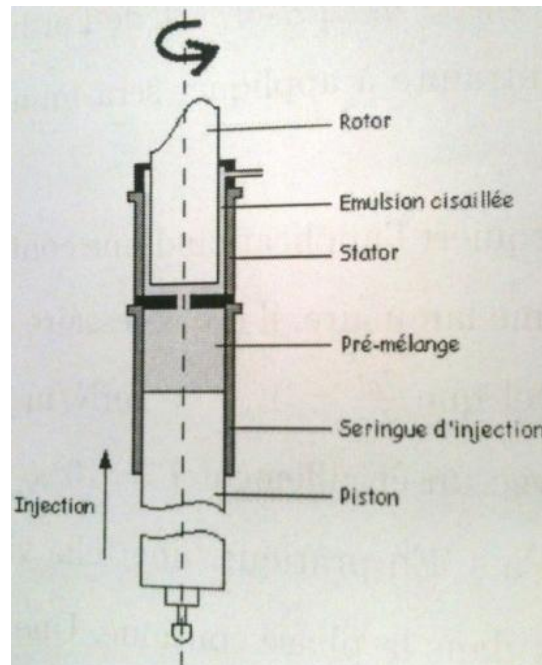


Figure II.2 : Schéma d'une cellule de Couette (extrait de la thèse de N. Drelon, 2006).

L'émulsion est ensuite analysée en granulométrie afin de connaître sa taille et sa dispersité. Deux populations, l'une possédant un diamètre de 9 μ m, l'autre de 5 μ m, sont obtenues. Il est à noter que cette émulsion est stable sur une durée de 25 jours (L. Berthenoux, 2012).

Les émulsions sont ensuite diluées (2 à 3 dilutions successives) dans une solution tampon de D₂O + TMSP ([TMSP] = 20mM), afin d'obtenir la concentration lipidique voulue. Pour les systèmes mixtes tannin/émulsion, la dernière dilution est réalisée avec la solution mère de tannin ([T]_{mère} = 2x[T]_{finale}) afin d'obtenir la concentration en tannin finale voulue.

II.B.3.c Obtention des précipités dans le cas des bicelles isotropes DMPC/DCPC et des MLV de DMPC

Les conditions d'obtention des précipités par ajout de tannin sur les bicelles isotropes DMPC/DCPC et les MLV de DMPC-d₂₇ sont décrites ci-après. Dans le cas des bicelles isotropes, le précipité a été obtenu par un ajout de 600 μ L de solution tannique ([T] = 100mM dans le cas de la

catéchine, 170mM dans le cas d'EGCG afin d'obtenir respectivement des rapports T/L de 1/2 et 1/0.7) à une solution de 600 μ L de bicelles isotropes ayant une concentration lipidique de 120mM. L'échantillon présente instantanément un aspect turbide résultant de l'apparition du précipité (jaune orangé dans le cas de la catéchine et blanchâtre dans le cas d'EGCG).

Dans le cas des vésicules multilamellaires de DMPC-d₂₇, le précipité est obtenu en suivant le même protocole. Une solution de 300 μ L de catéchine ([T] = 100mM, m = 8.7mg) est ajoutée à une solution de 300 μ L de MLV de DMPC-d₂₇ ([L] = 120mM, m = 25.3mg). Le précipité jaune-orangé apparaît là encore de façon instantanée.

II.B.4 Addition de tannin sur la phase lamellaire du DPoPE

13.1mg de DPoPE sont pesés et hydratés avec 100 μ L ([L] = 196mM) d'eau deutérée ou avec 100 μ L d'une solution de catéchine dans de l'eau deutérée. Deux solutions de catéchine, dont les concentrations sont au-dessus (60mM) et en dessous (6mM) de la CMC du tannin (9 \pm 1mM, Pianet et al., 2008), ont été préalablement préparées afin d'obtenir des rapports molaires tannin/lipide respectivement de 1/3 et 1/33. La solution est agitée dix minutes à l'aide d'un vortex (1500rpm) afin de faciliter l'hydratation du lipide.

II.C La spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN)

II.C.1. Notions théoriques

II.C.1.a Généralités

Les noyaux, comme les électrons, tournent sur eux-mêmes. Ils possèdent ainsi un moment cinétique de spin noté \vec{I} . Pour les noyaux présentant un nombre de masse A pair et une charge Z pairs, tel le ¹²C ou le ¹⁶O, ce moment cinétique est nul. Ils ne sont alors pas détectables par RMN. *A contrario*, les noyaux présentant un nombre de masse A impair (¹H, ³¹P) ou une charge Z impaire (²H) possèdent un moment cinétique de spin \vec{I} non nul auquel est associé un moment magnétique de spin $\vec{\mu}$ colinéaire à \vec{I} . Ce moment magnétique caractérise les propriétés magnétiques du noyaux et est à la base des principales interactions détectées par RMN. L'opérateur de spin associé au moment magnétique, noté $\hat{\mu}$, est relié à \hat{I} , l'opérateur associé au moment cinétique, \vec{I} , suivant la relation :

$$\hat{\mu} = \gamma \hbar \hat{I} \quad (\text{II.1})$$

où γ est le rapport gyromagnétique, caractéristique de chaque noyau et \hbar la constante de Planck divisée par 2π ($\hbar = 1.054 \cdot 10^{-34}$ J.s). Il est utile de définir l'opérateur \hat{I}_z associé à la composante du moment cinétique suivant l'axe z. Cet opérateur possède des valeurs propres notées m qui varient de -I à +I par pas de 1.

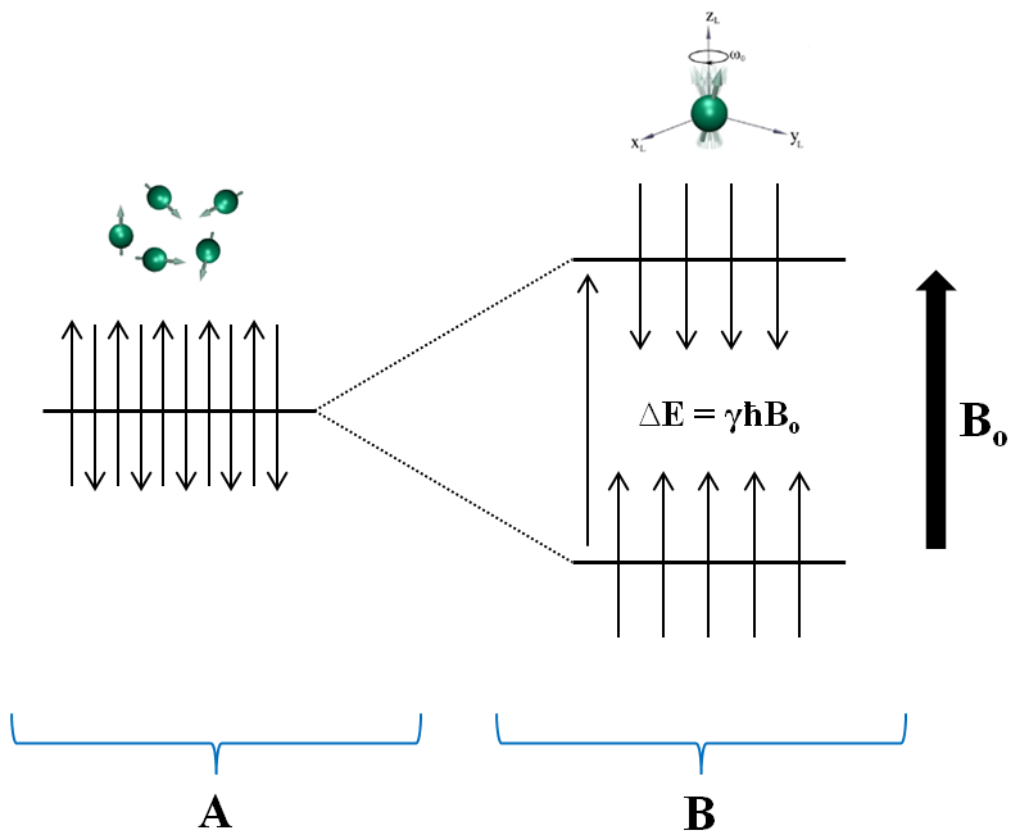


Figure II.3 : Niveaux d'énergie et orientation des spins nucléaires en absence et en présence d'un champ magnétique statique \vec{B}_0 . **(A)** Hors du champ magnétique \vec{B}_0 , les spins nucléaires ont une orientation aléatoire et présentent tous la même énergie. **(B)** En présence de \vec{B}_0 , les spins nucléaires précessent autour de l'axe z du champ magnétique et leurs niveaux d'énergie subissent une levée de dégénérescence.

Placée dans un champ magnétique statique \vec{B}_0 , une population de spin nucléaire \vec{I} est soumise à plusieurs interactions qui peuvent être classées en deux catégories : les interactions externes correspondant aux interactions entre le noyau et son environnement extérieur, le champ magnétique appliqué et les interactions dites internes correspondant aux interactions entre les champs locaux induits par les noyaux. Pour décrire ces interactions, Abragam et Hebel développent en 1961 le concept d'hamiltonien de spin nucléaire \hat{H} (Abragam & Hebel, 1961). Cet hamiltonien peut être décrit comme la somme d'un hamiltonien relatif aux interactions externes (\hat{H}_{ext}) et un hamiltonien relatif aux interactions internes (\hat{H}_{int}) :

$$\hat{H} = \hat{H}_{ext} + \hat{H}_{int} \quad (\text{II.2})$$

L'hamiltonien de couplage externe \hat{H}_{ext} correspond à l'effet Zeeman décrit ci-dessous. L'hamiltonien de couplage interne \hat{H}_{int} sera décrit ultérieurement (partie II.C.1.d).

II.C.1.b Comportement du noyau dans le champ magnétique statique \vec{B}_0 : effet Zeeman et fréquence de Larmor

En l'absence de champ magnétique, les spins nucléaires ont une orientation aléatoire. L'aimantation nucléaire, correspond à la résultante des moments magnétiques $\vec{\mu}$, est donc nulle et les spins ont tous la même énergie (**figure II.3A**). En présence du champ magnétique statique (parallèle à l'axe z), noté \vec{B}_0 , les spins nucléaires s'orientent par rapport au champ entraînant une levée de dégénérescence de l'énergie en $(2I+1)$ niveaux (**figure II.3B**) dont les valeurs sont déterminés par la relation suivante :

$$E_m = \gamma \hbar m B_0 \quad (\text{II.3})$$

Le nombre de niveaux d'énergie étant défini par le nombre quantique magnétique m, la différence entre deux niveaux d'énergie est donnée par la relation :

$$\Delta E = \gamma \hbar B_0 \quad (\text{II.4})$$

Cette levée de dégénérescence est due à l'**effet Zeeman** (du nom de Peter Zeeman, son découvreur, prix Nobel de physique en 1902) qui résulte d'un couplage entre le moment magnétique $\vec{\mu}$ de chaque noyau et le champ magnétique \vec{B}_0 . Ce couplage est décrit par l'hamiltonien \hat{H}_z qui, puisque le champ magnétique \vec{B}_0 est parallèle à l'axe z, peut s'écrire :

$$\hat{H}_z = -\mu \hat{B}_0 = -\gamma \hat{I}_z \hat{B}_0 = \gamma \hbar \hat{I}_z \hat{B}_0 \quad (\text{II.5})$$

Les valeurs propres de \hat{H}_z correspondent donc aux valeurs des niveaux énergétiques E_m .

Soumis au champ magnétique statique \vec{B}_0 , les spins nucléaires vont entrer dans un mouvement de précession autour de l'axe directeur du champ magnétique. Celui-ci se fait à une certaine fréquence

dépendant du champ magnétique mais propre au noyau considéré. Cette fréquence, appelée **fréquence de Larmor** ν_0 , est définie par l'équation suivante :

$$\nu_0 = \frac{\gamma B_0}{2\pi} \quad (\text{II.6})$$

Il est à noter que les transitions entre les différents niveaux d'énergie ne sont observées en RMN que si le système obéit à la loi de Bohr c'est-à-dire si la différence d'énergie entre les niveaux nucléaire ΔE est égale à $h\nu$ où ν est la fréquence de rayonnement électromagnétique auquel sont soumis les noyaux. L'incorporation de l'équation **II.6** dans l'équation **II.4** montre que c'est le cas si $\nu = \nu_0$. Ainsi, la fréquence nécessaire pour induire la transition entre deux niveaux énergétiques est similaire à la fréquence de précession du noyau dans le champ magnétique. Enfin, en RMN, on parle préférentiellement de « pulsation de Larmor » ω_0 reliée à la fréquence de Larmor par la relation :

$$\omega_0 = 2\pi\nu_0 \quad (\text{II.7})$$

Ainsi, l'hamiltonien \hat{H}_z peut s'écrire :

$$\hat{H}_z = -\gamma\hbar\hat{I}_z\hat{B}_0 = -h\nu_0\hat{I}_z = -\hbar\omega_0\hat{I}_z \quad (\text{II.8})$$

II.C.1.c Comportement du noyau soumis à un champ radiofréquence B_1 – Le cas d'une expérience RMN simple

Une expérience de RMN comprend trois étapes principales : (i) l'équilibre où les spins nucléaires, soumis au seul champ magnétique \vec{B}_0 , précessent à la fréquence de Larmor ν_0 . (ii) La perturbation (ou impulsion) apportée par un champ radiofréquence \vec{B}_1 qui induit la transition énergétique entre les différents niveaux d'énergie. (iii) La relaxation, où le système retourne à son état initial d'équilibre après arrêt de la perturbation. C'est cette étape qui est détectée lors d'une expérience RMN.

Chacune de ces trois étapes est présentée ci-après. Pour ce faire, nous prendrons l'exemple d'une séquence de base présentant une seule impulsion à 90° dans le plan xy (plan perpendiculaire à l'axe z du champ magnétique \vec{B}_0). De plus, pour faciliter la compréhension, nous allons étudier le cas d'un système où l'interaction externe (interaction Zeeman) est prédominante.

L'équilibre

A l'équilibre, les spins ne sont soumis qu'au seul champ magnétique \vec{B}_0 et précessent autour de son axe z à la fréquence de Larmor propre au noyau considéré. La répartition des spins sur les $(2I + 1)$ niveaux d'énergie, régie par la distribution statistique de Boltzmann, va entraîner une aimantation \vec{M} colinéaire à \vec{B}_0 et de norme M_0 (**figure II.4A**).

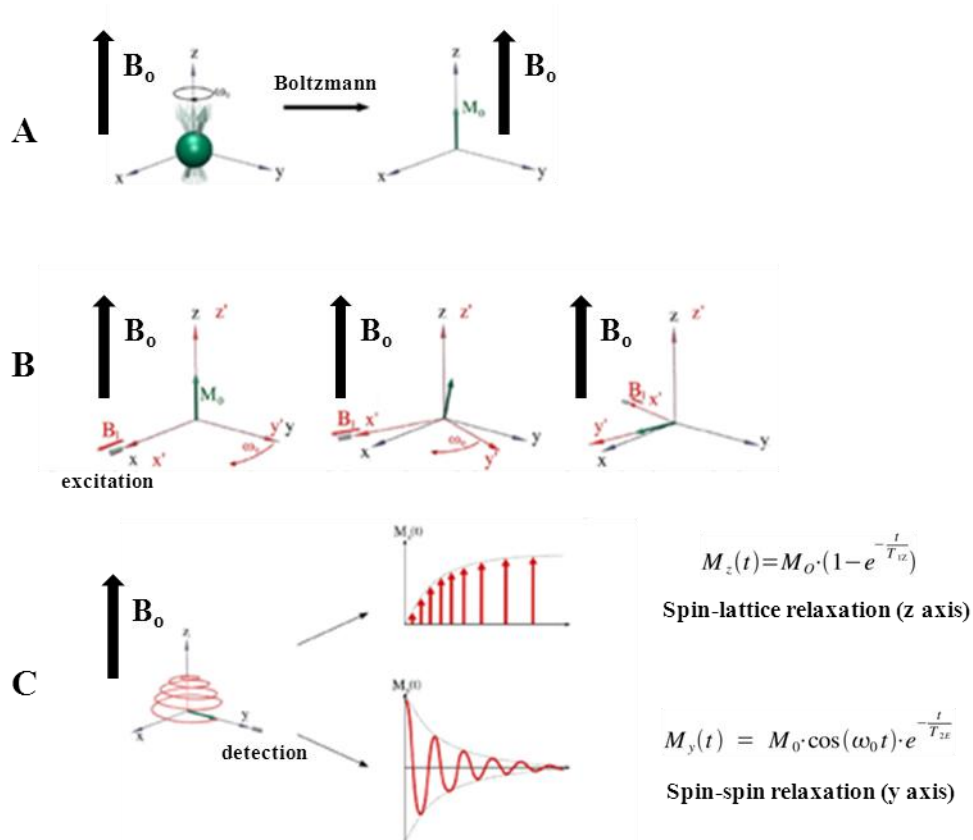


Figure II.4 : Représentation schématique des trois étapes principales d’une expérience RMN. (A) L’équilibre ; (B) La perturbation ; (C) La relaxation. Les axes (x, y et z) et (x’, y’ et z’) représentent respectivement le référentiel du laboratoire et le référentiel tournant (image extraite de S. Buchoux, 2008)

La perturbation

Lors de la perturbation, un champ radiofréquence \vec{B}_1 est produit par une bobine (solénoïde) traversée par un courant électrique. Ce champ radiofréquence, oscillant à la fréquence de précession des noyaux étudiés, apporte l'énergie nécessaire à la transition entre les différents niveaux énergétiques E_m . Cet apport d'énergie a pour conséquence un changement dans l'orientation de l'aimantation résultante \vec{M} . A cause de la précession de Larmor, l'aimantation \vec{M} ne peut être décrite dans le référentiel du laboratoire (x, y, z). Ainsi, il est obligatoire de définir un référentiel tournant (x', y', z') dont l'axe z' est parallèle à l'axe z. C'est dans ce référentiel qu'est appliqué le champ oscillant \vec{B}_1 le long de l'axe x' pendant une durée τ ($\tau = \frac{\theta}{\gamma B_1}$) de sorte que \vec{M} , initialement orienté suivant z', bascule d'un angle θ (90° expérimentalement) en direction de l'axe y' (**figure II.4B**).

La relaxation

La relaxation est le terme employé pour traduire le retour à l'équilibre du système correspondant à \vec{M} colinéaire à \vec{B}_0 . Ce retour se décompose en deux parties : la relaxation longitudinale selon l'axe z et la relaxation transversale dans le plan (x, y) (**figure II.4C**).

L'étude de la relaxation longitudinale est effectuée en suivant l'évolution de la composante de \vec{M} selon l'axe z, \vec{M}_z , dont l'intensité suit une exponentielle croissante donnée par l'équation suivante :

$$M_z(t) = M_0(1 - e^{-\frac{t}{T_1}}) \quad (\text{II.9})$$

où T_1 , appelé temps de relaxation longitudinale, est lié aux échanges entre les spins soumis à l'agitation thermique et leur environnement *via* les mouvements moléculaires. C'est pourquoi la relaxation longitudinale porte aussi le nom de relaxation spin-réseau. La relaxation longitudinale étant liée à la dynamique du système, l'étude du T_1 va donner des informations sur les mouvements moléculaires à l'échelle de la nanoseconde.

La relaxation transversale, traduisant la perte d'aimantation dans le plan (x, y) correspond à l'évolution de la composante \vec{M} selon l'axe y, \vec{M}_y . Son intensité modulée cette fois-ci par la précession de Larmor, suit une cosinusoïde amortie par une exponentielle décroissante dont l'équation est la suivante :

$$M_y(t) = M_0 \cos(\omega_0 t) e^{-\frac{t}{T_2}} \quad (\text{II.10})$$

où T_2 est appelé temps de relaxation transversale. Ce terme est lié aux interactions entre les spins des noyaux et caractérise la relaxation spin-spin. La relaxation transversale donne ainsi des informations sur la dynamique du système aux échelles variant de la microseconde à la seconde. Une valeur de T_2 faible est l'expression d'un système peu mobile (cas de la RMN des solides). A l'inverse, une valeur de T_2 élevée est caractéristique d'un système où les molécules ont une grande liberté de mouvement (cas de la RMN en solution).

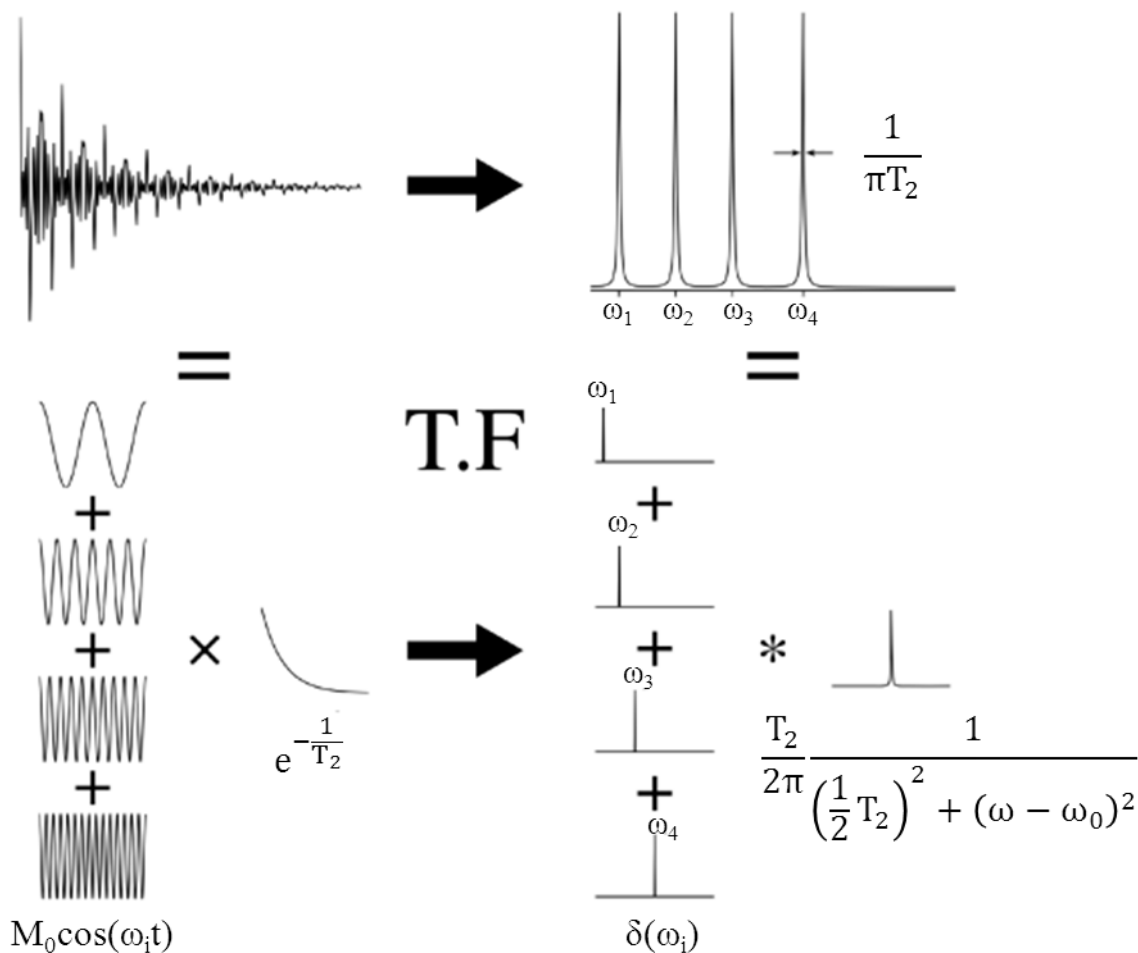


Figure II.5 : Utilisation de la transformée de Fourier (TF) pour passer du domaine temporel au domaine fréquentiel. La FID en haut à gauche constituée de cosinusoides est transformée en un spectre constitué de raies lorentziennes en bas à droite (d'après la thèse de S. Buchoux, 2008).

La détection

En RMN, c'est la relaxation transversale qui est détectée à l'aide d'une bobine réceptrice localisée dans le plan (x, y). Il en résulte un signal appelé « signal de précession libre » (ou FID, pour **Free Induction Decay**) qui sera numérisé puis converti analogiquement et numériquement avant d'être traité et interprété. Ce traitement se fait à l'aide d'une transformée de Fourier qui permet le passage du domaine temporel (la FID) au domaine fréquentiel (le spectre RMN). Le spectre RMN résultant est alors constitué de raies de même fréquence que celle des cosinusoïdes dont elles sont la transformée de Fourier (**figure II.5**).

II.C.1.d Les interactions internes – Distinction entre la RMN des liquides et des solides

Nous avons seulement pris en compte, dans le cas précédemment abordé, l'interaction Zeeman relatif à l'interaction entre les spins des noyaux et les champs magnétiques \vec{B}_0 et \vec{B}_1 . Nous allons maintenant nous intéresser aux interactions internes décrites par l'hamiltonien \hat{H}_{int} tel que :

$$\hat{H}_{int} = \hat{H}_\sigma + \hat{H}_J + \hat{H}_D + \hat{H}_Q \quad (\text{II.11})$$

L'hamiltonien \hat{H}_σ est relatif au blindage électronique résultant d'un couplage entre le moment magnétique du noyau et un champ magnétique local. Celui-ci, de signe opposé à \vec{B}_0 , est induit par le nuage électronique entourant le noyau sous l'effet du champ magnétique statique. Un noyau isolé est donc partiellement « protégé » de \vec{B}_0 par son nuage électronique, donc par ses électrons. Le noyau est alors dit « blindé ». A l'inverse, lorsque ses électrons sont engagés dans des liaisons chimiques, la densité électronique autour du noyau diminue, celui-ci est alors « découvert » et ressent de manière plus importante le champ magnétique global. On dit alors qu'il est « déblindé ». Ce phénomène a été quantifié en définissant le déplacement chimique δ (en parties par million ou ppm) par rapport à la fréquence de résonance des protons du TétraMéthylSilane (ou TMS) fixée à 0ppm et utilisée comme référence :

$$\delta = \frac{(v_{TMS} - \nu)}{v_{TMS}} \times 10^6 \quad (\text{II.12})$$

Le blindage électronique dépend de l'intensité du champ magnétique \vec{B}_0 et, dans le cas d'échantillons « solides », possède une dépendance orientationnelle, le nuage électronique étant rarement isotrope.

L'hamiltonien \hat{H}_J décrit le couplage entre les moments magnétiques de deux noyaux d'une même molécule par l'intermédiaire des électrons de liaisons. L'interaction est donc purement intramoléculaire. Ce couplage baptisé couplage scalaire ou encore couplage spin-spin indirect peut être homonucléaire ou hétéronucléaire. En outre, il ne dépend pas de l'intensité du champ magnétique \vec{B}_0 .

L'hamiltonien \hat{H}_D exprime l'interaction dipolaire associée au couplage de deux noyaux A et B voisins dans l'espace à travers leurs moments magnétiques respectifs $\vec{\mu}_A$ et $\vec{\mu}_B$. Ce couplage dipolaire, aussi appelé couplage spin-spin direct, dépend de la distance entre les noyaux A et B et décroît rapidement (en $\frac{1}{r^3}$) avec celle-ci. Cette interaction présente une dépendance orientationnelle liée à l'angle entre les deux dipôles A et B. En milieu isotrope, la distance entre les noyaux et leurs orientation relative varient trop rapidement et de façon trop importante pour permettre l'observation du couplage dipolaire. L'interaction dipolaire est donc moyennée et nulle. Cette interaction n'est donc visible que dans le cas d'échantillons anisotropes et peut être homonucléaire ou hétéronucléaire.

L'hamiltonien \hat{H}_Q est associé à l'interaction quadrupolaire et ne concerne que les noyaux de spin supérieur à 1/2 (75% des isotopes observables en RMN dont ^2H). En plus du moment magnétique nucléaire, ces noyaux possèdent un moment électrique quadrupolaire (eQ). Celui-ci décrit la forme de l'ellipsoïde de la distribution des charges nucléaires qui n'est plus dans ce cas de symétrie sphérique. L'interaction quadrupolaire traduit le couplage entre le moment quadrupolaire et le gradient de champ électrique créé par les charges extérieures au noyau (électrons, ions...). Comme dans le cas de l'interaction dipolaire, l'interaction quadrupolaire n'est observable que pour des échantillons anisotropes. En effet, dans le cas d'échantillons isotropes, la réorientation rapide des charges va réduire l'anisotropie du gradient de champ électrique jusqu'à l'annuler. L'interaction devient alors nulle.

Ainsi, l'hamiltonien \hat{H} développé par Abragam s'écrit :

$$\hat{H} = \hat{H}_z + \hat{H}_\sigma + \hat{H}_J + \hat{H}_D + \hat{H}_Q \quad (\text{II.13})$$

Il est important de noter que les ordres de grandeur de tous ces hamiltoniens ne sont pas équivalents et vont dépendre de la nature isotrope (RMN en phase liquide) ou anisotrope (RMN en phase solide) de l'échantillon (**tableau II.2**).

Echantillon	\hat{H}_z	\hat{H}_σ	\hat{H}_J	\hat{H}_D	\hat{H}_Q
Solides	10^8	10^4 (anisotrope)	10^2	10^4	10^6 ($I \geq 1$) ou 0 ($I \leq 1$)
Liquides	10^8	10^4 (isotrope)	10^2	0	0

Tableau II.2 : Ordre de grandeur (en Hertz) des hamiltoniens pour des systèmes solides et liquides.

Nous pouvons voir que les interactions ne sont pas toutes présentes selon l'échantillon. Elles dépendent en effet de ses propriétés physico-chimiques et plus particulièrement de sa dynamique. Ainsi, en termes d'interactions internes, dans le cas de la RMN des liquides, les spectres sont dominés par le blindage électronique et le couplage spin-spin indirect. A l'inverse, ce sont l'anisotropie de déplacement chimique, le couplage dipolaire et le couplage quadrupolaire qui sont prédominant en

RMN des solides. L'influence de la dynamique du système va aussi se ressentir sur les temps de relaxation observés. Ainsi, dans le cas de la RMN des liquides, les temps de relaxation sont relativement longs, de l'ordre de plusieurs secondes. A l'inverse, les temps de relaxation en RMN des solides sont courts (atteignant même la milliseconde dans le cas du deutérium) ce qui contraint l'expérimentateur à utiliser des séquences spécifiques que nous présenterons brièvement dans la suite de ce chapitre (écho solide, écho de Hahn).

Cette thèse s'intéresse notamment à l'étude des interactions entre les tannins du vin et des modèles membranaires qui pour la plupart ont une contribution anisotrope. C'est pourquoi, la RMN des « solides » a été principalement utilisée et sera présentée en détail dans le paragraphe suivant.

II.C.2 La RMN des solides – Applications à l'étude des biomembranes

Le proton, du fait de son abondance naturelle (99.98%) et de sa forte présence dans toutes les structures organiques, est le noyau le plus couramment utilisé en RMN des liquides. La RMN du proton est très utilisée par les chimistes notamment pour la caractérisation de molécules en solution. Néanmoins, cette forte présence dans les structures organiques, qui est une force pour l'analyse par RMN des liquides, devient une faiblesse dans l'étude des biomembranes. En effet, il existe dans les bicouches lipidiques des milliers de protons non équivalents qui auront des raies individuelles très larges, rendant impossible leur identification.

Deux noyaux lui sont donc préférés pour l'étude des membranes par RMN : le phosphore (^{31}P) et le deutérium (^2H).

II.C.2.a RMN du Phosphore ^{31}P

Le phosphore ^{31}P est un noyau de choix dans l'étude des biomembranes du fait de son abondance naturelle (100%) et de sa localisation au niveau des têtes polaires de tous les phospholipides. La RMN du phosphore est donc couramment utilisée pour étudier la dynamique de la surface des modèles membranaires.

Le phosphore ^{31}P possède un spin $\frac{1}{2}$ et ne présente donc pas d'interaction quadrupolaire. Les interactions prédominantes sont donc, l'effet Zeeman, le blindage électronique (prédominant) et l'interaction dipolaire phosphore-proton. Cette dernière peut être éliminée expérimentalement par un découplage proton (irradiation des noyaux ^1H à leur fréquence de résonance afin de supprimer les couplages existant avec les hétéronoyaux). Nous avons vu précédemment que les électrons circulant autour du noyau phosphore créent un champ magnétique local opposé à \vec{B}_0 . Dans ces conditions, le champ magnétique perçu par les noyaux n'est pas \vec{B}_0 mais un champ effectif \vec{B}_{eff} s'exprimant selon la relation :

$$\vec{B}_{\text{eff}} = \vec{B}_0 - \sigma \vec{B}_0 \quad (\text{II.14})$$

où σ est la constante d'écran qui varie selon l'environnement électronique du noyau. Dans le cas général, le nuage électronique autour du noyau présente une anisotropie. σ s'exprime alors sous la forme d'un tenseur d'écran (ou tenseur d'anisotropie de déplacement chimique) diagonal lorsqu'il est exprimé dans son système d'axes principal (x' , y' , z') :

$$\vec{\sigma} = \begin{bmatrix} \sigma_{x'x'} & 0 & 0 \\ 0 & \sigma_{y'y'} & 0 \\ 0 & 0 & \sigma_{z'z'} \end{bmatrix} \quad (\text{II.15})$$

où $\sigma_{x'x'}$, $\sigma_{y'y'}$ et $\sigma_{z'z'}$ sont les valeurs propres du tenseur. On peut alors montrer que l'hamiltonien total s'écrit (Dufourc et al., 1992) :

$$\hat{H} = \hat{H}_Z + \hat{H}_\sigma = -\hbar\omega_0 \left[\hat{I}_z + \sigma_{\text{iso}} + \frac{2}{3} I_z \Delta\sigma \left(\frac{3\cos^2\beta - 1}{2} + \frac{\eta}{2} \cos 2\alpha \sin^2\beta \right) \right] \quad (\text{II.16})$$

où α et β sont les angles d'Euler (**figure II.6**) permettant le passage des axes principaux du tenseur (x' , y' , z') vers les axes du référentiel du laboratoire (x , y , z). σ_{iso} , $\Delta\sigma$ et η représentent respectivement la partie isotrope du blindage électronique, l'anisotropie de déplacement chimique et le paramètre d'asymétrie. Ils s'écrivent selon les relations suivantes :

$$\sigma_{\text{iso}} = \frac{1}{3} (\sigma_{x'x'} + \sigma_{y'y'} + \sigma_{z'z'}) \quad (\text{II.17})$$

$$\Delta\sigma = \sigma_{z'z'} - \frac{(\sigma_{x'x'} + \sigma_{y'y'})}{2} \quad (\text{II.18})$$

$$\eta = \frac{\sigma_{x'x'} - \sigma_{y'y'}}{\sigma_{z'z'}} \quad (\text{II.19})$$

Dans les biomembranes, les phospholipides sont animés d'un mouvement de rotation rapide sur eux-mêmes autour de l'axe principal du lipide. Ce mouvement induit la présence d'une symétrie axiale. L'axe z' étant colinéaire à l'axe principal du mouvement, les composantes suivant les axes x' et y' (perpendiculaire à z') deviennent identiques. Ainsi, la symétrie axiale permet de simplifier l'expression du tenseur qui devient :

$$\vec{\sigma} = \begin{bmatrix} \sigma_{\perp} & 0 & 0 \\ 0 & \sigma_{\perp} & 0 \\ 0 & 0 & \sigma_{\parallel} \end{bmatrix} \quad (\text{II.20})$$

Dans ce cas, σ_{iso} et $\Delta\sigma$ prennent les valeurs :

$$\sigma_{\text{iso}} = \frac{1}{3} (2\sigma_{\perp} + \sigma_{\parallel}) \quad (\text{II.21})$$

$$\Delta\sigma = \sigma_{z'z'} - \frac{2\sigma_{x'x'}}{2} = \sigma_{\parallel} - \sigma_{\perp} \quad (\text{II.22})$$

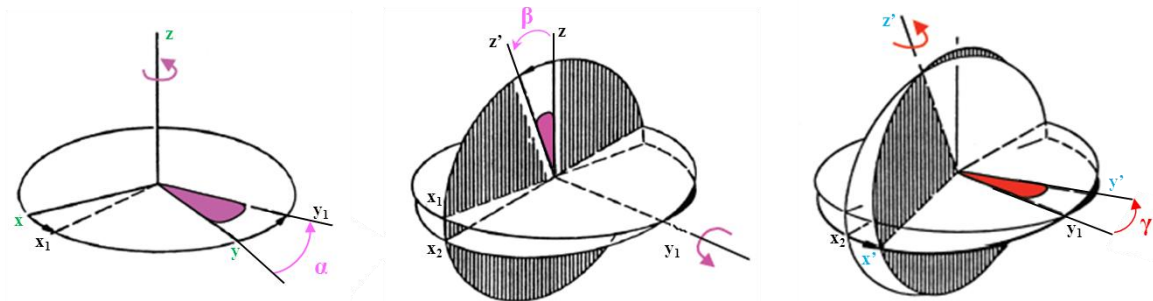


Figure II.6 : Angles d'Euler α , β , γ assurant le passage du référentiel du laboratoire (x , y , z) aux axes principaux du tenseur (x' , y' , z'). L'angle α est induit par la rotation autour de z , β par celle autour de y_1 et γ par celle autour de z' . L'image est adaptée de Dufourc, 2008.

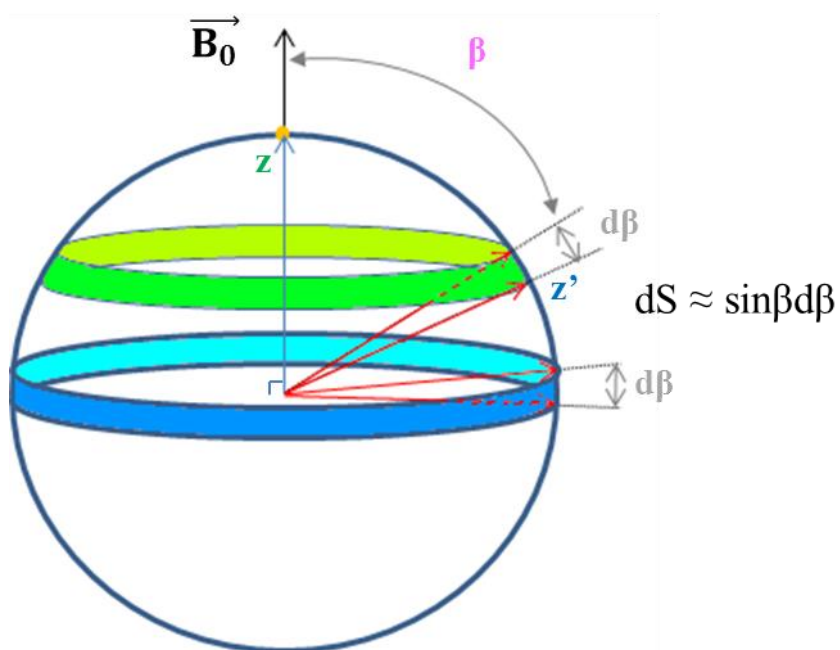


Figure II.7 : Représentation de la distribution sphérique des axes z associés aux tenseurs d'anisotropie de déplacement chimique des atomes de phosphore dans le cas d'un liposome.

Et $\eta = 0$ puisque $\sigma_{x'x'} = \sigma_{y'y'}$ du fait de la symétrie axiale obtenue en phase fluide. Ainsi, l'hamiltonien se simplifie et devient :

$$\hat{H} = \hat{H}_Z + \hat{H}_\sigma = -\hbar\omega_0 \left[\hat{I}_z + \sigma_{\text{iso}} + \frac{2}{3} I_z \Delta\sigma \left(\frac{3\cos^2\beta - 1}{2} \right) \right] \quad (\text{II.23})$$

Les valeurs propres de cet hamiltonien permettent alors d'exprimer la fréquence de résonance en fonction de l'angle β correspondant à l'angle entre le champ magnétique \vec{B}_0 et l'axe principal du tenseur :

$$\nu(\beta) = \nu_0 \left[1 - \sigma_{\text{iso}} - \frac{2}{3} \Delta\sigma \left(\frac{3\cos^2\beta - 1}{2} \right) \right] \quad (\text{II.24})$$

Ainsi, la fréquence de résonance du phosphore dépend de son orientation par rapport au champ magnétique. Le spectre ^{31}P résultant présente donc une dépendance orientationnelle.

Cette dépendance orientationnelle est retrouvée dans le cas des liposomes. Ceux-ci peuvent être représentés par une sphère où les spins sont distribués à sa surface (**figure II.7**). Ainsi, l'angle β est différent pour chaque spin. Les spins n'ayant pas la même orientation sur la sphère, chacun d'eux résonnera à une fréquence de résonance spécifique d'après l'équation II.24. Le spectre final résulte donc de la superposition de toutes ces fréquences de résonance dont les intensités sont pondérées par la probabilité d'existence $P(\beta)$ de chaque orientation :

$$P(\beta) = \frac{1}{2} \int_0^{90} \sin \beta \, d\beta \quad (\text{II.25})$$

Dans le cas de $\beta=90^\circ$ (axe du tenseur perpendiculaire à \vec{B}_0), cette probabilité d'existence est représentée par un disque (en bleu sur la **figure II.7**) alors que dans le cas de $\beta=0^\circ$ (axe du tenseur parallèle à \vec{B}_0), celle-ci se limite à un point. Ainsi, la probabilité d'existence est supérieure pour $\beta=90^\circ$ par rapport à $\beta=0^\circ$. De ce fait, l'orientation la plus favorable correspond à 90° tandis que la moins favorable correspond à $\beta=0^\circ$. Il est à noter que l'anisotropie de déplacement chimique (ou CSA pour chemical shift anisotropy), renseignant sur la dynamique du système, peut être mesurée sur les spectres à partir de l'équation II.22 en considérant les positions extrêmes des fréquences de résonances sur le spectre qui correspondent à $\beta=0^\circ$ et $\beta=90^\circ$:

$$\Delta\sigma = \nu(90^\circ) - \nu(0^\circ) \quad (\text{II.26})$$

Outre l'anisotropie de déplacement chimique, l'allure du spectre RMN ^{31}P renseigne aussi sur la dynamique du spectre ainsi que sur la phase lipidique adoptée par l'auto-assemblage des lipides. A cause de la dépendance orientationnelle des interactions en présence, ces spectres sont beaucoup plus larges que dans le cas de la RMN des liquides, ainsi la fenêtre de détection sera plus grande. La **figure II.8** présente quelques spectres RMN du phosphore observés pour différentes morphologies lipidiques :

- Dans le cas d'un échantillon lipidique sous forme de poudre (**figure II.8A**), la dynamique du système est quasi-nulle. Les noyaux ^{31}P dans un tel milieu possèdent un tenseur d'écran dont

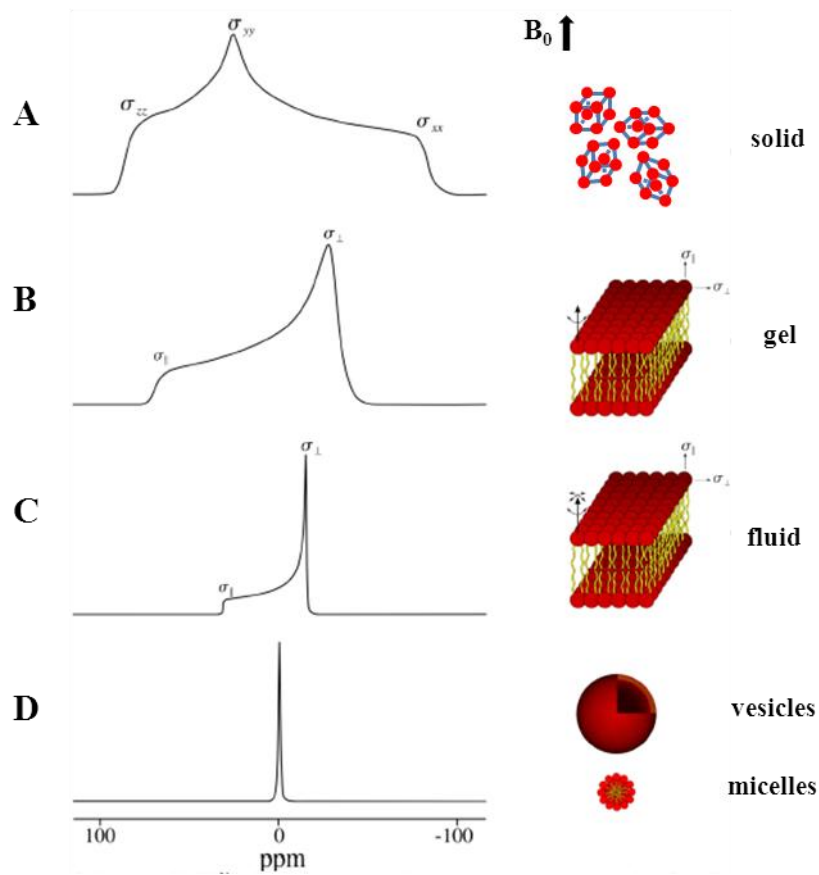


Figure II.8 : Spectres RMN du phosphore en fonction de la phase lipidique (image extraite de S. Buchoux, 2008 et adaptée de E.J. Dufourc, 1986)

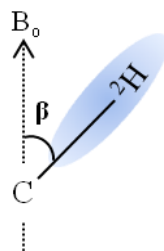


Figure II.9 : Schématisation de l'angle β entre le gradient de champ électrique (ovale bleu) d'un noyau deutérium ^2H et le champ magnétique \vec{B}_0 .

les trois composantes sont différentes. Toutes les orientations étant possibles, un spectre dit de poudre est observé.

- Dans le cas d'une phase lamellaire gel (**figure II.8B**), le groupement phosphate est animé d'un mouvement de rotation sur lui-même autour de l'axe principal du lipide. Ce mouvement est dans le cas de la tête polaire, assez rapide pour induire une symétrie axiale. Ainsi, le tenseur d'écran ne possède que deux valeurs différentes : $\sigma_{\parallel} = \sigma_{z'z'}$ et $\sigma_{\perp} = \sigma_{x'x'} = \sigma_{y'y'}$. Le spectre est alors plus étroit.
- Dans le cas d'une phase lamellaire fluide (**figure II.8C**), la dynamique du système augmente car des mouvements d'oscillation autour de l'axe de rotation apparaissent. La largeur du spectre diminue.
- Enfin dans le cas d'objets de petite taille ou très mobiles (**figure II.8D**), la dynamique très rapide de l'échantillon va éliminer sa dépendance angulaire. Ainsi le tenseur d'écran s'exprime juste *via* sa composante isotrope. Le spectre se réduit à un pic fin dit « isotrope ».

II.C.2.b RMN du deutérium ^2H

Le deutérium est un noyau couramment utilisé pour étudier la morphologie ainsi que la dynamique du cœur hydrophobe des modèles membranaires. Ce noyau étant très peu abondant à l'état naturel (0.015%), il est nécessaire d'utiliser un lipide deutéré. Le deutérium possédant un spin $I = 1$, une nouvelle interaction interne est mise en jeu, l'interaction quadrupolaire. L'hamiltonien relatif à cette interaction s'écrit (Davis, 1983) :

$$\hat{H}_Q = \frac{e^2qQ}{4I(2I+1)} \left[3\hat{I}_z^2 - I(I+1) \right] \left(\frac{3\cos^2\beta-1}{2} + \frac{\eta}{2} \cos 2\alpha \sin^2\beta \right) \quad (\text{II.27})$$

où η est le paramètre d'asymétrie du gradient de champ électrique tandis que le terme e^2qQ provient du moment quadrupolaire (eQ) multiplié par la composante du gradient de champ électrique ($V_{z'z'} = eq$).

Deux interactions prédominent dans le cas du deutérium : l'interaction quadrupolaire et l'effet Zeeman, les autres interactions étant d'un ordre de grandeur bien inférieur à celui de ces deux interactions (**tableau II.2**). L'hamiltonien total s'écrit alors :

$$\hat{H} = \hat{H}_Z + \hat{H}_Q = -\hbar\omega_0\hat{I}_{z'} + \frac{e^2qQ}{4I(2I+1)} \left[3\hat{I}_z^2 - I(I+1) \right] \left(\frac{3\cos^2\beta-1}{2} + \frac{\eta}{2} \cos 2\alpha \sin^2\beta \right) \quad (\text{II.28})$$

En phase fluide, η est nul (symétrie axiale). Ainsi, l'hamiltonien total peut se simplifier et prend la forme suivante :

$$\hat{H} = -\hbar\omega_0\hat{I}_z + \frac{e^2qQ}{4I(2I+1)} \left[3\hat{I}_z^2 - I(I+1) \right] \left(\frac{3\cos^2\beta-1}{2} \right) \quad (\text{II.29})$$

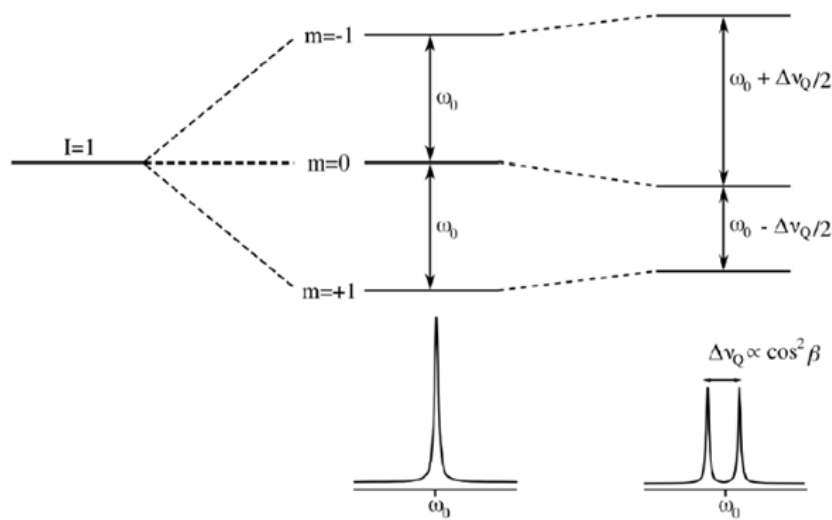


Figure II.10 : Niveaux d'énergie et raies de résonance pour un noyau de spin $I=1$ soumis aux interactions Zeeman et quadrupolaire (image extraite de S. Buchoux, 2008).

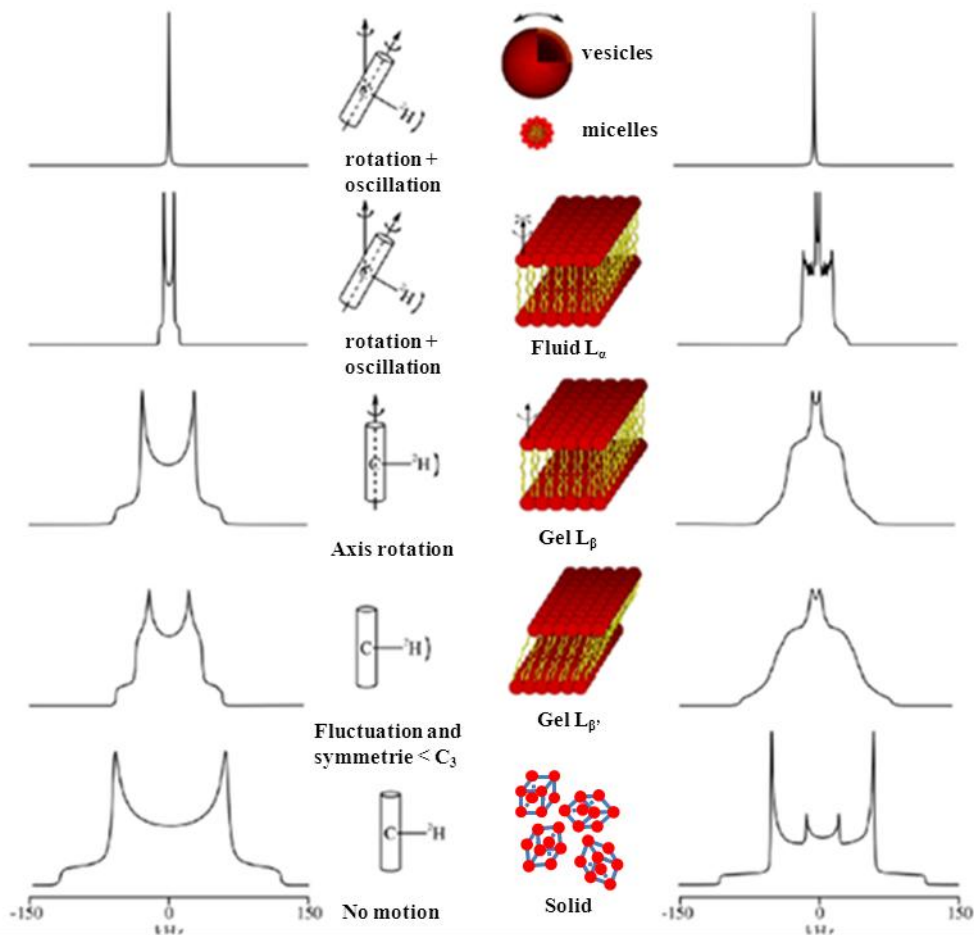


Figure II.11 : Influence des mouvements moléculaires sur la forme des spectres obtenus en RMN du deutérium. La colonne de gauche représente les spectres simulés pour un seul noyau deutérium. La colonne de droite représente les spectres simulés pour un lipide de type DMPC- d_{54} . Image extraite de S. Buchoux (2008) et adaptée de Dufourc & Smith (1986)

avec β l'angle entre le champ magnétique et l'axe principal du gradient de champ électrique (**figure II.9**). Les niveaux d'énergie associés à l'hamiltonien peuvent ainsi être calculés et sont au nombre de trois ($m = -1, 0$ ou 1) pour le cas où $I=1$ (**figure II.10**) :

$$E_m = -\hbar\omega_0 m + \frac{e^2 q Q}{4} (3m^2 - 2) \left(\frac{3\cos^2\beta - 1}{2} \right) \quad (\text{II.30})$$

Il y a donc deux transitions énergétiques qui conduisent à l'obtention de deux raies sur le spectre centrées sur la fréquence de Larmor, (ν_0) ayant comme fréquence :

$$\nu_1 = \nu_0 + \frac{3}{4} \frac{e^2 q Q}{h} \left(\frac{3\cos^2\beta - 1}{2} \right) \quad (\text{II.31})$$

$$\nu_2 = \nu_0 - \frac{3}{4} \frac{e^2 q Q}{h} \left(\frac{3\cos^2\beta - 1}{2} \right) \quad (\text{II.32})$$

L'écart entre les deux raies, $\Delta\nu_Q$, est appelé l'éclatement quadrupolaire et correspond à :

$$\Delta\nu_Q = \frac{3}{2} \frac{e^2 q Q}{h} \left(\frac{3\cos^2\beta - 1}{2} \right) \quad (\text{II.33})$$

Par commodité, le terme $\frac{e^2 q Q}{h}$ désignant la constante de couplage quadrupolaire statique est notée A_Q .

L'équation précédente devient alors :

$$\Delta\nu_Q = \frac{3}{2} A_Q \left(\frac{3\cos^2\beta - 1}{2} \right) \quad (\text{II.34})$$

Dans le cas d'une liaison $C-^2H$ dans un groupement méthylène, cette constante est de 167 kHz (Burnett & Muller, 1971). L'éclatement quadrupolaire dépend de β , angle entre le champ magnétique et l'axe principal du gradient de champ électrique, colinéaire à la liaison $C-^2H$ (**figure II.9**). Ainsi, comme nous l'avons vu dans le cas d'un noyau phosphore, le signal RMN relatif à une liaison $C-^2H$ résulte d'une superposition des raies de résonance relatives à toutes les valeurs de β . L'intensité des différentes raies dépend de la probabilité d'avoir une liaison $C-^2H$ suivant chaque orientation et conduit à un signal, en forme de doublet élargi, appelé doublet de Pake (**figure II.12**). Le spectre RMN résulte alors de la superposition des différents doublets de Pake relatifs à chaque liaison $C-^2H$.

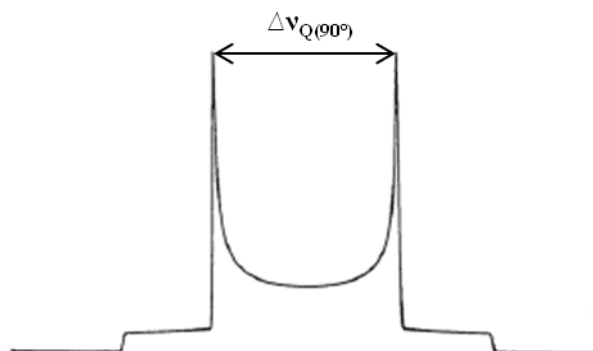


Figure II.12 : Représentation d'un doublet de Pake.

Comme dans le cas du noyau phosphore vu précédemment, la forme du spectre et les valeurs des différents éclatements quadrupolaires renseignent sur la morphologie et la dynamique du modèle membranaire (**figure II.11**). En effet, plus la dynamique du système augmente, plus l'interaction quadrupolaire est moyennée, ce qui se traduit par une diminution des éclatements quadrupolaires et donc de la largeur des spectres. Ainsi, dans le cas d'un système lipidique rigide en phase L_{β} , le spectre est large et peu résolu. A l'inverse, dans le cas d'un système lipidique en phase fluide L_{α} , les chaînes acyles sont soumises à plus de mouvements et le spectre est moins large et mieux résolu. Dans le cas de petites vésicules (type SUV) ou de micelles soumises à de nombreux mouvements dans toutes les directions de l'espace, l'interaction quadrupolaire est moyennée et un spectre isotrope est observé.

II.C.2.c La rotation à l'angle magique

La plupart des modèles membranaires utilisés lors de cette thèse possèdent des propriétés anisotropes. Par conséquent, la RMN du proton en phase liquide va conduire à des spectres peu résolus aux raies larges, rendant impossible l'exploitation et l'étude des variations des déplacements chimiques. On fait alors appel dans ce cas à la technique RMN haute résolution en rotation à l'angle magique (HR-MAS pour High Resolution Magic Angle Spinning)

Il a été vu que la dynamique influe sur la largeur du spectre RMN. Ainsi, dans le cas d'un échantillon très mobile comme le sont les bicelles isotropes, la dépendance angulaire est annulée et une raie fine est obtenue. La technique RMN HR-MAS suit le même principe. En effet, l'échantillon est soumis mécaniquement à une rotation très rapide à un angle de 54.7° par rapport au champ magnétique externe \vec{B}_0 . En effet, à cet angle, appelé angle magique, le terme de dépendance angulaire des interactions magnétiques anisotropes, $\frac{3\cos^2\beta-1}{2}$, s'annule. De ce fait, si la fréquence de rotation de l'échantillon est supérieure à celle des interactions magnétiques anisotropes considérées, ces dernières sont moyennées et s'annulent. On se retrouve alors dans les conditions de la RMN des liquides où seul l'effet Zeeman, le blindage électronique isotrope et le couplage indirect spin-spin isotrope subsistent. On obtient alors un spectre avec une résolution comparable à celle d'un spectre en phase liquide.

Bien que l'interaction dipolaire $^1\text{H}-^1\text{H}$ soit importante dans le cas des systèmes solides (80 kHz), la dynamique interne des modèles de membranes (MLV, LUV) et de gouttelettes lipidiques (émulsion huile dans eau) utilisés est telle qu'elle contribue à réduire cette dernière. Ainsi, une vitesse de rotation de 5 à 8kHz a été suffisante pour obtenir des spectres de résolution suffisante pour l'étude des interactions tannin-lipide (Carlotti et al., 2002).

II.D Acquisition et traitement des spectres RMN

Cette partie présente des paramètres d'acquisition expérimentaux utilisés au cours de cette thèse et des différents outils utilisés lors du traitement des acquisitions relatives à la RMN des solides.

II.D.1 Acquisition des données

L'ensemble des données présentées dans cette thèse ont été obtenues sur quatre spectromètres. Les expériences de RMN du phosphore ont été réalisées sur des spectromètres Bruker Avance Biospin 700MHz (sonde BIOSOLIDE triple résonance CP-MAS ^1H , ^2H et ^{31}P), 500MHz (sonde CP-MAS $^1\text{H}/\text{X}$ très basse fréquence et PE triple $^1\text{H}/\text{X}/\text{Y}$), 400MHz (sonde QNP $^{13}\text{C}/^{19}\text{F}/^{31}\text{P}/^1\text{H}/^2\text{H}$) et 300MHz (sonde CP-MAS $^1\text{H}/\text{X}/\text{Y}$). Les expériences en deutérium ont été réalisées sur des spectromètres Bruker Avance Biospin 700MHz (sonde BIOSOLIDE triple résonance CP-MAS ^1H , ^2H et ^{31}P), 500MHz (sonde CP-MAS $^1\text{H}/\text{X}$ très basse fréquence) et 300MHz (sonde CP-MAS $^1\text{H}/\text{X}/\text{Y}$). Enfin, les expériences de RMN du proton ont été effectuées sur des spectromètres Bruker Avance Biospin 500MHz (sonde CP-MAS $^1\text{H}/\text{X}$ très basse fréquence et PE triple $^1\text{H}/\text{X}/\text{Y}$ et HR-MAS $^1\text{H}/^{13}\text{C}/^2\text{H}$) et 400MHz (sonde QNP $^{13}\text{C}/^{19}\text{F}/^{31}\text{P}/^1\text{H}/^2\text{H}$). Cette sous-partie présente les paramètres d'acquisition utilisés, noyau par noyau. Deux séquences spécifiques à la RMN du solide sont également décrites.

II.D.1.a Une spécificité de la RMN des solides, les séquences d'écho

Comme cela a déjà été évoqué, le temps de relaxation transversal, T_2 , dépend de la dynamique du système étudié. Dans le cas d'un échantillon dit solide, T_2 est relativement court. Ainsi, toute l'information est concentrée sur une gamme de temps très faible. Or, après une impulsion radiofréquence, un délai machine, appelé temps mort, est observé. Pendant celui-ci, il est impossible de faire une acquisition. Si ce temps mort n'est pas problématique dans le cas de la RMN des liquides où la relaxation est lente, il pose un problème majeur dans le cas de la RMN des solides où bien souvent il est supérieur au T_2 de l'échantillon entraînant alors une perte d'information.

Pour remédier à ce problème, des séquences d'écho ont été mises au point (E.L. Hahn, 1950). Le but est de déplacer l'origine du signal RMN au-delà du temps mort machine. Pour cela, une première impulsion d'excitation fait basculer les spins de 90° . Après un temps τ , une deuxième impulsion est appliquée au système afin de refocaliser l'interaction à étudier. Cette refocalisation ne se fait pas immédiatement après la deuxième impulsion mais après un temps égal à τ . Ceci implique que le maximum des cosinusoïdes constitutives du signal est décalé d'un temps égal à τ par rapport à la dernière impulsion. L'acquisition est alors décalée de la même façon sans perte d'information. Il est à signaler que τ doit être plus grand que la durée du temps mort mais suffisamment court pour éviter les pertes en termes de rapport signal/bruit sous l'effet de la relaxation.

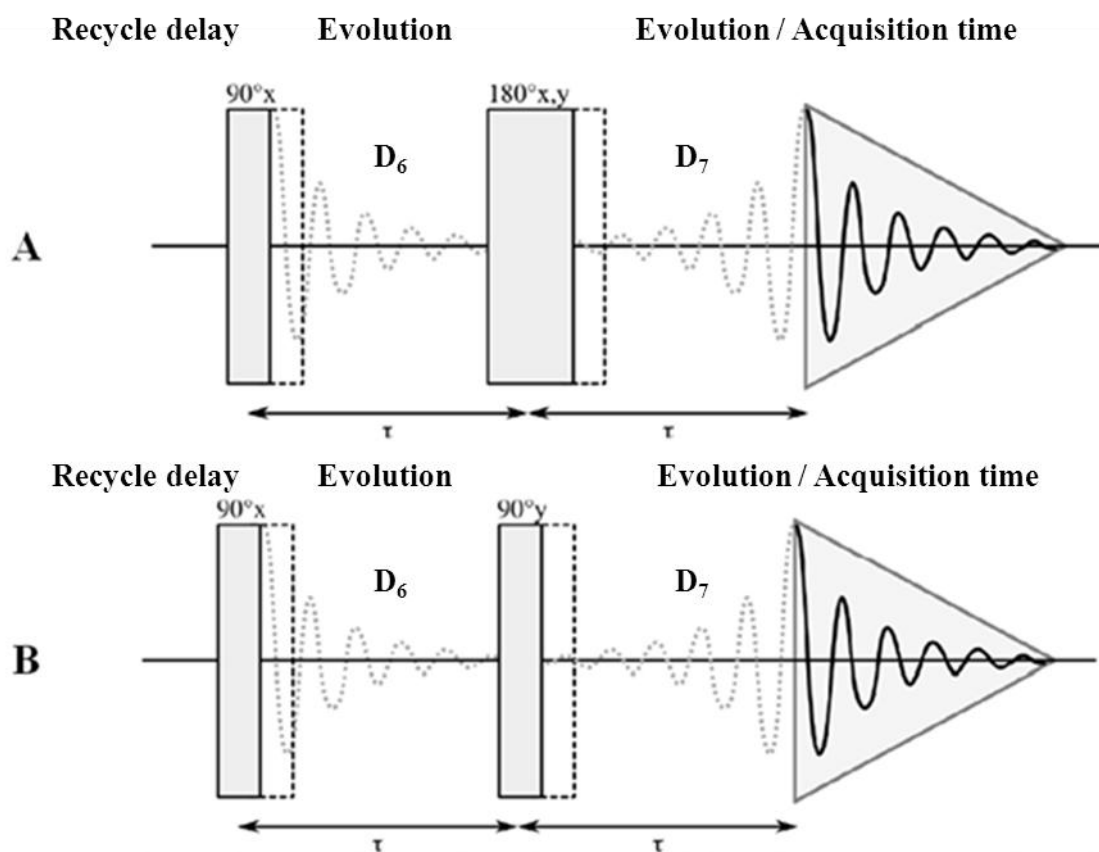


Figure II.13 : Séquences d'impulsions d'écho de Hahn (A) et quadrupolaire (B) utilisées pour l'analyse d'échantillons anisotropes. Les traits en pointillés représentent le temps mort machine.

Dans le cas du phosphore ^{31}P (et pour tout noyau de spin $I=1/2$), la séquence utilisée est la séquence de type écho de Hahn (**figure II.13A**) permettant de refocaliser les interactions de type spin-spin directes et de blindage électronique (Rance et Byrd, 1983). Cependant, cette séquence ne permet pas de refocaliser l'interaction quadrupolaire mise en jeu notamment dans le cas de la RMN du deutérium. Une autre séquence, la séquence d'écho solide (ou écho quadrupolaire), développée par Davis et al. (1976), est utilisée pour les études de ce noyau (**figure II.13B**). Cette séquence suit le même principe que la séquence d'écho de Hahn.

III.D.1.b Paramètres d'acquisition

Pour plus de clarté, les paramètres d'acquisition sont énumérés par noyau. Il est à noter que certains paramètres varient légèrement suivant le spectromètre utilisé.

RMN du phosphore

Toutes les acquisitions présentées lors de cette thèse ont été réalisées avec des séquences d'écho de Hahn (spectromètre 700, 500 et 300MHz) ou présentant une impulsion à 90° avec découplage proton (400 MHz). Chaque spectre a été référencé à l'aide d' H_3PO_4 , fixé à 0ppm.

Au 700 MHz : La fenêtre spectrale utilisée est de 500kHz. La séquence présente une première impulsion à 90° de $4.85\mu\text{s}$ et un délai entre les deux impulsions de $35\mu\text{s}$. Le temps mort est de $6.5\mu\text{s}$. Le temps de recyclage est lui de 4s. 512 acquisitions ont été effectuées. Un traitement exponentiel en $e^{-\text{LB} \cdot t}$ est appliqué avec un LB (« Line Broadening ») de 50Hz avant la transformée de Fourier afin de diminuer le rapport signal/bruit du spectre.

Au 500 MHz : La fenêtre spectrale utilisée varie de 50 à 250kHz. La séquence présente une première impulsion à 90° de $5.75\mu\text{s}$ et un délai entre les deux impulsions de $30\mu\text{s}$. Le temps mort est de 6s. Le temps de recyclage est lui de 5s. De 1k à 2k scans ont été effectués. Un LB de 50Hz est appliqué avant la transformée de Fourier.

Au 400 MHz : La fenêtre spectrale utilisée est de 50kHz. La séquence présente une seule impulsion à 90° de $14\mu\text{s}$ sans écho. Le temps mort est de $6.5\mu\text{s}$. Le temps de recyclage est quand à lui de 5s. 128 à 256 scans ont été effectués. Un LB de 50Hz est appliqué avant la transformée de Fourier.

Au 300 MHz : La fenêtre spectrale utilisée est de 50kHz. La séquence présente une première impulsion à 90° de $3.10\mu\text{s}$ et un délai entre les deux impulsions de $40\mu\text{s}$. Le temps mort est de $4.5\mu\text{s}$. Le temps de recyclage est lui de 5s. 1k scans ont été effectués. Le LB de 50Hz est appliqué avant la transformée de Fourier.

RMN du deutérium

Les spectres RMN du deutérium présentés dans ce manuscrit ont été réalisés à l'aide de séquences d'écho solide. Le centre des spectres est arbitrairement fixé à 0ppm.

Au 700 MHz : La fenêtre spectrale utilisée est de 1MHz. Cette séquence présente deux impulsions à 90° de 5µs et un délai entre ces deux impulsions de 30µs. Le temps mort machine est de 6.5µs. Le temps de recyclage est de 1.5s. 10k scans ont été effectués pour chaque spectre. Un LB de 200Hz est appliqué avant la transformée de Fourier.

Au 500 MHz : La fenêtre spectrale utilisée est de 500kHz. Cette séquence présente deux impulsions à 90° de 2.1µs et un délai entre ces deux impulsions de 40µs. Le temps mort machine est de 4.5µs. Le temps de recyclage est de 2s. 12 à 100k scans ont été effectués suivant le spectre. Un LB de 50-300Hz est appliqué avant la transformée de Fourier.

Au 300 MHz : La fenêtre spectrale utilisée est de 500kHz. Cette séquence présente deux impulsions à 90° de 5.4µs et un délai entre ces deux impulsions de 50µs. Le temps mort machine est de 4.5µs. Le temps de recyclage est de 1.5s. 3 à 16k scans ont été effectués suivant le spectre. Un LB de 100-200Hz est appliqué avant la transformée de Fourier.

RMN du proton

La séquence utilisée pour les études en RMN du proton est une séquence standard présentant une seule impulsion à 90°. Il est à noter, qu'au vu des taux d'hydratation élevés des échantillons, une présaturation a été effectuée sur le signal de l'eau dans le but d'éviter que celui-ci n'écrase les autres signaux présents sur les spectres. Les spectres ont été référencés à l'aide du TMSP (trimethylsilyl-2,2,3,3-d₄-propionate), fixé à 0ppm.

Au 500 MHz : La fenêtre spectrale est de 10kHz. L'impulsion à 90°, initialement à 4.2µs fut optimisée à 3.13µs. Le temps mort est de 6µs. Le temps d'échantillonnage, optimisé de tel façon que $D_1 > 5T_1$, est de 13s. Une présaturation a été faite sur le signal de l'eau à une puissance de 58 à 65dB. 16 à 32 scans ont été effectués. Aucun traitement n'a été appliqué à la FID avant la transformée de Fourier.

Au 400 MHz : La fenêtre spectrale est de 4kHz. L'impulsion à 90° est de 13µs. Le temps d'échantillonnage est de 10s. Une présaturation a été faite sur le signal de l'eau à une puissance de 55dB. 16 à 64 scans ont été effectués. Aucun traitement n'a été appliqué à la FID avant la transformée de Fourier.

RMN à 2 dimensions

COSY : La fenêtre spectrale est de 6000Hz dans les deux dimensions. La séquence présente deux impulsions, l'une à 90° de 5.2µs (13µs au 400MHz), l'autre de 20 à 90° de 5.2µs (6.5µs au 400MHz). Après chaque impulsion, une impulsion de gradient de champ de 1000µs est effectuée. Le temps d'échantillonnage est de 2s. De 16 à 32 scans ont été effectués. Le spectre a été enregistré en utilisant un domaine de temps de 2048 et un incrément de 256 en t_1 .

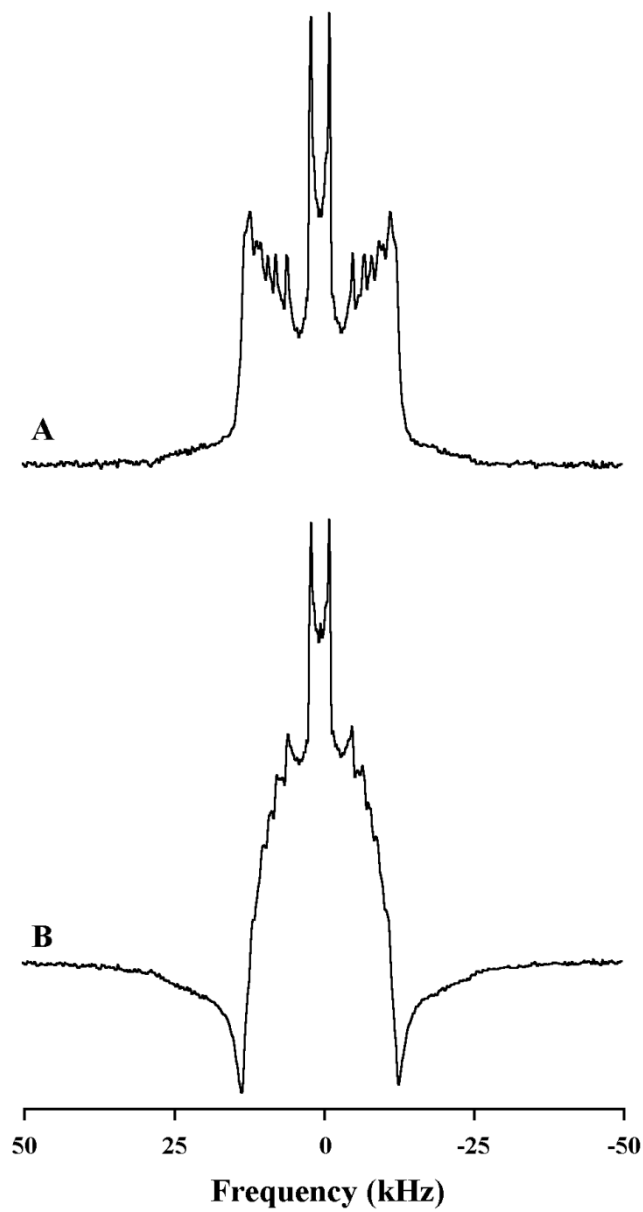


Figure II.14: Influence de l'origine de la transformée de Fourier sur la forme du spectre RMN du deutérium obtenu. (A) Transformée de Fourier effectuée au sommet de l'écho. (B) Transformée de Fourier effectuée au début de la FID, $\Delta D_7 = D_7(\text{optimal}) - D_7(\text{utilisé}) = 18\mu\text{s}$.

NOESY : La fenêtre spectrale est de 6000Hz dans les deux dimensions. La séquence présente trois impulsions à 90° de 5.2µs. Le temps d'échantillonnage est de 2s, tandis que le temps de mélange (D_8) varie de 50 à 350ms. Le spectre a été enregistré en utilisant un domaine de temps de 2048 et un incrément de 256 en t_1 . La séquence comprend une présaturation sur le signal de l'eau à une puissance de 58dB.

ROESY : La fenêtre spectrale est de 6000 Hz dans les deux dimensions. La séquence présente une impulsion à 90° durant 5.2µs suivie d'un temps de spin lock (P_{15}) de 100ms. Le temps de mélange varie de 30 à 300ms. Le temps d'échantillonnage est de 2s. Le nombre de scans effectué est de 32. Le spectre a été enregistré en utilisant un domaine de temps de 2048 et un incrément de 256 en t_1 . La séquence comprend une présaturation sur le signal de l'eau à une puissance de 58dB.

II.D.2 Traitement des données en RMN du solide

La RMN des solides est une technique de choix pour l'étude de la dynamique des membranes. En effet, deux outils peuvent être utilisés pour exploiter les spectres RMN du deutérium : les moments spectraux donnant une information globale sur le thermotropisme du système et les paramètres d'ordres S_{CD} donnant une information locale sur l'ordre du cœur hydrophobe. Néanmoins, l'obtention de telles informations nécessite des traitements préalables. Nous verrons donc dans cette partie, les différents traitements utilisés pour passer de la FID aux informations sur la dynamique du système lipidique.

II.D.2.a Obtention du spectre – le sommet de l'écho

Il a été vu précédemment que dans les séquences de type écho (Hahn et quadrupolaire), le signal est déplacé hors du temps mort machine. Or, un spectre de bonne qualité n'est obtenu que lorsque la transformée de Fourier prend comme origine le sommet de l'écho (**figure II.14A**). Dans le cas contraire, par exemple où la transformée de Fourier est effectuée au début de la FID, un spectre présentant d'importantes distorsions est observé (**figure II.14B**). Ainsi, pour prendre comme origine le sommet de l'écho, l'utilisateur peut procéder de deux façons :

1/ Soit en calculant un intervalle de temps optimal (D_7) entre la première impulsion et le début de l'acquisition afin de démarrer celle-ci au sommet de l'écho. Cette solution présente l'avantage de n'avoir aucun traitement post-acquisition à effectuer (hormis l'application d'un LB) mais est sensible aux erreurs de calcul. Le spectre obtenu étant inutilisable si l'acquisition démarre après le sommet de l'écho. Le D_7 optimal est obtenu suivant la relation (valable pour un écho de Hahn et un écho quadrupolaire) :

$$D_7 = D_6 + \frac{P_1}{2} - D_e \quad (\text{II.35})$$

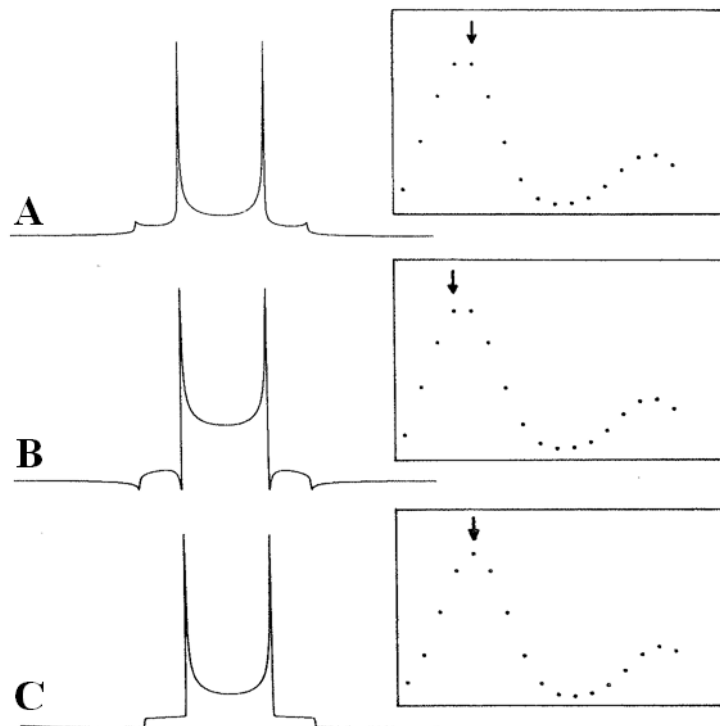


Figure II.15 : Influence de l'origine de la transformée de Fourier et de la digitalisation du sommet de l'écho sur la forme du spectre. Les spectres à gauche résultent de la transformée de Fourier de tous les points de la FID (dans l'encadrée de droite) en partant de la flèche **(A)** Sommet non digitalisé, origine située légèrement après l'écho. **(B)** Sommet non digitalisé, origine située légèrement avant l'écho. **(C)** Sommet digitalisé, origine de la transformée de Fourier située au sommet de l'écho. D'après la thèse de E.J. Dufourc, 1986.

Avec D_6 l'intervalle de temps entre les deux impulsions, D_e le temps mort et P_1 , la durée de la première impulsion à 90° .

2/ Soit en enlevant, par un traitement effectué après l'acquisition, les points entre le début de la FID et le sommet de l'écho. Avec cette méthode, une attention toute particulière doit être portée d'une part sur le nombre de points à enlever entre le début de la FID et le sommet de l'écho et d'autre part sur l'ajustement des délais de la séquence de tel façon qu'un point d'échantillonnage soit situé au sommet de l'écho. Pour ce faire, l'écart entre les points de la FID doit être le plus petit possible (0.5-1 μ s de façon optimale), ce qui implique une fenêtre spectrale assez large. La **figure II.15** montre bien l'importance de se situer au sommet du signal. Dans les cas relatifs aux **figure II.15A et II.15B**, le sommet de l'écho n'est pas digitalisé. Dans le premier cas, l'origine de la transformée de Fourier se situe légèrement après le sommet de l'écho ; il en résulte un spectre avec de légères distorsions. Dans le deuxième cas, prendre comme origine un point de la FID précédant le sommet de l'écho va entraîner l'apparition de creux en périphérie du spectre. A l'inverse, effectuer la transformée de Fourier à partir d'un point au sommet de l'écho (**figure II.15C**) conduit à un spectre optimal sans distorsion.

Le fait d'effectuer la transformée de Fourier au sommet de l'écho prend tout son sens au niveau de l'étude des moments spectraux, ceux-ci étant dépendants de l'aire sous le spectre (nous reviendrons sur ces moments dans la partie II.D.2.b de ce chapitre). En effet, si l'origine de la transformée de Fourier est prise après l'écho, le spectre présente des points incorrects d'intensité positive par rapport à la ligne de base, ce qui surévalue la valeur du moment spectral obtenu. A l'inverse, en prenant comme origine de la transformée de Fourier un point situé avant l'écho, le spectre présente des points d'intensité négative, ce qui sous-estime la valeur du moment obtenu.

Dans le cas de la RMN du deutérium, plusieurs acquisitions successives devraient en pratique être effectuées pour qu'un point de la FID soit situé sur le sommet de l'écho. Or, une seule expérience prenant plusieurs heures, ce paramétrage n'est pas effectué sur l'échantillon lui-même mais est effectué au préalable sur un échantillon de plexiglas totalement deutéré, le temps d'acquisition sur un tel échantillon étant inférieur à la minute.

II.D.2.b Traitement des données – moments spectraux et paramètres d'ordre

Moments spectraux

Un moment est une grandeur spectrale calculée à partir de l'intensité $S(\omega)$ d'un spectre RMN par rapport à une fréquence de référence, la fréquence de Larmor ω_0 . Le moment d'ordre n est défini suivant l'équation ci-dessous (Davis, 1979) :

$$M_n = \frac{\int_{-\infty}^{+\infty} (\omega - \omega_0)^n S(\omega) d\omega}{\int_{-\infty}^{+\infty} S(\omega) d\omega} \quad \text{(II.36)}$$

Dans le cas de spectres symétriques, comme c'est le cas des spectres obtenus en RMN du deutérium, les moments d'ordre impair sont nuls. Dans ce cas, on définit les moments de la façon suivante :

$$M_n = \frac{\int_0^{+\infty} (\omega - \omega_0)^n S(\omega) d\omega}{\int_0^{+\infty} S(\omega) d\omega} = \frac{1}{A} \int_0^{+\infty} (\omega - \omega_0)^n S(\omega) d\omega \quad (\text{II.37})$$

Dans le cas des bicouches, du fait de la symétrie axiale, les moments peuvent être reliés à la distribution des éclatements quadrupolaires (moyennés sur l'ensemble des mouvements) par la relation :

$$M_n = A_n (2\pi)^n \langle \Delta\nu_Q^n \rangle \quad (\text{II.38})$$

Où A_n est une constante dépendante de n . Elle est égale pour $n = 1$ et $n = 2$ respectivement à $\frac{2}{3\sqrt{3}}$ et $1/5$ (Davis., 1979). Les moments de premier ordre, M_1 et de deuxième ordre, M_2 , utilisés dans cette thèse sont donc égaux à :

$$M_1 = \frac{4\pi}{3\sqrt{3}} \langle \Delta\nu_Q \rangle \quad (\text{II.39})$$

$$M_2 = \frac{4\pi^2}{5} \langle \Delta\nu_Q^2 \rangle \quad (\text{II.40})$$

La **figure II.16** représente la variation du premier moment spectral M_1 en fonction de la température dans le cas d'un système lamellaire présentant une transition de phase gel/fluide. Les moments spectraux étant reliés à l'aire sous le spectre, ceux-ci sont plus importants dans le cas d'une phase gel que dans le cas d'une phase fluide. La température de transition de phase est alors déterminée au point d'inflexion de la courbe. Un profil identique est retrouvé dans le cas du second moment spectral M_2 , la température de transition de phase étant obtenue de la même façon.

Les moments M_1 et M_2 obtenus au cours de cette thèse ont été calculés à l'aide d'un programme développé au laboratoire par S. Buchoux qui nécessite l'importation des données RMN expérimentales. Il est à noter que la valeur des moments dépend grandement du rapport signal/bruit du spectre, un bruit de fond important entraînant une erreur de mesure élevée. Les barres d'erreur sont donc relativement importantes dans le cas des valeurs de M_1 relatives aux spectres en phase gel ainsi que pour les valeurs de M_2 proportionnelles aux éclatements quadrupolaires au carré.

Paramètres d'ordre

La notion de paramètre d'ordre fut introduite par Seelig (1977) afin de décrire les mouvements moléculaires du cœur hydrophobe et ainsi quantifier l'état d'organisation du système. Dans le cas des bicouches de lipides présentant une symétrie axiale, on définit par θ_i les trois angles utilisés pour passer des axes principaux du gradient de champ électrique aux axes principaux du lipide (x'' , y'' ,

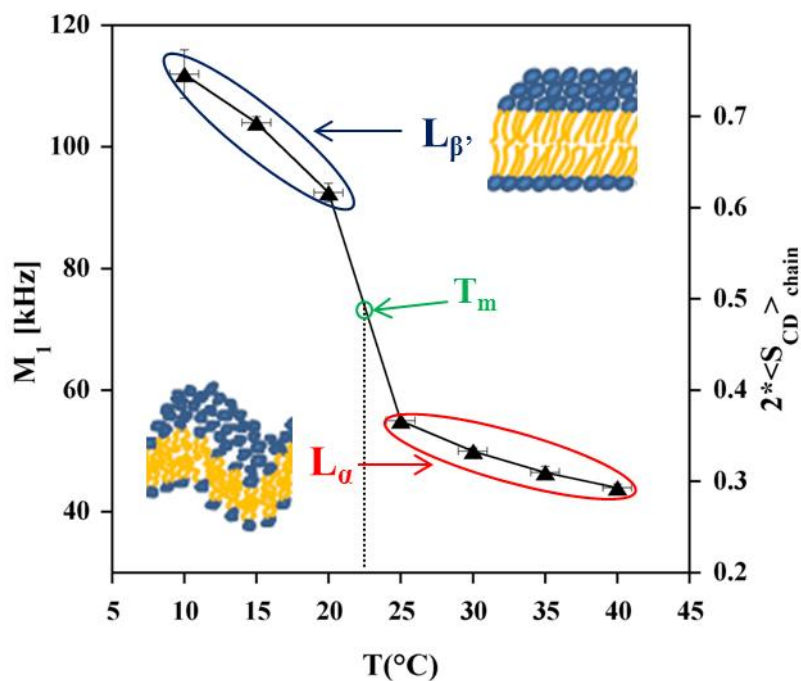


Figure II.16 : Variation du moment spectral M_1 et paramètre d'ordre moyen des chaînes acyles deutérées ($2\langle S_{CD} \rangle_{chaîne}$) en fonction de la température. Cas d'un système lamellaire de DMPC- d_{27} présentant une transition de phase gel/fluide. La température de transition de phase, T_m , est obtenue au point d'inflexion de la courbe.

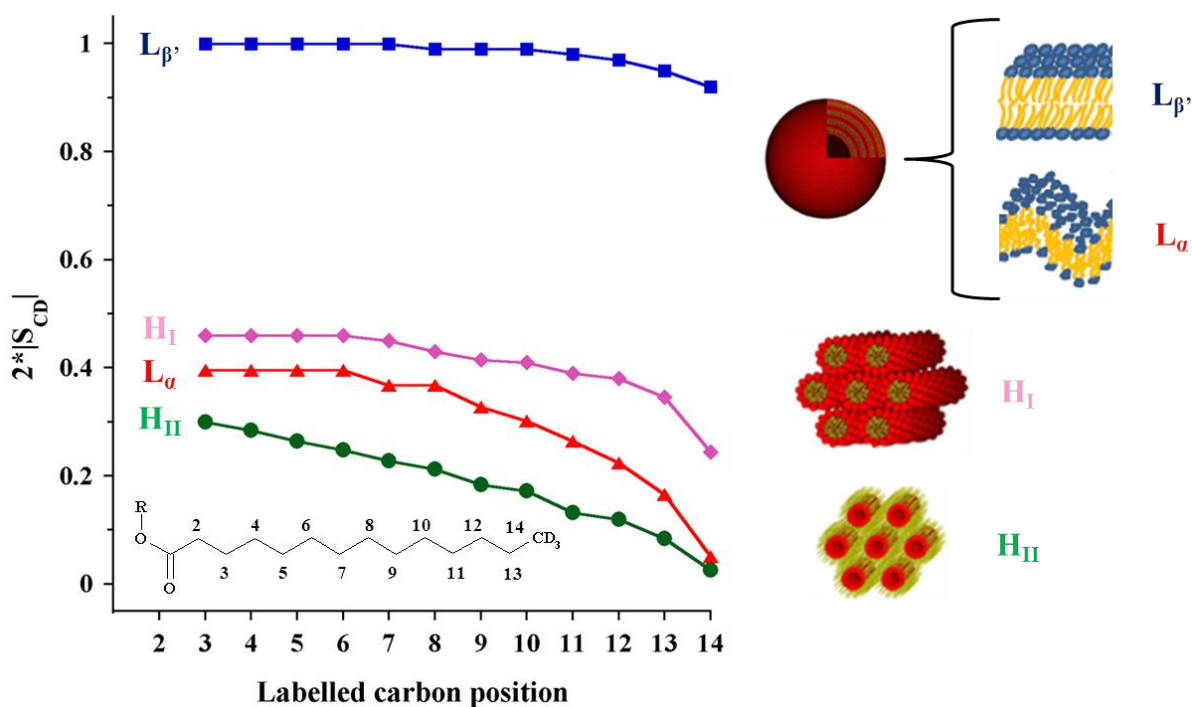


Figure II.17 : Profils des paramètres d'ordre S_{CD} dans le cas de phases lipidiques lamellaire gel $L_{\beta'}$, lamellaire fluide L_{α} , hexagonale de type H_I et hexagonale de type H_{II} . Le lipide utilisé est le DMPC- d_{27} . Ces profils sont construits à partir des S_{CD} obtenus pour chaque position marquée le long de la chaîne sn-2 du lipide, hormis la position en 2 qui n'est pas prise en compte. Les différentes phases sont présentées à droite des profils.

z''). Les fluctuations de la liaison C-²H par rapport à la normale à la bicouche peuvent alors être estimées par les paramètres d'ordres S_{ii} :

$$S_{ii} = \frac{3\langle \cos^2\theta_i \rangle - 1}{2} \quad (\text{II.41})$$

où i représente le système d'axe (x',y',z') de la liaison C-²H (avec z' colinéaire à l'axe principal du gradient de champ électrique). Le terme $\langle \cos^2\theta_i \rangle$ décrit la moyenne temporelle des fluctuations par rapport à l'axe directeur du lipide, z''. Du fait de la rotation du lipide sur lui-même, S_{z'z''} est suffisant pour rendre compte des fluctuations (S_{z'z''} = -2S_{y'y''} = -2S_{x'x''}). On peut ainsi exprimer l'éclatement quadrupolaire (équation II.34) en fonction de ce paramètre d'ordre :

$$\Delta\nu_Q(\beta') = \frac{3}{2}A_Q \left| \frac{3\cos^2\beta' - 1}{2} \right| S_{z'z''} \quad (\text{II.42})$$

β' est ici l'angle entre l'axe z' de la normale à la bicouche et le champ magnétique \vec{B}_0 . Dans le cas de la liaison C-²H, l'axe principal du gradient de champ électrique est quasiment colinéaire à l'axe de la liaison. S_{z'z''} peut être noté S_{CD}. Ainsi, les fluctuations des liaisons C-²H sont reliées à l'éclatement quadrupolaire suivant la relation :

$$\Delta\nu_Q(\beta') = \frac{3}{2}A_Q \left| \frac{3\cos^2\beta' - 1}{2} \right| S_{CD} \quad (\text{II.43})$$

Pour β = 90°, le terme $\left(\left| \frac{3\cos^2\beta' - 1}{2} \right| \right)$ est égal à 1/2. Ainsi, une estimation du paramètre d'ordre pour chaque liaison C-²H peut être obtenue en mesurant les éclatements quadrupolaire visibles sur le spectre. Les différents S_{CD} sont obtenus par la relation :

$$\Delta\nu_Q(90) = \frac{3}{4}A_Q S_{CD} \quad (\text{II.44})$$

Dans certains cas, la détermination des S_{CD} peut être rendue délicate à cause d'un rapport signal/bruit faible ou dans le cas de spectres asymétriques. Ainsi, une estimation global de l'ordre des chaînes peut être obtenue en utilisant le premier moment spectral M₁, selon la relation suivante (Davis, 1979 ; Beck et al., 2007):

$$\langle S_{CD} \rangle_{chaîne} = \frac{\sqrt{3}}{\pi A_Q} M_1 \quad (\text{II.45})$$

Le paramètre 2⟨S_{CD}⟩_{chaîne} est reporté sur les figures représentant les variations de M₁ en fonction de la température sur un second axe en ordonnée (figure II.16). Le facteur 2 représente le fait que l'orientation moyenne des liaisons C-²H par rapport à l'axe directeur du lipide est de 90°. Cela n'est pas entièrement vrai pour le CD₃ terminal et pour les deutérons en position 2' de la chaîne sn-2 ou un facteur géométrique additionnel doit être utilisée, l'orientation des liaisons C-²H n'étant ici pas égale à 90°.

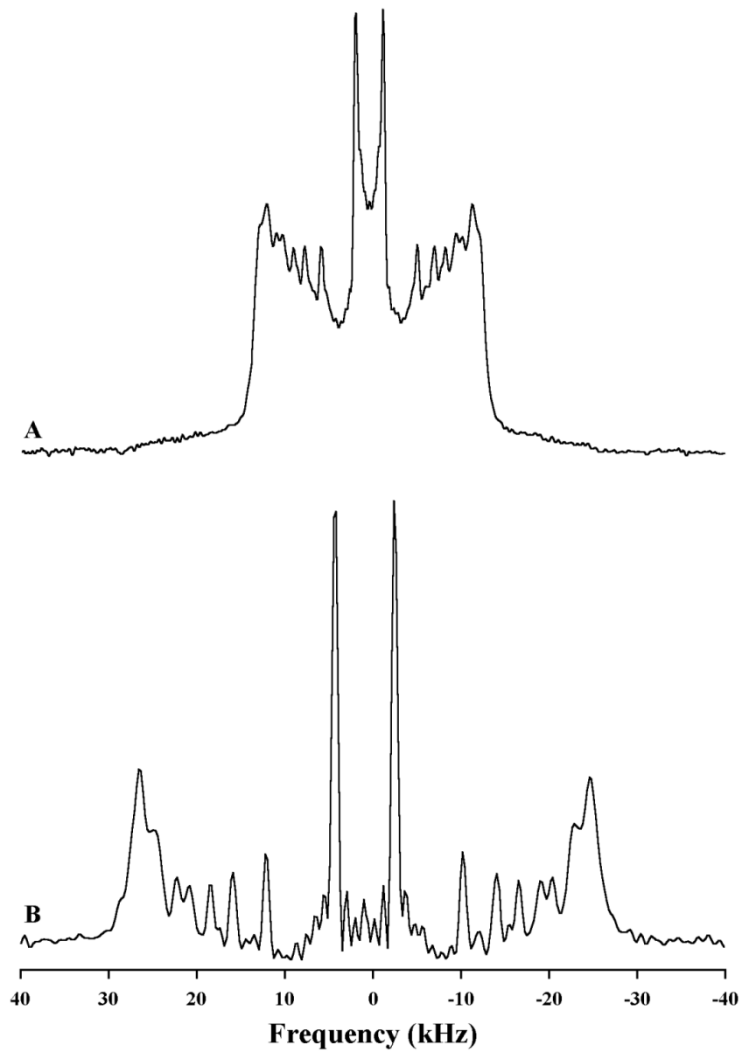


Figure II.18 : Illustration de la technique de déconvolution spectrale (ou « de-Pake-ing ») sur un spectre de MLV de DMPC-d₂₇. (A) Spectre expérimental ; (B) Spectre déconvolué, seules les résonances pour $\beta^2=0^\circ$ sont ici visibles.

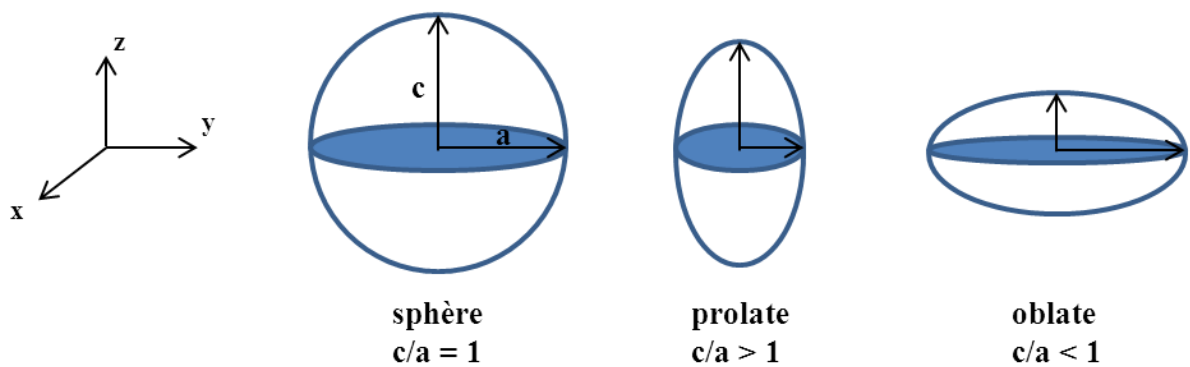


Figure II.19: Illustration du paramètre c/a rendant compte de la déformation du système lipidique dans le champ magnétique.

Cette approximation permet d'avoir une estimation de l'ordre de la chaîne entre $2\langle S_{CD} \rangle = 1$ pour un système rigide et $2\langle S_{CD} \rangle = 0$ pour un système complètement désordonné

La **figure II.17** donne les profils d'ordre des paramètres S_{CD} obtenus pour un système lipidique en phase lamellaire gel ou fluide et hexagonal de type H_I ou H_{II} . Plus un système est rigide (cas d'une phase lamellaire gel $L_{\beta'}$), plus les valeurs des S_{CD} sont proches de 1. A l'inverse, plus la fluidité est importante (cas d'une phase H_{II}), plus les valeurs tendent vers 0. Les profils d'ordre sont donc un indicateur de la dynamique du système. De ce fait, il n'est pas surprenant de constater que les S_{CD} relatifs à une phase H_{II} sont inférieurs à ceux d'une phase H_I . Les liaisons $C-^2H$ sont plus mobiles dans le premier cas puisqu'elles ont plus de liberté de mouvement lorsqu'elles pointent vers l'extérieur. De plus, plus on descend le long de la chaîne acyle, plus les S_{CD} sont faibles car la dynamique de la chaîne augmente au centre du cœur hydrophobe de la membrane. Cet effet se traduit par une allure décroissante du profil d'ordre.

II.D.2.c Obtention des paramètres d'ordre – « de-Pake-ing » et simulation

Du fait de la superposition de tous les signaux relatifs à chaque position marquée au deutérium le long de la chaîne acyle et à chaque orientation des liaisons $C-^2H$, il est difficile de mesurer avec précision les éclatements quadrupolaires. De plus, pour des spectres de faible résolution ou lors de coexistence de phases, il est tout simplement impossible d'obtenir l'ensemble des éclatements quadrupolaires relatifs à toutes les liaisons $C-^2H$. Pour remédier à ce problème, deux méthodes de traitements des spectres sont à notre disposition : la déconvolution spectrale appelée aussi « de-Pake-ing » et la simulation des spectres.

Le de-Pake-ing

Mis au point par Blomm et ses collaborateurs (Blomm et al., 1981), le « de-Pake-ing » est une procédure mathématique analogue à une déconvolution qui permet de construire un spectre orienté à un angle β' donné (0° dans notre cas) à partir du spectre de poudre expérimental (**figure II.18A**). On s'affranchit ainsi de toutes les orientations hormis celle considérée. Le spectre présente alors une superposition de $2N$ raies de résonances (avec N le nombre de liaisons $C-^2H$ non équivalentes) centrées sur la fréquence de Larmor fixée dans notre cas à 0ppm (**figure II.18B**). Les différents éclatements quadrupolaires peuvent être alors facilement déterminés sur le spectre déconvolué. On remonte alors au paramètre d'ordre *via* l'équation :

$$\Delta\nu_Q(0) = \frac{3}{2}A_Q S_{CD} \quad (\text{II.46})$$

Cependant, il peut arriver que la résolution du spectre soit trop faible pour obtenir tous les éclatements quadrupolaires par la méthode de déconvolution spectrale empêchant le tracé précis du

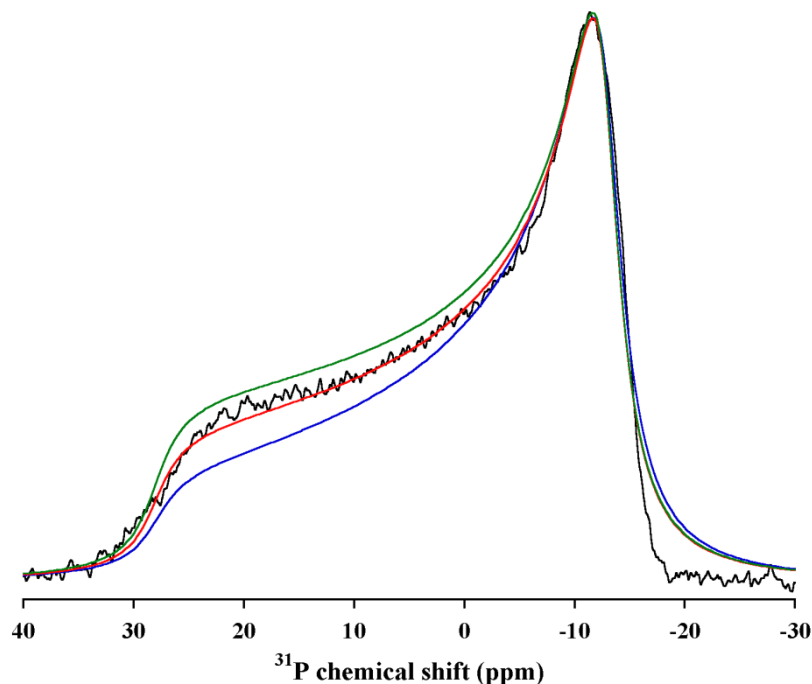


Figure II.20 : Influence de la valeur du paramètre c/a sur l'allure du spectre ^{31}P simulé dans le cas de vésicules multilamellaires de DMPC- d_{27} en phase fluide. Le spectre expérimental est présenté en noir. Le paramètre c/a est égal respectivement à 0.95 (en vert), 1.10 (en bleu) et 1 (en rouge). La simulation optimale retenue est celle où $c/a = 1$. L'intensité des spectres simulés est référencée par rapport à celle de la position σ_{\perp} du spectre expérimental.

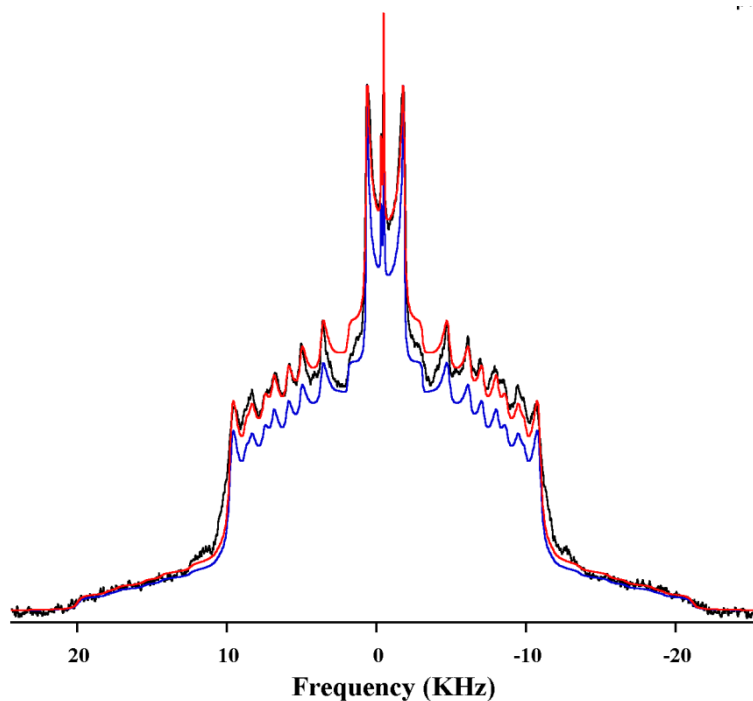


Figure II.21 : Influence de la valeur du paramètre $\Delta\nu_{1/2}$ relatif au groupement méthyle terminal sur l'allure du spectre ^2H simulé dans le cas de vésicules multilamellaires de DMPC- d_{27} en phase fluide. Le spectre expérimental est présenté en noir. La valeur de $\Delta\nu_{1/2}$ est égale respectivement à 100 Hz (en bleu) et à 180 Hz (en rouge). La simulation optimale retenue est celle où $\Delta\nu_{1/2} = 180\text{Hz}$. Les intensités sont référencées par rapport à celle du doublet de Pake du méthyle terminal du spectre expérimental et son paramètre c/a est fixé 1.

profil d'ordre. Dans ces conditions, le spectre deutérium est simulé afin d'obtenir une valeur précise des différents paramètres d'ordre pour chaque position deutérée de la chaîne acyle du lipide.

La simulation d'un spectre RMN

La simulation a été effectuée grâce à deux programmes FORTRAN élaborés par E.J. Dufourc (non publié), « multicsa » pour les spectres RMN du deutérium et « multiqelps » pour les spectres RMN du phosphore. Nous détaillerons dans cette partie la méthode utilisée pour obtenir la simulation des spectres RMN ^2H et ^{31}P dans le cas d'un échantillon contenant un seul lipide marqué sans coexistence de phase. Dans le cas du spectre deutérium, nous prendrons l'exemple d'un spectre de DMPC-d₂₇ deutérée uniquement sur sa chaîne sn-1.

Les programmes nécessitent la connaissance de cinq paramètres pour chaque position marquée i ; 14 positions dans le cas d'un spectre deutérium du DMPC-d₂₇ et 1 position dans le cas d'un spectre phosphore, ce qui représente respectivement 70 (14x5) et 5 variables. Bien entendu, le nombre de variables augmente en cas de coexistence de phase. Ces paramètres sont décrits dans le **tableau II.3**.

RMN du deutérium		RMN du phosphore	
<i>Paramètres</i>	<i>Descriptif</i>	<i>Paramètres</i>	<i>Descriptif</i>
$\Delta\nu_Q(0)$	Eclatements quadrupolaires à 0° obtenus à partir du "de-Pake-ing"	CSA	Anisotropie de blindage électronique mesurée sur le spectre
$\Delta\nu_{1/2}$	Largeur à mi-hauteur du doublet de Pake relatif à la position marquée i	$\Delta\nu_{1/2}$	Largeur à mi-hauteur pour une population donnée i
ν_{iso}	Fréquence du signal correspondant à l'échantillon isotrope	ν_{iso}	Fréquence du signal correspondant à l'échantillon isotrope
P	Nombre de deutérons par position marquée i : 2 pour les CD ₂ *, 3 pour le méthyl terminal	P	Nombre de phosphore par lipide
c/a	Déformation globale du système lipidique (<i>cf. figure II.19</i>)	c/a	Déformation globale du système lipidique (<i>cf. figure II.19</i>)

Tableau II.3 : Description des paramètres utilisés pour la simulation des spectres RMN ^2H et ^{31}P . * Pour la position en α du carbonyle (position 2), ceci n'est vrai que pour la chaîne sn-1 du lipide. Pour la chaîne sn-2, les deux deutérons en position 2, 2S et 2R, ne sont pas équivalents. Les liaisons C- ^2H respectives présentent alors des éclatements quadrupolaires différents. On les différencie donc lors de la simulation et chacune prend un poids de 1.

D'un point de vue pratique, les paramètres sont initialisés puis affinés de manière à optimiser le spectre simulé pour qu'il tende vers le spectre expérimental. La valeur de chacun des paramètres diffère suivant la position marquée et influe sur la forme du spectre simulé obtenue. Les paramètres ayant un fort impact sur la forme du spectre sont le poids de chaque position (fixé dans notre cas), le rapport c/a et les éclatements quadrupolaires $\Delta\nu_{1/2}$ comme on peut le voir sur les **figures II.20** et **II.21**. La **figure II.20** présente les simulations du spectre RMN ^{31}P de vésicules multilamellaires de DMPC-

d_{27} obtenues pour trois valeurs de c/a (0.95, 1 et 1.10). La largeur à mi-hauteur $\Delta\nu_{1/2}$ est optimisée dans un premier temps pour simuler la position σ_{\perp} (position la plus intense). L'anisotropie de déplacement chimique CSA est ensuite optimisée pour simuler la position en fréquence de la position σ_{\parallel} . Nous pouvons ainsi constater que le rapport c/a a une grande influence sur l'intensité de la position σ_{\parallel} . Un rapport c/a de 1 donne le spectre simulé le plus satisfaisant. C'est cette valeur qui a été retenue pour la simulation du spectre RMN ^2H deutérium du même échantillon (**figure II.21**). La **figure II.21** présente les spectres simulés pour deux valeurs de $\Delta\nu_{1/2}$ (100 et 180Hz) pour le doublet de Pake du groupement méthyle terminal (position 14), l'éclatement quadrupolaire $\Delta\nu_Q$ pour cette position ayant optimisé en premier lieu. Les paramètres $\Delta\nu_Q$ et $\Delta\nu_{1/2}$ de cette position sont en effet ceux qui ont le plus d'impact sur l'allure de la simulation. La simulation obtenue pour $\Delta\nu_{1/2}=180\text{Hz}$ a été retenue car c'est celle qui simule le mieux la largeur et le creux de ce doublet de Pake. Dans un deuxième temps, les paramètres des autres positions sont optimisés de manière à obtenir la superposition la plus satisfaisante entre le spectre simulé et le spectre expérimental.

L'optimisation des spectres simulés peut nécessiter beaucoup de temps notamment pour les spectres RMN ^2H en raison du grand nombre de paramètres à optimiser. Lorsque la simulation est jugée satisfaisante, les éclatements quadrupolaires obtenus *in fine* sont utilisés pour le calcul des S_{CD} à partir de l'équation II.46. Un profil d'ordre peut alors être tracé avec précision.

II.E La diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS)

La diffusion des rayons X aux petits angles est une méthode de caractérisation directe et performante des propriétés structurales des membranes. La position et l'intensité des maxima de diffusion renseignent à la fois sur l'homogénéité de l'échantillon (séparation de phases), la nature des phases lipidiques (lamellaires, cristallines...) et les caractéristiques spatiales (période de répétition du motif lamellaire, épaisseur de l'objet...). Des détails sur la structure des bicouches lipidiques (organisation moléculaire) peuvent aussi être obtenus car l'intensité diffusée reflète la distribution de la matière diffusante. Cette technique permet d'avoir des informations sur des objets dont la taille varie de quelques Å à 1000 Å.

Le principe d'une expérience de diffusion consiste à envoyer un faisceau monochromatique sur un échantillon et à mesurer l'intensité diffusée par ce dernier (**figure II.22**). Dans le cas de la diffusion des rayons X, l'interaction onde-matière s'effectue entre les photons du faisceau incident et les électrons de l'échantillon ; les fluctuations de densité électronique dans les membranes vont donc moduler l'intensité diffusée.

La diffusion d'une structure possédant un motif de répétition, comme les bicouches lipidiques, peut être définie en termes de réflexions par des plans d'égale densité de diffusion (**figure II.23**). Les ondes réfléchies sont en phase et donc en interférences constructives que si l'angle

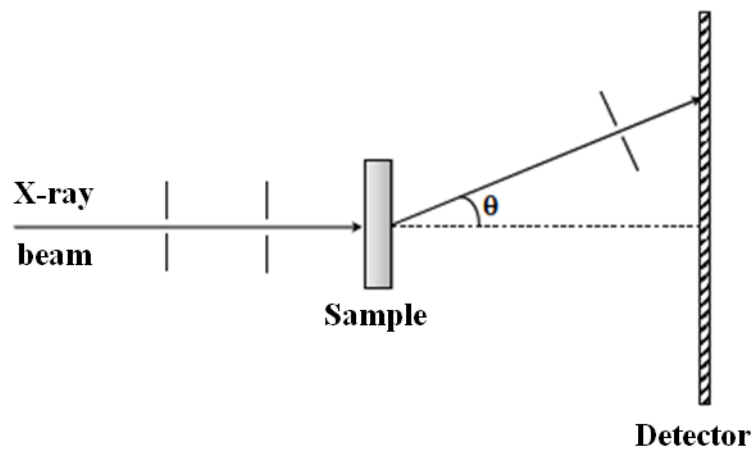


Figure II.22 : Schéma simplifié d'un montage de diffusion

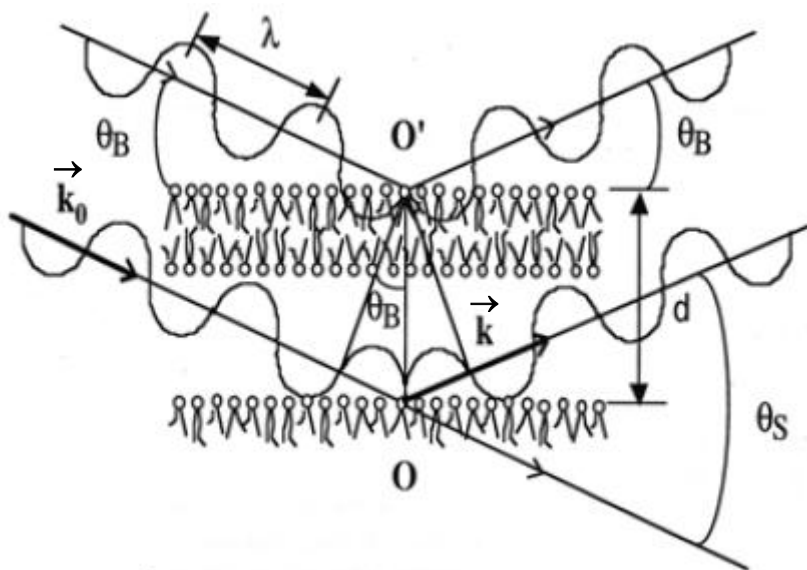


Figure II.23 : Schéma illustrant la loi de Bragg. λ est la longueur d'onde de l'onde incidente, \vec{k}_0 le vecteur d'onde de l'onde incidente, \vec{k} le vecteur d'onde de l'onde réfléchie, θ_B est l'angle entre le plan des bicouches et \vec{k} (ou la moitié de l'angle θ_S entre l'onde incidente et l'onde diffusée) et d le motif de répétition de la structure lamellaire (d'après Faure, 1996).

d'incidence et l'angle de réflexion sont égaux et si la différence de marche δ entre deux ondes réfléchies par deux plans adjacents est un multiple de la longueur d'onde λ de l'onde incidente. Cette différence de marche s'exprime de la façon suivante :

$$\delta = \lambda \vec{r} \cdot \vec{S} \quad (\text{II.47})$$

où $\vec{r} = \overrightarrow{OO'}$ et $\vec{S} = \vec{k} - \vec{k}_0$ avec \vec{k}_0 et \vec{k} les vecteurs d'onde respectivement de l'onde incidente et de l'onde réfléchie.

L'interaction du rayonnement avec la matière étant de nature élastique (c'est-à-dire qu'elle s'effectue sans transfert d'énergie), les vecteurs d'onde \vec{k} et \vec{k}_0 ont donc le même module $1/\lambda$.

D'après l'équation II.47 et la figure II.23, on établit la relation de Bragg :

$$\delta = 2d \sin \theta_B = h\lambda \quad (\text{II.48})$$

où θ_B est l'angle entre le plan des bicouches et l'onde incidente (ou la moitié de l'angle entre le rayon diffusé et le rayon incident ($\theta_s/2$), h l'ordre de la diffusion égal à $0, \pm 1, \pm 2 \dots$ et d la distance entre deux bicouches.

Par convention, les spectres de diffusion des rayons X expriment l'intensité diffusée I en fonction du vecteur d'onde de diffraction \vec{q} , lequel est relié au vecteur \vec{S} par l'expression :

$$\vec{q} = 2\pi\vec{S} \quad (\text{II.49})$$

D'après les équations II.47, II.48 et II.49, le module du vecteur q s'exprime de la façon suivante :

$$q = \frac{4\pi \sin(\theta_B)}{\lambda} = \frac{2\pi h}{d} \quad (\text{II.50})$$

L'unité standard de q est \AA^{-1} .

Dans le cas d'une phase lamellaire, le module du vecteur d'onde de diffusion q est donc proportionnel à l'inverse de la distance de répétition, d , de la structure lamellaire étudiée. Un spectre de diffusion d'une phase lamellaire se présente donc sous la forme de x pics régulièrement espacés par la distance $2\pi/d$ (**figure II.24**). Le nombre de pics de Bragg sur la courbe de l'intensité diffusée I en fonction de q renseigne sur l'état d'organisation d'un échantillon ; plus ce dernier est structuré, plus l'ordre de la diffusion h est grand et plus le nombre de pics présents sur la courbe est important. La position en q des pics permet de calculer les distances de répétition d de chaque motif. Dans le cas d'une phase lamellaire, elle est obtenue selon l'équation (Kulkarni et al., 2011) :

$$S_{lam} = \frac{h}{d} \quad (\text{II.51})$$

Dans le cas d'une phase hexagonale, la distance de répétition, notée a (**figure II.25**), est obtenue grâce à l'équation (Kulkarni et al., 2011) :

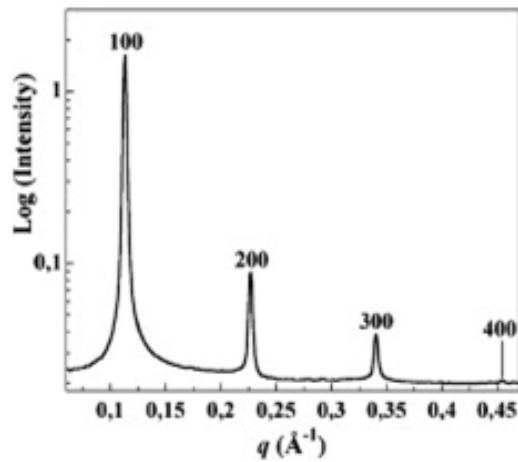


Figure II.24 : Exemple de profil d'intensité en fonction du vecteur d'onde de diffusion q obtenu pour une phase lamellaire L_α . Cas d'une dispersion de DGDG (d'après Bottier et al., 2007).

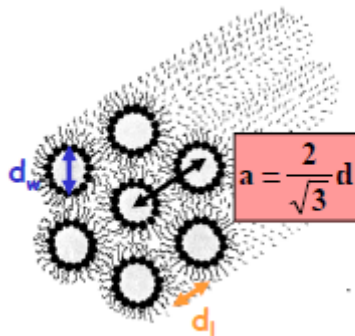


Figure II.25 : Schéma représentant la distance de répétition a dans le cas d'une phase hexagonale. d_w = diamètre du cylindre aqueux ; d_l = épaisseur de la bicouche lipidique (d'après Dufourc, 2004).

$$S_{hex} = \frac{2\sqrt{h^2+k^2+hk}}{a\sqrt{3}} \quad (\text{II.52})$$

où h et k sont les indices de Miller (indice utilisés pour désigner les plans dans un cristal).

CHAPITRE III

**Les interactions tannin-lipide impliquées dans l'amertume ?
Etude de l'effet des tannins sur la dynamique des
membranes par RMN des solides**

Résumé:

L'amertume est le goût le plus ressenti lors de la dégustation d'un vin. Elle résulte d'interactions entre certaines molécules du vin, comme les tannins, et les récepteurs du goût situés notamment au niveau des papilles gustatives de l'épithélium lingual et des muqueuses buccales (palais mou). Ces récepteurs gustatifs, de nature transmembranaire, pourraient être affectés par un changement dans la dynamique de la membrane lipidique dans laquelle ils sont enchâssés, ce qui pourrait influencer sur la sensation d'amertume ressentie. Ainsi, ce chapitre s'intéresse à l'influence des tannins sur la dynamique de modèles membranaires mimant les membranes buccales. La RMN des solides des noyaux ^2H et ^{31}P a été utilisée pour cette étude. L'étude réalisée dans un premier temps sur des MLV de DMPC montre que les tannins fluidifient le système lipidique et augmentent la dynamique en surface et au niveau du cœur hydrophobe. Ces effets, retrouvés pour les trois tannins étudiées (C, EC et EGCG) sont dose-dépendants et varient en fonction de la structure du tannin. Afin de se rapprocher de la composition des membranes biologiques et des conditions mimant la dégustation, les MLV ont été dopées avec du cholestérol (18% molaire) en présence ou non d'éthanol (12% volumique). En présence de cholestérol seul, la catéchine induit une fluidification et une désorganisation du cœur hydrophobe des MLV plus importante. Ces deux effets sont atténués en présence d'éthanol. Enfin, la catéchine s'est avérée n'avoir aucun effet sur un modèle mimant la composition lipidique de la muqueuse buccale, POPC/POPE/GSL/SM/CH (1.5/1.8/1.5/1.2/4) en présence d'éthanol. La nature plus ou moins fluide de la membrane lipidique est donc déterminante sur l'effet fluidifiant des tannins.

Le goût est un indicateur de la composition nutritionnelle d'un aliment et peut agir comme un signal lors de l'ingestion d'une substance potentiellement toxique par l'organisme. Ainsi, un goût sucré est l'indicateur d'aliment riche en sucre et donc énergétique. A l'inverse, un goût trop amer peut mettre l'individu en alerte contre une substance ingérée potentiellement nocive. Le goût contribue aussi au plaisir ressenti lors de la dégustation d'un mets. La notion de goût résulte en effet d'une interaction entre un ligand et les récepteurs localisés au niveau des cellules réceptrices du goût qui vont moduler leurs réponses selon le type de molécules interagissant (Chandrashekar et al., 2006). Ces cellules sont localisées au niveau des bourgeons du goût que l'on retrouve majoritairement au niveau des papilles gustatives de la langue (75%) mais aussi au niveau du palais mou, du pharynx et des parties supérieures de l'œsophage.

Il existe cinq types de gout : sucré, salé, acide, amer et umami (Ikeda., 2002, Lindemann et al., 2002). Le goût amer est avec la sensation d'astringence, la propriété organoleptique principale des tannins. L'amertume est donc ressentie lors de la dégustation d'un vin. Néanmoins, contrairement à l'astringence qui possède un caractère tactile, elle résulte d'une interaction entre les tannins du vin et les récepteurs du goût. Ceux-ci sont enchâssés dans la membrane des cellules gustatives. Ainsi, on peut supposer qu'un changement dans la dynamique des lipides proches du récepteur va perturber cette interaction et moduler l'amertume ressentie. L'objectif de ce chapitre a donc été d'étudier l'effet des tannins sur différents modèles membranaires du plus simple au plus représentatif des membranes buccales.

Le premier modèle utilisé a été des vésicules multilamellaires de DMPC. Ces liposomes, constitués de plusieurs bicouches mimant les différentes strates des membranes, sont couramment utilisés en tant que modèles des membranes naturelles (Zhendre et al., 2011, Warschawski et al., 2011, Beck et al., 2007). Le DMPC a en outre été bien étudié dans la littérature (Aussenac et al., 2003, Takaoka et al., 2000, Douliez et al., 1996). Les vésicules ont ensuite été dopées avec du cholestérol à un pourcentage molaire de 18 %, de manière à représenter la teneur moyenne en cholestérol des membranes biologiques, teneur pouvant varier de 0% (membranes des globules rouges) à 40% (membranes buccales). Enfin, le modèle POPC/POPE/GSL/SM/CH (1.5/1.8/1.5/1.2/4) a été utilisé. Ce modèle mime la composition en lipides et en acides gras des membranes buccales notamment avec une teneur en cholestérol de 40%.

La sensation d'amertume étant plus ressentie que la sensation d'astringence pour des flavonoïdes possédant une masse molaire inférieure à 500g/mol (Noble, 1994), nous avons choisi trois tannins ayant une masse molaire faible et présents dans le vin, la catéchine (290.27g/mol), l'épicatéchine (290.27g/mol) et l'épigallocatechine gallate (458.37g/mol). La RMN des solides ^2H et ^{31}P a été utilisée pour cette étude car c'est une technique de choix pour étudier la dynamique des membranes.

Nous examinerons l'effet des tannins sur la dynamique des trois modèles membranaires.

L'influence de la structure des tannins sur la dynamique sera abordée dans le cas des MLV de DMPC. Afin de mimer les conditions du vin, l'effet de l'éthanol sera étudié.

III.A Etude de l'effet des tannins sur des MLV de DMPC deutéré

Les études réalisées sur la dynamique des MLV de DMPC (deutérimé sur une ou deux chaînes) en absence et en présence de tannin seront présentées initialement. Ce travail a été initié par Aurore Castets sous la direction d'Isabelle Pianet lors d'un stage de Master 2 réalisé au laboratoire en 2008. L'ensemble de ces données a été à nouveau analysé puis complété par mes soins. Il est rappelé que pour cette étude, les tannins ont été insérés au système lipidique par cosolubilisation pour deux rapports molaires T/L, 1/8 et 1/20.

III.A.1 Etude du système seul

La **figure III.1A** présente les spectres deutérium de vésicules multilamellaires de DMPC-d₂₇ deutéré sur la chaîne sn-2 obtenus à trois températures, 15, 20 et 25°C. A 15°C et 20°C, les spectres ne présentant pas de symétrie axiale sont larges et peu résolus. Aucun doublet de Pake n'est ici visible. La largeur importante traduit la faible mobilité des chaînes acyles soumises au seul mouvement de rotation autour de l'axe long de la molécule, lorsque le DMPC est en phase lamellaire gel L_β, comme c'est le cas ici (T < T_m = 21.5 ± 1°C, Aussenac et al., 2003). A 25°C, le spectre de poudre obtenu moins large et mieux résolu présente une symétrie axiale et résulte d'une superposition des différents doublets de Pake relatifs aux liaisons C-D le long de la chaîne acyle. L'augmentation de la résolution ainsi que la diminution de la largeur du signal sont dues à une augmentation importante de la dynamique des chaînes acyles relative au passage de la phase gel à la phase lamellaire fluide L_α, dans laquelle les lipides sont soumis à plus de mouvements (balancement des chaînes, isomérisation gauche-trans). Il est à noter que le groupement méthyle terminal possède un mouvement supplémentaire (rotation autour de la liaison C₁₃-C₁₄) par rapport aux C-D₂, ce qui se traduit par un éclatement quadrupolaire faible (correspondant au doublet de Pake le plus intense).

Une première estimation de la température de transition de phase gel/fluide T_m peut être effectuée à la seule lecture des spectres. Toutefois, cette information peut être obtenue de façon quantitative *via* l'étude de la variation du premier moment spectral M₁ relatif aux chaînes acyles en fonction de la température (**figure III.1B**). Le paramètre d'ordre globale 2*⟨S_{CD}⟩ est présenté sur un double axe y afin de traduire les M₁ en termes de fluidité ou de rigidité. Dans le cas d'une phase fluide, les lipides sont

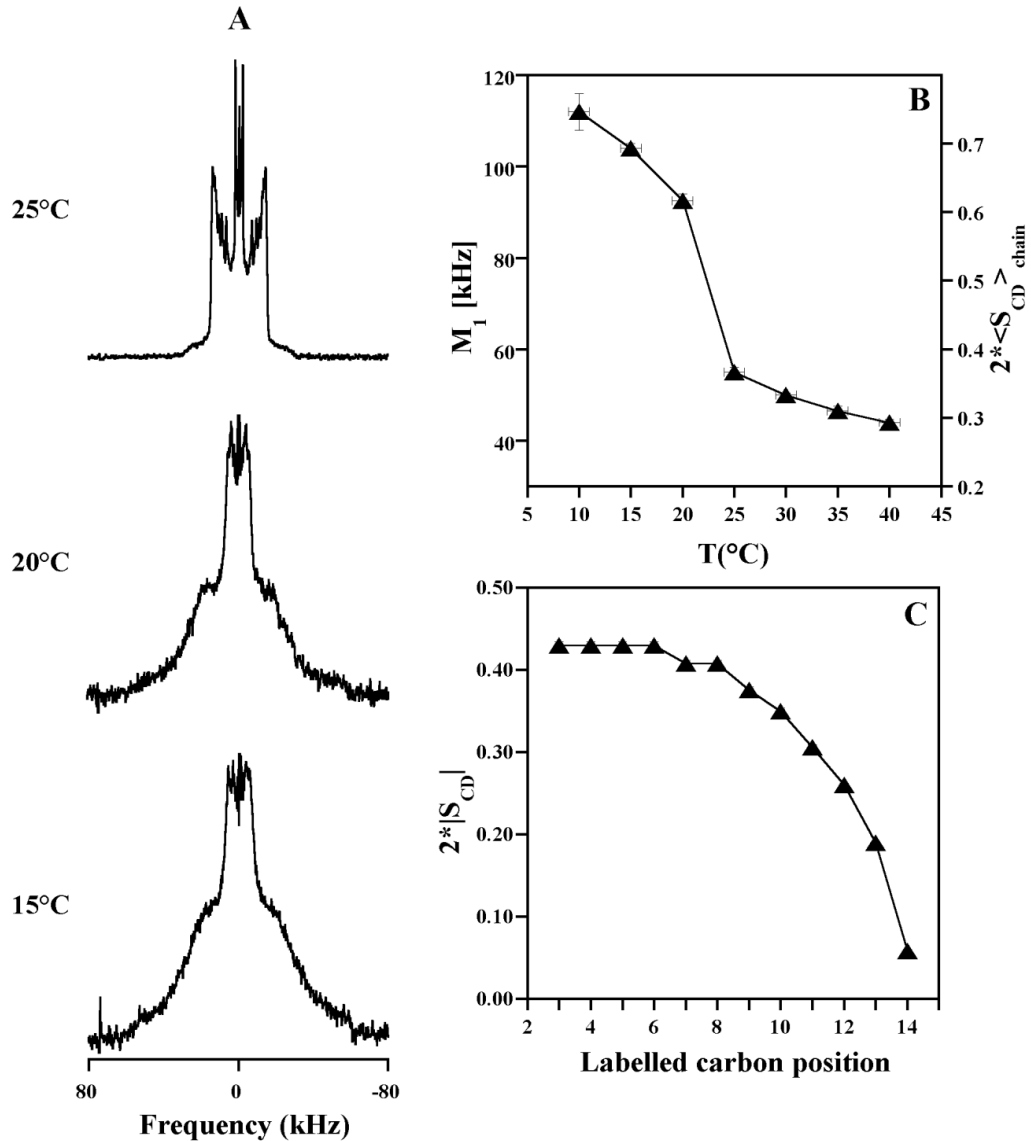


Figure III.1: (A) Spectres RMN du deutérium (intensité relative) de vésicules multilamellaires de DMPC-d₂₇ au-dessus et en-dessous de la température de transition de phase du lipide (21.5°C). Nombre d’acquisition : 6k. (B) Moments spectraux d’ordre 1 et paramètre d’ordre moyen des chaînes acyles deutérées ($2\langle S_{CD} \rangle_{\text{chaîne}}$) du système correspondant. L’erreur est estimée à $\pm 1-3\%$ pour les moments spectraux et à $\pm 1.5^\circ\text{C}$ pour les températures. L’erreur pour les paramètres d’ordres moyens est estimée à ± 0.025 . (C) Profil d’ordre représentant le paramètre d’ordre local S_{CD} en fonction de la position de la liaison C-D sur la chaîne sn-2 du DMPC-d₂₇. Les paramètres d’ordre ont été déterminés à partir du spectre « de-Pake-ing » à 0° (cf figure III-3). T = 30°C. L’erreur estimée est localisée dans le symbole.

soumis à plus de mouvements que dans le cas d'une phase gel, leur mobilité est alors plus grande ce qui se traduit par un rétrécissement du spectre. Ainsi, il n'est pas surprenant de constater que pour le cas d'une phase lamellaire fluide L_{α} , les valeurs du moment spectral M_1 sont plus basses (55-45 kHz) que pour le cas d'une phase lamellaire gel L_{β} , plus ordonnée (110-90 kHz). La température de transition de phase T_m entre phase gel et phase fluide peut ainsi se mesurer par la détermination du point d'inflexion de la courbe. La température de transition T_m obtenue dans notre cas est de 22.5°C. On retrouve ici la valeur de 21.5° ± 1°C obtenue par Aussenac et al. à l'erreur expérimentale près.

Enfin, la dernière information rapportée par la RMN du deutérium est relative à l'ordre orientationnel de la chaîne acyle. Dans le cas d'une phase lamellaire fluide, chaque doublet de Pake, hormis ceux situés en périphérie du spectre, sont bien résolus et identifiables les uns par rapport aux autres. Les éclatements quadrupolaires $\Delta\nu_Q$ correspondants peuvent ainsi être mesurés. Cette attribution s'effectue par « de-Pake-ing », simulation spectrale (cf. **chapitre II.D.2.c**) et en utilisant la littérature (Douliez et al. 1995). Les paramètres d'ordres S_{CD} associés à ces éclatements peuvent être ainsi reportés sur un profil d'ordre en fonction de la profondeur membranaire soit en d'autres termes en fonction de la position de la liaison C-D le long de la chaîne acyle. Pour chaque position, les paramètres d'ordres varient entre 0 (système liquide désordonné) et 1 (système gel figé). Ainsi, une diminution du profil d'ordre est synonyme d'une fluidification des chaînes acyles au fur et à mesure que l'on pénètre dans le cœur hydrophobe. A l'inverse, une augmentation de ce profil est le signe d'une rigidification des chaînes acyles (cf. **figure II.15**).

La **figure III.1C** présente le profil d'ordre obtenu pour le cas du DMPC-d₂₇ seul. Ce profil, typiquement observé dans le cas d'une phase lamellaire fluide L_{α} présente deux zones distinctes : une région plateau relative aux positions 3 à 8 suivis d'une région où les S_{CD} décroissent brutalement (position 9 à 14). La région plateau relative aux positions proches de la tête polaire du lipide correspond donc à une zone rigide dans la membrane, correspondant aux épaulements visibles en périphérie du spectre où les doublets de Pake sont très peu distinguables sur le spectre. Cela se traduit par des éclatements quadrupolaires très proches (variation des S_{CD} de 0.43 à 0.408) symbolisés par un plateau. Les positions 9 à 14 relatives aux positions proches du cœur de la bicouche correspondent quand à elle à une zone plus fluide de la membrane et à des doublets de Pake bien résolus sur le spectre ²H. Les éclatements quadrupolaires ont dans ce cas des valeurs bien distinctes.

Les deux deutérons en position 2 sur la chaîne sn-2 du lipide (notés 2S et 2R) ne sont pas équivalents et présentent des S_{CD} plus faibles que pour les positions 3 à 8. Ceci s'explique par la structure du lipide dans la membrane. En effet, la chaîne sn-2, du fait de la géométrie spatiale du glycérol, va adopter une structure coudée au niveau de la position 2 ce qui entraîne une dynamique différente pour

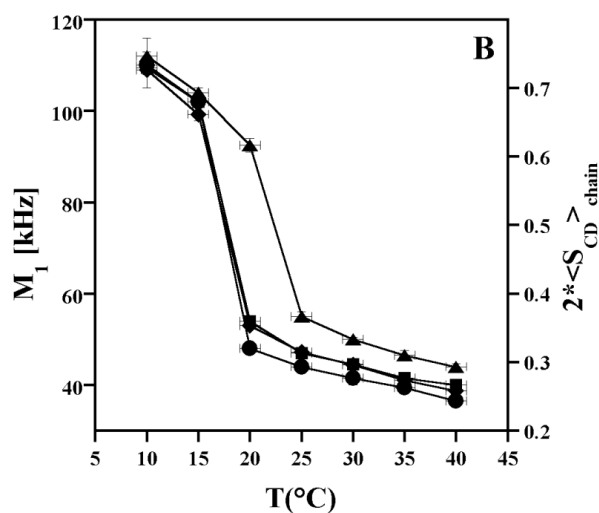
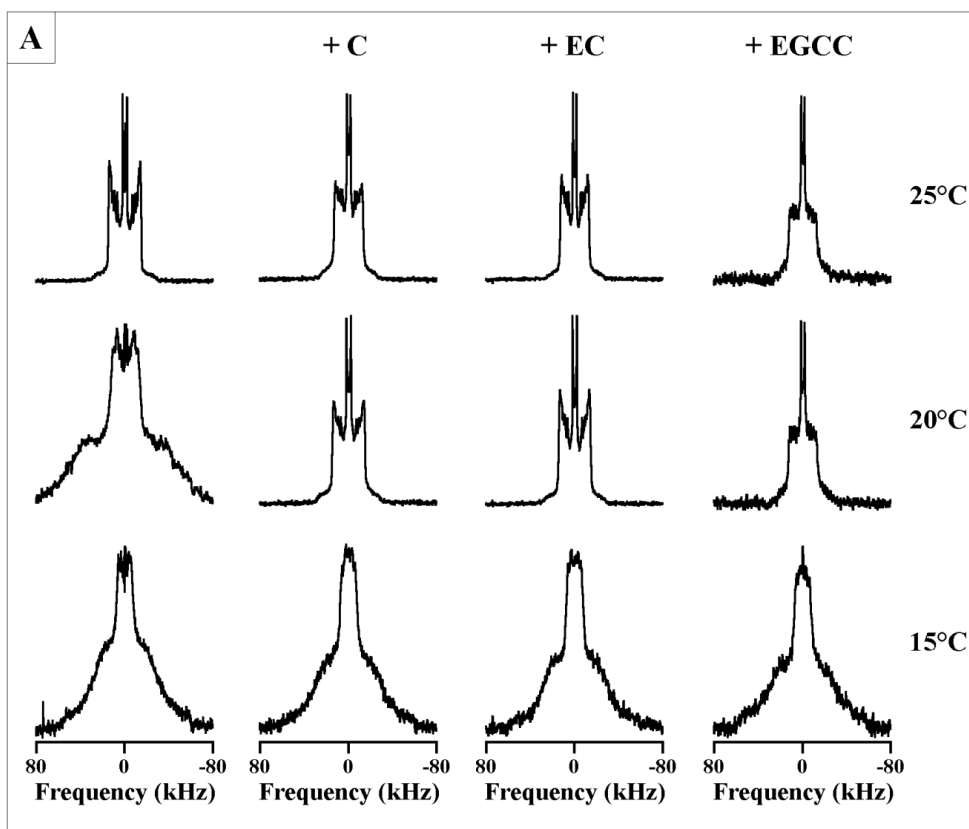


Figure III.2 : (A) Spectres de RMN du deutérium (intensité relative) des vésicules multilamellaires de DMPC-d₂₇ en absence et en présence de tannin (rapport molaire tannin/lipide de 1/8) à trois températures, 15, 20 et 25°C. Nombre d’acquisition : 3-4k dans le cas du modèle DMPC/EGCG et 6-8k dans les autres cas. Le centre du spectre est arbitrairement positionné à 0Hz. (B) Moments spectraux M₁ et paramètre d’ordre moyen des chaînes acyles deutérées ($2 \langle S_{CD} \rangle_{\text{chaîne}}$) calculées à l’aide des spectres de la figure III.2A en fonction de la température pour les systèmes DMPC seul (▲), C/DMPC (■), EC/DMPC (◆) et EGCG/DMPC (●). L’erreur est estimée à $\pm 1,5^\circ\text{C}$ pour les températures et à $\pm 1-3,5\%$ pour les moments M₁

les deux deutérons (Dufourc et al., 1983). En raison d'un rapport signal/bruit faible, leurs éclatements quadrupolaires n'ont pas pu être mesurés sur le spectre. Les paramètres d'ordre des positions 2S et 2R ne sont donc pas représentés.

III.A.2 Effet des tannins sur la dynamique du système

III.A.2.a Effet sur le thermotropisme des lipides

Afin d'étudier l'influence des tannins sur la dynamique globale du modèle membranaire, ainsi que sur les dynamiques des chaînes hydrophobes et de la tête polaire, des expériences en température ont été effectuées. L'étude a été réalisée dans un premier temps pour un rapport molaire T/L de 1/8. Les concentrations en tannin sont ici supérieures aux CMC. Aucune modification de l'aspect visuel notable n'a été constatée ; tous les échantillons en présence de tannin ont un aspect visuel laiteux comme dans le cas des vésicules multilamellaires seules.

La **figure III.2A** montre les spectres RMN ^2H obtenus à trois températures, 15, 20 et 25°C pour les MLV de DMPC- d_{27} en absence et en présence de tannin. A 15°C, le spectre détecté présente une allure caractéristique d'une phase lamellaire gel L_{β} pour chaque échantillon. Ainsi, aucun effet des tannins n'est détectable sur le spectre à cette température. A 20°C, une différence dans le profil des spectres est constatée suivant que l'on est en présence ou non de tannin. Dans le cas du lipide seul, les vésicules multilamellaires sont encore en phase gel. A l'inverse, en présence de tannin, et indépendamment de la nature du tannin, on observe un rétrécissement important de la largeur des raies et les spectres sont mieux résolus. Une symétrie axiale, typiquement observée dans le cas d'un spectre de poudre relatif à une phase lamellaire fluide L_{α} est par ailleurs visible. Les systèmes T/MLV sont donc en phase L_{α} à cette température. A 25°C, un rétrécissement peut être noté pour le cas du lipide seul signifiant que le système est désormais en phase fluide, mais aussi pour les systèmes T/MLV dont la dynamique est accrue sous l'effet de l'augmentation de la température.

Ces résultats montrent que la présence de tannin, galloylé ou non, diminue la température de transition de phase T_m du lipide, ce qui traduit un effet fluidifiant des polyphénols sur le modèle membranaire utilisé. En comparant les systèmes EGCG/MLV, C/MLV et EC/MLV, une diminution plus importante de la largeur spectrale semble être constatée pour le système EGCG/MLV. D'autres outils doivent toutefois être utilisés pour mettre en évidence une différence d'effet entre les tannins. Une étude sur la variation du moment spectral M_1 en fonction de la température a donc été effectuée (**figure III.2B**) pour les MLV de DMPC- d_{27} en présence et en absence de tannin. L'effet fluidifiant conclu précédemment peut alors être quantifié. Une diminution de 5°C de la température de transition de phase T_m du lipide est

constatée en présence des tannins. Celle-ci passe en effet de 22.5°C pour le cas du lipide seul à 17.5±1°C pour les échantillons T/MLV.

Outre la quantification de la T_m , l'étude de la variation des M_1 à une température donnée va permettre de quantifier l'effet des tannins sur la dynamique des chaînes acyles en fonction de la phase, gel ou fluide du lipide. En phase gel, il n'y a pas d'effet significatif des tannins par rapport au cas sans tannin ni des tannins entre eux. En effet, les variations des M_1 (3 kHz) sont englobées dans la barre d'erreur de chaque mesure (5 kHz). On peut noter que l'erreur sur les M_1 est plus importante en phase gel qu'en phase fluide car les spectres larges et peu résolus relatifs à la phase gel présentent un rapport signal/bruit faible.

En phase fluide, pour des températures supérieures à la température de transition de phase, une diminution notable des valeurs des M_1 est constatée pour les systèmes T/MLV comparés aux MLV seules. Par ailleurs, cette diminution est significative dans la mesure où elle est supérieure aux barres d'erreurs (< 1.5kHz). Cette diminution est plus importante dans le cas d'EGCG que dans les cas de C et EC dont les effets sont comparables. On peut conclure à un effet fluidifiant des tannins sur les chaînes acyles en phase fluide avec un effet plus marqué dans le cas du tannin galloylé. Ce résultat peut être corrélé avec les observations effectuées sur les spectres (diminution de la largeur spectrale plus importante dans le cas d'EGCG).

La RMN du phosphore 31 renseignant sur la dynamique et l'orientation de la tête polaire peut aussi être utilisée pour étudier le thermotropisme du système. La **figure III.3A** présente l'allure des spectres obtenus en phase fluide (L_α , 25°C) et gel (L_β , 10°C) pour les MLV de DMPC-d₂₇ en absence et en présence de tannin (ici la catéchine). Pour les MLV seules, des spectres de poudres à symétrie axiale caractéristiques d'une phase lamellaire sont observés, aussi bien en phase fluide qu'en phase gel. Cela est dû à la dynamique de la tête polaire qui est suffisamment importante en phase gel pour induire une symétrie axiale. Par ailleurs, un rétrécissement du spectre est constaté sur le spectre de la phase fluide. Celle-ci s'explique par une augmentation de la dynamique de la tête polaire du lipide lors de la transition vers la phase fluide. Dans le cas du système C/MLV, des spectres de poudre à symétrie axiale caractéristiques d'une phase lamellaire sont aussi observés, que ce soit à 10°C (phase gel) ou à 25°C (phase fluide). Ceux-ci sont similaires aux spectres obtenus pour le lipide seul mais possèdent une largeur spectrale légèrement moins importante, ce qui traduit l'effet fluidifiant du tannin sur les deux phases.

L'étude de l'effet des tannins sur le thermotropisme du système a été effectuée dans ce cas par le suivi des variations du moment spectral d'ordre 2 en fonction de la température (**figure III.3B**). En phase fluide, la tête polaire est plus mobile qu'en phase gel. Comme pour un spectre deutérium, cela se traduit par un rétrécissement du spectre comme vu précédemment. Ainsi, les valeurs des moments spectraux M_2 sont plus basses dans le cas d'une phase fluide que pour une phase gel. De ce fait, le profil obtenu

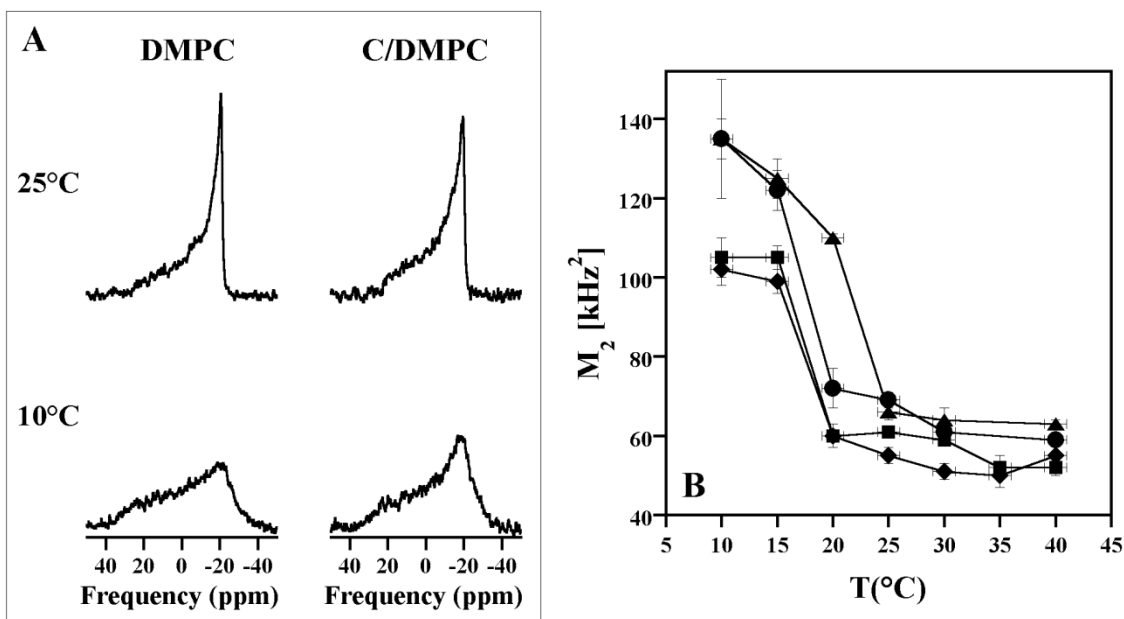


Figure III.3 : (A) Spectres RMN du phosphore (intensité absolue) sur des vésicules multilamellaires de DMPC en absence et en présence de catéchine à deux températures 10 et 25°C. Le rapport molaire tannin/lipide est de 1/8. Nombre d'acquisition : 1k. (B) Moments spectraux M_2 du DMPC calculés en fonction de la température pour les systèmes DMPC (▲), C/DMPC (■), EC/DMPC (◆) et EGCG/DMPC (●). Le rapport molaire tannin/lipide est de 1/8. L'erreur est estimée à $\pm 1.5^\circ\text{C}$ pour les températures et à $\pm 1-5\%$ pour les moments M_2 .

T (°C)	Anisotropie de déplacement chimique (ppm)			
	MLV	C/MLV	EC/MLV	EGCG/MLV
15°C	53.27	48 ± 1	47 ± 0.5	47 ± 1

Tableau III.1 : Anisotropie de déplacement chimique du DMPC-d₂₇ en présence et en absence de tannin. Le rapport molaire tannin/lipide est de 1/8. [L] = 157mM ; T = 15°C. Les CSA sont issus de spectre RMN ³¹P simulé à l'aide d'un logiciel FORTRAN (voir chapitre II.C.4.d pour plus de détail).

présente une cassure au niveau de la transition de phase. Ainsi, comme pour les M_1 , la température de transition de phase T_m du système peut être déterminée au point d'inflexion de la courbe. Les deux valeurs obtenues précédemment, $22.5 \pm 1^\circ\text{C}$ pour le lipide seul et $17.5 \pm 1^\circ\text{C}$ pour les systèmes T/MLV, sont retrouvées ici.

En phase gel, on observe une différence de comportement entre les deux tannins non galloylés, C et EC, et le tannin galloylé, EGCG. Pour EGCG, les valeurs de M_2 sont comparables à celles obtenus dans le cas du système seul alors qu'une diminution de 25kHz^2 est constatée pour C et EC. Cette distinction entre les deux tannins non galloylés et EGCG n'est pas retrouvée au niveau des anisotropies de déplacement chimique. En effet, à 15°C , l'anisotropie de déplacement chimique déterminée pour le système EGCG/MLV est différente de celle obtenue pour les MLV seules (47 vs. 53 ppm) mais est similaire à celle obtenue pour les deux autres tannins (**tableau III.1**).

Or, les moments spectraux de deuxième ordre sont aussi influencés par l'orientation du groupement phosphate. Ainsi, un changement d'orientation de ce groupement dû à l'insertion du tannin peut entraîner une variation de la valeur du M_2 obtenue. Au vu de la localisation du tannin à la surface du système lipidique (Uekusa et al., 2011), l'hypothèse d'une variation de la valeur des M_2 due à une réorientation de la tête phosphate par effet du tannin peut-être envisagée. Dans ce cas, l'étude des moments spectraux de deuxième ordre n'est pas un outil adéquat pour étudier la dynamique d'un système lipidique en phase fluide et en phase gel.

III.A.2.b Effet sur la dynamique locale des chaînes

La RMN du deutérium est un outil permettant d'étudier l'effet du tannin sur l'ordre des chaînes. De plus, une distinction peut être effectuée par exemple entre la dynamique des liaisons C-D proches de la tête polaire et celle au centre de la bicouche. Ces deux dynamiques étant différentes, on parle alors de dynamique locale. Les spectres deutérium obtenus en phase fluide présentent une meilleure résolution qu'en phase gel et la majeure partie des éclatements quadrupolaires y est visible. C'est pourquoi l'effet des tannins sur l'ordre des chaînes a été étudié en phase fluide, à une température de 30°C . Les éclatements quadrupolaires, nécessaires à la construction des profils d'ordre, ont été obtenus par « de-Pake-ing » (**figure III.4A**) pour le modèle lipidique en absence de tannin et pour les systèmes C/MLV et EC/MLV. Dans le cas du système EGCG/MLV, ils ont été obtenus à partir du spectre simulé car le spectre deutérium est de résolution trop faible pour les obtenir à partir du spectre « de-Paké ». Les données relatives à cette simulation sont fournies en annexe (**annexe 4**).

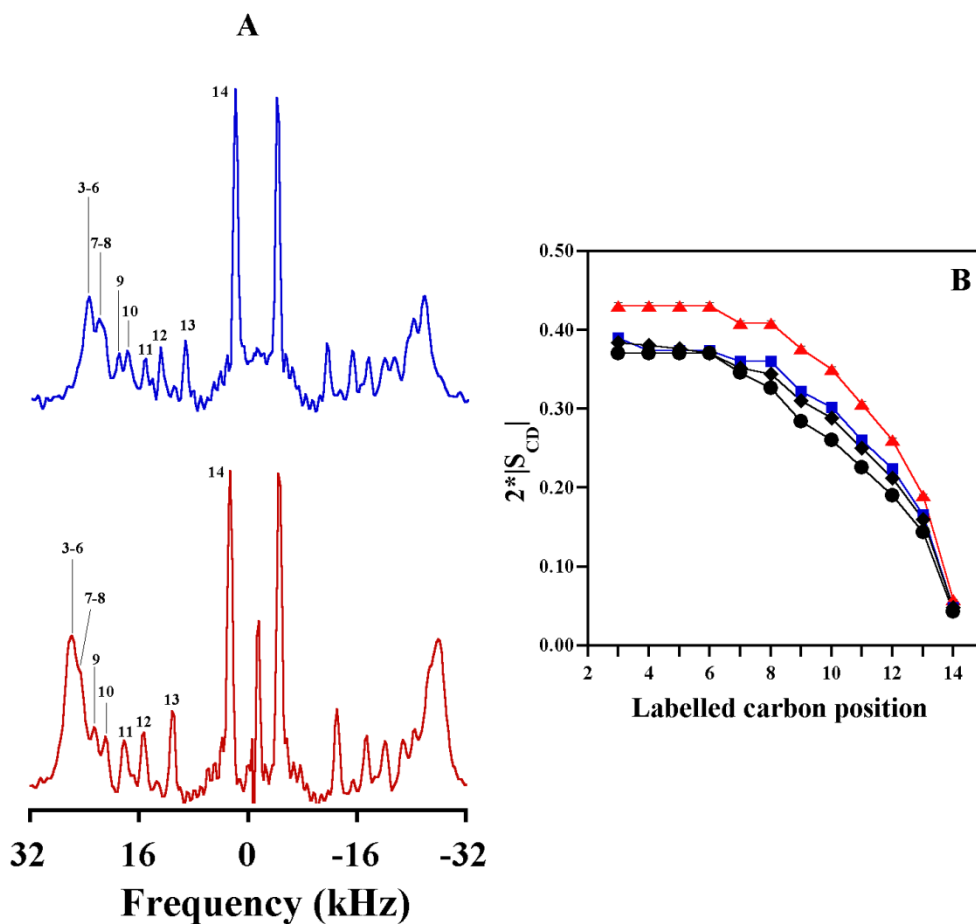


Figure III.4 : (A) Spectres deutérium « de-Paké » du DMPC seul (en rouge) et du système C/DMPC (en bleu) pour un rapport tannin-lipide de 1/8. T = 30°C (B) Profil d'ordre représentant le paramètre d'ordre local S_{CD} en fonction de la position de la liaison C-D sur la chaîne *sn*-2 du DMPC-d₂₇ pour les systèmes DMPC seul (▲), C/DMPC (■), EC/DMPC (◆) et EGCG/DMPC (●). Le rapport tannin/lipide est de 1/8. Les données sont issues de la simulation pour le cas EGCG/DMPC (annexe 4) et des spectres « de-Pake-ing » pour les autres profils. T = 30°C. L'erreur est localisée dans le symbole.

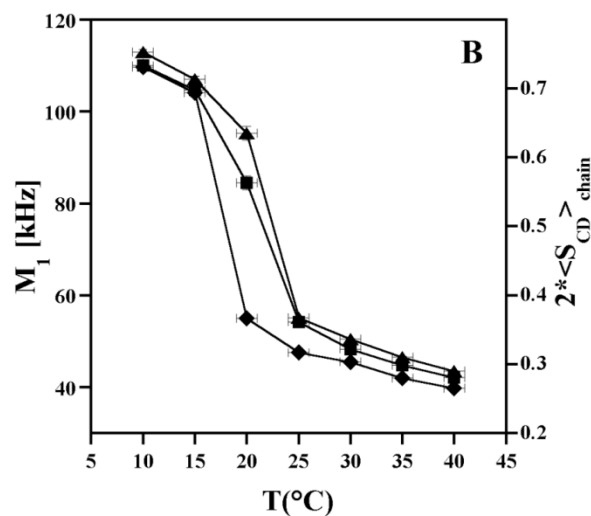
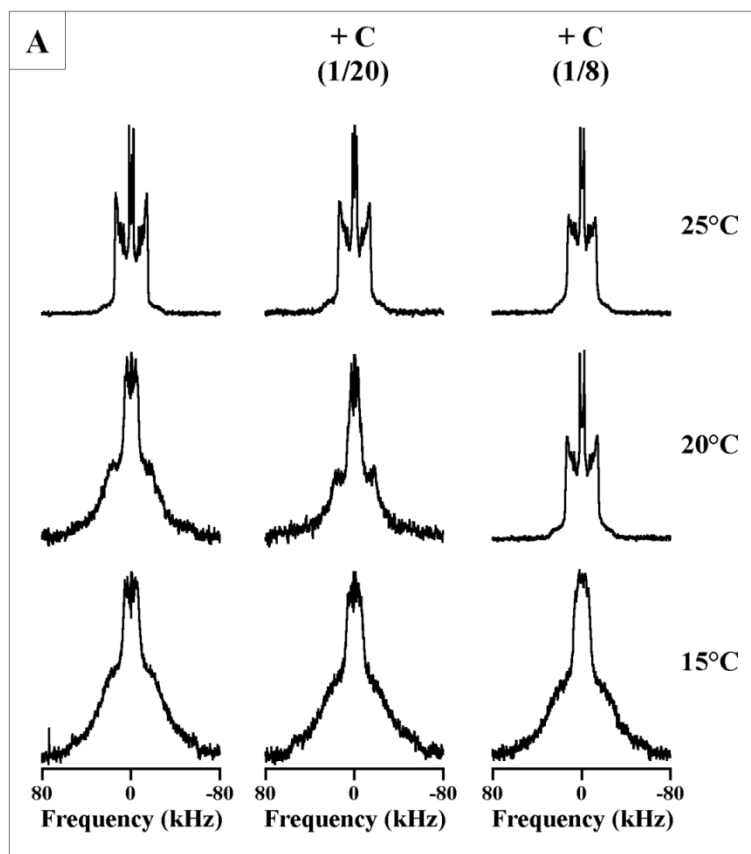


Figure III.5 : (A) Spectres de RMN du deutérium des vésicules multilamellaires de DMPC-d₂₇ en absence et en présence de catéchine à trois températures, 15, 20 et 25°C. Nombre d’acquisition : 4-6k. Le centre de chacun des spectres est arbitrairement positionné à 0 Hz. (B) Moments spectraux M₁ et paramètre d’ordre moyen des chaînes acyles deutérées ($2 \langle S_{CD} \rangle_{\text{chaîne}}$) calculés à l’aide des spectres de la figure A en fonction de la température pour les systèmes DMPC seul (▲) et C/DMPC avec un rapport de 1/20 (■) et de 1/8 (◆). L’erreur est estimée à ± 1,5°C pour les températures et à ± 1-3,5 % pour les moments M₁. L’erreur pour le paramètre d’ordre moyen, représenté sur le second axe vertical est estimée à ± 0.025.

La **figure III.4B** présente le profil d'ordre du modèle en absence et en présence de tannin. Chaque système T/MLV présente un profil typique d'une phase lamellaire fluide L_α à 30°C conformément à ce qui a été montré précédemment. Au niveau de la région plateau (positions 3 à 7), une diminution des S_{CD} (0.05-0.07) est constatée pour tous les systèmes T/MLV étudiés. Une augmentation du désordre indépendant de la nature du tannin est donc mise en évidence pour cette région. Un effet similaire est constaté pour les positions 8 à 13 avec toutefois une intensité qui semble dépendre de la nature du tannin. En effet, la diminution des S_{CD} relatifs à ces positions est plus importante dans le cas d'EGCG que pour les deux autres tannins qui présentent eux un effet similaire ce qui traduit un ancrage légèrement plus important d'EGCG dans le modèle membranaire. Enfin, le méthyle terminal n'est pas affecté par la présence du tannin. La dynamique initialement importante de ce groupement situé en profondeur dans la membrane étant peu affectée par la présence des tannins qui sont préférentiellement situés à la surface ou au niveau des têtes polaires (*cf. chapitre IV*).

III.A.2.c Influence de la concentration en tannin sur la dynamique de la membrane

L'effet fluidifiant des tannins a été mis en évidence précédemment pour un rapport molaire tannin/lipide de 1/8. Il est alors intéressant de déterminer si cet effet est ou non dose dépendant. Ainsi, une étude a été effectuée avec la catéchine pour une concentration en tannin plus faible correspondant à un rapport molaire tannin/lipide de 1/20 ($[T] = 7.85\text{mM}$). La **figure III.5A** montre les spectres RMN du deutérium réalisés en absence et en présence de catéchine aux deux rapports molaires, 1/20 et 1/8 pour trois températures 15, 20 et 25°C proche des transitions de phase déterminées précédemment ($17.5\pm 1^\circ\text{C}$ pour les systèmes T/MLV, $22.5\pm 1^\circ\text{C}$ pour le lipide seul). Les spectres obtenus à 15 et 20°C sont très proches pour les deux rapports molaires étudiés. En revanche, le spectre obtenu à 20°C dans le cas du rapport 1/20 présente une allure similaire à celle d'une phase lamellaire gel L_β' alors que celui obtenu pour le rapport molaire 1/8 présente un spectre relatif à une phase lamellaire fluide L_α . Par ailleurs, la comparaison des spectres à 20°C des MLV seules et en présence de tannins pour le rapport molaire T/L de 1/20 montre un épaulement plus prononcé dans ce dernier cas suggérant l'émergence de la phase lamellaire fluide. Ainsi, la température de transition de phase du lipide diminue avec la concentration en tannin L'effet fluidifiant des tannins est donc dose-dépendant.

Cet effet a été confirmé par l'étude des variations des moments spectraux d'ordre 1 en fonction de la température (**figure III.5B**). Dans le cas du rapport molaire T/L de 1/20, on observe une diminution de T_m par rapport au cas du lipide seul (-1°C). Cette diminution est plus faible que dans le cas du rapport molaire T/L de 1/8 (-5°C). En phase gel ($T = 10$ et 15°C), les valeurs de M_1 sont similaires pour les deux rapports. En phase fluide, les valeurs de M_1 pour le rapport T/L de 1/20 varient très peu par comparaison

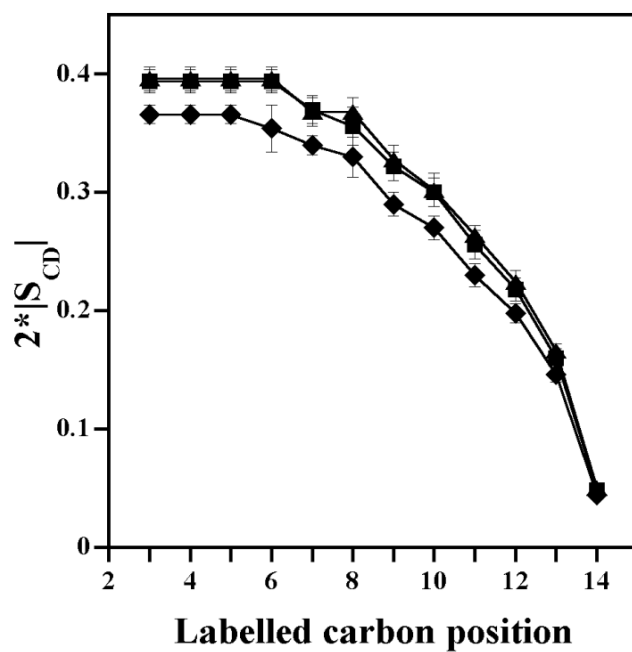


Figure III.6 : Profil d'ordre représentant les paramètres d'ordre locaux S_{CD} en fonction de la position de la liaison C-D sur la chaîne sn-2 du DMPC-d₂₇ en absence et en présence de catéchine. Les données ont été obtenues à partir des spectres « de-Pake-ing ». (▲) DMPC seul ; (■) C/DMPC (1/8) ; (◆) C/DMPC (1/20). T = 37°C. L'erreur estimée est de $\pm 0.005-0.02$.

au système sans tannins et sont plus faible que dans le cas du rapport T/L de 1/8. L'effet fluidifiant est donc bien plus important dans le cas d'un rapport T/L élevé.

L'influence du rapport molaire tannin/lipide sur l'ordre des chaînes acyles a été aussi étudiée. Le profil d'ordre est présenté sur la **figure III.6**. Le profil d'ordre relatif au rapport molaire 1/20 se superpose quasiment à celui du lipide seul. Le tannin n'a donc pas d'effet sur l'organisation des chaînes acyles à un rapport trop faible. L'effet fluidifiant dépend donc fortement de la concentration en tannin mise en jeu.

III.A.3 Effet des tannins en présence d'éthanol

Nous avons vu que les tannins induisent deux effets sur les MLV de DMPC : une fluidification globale du système et une désorganisation des chaînes acyles des lipides à haute température. La composition du modèle utilisé restant simple, il est nécessaire de le complexifier avant de conclure à un effet des tannins sur la dynamique de la membrane buccale lors de la dégustation. L'objectif de cette étude a donc été d'étudier l'effet des tannins sur le modèle membranaire en présence d'éthanol, dont le pourcentage volumique dans le vin est de 12%. C'est ce pourcentage qui a été utilisé pour cette étude. Le cas d'une insertion de catéchine dans des MLV dans lesquelles du DMPC-d₅₄ a été incorporé pour la RMN du deutérium est ici traité.

III.A.3.a Effet de l'éthanol sur la dynamique des MLV de DMPC-d₅₄.

Les résultats obtenus dans les vésicules multilamellaires seules en présence d'éthanol ont été dans un premier temps étudiés puis comparés aux résultats obtenus pour ce même système en présence de catéchine (**figure III.7**).

La **figure III.7A** présente les spectres RMN du deutérium relatifs au DMPC-d₅₄ en absence d'éthanol et de tannin. A des températures inférieures ou égales à 16°C, les spectres obtenus sont caractéristiques d'une phase lamellaire gel L_β. A 18°C, la largeur du spectre diminue et les éclatements quadrupolaires des méthyles terminaux ainsi que les épaulements relatifs aux liaisons C-D proche du glycérol deviennent visibles. Toutefois, le spectre présente une résolution trop faible et une largeur trop importante pour être celui d'une phase lamellaire fluide L_α pure. Il existe donc une coexistence de deux phases à cette température L_β et L_α. A 20°C, le spectre présente une symétrie axiale typiquement observée dans le cas d'une phase lamellaire fluide L_α. Il est à noter que la phase L_α n'était pas observée à cette température pour les MLV de DMPC-d₂₇ étudiées précédemment. En effet la température de

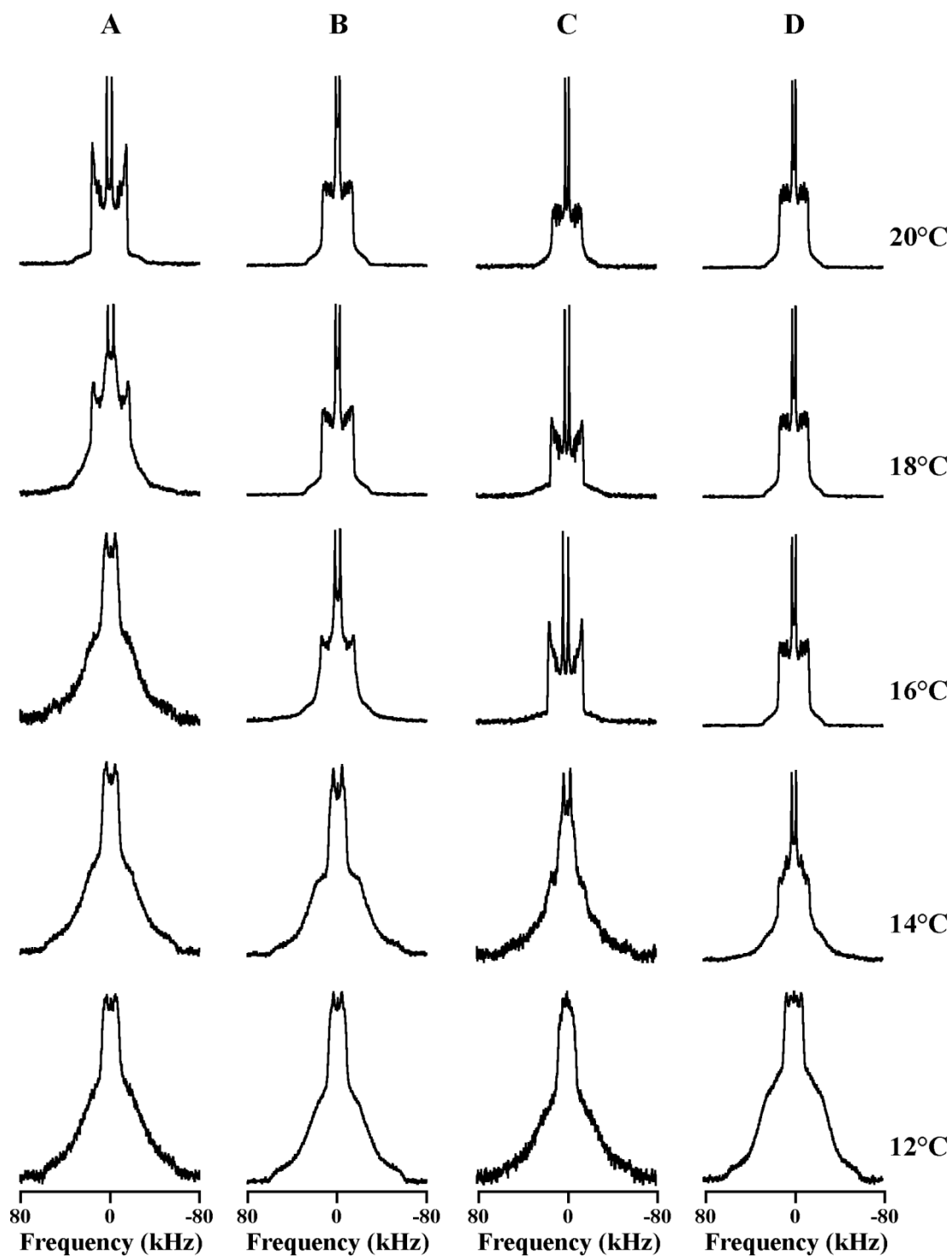


Figure III.7 : Spectres RMN du deutérium de vésicules multilamellaires de DMPC-d₅₄ en absence et en présence de catéchine (rapport tannin/lipide de 1/8) et/ou d'éthanol (12% volumique). **(A)** MLV seul, **(B)** MLV + EtOH, **(C)** C/MLV, **(D)** C/MLV + EtOH. Nombre d'acquisition : 12-16k. Le centre du spectre est arbitrairement positionné à 0Hz.

transition de phase du DMPC-d₅₄ est inférieure à celle du DMPC-d₂₇ à cause de la deutération plus importante du lipide (théoriquement, 21.5±1°C vs. 20.5±1°C, Aussenac et al., 2003).

Pour le système en présence d'éthanol (**figure III.7B**), on remarque que le spectre correspondant à la coexistence des phases L_{β'} et L_α est obtenue à plus basse température (16°C vs. 18°C). Ainsi, l'éthanol a, comme le tannin, un effet fluidifiant sur le modèle membranaire. Ce résultat n'est en soit pas unesurprise, l'effet fluidifiant de l'éthanol sur les systèmes lipidiques étant bien connu dans la littérature (Hill et al., 1991, Chin and Goldstein 1977, Patra et al., 2006).

Cet effet a également été mis en évidence par l'étude des variations des M₁ en fonction de la température (**figure III.8**). En effet, la température de transition de phase est diminuée de 2°C en présence d'éthanol (16±0.5°C vs. 18±0.5°C). En outre, une diminution des moments M₁ est constatée pour le système en présence d'éthanol sur toute la gamme de température. Ainsi, l'éthanol désorganise aussi la phase gel, contrairement au tannin.

Les effets des tannins et de l'éthanol sur le thermotropisme du système étant similaires, il est intéressant de mettre en présence éthanol et tannin afin de savoir si leurs effets vont s'ajouter ou s'annuler ou si un effet va être prédominant par rapport à l'autre.

III.A.3.b Effet de la catéchine sur la dynamique du modèle membranaire en présence d'éthanol

Les figures **III.7C** et **III.7D** présentent les spectres RMN du deutérium obtenus pour le système C/MLV respectivement en absence et en présence d'éthanol aux différentes températures d'étude.

Pour le système MLV + EtOH, on constate que le profil des spectres que l'on soit en absence (**figure III.7B**) ou en présence de catéchine (**figure III.7D**) correspond à un même type de phase à 12, 18 et 20°C. A 12°C, les spectres sont ceux d'une phase gel L_{β'}. Alors que pour des températures égales ou supérieures à 18°C, on a des spectres relatifs à une phase L_α. En revanche, à 14 et 16°C, la nature de la phase est différente entre les deux systèmes. A 14°C, le spectre en absence de tannin est relatif à une phase gel L_{β'} tandis qu'en présence de catéchine, le spectre correspond à une coexistence de phase L_{β'} et L_α. De même, à 16°C, le spectre du système MLV + EtOH correspond à une coexistence de phase L_{β'} et L_α tandis que celui du système C/MLV + EtOH est relatif à une phase L_α pure. La température de transition de phase est donc plus faible en présence qu'en absence de catéchine pour le système MLV + EtOH. Ce résultat est en accord avec le caractère fluidifiant du tannin démontré précédemment.

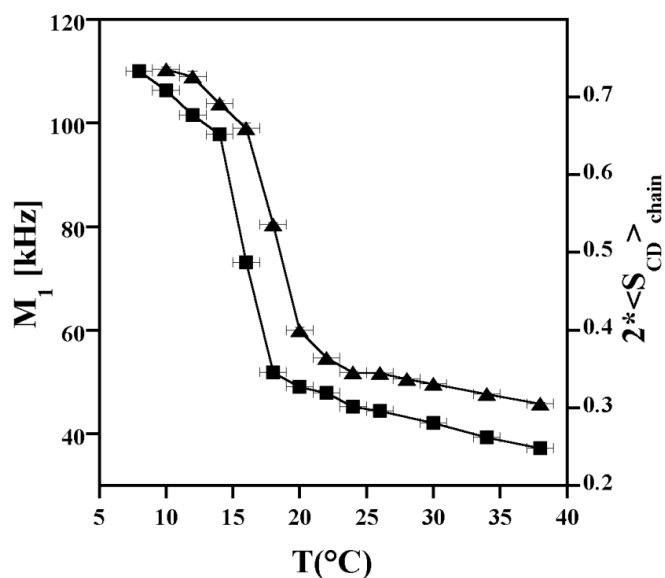


Figure III.8 : Moments spectraux M_1 et paramètre d'ordre moyen des chaînes acyles deutérées ($2\langle S_{CD}^2 \rangle_{chaîne}$) du DMPC- d_{54} calculés en fonction de la température pour les systèmes DMPC $_{d54}$ seul (\blacktriangle) et DMPC en présence d'éthanol (12% volumique) (\blacksquare). L'erreur est estimée à $\pm 1,5^\circ\text{C}$ pour les températures et est inférieure à 1% pour les moments M_1 . L'erreur pour le paramètre d'ordre moyen, représenté sur le second axe vertical, est estimée à ± 0.008

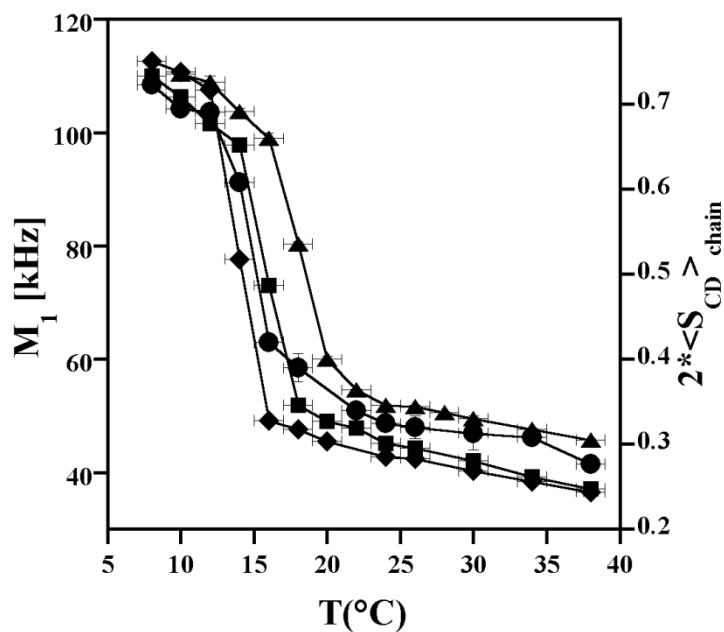


Figure III.9 : Moments spectraux M_1 et paramètres d'ordre moyen des chaînes acyles deutérées ($2\langle S_{CD}^2 \rangle_{chaîne}$) en fonction de la température pour les vésicules multilamellaires de DMPC- d_{54} en absence et en présence de catéchine et/ou d'éthanol à 12% volumique. MLV seules (\blacktriangle), MLV + EtOH (\blacksquare), C/MLV (\bullet) C/MLV + EtOH (\blacklozenge). Le rapport tannin/lipide est de 1/8. L'erreur est estimée à $\pm 1,5^\circ\text{C}$ pour les températures et est inférieure à 1% pour les moments M_1 . L'erreur du paramètre d'ordre moyen, représentée sur le second axe vertical, est estimée à ± 0.008 .

Si on compare le spectre à 14°C du système C/MLV en absence (**figure III.7C**) et en présence d'éthanol (**figure III.7D**), on peut voir que ces deux spectres correspondent à une coexistence $L_{\beta'}$ et L_{α} mais que celui relatif au système C/MLV + EtOH est plus étroit et mieux résolu. Par conséquent, la proportion de phase fluide est plus importante pour le système où catéchine et éthanol coexistent que pour les systèmes sans catéchine avec éthanol ou avec catéchine sans éthanol. Ce résultat laisse supposer que la température de transition de phase T_m la plus basse est obtenue pour le système en présence d'éthanol et de catéchine.

Ceci a été confirmé par l'étude des moments spectraux M_1 (**figure III.9**). La T_m la plus basse, estimée à $13.7 \pm 0.5^\circ\text{C}$, est obtenue pour le système C/MLV + EtOH suivi par la T_m du système C/MLV sans éthanol ($15 \pm 0.5^\circ\text{C}$) puis celle du système MLV + EtOH sans catéchine ($16 \pm 0.5^\circ\text{C}$). Ainsi, la diminution de la valeur de la température de transition par rapport aux MLV seules due au tannin pour un rapport molaire T/L de 1/8 est plus importante que celle due à l'alcool. Néanmoins, nous avons vu précédemment que cet effet fluidifiant du tannin dépend grandement du rapport molaire tannin/lipide mis en jeu. Ainsi, il serait dangereux de conclure à un effet fluidifiant plus important dans le cas de la catéchine que dans le cas de l'éthanol. La diminution dans le cas du système C/MLV en présence d'éthanol ($4.3 \pm 1^\circ\text{C}$) est similaire à la somme des effets conjugués de la catéchine et de l'éthanol pris séparément ($2 \pm 1^\circ\text{C} + 3 \pm 1^\circ\text{C} = 5 \pm 2^\circ\text{C}$). Il y a donc additivité des deux effets mais pas de synergie.

En phase gel, la catéchine ne semble pas influencer sur les valeurs des M_1 que ce soit en absence ou en présence d'éthanol. Son effet est plus notable en phase fluide. Toutefois, à une température donnée, la diminution des M_1 due à la catéchine est inférieure à celle due à l'effet de l'éthanol. Ainsi, en phase fluide, l'effet fluidifiant de la catéchine sur les chaînes acyles, dans le cas d'un rapport molaire tannin/lipide de 1/8, est approximativement deux fois plus faible que celui de l'éthanol. A noter aussi que pour des températures relatives à la phase fluide, peu de différences au niveau des valeurs des M_1 sont constatées pour les deux systèmes en présence d'éthanol. Ainsi, la catéchine influe peu sur la dynamique de la phase fluide en présence de l'alcool.

Pour finir, nous pouvons remarquer que la diminution de la température de transition de phase due à la catéchine est inférieure à la valeur obtenue lors des études sur le DMPC-d₂₇. Ceci s'explique par le nombre de paliers de température utilisés plus important dans cette étude (tous les 2°C) que pour l'expérience précédente (tous les 5°C). Ainsi l'analyse est plus fine, ce qui diminue l'erreur expérimentale.

En conclusion, trois résultats majeurs ressortent de cette première partie du chapitre. (i) Les tannins fluidifient le modèle membranaire ; ils diminuent la température de transition de phase du lipide. (ii) Les tannins désorganisent le cœur hydrophobe du modèle lipidique en phase fluide, l'intensité de cet effet étant dépendant de la structure du tannin, le tannin galloylé ayant un effet plus important que les

tannins non galloylé (iii) L'effet fluidifiant de la catéchine persiste en présence d'éthanol et s'ajoute à celui-ci.

Le modèle membranaire utilisé lors de cette étude est simple et modélise très grossièrement les membranes buccales. Ainsi il est nécessaire de la complexifier, notamment par l'ajout de cholestérol, constituant important des membranes naturelles. La suite de ce chapitre va donc s'intéresser aux effets des tannins sur le modèle membranaire de MLV de DMPC dans lequel on a ajouté 18% molaire de cholestérol de manière à représenter la teneur moyenne en cholestérol des membranes biologiques, en présence ou non d'éthanol.

III.B/ Etude de l'effet du tannin sur des MLV de DMPC dopées avec du cholestérol (18% molaire)

Le système PC/CH a été couramment étudié dans la littérature (Vist & Davis., 1990 ; Sankaram & Thompson., 1991). On notera qu'à partir d'un certain pourcentage de cholestérol, pourcentage dépendant du phospholipide utilisé, les lipides adoptent une nouvelle phase dite liquide ordonnée (L_o). Celle-ci peut être pure ou en coexistence avec les phases L_α et L_β , dont les proportions dépendent aussi du pourcentage de cholestérol incorporé dans le modèle membranaire. La transition $L_\beta + L_o \rightarrow L_\alpha + L_o$ a lieu aux environs de la température de transition de phase T_m du phospholipide seul. Une version améliorée de ce diagramme de phase a été proposée par McMullen & McElhaney en 1995. Ils y introduisirent notamment deux nouvelles phases, la phase liquide ordonnée type gel $L_{o\beta}$ et la phase liquide ordonnée type fluide $L_{o\alpha}$. Cependant, ces trois phases n'étant pas distinguables en RMN des solides, l'analyse et l'interprétation des résultats relatifs aux modèles présentant du cholestérol se baseront sur le diagramme de Sankaram & Thompson (**figure III.10B**). Ce diagramme montre qu'à un pourcentage molaire de 18% en cholestérol, le système DMPC/CH présente une coexistence de phases entre la phase L_o et les phases L_α/L_β .

III.B.1 Etude du système seul

Comme pour les MLV de DMPC- d_{54} , il est nécessaire d'étudier le système seul avant de regarder l'effet des tannins sur sa dynamique. La **figure III.10A** présente les spectres RMN du deutérium obtenus à trois températures pour les systèmes DMPC- d_{54} /CH (82/18) et DMPC- d_{54} seul. A 10°C, le spectre d'un système lipidique seul est caractéristique d'une phase gel L_β . En présence de cholestérol, le spectre est très différents de celui d'une phase gel L_β mais aussi d'une phase fluide L_α (comme celui du DMPC seul à

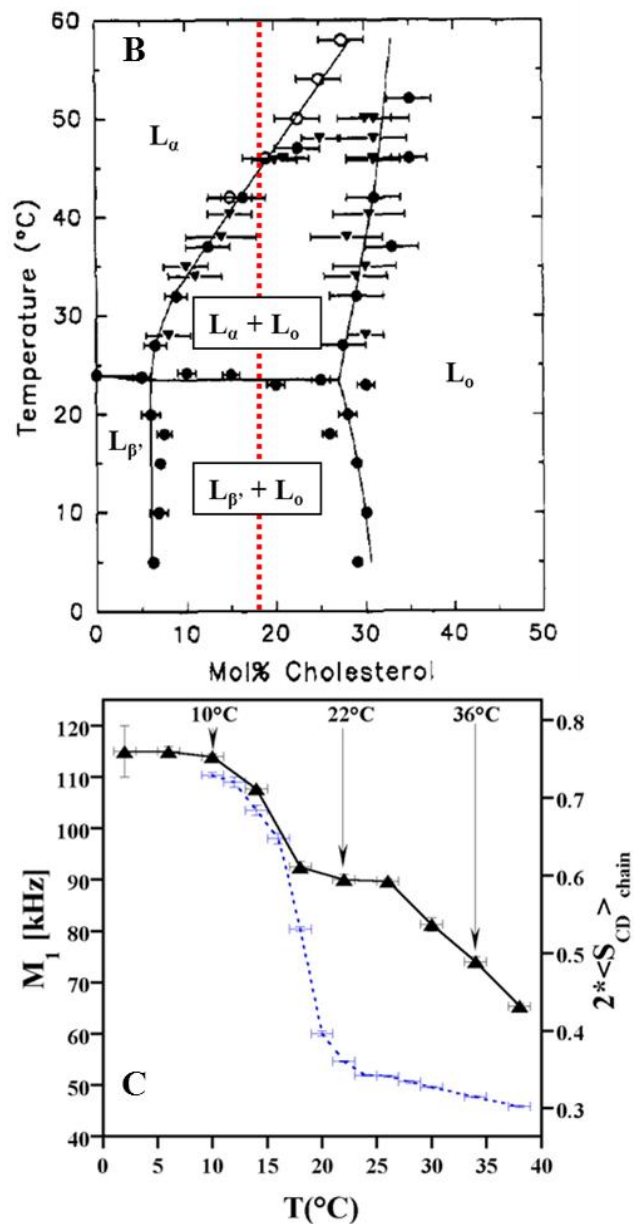
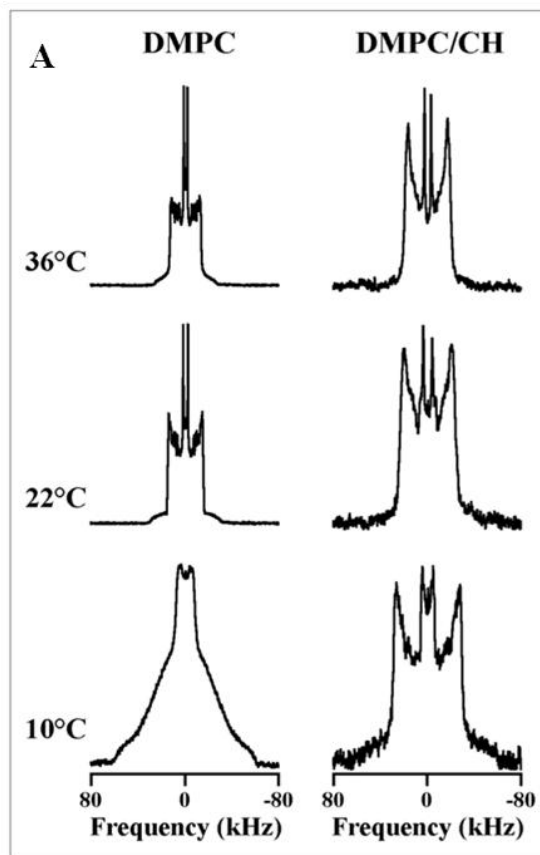


Figure III.10 : (A) Spectres RMN du deutérium sur des vésicules multilamellaires de DMPC- d_{54} en absence et en présence de cholestérol à trois températures 10, 22 et 34°C. Le rapport molaire DMPC/cholestérol est de 82/18. Nombre d’acquisition : 12k. Le centre du spectre est arbitrairement positionné à 0Hz. (B) Diagramme de phase du système DMPC/DC selon Sankaram & Thompson (diagramme tirée de Almeida et al., 1992). (C) Moments spectraux M_1 et paramètre d’ordre moyen des chaînes acyles deutérées ($2^* \langle S_{CD} \rangle_{chaîne}$) du DMPC- d_{54} calculés en fonction de la température pour les systèmes DMPC/CH (\blacktriangle) et DMPC seul (trait pointillé). L’erreur est estimée à $\pm 1.5^\circ\text{C}$ pour les températures et à $\pm 1-4\%$ pour les moments M_1 . L’erreur pour le paramètre d’ordre moyen, représentée sur le second axe vertical, est localisée dans le symbole.

36°C). En effet, bien que résolu et de symétrie axiale, sa largeur spectrale est beaucoup plus grande et la région plateau (éclatements vers $\approx 52\text{-}55\text{kHz}$) est très importante. Cette différence très marquée au niveau de la région plateau signifie qu'il y a plus de position CD_2 qui contribuent à cette région. Les doublets de Pake relatifs aux méthyles terminaux sont aussi moins intenses. Cette allure de spectre est celui résultant d'une superposition d'une phase $L_{\beta'}$ et d'une phase liquide ordonné L_o (Beck et al., 2007). A 22°C, le spectre du système contenant du cholestérol garde une allure similaire mais se rétrécit, signe d'un système plus fluide qu'à 10°C. Ceci suggère que la proportion de phase $L_{\beta'}$ diminue au profit de la phase L_{α} . Le spectre du DMPC seul est quand à lui celui d'une phase L_{α} . A 34°C, la largeur du spectre à encore diminué. Toutefois, elle est 1.4 fois plus grande que celle du DMPC seule à cette température. Or, dans le cas d'une phase L_o pure, la largeur spectrale est deux fois celle d'une phase L_{α} (Hsueh et al., 2005). Par conséquent, on n'a pas une phase ordonnée L_o pure mais un mélange $L_{\alpha} + L_o$. L'ensemble de ces résultats est en accord avec l'effet rigidifiant bien connu du cholestérol.

Précédemment, il a été vu qu'un changement de la nature de la phase lipidique se traduisait par une cassure au niveau de la courbe représentant les variations du moment spectral M_1 en fonction de la température. Ainsi, il est intéressant d'étudier cette variation pour le modèle DMPC- d_{54} /CH (82/18) et de le comparer au DMPC- d_{54} seul (pointillé) (**figure III.10C**). Contrairement au cas des MLV de DMPC- d_{54} , la courbe relative aux variations des M_1 pour le système DMPC- d_{54} /CH (82/18) présentent deux cassures, l'une entre 10 et 18°C, l'autre après 26°C et un plateau entre 18 et 26°C. En outre, il y a une nette différence entre les valeurs de M_1 entre les deux systèmes à partir de 18°C (la variation des M_1 , ΔM_1 , étant de 12.1kHz à 18°C et 35.4kHz à 22°C par exemple). Ainsi, la dynamique du système lipidique est, comme attendue, différente que l'on soit en absence ou en présence de cholestérol.

Une étude de la courbe relative aux variations des M_1 en fonction de la température pour le système DMPC- d_{54} /CH (82/18) peut être effectuée en s'appuyant sur les spectres présentés précédemment (**figure III.10A**) et sur le diagramme de Vist & Davis (Vist & Davis., 1990). Celui-ci stipule que pour un rapport molaire PC/CH de 82/18, les liposomes présentent une coexistence de phase $L_{\beta'} + L_o$ à de faibles températures et une coexistence $L_{\alpha} + L_o$ aux températures élevées. Il y a donc théoriquement qu'une seule transition de phase $L_{\beta'} + L_o \rightarrow L_{\alpha} + L_o$ se situant à une température proche de la température de transition de phase du PC seul (18°C ici). Les travaux de Vist & Davis peuvent donc expliquer les M_1 obtenus pour des températures inférieures à 18°C et supérieures à 26°C. De 2 à 14°C, les valeurs obtenues, supérieure à 105 kHz, sont proches de celles relatives à une phase lamellaire gel (110 kHz). Cela traduit la coexistence entre les phases L_o et $L_{\beta'}$ à ces températures. De même, pour des températures supérieures à 26°C, la décroissance continue des M_1 traduit une augmentation de la fluidité du cœur hydrophobe de la membrane

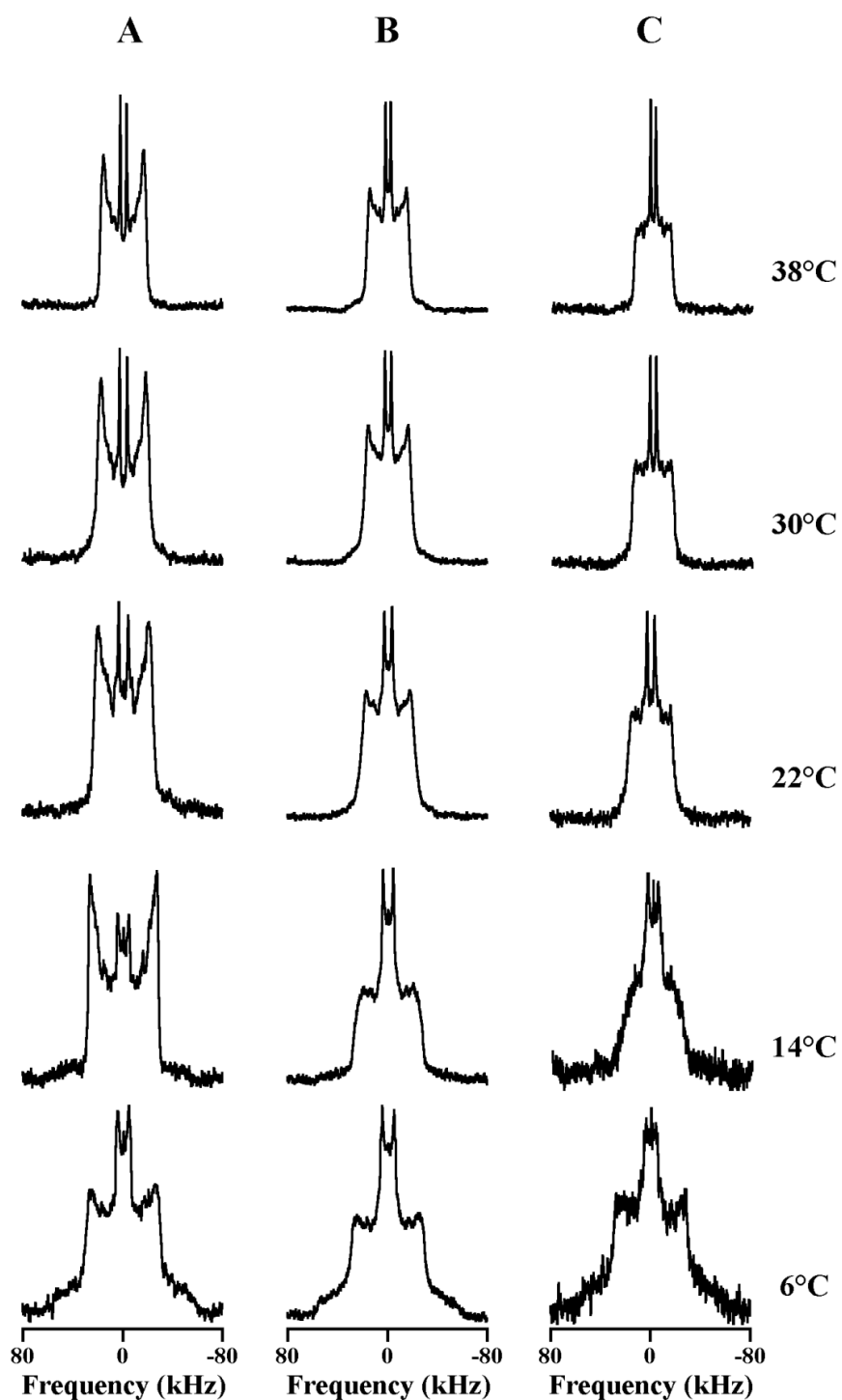


Figure III.11 : Spectres RMN du deutérium de vésicules multilamellaires de DMPC-d₅₄ et de cholestérol en absence et en présence de catéchine à plusieurs températures. (A) DMPC/CH, (B) C/DMPC/CH (T/L = 1/20), (C) C/DMPC/CH (T/L = 1/8). Nombre d’acquisitions : 12k pour le système DMPC/CH, 14k pour le système C/DMPC/CH (T/L de 1/8), 16 k pour le système C/DMPC/CH (T/L de 1/20). Le centre du spectre est arbitrairement positionné à 0 Hz.

due à la température. Le système présente ici une coexistence de phase $L_{\alpha} + L_o$. Enfin, le plateau entre 18 et 26°C semble relatif à la zone de transition $L_{\beta'} + L_o \rightarrow L_{\alpha} + L_o$ présentant une coexistence des trois phases avec une émergence de la phase L_{α} et une disparition progressive de la phase $L_{\beta'}$. Cette transition, progressive, se fait donc sur un intervalle de plusieurs températures.

III.B.2 Effet de la catéchine sur la dynamique des MLV de DMPC + cholestérol

Afin d'étudier l'effet de la catéchine sur la dynamique du système DMPC-d₅₄/CH (82/18), des études en température ont été effectuées sur deux échantillons présentant des rapports T/L de 1/20 et 1/8. En présence de cholestérol, les MLV présentent toujours un aspect laiteux qui persiste en présence de catéchine.

La **figure III.11** présente les spectres RMN du deutérium obtenus pour les systèmes DMPC/CH en absence et en présence de tannin à différentes températures (6, 14, 22, 30 et 38°C). Nous comparerons les spectres relatifs au modèle lipidique seul (**figure III.11A**) au système C/DMPC/CH ayant un rapport molaire T/L de 1/20 (**figure III.11B**) dans un premier temps puis au rapport T/L de 1/8 dans un deuxième temps (**figure III.11C**). A 6°C, les spectres obtenus sont sensiblement similaires tant au niveau de leurs allures générales qu'au niveau des éclatements quadrupolaires obtenus pour les épaulements en périphérie relatifs à la région plateau ($54 \pm 1\text{kHz}$) et résultent d'une superposition entre un spectre de poudre relatif à une phase lamellaire gel $L_{\beta'}$ et un spectre à symétrie axiale typiquement observé pour une phase liquide ordonnée L_o . En revanche, à 14°C, le spectre en présence de catéchine adopte un profil assez différent. Bien que le spectre conserve sa symétrie axiale, le spectre est plus étroit (l'éclatement quadrupolaire relatif à la région plateau diminue de 11kHz en présence de catéchine) et la région plateau est moins importante (éclatements vers 41-43 kHz) moins intense. Ceci signifierait qu'on est toujours en présence d'une phase L_o mais avec une diminution de la phase $L_{\beta'}$ et une émergence de la phase L_{α} . A cette température, le système est donc dans la zone de transition de phase $L_{\beta'} + L_o \rightarrow L_{\alpha} + L_o$ alors que ce n'est pas encore le cas du système sans tannin (l'éclatement quadrupolaire relatif à la région plateau n'ayant pas évolué). Ainsi, la catéchine a de nouveau un effet fluidifiant sur ce système lipidique. On retrouve cet effet à 22, 30 et 38°C. A ces températures, les deux systèmes présentent des spectres typiquement observés lors d'une coexistence entre les phases L_o et L_{α} . Cependant à une même température, ceux du système avec catéchine sont plus étroits et l'intensité des éclatements quadrupolaires au niveau de la région plateau est beaucoup plus faible par rapport au système lipidique sans tannins. Ceci est en faveur d'une phase L_{α} majoritaire par rapport à la phase L_o . Le système en présence de tannin est donc bien plus fluide. Par ailleurs, contrairement au spectre obtenu à 14°C, l'épaulement aux extrémités du spectre est présent à ces températures mais est moins intense que dans le cas du système lipidique sans tannins.

La **figure III.11C** présente les spectres RMN du deutérium aux mêmes températures étudiées pour le système C/DMPC/CH à un rapport molaire T/L de 1/8. Par comparaison aux spectres pour le rapport molaire T/L de 1/20, on constate que l'allure des spectres est sensiblement la même. Toutefois, on peut remarquer qu'à 14°C, il n'y a quasiment plus de région plateau ; le spectre ressemble à celui d'une phase $L_{\beta'}$ pure. Et à des températures supérieures ou égales à 22°C, la région plateau est beaucoup moins importante, ce qui laisse supposer que la phase L_o n'existe plus ou est très minoritaire. Comme dans le cas du rapport molaire T/L de 1/20, l'effet fluidifiant de la catéchine vient contrebalancer l'effet rigidifiant du cholestérol pour le cas du rapport T/L de 1/8. De plus, cet effet fluidifiant est dose-dépendant comme cela a été montré pour le système modèle sans cholestérol (cf. partie III.A.2.c).

Afin de confirmer l'effet nivelant de la catéchine sur l'effet rigidifiant du cholestérol, l'étude des moments spectraux M_1 en fonction de la température a été réalisée pour le système C/DMPC/CH au rapport molaire T/L de 1/20 et de 1/8 (**figure III.12**). Par comparaison au système DMPC/CH sans tannin, la différence la plus notable réside dans la disparition du plateau entre 18 et 26°C. Ainsi, la transition de phase $L_{\beta'} + L_o \rightarrow L_{\alpha} + L_o$ est brutale et non progressive comme c'était le cas sans catéchine. De plus, cette transition a lieu à des températures plus faibles que pour le système lipidique seul, la température de transition étant d'autant plus faible que le rapport T/L est élevé, la cassure obtenue à des températures plus faible dans le cas du rapport T/L de 1/8.

Aucun effet dû à la catéchine n'est observé au niveau de la dynamique du système pour le système lipidique en phase $L_{\beta'} + L_o$ quelque soit le rapport T/L. A l'inverse, une nette diminution des moments spectraux M_1 est constatée au niveau de la phase $L_{\alpha} + L_o$ en présence de catéchine, cette diminution étant d'autant plus importante que le rapport T/L est élevé (-13.5kHz pour T/L = 1/20 vs. -27kHz pour T/L = 1/8). La catéchine désorganise donc la membrane du système lipidique en phase $L_{\alpha} + L_o$ et ce d'autant plus que sa concentration est élevée. Il est à noter que cet effet diminue en augmentant la température du système. Ainsi, l'effet fluidifiant de la catéchine est moins significatif sur une membrane plus fluide comme cela a été montré dans le cas d'un ajout d'éthanol dans le milieu. Enfin, on constate que quelque soit le rapport T/L étudié, les valeurs des M_1 restent supérieures à celles relatives au système sans cholestérol. Ainsi, en phase $L_{\alpha} + L_o$, l'effet rigidifiant du cholestérol est certes atténué par l'effet désorganisant du tannin mais n'est pas totalement compensé.

En conclusion, la catéchine présente les mêmes effets sur les MLV de DMPC/CH (82/18) que sur les MLV de DMPC seules ; (i) fluidification globale de la membrane lipidique (diminution de T_m), (ii) désorganisation de la membrane en phase fluide, (iii) effet fluidifiant dépendant de la concentration en tannin.

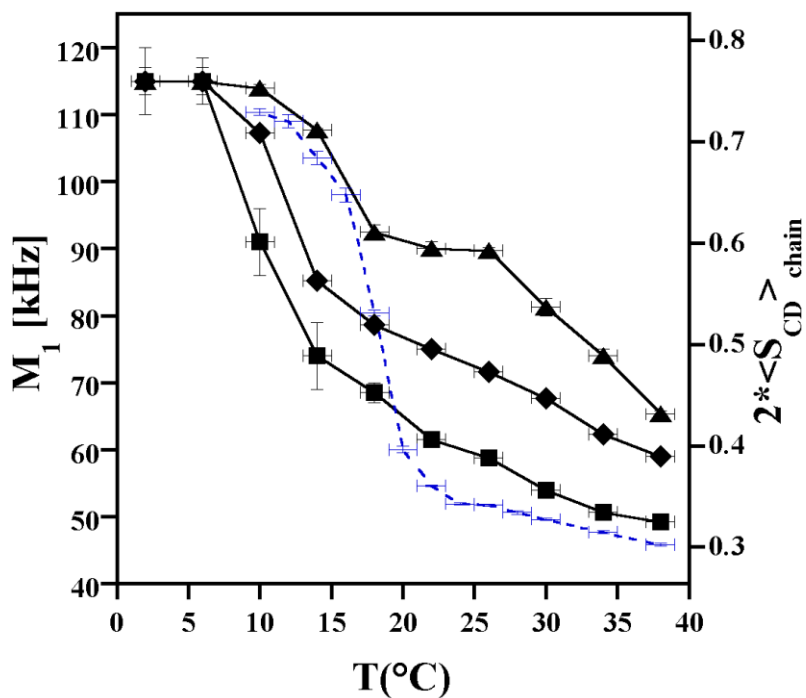


Figure III.12 : Moments spectraux M_1 et paramètres d'ordre moyen des chaînes acyles deutérées ($2|S_{CD}|_{\text{chaîne}}$) du DMPC-d₅₄ en fonction de la température pour les systèmes DMPC/CH (▲), C/DMPC/CH (T/L de 1/8) (■), C/DMPC/CH (T/L de 1/20) (◆) et DMPC seul (trait pointillé). Le DMPC est deutéré à 100%. Le rapport molaire DMPC/cholestérol est de 82/18. L'erreur est estimée à $\pm 1,5^\circ\text{C}$ pour les températures et à 1-6 % pour les moments M_1 . L'erreur pour le paramètre d'ordre moyen, représentée sur le second axe vertical, est localisée dans les symboles.

III.B.3 Effet de la catéchine sur le modèle de MLV de DMPC/CH (82/18) en présence d'éthanol

Comme lors de l'étude réalisée sur le système C/MLV de DMPC, l'influence de la catéchine sur le modèle de MLV DMPC/CH a été étudiée en présence de 12% d'éthanol afin de se rapprocher des conditions du vin. L'effet de l'éthanol a été dans un premier temps étudié en absence de tannin. Nous verrons les résultats obtenus en présence de tannin dans une seconde partie.

III.B.3.a Influence de l'éthanol sur la dynamique du système [DMPC/CH] (82/18)

La **figure III.13** présente les spectres RMN du deutérium obtenus lors de l'étude en température pour le système DMPC/CH (82/18) en absence et en présence d'éthanol. Le cas du modèle lipidique sans éthanol ayant déjà été discuté précédemment, seuls les spectres relatifs au système en présence d'éthanol sont présentés dans cette partie. A 6°C, l'allure et les éclatements quadrupolaires relatifs à la région plateau sont similaires à celles obtenus pour les liposomes en absence d'éthanol et sont donc relatives à une coexistence de phase $L_{\beta'} + L_o$. A 14°C, les épaulements en périphérie du spectre sont plus intenses ce qui traduit une augmentation de la contribution relative de la phase L_o . Toutefois, l'éclatement quadrupolaire relatif à la région plateau (51.5 kHz) est proche de celui mesurée à 6°C (55kHz) ce qui montre la présence de la phase lamellaire gel $L_{\beta'}$. Cet échantillon présente donc à cette température une coexistence de phase $L_{\beta'} + L_o$, cette dernière étant plus importante qu'à 6°C. A 22, 30 et 38°C, les spectres présentent des allures typiquement observées dans le cas d'une coexistence de phase $L_{\alpha} + L_o$. Toutefois, les épaulements en périphérie des spectres sont moins intenses que pour le système en absence d'éthanol, ce qui traduit une diminution du nombre de deutéron impliqué dans la région plateau. Ce résultat signifie qu'il y a une diminution de l'ordre au niveau du cœur hydrophobe de la membrane. Les éclatements quadrupolaires relatifs à la région plateau sont plus petits pour le système avec éthanol que ceux du système sans éthanol (30kHz vs. 36kHz à 30°C). De ce fait, l'effet fluidifiant de l'éthanol est donc à nouveau visible à ces températures. Enfin, il est à noter que l'intensité des épaulements en périphérie du spectre diminue avec l'augmentation en température, ce qui signifie que la proportion de la phase L_o diminue au profit de la phase L_{α} .

L'effet de l'éthanol sur le système DMPC/CH a aussi été étudié à partir de l'évolution des moments spectraux M_1 et des paramètres d'ordres moyens associés en fonction de la température. Ces variations sont présentées sur la **figure III.14** pour le modèle DMPC/CH (82/18) en absence et en présence d'éthanol. Le cas des MLV de DMPC-d₅₄ seul obtenu dans les mêmes conditions expérimentales

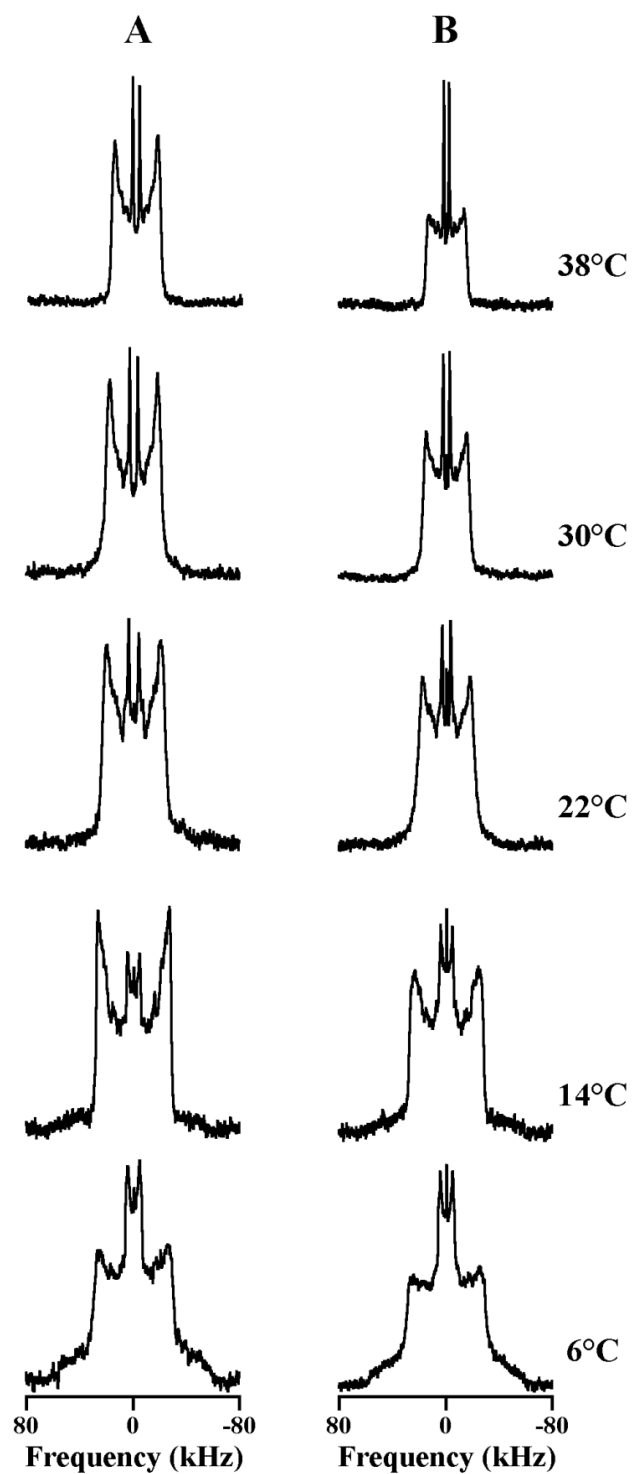


Figure III.13 : Spectres RMN du deutérium de vésicules multilamellaires de DMPC/cholestérol en absence et en présence d'éthanol (12% volumique) à plusieurs températures. (A) DMPC/CH, (B) DMPC/CH + EtOH. Le rapport molaire DMPC/cholestérol est de 82/18. Nombre d'acquisitions : 12k pour le système en absence d'éthanol, 16k pour le système en présence d'éthanol. Le centre du spectre est arbitrairement positionné à 0 Hz.

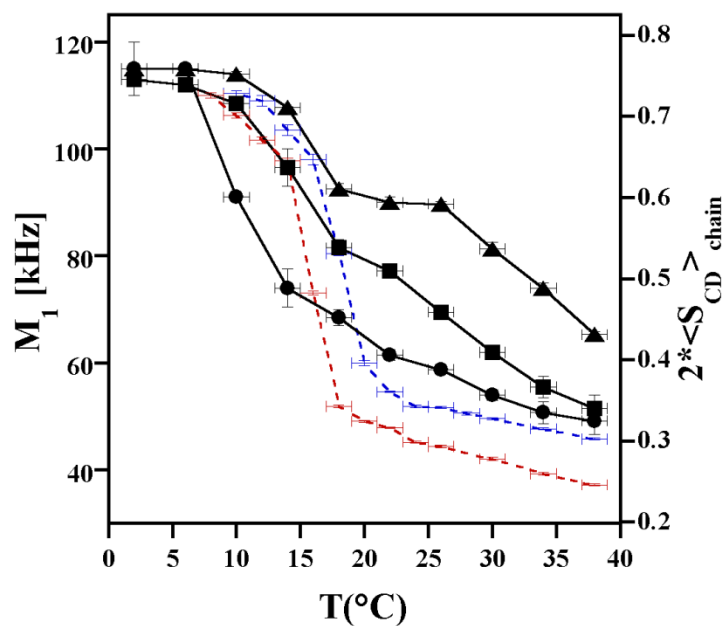


Figure III.14 : Moments spectraux M_1 et paramètres d'ordre moyen des chaînes acyles deutérées ($2\langle S_{CD} \rangle_{\text{chaîne}}$) du DMPC-d₅₄ calculés en fonction de la température pour les systèmes DMPC/CH (▲), DMPC/CH + EtOH (12% volumique) (■), C/DMPC/CH (rapport T/L = 1/8) (●), DMPC seul (pointillé bleu) et DMPC + EtOH (12% volumique) (pointillé rouge). Le rapport molaire DMPC/cholestérol est de 82/18. Le DMPC est deutéré à 100%. L'erreur est estimée à $\pm 1,5^\circ\text{C}$ pour les températures et à 1-4.5 % pour les moments M_1 . L'erreur pour le paramètre d'ordre moyen, représentée sur le second axe vertical, est localisée dans les symboles.

est présenté à titre indicatif (pointillé bleu pour le cas du DMPC en absence d'éthanol, pointillé rouge pour le cas en présence de l'alcool).

Il a été vu précédemment que l'éthanol diminue la température de transition de phase $L_{\beta'} \rightarrow L_{\alpha}$ dans le cas des MLV de DMPC-d₅₄ seules. Une diminution de T_m semble aussi constatée pour la transition $L_{\beta'} + L_o \rightarrow L_{\alpha} + L_o$ relative au système DMPC/CH (82/18). En outre, le plateau (de 18 à 26°C) observé dans le cas du système lipidique sans éthanol, disparaît quasiment en présence de l'alcool. Ainsi, la transition de phase entre $L_{\beta'} + L_o$ et $L_o + L_{\alpha}$ est plus rapide dans ce dernier cas. Par ailleurs, les valeurs des M_1 diminuent en présence d'éthanol quelque soit la température ou la nature de la phase. Ainsi, comme cela a été vu pour les vésicules multilamellaires de DMPC-d₅₄, l'éthanol va désorganiser la membrane non seulement en phase fluide ($L_{\alpha} + L_o$) mais en phase gel ($L_{\beta'} + L_o$), cet effet étant plus prononcé pour la phase fluide. Dans la phase $L_{\alpha} + L_o$, cet effet semble diminuer légèrement en augmentant la température ($\Delta M_1 = 19.3, 18.5$ et 13.8 kHz respectivement à 30, 34 et 38°C). Enfin, les valeurs de M_1 obtenues pour le système DMPC/CH restent supérieures à ceux du DMPC seul en présence ou non d'éthanol. Ainsi, on retrouve l'effet fluidifiant de l'éthanol sur la membrane lipidique constituée de 18% de cholestérol mais à cette proportion volumique, l'éthanol ne compense pas l'effet rigidifiant du cholestérol.

En conclusion, l'éthanol à 12% volumique a un effet fluidifiant très proche de celui observé pour la catéchine. En effet, l'éthanol désorganise le cœur hydrophobe de la membrane lipidique en phase ($L_{\alpha} + L_o$) comme c'est le cas de la catéchine mais ne compense pas l'effet rigidifiant du cholestérol. En revanche, l'éthanol désorganise aussi la membrane en phase $L_{\beta'} + L_o$ ce qui n'a pas été constaté pour la catéchine. Ainsi, il est intéressant d'étudier le modèle C/DMPC/CH en présence d'éthanol afin d'observer s'il y a, ou non synergie entre les deux effets.

III.B.3.b Effet de la catéchine sur la dynamique du système DMPC/CH (82/18) en présence d'éthanol

La catéchine a été ajoutée au modèle lipidique (MLV de DMPC/CH) en présence d'éthanol (12% volumique) à des rapports molaires T/L de 1/20 et 1/8. La **figure III.15** présente les spectres obtenus à plusieurs températures (6, 14, 22, 30 et 38°C) pour ce système aux deux rapports T/L ainsi que pour le système DMPC/CH seul en présence ou non d'éthanol. Tout d'abord, il est intéressant de noter qu'en présence d'EtOH, les spectres du système C/DMPC/CH sont quasiment similaires, ce qui était moins vrai en absence d'EtOH. On retrouve une évolution des spectres également très proche de celle observée entre le système DMPC/CH et le système C/DMPC/CH en absence d'éthanol. La catéchine a donc encore un effet fluidifiant. Toutefois, au rapport molaire 1/20, les épaulements à la périphérie du spectre bien que

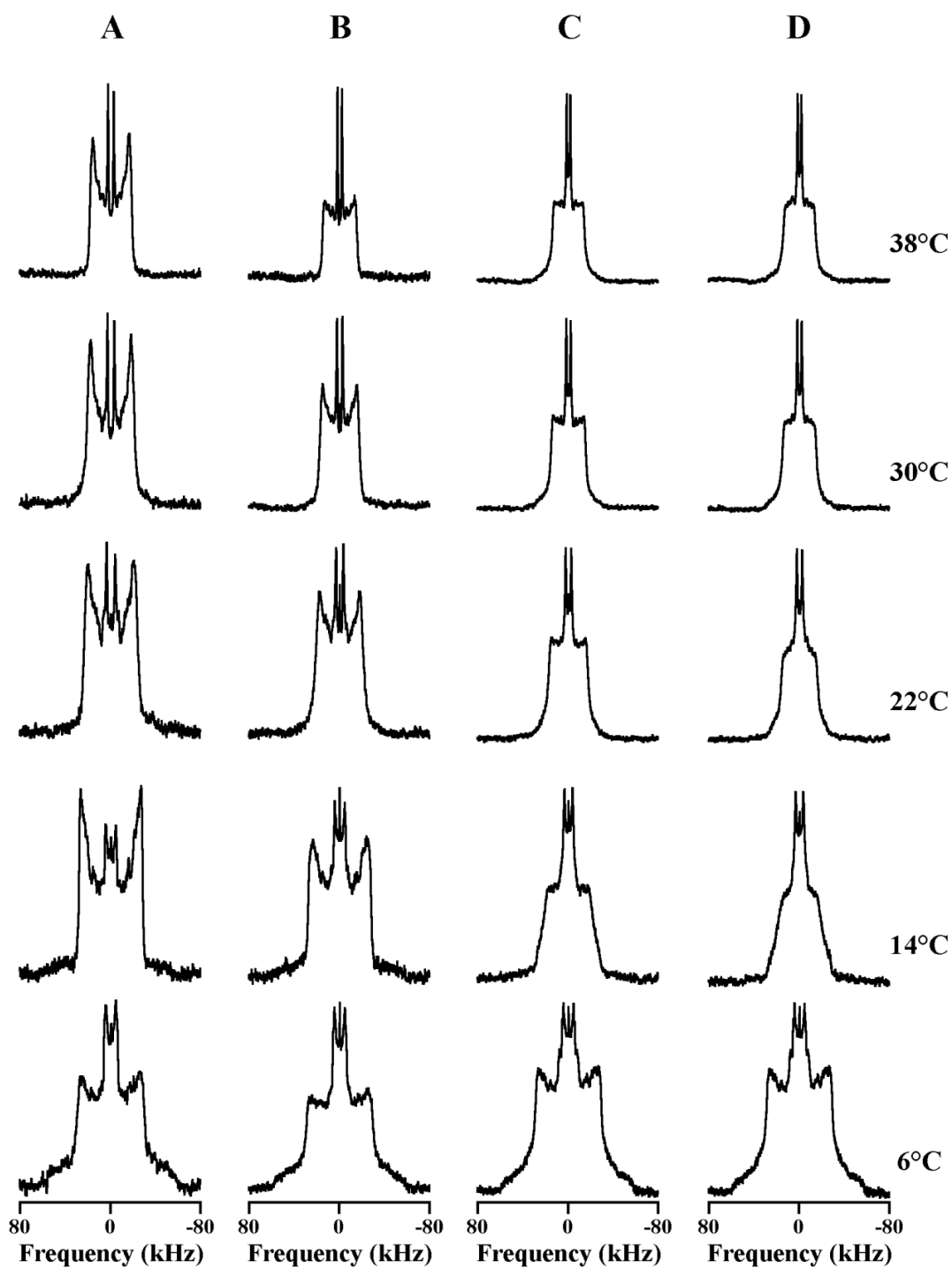


Figure III.15 : Spectres RMN du deutérium de vésicules multilamellaires de DMPC/cholestérol en absence et en présence de catéchine et/ou d'éthanol (12% volumique) à différentes températures. **(A)** DMPC/CH, **(B)** DMPC/CH + EtOH, **(C)** C/DMPC/CH + EtOH à T/L = 1/20, **(D)** C/DMPC/CH + EtOH à T/L = 1/8. Nombres d'acquisitions : 12k pour le système DMPC/CH et 16k pour les autres systèmes. Le centre du spectre est arbitrairement positionné à 0 Hz.

beaucoup moins intenses que dans le cas sans tannins subsistent contrairement au rapport 1/8. Cela signifie qu'il subsiste un peu de phase L_o aussi faible soit-elle. Ainsi, l'effet fluidifiant de la catéchine est encore ressentie pour le système lipidique DMPC/CH en présence d'éthanol mais son caractère dose-dépendant est beaucoup moins marqué que dans le cas sans éthanol.

Les variations de M_1 ont également été tracées (**figure III.16**). Les courbes relatives au DMPC-d₅₄ seul en présence (pointillé rouge) et absence d'éthanol (pointillé bleu) ainsi qu'au système DMPC/CH (82/18) en présence et en absence d'éthanol sont données à titre de comparaison. Pour le système C/DMPC/CH en présence d'éthanol, les cassures des courbes attribués à la transition de phase $L_{\beta'} + L_o \rightarrow L_{\alpha} + L_o$ ont lieu à des températures plus faibles que pour le même système en absence de tannin. La cassure de la courbe est obtenue plus rapidement pour le système C/DMPC/CH au rapport tannin/lipide de 1/8 comparé au rapport T/L de 1/20. On retrouve de nouveau l'effet fluidifiant dose-dépendant de la catéchine.

D'autre part, en phase ($L_{\beta'} + L_o$) de 2 à 6°C, aucune variation au niveau des valeurs de M_1 et des paramètres d'ordres moyen n'est constatée entre les systèmes en absence et en présence de catéchine. A l'inverse, une diminution des valeurs de M_1 est constatée pour la phase ($L_{\alpha} + L_o$) dans le système en présence de tannin. Toutefois, l'écart diminue et s'annule avec le système DMPC/CH + EtOH sans tannin avec l'augmentation de la température. L'effet fluidifiant de la catéchine s'estompe donc avec une augmentation de la fluidité membranaire comme cela a été le cas pour le système DMPC/CH sans éthanol. Toutefois, nous avons vu précédemment que les ΔM_1 restent importants entre les systèmes DMPC et C/DMPC/CH +EtOH. De ce fait, l'effet rigidifiant du cholestérol n'est pas compensé par les effets fluidifiants de la catéchine et de l'éthanol. D'autres part, pour le rapport T/L de 1/8, la courbe semble avoir un comportement asymptotique et tendre vers une valeur minimale d'environ 48kHz. Ce comportement observé également pour le rapport 1/20, permet de mettre en évidence une fluidification maximale due au tannin du système DMPC/CH. Par conséquent, l'effet rigidifiant du cholestérol sur la membrane ne pourra pas vraisemblablement être compensé par les effets simultanés de l'éthanol et de la catéchine même à des concentrations plus élevées

III.B.4 Effet de la catéchine sur la dynamique des chaînes acyles du système DMPC/CH (82/18)

Pour le système DMPC/CH en absence et en présence d'éthanol et/ou de catéchine, les études des variations des M_1 et de leurs paramètres d'ordres moyens associés en fonction de la température ont montré une diminution de ceux-ci dans chaque cas. Cela a permis de conclure à une désorganisation de la

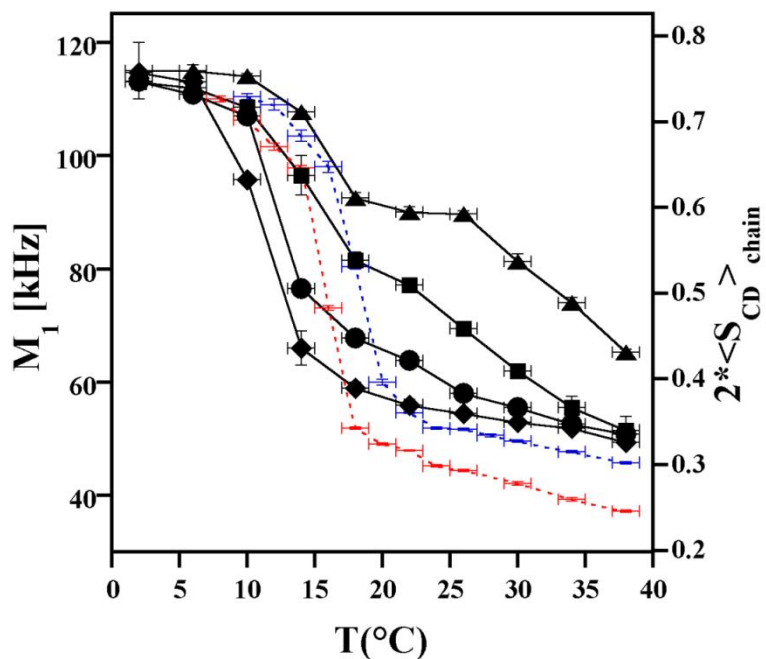


Figure III.16 : Moments spectraux M_1 et paramètre d'ordre moyen des chaînes acyles deutérées ($2\langle S_{CD} \rangle_{\text{chaîne}}$) du DMPC- d_{54} calculés en fonction de la température pour les systèmes DMPC/CH (\blacktriangle), DMPC/CH + EtOH (\blacksquare), C/DMPC/CH + EtOH (T/L = 1/8) (\blacklozenge), C/DMPC/CH + EtOH (T/L = 1/20) (\bullet) et DMPC seul en présence (trait pointillé rouge) et en absence d'éthanol (trait pointillé bleu). Le rapport molaire DMPC/cholestérol est de 82/18. Le pourcentage volumique d'éthanol est de 12%. Le DMPC est deutéré à 100%. L'erreur est estimée à $\pm 1,5^\circ\text{C}$ pour les températures et à 1-4.5 % pour les moments M_1 . L'erreur pour le paramètre d'ordre moyen, représentée sur le second axe vertical, est localisée dans les symboles.

membrane due aux molécules en présence, catéchine et/ou éthanol. Toutefois, de telles études ne permettent pas de préciser quelle partie des chaînes acyles est la plus affectée. Cette information peut toutefois être apportée par l'étude des paramètres d'ordres S_{CD} en fonction de la position de la liaison C-D le long de la chaîne acyle. Cependant, le tracé d'un profil d'ordre nécessite des spectres présentant des doublets de Pake suffisamment bien résolus afin d'obtenir des éclatements quadrupolaires par « de-Pake-ing » ou simulation (*cf.* **chapitre II.D.2.c**). Malheureusement, c'est ici le cas de tous les spectres obtenus pour ce système.

Afin d'obtenir malgré tout les observations voulues, les éclatements quadrupolaires des doublets de Pake les mieux résolus ont été mesurés à savoir celui relatif au CH_3 terminal et ceux correspondant aux épaulements en périphérie du spectre (région plateau). Les paramètres d'ordres S_{CD} ont pu ainsi être obtenus d'après l'équation II.43. Les éclatements quadrupolaires $\Delta\nu_Q$ et leurs paramètres d'ordres associés sont présentés sur la **figure III.17**.

Effet sur la dynamique de la région plateau

La **figure III.17A** montre l'évolution en fonction de la température des éclatements quadrupolaires (axe vertical de gauche) et des paramètres d'ordres associés (axe vertical de droite) pour la région plateau des systèmes, DMPC/CH, DMPC/CH en présence ou non d'éthanol et C/DMPC/CH avec des rapports T/L de 1/20 et 1/8 en présence ou non d'éthanol. Pour le système DMPC/CH sans catéchine en présence d'éthanol, les $\Delta\nu_Q$ sont plus faibles que pour le système sans éthanol mais le profil est identique. Ceci est la preuve de l'effet fluidifiant bien connu de l'éthanol. Une diminution des $\Delta\nu_Q$ est aussi constatée dans le cas du système C/DMPC/CH avec ou sans éthanol et augmente avec le rapport T/L, ce qui est en accord avec les résultats précédemment obtenus. Par ailleurs, on constate que les diminutions par rapport au système sans tannins sont moins importantes à températures élevées. Ainsi, l'influence de la catéchine sur la dynamique du système diminue avec l'augmentation en température, c'est-à-dire que son effet fluidifiant est moins ressenti sur une membrane plus fluide. Comme attendu, la plus forte diminution est obtenue pour les systèmes C/DMPC/CH en présence d'éthanol.

Effet sur la dynamique du CD_3 terminal

La **figure III.17B** montre l'évolution en fonction de la température des éclatements quadrupolaires et des paramètres d'ordre pour les systèmes étudiés précédemment. Comme précédemment, une diminution des éclatements quadrupolaires est constatée pour les échantillons en présence d'éthanol et/ou de catéchine mais ces diminutions sont toutefois moins importantes en valeur absolue que pour la région plateau. A titre d'exemple, les variations moyennes entre les modèles DMPC/CH en absence et en présence d'éthanol sont de 5 ± 1 kHz pour la région plateau est de 1.3 ± 0.4 kHz

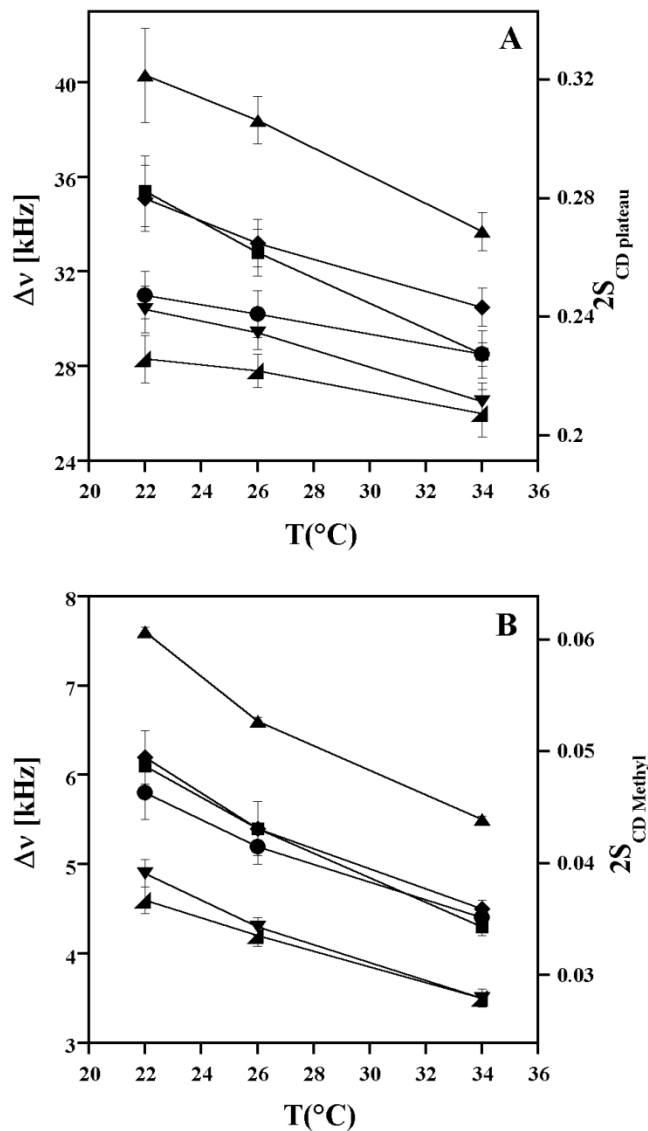


Figure III.17 : Eclatements quadrupolaires et paramètres d'ordre pour des vésicules multilamellaires de DMPC- d_{54} /cholestérol en absence et en présence de catéchine et/ou d'éthanol (12% volumique). **(A)** Région « plateau », **(B)** Groupements méthyles terminaux des chaînes acyles. (▲) DMPC/CH ; (■) DMPC/CH + EtOH ; (◆) C/DMPC/CH (T/L = 1/20) ; (●) C/DMPC/CH (T/L = 1/8) ; (▼) C/DMPC/CH + EtOH (T/L = 1/20) ; (▲) C/DMPC/CH + EtOH (T/L = 1/8). L'erreur est estimée à ± 0.2 -2 kHz pour les éclatements quadrupolaires de la région « plateau » et à ± 0.1 -0.5 kHz pour ceux des groupements méthyles terminaux. L'erreur pour les paramètres d'ordres, représenté sur le second axe vertical, est incluse dans les symboles.

pour le méthyle en bout de chaîne. Ainsi catéchine et éthanol entraînent moins de désordre au niveau du cœur hydrophobe qu'au voisinage des têtes polaires. Il est à noter que les éclatements quadrupolaires obtenus pour les systèmes C/DMPC/CH en absence d'éthanol et DMPC/CH en présence de l'alcool sont similaires. Les désordres engendrés au niveau du méthyle en bout de chaîne par la catéchine et l'éthanol sont donc comparables. Par ailleurs, comme attendu et comme pour la région plateau, la dynamique la plus importante est obtenue pour les systèmes C/DMPC/CH

Pour les deux régions, l'éthanol et le tannin augmentent la dynamique à la surface et au cœur de la membrane. Toutefois, les effets de ces deux molécules sont plus importants pour une région proche de la surface hydrophile qu'au centre hydrophobe de la bicouche.

III.B.5 Conclusion sur l'effet des tannins sur des MLV dopées avec du cholestérol (18% molaire)

Pour conclure sur le système DMPC/CH (82/18), plusieurs résultats relatifs à l'effet de la catéchine sur ce modèle membranaire ont pu être observés. (i) Comme dans le cas des vésicules multilamellaires de DMPC, une fluidification du modèle DMPC/CH suite à l'insertion de catéchine a été constatée. Cet effet semble par ailleurs plus important dans le cas des liposomes contenant du cholestérol. En outre, la transition de phase $L_{\beta'} + L_o \rightarrow L_o + L_{\alpha}$, progressive dans le cas du système DMPC/CH, devient rapide en présence du tannin. (ii) De même, une diminution des moments M_1 et des paramètres d'ordres associés est constatée pour le modèle C/DMPC/CH. De ce fait, la dynamique du cœur hydrophobe en phase fluide est fortement perturbée par l'insertion de catéchine. (iii) L'intensité de cette perturbation n'est pas constante le long de la chaîne acyle. En effet, les positions proches du squelette glycérol sont plus affectées que celles en bout de chaîne. Ce résultat fut aussi observable dans l'étude précédente. (iv) L'effet fluidifiant bien connu de l'éthanol atténue celui du tannin, surtout à des températures élevées (30, 34 et 38°C). On peut penser à une compétition entre les deux effets avec une influence de l'éthanol prédominante. (v) Le désordre engendré par la catéchine diminue en augmentant la température. A l'inverse, cette atténuation de l'effet fluidifiant due à l'augmentation de la température n'est pas constatée pour l'éthanol. (vi) Il est important de noter que ces effets (fluidification globale du modèle membranaire, désorganisation du cœur hydrophobe) dépendent de la concentration en tannin insérée. Par ailleurs, ceux-ci sont observés pour une concentration en tannin inférieure à la CMC, donc pour un état sous forme monomérique, que l'on retrouve dans le vin. (vii) Enfin, l'effet rigidifiant du cholestérol est atténué par la présence de catéchine et d'éthanol, mais n'est pas totalement compensé.

Nous avons donc vu que la catéchine avait une influence sur la dynamique du cœur hydrophobe de deux systèmes lipidiques modèles, les MLV de DMPC et le système DMPC/CH. Mais est-ce le cas pour un modèle plus représentatif de la muqueuse buccale dans les conditions proches de la dégustation ? C'est ce que nous allons voir dans la suite de ce chapitre.

III.C/ Effet de la catéchine sur un modèle de membrane buccale

L'objectif de cette partie a été d'étudier l'influence de la catéchine, sur un modèle mimant la composition lipidique des membranes buccales dans les conditions du vin ; tannin sous forme monomérique, 12% d'éthanol, température de 36°C, trouvée en bouche). Comme précédemment, le pH n'a pas été tamponnée.

III.C.1 Présentation et conception du modèle

Pour cette étude, nous nous sommes appuyés sur la composition réelle moyenne des membranes buccales données dans l'introduction (**figure I.10**). Au niveau de la composition en acide gras, on peut voir que l'acide palmitique (C16:0) et l'acide oléique (C18:1, n-9) sont les acides gras majoritaires aux proportions respectives de 23 et 20.3%. Viennent ensuite, l'acide stéarique (C18:0, 16.9%), l'acide linoléique (C18:2, n-6 14.5%) et enfin l'acide arachidonique (C20:4, n-6 9.3%). En revanche, l'acide myristique (C14:0, 1.2%), choisi dans le modèle précédent est peu présent dans l'épithélium buccal. Ainsi, le DMPC n'est pas un lipide de choix pour mimer cet épithélium, on lui préférera par exemple le POPC (une chaîne en C16:0, l'autre en C18:1).

Par ailleurs, les principaux lipides constituant l'épithélium sont en pourcentage massique le cholestérol (17.6%), les phosphatidyléthanolamines (15.1%), les phosphatidylcholines (13.9%), les glucosylcéramides (12.7%) et la sphingomyéline (9.8%) (**figure I.10A**). Nous avons donc choisi pour la composition du modèle de membrane buccale les lipides suivants qui reprennent les lipides et les acides gras les plus représentés : le POPC, le POPE, les glucosylcéramides de soja (GSL, composé majoritairement de chaînes grasses en C16:2 et C16:0), la sphingomyéline (composé majoritairement de deux chaînes grasses en C16:0) et le cholestérol. Les proportions massiques obtenues dans la littérature ont été converties en proportions molaires afin de définir le modèle d'étude suivant : POPC/POPE/GSL/SM/CH 1.5/1.8/1.5/1.2/4 (**figure III.18**). L'objectif étant de regarder l'effet de la

A

Lipids	Weight percent (%)	Weight percent (%)	Average molar mass	Mole percent (%)
CH	17.6	24.7	386.35	39
GSL	12.7	18.3	725.34	15.5
SM	9.8	14.2	728.77	12
PC	13.9	20.1	785.54	15.5
PE	15.1	21.8	743.54	18
Sum	69.1	100		100

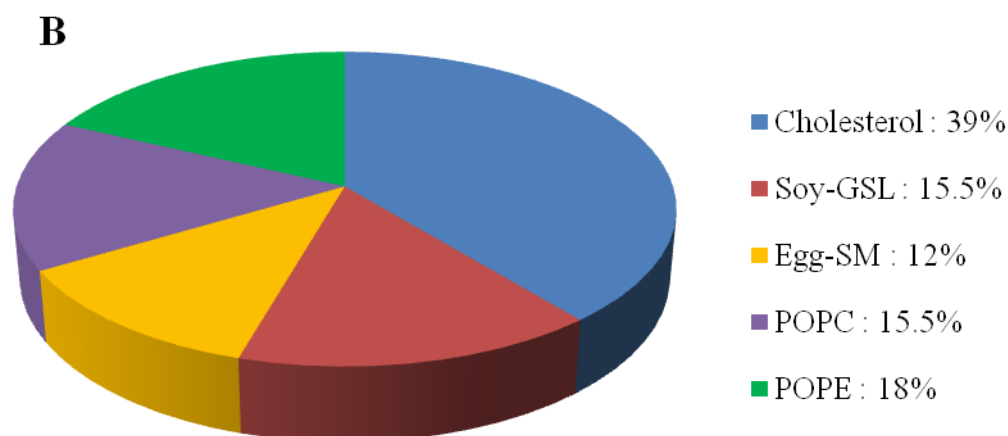


Figure III.18 : (A) Pourcentages massiques (par rapport à la masse de lipides totale présente dans l'épithélium buccal et ramené à 100% dans le modèle) et molaires des différentes classes de lipides composant le modèle membranaire utilisé. (B) Composition lipidique (% molaire) du modèle membranaire utilisé. CH : cholestérol ; GSL : Glucosylcéramides ; SM : Sphingomyéline ; PC : phosphatidylcholines ; PE : phosphatidyléthanolamines ; POPC : 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine ; POPE : 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine.

catéchine sur la dynamique du système lipidique, nous avons choisi le POPC-d₃₁ pour l'étude en RMN du deutérium.

III.C.2 Influence de la catéchine sur la dynamique du modèle de membrane buccale POPC-d₃₁/POPE/GSL/SM/CH (1.5/1.8/1.5/1.2/4) dans les conditions de la dégustation

Les vésicules multilamellaires de POPC-d₃₁/POPE/GSL/SM/CH (1.5/1.8/1.5/1.2/4) présentent un aspect opaque laiteux qu'elles soient en présence ou non de tannin comme c'est typiquement observé dans le cas de vésicules multilamellaires. En outre, aucune séparation de phase au niveau des échantillons n'a été observée au cours du temps. Les **figures III.19A et III.19B** présentent les spectres RMN du deutérium obtenus à trois températures à 36°C pour le modèle de membrane buccale en présence d'éthanol et respectivement en absence et en présence de catéchine au rapport molaire T/L = 1/20. A cette température, le spectre de RMN du deutérium obtenu pour le système sans tannin présente une symétrie axiale et des éclatements quadrupolaires bien résolus. En se référant au diagramme de Vist & Davis (Vist & Davis., 1990) à un pourcentage molaire de cholestérol (39%) le système serait en phase L_o. Toutefois, la diminution de l'intensité des épaulements en périphérie de spectre du à la présence d'éthanol, déjà observé dans le cas du système DMPC/CH (82/18) dans les mêmes conditions expérimentales suggère une coexistence de phase L_α + L_o. En présence de catéchine, un spectre de profil similaire est observé, les éclatements quadrupolaires de la région plateau et du méthyle terminal ne variant pas en présence du tannin. Ainsi, dans ses conditions expérimentales, la catéchine n'a pas d'influence sur la dynamique du cœur hydrophobe.

Afin de renforcer cette affirmation, les moments spectraux de premier ordre et les paramètres d'ordres moyens associés ont été reportés en fonction de la température (**figure III.19C**). En absence et en présence de catéchine les courbes sont confondues (ΔM_1 inférieures à 1.5kHz) ce qui traduit l'absence d'effet de la catéchine sur la dynamique du cœur hydrophobe dans ces conditions. D'autres part, on peut remarquer que les valeurs de M_1 obtenus pour ce système sont supérieures à celles obtenues pour le système DMPC/CH (82/18) dans les mêmes conditions expérimentales. Cette différence peut être expliquée par le pourcentage de cholestérol plus important dans le nouveau système (39% vs. 18%).

L'effet de la catéchine sur le modèle POPC/POPE/GSL/SM/CH (1.5/1.8/1.5/1.2/4) a été aussi étudié par RMN du phosphore afin d'observer l'influence du tannin sur la dynamique de la tête polaire. Les **figures III.20.A et III.20.B** présentent les spectres RMN du phosphore obtenus à 36°C respective

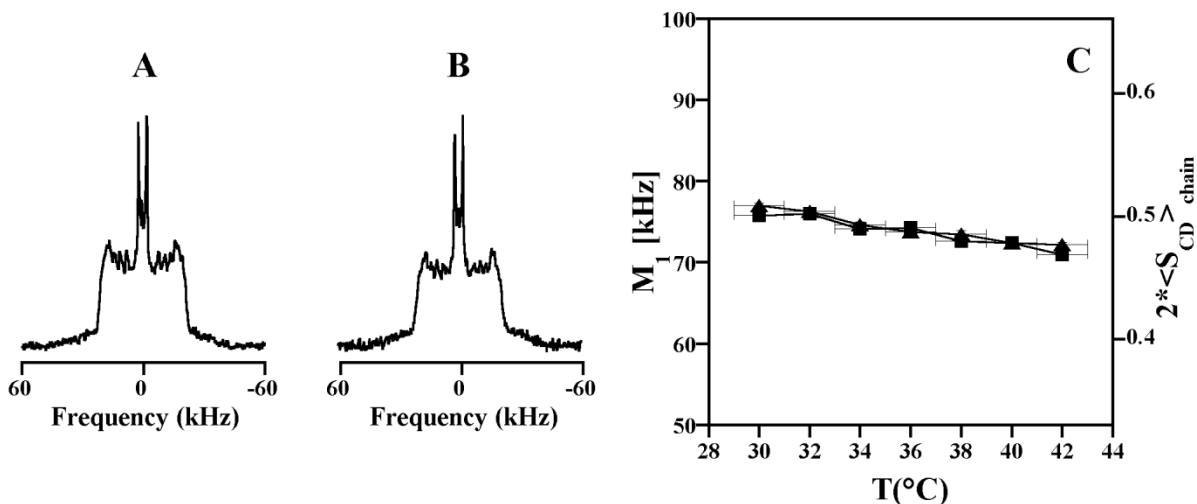


Figure III.19 : Spectres RMN du deutérium du modèle de membrane buccale POPC-d₃₁/POPE/GSL/SM/CH (1.5/1.8/1.5/1.2/4) en absence (A) et en présence (B) de catéchine. [L] = 157mM. T = 36°C. Le rapport molaire tannin/lipide est de 1/20. Nombres d’acquisitions : 10k. Le centre du spectre est arbitrairement positionné à 0Hz. (C) Moments spectraux M_1 et paramètres d’ordres moyens de la chaîne acyle deutérée ($\langle S_{CD} \rangle$) en fonction de la température pour les systèmes POPC-d₃₁/POPE/GSL/SM/CH (1.5/1.8/1.5/1.2/4) en absence (▲) et en présence (■) de catéchine. L’erreur est estimée à $\pm 1^\circ\text{C}$ pour les températures et à ± 0.4 kHz pour les moments M_1 . L’erreur du paramètre d’ordre moyen, représentée sur le second axe vertical, est estimée à ± 0.002 .

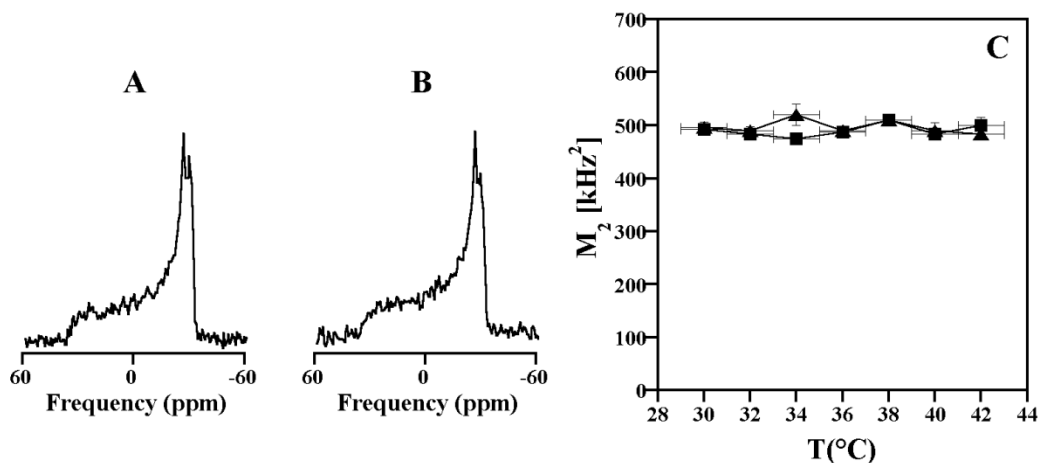


Figure III.20 : Spectres RMN du phosphore du modèle de membrane buccale POPC-d₃₁/POPE/GSL/SM/CH (1.5/1.8/1.5/1.2/4) en absence (A) et en présence (B) de catéchine. [L] = 157mM. T = 36°C. Le rapport molaire tannin/lipide est de 1/20. Nombres d’acquisitions : 512. (C) Moments spectraux M_2 en fonction de la température pour les systèmes POPC-d₃₁/POPE/GSL/SM/CH (1.5/1.8/1.5/1.2/4) en absence (▲) et en présence (■) de catéchine. L’erreur est estimée à $\pm 1^\circ\text{C}$ pour les températures et à $\pm 5-20$ kHz² pour les moments M_1 .

-ment en absence et en présence de catéchine. A cette température, un spectre de poudre à symétrie axiale, présentant une anisotropie de déplacement chimique de 38 ± 1 ppm, est observé pour le système lipidique en absence de catéchine. Ce spectre, caractéristique d'une phase lamellaire présente deux pics au niveau de la partie la plus intense du signal (σ_{\perp}), l'un à -12.2 ppm, l'autre à -14.5 ppm. La présence de ces deux pics peut s'expliquer par l'hétérogénéité en termes de composition du modèle membranaire, plusieurs classes de lipide du modèle membranaire étant visibles en RMN du phosphore (POPC-d₃₁, POPE, sphingomyéline d'œuf). En présence de tannin, le spectre obtenu est très semblable à celui du système sans tannin, l'allure spectrale et l'anisotropie de déplacement chimique ne présentant aucune variation entre ces deux systèmes. Ainsi, l'ajout de tannin n'implique aucune modification sur la dynamique des têtes polaires du modèle membranaire.

Cette affirmation a été confortée par l'étude de la variation des moments spectraux de deuxième ordre M_2 en fonction de la température (**figure III.20C**). En effet, les M_2 pour les systèmes avec et sans tannins présentent des valeurs similaires, autour de 490 ± 15 kHz², et les courbes relatives à ces deux échantillons sont confondues. Par ailleurs, aucune décroissance des M_2 n'est constatée pour ces deux systèmes, ainsi, la température n'a pas d'influence sur la dynamique des têtes polaires des échantillons dans les conditions de l'étude.

En conclusion, aucune variation au niveau des M_1 et des M_2 n'est constatée suite à l'insertion de catéchine dans le modèle membranaire POPC/POPE/GSL/SM/CH (1.5/1.8/1.5/1.2/4) dans les conditions de l'étude ($T = 36^{\circ}\text{C}$, 12% d'éthanol). Ainsi, dans ces conditions le tannin n'influe pas sur la dynamique de la membrane buccale que ce soit au niveau du cœur hydrophobe ou de la tête polaire.

III.D Discussion

Nous discuterons des résultats précédemment obtenus en les reliant avec ceux de la littérature. Dans un premier temps, nous discuterons de l'effet du tannin sur un modèle simple, les MLV de DMPC. Des explications seront ainsi avancées pour justifier les principaux résultats obtenus, (i) fluidification globale de la membrane, (ii) désorganisation du cœur hydrophobe dépendant de la structure du tannin. Afin de se rapprocher des conditions de la dégustation, les MLV de DMPC ont été étudiés en présence d'éthanol et dopés avec du cholestérol. L'effet du tannin en présence d'éthanol et sur un système lipidique enrichi en cholestérol sera discuté dans une seconde partie. Enfin, nous discuterons des possibles implications du résultat obtenu sur le modèle POPC/POPE/GSL/SM/CH (1.5/1.8/1.5/1.2/4) le plus représentatif des muqueuses buccales au niveau de la dégustation d'un vin.

Les tannins fluidifient le modèle membranaire

Une diminution de la température de transition de phase de 3°C entre les systèmes T/MLV et MLV seule a été mise en évidence. Cette diminution traduit donc un effet fluidifiant des tannins sur le modèle membranaire. Cet effet est indépendant de la structure du tannin mais dépend du rapport molaire T/L mis en jeu. Une explication possible peut être établie en raisonnant sur l'effet du tannin sur l'aire par molécule du lipide. Lee et al. (2004) montrèrent, par modélisation de l'effet de petites molécules (méthanol, DMSO, tréhalose) sur des bicouches de DPPC, que l'aire par molécule et le paramètre d'ordre S_{CD} étaient inversement corrélées. Or les S_{CD} sont directement corrélés au moment spectral M_1 (Davis, 1979) donc à la fluidité. De ce fait, nous pouvons émettre l'hypothèse d'une corrélation entre aire par molécule et fluidité. Cette hypothèse est confortée par les travaux de Lee et al. qui montrèrent que le méthanol, molécule fluidifiante, tend à augmenter l'aire par lipide. A l'inverse, le cholestérol, molécule rigidifiant les membranes fluides, la diminue (Ipsen et al., 1990). Ainsi, une molécule diminuant l'aire par molécule des lipides constituant la bicouche, augmente la rigidité de celle-ci et inversement. En conséquence, en se référant aux travaux de Simon et al. (1994) qui montrèrent que l'acide tannique augmente l'aire par molécule des phosphocholines, nous pouvons proposer que l'effet fluidifiant des tannins sur une membrane de DMPC pourrait être dû à une augmentation de l'aire par molécule du système lipidique par interaction des têtes polaires avec le tannin.

Les tannins désorganisent le cœur hydrophobe du modèle lipidique

Nous avons vu que E, EC, et EGCG désorganisent le cœur hydrophobe du modèle membranaire. Ce désordre, traduit par les variations des différents paramètres d'ordre S_{CD} relatif aux liaisons C-D des chaînes acyles, semble plus prononcé pour des positions proches du squelette glycérol qu'en profondeur.

Le centre de la bicouche, très mobile, n'est lui pas affecté par la présence des polyphénols. Ces résultats suggèrent que les tannins s'insèrent dans le cœur hydrophobe au niveau du squelette glycérol. Par ailleurs, l'étude de la structure tridimensionnelle du DMPC (Strenk et al. 1985, Dufourc et al. 1992) montre que le squelette glycérol est localisé à la surface de la bicouche. Le résultat que nous avons obtenu n'est donc pas en désaccord avec les travaux issus de la littérature suggérant une localisation en surface des polyphénols (Uekusa et al. 2007 et 2011, Sirk et al. 2008). En effet, dans notre cas, les tannins sont bien localisés à l'interface mais au moins une partie de la molécule se situe sous les têtes polaires. Ces travaux concordent avec les résultats obtenus en RMN des solides par Yu et al. (2011) qui constatèrent par RMN ^2H et ^{31}P sur un système similaire (EGCG/DMPC- d_{54} , rapport molaire de 1/10 et 1/20) une désorganisation du cœur hydrophobe et une augmentation de la dynamique à la surface de la membrane par insertion d'EGCG. Ils apportent toutefois un peu plus de précision en montrant que cet effet de désordre n'est pas homogène le long de la chaîne acyle.

L'étude de Yu et al. établit un lien entre la lipophilie du tannin et sa faculté à désorganiser le cœur hydrophobe des vésicules multilamellaires. En effet, cette étude, effectuée sur trois tannins (cat₃, EGCG, PGG), montre que plus le caractère lipophile du tannin est marqué, plus celui-ci diminue le paramètre d'ordre moyen du modèle membranaire. Ce résultat est retrouvé ici et tend à apporter une explication à l'effet fluidifiant sur la phase fluide plus important pour EGCG que pour les deux autres tannins non galloylés, C et EC. En effet, le logP d'EGCG (12.1) étant plus élevé que ceux de C et d'EC (2.4) selon Hagerman et al. (1998), celui-ci est plus lipophile, son effet sur l'ordre des chaînes acyles est donc plus important. En outre, ces résultats sont en accord avec les mesures de constante d'association tannins-lipides par microbalance à cristal de quartz (QCM) par Kamahira et al. (2008) où ils obtinrent des K_a mille fois plus élevés dans les cas d'EGCG et ECG comparés à ceux obtenus pour C et EC

Effet des tannins sur la fluidité du modèle membranaire en présence d'éthanol

Deux résultats sont observés en présence d'éthanol : (i) en phase fluide une diminution de l'influence de la catéchine sur la désorganisation du cœur hydrophobe en présence d'éthanol est constatée. (ii) l'effet fluidifiant de la catéchine sur le modèle membranaire plus importante en absence qu'en présence de l'alcool. Ces résultats peuvent être expliqués en se basant sur la localisation de l'éthanol au niveau de la membrane. Celle-ci fut abondamment étudiée dans la littérature. Citons notamment les travaux de Barry & Gawrisch (1994,1995) ou encore ceux de Holte et al. (1997) qui montrèrent, en quantifiant l'intensité des taches de corrélation entre l'éthanol et le lipide obtenues en RMN à deux dimensions de type NOESY, une localisation de l'éthanol au niveau du squelette glycérol du lipide dans le cas de DMPC- d_{27} , SOPC- d_{35} (18:0/18:1) et SDPC- d_{35} (18:0/22:6). Cette localisation est favorisée par différentes interactions entre l'éthanol et la bicouche comme des liaisons hydrogène entre le groupement

hydroxyle de l'alcool et les groupements carbonyle et phosphate du lipide ou encore des interactions hydrophobes entre le groupement éthyle de l'éthanol et les CH₂ proche du squelette glycérol du lipide (Feller et al., 2002). Ainsi, l'éthanol est localisé dans la même région du lipide que le tannin ce qui peut entraîner une compétition pour un même site de fixation entre les deux molécules. De ce fait, les effets fluidifiant et de désordre induits par le tannin diminue en présence d'éthanol

Effet de la catéchine sur un modèle membranaire enrichi en cholestérol

En présence d'un pourcentage molaire de cholestérol généralement supérieur à 5-10%, mais dépendant notamment de la température, le modèle lipidique présente une hétérogénéité dans son organisation. Cela se traduit par une coexistence de deux phases, une phase lamellaire gel L_{β'} ou fluide L_α pour les régions pauvres en cholestérol et une phase liquide ordonnée L_o pour les régions enrichies en stérol. Cette organisation des bicouches lipidiques contenant du cholestérol fut couramment étudiée dans la littérature au cours de ces trente dernières années. Citons notamment les travaux en microscopie de fluorescence de Veatch & Keller (2002) ou encore les diagrammes de phases de Vist & Davis (1990), de Sankaram & Thompson (1991) et de McMullen & McElhaney (1995) qui ont servi de base à cette étude.

En présence de catéchine, une fluidification globale du système ainsi qu'une désorganisation du cœur hydrophobe sont à nouveau observées. Néanmoins, les intensités de ces deux effets sont plus importantes que pour le modèle lipidique sans cholestérol. Une modification de la nature des phases en présence est également constatée. En effet, la transition L_{β'} + L_o → L_α + L_o devient rapide et la proportion de la phase L_o diminue en présence de tannin, ce qui se traduit sur le spectre RMN du deutérium par une baisse en intensité des épaulements en périphérie du spectre.

Comme dans le cas de l'éthanol, une explication peut être proposée en raisonnant sur la localisation du cholestérol au niveau de la bicouche lipidique et en comparant celle-ci avec la localisation du tannin. L'interaction entre le cholestérol et les phospholipides a été longuement étudiées dans la littérature (Ohvo-Rekilä et al., 2002). Il en résulte que le cholestérol s'insère perpendiculairement par rapport au plan de la bicouche avec son groupement hydroxyle localisé au niveau du squelette glycérol et sa structure tétracyclique hydrophobe insérée en profondeur à proximité des positions 2 à 10 des chaînes acyles du lipide (Dufourc et al., 1984, Yeagle., 1988, Davies et al., 1990, Finegold., 1993). Or, nos travaux, concordant avec la littérature (Uekusa et al., 2007 et 2011, Sirk et al., 2008), indiquent que les tannins sont localisés sous la surface de la membrane au niveau du squelette glycérol. Tannin et cholestérol sont donc localisés en partie à proximité du glycérol ce qui induit un encombrement stérique au niveau de cette région du lipide. De ce fait, on peut raisonnablement penser que la présence du tannin

tend à défavoriser la formation de région riche en cholestérol (organisée en phase L_o) et va favoriser la diffusion de celui-ci vers des régions pauvres en stérol (organisées en phase L_a). Ce comportement est par ailleurs retrouvé pour d'autres molécules, certes de structures différentes de celle du cholestérol, insérées dans un système PC/CH, comme des céramides (Chiantia et al., 2006) ou des intercalants membranaires tels l'acide parinarique ou le cholestatrienol (**annexe 2**, Alanko et al., 2005). Il en résulte une augmentation du pourcentage de lipide organisé en phase L_a et une diminution du pourcentage de lipide organisé en phase L_o , ce qui est en accord avec nos résultats..

Ainsi, la catéchine va entraîner une diffusion du cholestérol vers les régions où celui-ci est peu abondant ce qui va induire une diminution de la phase L_o et donc un changement dans la dynamique du modèle membranaire. Si on veut relier cette conclusion aux phénomènes présents lors de la dégustation d'un vin, il est nécessaire d'être prudent. En effet, le tannin fut inséré par cosolubilisation au modèle DMPC/CH ce qui tend à favoriser sa présence dans la bicouche et défavoriser la formation des régions riches en cholestérol organisé en phase L_o . Dans des conditions proches de la dégustation, le tannin est ajouté à la membrane où ces régions sont présentes initialement. On peut ainsi s'attendre à un effet du tannin moins important dans ces conditions. Toutefois, il n'est pas aberrant de conclure à la présence de cet effet en bouche, avec une intensité sans doute moindre.

Implication possible dans le goût des vins

Les résultats obtenus dans des conditions proches de la dégustation sur le modèle le plus représentatif des membranes buccales, POPC/POPE/GSL/SM/CH (1.5/1.8/1.5/1.2/4), ne montrent aucune variation dans la dynamique du modèle membranaire en présence de tannin. Ainsi, dans ces conditions, le tannin n'influe pas sur la dynamique de la membrane buccale que ce soit au niveau du cœur hydrophobe ou de la tête polaire. Le résultat est à rapprocher de ceux trouvés pour le système DMPC/CH (82/18) en présence d'éthanol. En effet, une forte variation des moments spectraux de premier ordre a été constatée en phase fluide entre les systèmes DMPC/CH et C/DMPC/CH en présence d'éthanol. Cependant, ces variations ne sont plus significatives pour des températures supérieures à 30°C. Par conséquent, il n'est pas surprenant d'obtenir aucun effet de la catéchine à 37°C. Par ailleurs, on a montré que l'effet fluidifiant de la catéchine est beaucoup moins prononcé sur les membranes plus fluides, ce qui est le cas en présence d'éthanol.

Dans le contexte de la dégustation, l'éthanol et la catéchine sont deux molécules exogènes possédant un effet fluidifiant reconnu. Toutefois, elles sont présentes dans des proportions bien différentes, l'éthanol ayant une concentration plus importante que la catéchine (2.5M vs. 680µM). Ainsi,

l'effet fluidifiant de l'éthanol va prédominer par rapport à celui de la catéchine. On peut donc supposer que les récepteurs gustatifs vont être plus perturbés non pas par le tannin, mais par l'effet fluidifiant de l'éthanol.

Toutefois, le vin se dégustant à une température idéale comprise entre 8 à 18°C selon les vins, l'ingestion de cette boisson peut entraîner localement une diminution de la température en bouche de quelques degrés pendant un court instant. Or, contrairement au système riche en cholestérol (POPC/POPE/GSL/SM/CH 1.5/1.8/1.5/1.2/4), un effet fluidifiant a été constaté entre 30 et 34°C sur le système présentant une teneur en cholestérol plus faible (DMPC/CH 82/18). Du fait de la répartition inhomogène des stérols au niveau de la membrane, ces résultats suggèrent que les tannins pourraient avoir un effet fluidifiant sur des régions pauvres en cholestérol des membranes buccales au moment de la dégustation.

III.E Conclusion et perspectives

L'objectif de ce chapitre était d'étudier l'influence des interactions tannin-lipide sur la dynamique de plusieurs modèles membranaires, afin de relier ces résultats sur une possible influence de ces interactions sur l'amertume. Pour ce faire, nous avons étudié l'influence de trois tannins, C, EC et EGCG, sur la dynamique de plusieurs modèles membranaires, un modèle très grossier mais simple, les vésicules multilamellaires de DMPC, et un modèle beaucoup plus représentatif de la composition des muqueuses buccales, le système POPC/POPE/GSL/SM/CH (1.5/1.8/1.5/1.2/4).

Plusieurs effets notables furent observés sur le premier système, en absence et en présence de cholestérol. Ainsi, il a été constaté que les tannins induisent une fluidification globale des modèles membranaires et une désorganisation de leur cœur hydrophobe, dont l'intensité dépend de la structure du tannin mise en jeu. Par ailleurs, une perturbation plus importante de l'organisation du modèle membranaire fut constatée pour un système lipidique contenant du cholestérol. Une diffusion du cholestérol des régions riches vers les régions pauvres en stérols a ainsi été observée, entraînant une désorganisation plus importante de la membrane. A l'inverse, l'éthanol, par son caractère fluidifiant, a tendance à atténuer les effets du tannin sur la fluidité et l'organisation de la membrane rendue plus fluide en sa présence. Cette atténuation est retrouvée au niveau de l'étude des effets du tannin sur le modèle POPC/POPE/GSL/SM/CH (1.5/1.8/1.5/1.2/4), où aucune influence n'est constatée dans les conditions de la dégustation. Ainsi, l'interaction tannin-lipide ne serait pas le principal facteur influençant l'amertume ressentie, le changement dans la dynamique de la membrane induisant la perturbation des récepteurs gustatifs serait principalement du à l'effet fluidifiant de l'éthanol. Toutefois, les résultats obtenus sur le

système DMPC/CH (82/18) laissent penser que les tannins fluidifieraient légèrement la membrane pour des systèmes pauvres en cholestérol. Ainsi, les récepteurs au goût amer situés dans de telles régions s'en trouveraient perturbés.

Ce travail a permis une étude globale de l'influence des tannins sur la dynamique de modèles membranaires mimant les épithéliums buccaux et linguaux. Toutefois, quelques points restent encore à éclaircir. On peut penser à une étude de l'effet du tannin sur la dynamique du système DMPC/CH (82/18) en faisant interagir le tannin non pas par cosolubilisation mais par addition, ce procédé mimant mieux les conditions de la dégustation. En outre, il serait intéressant d'étudier l'effet du tannin sur le système POPC/POPE/GSL/SM/CH (1.5/1.8/1.5/1.2/4) en absence d'éthanol afin de confirmer l'hypothèse d'un effet sur la dynamique du modèle membranaire dans ces conditions. De plus, les tannins utilisés restent basiques, des monomères ayant été uniquement utilisés. Ainsi, une perspective d'étude viserait à étudier l'influence d'un tannin dimérique ou oligomérique, ou bien encore d'un mélange de plusieurs tannins, sur la dynamique des modèles membranaires. Enfin, des travaux en DSC permettraient de confirmer les résultats obtenus par RMN en termes de valeur de température de transition de phase.

CHAPITRE IV

Etude de l'interaction tannin-lipide par RMN des liquides – Détermination de constantes d'association

Résumé

L'astringence est une sensation de dessèchement en bouche ressentie lors de la dégustation d'un vin qui résulte d'interactions entre les tannins du vin et les protéines de la salive, entraînant leur précipitation. L'affinité tannin-protéines salivaires a pu être quantifiée au laboratoire lors de travaux antérieurs (Cala et al., 2010). En bouche, les tannins peuvent aussi interagir avec les lipides présents lors de la dégustation, notamment ceux des membranes buccales. Mais l'affinité des tannins pour les lipides est-elle comparable à celle pour les protéines salivaires ? L'objectif de ce chapitre est de quantifier l'interaction tannin-lipides par la mesure de constantes d'association (K_a) par RMN et de la comparer à l'interaction tannin-protéines salivaires pour permettre de connaître son impact sur l'astringence. Les constantes d'association tannin-lipides ont été étudiées pour quatre tannins (C, EC, ECG, EGCG) en interaction avec des vésicules multilamellaires de DMPC à pH 7.4 et à 37°C. Celles-ci ont été déterminées à partir de l'ajustement mathématique de la courbe représentant les variations de déplacement chimique du groupement $N^+(CH_3)_3$ du lipide en fonction de la concentration en tannin ajouté. L'échelle d'affinité tannin-lipides suivante a pu être établie : $K_a(EGCG/MLV) = 2217 \pm 590 M^{-1} > K_a(EC/MLV) = 1110 \pm 149 M^{-1} \sim K_a(C/MLV) = 973 \pm 116 M^{-1}$. Celle-ci montre que la stéréochimie des groupements en position 2 et 3 du cycle pyrane des tannins n'a pas d'influence sur l'association tannin-lipides et que l'affinité augmente dans le cas des tannins galloylés. L'influence du milieu (pH, T, présence d'éthanol) sur la constante d'association tannin-lipides a également été étudiée dans le cas de la catéchine. Les résultats montrent qu'une diminution de la température et du pH tendent à diminuer l'affinité du tannin pour le système lipidique modèle ($K_a(C/MLV, 31^\circ C) = 669 \pm 57 M^{-1}$ et $K_a(C/MLV, pH 3.5) = 696 \pm 57 M^{-1}$). La présence d'éthanol dans le milieu entraîne la diminution la plus importante avec une constante d'association estimée entre 176 et 258 M^{-1} . Enfin, l'absence d'influence de la nature des chaînes grasses du lipide sur la constante d'association tannin-lipides a été constatée, les K_a étant sensiblement les mêmes pour les systèmes C/MLV de DMPC et C/MLV de POPC ($973 \pm 116 M^{-1}$ vs. $1066 \pm 300 M^{-1}$). Enfin, l'ensemble de ces résultats a permis de montrer que les constantes d'association relatives aux interactions tannin-lipides étaient du même ordre de grandeur que celles relatives aux interactions tannin-protéines salivaires. Il existe donc au moment de la dégustation une compétition entre les interactions tannin-lipides et tannin-protéines salivaires. Les lipides vont donc jouer un rôle sur la sensation d'astringence ressentie.

L'astringence est une sensation tactile présente lors de la dégustation qui participe à la qualité globale et au caractère d'un vin. Celle-ci est la conséquence d'une précipitation de certaines protéines de la salive (Green, 1993) due à de fortes interactions avec les tannins. Il en résulte des sensations de plissement, de dureté et de sécheresse en bouche (Lee et al., 1991). Des travaux ont été effectués, notamment au laboratoire (Cala et al., 2010) permettant de quantifier les interactions responsables de cette astringence. Des constantes de dissociation, de l'ordre du milli-molaire à la dizaine de milli-molaire, ont pu être établies entre 5 tannins (la catéchine, les dimères B1, B2, B3 et B4 et le trimère C2) et trois peptides modèles mimant les protéines de la salive (IB7₁₄, IB9₃₇, His₃).

Les tannins peuvent induire des modifications des propriétés gustatives par interaction avec une autre classe de composés, les lipides présents dans les parois buccales. Une compétition entre les interactions tannin-lipide et tannin-protéine ayant un effet sur l'astringence est envisageable. Ces interactions tannin-lipide dans un contexte plus général ont été couramment étudiées dans la littérature, notamment par RMN (Uekusa et al., 2007 ; Uekusa et al., 2011), modélisation moléculaire (Sirk et al., 2008), microbalance à cristal de quartz (Kamihara et al., 2008) ou encore par mesure de coefficient de partition (Uekusa et al., 2008). Mais à notre connaissance, seule une étude a été effectuée par la technique de microbalance à cristal de quartz QCM (quartz-crystal microbalance) et a permis de déterminer des constantes d'association tannin-lipide avec des multicouches supportées de DMPC. L'échelle d'affinité suivante a été obtenue : $K_a(\text{ECG}) = (3.75 \pm 0.997) \cdot 10^6 \text{M}^{-1} > K_a(\text{EGCG}) = (2.16 \pm 0.791) \cdot 10^6 \text{M}^{-1} \gg K_a(\text{EC}) = (1.86 \pm 0.128) \cdot 10^3 \text{M}^{-1} > K_a(\text{EGC}) = (1.33 \pm 0.124) \cdot 10^3 \text{M}^{-1}$ (Kamihara et al., 2008). Toutefois, d'autres études doivent être menées pour valider ces résultats. Ainsi, l'objectif de ce chapitre a été de déterminer les constantes d'association entre les tannin et les lipides des membranes buccales par RMN, technique de choix pour la détermination de telles constantes (Baxter et al., 1997 ; Charlton et al., 2002, Cala et al., 2010).

Dans le cadre du goût du vin, les membranes buccales ont été modélisées par des liposomes multilamellaires (MLV). Deux lipides, le DMPC, utilisé pour les études du chapitre III et le POPC, lipide composé des acides gras les plus représentés dans les membranes buccales (C16:0 et C18:1), ont été utilisés pour cette étude. De plus, notre choix s'est porté sur quatre tannins, la catéchine (C), l'épicatéchine (EC), l'épicatéchine gallate (ECG) et l'épigallocatechine gallate (EGCG). En effet, les deux premiers sont à la base des principaux tannins condensés retrouvés dans le vin (Blouin et al., 2003). L'EGCG, quant à lui, présente un groupement galloyle qui semblerait augmenter l'affinité du tannin pour les membranes (Tsuchiya., 2001 ; Kajiya et al., 2001 ; Uekusa et al., 2008). Enfin, l'EGCG a été étudié pour examiner l'influence du groupement hydroxyle en position 5' du cycle B sur l'affinité tannin-lipide

Les principales étapes ayant permis l'élaboration du protocole visant à déterminer la constante d'association entre les tannins et les lipides membranaires sont présentées dans une première partie à travers le système C/MLV. Cette constante est obtenue à partir de la courbe des variations de déplacement chimique du groupement $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ du lipide en interaction avec le tannin, extraites de

son spectre RMN ^1H , en fonction de la concentration en tannin ajoutée. L'influence du rapport molaire tannin-lipide et de l'état d'agrégation du tannin (monomérique ou micellaire) sur ces variations ont été également examinées. L'influence sur la constante d'association tannin-lipide de la structure du tannin, du milieu (pH, T, présence d'éthanol) et de la nature du lipide constituant le modèle lipidique est ensuite analysée. Enfin, les résultats que nous avons obtenus sont discutés et comparés avec ceux de la littérature. Les constantes d'association tannin-lipide et tannin-protéine sont notamment comparées.

IV.A Caractérisation structurale du système par RMN ^1H

L'attribution des spectres proton relatifs aux vésicules multilamellaires de DMPC et aux différents tannins étudiés sont présentés dans cette partie.

IV.A.1 Caractérisation des vésicules multilamellaires

Les vésicules multilamellaires, du fait de leurs propriétés anisotropes dues à leur taille ne peuvent pas être étudiées dans les conditions de la RMN des liquides classique, le spectre RMN du proton qui en résulte étant très large et non résolu. La RMN à rotation à l'angle magique est nécessaire afin d'obtenir un spectre présentant des pics fins et caractérisables (**figure IV.1**). L'attribution des MLV de DMPC a été effectuée à l'aide de la littérature (Carlotti et al., 2002) et en utilisant une séquence de RMN à deux dimensions de type COSY. Ce spectre présente trois régions distinctes. La première entre 0.8 et 3ppm est relative aux différents protons des chaînes acyles. Il est à noter que les chaînes sn-1 et sn-2 présentent les mêmes déplacements chimiques à l'exception du CH_2 en α du carbonyle où deux résonances sont observées, synonymes de déplacements chimiques légèrement différents au niveau des deux chaînes. Les résonances relatives à la tête choline sont elles retrouvées entre 3 et 4ppm. Enfin, les groupements relatifs au squelette glycérol ont des déplacements chimiques compris entre 4 et 5.5ppm. Cette région étant plus rigide, les résonances associées sont plus larges et moins intenses que celles associées à la tête choline. L'attribution est présentée dans le **tableau IV.1**.

Un deuxième lipide a été utilisé au cours de cette étude, le POPC (16:0-18:1 PC) présentant des longueurs de chaîne plus importantes et une insaturation sur sa chaîne acyle sn-2. Le spectre RMN du proton de ce lipide est similaire à celui du DMPC, hormis deux résonances supplémentaires relatives à la double liaison, une à 5.3 ppm ($\text{CH}=\text{CH}$), l'autre à 2.06 ppm ($\text{CH}_2\text{-CH}=\text{CH-CH}_2$).

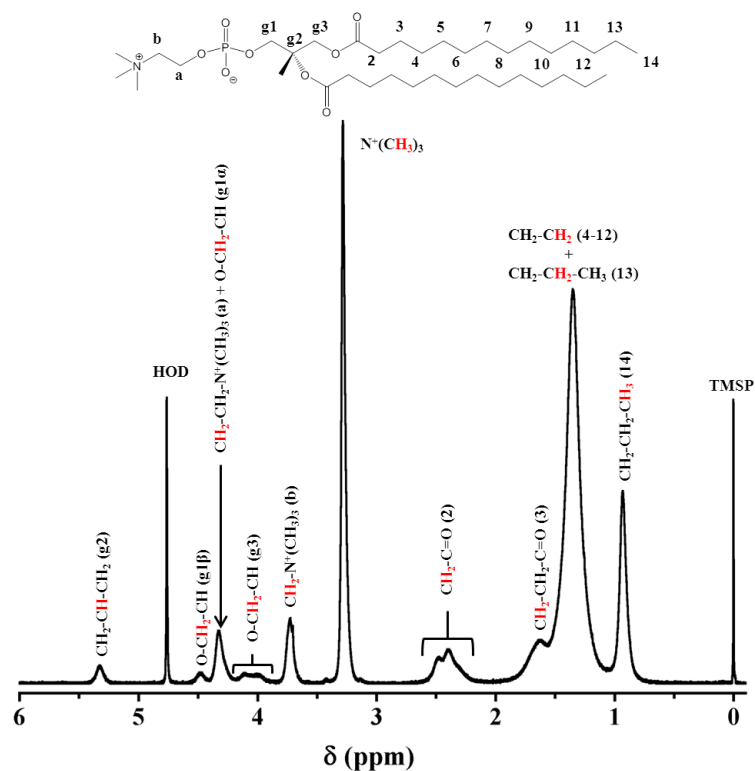


Figure IV.1 : Spectre RMN HR-MAS du proton de vésicules multilamellaires de DMPC dans de l'eau deutérée ($\delta_{\text{HOD}}=4.76$ ppm). [L] = 20mM ; T = 37°C ; vitesse de rotation 5kHz. Le spectre est référencé par le TMSP dont le déplacement chimique est fixé à 0ppm.

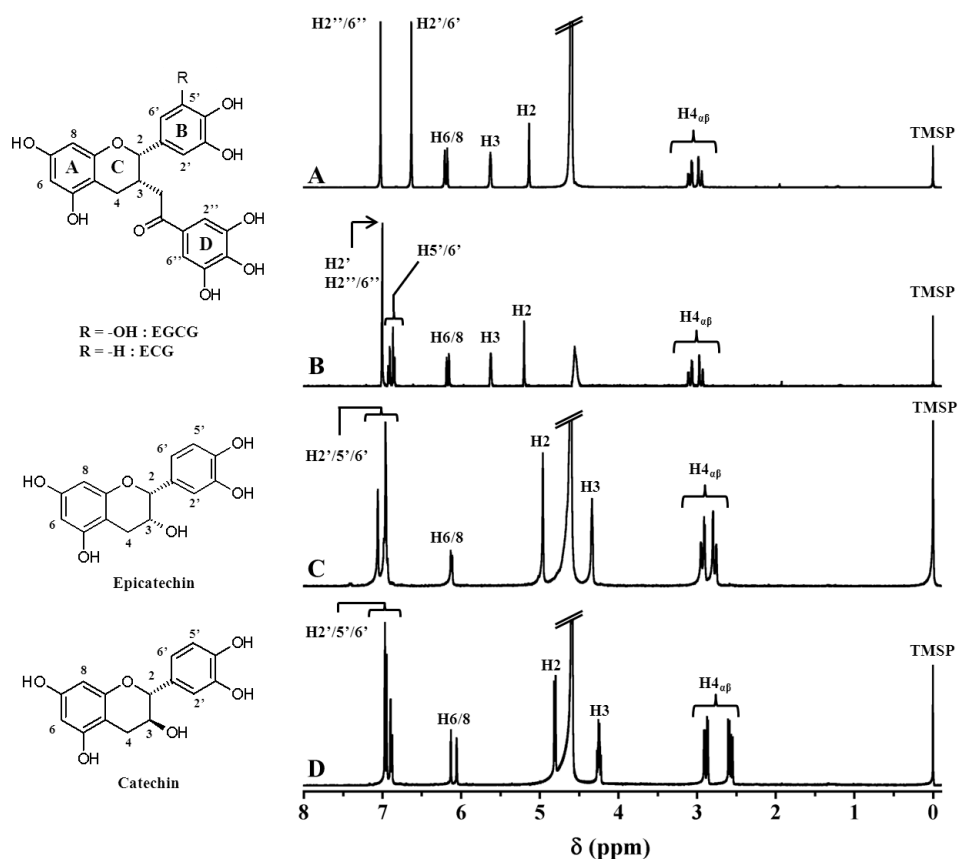


Figure IV.2 : Spectres RMN du proton des tannins utilisés dans de l'eau deutérée D_2O ($\delta_{\text{HOD}} = 4.61$ ppm). (A) EGCG, (B) ECG, (C) épicatechine, (D) catéchine. T = 40°C.

Groupement	δ (ppm)
CH (g2)	5.33
CH ₂ (g1)	4.48
CH ₂ (a)	4.33
CH ₂ (g3)	4.11-3.98
CH ₂ -N ⁺ (CH ₃) ₃ (b)	3.72
N ⁺ (CH ₃) ₃	3.28
CH ₂ -C=O (2)	2.4
CH ₂ -CH ₂ -C=O (3)	1.62
chaînes acyles (-CH ₂ -) (4-13)	1.3-1.2
CH ₃ term	0.93

Tableau IV.1 : Déplacements chimiques (en ppm) des protons pour les différents groupements moléculaires du lipide (obtenus à partir de la figure 6.1). Milieu : Eau deutérée. T = 37°C. Les déplacements chimiques sont référencés par rapport au TMS, fixé à 0ppm. L'erreur est estimée à $\pm 0.005-0.01$ ppm.

IV.A.2 Attribution par RMN ¹H des résonances du tannin

Les structures et les spectres des quatre tannins utilisés durant ce chapitre sont présentés sur la **figure IV.2**. L'attribution des MLV de DMPC a été effectuée à l'aide de la littérature (Uekusa et al., 2007) et en utilisant une séquence de RMN à deux dimensions de type COSY. Les spectres présentent, comme pour les lipides, trois régions distinctes.

Les protons aromatiques des cycles A, B et du groupement galloyle se situent entre 6 et 7.5ppm. Les résonances sont ici sous la forme de singulet pour H_{2'}, H_{6'}, H₂, H₆ et H₈ et de doublet pour H_{5'} et H_{6'}. Il est à noter que dans le cas d'EGCG, le carbone en 5' porte une fonction hydroxyle, ainsi H_{6'} n'est pas couplé avec un autre proton, sa résonance est dans ce cas un singulet. De plus, une diminution de l'intensité des signaux H₆ et H₈ est constatée. Ces diminutions sont dues à un échange avec les deutérons du solvant favorisé par les tautoméries céto-énoliques du cycle A.

Les signaux des protons H₂ et H₃ sont retrouvés entre 4 et 6ppm. Le signal relatif à H₂ est un doublet tandis que celui relatif à H₃ est un multiplet, alors qu'un doublet de doublet aurait été attendu (couplage avec H₂ et H₄). Cette multiplicité s'explique par la présence de proton inéquivalent sur le carbone 4. Il est à noter que pour EGCG et ECG, le signal relatif au proton H₃ est fortement déblindé du fait de la présence du groupement galloyle qui va avoir un effet électro-attracteur.

Enfin, les signaux relatifs aux protons H_{4 α} et H_{4 β} , retrouvés entre 2 et 3.5ppm ne sont pas équivalents et présentent donc des déplacements chimiques légèrement différents. Cette non-équivalence est due à la géométrie de la molécule, un des deux protons étant affecté par le courant de cycle du cycle B. Il est à noter qu'en RMN ¹H, les déplacements chimiques des différents groupements des tannins varient légèrement suivant leurs concentrations dans le milieu, cela étant dû à leur propriété d'auto-association. En effet, en s'auto-associant, les tannins vont induire un changement dans l'environnement de chaque proton, à cause notamment de la présence des cycles aromatiques.

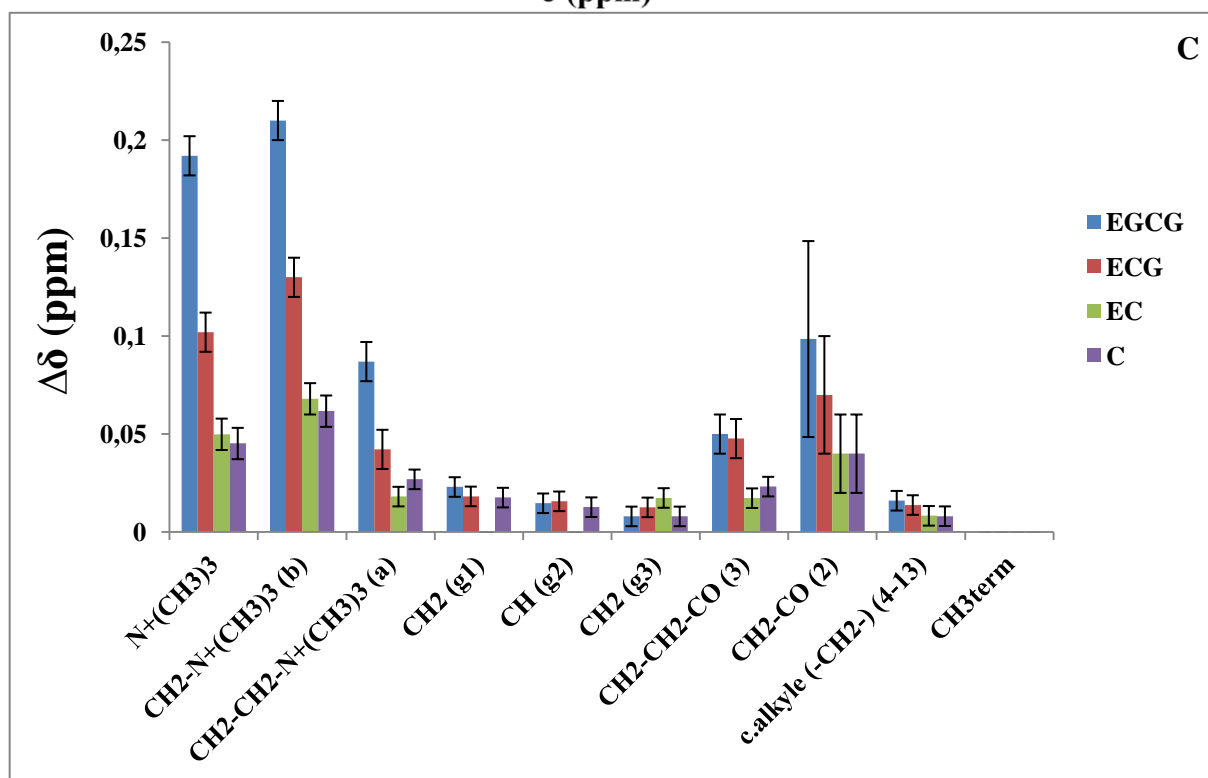
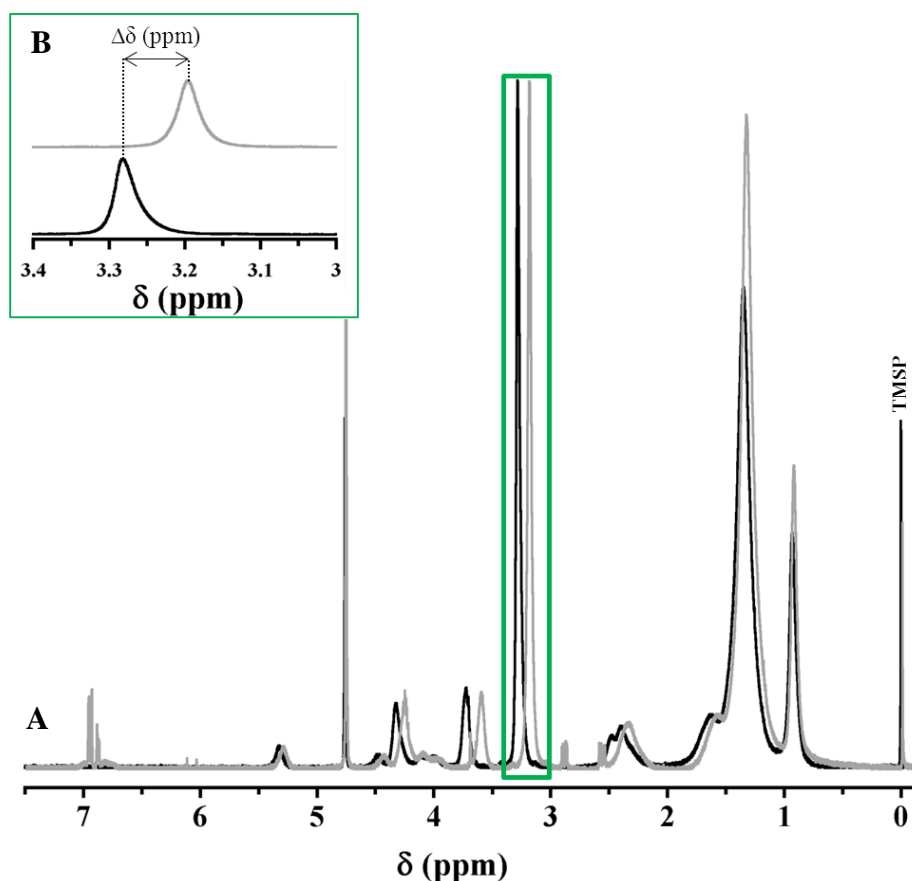


Figure IV.3: (A) Comparaison des spectres de RMN du proton (intensité relative) obtenus en rotation à l'angle magique (5kHz) de vésicules multilamellaires de DMPC en absence (en noir) et en présence (en gris) de catéchine dans D₂O ($\delta_{\text{HOD}} = 4.76\text{ppm}$). [L] = 20mM ; T = 37°C. Le rapport molaire tannin/lipide est de 1/2.5. (B) Agrandissement de la zone de résonance du groupement N⁺(CH₃)₃ de la tête choline (3-3.4ppm) du spectre figure IV.3A. (C) Variations de déplacement chimique des signaux du lipide en fonction de la position du groupement moléculaire portant les protons observés entre le spectre ¹H des MLV et celui du système mixte tannin/MLV. Le rapport molaire tannin/lipide est de 1/3.5. [L] = 7mM ; T = 37°C.

IV.B Stratégie d'étude

Les principales étapes ayant conduit à la mise en place du protocole permettant la détermination des constantes d'association tannin-lipide par RMN sont présentées ci-après. Les effets des tannins sur les déplacements chimiques des signaux du lipide suite à leurs ajouts sur des MLV de DMPC ont été dans un premier temps étudiés. Dans un second temps, l'influence de l'état d'agrégation du tannin (monomérique ou micellaire) et du rapport molaire tannin/lipide (T/L) sur le signal du lipide le plus affecté par l'effet des tannins ont été examinées.

IV.B.1 Mise en évidence du site d'interaction entre les tannins et les lipides

La **figure IV.3A** présente les spectres relatifs aux vésicules multilamellaires de DMPC à 37°C en présence et en absence de catéchine (les spectres avec les trois autres tannins ne sont pas présentés). En présence de tannin et indépendamment de la nature du tannin, un blindage de la totalité des signaux du lipide a été constaté. Il y a donc une augmentation de l'effet d'écran pour chaque proton du lipide due à la présence du tannin. Les enrichissements électroniques provoquant ces blindages sont dus aux effets de cycle des noyaux aromatiques des tannins, qui sont orientés au-dessus du groupement considéré (Scheidt et al., 2004). Afin de déterminer quels groupements sont les plus affectés par la présence du tannin, la variation des déplacements chimiques, $\Delta\delta$, entre le système sans tannin et en présence de tannin a été reportée en fonction de la position des protons sur le lipide (**figure IV.3C**). On peut constater que ces variations diffèrent suivant (i) la nature du groupement lipidique et (ii) la nature du tannin.

La plus forte variation est obtenue pour les résonances relatives aux protons des groupements $N^+(\text{CH}_3)_3$ et $\text{CH}_2-N^+(\text{CH}_3)_3$ de la tête choline. Les variations de ces résonances sont jusqu'à 13 fois supérieures dans le cas d'une addition d'EGCG à celles relatives aux protons du squelette glycérol. Il est à signaler que les protons en alpha et en bêta des carbonyles présentent des variations de déplacement chimique importantes, ce qui peut être dues à un léger ancrage des tannins. Les faibles variations de déplacement chimique observées pour les protons du squelette glycérol peuvent alors s'expliquer dans ce cas par l'orientation des tannins de telle façon que les protons du glycérol ne soient plus dans la zone de blindage des cycles aromatiques. Enfin de très faibles variations de déplacements chimiques sont observées pour le reste de la chaîne acyle ce qui permet de conclure que les tannins ne sont pas localisés dans le cœur hydrophobe du modèle lipidique mais à l'interface. On peut supposer que l'interaction entre les tannins et les lipides est favorisée par la présence (i) de liaisons hydrogène entre les fonctions hydroxyles des tannins et les doublets non liant des oxygènes des carbonyles et du groupement phosphate, (ii) d'interactions de type cation- π entre la tête choline et les cycles phénoliques des tannins.

Il est à noter que pour une addition de tannin sur le modèle membranaire, l'intensité des variations de déplacement chimique varie selon la nature du tannin dans l'ordre décroissant suivant :

EGCG > ECG > tannins non galloylés (C, EC). De ce fait, nous pouvons constater que la présence d'un groupement galloyle va considérablement augmenter les variations de déplacement chimique des signaux du lipide, cela étant dû aux changements d'environnement chimique induit par la présence du troisième cycle aromatique du groupement galloyle dans le cas d'EGCG et d'ECG. De plus, plus le tannin possède de fonctions hydroxyles, plus les variations de déplacement chimique induites par sa présence sont importantes. Ceci peut s'expliquer par la formation possible de liaisons hydrogène entre le tannin et la tête polaire du lipide (Sirk et al., 2008) qui pourrait augmenter son affinité pour l'interface membranaire et donc son influence sur l'environnement chimique des protons du lipide, notamment ceux de la tête choline, et ceux proches des groupements carbonyles des chaînes grasses.

Dans la suite de ce chapitre, les études furent effectuées en suivant les variations de déplacement chimique de la résonance relative au groupement $N^+(CH_3)_3$ de la tête choline, car ce signal est beaucoup plus intense que le signal du groupement CH_2 adjacent. Il apparaît de plus dans une « fenêtre » de déplacement chimique relativement peu encombrée par d'autres résonances.

IV.B.2 Détermination de la concentration en tannin optimale pour l'étude des interactions tannin-lipide

IV.B.2.a Cas d'un rapport molaire tannin-lipide inférieur à 1

La variation de déplacement chimique du groupement $N^+(CH_3)_3$ a été dans un premier temps étudiée pour une addition de catéchine sur des vésicules multilamellaires de DMPC à une concentration en lipide de 15mM de manière à faire varier la concentration en catéchine de part et d'autre de sa CMC de 9 ± 2 mM (Pianet et al., 2008) et tel que le rapport molaire T/L soit inférieur à 1. En premier lieu, une augmentation de quelques hertz de la largeur à mi-hauteur du signal est constatée sur les spectres RMN 1H lors de l'addition de la catéchine (**tableau IV.2**).

[T] (mM)	$\nu_{1/2}$ (Hz)
0	14
1	14
4	16
6	17
7	18
8.5	19
10	18
11	20
13	21

Tableau IV.2 : Variations de la largeur à mi-hauteur du signal $N^+(CH_3)_3$ en fonction de la concentration en tannin ajouté. Cas d'une addition de catéchine sur des vésicules multilamellaires de DMPC. [L] = 15mM; Milieu : eau deutérée. T = 37°C. La précision est de ± 1 Hz.

Celle-ci augmente avec la quantité de tannin ajoutée. Une telle variation de la largeur à mi-hauteur peut être attribuée soit à une précipitation de l'échantillon, soit à une diminution de la dynamique de la tête polaire du lipide. Or, l'aire des signaux relatifs au lipide reste constante et ne diminue pas. Il n'y a donc pas de perte du signal du lipide due à une précipitation. L'augmentation de la largeur du signal, qui est relié au temps de corrélation transversale T_2 ($\nu_{1/2} = \frac{1}{\pi T_2}$), résulte donc d'un ralentissement des mouvements dits « lents » (μs - ms) de la tête polaire due à la localisation de la catéchine à la surface de la membrane.

Les variations de déplacement chimique du groupement $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ du lipide en fonction de la concentration en tannin ajoutée sont présentées sur la **figure IV.4**. Deux tendances sont observées. Une première région entre 0 et 8mM où les $\Delta\delta$ varient de manière logarithmique suivi d'une région au-delà de 8mM où les points croissent de façon quasi linéaire. Ce résultat suggère la présence de deux types d'interaction entre la catéchine et les vésicules modèles. En effet, on peut remarquer que la frontière entre les deux régions à 8mM se situe au niveau de la CMC de la catéchine. Il semblerait donc que l'interaction est différente selon que la catéchine est sous forme monomérique ou micellaire.

IV.B.2.b Cas d'un rapport molaire tannin/lipide supérieur à 1

Afin de confirmer le résultat précédent, une deuxième expérience a été effectuée pour une concentration en lipides de 3mM et une concentration en catéchine maximale de 7mM de manière à dépasser un rapport T/L de 1. Un élargissement du signal de la tête choline $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ est de nouveau constaté lors de l'addition du tannin. Celui-ci est de l'ordre de 1.5-2 Hz pour une concentration en catéchine inférieure à la concentration en lipide puis augmente fortement au-delà (**tableau IV.3**).

[T] (mM)	Rapport T/L	$\nu_{1/2}$ (Hz)	Aire normalisée
0	0	17	1
0.5	0.16	18	1
1	0.33	18	1
1.5	0.5	17	nd
2	0.66	18	nd
2.5	0.83	18	0.95
3	1	20	nd
4	1.33	19	0.8
5	1.66	22	0.71
6	2	22	0.67
7	2.33	24	0.59

Tableau IV.3 : Variations de la largeur à mi-hauteur et de l'aire du signal relatif au groupement $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ en fonction de la concentration en tannin ajouté. Cas d'une addition de catéchine sur des vésicules multilamellaires de DMPC. [L] = 3mM. Milieu : eau deutérée. T = 37°C. nd = non déterminé à cause d'un rapport signal/bruit du spectre RMN faible.

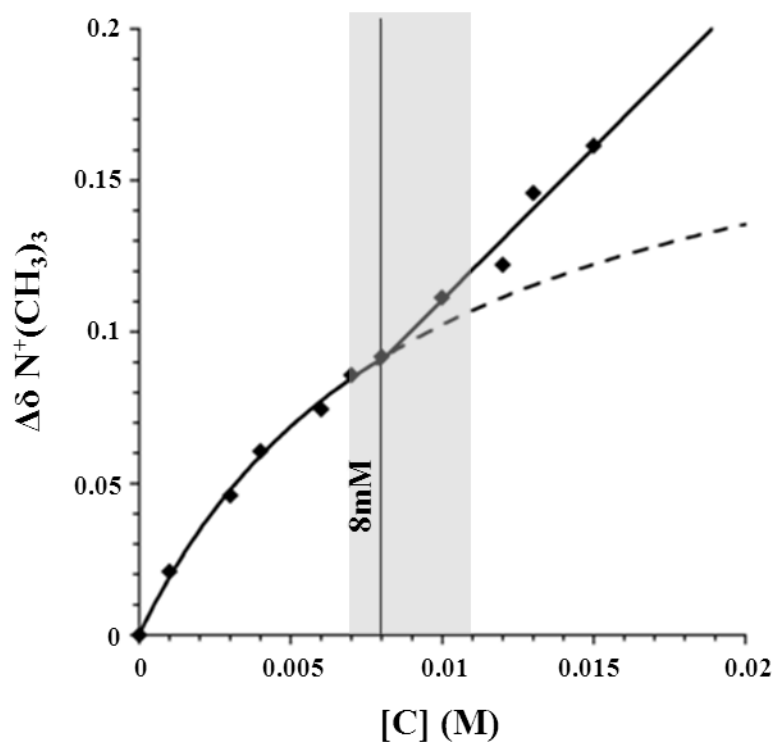


Figure IV.4: Variations de déplacement chimique du signal relatif au groupement $N^+(CH_3)_3$ de vésicules multilamellaires de DMPC en fonction de la concentration en catéchine. $[L] = 15\text{mM}$; $T=37^\circ\text{C}$. Le rectangle gris représente la région où se situe la CMC du tannin.

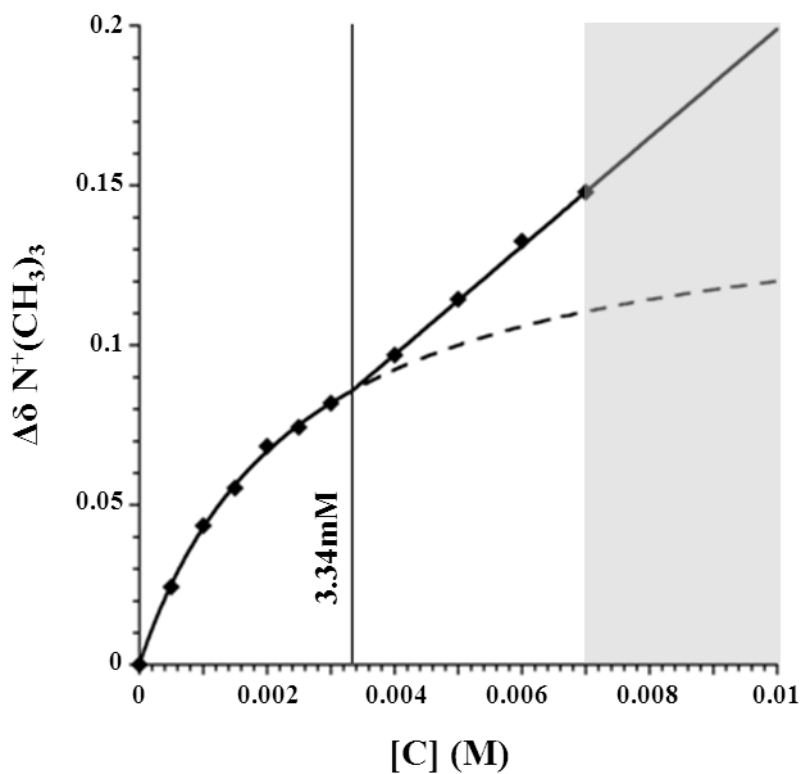


Figure IV.5: Variations de déplacement chimique du signal relatif au groupement $N^+(CH_3)_3$ de vésicules multilamellaires de DMPC en fonction de la concentration en catéchine. $[L] = 3\text{mM}$; $T=37^\circ\text{C}$. Le rectangle gris représente la région où se situe la CMC du tannin.

Il est à noter que, contrairement au cas précédent, une diminution significative de l'aire du signal est constatée à partir d'un rapport molaire T/L de 1.33/1, soit pour une concentration en catéchine insérée de 4mM. Cette diminution est le signe d'une précipitation du système. En effet, à l'état d'agrégats, les noyaux étudiés présentent une interaction dipolaire extrêmement forte (plusieurs dizaines à une centaine de kHz) qui ne pourra pas être annulée par la rotation de l'échantillon (5kHz dans notre cas, 12kHz au maximum sur la sonde utilisée). Cela se traduit sur le spectre RMN HR-MAS par une chute de l'aire du signal. Le système précipite donc pour un rapport molaire T/L supérieur à 1.

La **figure IV.5** présente les variations de déplacement chimique du groupement $N^+(CH_3)_3$ de la tête choline en fonction de la concentration en catéchine ajoutée. Comme précédemment, deux tendances se dessinent : une logarithmique de 0 à 3.34mM, et une quasi-linéaire au-delà de 3.34mM. On peut remarquer que cette fois la frontière entre les deux régions (à 3.34mM) n'est pas dans la zone de la CMC de la catéchine. Par conséquent, l'apparition d'un deuxième comportement se produit non pas lors du changement de l'état d'agrégation du tannin, mais lorsque le rapport molaire tannin-lipide devient supérieur à 1. Ainsi, deux comportements distincts semblent être observés, selon que l'on est à un rapport molaire inférieur ou supérieur à 1.

IV.B.2.c Détermination des conditions d'étude

Les résultats précédents montrent que l'interaction entre les tannins et les lipides membranaires est dépendante de l'état d'agrégation des lipides et du rapport molaire tannin/lipide. Or, dans le vin, les tannins sont la plupart du temps à l'état monomérique. Par conséquent, afin de se placer dans les conditions de la dégustation, nous nous sommes placés, pour la suite de notre étude, à une concentration en tannin inférieure à la CMC et à un rapport molaire inférieur à 1 de manière à conserver l'intégrité du système lipidique (pas de précipitation). Il est en effet important pour déterminer une constante d'association relative à un équilibre thermodynamique d'être dans des conditions où le système que l'on examine, à l'exception de la concentration en tannin, soit invariant.

Ainsi, les concentrations en lipide et tannin utilisées pour cette étude ont été choisies selon deux critères. (i) $[T] \leq CMC$, (ii) $T/L \leq 1$. Les CMC des différents tannins étudiés dans ce chapitre étant respectivement dans un milieu 100% D_2O de $9 \pm 2mM$ pour C, $< 5mM$ pour EC, de $2.8 \pm 0.3mM$ pour ECG et de $6 \pm 2mM$ pour EGCG (Pianet et al., 2008 ; Fabre et al., 2010), une concentration lipidique de 4 mM fut donc choisie afin de respecter ces deux critères et d'être dans des conditions identiques pour l'ensemble des tannins.

IV.C Etude de l'interaction de la catéchine avec des vésicules multilamellaires

IV.C.1 Modélisation des interactions tannins-lipides

Cette partie du chapitre traitera de l'étude de l'interaction catéchine-lipide et de la détermination de la constante d'association dans le cas de MLV de DMPC comme système membranaire modèle. La **figure IV.6** présente les différents types d'interaction envisageables lors d'une addition de tannin sur des vésicules multilamellaires de DMPC. Le tannin peut interagir avec le modèle lipidique soit à l'état monomérique (**figure IV.6C**) soit à l'état micellaire (**figure IV.6D**). Il peut aussi s'auto-associer pour former des micelles puis des agrégats avec la constante d'auto-association notée K_{aa} (**figure IV.6A et IV.6B**). Si cette auto-association se produit, celle-ci va influencer sur la concentration en tannin pouvant interagir avec les lipides du modèle membranaire. La concentration en tannin entrant en jeu dans l'interaction n'est alors pas la concentration totale en tannin ajoutée $[T]_0$, mais la concentration en tannin $[T]_i$ qui tient compte de l'auto-association d'après la relation suivante :

$$[T]_i = [T] \times (1 - K_{aa}[T]) \quad (\text{IV.1})$$

où $[T]$ peut être exprimé en fonction de la concentration totale en tannin $[T]_0$ selon l'équation IV.2 (Baxter et al., 1997) démontrée en annexe (cf. **annexe 5**) :

$$[T] = [T]_0 \left(\frac{2}{1 + \sqrt{1 + 4K_{aa}[T]_0}} \right)^2 \quad (\text{IV.2})$$

Avant d'entreprendre la détermination des constantes d'association tannin-lipide, nous avons en premier lieu cherché à connaître l'influence qu'aurait, dans les conditions de notre étude ($[DMPC] = 4\text{mM}$, $[T] < \text{CMC}$, $T/L < 1$, D_2O , $\text{pH } 7.4$, 37°C), l'auto-association des tannins sur ces constantes. Pour cela, nous avons déterminé dans un premier temps la constante d'association tannin-lipide pour le système C/MLV en négligeant l'auto-association des tannins. Dans un deuxième temps, nous avons déterminé la constante d'auto-association des tannins dans les conditions de notre étude et vérifié qu'elle était négligeable par rapport à la constante d'association tannin-lipide du système C/MLV.

La détermination de la constante d'association tannin-lipide est effectuée à partir de la courbe des variations de déplacements chimique du groupement $N^+(\text{CH}_3)_3$ du lipide (obtenues à partir des spectres RMN ^1H du lipide) en fonction de la concentration en tannin ajoutée. On peut montrer (cf. **annexe 5**) que ces variations de déplacement chimique obtenues expérimentalement, $\Delta\delta$, sont reliées à la constante d'association tannin-lipide K_a par l'**équation de Baxter** (Baxter et al., 1997) pour un lipide présentant n sites de fixation de la façon suivante :

$$\Delta\delta = \frac{1}{2} \Delta\delta_{\max} \left\{ \left(1 + \frac{1}{K_a n [L]} + \frac{[T]_i}{n [L]} \right) - \left[\left(1 + \frac{1}{K_a n [L]} + \frac{[T]_i}{n [L]} \right)^2 - 4 \frac{[T]_i}{n [L]} \right]^{1/2} \right\} \quad (\text{IV.3})$$

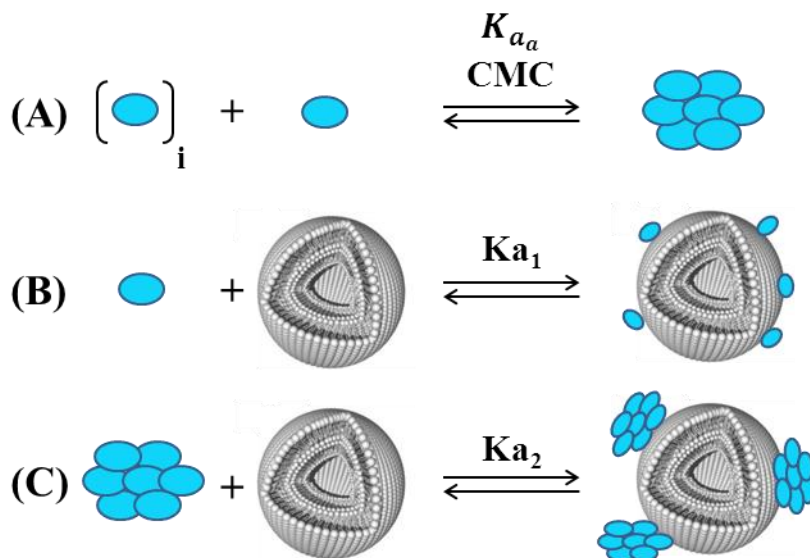
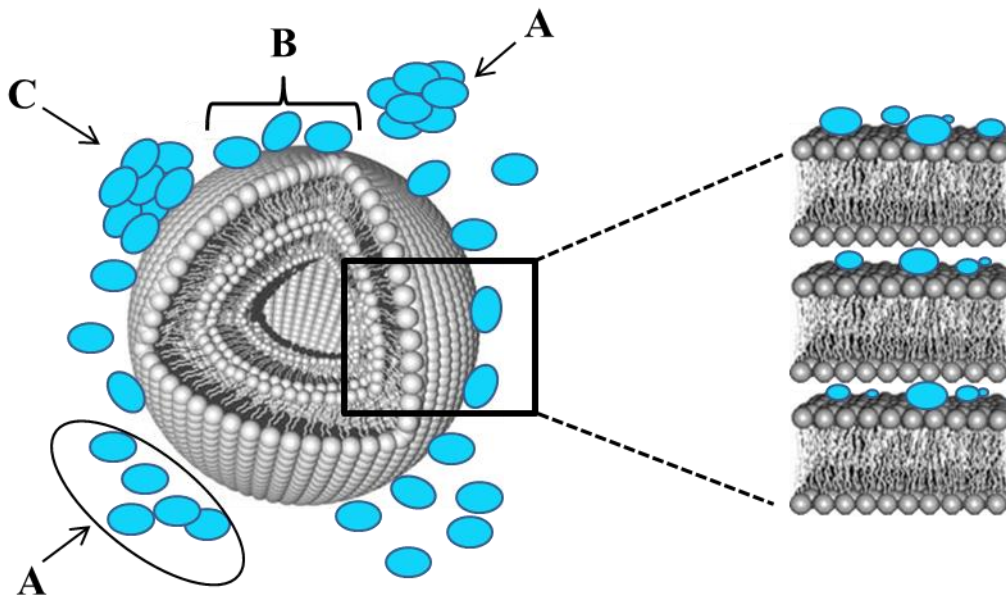


Figure IV.6 : Coupe schématisée d'une vésicule multilamellaire en présence de tannin et équations chimiques illustrant le comportement du tannin en présence de vésicules multilamellaires. (A) Auto-association et formation de micelles de tannin pour une concentration en tannin [T] supérieure à la CMC ; (B) Interaction monomère de tannin/lipide si [T] < CMC ; (C) Interaction micelle de tannin/lipide si [T] > CMC. $K_{aa}(\text{M}^{-1})$ représente la constante d'auto-association du tannin, $K_{a1}(\text{M}^{-1})$ représente la constante d'association du modèle tannin/lipide pour une [T] < CMC (forme monomérique) et $K_{a2}(\text{M}^{-1})$ celle pour une [T] > CMC (forme micellaire).

où $\Delta\delta_{\max}$ est la variation de déplacement chimique maximale correspondant à la saturation de tous les sites de fixation du lipide, $[T]_i$ la concentration en tannin en tenant compte de l'auto-association et $[L]$ la concentration totale en lipide. Si l'on considère que l'auto-association est négligeable, alors $[T]_i$ est égale à la concentration totale en tannin ajoutée $[T]_0$, c'est-à-dire celle reportée sur l'axe des abscisses de la courbe $\Delta\delta = f([T])$.

L'obtention de K_a a été réalisée grâce à un ajustement mathématique des points expérimentaux par l'équation de Baxter (avec $[T]_i = [T]_0$) où les paramètres $\Delta\delta_{\max}$, n et K_a sont considérés comme des variables. Cet ajustement a été obtenu avec le logiciel KGraph (version 4.1.1, Synergy Software, Reading, PA) par la méthode des moindres carrés.

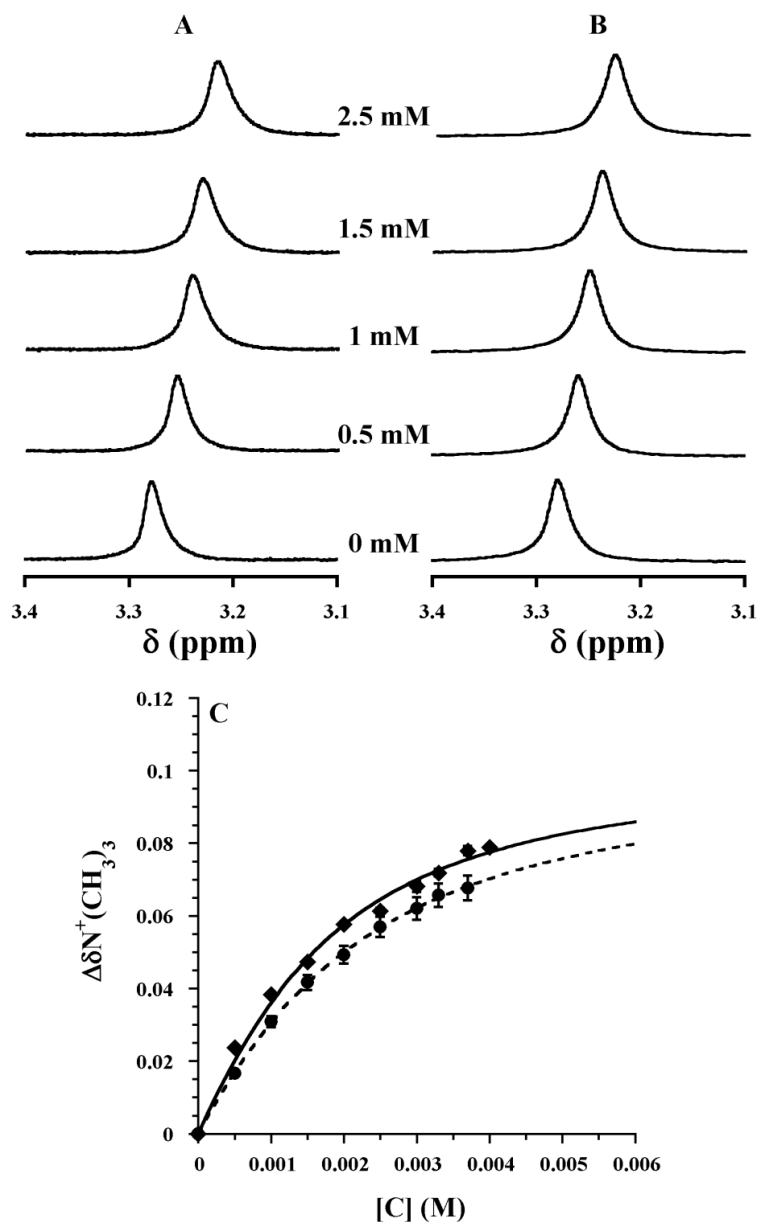
IV.C.1 Etude du système C/MLV par RMN ^1H

Lorsque l'on ajoute des quantités croissantes de catéchine sur une solution de MLV de DMPC de concentration fixée à 4mM, on observe d'une part un blindage du signal des $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ comme attendu et d'autre part, que l'allure du pic n'est pas modifiée ; on a toujours, en présence de tannin, qu'un seul pic, son intensité et sa largeur à mi-hauteur restant constantes par rapport au cas sans tannin (**figure IV.7A**). Ce dernier point signifie qu'il n'existe qu'une seule population de $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ dans le milieu et que toutes les têtes polaires des lipides sont en moyenne en interaction avec les tannins. On peut donc conclure que les tannins ajoutés aux MLV de DMPC ont franchi par diffusion les différentes bicouches lipidiques et ce sont répartis uniformément à l'intérieur des vésicules. Ce résultat implique donc, que les tannins ne sont pas localisés uniquement à la surface des MLV (comme cela a été montré jusqu'à maintenant) mais au niveau de toutes les interfaces eau/bicouche dans les vésicules multilamellaires. Par conséquent, la concentration en lipide, $[L]$, dans l'équation de Baxter, correspond à la concentration totale en lipide, $[L]_0$, fixée à 4mM.

Cependant, un ajustement des variations de déplacement chimique en fonction de la concentration en tannin ajouté par l'équation de Baxter n'a pu être obtenu ($n=0$). On a donc été amené à travailler avec un nouveau système membranaire modèle, des LUV de DMPC, avec une concentration en lipide identique de 4mM et dans les mêmes conditions de pH et de température, afin de réussir à déterminer le nombre de sites de fixation sur le DMPC dans le cas de la catéchine.

IV.C.2 Etude du système C/LUV par RMN ^1H et comparaison avec le système C/MLV

La **figure IV.7B** montre le signal RMN ^1H pour le groupement $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ des lipides obtenu par ajout de catéchine sur des LUV de DMPC à la concentration de 4mM. Les signaux présentent une



D

	n	$\Delta\delta_{\max}$ (ppm)	K_a (M^{-1})	R
LUV	0.33 ± 0.03	0.103 ± 0.008	700 ± 100	0.9998
MLV	0.33	0.104 ± 0.007	1000 ± 150	0.9997

Figure IV.7: Signal RMN 1H obtenu en rotation à l'angle magique (5kHz) (intensité relative) de la région relative à la tête choline (3-3.4 ppm) du DMPC en absence et en présence de quantités croissantes de catéchine pour une addition de tannin sur des MLV (A) et LUV (B). [L] = 4mM ; T = 37°C ; pH = 7.4 (tampon Tris- d_{11} dans D_2O , [Tris] = 15mM) ; $\delta_{TMSP} = 0$ ppm. (C) Variations de déplacement chimique en fonction de la concentration en catéchine ajoutée sur les MLV (♦) et sur les LUV (●). L'erreur sur les variations de déplacements chimiques est estimée à $\pm 1-2\%$ dans le cas des MLV et à $\pm 1-4.7\%$ pour les LUV. (D) Paramètres n, K_a , $\Delta\delta_{\max}$ et coefficient de corrélation R obtenus en ajustant les courbes relatives aux systèmes C/LUV et C/MLV avec l'équation de Baxter (IV.3 dans le texte). L'erreur sur le K_a a été estimée à partir du calcul des K_a pour les valeurs de n bornant son intervalle de confiance, soit respectivement 0.30 et 0.33.

allure similaire à ceux obtenus dans le cas des MLV de DMPC, avec un blindage du pic et la présence d'un seul pic quelle que soit la quantité en tannin ajoutée. Ce dernier résultat confirme qu'il n'existe qu'une seule population de $N^+(\text{CH}_3)_3$ dans le milieu, comme dans le cas d'une addition de catéchine sur les MLV. Les variations de déplacement chimique sont représentées sur la **figure IV.7C**. On peut remarquer que les valeurs sont légèrement plus faibles que celles trouvées dans le cas des MLV.

L'ajustement des points par l'équation de Baxter a permis d'obtenir une valeur au plateau $\Delta\delta_{\text{max}}$ de $0.103\pm 0.008\text{ppm}$, un nombre de sites de fixation n de 0.33 ± 0.03 et une constante d'association tannin-lipide $K_a(\text{C/LUV})$ de $700\pm 100\text{M}^{-1}$ (**figure IV.7D**). L'erreur sur K_a a été estimée à partir du calcul des K_a pour les valeurs de n bornant son intervalle de confiance, soit respectivement 0.30 et 0.33. La valeur de n de 0.33 obtenue correspond en moyenne à la fixation de 3 lipides par tannin. Dans l'hypothèse où le tannin serait à plat à l'interface du modèle membranaire, la comparaison de l'aire surfacique maximale du tannin (82.0\AA^2) (Chemicalize, 2013) par rapport à la surface de la tête polaire (65\AA^2) (Lewis & Hagelman, 1983) permet de valider la cohérence d'un tel résultat.

Le lipide étant le même pour les systèmes LUV et MLV, le nombre de sites de fixation a été considéré identique dans les deux cas, à savoir $n=0.33$. Dans ces conditions, la valeur au plateau $\Delta\delta_{\text{max}}$ et la constante d'association tannin-lipide pour le système C/MLV $K_a(\text{C/MLV})$ ont été trouvées respectivement égales à $0.104\pm 0.007\text{ppm}$ et $1000\pm 150\text{M}^{-1}$ (**figure IV.7D**).

La comparaison entre les systèmes LUV et MLV permet de mettre en évidence trois points. (i) Les valeurs au plateau $\Delta\delta_{\text{max}}$ sont similaires. Ce résultat n'est pas surprenant dans la mesure où ces deux systèmes sont composés du même lipide (le DMPC) et sont en interaction avec le même tannin (la catéchine) dans des conditions de pH et de température identiques. (ii) Le K_a obtenu dans le cas des LUV est plus faible que celui obtenu dans le cas des MLV. Ce résultat peut être expliqué par la différence de taille entre les deux types de vésicules. En effet les LUV, plus petites, ont une tension superficielle plus importante. Son interface est donc plus rigide, ce qui rendrait les interactions entre les têtes polaires des lipides et les tannins moins favorables. (iii) Les spectres RMN ^1H sont moins bien résolus dans le cas des LUV que dans le cas des MLV (**figure IV.8**). Cette baisse de résolution est notamment significative au niveau de l'épaule à 1.6ppm relatif aux protons en β des fonctions carbonyles. Celui-ci est en effet visible sur le spectre du système C/MLV mais pas sur celui du système C/LUV. Cette perte en résolution a aussi été constatée sur le spectre RMN ^1H des LUV de DMPC seules et n'est donc pas due à un effet du tannin. Celle-ci a déjà été mise en évidence aussi sur les acquisitions relatives au LUV seules, n'est pas due à un effet du tannin. Déjà constatée dans la littérature (Cruciani et al., 2006, Long et al., 1994) et apparaît lorsque le temps de corrélation du mouvement de rotation de l'échantillon est du même ordre de grandeur que la vitesse de rotation de l'objet colloïdal. C'est le cas des LUV alors que les MLV, objets de taille plus grosse, ont une vitesse de rotation trop faible pour être du même ordre de grandeur que la rotation mécanique de l'échantillon (5kHz).

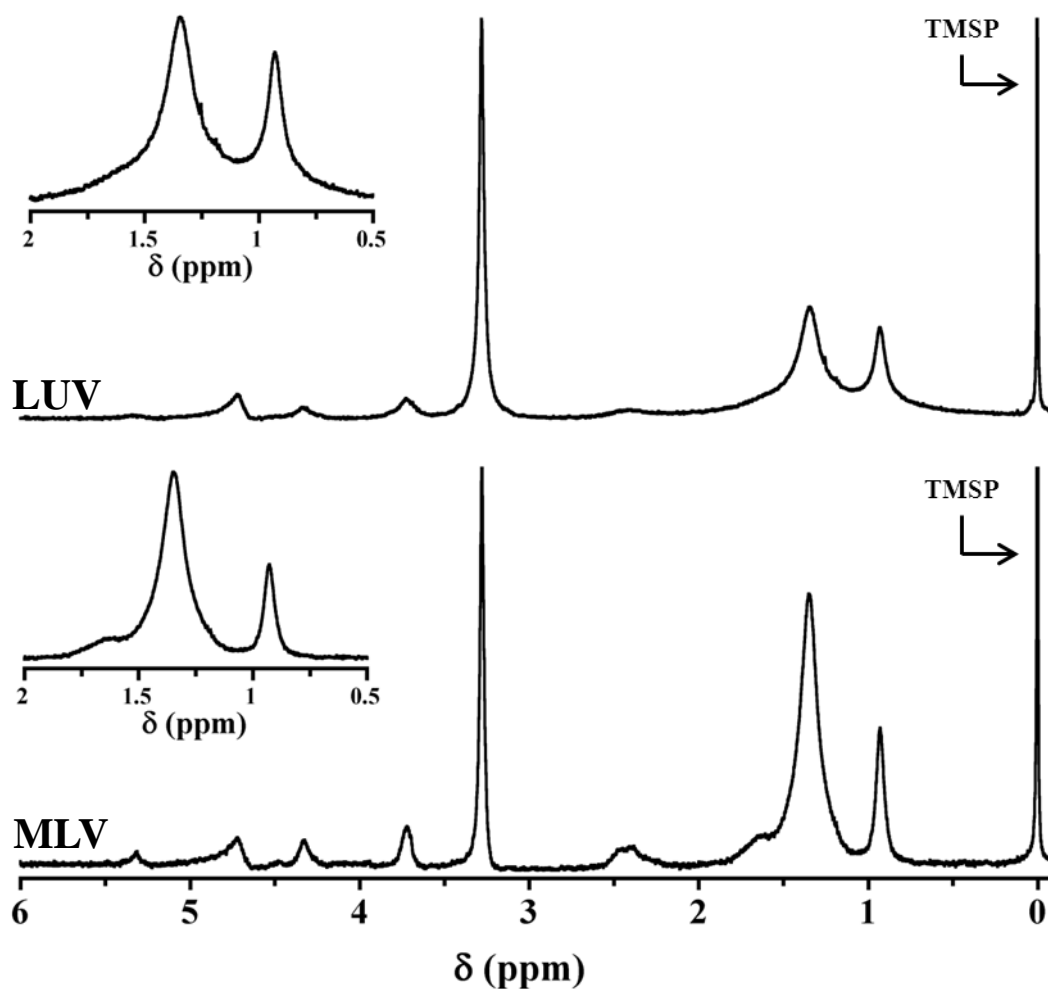


Figure IV.8: Comparaison des spectres RMN ¹H (intensité relative) obtenus en rotation à l'angle magique (5kHz) de vésicules de DMPC dans de l'eau deutérée à pH 7.4 (tampon Tris-d₁₁, [Tris] = 15mM). [L] = 4mM. T = 37°C. Nombre d'acquisitions : 64. D₁ = 4s pour les LUV, 5s pour les MLV. Les déplacements chimiques sont référencés par rapport au TMSP, fixé à 0ppm. Une présaturation sur le signal de l'eau (δ = 4.7ppm) a été effectuée. Un agrandissement de la région [0.5-2] ppm est présenté dans les deux cas.

IV.D Influence de l'auto-association du tannin sur l'interaction tannin-lipide

L'auto-association du tannin a été supposée négligeable lors de l'étude précédente. Il est toutefois nécessaire de valider cette hypothèse en étudiant son influence sur l'interaction tannin/lipide. De ce fait, les constantes d'auto-association relatives aux différentes conditions expérimentales étudiées durant ce chapitre ($T = 37^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 7.4$ et 3.5) ont été déterminées et comparées avec la constante d'association catéchine-lipide obtenue précédemment pour le système C/MLV ; le but est de déterminer si l'auto-association des tannins est ou non négligeable dans l'étude des interactions tannin-lipide. Le protocole expérimental utilisé provient des travaux de Pianet et al. (2008) et est présenté en **annexe (annexe 1)**.

IV.D.1 Détermination des constantes d'auto-association de la catéchine pour $T = 37^\circ\text{C}$ à pH de 7.4 et 3.5

Les constantes d'auto-association ont été obtenues en étudiant l'évolution des déplacements chimiques des protons H_2 , H_3 , $\text{H}_{4\alpha}$ et $\text{H}_{4\beta}$ du cycle pyrane (cycle C) du tannin en fonction de sa concentration dans le solvant (D_2O) à pH 7.4 et à la température de 37°C (**figure IV.9**). Ces protons ont été choisis car ils présentent les plus grandes variations de déplacements chimiques, les signaux des protons aromatiques n'étant que peu affectés par l'auto-association. On peut montrer (*cf. annexe 1*) que les variations des déplacements chimiques $\Delta\delta$, déterminées à partir des spectres RMN ^1H sont reliées à la constante d'auto-association du tannin, K_{aa} , selon la relation suivante (Baxter et al., 1996) :

$$\Delta\delta = \Delta\delta_{max} K_{aa} [T]_0 \left(\frac{2}{1 + \sqrt{1 + 4K_{aa}[T]_0}} \right)^2 \quad (\text{IV.4})$$

où $\Delta\delta = \delta - \delta_{\text{libre}}$, correspond à la différence entre le déplacement chimique du tannin à la concentration de travail ($> \text{CMC}$) et celui du tannin libre à l'état monomérique, δ_{libre} ; $\Delta\delta_{\text{max}} = \delta_{\text{micelle}} - \delta_{\text{libre}}$ représente la variation de déplacement maximale à saturation, c'est-à-dire la différence entre le déplacement chimique de l'agrégat de tannins saturé, δ_{micelle} , et celui du tannin libre à l'état monomérique ; $[T]_0$ représente la concentration totale en tannin.

L'ajustement des données expérimentales réalisé à partir de l'équation IV.3 a permis d'obtenir les constantes d'auto-association relatives à chaque proton, ce qui permet d'obtenir un K_{aa} moyen de $14 \pm 4 \text{ M}^{-1}$ pour une température de 37°C . Cette valeur est quatre fois plus faible que celle obtenue à 25°C ($53 \pm 10 \text{ M}^{-1}$) par Pianet et al., (2008). L'auto-association du tannin est défavorisée lorsque la température croît comme il est attendu pour les réactions exothermiques d'après la loi de Van't Hoff.

Les mêmes résonances ont également été étudiées à un pH de 3.5 dans les mêmes conditions de solvant et de température (**figure IV.10**). La constante d'auto-association moyenne obtenue pour ces conditions est de $29 \pm 0.5 \text{ M}^{-1}$. Elle est donc deux fois plus importante que celle obtenue à pH 7.4.

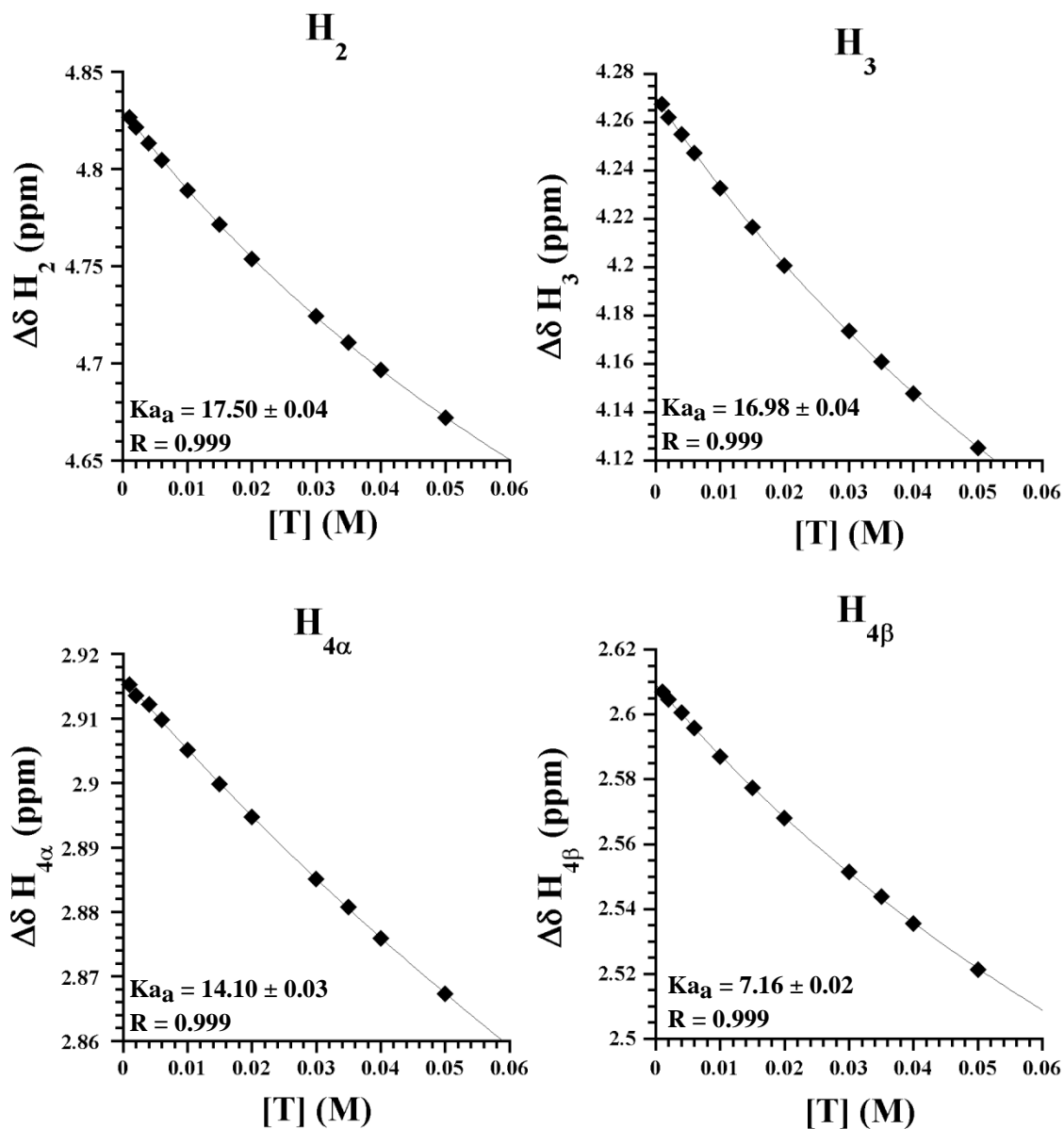


Figure IV.9 : Variations de déplacement chimique des signaux H_2 , H_3 , $H_{4\alpha}$ et $H_{4\beta}$ de la catéchine en fonction de sa concentration. Milieu : D_2O ; pH 7.4 (tampon Tris, $[Tris] = 15mM$) ; $T = 37^\circ C$. Les constantes d'auto-association déterminées par l'équation IV.4 sont notifiées pour chaque proton (en rouge). Les barres d'erreur sont englobées dans les symboles.

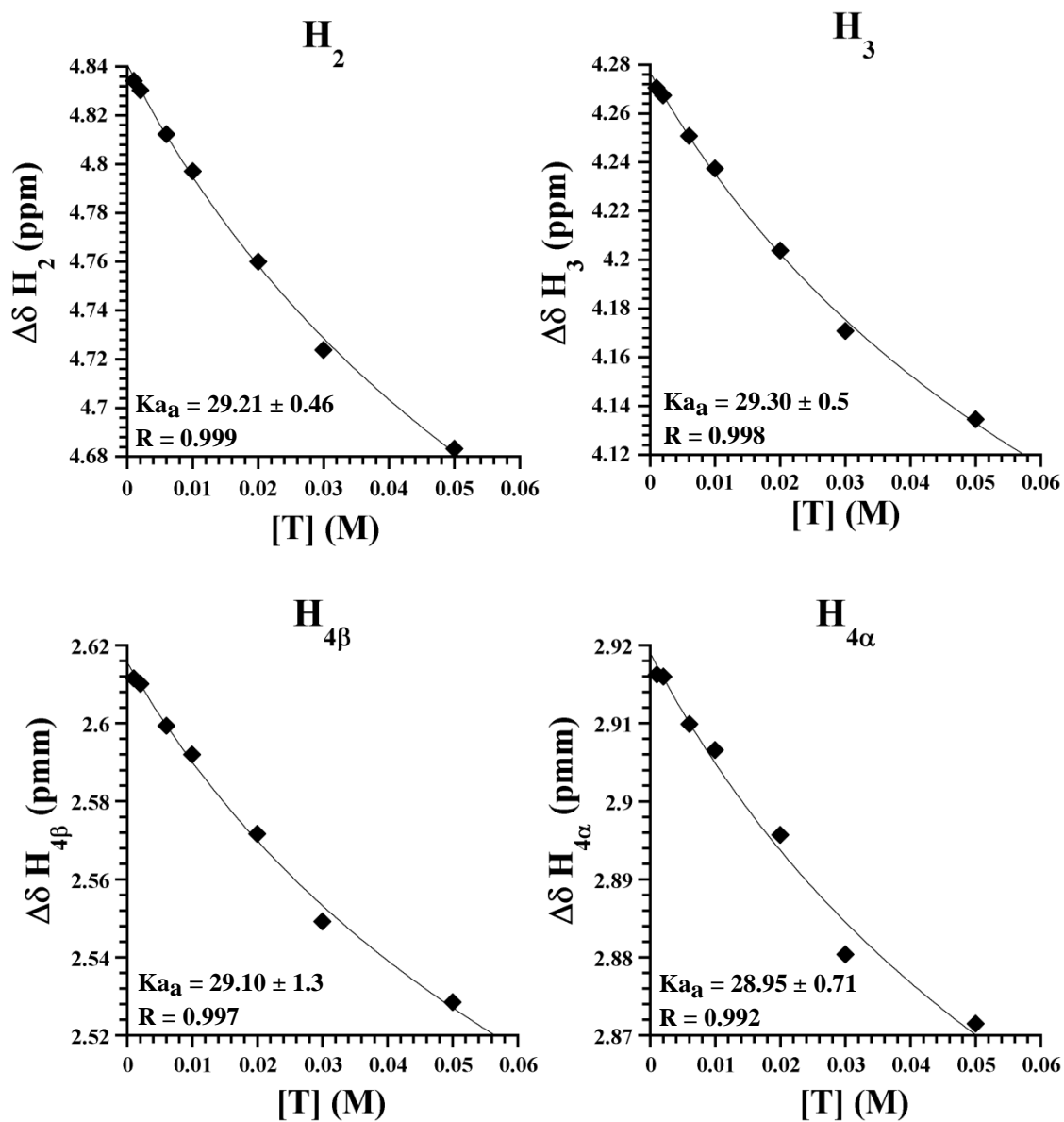


Figure IV.10 : Variations de déplacement chimique des signaux H₂, H₃, H_{4α} et H_{4β} de la catéchine en fonction de sa concentration. Milieu : D₂O ; pH 3.5 (tampon acide acétique) ; T = 37°C. Les constantes d'auto-association déterminées par l'équation IV.4 sont notifiées pour chaque proton (en rouge). Les barres d'erreur sont englobées dans les symboles.

L'auto-association est favorisée lorsque le pH diminue ; les liaisons avec l'eau environnante sont en effet affaiblies en milieu acide.

Par ailleurs, Pianet et al. (2008) ont montré d'une part que les constantes d'auto-association sont plus faibles en présence d'éthanol (10% volumique dans l'étude menée), l'éthanol ayant un effet écran. D'autre part, la conformation cis au niveau du cycle pyrane que l'on retrouve pour EC, EGCG et ECG tend à diminuer la valeur de la constante d'auto-association obtenue. Ainsi, on peut supposer qu'en présence d'éthanol, les constantes d'auto-association des tannins seront inférieures à $29 \pm 0.5 \text{ M}^{-1}$ (cas de la catéchine, à pH 3.5, 37°C et dans un milieu 100% D₂O). La constante d'association tannin-lipide trouvée dans le cas du système C/MLV étant beaucoup plus élevée que les constantes d'auto-association des tannins ($1000 \pm 150 \text{ M}^{-1}$ vs. $29 \pm 0.5 \text{ M}^{-1}$), l'auto-association peut être négligée par rapport à l'interaction tannin-lipide. Il est donc justifié de ne pas la prendre en compte pour la suite de cette étude.

IV.E Paramètres influençant l'interaction tannin-lipide

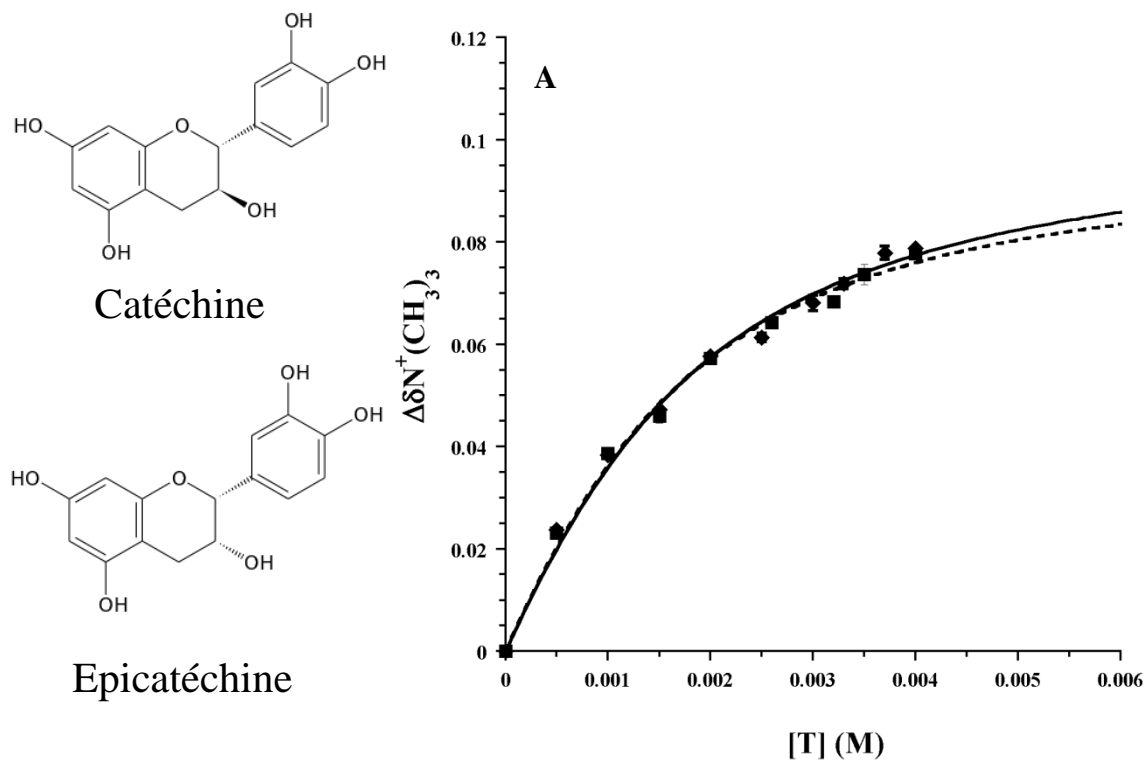
Cette partie s'intéresse à la détermination des constantes d'association tannin-lipide, K_a , à partir de l'équation de Baxter (**équation IV.3**). Cette partie traite pour commencer de l'influence de la structure du tannin (C, EC, ECG, EGCG) sur la constante d'association tannin-lipide. Nous verrons ensuite l'influence du milieu (pH, T, présence d'éthanol) sur cette constante. Enfin, l'influence de la nature du lipide sur l'interaction avec le tannin est étudiée *via* une comparaison entre le DMPC et le POPC, lipide présentant des chaînes grasses en C16:0 et C18:1 retrouvées majoritairement dans les membranes buccales (**cf. figure I.10B**).

L'ensemble des études a été effectué sur des MLV pour une concentration en lipide $[L] = 4 \text{ mM}$ et pour des concentrations en tannins ajoutées inférieures à la CMC. L'auto-association des tannins a par ailleurs été négligée ($K_a = 0$) ce qui implique dans l'équation que $[T]_i$ est égale à la concentration totale en tannin ajoutée $[T]_0$.

IV.E.1 Détermination des constantes d'association tannin-lipide en fonction de la structure du tannin

IV.E.1.a Cas du système EC/MLV

Comme dans le cas d'un ajout de catéchine, l'ajout de quantités croissantes d'épicatéchine sur les MLV de DMPC entraîne un blindage de tous les signaux du lipide. De plus, cet ajout n'entraîne pas de changement au niveau de l'allure du signal relatif au $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ du lipide, son intensité et sa largeur à mi-hauteur restant constante par rapport au cas sans tannin. Ainsi, comme pour la catéchine,



B

	n	$\Delta\delta_{max}$	$K_a (M^{-1})$	R
C/MLV	0.33	0.104±0.007	1000±150	0.9997
EC/MLV	0.33	0.099±0.006	1100±150	0.9970

Figure IV.11 : (A) Variations de déplacement chimique en fonction de la concentration en tannins ajoutés sur des MLV de DMPC. (♦) Catéchine ; (■) Epicatechine. [L] = 4mM ; 37°C ; pH 7.4 (tampon Tris-d₁₁ dans D₂O). L'erreur pour les variations de déplacement chimique est estimée à ± 1-2% pour la catéchine et à ±1-5% pour l'épicatechine. (B) Paramètres K_a , $\Delta\delta_{max}$ et coefficient de corrélation R obtenus en ajustant les courbes relatives aux systèmes C/MLV et EC/MLV avec l'équation de Baxter (IV.3 dans le texte).

l'épicatéchine parvient à diffuser à travers le modèle membranaire et l'ensemble des lipides sont en moyenne en interaction avec les tannins.

La **figure IV.11A** présente les variations de déplacement chimique du $N^+(CH_3)_3$ de la tête choline en fonction de la concentration en tannin ajoutée pour les systèmes EC/MLV et C/MLV (donné à titre de comparaison). Les variations obtenues pour les deux systèmes sont superposables, les nuages de points étant confondus. De ce fait, la stéréochimie des groupements en position 2 et 3 du cycle central, *trans* dans le cas de la catéchine et *cis* dans le cas de l'épicatéchine, ne semble pas entraîner de modification de l'affinité du tannin pour le modèle membranaire.

Afin de valider ce résultat, l'ajustement des points de la courbe $\Delta\delta = f([T])$ par l'équation de Baxter a été réalisé. N'ayant pu être obtenu avec les trois variables ($\Delta\delta_{max}$, n et K_a), celui-ci a été effectué dans un second temps en considérant que le nombre de sites de fixation n pour l'épicatéchine était identique à celui de la catéchine. En effet, ces deux tannins ont des structures chimiques très proches, un même nombre de fonctions hydroxyles (5) et des aires surfaciques maximales du même ordre de grandeur (82.0\AA^2 pour C et 77.1\AA^2 pour EC) (Chemicalize, 2013). Pour $n = 0.33$, pour le système EC/MLV, une valeur au plateau de $0.099\pm 0.006\text{ppm}$ et une constante d'association $K_a(\text{EC/MLV})$ de $1100\pm 150\text{M}^{-1}$ ont été obtenues (**figure IV.11B**). Comme attendu, les valeurs au plateau et les constantes d'association entre les deux systèmes C/MLV et EC/MLV sont sensiblement les mêmes et les nuages de points sur la courbe $\Delta\delta = f([T])$ sont confondus. La stéréochimie des groupements en positions 2 et 3 du cycle pyrane ne semble pas donc être un facteur déterminant pour l'affinité du tannin pour le lipide.

IV.E.1.b Cas du système EGCG/MLV

Comme pour la catéchine (**figure IV.12A**), une addition d'EGCG sur les MLV de DMPC induit un blindage des signaux du lipide. Néanmoins, contrairement aux deux cas précédents, un léger épaulement apparaît à gauche de la résonance relative au groupement $N^+(CH_3)_3$ de la tête choline du lipide (**figure IV.12B**). Ce phénomène traduit la présence de deux populations de $N^+(CH_3)_3$ dans le système ; une population majoritaire en interaction avec les tannins et une autre très minoritaire ne l'étant pas. Au vu de la très faible intensité de cet épaulement, on négligera cette dernière population pour la détermination de la constante d'association du système EGCG/MLV.

De plus, une perte d'intensité au niveau de ce signal et une augmentation de sa largeur à mi-hauteur sont constatées lors de l'addition du tannin galloylé. Afin de déterminer si celle-ci est due à une précipitation du système, la variation de l'aire du signal relatif au groupement $N^+(CH_3)_3$ de la tête choline en fonction de la concentration en tannin ajoutée (inférieure et supérieure à la CMC pour cette étude) a été étudiée et comparée au cas du système C/MLV (**figure IV.12C**). Alors que pour le système C/MLV, l'aire du pic relatif au groupement $N^+(CH_3)_3$ est constante (signe d'une absence de précipitation), une diminution de celle-ci est constatée pour le système EGCG/MLV à partir d'un rapport molaire EGCG/lipide de 0.3 correspondant à une concentration en tannin ajoutée de 1.2mM,

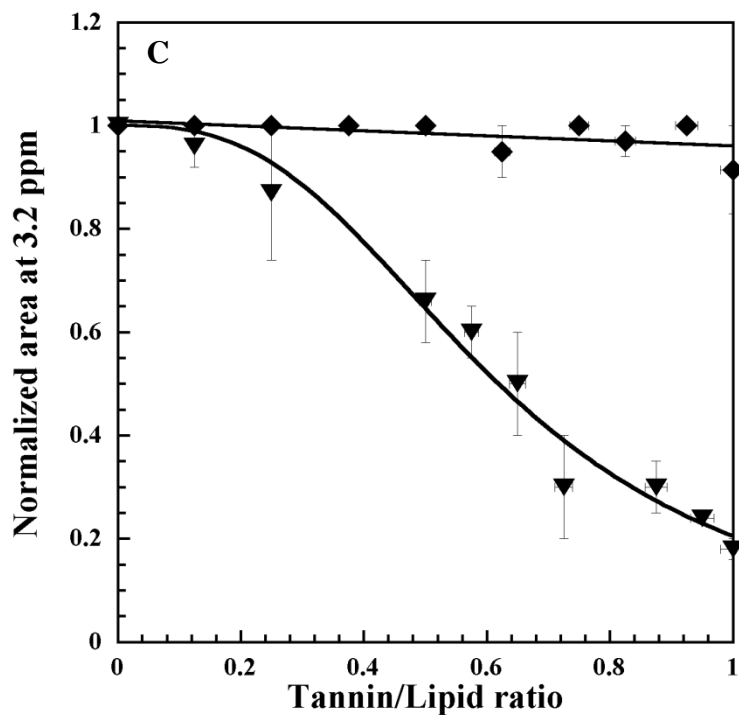
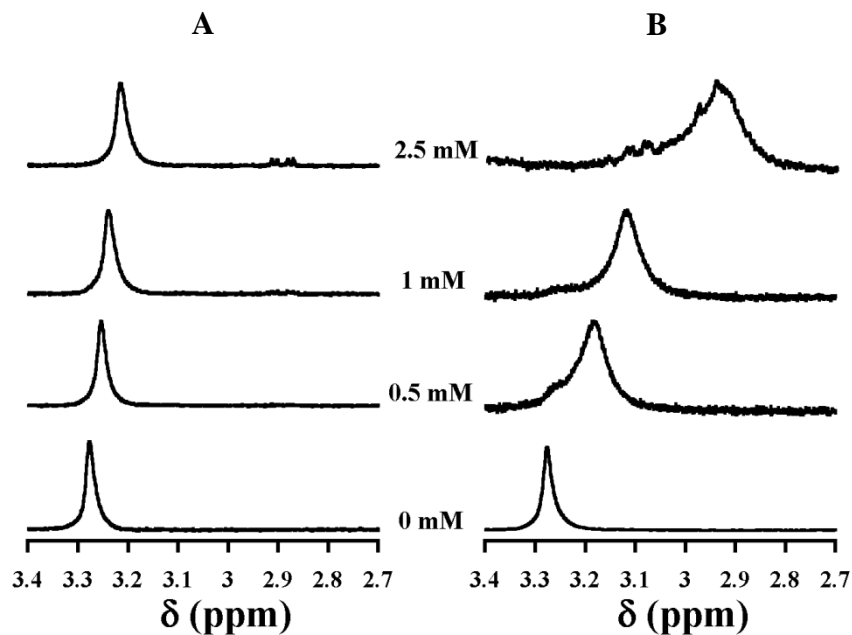


Figure IV.12 : Signal RMN ^1H (intensité relative) de la région relative à la tête choline (2.7-3.4 ppm) du lipide en absence et en présence de tannin dans le cas d'une addition de catéchine (**A**) et d'EGCG (**B**) sur des MLV de DMPC. $[\text{T}] = 4\text{mM}$; pH 7.4 (tampon Tris- d_{11} dans D_2O , $[\text{Tris}] = 15\text{mM}$) ; $T = 37^\circ\text{C}$. (**C**) Variations de l'aire du signal RMN relatif aux protons du groupement $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ de la tête choline pour des MLV de DMPC en fonction du rapport molaire tannin/lipide dans le cas d'addition de catéchine (♦) et d'EGCG (▼). $[\text{L}] = 4\text{mM}$; pH = 7.4 (tampon Tris- d_{11} dans D_2O , $[\text{Tris}] = 15\text{mM}$) ; $T = 37^\circ\text{C}$. Les barres d'erreur du rapport tannin/lipide sont estimées à $\pm 2\%$. L'erreur sur les aires est estimée à $\pm 1-8.5$ dans le cas de la catéchine, $\pm 1-5$ dans le cas d'EGC et $\pm 1-15$ dans le cas d'EGCG.

donc inférieure à sa CMC ($6\pm 2\text{mM}$, Fabre et al., 2010). Par conséquent, l'addition d'EGCG à l'état monomérique provoque une déstabilisation du système membranaire alors que celle-ci est observée pour les tannins non galloylés qu'à l'état micellaire (cf partie IV.B.2).

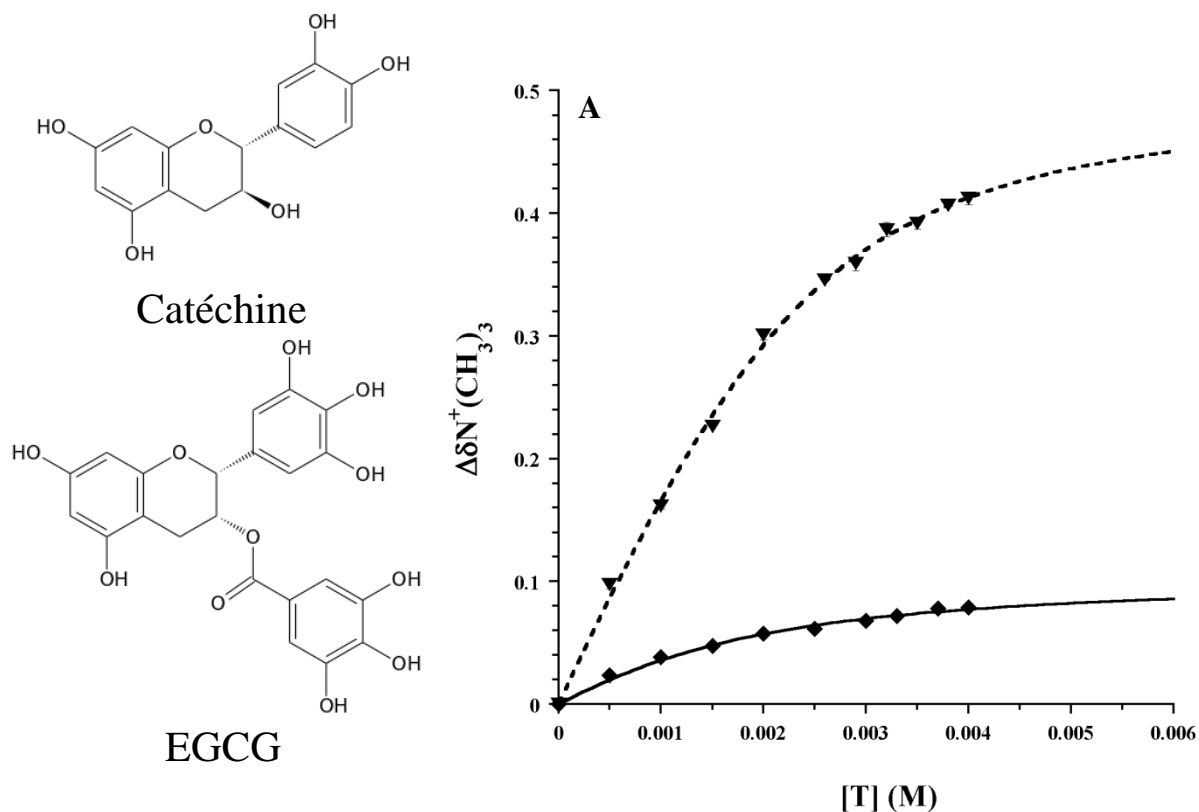
La **figure IV.13A** présente la variation de déplacement chimique du groupement $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ du lipide en fonction de la concentration en tannin ajoutée pour les systèmes EGCG/MLV et C/MLV. Nous pouvons constater que la présence d'un groupement galloyle et d'une fonction hydroxyle supplémentaire entraîne une forte augmentation de la variation de déplacement chimique du groupement $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ par rapport à la catéchine. Cette augmentation peut s'expliquer par la présence d'un cône d'anisotropie induit par le cycle aromatique du groupement galloyle. On peut en effet supposer que le groupement $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ se trouve dans la zone de blindage (riche en électrons), parallèle au cycle, et donc que la densité électronique autour des protons est augmentée, ce qui se traduit par un blindage des résonances du lipide plus important dans le cas du tannin galloylé.

Dans le cas du système EGCG/MLV, l'ajustement des points de la courbe $\Delta\delta = f([T])$ par l'équation de Baxter a pu être obtenu avec les trois variables ($\Delta\delta_{\text{max}}$, n et K_a). Les résultats trouvés sont les suivants : $\Delta\delta_{\text{max}} = 0.503\pm 0.038\text{ppm}$, $n = 0.59\pm 0.03$ et K_a (EGCG/MLV) = $2200\pm 600\text{M}^{-1}$ (**figure IV.13B**). On constate qu'en moyenne le nombre de lipides par tannin a diminué par rapport à la catéchine (1.7 vs. 3). Par ailleurs, la constante d'association tannin-lipide obtenue dans le cas d'EGCG est plus importante que pour les tannins non galloylés, C et EC ($2200\pm 600\text{M}^{-1}$ vs. $\sim 1050\pm 150\text{M}^{-1}$). Ainsi, la présence d'un groupement galloyle et d'une nouvelle fonction hydroxyle en position 5' du cycle B augmente l'affinité du tannin pour le modèle membranaire. Cette effet peut être expliqué avec l'apparition d'une interaction de type cation- π pouvant avoir lieu entre le groupement galloyle et le $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ du lipide (Uekusa et al., 2008) et la possibilité d'une nouvelle liaison hydrogène entre le lipide et la fonction OH supplémentaire sur la structure du tannin.

IV.E.1.c Cas du système ECG/MLV

De façon identique à ce qui a pu être observé dans le cas d'EGCG, l'ajout d'une quantité croissante d'ECG sur des MLV de DMPC entraîne un blindage des signaux du lipide et l'apparition d'un léger épaulement à gauche de la résonance relative au groupement $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ de la tête choline du lipide (**figure IV.14A**). Celui-ci étant très peu intense, la population de $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ n'interagissant pas avec le tannin est considérée minoritaire par rapport à celle interagissant avec ECG et ne sera pas prise en compte lors de la détermination de la constante d'association.

On observe également, suite à l'addition d'ECG sur les MLV, une diminution de l'intensité et une augmentation de la largeur à mi-hauteur du signal du groupement $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$, comme c'est le cas pour le système EGCG/MLV. Afin de mettre en évidence une éventuelle précipitation, la variation de l'aire du signal relatif au groupement $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ de la tête choline en fonction de la concentration en tannin ajouté a été étudiée et comparée au cas des systèmes C/MLV et EGCG/MLV (**figure IV.14C**).



B

	n	$\Delta\delta_{\text{max}}$	K_a (M^{-1})	R
C/MLV	0.33	0.104 ± 0.007	1000 ± 150	0.9997
EGCG/MLV	0.59 ± 0.03	0.503 ± 0.038	2200 ± 600	0.9991

Figure IV.13 : Variations de déplacement chimique en fonction de la concentration en tannins ajoutés sur des MLV de DMPC. (♦) Catéchine ; (▼) EGCG. $[L] = 4\text{mM}$; $T = 37^\circ\text{C}$; $\text{pH } 7.4$ (tampon Tris- d_{11} dans D_2O). L'erreur sur les variations de déplacement chimique est estimée à $\pm 1\text{-}2\%$ pour la catéchine, à $\pm 1\text{-}5\%$ pour ECG et à $\pm 0.5\text{-}4\%$ pour EGCG. **(B)** Paramètres n , K_a , $\Delta\delta_{\text{max}}$ et coefficient de corrélation R obtenus en ajustant les courbes relatives aux systèmes C/MLV et EGCG/MLV avec l'équation de Baxter (IV.3 dans le texte). L'erreur sur le K_a d'EGCG a été estimée à partir du calcul des K_a pour les valeurs de n bornant son intervalle de confiance, soit respectivement 0.56 et 0.62.

Comme pour le système EGCG/MLV, une diminution de l'aire du signal est constatée confirmant la précipitation du système. Celle-ci est moins importante et apparaît plus tôt que dans le cas du système EGCG/MLV. Toutefois, la précipitation apparaît également à une concentration en tannin inférieure à sa CMC ($2.8 \pm 0.3 \text{ mM}$, Fabre et al., 2010). On peut donc conclure que, contrairement aux tannins non galloylés, les deux tannins galloylés étudiés déstabilisent le modèle membranaire à l'état monomérique au-delà d'un certain rapport molaire tannin-lipide avec un effet plus marqué pour EGCG.

Afin de rester dans les conditions de la dégustation, les variations de déplacements chimiques du pic relatif au $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ en fonction de la concentration en tannin reportée sur la **figure IV.15A** ne le sont que pour des concentrations en ECG ajoutées inférieures à sa CMC. Nous pouvons constater les variations de déplacement chimique induites par ECG bien qu'identiques à celles d'EGCG aux faibles concentrations en tannin sont plus faibles aux fortes concentrations. La fonction hydroxyle en moins sur ECG est peut-être à l'origine de cet effet.

Contrairement à EGCG, l'ajustement de la courbe $\Delta\delta = f([\text{T}])$ par l'équation de Baxter avec les trois variables ($\Delta\delta_{\text{max}}$, n , K_a) n'a pu être obtenu. Les structures d'ECG et d'EGCG étant très proches et leurs aires surfaciques maximales étant du même ordre de grandeur (109.5 \AA^2 pour ECG et 100.4 \AA^2 pour EGCG) (Chemicalize, 2013), le nombre de sites de fixation n a été supposé identique pour les deux tannins. Pour n fixé à 0.59, pour le système ECG/MLV, l'ajustement de la courbe a permis d'obtenir un $\Delta\delta_{\text{max}}$ de $0.497 \pm 0.405 \text{ ppm}$ et un $K_a(\text{ECG/MLV})$ de $1300 \pm 150 \text{ M}^{-1}$ (**figure IV.15B**). Comme on pouvait s'y attendre au vu de l'allure des courbes $\Delta\delta = f([\text{T}])$, la valeur du K_a pour le système ECG/MLV est comprise entre celle des tannins non galloylés et celle d'EGCG. Cependant, on peut remarquer que : (i) la valeur au plateau est à remettre en cause au vu de la barre d'erreur trouvée, (ii) l'ajustement n'est pas optimal et (iii) la valeur du K_a pour ECG est très différente de celle pour EGCG. Ce résultat sera discuté dans la partie discussion (IV.E) de ce chapitre.

IV.E.2 Influence du milieu sur la constante d'association

Le pH d'un vin est généralement compris entre 3.2 et 3.8 et la température idéale de dégustation se situe autour de 18°C . On peut donc supposer que l'ingestion d'un verre de vin va produire ponctuellement une baisse du pH et de la température en bouche (respectivement comprises entre 7.1 et 7.4 et 35.5 et 37.5°C). Cette partie s'attache donc à étudier l'influence du pH et de la température sur la constante d'association tannin-lipide. Par ailleurs, le caractère fluidifiant de l'éthanol (présent dans le vin à un pourcentage volumique de 12%, Taillandier & Bonnet, 2005) est susceptible d'affecter l'affinité tannin-lipide. L'effet de la présence de 12% d'éthanol sera donc également examiné dans cette partie. Le système C/MLV sert de référence pour cette étude.

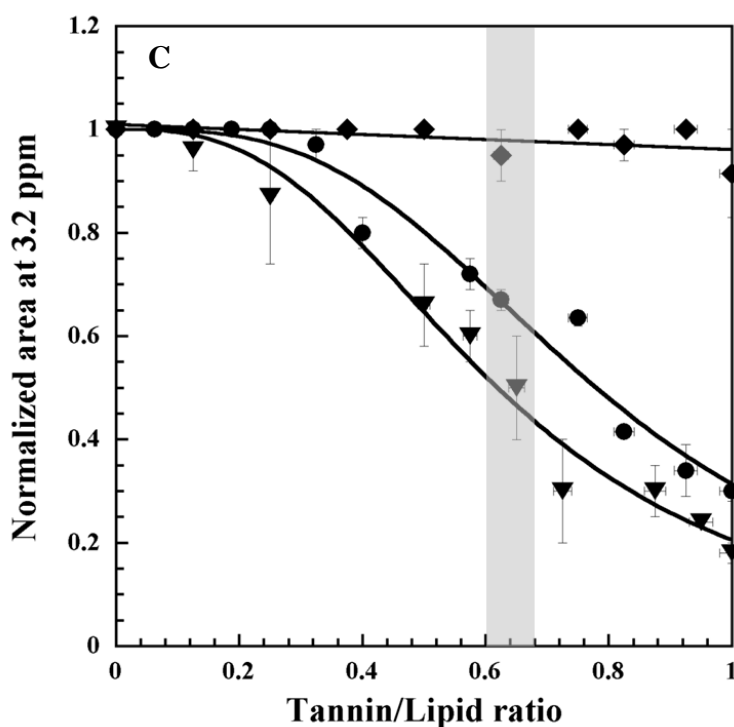
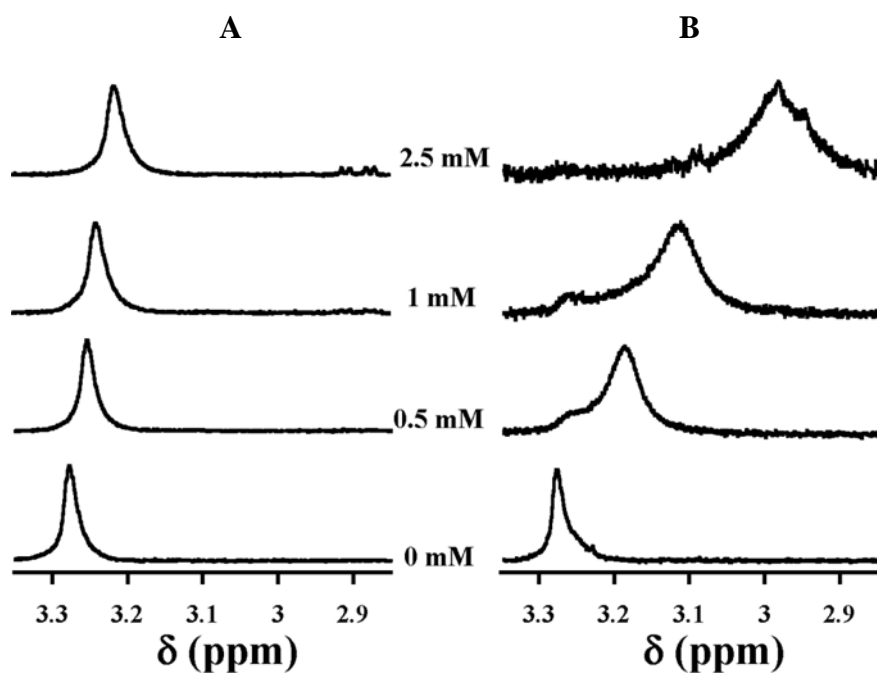
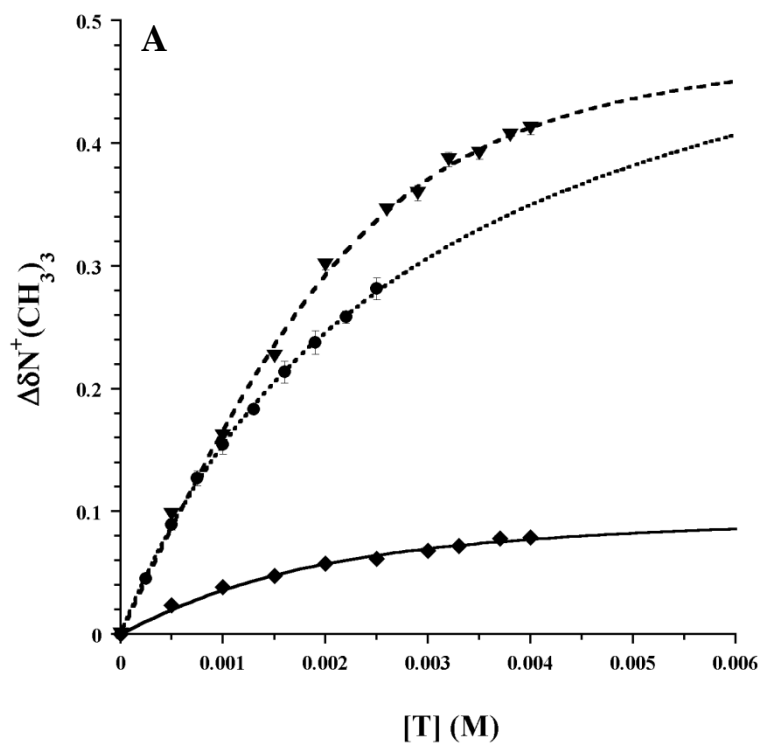
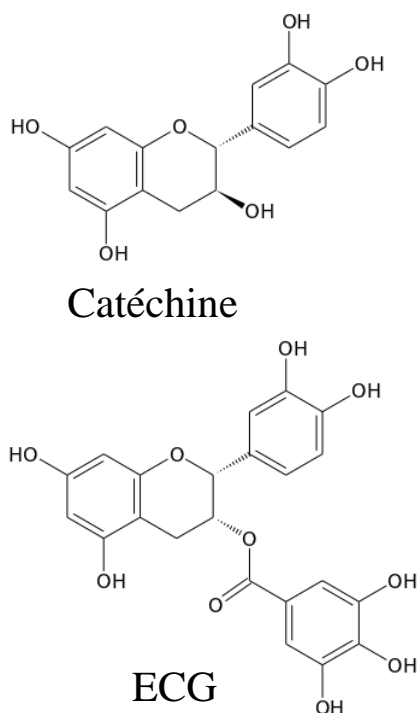


Figure IV.14: Signal RMN ¹H (intensité relative) de la région relative à la tête choline (2.8-3.4 ppm) du DMPC en absence et en présence d'ajout de quantités croissantes de tannin sur des MLV dans le cas d'une addition de catéchine (A) et d'ECG (B). [L] = 4mM ; pH 7.4 (tampon Tris-d₁₁ dans D₂O, [Tris] = 15mM) ; T = 37°C. (C) Variations de l'aire du signal RMN relatif aux protons du groupement N⁺(CH₃)₃ de la tête choline pour des MLV de DMPC en fonction du rapport molaire tannin/lipide pour une addition de catéchine (\blacklozenge), d'ECG (\bullet) et d'EGCG (\blacktriangledown). [L] = 4mM ; pH = 7.4 (tampon Tris-d₁₁ dans D₂O, [Tris] = 15mM) ; T = 37°C. L'erreur sur le rapport tannin/lipide est estimée à $\pm 2\%$. L'erreur sur les aires est estimée à $\pm 1-8.5\%$ dans le cas de la catéchine et à $\pm 1-5\%$ dans le cas d'ECG. Le rectangle gris représente la région où se situe la CMC de l'ECG.



B

	n	$\Delta\delta_{\text{max}}$	K_a (M^{-1})	R
C/MLV	0.33	0.104 ± 0.007	1000 ± 150	0.9997
EGCG/MLV	0.59 ± 0.03	0.503 ± 0.038	2200 ± 600	0.9991
ECG/MLV	0.59	0.497 ± 0.405	1300 ± 150	0.9947

Figure IV.15 : Variations de déplacement chimique en fonction de la concentration en tannins ajoutés sur des MLV de DMPC. (♦) Catéchine ; (▼) EGCG; (●) ECG. [L] = 4mM ; T = 37°C ; pH 7.4 (tampon Tris-d₁₁ dans D₂O). L'erreur sur les variations de déplacement chimique est estimée à ± 1-2% pour la catéchine et à ±1-5% pour ECG. (B) Paramètres n, K_a, Δδ_{max} et coefficient de corrélation R obtenus en ajustant les courbes relatives aux systèmes C/MLV, ECG/MLV et EGCG/MLV avec l'équation de Baxter (IV.3 dans le texte).

IV.E.2.a Impact de la température

Afin de se placer entre la température idéale de dégustation d'un vin et celle de la bouche, l'étude a été effectuée à une température fixée à 31°C et à pH 7.4. L'ajout de quantités croissantes de catéchine sur les MLV de DMPC entraîne un blindage du signal relatif au groupement $N^+(CH_3)_3$ sans changement de son allure (intensité, largeur à mi-hauteur). Ainsi, comme vu précédemment, toutes les têtes choline sont en moyenne en interaction avec la catéchine qui diffuse à travers la membrane et aucune précipitation n'est détectée.

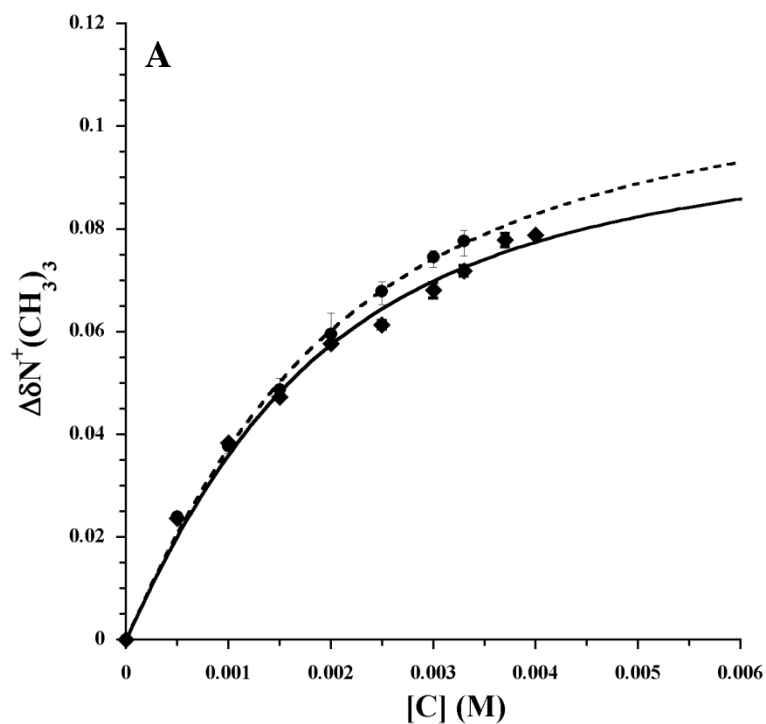
Les variations de déplacement chimique du groupement $N^+(CH_3)_3$ du lipide en fonction de la quantité en tannin ajoutée pour le système C/MLV à 37 et 31°C sont présentées sur la **figure IV.16A**. Pour une concentration en catéchine ajoutée inférieure ou égale à 2mM, les points sont confondus. Toutefois, pour une concentration supérieure, les variations de déplacements chimiques sont plus faibles à 31°C. La température semblerait avoir une influence sur l'affinité tannin-lipide.

L'ajustement des points de la courbe $\Delta\delta = f([T])$ par l'équation de Baxter n'a pu être obtenu avec les trois variables ($\Delta\delta_{max}$, n et K_a). Une augmentation de la température n'affectant pas la structure du tannin, nous avons considéré que le nombre de sites de fixation n à 31°C et à 37°C était identique. En fixant $n = 0.33$, pour le système C/MLV à 31°C, la valeur au plateau $\Delta\delta_{max}$ et la constante d'association obtenues sont respectivement de 0.126 ± 0.007 ppm et de $700 \pm 50 M^{-1}$ (**figure IV.16B**). Cette dernière est inférieure à celle obtenue à 37°C ($1000 \pm 150 M^{-1}$). Une diminution de température semble donc conduire à une baisse de l'affinité de la catéchine pour le modèle membranaire. Ce résultat peut être relié à une diminution de la mobilité des molécules de lipides défavorable à leurs interactions avec les molécules de tannin.

IV.E.2.b Impact du pH

L'étude a ici été effectuée au pH moyen du vin de 3.5. Comme précédemment, l'ajout de quantités croissantes de catéchine sur les MLV de DMPC entraîne un blindage du signal relatif au groupement $N^+(CH_3)_3$ sans changement de son allure. De nouveau, en condition acide, toutes les têtes choline sont en moyenne en interaction avec le tannin et aucune précipitation n'est détectée.

Les variations de déplacements chimiques du pic relatif au $N^+(CH_3)_3$ du lipide en fonction de la concentration en catéchine ajoutée sont présentées sur la **figure IV.17A** pour des pH de 7.4 et 3.5. Une légère diminution de ces variations est observée dans le cas du pH acide. Le pH semblerait modifier quelque peu l'affinité du tannin pour les lipides.



B

	n	$\Delta\delta_{\max}$	K_a (M^{-1})	R
C/MLV 37°C	0.33	0.104 ± 0.007	1000 ± 150	0.9997
C/MLV 31°C	0.33	0.126 ± 0.007	700 ± 50	0.9985

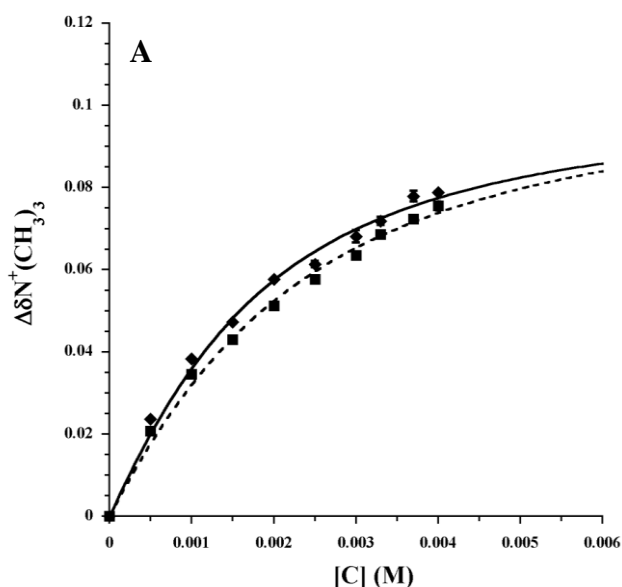
Figure IV.16 : (A) Variations de déplacement chimique en fonction de la concentration en catéchine ajoutée sur des MLV de DMPC à deux températures (\blacklozenge) $T = 37^\circ\text{C}$; (\bullet) $T = 31^\circ\text{C}$. $[L] = 4\text{mM}$; $\text{pH } 7.4$ (tampon Tris- d_{11} dans D_2O , $[\text{Tris}] = 15\text{mM}$). Les barres d'erreur des variations de déplacement chimique sont estimées à $\pm 1\text{-}2\%$ pour $T = 37^\circ\text{C}$ et à $\pm 0.1\text{-}6.7\%$ pour $T = 31^\circ\text{C}$. (B) Paramètres K_a , $\Delta\delta_{\max}$ et coefficient de détermination R obtenus en ajustant les courbes relatives au système C/MLV à 31 et 37°C avec l'équation de Baxter (IV.3 dans le texte). Le nombre de sites de fixation n est fixé à 0.325 ± 0.025 .

L'ajustement des points de la courbe $\Delta\delta = f([T])$ par l'équation de Baxter n'a pu être obtenu avec les trois variables ($\Delta\delta_{\max}$, n et K_a). Or, à pH 3.5, la charge électrique du tannin et du lipide n'est pas modifiée par rapport à celle à pH 7.4. En effet, le pK_a de la fonction hydroxyle la plus acide de la catéchine (Muzolf et al., 2008) est de 8.97 (OH en position 4' du cycle B) et celui du groupement phosphate du DMPC d'environ 1 (Moncelli, 1994). Le nombre de sites n à pH 3.5 a donc été considéré comme identique à celui à pH 7.4 ($n = 0.33$). Dans ces conditions, la valeur au plateau $\Delta\delta_{\max}$ et la constante d'association obtenue pour le système C/MLV à pH 3.5 sont respectivement de 0.108 ± 0.008 ppm et de $700 \pm 50 M^{-1}$ (**figure IV.17B**). Cette dernière est (1.4 fois) inférieure à la constante d'association obtenue pour le même système à un pH de 7.4 ($1000 \pm 150 M^{-1}$). Ce résultat suggère que l'affinité tannin-lipide diminue lorsque l'on passe d'un pH alcalin à un pH acide.

IV.E.2.c Impact de l'éthanol

La catéchine a été additionnée en quantités croissantes sur une solution de MLV de DMPC dans un milieu $D_2O/EtOD$ (88/12). Les mêmes observations que dans le cas du système C/MLV sans éthanol sont retrouvées ici. L'addition de tannin entraîne un blindage de toutes les résonances du lipide, l'allure du pic relatif au $N^+(CH_3)_3$ du lipide (intensité, largeur à mi-hauteur) n'est pas affectée et un seul pic est observé. De ce fait, même en présence d'éthanol, toutes les têtes polaires du lipide sont en moyenne en interaction avec le tannin et aucune précipitation n'est détectée. Néanmoins, en comparant les variations de déplacement chimique du $N^+(CH_3)_3$ dans les milieux 100% D_2O et $D_2O/EtOD$ (88/12) (**figure IV.18A**), nous pouvons voir que ces variations sont très inférieures dans le cas du système C/MLV en présence d'éthanol.

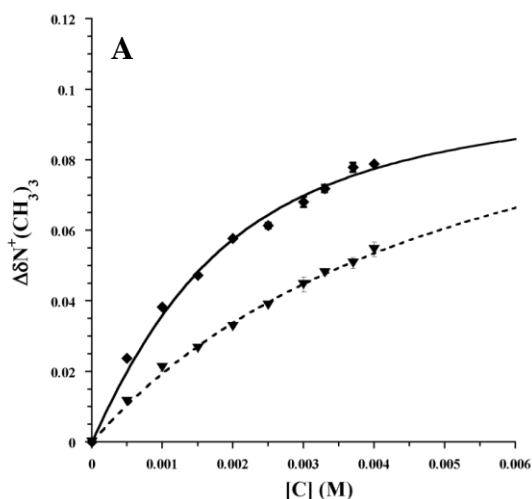
L'ajustement des points de la courbe $\Delta\delta = f([T])$ par l'équation de Baxter n'ayant pu être obtenu avec les trois variables ($\Delta\delta_{\max}$, n et K_a), on a donc supposé que le nombre de sites n était invariant en présence d'éthanol. Ainsi, une valeur au plateau $\Delta\delta_{\max}$ et une constante d'association pour le système C/MLV en présence d'éthanol ont été trouvées respectivement égales à 0.115 ± 0.011 ppm et à $250 \pm 20 M^{-1}$. L'affinité tannin-lipide est donc très affectée par la présence d'éthanol ($K_a(C/MLV, \text{ sans éthanol}) = 1000 \pm 150 M^{-1}$) comme on pouvait s'y attendre à cause de sa localisation dans la même région que le tannin au niveau de l'interface du modèle membranaire (Holte et al., 1997). L'hypothèse faite sur le nombre de sites sera donc discutée dans la partie discussion ci-après.



B

	n	$\Delta\delta_{\max}$	K_a (M^{-1})	R
C/MLV pH 7.4	0.33	0.104 ± 0.007	1000 ± 150	0.9997
C/MLV pH 3.5	0.33	0.108 ± 0.008	700 ± 50	0.9974

Figure IV.17 : (A) Variations de déplacement chimique en fonction de la concentration en catéchine ajoutée sur des MLV de DMPC à différents pH. (♦) pH 7.4 (tampon Tris- d_{11} , [Tris] = 15mM) ; (■) pH 3.5 (tampon acide acétique- d_6 , $[C_3D_6O_2]$ = 5mM). [L] = 4mM ; T = 37°C. L'erreur sur les variations de déplacement chimique est estimée à ± 1 -2% pour le pH 7.4 et ± 0.5 -3% pour le pH 3.5. (B) Paramètres K_a , $\Delta\delta_{\max}$ et coefficient de détermination R obtenus en ajustant les courbes relatives au système C/MLV à pH 3.5 et 7.4 avec l'équation de Baxter (IV.3 dans le texte).



B

	n	$\Delta\delta_{\max}$	K_a (M^{-1})	R
C/MLV	0.33	0.104 ± 0.007	1000 ± 150	0.9997
C/MLV + EtOH	0.33	0.115 ± 0.011	250 ± 20	0.9985

Figure IV.18 : (A) Variations de déplacement chimique en fonction de la concentration en catéchine ajoutée sur des MLV de DMPC en absence et en présence d'éthanol (12% volumique). (♦) Tampon pH 7.4 (Tris- d_{11} , [Tris] = 15mM) ; (▼) Tampon pH 7.4 + éthanol. [L] = 4mM ; T = 37°C. L'erreur sur les variations de déplacement chimique est estimée à ± 1 -2% en absence d'éthanol et à ± 0.1 -5% en présence d'éthanol. (B) Paramètres n, K_a , $\Delta\delta_{\max}$ et coefficient de détermination R obtenus en ajustant les courbes relatives au système C/MLV en absence et en présence d'éthanol avec l'équation de Baxter (IV.3 dans le texte).

IV.E.3 Détermination de la constante d'association du système C/MLV de POPC

Comme cela a été vu dans l'introduction, le DMPC, présentant deux chaînes en C14:0, est un lipide dont les chaînes grasses sont peu représentatives des chaînes grasses présentes sur les lipides des membranes buccales. C'est pourquoi, afin de tendre vers la composition biologique des membranes buccales, nous avons choisi d'analyser l'influence de la nature des chaînes acyles du lipide sur son affinité pour les tannins. Pour cela, nous avons étudié l'interaction de la catéchine avec des MLV de POPC, lipide comportant une chaîne grasse en C16:0 (en position sn-1) et une chaîne grasse en C18:1 (en position sn-2), ces deux chaînes grasses étant les plus représentées dans les membranes buccales (**figure I.10**). L'étude a été effectuée à un pH de 7.4 et à 37°C.

Comme attendu, l'addition de tannin entraîne un blindage des signaux du lipide. Néanmoins, contrairement au cas observé pour une addition de tannin sur des MLV de DMPC, la présence de deux pics distincts pour le groupement $N^+(CH_3)_3$ est ici constaté (**figure IV.19A**). Le premier à 3.275ppm correspond au pic du POPC n'interagissant pas avec les tannins (**figure IV.19B**) tandis que le second à 3.2ppm correspond au pic du POPC en interaction avec les tannins. Toutefois, l'aire du signal à 3.2ppm est supérieure à celle du signal à 3.275ppm, signifiant que la population de tête choline en interaction avec les tannins est plus importante que celle qui n'interagit pas. Par conséquent, dans le cas d'une addition de catéchine sur des MLV de POPC, le tannin ne se répartit pas de façon homogène à travers toutes les bicouches lipidiques de la membrane. Le phénomène peut être attribué au fait que le tannin ne diffuse pas à travers les bicouches de POPC ou que sa diffusion est beaucoup plus lente que dans le cas du DMPC. Ce résultat peut s'expliquer par la nature de la phase lipidique présente lors de l'addition de la catéchine qui a eu lieu dans les deux cas à température ambiante, entre 20 et 24°C. Dans le cas du DMPC, cette addition s'effectue à une température proche de la température de transition de phase gel/fluide de 23.5°C (Cevc. 1993). Ainsi, nous sommes en présence d'une phase de pré-transition présentant des défauts au niveau de sa surface lipidique (Carlson & Sethna. 1987 ; Heimburg. 2000) qui vont faciliter la diffusion du tannin. En revanche, dans le cas du POPC dont la température de transition de phase gel/fluide est de -2°C, l'addition s'effectue sur sa phase fluide L_α seule en présence. Or, cette phase présente peu de défauts à sa surface, ce qui défavorise la diffusion des tannins à travers les bicouches.

La répartition non homogène de la catéchine à travers les bicouches de MLV de POPC se traduit par la présence de deux populations de $N^+(CH_3)_3$, l'une affectée par la présence des tannins et l'autre non affectée donc n'interagissant pas avec les tannins. Ceci est donc un frein à l'utilisation de l'équation de Baxter (équation IV.3). En effet, il n'est pas possible dans ces conditions de connaître la concentration de lipide en interaction avec les tannins. Afin de contourner ce problème, le système mixte C/MLV de POPC a été réalisé par la méthode de cosolubilisation de manière à forcer l'insertion des tannins dans les différentes bicouches. Le signal RMN 1H du groupement $N^+(CH_3)_3$ du lipide obtenu dans ce cas (**figure IV.20A**) présente un seul pic à 3.275ppm correspondant au déplacement chimique observé sur le spectre du système obtenu par addition pour la population en interaction avec

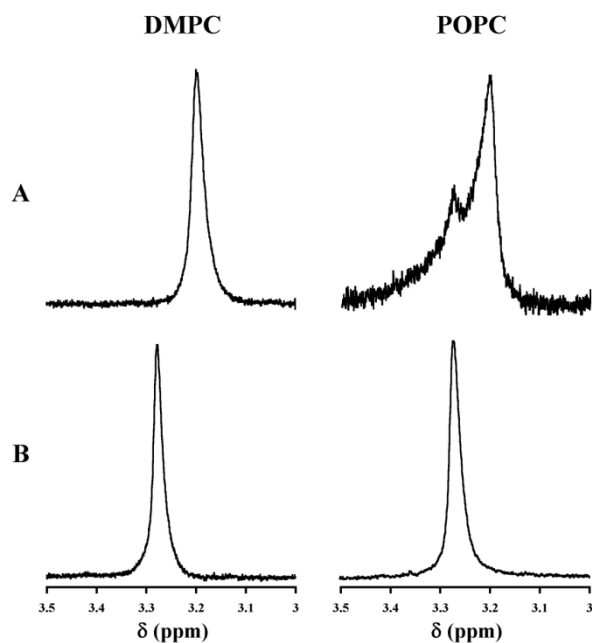


Figure IV.19 : Agrandissements (intensité relative) de la région relative au signal $N^+(CH_3)_3$ (3-3.5 ppm) de la tête choline pour le DMPC et le POPC en absence et en présence de catéchine. **(A)** DMPC/C avec un rapport molaire T/L de 1/1.15. **(B)** MLV seule. [L] = 4mM ; pH 7.4 (Tris- d_{11} , [Tris] = 15mM) ; T = 37°C.

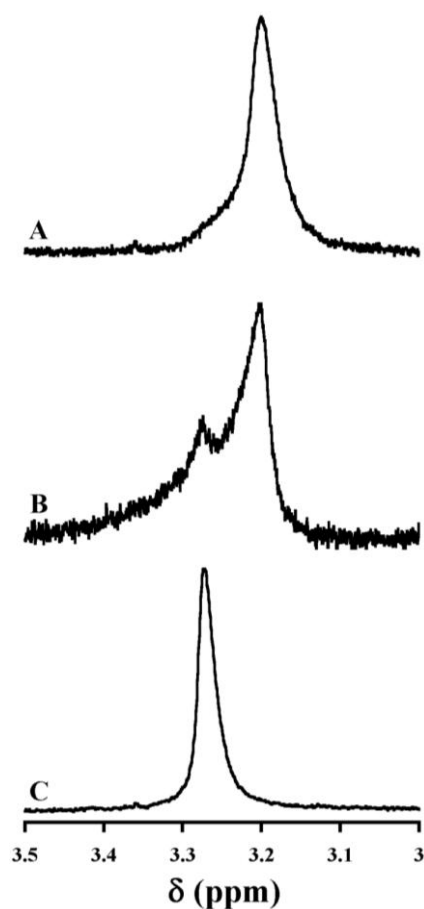


Figure IV.20 : Agrandissements (intensité relative) de la région relative au signal $N^+(CH_3)_3$ (3-3.5 ppm) de la tête choline du POPC en absence et en présence de catéchine. **(A)** C/POPC obtenue par cosolubilisation, **(B)** C/POPC obtenue par addition, **(C)** POPC seul. [L] = 4mM ; [T] = 3.5mM ; pH 7.4 (tampon Tris- d_{11} , [Tris] = 15mM) ; T = 37°C.

le tannin (**figure IV.20B**), signifiant qu'il existe une unique population de têtes cholines. De ce fait, tous les lipides sont en moyenne en interaction avec la catéchine. Le terme [L] de l'équation de Baxter et donc connu et correspond à la concentration totale en lipide de 4mM.

Comme pour le DMPC, afin de déterminer quels groupements moléculaires sont les plus affectés par la présence du tannin, les variations de déplacement chimique ont été reportées en fonction de la position des protons sur le lipide et sont présentées sur la **figure IV.21**. Nous pouvons voir que les variations de déplacements chimiques des différents groupements du lipide sont similaires aux variations observées dans le cas du système C/MLV de DMPC. Ainsi, les mêmes conclusions s'appliquent sur ce système : (i) Les variations les plus importantes sont retrouvées pour les protons relatifs à la tête choline, ce qui suggère une localisation de la catéchine à l'interface. (ii) Les variations significatives obtenues pour les protons en α et en β des carbonyles suggèrent un léger ancrage du tannin dans la membrane de POPC. (iii) Des variations de très faibles intensités sont observées pour les protons relatifs aux groupements CH_2 des chaînes acyles et à l'insaturation. Ainsi, la nature des chaînes grasses (longueur de chaîne, présence d'insaturations) ne semble pas avoir d'influence sur la localisation du tannin dans la membrane. Ainsi, comme précédemment, le suivi des variations de déplacement chimique a été effectué sur le groupement $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ de la tête choline.

Ces variations en fonction de la concentration en catéchine insérée sont présentées pour les deux systèmes C/MLV de POPC et C/MLV de DMPC sur la **figure IV.22A**. Nous pouvons voir que l'ensemble des points pour les deux systèmes sont confondus. Ainsi, la nature de la chaîne acyle ne semble pas avoir d'influence sur les variations de déplacement chimique et donc sur l'affinité tannin-lipide.

Pour ce système, l'ajustement des points de la courbe $\Delta\delta = f([T])$ par l'équation de Baxter a pu être obtenu avec les trois variables ($\Delta\delta_{\text{max}}$, n et K_a) avec $\Delta\delta_{\text{max}} = 0.099 \pm 0.019 \text{ ppm}$, $n = 0.31 \pm 0.08$ et $K_a = 1050 \pm 300 \text{ M}^{-1}$ (**figure IV.22B**). Comme attendu, le nombre de sites de fixation et la constante d'association sont quasi-identiques à ceux obtenus pour les MLV de DMPC ($n = 0.33$; $K_a = 1000 \pm 150 \text{ M}^{-1}$). Ce résultat est en faveur d'une localisation des tannins à l'interface du modèle membranaire de POPC ; le nombre de sites de fixation obtenu reste cohérent par rapport au léger ancrage du tannin suggéré par l'étude des variations de déplacement chimique des signaux du lipide en fonction de la position du groupement moléculaire.

IV.F Discussion

Dans cette partie, les résultats obtenus au cours de ce chapitre seront discutés et reliés à ceux de la littérature. Nous discuterons dans un premier temps de la localisation du tannin à la surface du modèle membranaire. L'échelle d'affinité des tannins pour les lipides obtenue dans le cadre de cette

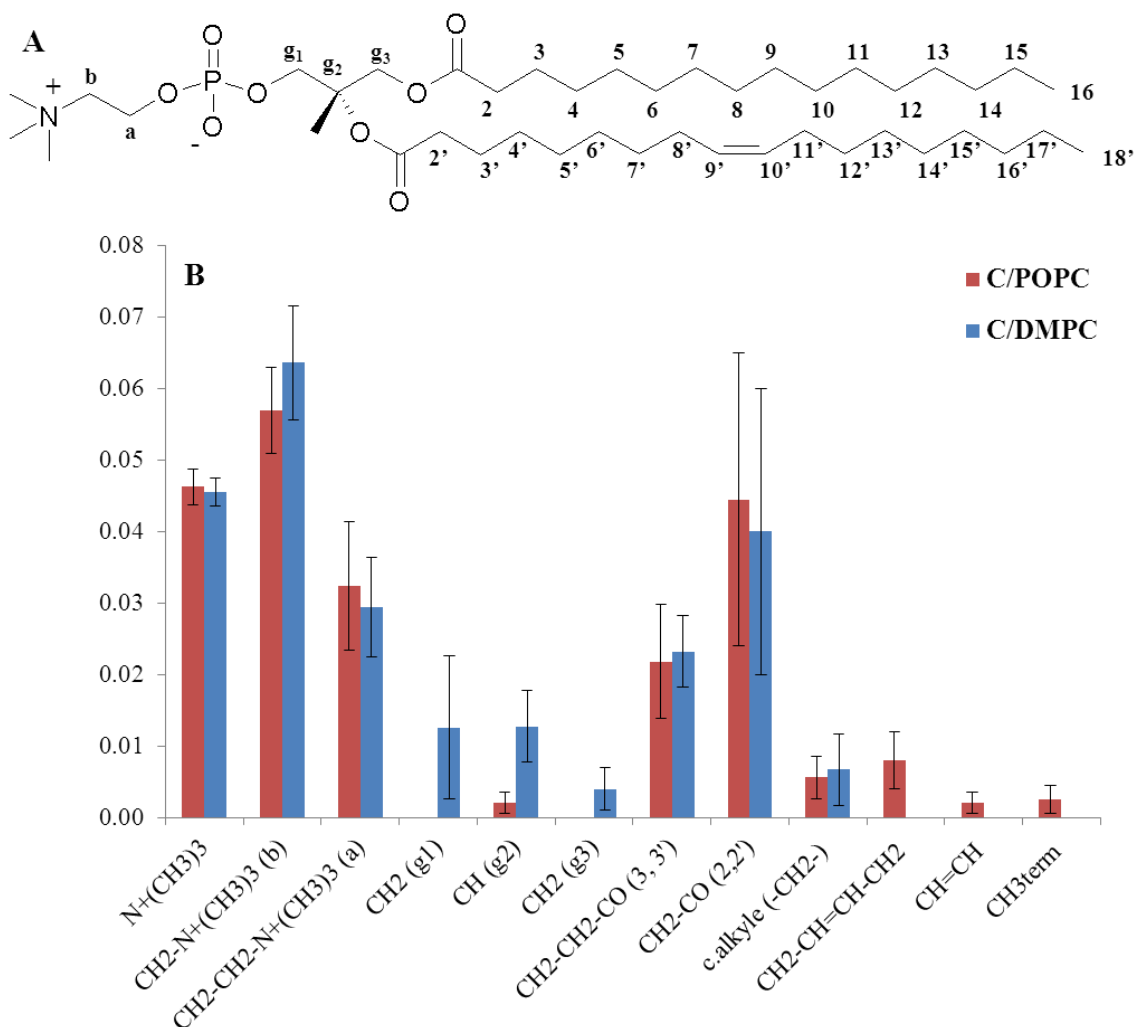
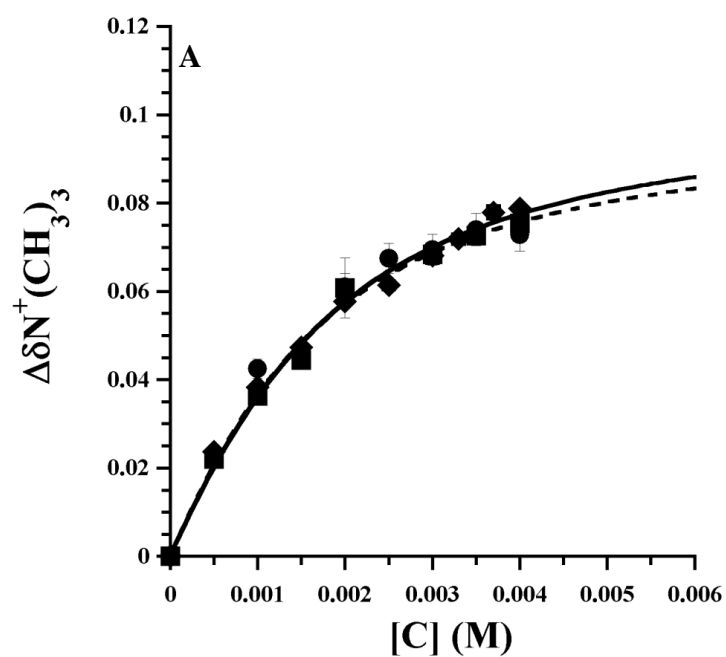


Figure IV.21: (A) Structure chimique numérotée du POPC ; (B) Variations de déplacement chimique des signaux du lipide en fonction de la position du groupement moléculaire portant les protons pour un ajout de catéchine sur des MLV. Comparaison entre des MLV de POPC et des MLV de DMPC. Le rapport molaire tannin/lipide est de 1/2.5. [L] = 4mM. T = 37°C. Du fait d'un rapport signal/bruit élevé, les variations de déplacements chimiques relatives aux groupements CH₂ g₁ et g₃ n'ont pas pu être déterminées dans le cas du POPC.



B

	n	$\Delta\delta_{\max}$	K_a (M^{-1})	R
C/MLV de DMPC	0.33	0.104 ± 0.007	1000 ± 150	0.9997
C/MLV de POPC	0.31 ± 0.08	0.099 ± 0.019	1050 ± 300	0.9970

Figure IV.22: Variations de déplacement chimique en fonction de la concentration en catéchine ajoutée sur des MLV de DMPC et de POPC (♦) DMPC ; (●) POPC, échantillon obtenu par addition de tannin ; (■) POPC, échantillon obtenu par cosolubilisation. [L] = 4mM ; T = 37°C ; pH 7.4 (tampon Tris- d_{11} , [Tris] = 15mM). L'erreur sur les variations de déplacement chimique est estimée à ± 1 -2% pour le DMPC et à ± 2.5 -10% pour le POPC.

étude sera commentée dans un second temps. Des explications seront notamment avancées pour justifier l'augmentation de l'affinité du tannin pour le système lipidique dans le cas d'un tannin galloylé. Une comparaison entre les valeurs des constantes d'association tannin-lipides obtenues et les constantes d'association tannin-protéines salivaires sera également établie afin de permettre une discussion sur l'impact réel ou non de l'interaction tannin-lipide sur la sensation d'astringence. Enfin, nous discuterons de la pertinence du protocole mis au point pour déterminer des constantes d'affinité pour l'interaction tannin-lipide par RMN.

IV.F.1 Localisation des tannins sur le modèle membranaire

L'étude de la variation de déplacement chimique à la surface du modèle membranaire a démontré une localisation des quatre tannins étudiés (C, EC, ECG, EGCG) à l'interface du modèle membranaire. Les variations de déplacements chimiques obtenus pour les signaux relatifs à la tête polaire du lipide sont en effet plus importantes que celles obtenues pour les résonances relatives au cœur hydrophobe (**figure IV.3**). De plus, les variations significatives des déplacements chimiques obtenues pour les pics relatifs aux protons en α et en β des carbonyles ($\text{CH}_2\text{-C=O}$ et $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-C=O}$) suggèrent un léger ancrage des tannins dans la membrane. Ces résultats apportent la preuve d'une localisation des tannins à l'interface du modèle membranaire jusqu'ici suggérée (Kajiya et al., 2001 ; Uekusa et al., 2007, 2011 ; Sun et al., 2009 ; Sirk et al., 2011) et infirment ceux obtenus par Caturla et al. (2003) qui conclurent à une localisation en profondeur pour ECG et EGCG. En effet, une telle localisation induirait une forte variation de déplacement chimique pour le pic relatif aux chaînes acyles, ce qui n'a pas été observé.

Dans le cas d'une addition de tannins non galloylés (C et EC) sur les systèmes lipidiques, on obtient un nombre de sites de fixation de 0.33, ce qui correspond en moyenne à la fixation de trois lipides par tannin. Si on suppose que le tannin interagit parallèlement à la bicouche, l'aire surfacique maximale du tannin (82.0\AA^2 pour C et 77.1\AA^2 pour EC) étant supérieure à la surface du lipide (65\AA^2), ce résultat est raisonnable. Dans le cas d'EGCG, l'aire du tannin (100.4\AA^2) augmente, on s'attendrait donc à ce qu'il interagisse avec plus de lipides donc que la valeur de n soit plus faible. Or, on trouve $n_{\text{EGCG}} = 0.59 > n_{\text{C}}$. Ce résultat suggère une diminution de l'aire surfacique du tannin et donc une pénétration plus en profondeur d'EGCG dans la bicouche lipidique. Ce résultat rejoint le résultat obtenu par Sirk et al. (2008) par modélisation moléculaire qui constatèrent, en étudiant l'interaction d'une molécule d'EGCG avec une bicouche POPC/POPE 1/1 (144 lipides par feuillet), un léger ancrage d'EGCG dans la membrane.

Ainsi, l'étude effectuée montre que les quatre tannins étudiés, C, EC, ECG et EGCG, sont localisés à l'interface du modèle membranaire avec une insertion légèrement plus importante pour EGCG. Ce résultat est en accord avec l'effet désorganisant au niveau du cœur hydrophobe plus important dans le cas de ce tannin, comme observé dans le chapitre III.

IV.F.2 Discussion sur la pertinence de la méthode utilisée

Une méthode basée sur l'utilisation de la RMN permettant la détermination quantitative de constantes d'association tannin-lipide par RMN a été élaborée. Une première remarque pourrait être faite sur le choix du lipide utilisé pour mimer les chaînes grasses, le DMPC étant très peu présent dans les membranes naturelles. Toutefois, nous avons montré que les chaînes grasses étaient peu influentes sur l'affinité tannin-lipide. Par conséquent, le modèle lipidique des MLV de DMPC, qui présente l'avantage d'être peu coûteux, peut être retenu comme modèle de référence pour la détermination et la comparaison relative des constantes d'association tannin-lipide.

Dans les conditions de notre étude (concentration en tannin inférieure à la CMC comme c'est le cas dans le vin), la valeur du K_a obtenue pour ECG n'est pas satisfaisante dans la mesure où elle est plus proche de celle des tannins non galloylés que celle du tannin galloylé EGCG. Ce résultat peut être attribué à la méthode utilisée (ajustement mathématique à partir de l'équation de Baxter). En effet, de tous les tannins étudiés, ECG a la CMC du tannin la plus basse, ce qui empêche expérimentalement d'atteindre le début du plateau de la courbe des variations de déplacement chimique en fonction de la concentration en tannin. Pour contourner ce problème, deux solutions peuvent être envisagées. La première serait de travailler à une concentration en lipide plus basse. La deuxième serait de faire appel à la technique par ITC (isothermal titration calorimetry) qui permettrait de déterminer le nombre de sites de fixation n sur le lipide. Celui-ci pourrait ensuite être injecté comme paramètre fixe dans l'équation de Baxter pour déterminer le K_a et la valeur au plateau.

Dans le cas du système C/MLV en présence d'éthanol ($K_a = 250 \pm 20 M^{-1}$), l'hypothèse d'un nombre de sites de fixation de 0.33 (3 lipides par tannin) identique à celui du même système sans éthanol est à remettre en cause. En effet, il a été montré que l'éthanol est localisé dans la même région que le tannin à l'interface de la membrane lipidique (Holte et al., 1997). Dans ces conditions, il existerait une compétition pour un même site de fixation entre les deux molécules. On peut donc raisonnablement penser que le nombre de sites de fixation sur le lipide disponibles pour le tannin va diminuer en présence d'éthanol, ce qui rend caduque notre hypothèse. Le recours à la technique par ITC pourrait là encore permettre d'accéder au nombre de sites de fixation n , lequel pourrait être ensuite injecté dans l'équation de Baxter pour déterminer le K_a . Cependant, pour avoir une estimation de la valeur de la constante d'association pour le système C/MLV en présence d'éthanol, nous avons calculé la valeur de K_a pour différentes valeurs de n inférieures à 0.33 dans l'équation de Baxter en le faisant tendre vers 0 (**tableau IV.4**).

n	Nombre de lipides par tannin	Valeur au plateau $\Delta\delta_{\max}$ (ppm)	K_a (M^{-1})	Coefficient de corrélation R
0.33	3	0.115±0.011	250 ± 20	0.9985
0.2	5	0.119±0.01	220±30	0.9986
0.1	10	0.125±0.01	200±20	0.9986
0.05	20	0.127±0.01	180±20	0.9987
0.02	50	0.129±0.01	180±20	0.9987
0.01	100	0.129±0.01	175±20	0.9987
0.005	200	0.130±0.01	175±20	0.9987
0.001	1000	0.130±0.01	175±20	0.9987

Tableau IV.4 : Valeurs de la constante d'association K_a en fonction du nombre de sites n fixé dans l'équation de Baxter pour le système C/MLV en présence d'éthanol.

Nous pouvons voir que pour des valeurs de n inférieures à 0.33, la constante d'association diminue et tend vers une valeur limite de $175\pm 20M^{-1}$. On peut donc supposer que la valeur précise de la constante d'association pour le système C/MLV en présence d'éthanol sera comprise entre $175\pm 20M^{-1}$ (n = 0.001) et $250\pm 20M^{-1}$ (n = 0.33).

Nous avons donc vu, à travers les systèmes ECG/MLV et C/MLV en présence d'éthanol, que des problèmes peuvent se poser pour le paramétrage de l'équation mathématique de Baxter utilisée pour l'ajustement des points expérimentaux de la courbe $\Delta\delta = f([T])$. En effet, l'absence de plateau sur la courbe expérimentale ou la difficulté du logiciel KGraph a trouvé un ajustement mathématique réaliste à partir de l'équation de Baxter à trois variables constitue la principale limitation de la méthode utilisée.

IV.F.3 Influence de la structure des tannins sur leur affinité pour le modèle membranaire

Les constantes d'associations ont pu être quantifiées pour les systèmes C/MLV, EC/MLV et EGCG/MLV ce qui permet d'établir l'échelle d'affinité suivante : $K_a(\text{EGCG/MLV}) = 2200\pm 600M^{-1} > K_a(\text{EC/MLV}) = 1100\pm 150M^{-1} \sim K_a(\text{C/MLV}) = 1000\pm 150M^{-1}$. Bien que la valeur du K_a pour le système ECG/MLV ne puisse être validée, en se basant sur les variations de déplacement chimique pour ce tannin, on peut raisonnablement conclure que l'affinité des tannins est plus importante pour des tannins galloylés que des tannins non galloylés. De plus, l'isomérisation cis/trans des carbones 2 et 3 du cycle pyrane ne semble pas influencer sur l'affinité des tannins non galloylés.

La valeur de K_a la plus élevée obtenue pour le tannin galloylé EGCG est en accord avec celle de la littérature (Hashimoto et al., 1999 ; Kajiya et al., 2001 ; Kamihara et al., 2008 ; Uekusa et al., 2008). Uekusa et al. (2011) expliquèrent ce résultat par la présence d'un nouveau système aromatique induisant des interactions de type cation- π avec la tête choline du lipide, ce qui va augmenter l'affinité du tannin pour le lipide. On peut toutefois supposer que la présence de trois nouvelles fonctions

hydroxyles pouvant être impliquées dans des liaisons hydrogène peut aussi être une explication de l'affinité plus importante dans le cas du tannin galloylé ; les liaisons hydrogène sont en effet les interactions qui prédominent entre les tannins et les lipides (Sirk et al., 2008 ; Abram et al., 2013).

Il est à noter que la seule étude montrant des données quantitatives (Kamihara et al., 2008) sur les constantes d'association entre des tannins et des multicouches de DMPC supportées sur une microbalance de cristal de quartz conclut aussi à une affinité plus importante des tannins galloylés par rapport aux tannins non galloylés avec $K_a(\text{ECG}) = (3.75 \pm 0.997) \cdot 10^6 \text{M}^{-1}$, $K_a(\text{EGCG}) = (2.16 \pm 0.791) \cdot 10^6 \text{M}^{-1}$, $K_a(\text{EC}) = (1.86 \pm 0.128) \cdot 10^3 \text{M}^{-1}$ et $K_a(\text{EGC}) = (1.33 \pm 0.124) \cdot 10^3 \text{M}^{-1}$. Cependant, alors que ces résultats montrent une affinité des tannins galloylés pour le système lipidique 1000 fois supérieure à celle des tannins non galloylés, elle est seulement deux fois plus élevée dans notre cas. Les valeurs très élevées des constantes d'association obtenues dans cette publication (de l'ordre de 10^3 à 10^6M^{-1}) nous amène à nous interroger sur la pertinence de ces résultats obtenus par la technique de QCM basée sur des mesures de variations de masse. En effet, la constante d'association est obtenue en ajustant la courbe des variations de masse en fonction de la concentration totale en tannin injecté $\Delta m = f([T])$. Or, les tannins doivent d'abord diffuser avant d'interagir avec la couche lipidique fixée sur la microbalance et déclencher la mesure. Ce phénomène de diffusion étant très lent (de plusieurs heures à plusieurs jours), la concentration en tannins interagissant avec la surface lipidique n'est pas égale à la concentration totale en tannin injecté, les tannins n'ayant pas tous diffusé au moment de la mesure. La concentration en tannin interagissant avec la surface lipidique est donc sur-estimée en la considérant égale à la concentration totale en tannin injecté. Cela entraîne alors une source d'erreur sur la valeur du K_a déterminée à partir de cette technique. La technique de QCM n'est donc peut-être pas la technique la plus appropriée pour la mesure de constantes d'association.

D'autre part, les valeurs de K_a que nous avons obtenues montrent que la catéchine et l'épicatéchine ont une affinité comparable pour les MLV. Ce résultat n'est pas en accord avec les données de la littérature qui sont en faveur d'une affinité plus importante dans le cas des tannins de type cis (cas de EC) par rapport aux tannins de type trans (cas de C) (Hashimoto et al., 1999 ; Kajiya et al., 2001 ; Uekusa et al., 2008). Cependant, les conclusions établies jusqu'à présent sont basées sur des données qualitatives ou des mesures effectuées dans des conditions peu représentatives des conditions de la dégustation d'un vin (mesures de coefficient de partage, utilisation de la technique HPLC en solvant organique acétonitrile $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ 20/80) tandis que nos résultats sont basés sur la détermination d'une grandeur thermodynamique dans des conditions mimant celles de la dégustation (milieu hydroalcoolique 12%, pH 7.4, 37°C).

IV.F.4 Influence de l'interaction tannin-lipide sur l'astringence et implication dans le goût du vin

La mesure de la constante d'association entre un tannin, la catéchine, et un modèle membranaire mimant les membranes buccales, les MLV de DMPC, a pu être effectuée dans des conditions mimant celles de la dégustation (12% d'éthanol, $T = 37^{\circ}\text{C}$, $\text{pH } 7.4$). Bien que la constante d'association pour le système C/MLV en présence d'éthanol n'ait pu être déterminée avec précision, celle a tout de même été estimée entre 155 et 270M^{-1} .

Ce résultat peut être comparé aux travaux effectués au laboratoire par O. Cala sur les interactions tannin-protéine (Cala et al., 2010) afin de voir si l'interaction entre les tannins et les lipides a une influence sur la sensation d'astringence. Pour la catéchine, l'auteur a déterminé une constante de dissociation K_d entre le tannin et le peptide IB7₁₄ mimant les protéines salivaires de $12.7 \pm 0.3\text{mM}$ soit une constante d'association K_a de $79 \pm 2\text{M}^{-1}$. Ainsi, la constante d'association C/MLV de DMPC est environ 2 à 3 fois plus importante que celle obtenue pour le système C/IB7₁₄.

Néanmoins, les conditions expérimentales varient entre les deux études, celles sur le système C/IB7₁₄ ayant été effectuée dans des conditions mimant le milieu du vin ($\text{pH } 3.5$, $T = 25^{\circ}\text{C}$, 12% d'éthanol) tandis que celles relatées dans ce chapitre pour le système C/MLV miment les conditions en bouche lors de la dégustation d'un vin ($\text{pH } 7.4$, $T = 37^{\circ}\text{C}$, 12% d'éthanol). De ce fait, l'effet du pH et de la température sur la constante d'association C/MLV est à prendre en compte lors de la comparaison avec les résultats sur l'interaction tannin-protéines salivaires. Or, une diminution du pH et de la température induisent une diminution d'environ 30% de la constante d'association tannin-lipide. D'autre part, les constantes d'association tannin-lipide obtenues pour les autres tannins (EC, EGCG) sont supérieures ou du même ordre de grandeur que les constantes d'association tannin-IB7₁₄ obtenues avec les dimères et trimères de tannins (Cala et al., 2010). Nous pouvons donc supposer que dans des conditions de T , pH et degré alcoolique identiques, l'affinité tannin-lipides est supérieure ou du moins du même ordre de grandeur que l'affinité tannin-protéines salivaires à la base de l'astringence. Au moment de la dégustation, il va donc exister une compétition entre l'interaction entre les tannins et les lipides et l'interaction entre les tannins et les protéines salivaires. Dans le cadre de ces études, les lipides des membranes buccales joueraient donc le rôle de modulateur de l'astringence.

IV.G Conclusion et perspectives

L'objectif de ce chapitre était de déterminer les constantes d'association entre des tannins du vin (C, EC, ECG et EGCG) et un modèle des membranes buccales, les MLV de DMPC, afin d'étudier l'impact de ces interactions entre les tannins et les lipides sur la sensation d'astringence. Cet objectif a été atteint grâce à la mise en place d'un protocole permettant la détermination de ces constantes par RMN. Celui-ci repose sur le suivi des variations du signal du groupement lipidique le plus affecté par

le tannin, le $N^+(CH_3)_3$, en fonction de la concentration en tannin dans le milieu et leur ajustement mathématique par l'équation déterminée par Baxter et al. (1996). Des constantes d'association tannin-lipide ont ainsi pu être obtenues pour la première fois dans le cas du modèle membranaire des MLV de DMPC, celles-ci variant de 175 à 2200M⁻¹.

Nous avons montré que la présence d'un groupement galloyle dans la structure du tannin augmente son affinité pour le modèle membranaire. Ce résultat est à relier aux nombre d'interactions décrites comme prédominantes dans la littérature entre les tannins et les lipides, avec une augmentation du nombre de liaisons hydrogène et l'apparition d'une interaction de type cation- π . De même, l'effet du pH, de la température ainsi que de la présence d'éthanol ont été mis en évidence. A l'inverse, il a été montré que la nature des chaînes grasses n'a pas d'influence sur l'affinité du tannin pour le modèle membranaire.

Les constantes d'association tannin-lipide obtenues pour le système tannin/MLV ont ensuite été comparées aux constantes d'association relative au système tannin-IB7₁₄, peptide mimant l'interaction entre les tannins et les protéines salivaires, responsable de la sensation d'astringence. Le résultat remarquable et inattendu que nous avons obtenu est que les interactions tannin-lipides sont du même ordre de grandeur que les interactions tannin-protéines salivaires. Ces deux interactions sont donc en compétition au moment de la dégustation d'un vin, ce qui va induire une modulation de l'astringence. Les lipides jouent donc un rôle sur l'astringence d'un vin et sont *a fortiori* à prendre en considération dans le cadre de l'association mets-vin.

Une perspective d'étude vise à rendre plus complexe la composition lipidique du modèle membranaire, notamment en y ajoutant des phosphoéthanolamines qui représentent avec les phosphocholines la majorité des phospholipides retrouvés dans les membranes buccales ou encore du cholestérol, deuxième lipide le plus représenté après les phospholipides. Par ailleurs, il serait intéressant de déterminer des constantes d'association pour des dimères ou des trimères de tannin afin de voir l'influence du degré de polymérisation du tannin sur son affinité pour le lipide (O. Cala et al. ont en effet montré que l'affinité entre les tannins et les protéines salivaires augmentait avec le degré de polymérisation du tannin). La détermination des constantes d'association tannin-lipides et tannin-protéines salivaires pour le système MLV de DMPC en présence du peptide modèle d'un des protéines salivaires IB7₁₄ permettrait de mieux cibler les interactions déterminantes pour le goût d'un vin.

CHAPITRE V

Effet des tannins sur des gouttelettes lipidiques

Résumé

L'interaction entre des tannins du vin et les lipides des membranes buccales a été établie au cours des chapitres précédents. Ce chapitre traite de l'interaction entre les tannins du vin et les lipides provenant des aliments. L'étude a été réalisée avec la catéchine et EGCG en interaction avec deux modèles de gouttelettes lipidiques, forme sous laquelle sont retrouvés les lipides dans les aliments ; les bicelles isotropes pour mimer les gouttelettes de petites taille (~ 10nm) et une émulsion huile dans eau pour mimer les gouttelettes lipidiques de grande taille (~µm). L'étude par RMN ^1H sur les bicelles isotropes a révélé une interaction avec les têtes polaires des lipides à faible concentration en tannin et une déstabilisation du modèle bicellaire à forte concentration en tannin conduisant à la formation d'un précipité. L'étude du précipité par RMN des solides ^{31}P et ^2H a mis en évidence la formation d'une phase lipidique hexagonale inverse H_{II} . Ce résultat rend compte d'une interaction forte entre les tannins et les lipides alimentaires. Par ailleurs, l'étude de l'effet de la catéchine sur la transition de phase lamellaire L_{α} /hexagonale H_{II} d'un phosphoéthanolamine a mis en évidence un effet chaotrope des tannins sur le système lipidique, ces derniers stabilisant la phase lamellaire du lipide. Enfin, l'effet de la catéchine sur une émulsion huile dans eau stabilisée par un émulsifiant alimentaire, le tween 80 (un ester de polysorbitan), a été examiné. Les résultats obtenus par RMN ^1H montrent que la catéchine interagit avec le tween 80 localisé à la surface des gouttelettes lipidiques. Bien que l'interaction soit faible, ce résultat met en évidence une interaction potentielle entre les gouttelettes lipidiques des aliments et les tannins du vin. Au même titre que les lipides des membranes buccales, les lipides alimentaires vont jouer un rôle dans l'astringence d'un vin, sensation résultant de l'interaction entre les tannins et les protéines salivaires. En effet, les tannins en interagissant avec les lipides sont moins disponibles pour interagir avec les protéines salivaires.

Le vin est généralement et traditionnellement consommé au cours d'un repas en présence d'autres aliments qui pour un certain nombre d'entre eux sont constitués de lipides, c'est le cas notamment de la viande ou du fromage. A l'échelle microscopique, les lipides se trouvent sous différentes formes : ils forment soit une phase continue telle les émulsions eau dans huile (beurre, margarine) soit ils sont présents sous forme de gouttelettes lipidiques dispersées dans une phase aqueuse dans les émulsions huile dans eau (lait, sauces) ou enchâssées dans des matrices glucidiques (produits sucrés) ou protéiques (viande, fromage). Ces gouttelettes sont constituées d'un cœur hydrophobe entouré d'une interface hydrophile (Dalglish et al., 2006) comprenant protéines et lipides (phospholipides, sphingolipides, cholestérol) (Lopez et al., 2008 ; Fujimoto et al., 2008). Dès lors que des lipides d'aliments sont ingérés, ils vont subir une première transformation dans la bouche avec la mastication. Celle-ci va entraîner une destruction des matrices lipidiques et protéiques ce qui va libérer les gouttelettes lipidiques et réduire la taille des émulsions. Il en résulte une dispersion de gouttelettes lipidiques de tailles très variables (**figure V.1A**).

Durant la dégustation, les tannins du vin sont donc en contact avec ces lipides. Une interaction entre tannin et lipide va se produire comme nous l'avons vu dans les chapitres précédents ce qui va influencer sur le goût du breuvage. Dans cette dernière partie de thèse, nous nous sommes intéressés à l'effet des lipides exogènes, présents sous forme colloïdale, sur le goût du vin. Pour cela, nous avons étudié l'effet de trois tannins sur deux modèles de gouttelettes lipidiques de taille différente afin de mimer ce qui peut intervenir dans la cavité buccale lorsque l'on mange et boit simultanément.

Deux suspensions colloïdales ont été utilisées : des bicelles isotropes DMPC/DCPC d'une dizaine de nanomètres pour mimer les gouttelettes lipidiques de petite taille (**figure V.1C**) et une émulsion de type huile dans eau dont la taille est comprise entre 7 et 10 μm (**figure V.1B**) a été utilisée pour modéliser les gouttelettes lipidiques de grandes tailles. Deux tannins ont été principalement étudiés, la catéchine et l'épigallocatechine gallate. Le premier a été choisi car c'est la principale unité monomérique que l'on retrouve dans les tannins condensés tandis que le second présente des résultats notables notamment en termes d'affinité et d'effet fluidifiant sur les membranes. Afin de mimer la température en bouche, les expériences présentées dans ce chapitre ont été effectuées à une température de 37°C.

La première partie de ce chapitre traite de l'effet des deux tannins sur les bicelles isotropes et plus particulièrement au précipité qui se forme lors d'un fort ajout de tannin sur ces bicelles, L'analyse du précipité par RMN des solides (du deutérium et du phosphore) et diffusion des rayons X fait l'objet d'une étude détaillée. La seconde partie de ce chapitre présente les premiers résultats obtenus en RMN du proton sur une émulsion huile dans eau modèle seule et en interaction avec le tannin EGCG. Ces résultats permettent de conclure sur la pertinence du modèle utilisé.

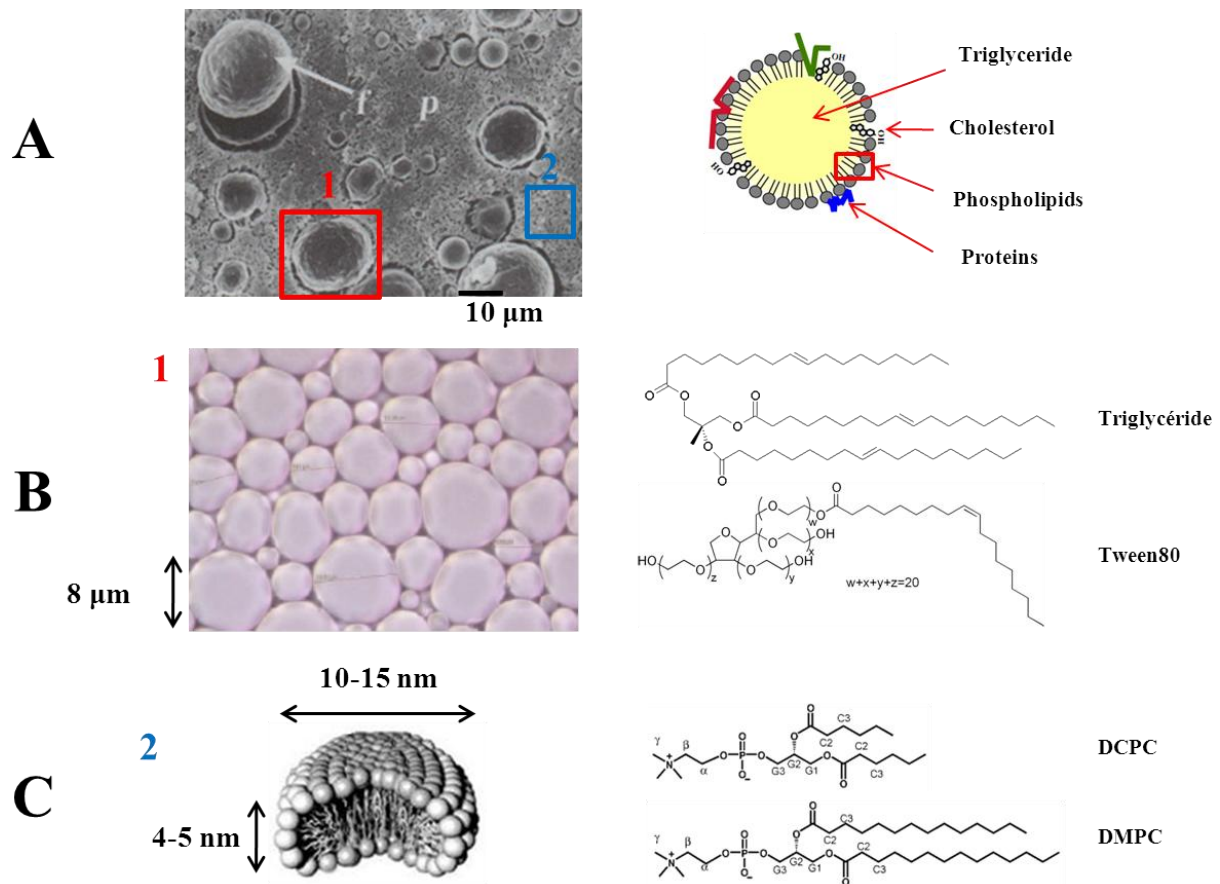


Figure V.1: (A) Cliché de microscopie électronique et composition de gouttelettes lipidiques (Sikorski & Kolakowska., 2003 ; Fujimoto et al., 2008). (B) Cliché de microscopie optique et structure des composés majoritaires de l'émulsion utilisée pour mimer les gouttelettes lipidiques de grandes tailles. (C) Schéma et structure des composés des bicelles isotropes utilisées pour mimer les gouttelettes lipidiques de petites tailles.

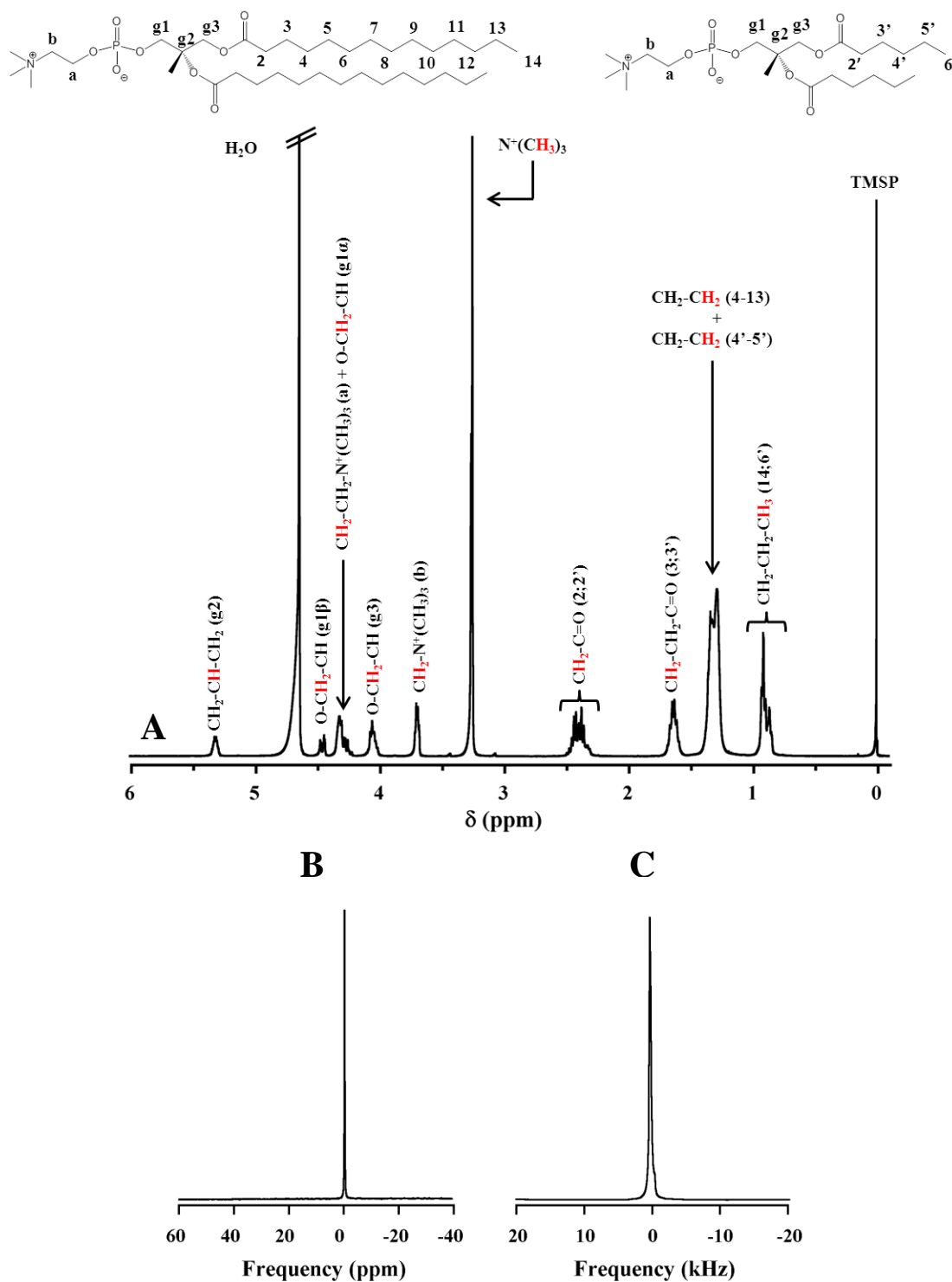


Figure V.2 : (A) Structure et spectre RMN du proton attribué de bicelles isotropes DMPC/DCPC en dispersion dans de l'eau deutérée ($\delta_{\text{HOD}}=4.7$ ppm) obtenu en HR-MAS. $q = [\text{DMPC}]/[\text{DCPC}] = 0.5$. $[\text{L}] = 30\text{mM}$. $T = 37^\circ\text{C}$. $\text{pH } 7.4$ (tampon $\text{Tris-}^2\text{H}_{11}$, 15mM) Le spectre est référencé par rapport au TMS dont le déplacement chimique est fixé à 0ppm. (B) Spectre RMN du phosphore de bicelles isotropes DMPC/DCPC. $q = [\text{DMPC}]/[\text{DCPC}] = 0.5$. $[\text{L}] = 60\text{mM}$. $T = 37^\circ\text{C}$. Nombre d'acquisitions : 128. (C) Spectre RMN du deutérium du modèle lipidique précédent. Le DMPC est deutéré à 25% via l'utilisation de DMPC- d_{27} . $[\text{L}] = 60\text{mM}$. $T = 37^\circ\text{C}$. Nombre d'acquisitions : 12k scans. Le centre du spectre est arbitrairement positionné à 0Hz.

V.A Effet des tannins sur les bicelles isotropes

V.A.1 Caractérisation structurale des bicelles

Les bicelles isotropes sont des objets de petite taille (10-15nm) présentant un cœur hydrophobe (les chaînes grasses) et une surface hydrophile (les têtes polaires) qui en font un modèle pouvant être utilisé pour mimer les gouttelettes lipidiques issues des aliments. Ces objets possèdent des propriétés isotropes du fait de leur dynamique très importante induite par leur petite taille. De ce fait, ces bicelles peuvent être étudiées en RMN du liquide. En effet, une dispersion de bicelles isotropes donne un spectre proton très résolu (**figure V.2A**) avec des résonances identiques à celles obtenues en rotation à l'angle magique pour des MLV de DMPC (*cf.* chapitre IV). La meilleure résolution obtenue dans ce cas permet de différencier, pour certains groupements, les résonances du DMPC et du DCPC. C'est le cas notamment pour le méthyl en bout de chaîne acyle présentant deux résonances, l'une à 0.83 ppm pour le DMPC, l'autre à 0.87 ppm pour le DCPC.

Les **figures V.2B et V.2C** présentent respectivement les spectres de bicelles isotropes obtenus en RMN du phosphore et du deutérium. Nous constatons la présence d'un seul pic fin dans les deux cas, dû à la nature isotrope de l'échantillon. En effet, soumis au mouvement Brownien, le système ne présente pas de dépendance angulaire, ce qui explique la faible largeur du signal. En outre, la dynamique de l'échantillon est trop rapide pour entraîner l'apparition de doublets de Pake en RMN du deutérium. Enfin, il est à noter que, bien que les déplacements chimiques des deux résonances relatives aux deux lipides, DMPC et DCPC, soient très proches, celles-ci devraient être visibles sur un spectre RMN ^{31}P hautement résolu, ce qui n'est pas le cas ici.

Il est à noter que pour une concentration lipidique inférieure à 130mM ce qui est le cas pour notre étude, le DCPC est en échange rapide entre sa forme libre et sa forme bicellaire (Glover et al., 2001). Au delà de cette concentration, le lipide est entièrement englobé dans la bicelle.

V.A.2 Effet de la catéchine sur les bicelles, formation d'un précipité à fortes concentration

L'effet de l'ajout de quantités croissantes de catéchine sur une solution de bicelles isotropes a été examiné. Une différence concernant l'aspect visuel des échantillons a été observé en premier lieu selon la quantité de catéchine ajoutée. En effet, pour de faibles ajouts de catéchine, la solution de bicelles initialement transparente le reste tandis qu'un précipité en suspension apparaît pour de forts ajouts (photos, **figure V.4**). Ces observations corrélerent avec les résultats obtenus sur le spectre RMN du proton des lipides (**figure V.3A**). Comme on peut le voir pour un rapport molaire T/L de 1/9, le spectre est peu affecté en termes d'intensité. En revanche, pour un rapport T/L de 1/1, on observe une diminution drastique de l'intensité de tous les signaux relatifs au lipide. Afin de déterminer le rapport T/L à partir duquel un précipité se forme suite à l'ajout de tannin, l'aire du pic de résonance du

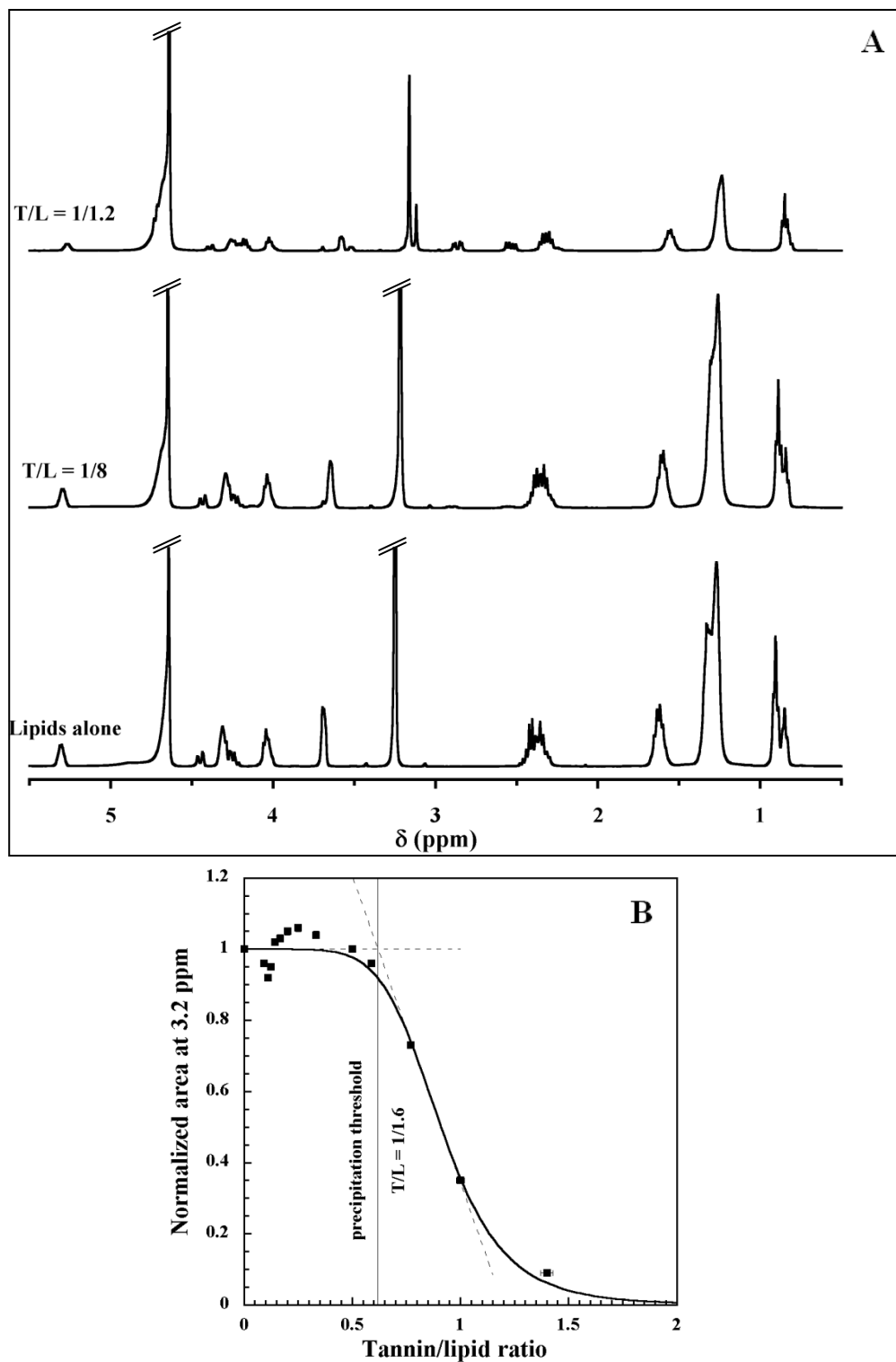


Figure V.3 : (A) Comparaison des spectres RMN du proton de bicelle isotrope DMPC/DCPC en absence et en présence de catéchine aux rapports molaires T/L 1/8 et 1/1.2. [L] = 50mM ; T=37°C. En cas de précipitation (T/L = 1/1.2), le spectre est celui du surnageant récupéré après centrifugation. Les spectres sont référencés par rapport au TMSP, fixé à 0 ppm. (B) Variation de l'aire normalisé du signal RMN relatif au groupement $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ des lipides en fonction du rapport molaire T/L. La valeur du rapport T/L au seuil de précipitation est déterminée à l'intersection des tangentes à la courbe (pointillés en rouge). [L] = 50mM ; T = 37°C.

groupement $N^+(CH_3)_3$ de la tête choline (3.2 ppm) normalisée par rapport à l'aire du pic dans le cas des bicelles seules a été reportée en fonction du rapport T/L. A partir du graphique de la **figure V.3B**, le rapport au seuil de précipitation a été déterminé à 1/1.6 (0.62) au-delà duquel on observe une brusque diminution de l'aire du signal (diminution de 75% dans le cas d'un rapport T/L de 1/1, supérieure à 90% dans le cas d'un rapport T/L de 1.4/1). Cette diminution peut s'expliquer par la présence du précipité qui entraîne le passage d'une partie des molécules de lipide de la phase liquide vers la phase solide, laquelle n'est pas détectée en RMN du liquide.

La formation d'un précipité a également été mise en évidence par la RMN du phosphore. La **figure V.4** montre les spectres phosphore des bicelles isotropes seules et en présence de catéchine pour un rapport inférieur et supérieur au seuil de précipitation. Avant le seuil de précipitation (**figure V.4B**), le spectre phosphore n'est pas modifié et présente une raie isotrope fine caractéristique comme dans le cas des bicelles isotropes seules (**figure V.4A**). Après le seuil de précipitation (**figure V.4C**), la raie isotrope se superpose à un spectre de poudre à symétrie axiale large et moins intense caractéristique d'une phase solide provenant du précipité et dont l'anisotropie $\Delta\sigma$ ($\sigma_{//}-\sigma_{\perp}$) est d'environ 17.5ppm.

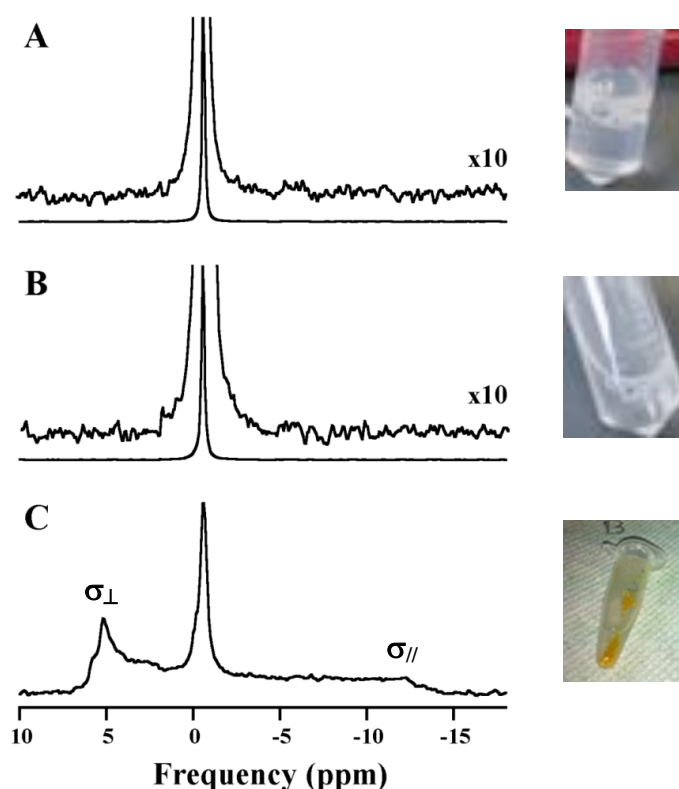


Figure V.4 : Spectres RMN du phosphore (intensité relative) du système catéchine/bicelles isotropes pour deux rapports T/L au-dessus et en dessous du seuil de précipitation. (A) Bicelles isotropes seules, (B) C/Bicelles (1/8), (C) C/Bicelles (1/1). Dans le cas des systèmes C/Bicelles (1/8) et bicelles isotropes seules, un zoom facteur 10 est représenté. L'aspect visuel des échantillons relatifs aux spectres est présenté sur la droite. T = 37°C. [L] = 50mM. Les systèmes sont hydratés en large excès d'eau deutérée (97%). Nombre d'acquisitions : 256 pour les systèmes C/Bicelles et 128 les bicelles seules.

V.A.2.a Composition du précipité

La détermination de la composition du précipité a ensuite été entreprise en RMN du proton et du phosphore. Elle a été déduite de l'analyse de la phase liquide récupérée après centrifugation de l'échantillon (à 5000 rpm) dans le cas d'un rapport T/L de 1.

Les proportions respectives en lipide et tannin ont été déterminées sur le spectre proton de la phase liquide (**figure V.5A**) à partir des aires normalisées par rapport à celle du TMSP (utilisé dans ce cas comme référence externe à une concentration de 4.92mM) des pics à 3.2 ppm pour les lipides et à 2.86 ppm pour la catéchine. Celles-ci sont présentées dans le **tableau V.1**.

	T	L	T/L
Surnageant	29	42	1/1.44
Précipité	71	68	1/0.82
Système avant précipitation	50	50	1

Tableau V.1 : Pourcentages de tannin et de lipide et rapport molaire T/L dans le surnageant et dans le précipité issus d'une addition de catéchine sur des bicelles isotropes DMPC/DCPC. Rapport molaire T/L = 1. [L] = 30mM ; T = 37°C. L'erreur est estimée à $\pm 1.6\%$. Les pourcentages pour le système avant précipitation sont donnés à titre indicatif.

Contrairement aux spectres obtenus dans le cas des bicelles isotropes, deux raies de résonances, relatives au DMPC et au DCPC, sont observées sur le spectre ^{31}P du surnageant (**figure V.5B**). Les proportions de chaque lipide ont été déterminées sur ce spectre à partir des aires des pics relatifs à ceux-ci, -0.56 ppm dans le cas du DMPC et -0.69 ppm dans le cas du DCPC. Les résultats sont présentés dans le **tableau V.2**.

	Précipité	Surnageant	Bicelles isotropes
DMPC	40.7	23	33.3
DCPC	59.3	77	66.7

Tableau V.2 : Pourcentages de DMPC et de DCPC dans le surnageant et dans le précipité issus d'une addition de catéchine sur des bicelles isotropes DMPC/DCPC. $q = 0.5$. Rapport molaire T/L = 1. [L] = 30mM. T = 37°C. Les pourcentages de DMPC et de DCPC dans le cas des bicelles isotropes seules sont donnés à titre indicatif.

L'ensemble des résultats obtenus nous permet de tirer plusieurs informations pour le système tannin/lipide pour un rapport T/L de 1. Tout d'abord, le précipité est composé à la fois de tannin et de lipide, ces deux composés étant majoritairement présents dans le précipité après ajout du tannin. Par ailleurs, le DCPC est le lipide le plus largement représenté dans la phase aqueuse. Par conséquent, l'ajout d'une forte quantité de tannin provoque une précipitation avec ségrégation des lipides entre la phase liquide et le précipité.

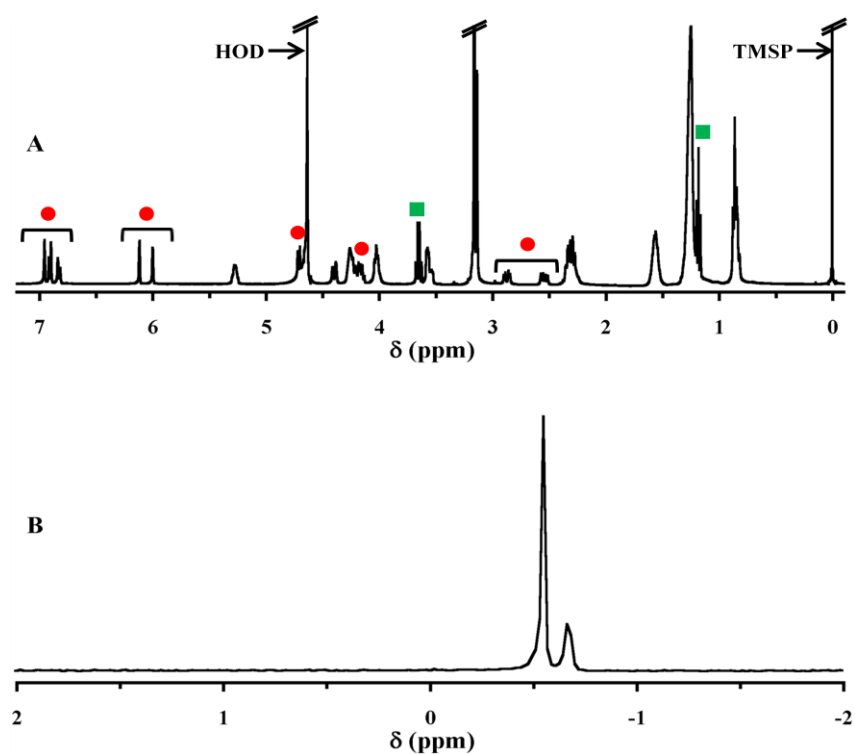


Figure V.5 : (A) Spectre RMN du proton du surnageant résultant de la précipitation du système catéchine/bicelles isotropes dans de l'eau deutérée ($\delta = 4.63\text{ppm}$) pour un rapport T/L de 1. $[\text{L}] = 50\text{mM}$. $T = 37^\circ\text{C}$. Les résonances du tannin sont indiquées par \bullet . L'échantillon présente des traces d'éthanol dues au lavage identifiées par \blacksquare . Nombre d'acquisitions : 16. (B) Spectre RMN du phosphore du même surnageant. Nombre d'acquisitions : 128. Les conditions expérimentales restent identiques.

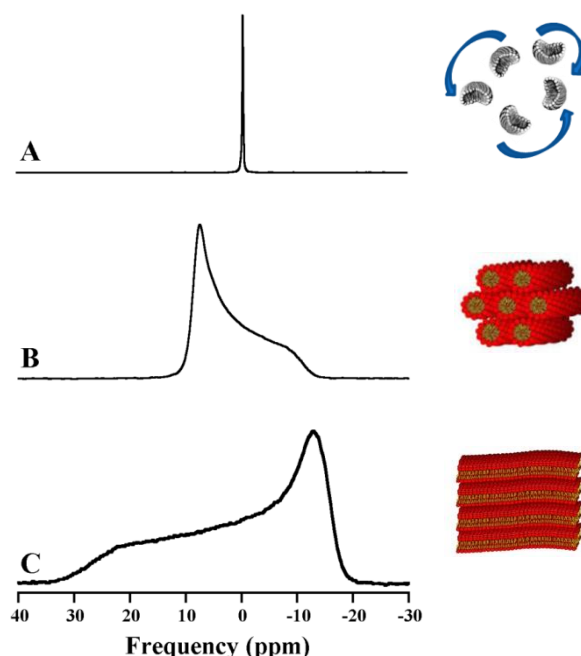


Figure V.6 : (A) Spectre RMN du phosphore des bicelles isotropes seules. $[\text{L}] = 60\text{mM}$. $T = 37^\circ\text{C}$. Les lipides sont hydratés en large excès d'eau deutérée (97%). Nombre d'acquisitions : 128. (B) Spectre RMN du phosphore du précipité C/Bicelles (1/1.2). $[\text{L}] = [\text{T}] = 60\text{mM}$. $T = 37^\circ\text{C}$. Nombre d'acquisitions : 2k. (C) Spectre RMN de vésicules multilamellaires de DMPC fournies à titre de comparaison. $[\text{L}] = 60\text{mM}$. $T = 37^\circ\text{C}$. Nombre d'acquisitions : 2k. Les spectres sont référencés par rapport à H_3PO_4 , 85%.

V.A.2.b Caractérisation du précipité

Suite à la mise en évidence du précipité, la nature de la phase lipidique composant le précipité a été caractérisée par RMN du phosphore et du deutérium ainsi que par diffusion des rayons X.

RMN du phosphore

Le spectre ^{31}P du précipité obtenu après addition de catéchine pour un rapport molaire T/L de 1/1.2 est représenté sur la **figure V.6B**. Contrairement au cas des bicelles isotropes seules (**figure V.6A**), celui-ci présente une dépendance angulaire se traduisant par un élargissement du signal. L'allure obtenue est celle d'un spectre de poudre à symétrie axiale présentant des contributions vers les champs faibles pour σ_{\perp} et vers les champs forts pour σ_{\parallel} . Par comparaison avec le spectre d'une phase lamellaire de MLV de DMPC (**figure V.6C**), le profil du spectre est inversé et l'anisotropie de déplacement chimique (aussi appelée anisotropie de blindage électronique ou CSA) est en valeur absolue 2.5 fois plus petite, $-17 \pm 1\text{ppm}$ vs. $42 \pm 1\text{ppm}$. Ces deux caractéristiques sont typiquement observées dans le cas d'une phase hexagonale. Par conséquent, le spectre du précipité C/Bicelles (1/1.2) pourrait être attribué à une telle phase. La diminution de la largeur du spectre peut être expliquée par un mouvement de diffusion latérale des lipides autour de l'axe du cylindre formé dans la phase hexagonale, mouvement qui n'existe pas dans le cas d'une phase lamellaire. Par ailleurs, on peut remarquer par comparaison au spectre de la **figure V.4C** obtenu pour la totalité de l'échantillon (phase liquide + précipité), que la contribution isotrope a disparu. Cela signifie qu'une partie de l'échantillon isotrope est restée dans la phase liquide et n'a pas précipité sous l'effet de l'ajout de tannin.

La RMN du phosphore, ne sondant que les têtes polaires (où se trouve l'atome de P), ne permet pas de trancher sur le type de phase hexagonale, H_I ou H_{II} (**annexe 6**). En effet dans les deux cas, les têtes polaires sont ordonnées selon une maille hexagonale. Les phases H_I et H_{II} donnent donc un spectre identique en RMN du phosphore. De manière à pouvoir trancher, le précipité C/Bicelles (1/1.2) a été étudié en RMN du deutérium ^2H qui va permettre de sonder les chaînes acyles des lipides.

RMN du deutérium

Le spectre RMN ^2H relatif au précipité obtenu avec du DMPC- $^2\text{H}_{27}$ et le profil d'ordre de la chaîne acyle deutérée sont présentés sur les **figure V.7A et V.7B**. Les éclatements quadrupolaires n'étant pas visibles sur le spectre, le profil d'ordre a été obtenu par simulation du spectre deutérium. Les paramètres de la simulation sont présentés en annexe (**annexe 4**). Il est à noter que comme pour les spectres RMN ^{31}P , le mouvement de diffusion latérale du lipide autour de l'axe du cylindre entraîne une diminution d'un facteur 2 des éclatements quadrupolaires relatifs à une phase hexagonale. Il faut donc en tenir compte dans le calcul des S_{CD} . Les paramètres d'ordre ne sont plus calculés à partir de l'équation II.46 vraie pour une phase lamellaire mais à partir de l'équation suivante :

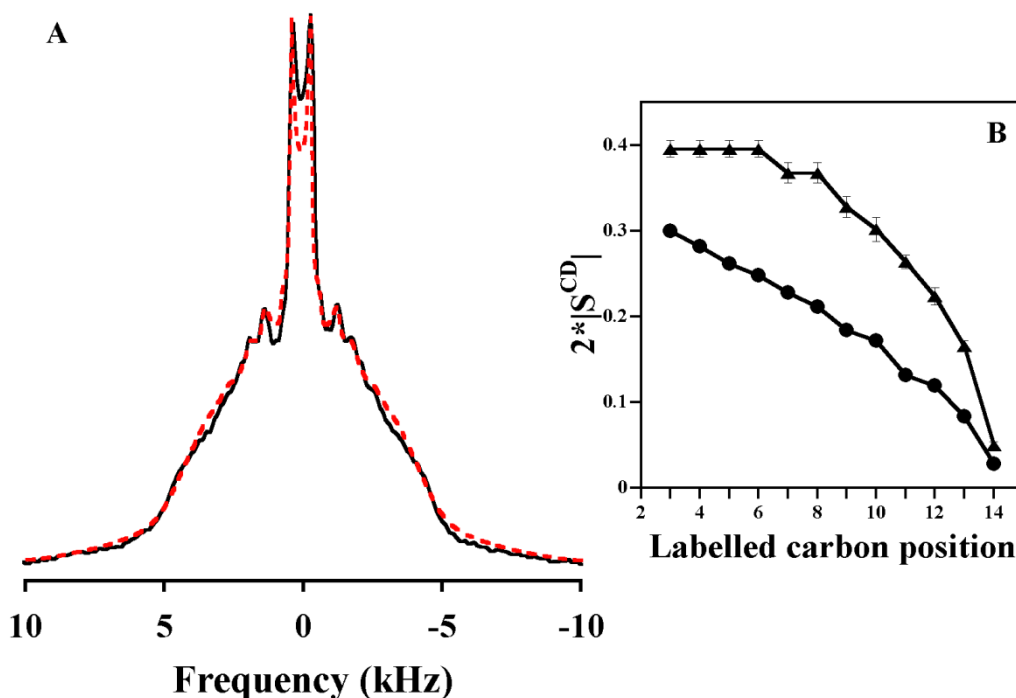


Figure V.7 : (A) Spectre RMN du deutérium (en noir) du précipité C/Bicelles (1/1.2) deutéré à 25% avec du DMPC-d₂₇. [L] = 60mM, T = 37°C. Nombre d’acquisitions : 67k. Le centre du spectre est arbitrairement positionné à 0 Hz. Le spectre simulé est représenté en pointillé rouge. (B) Profil d’ordre des paramètres d’ordre locaux S_{CD} en fonction de la position du carbone portant la liaison C-D sur la chaîne sn-2 du DMPC-d₂₇. Précipité C/Bicelles (1/1.2) (●), vésicules multilamellaires de DMPC-d₂₇ (▲). Les données sont issues respectivement de la simulation présentée figure A et de spectre « de-Pake-ing ». T = 37°C. L’erreur estimée est de ±0.5-2.5 %.

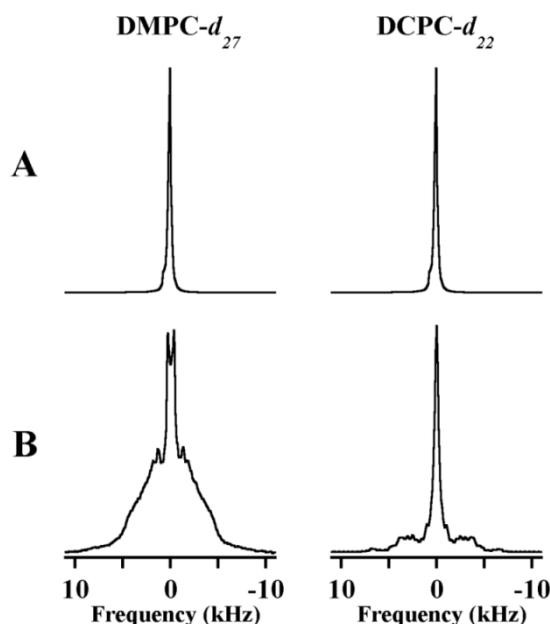


Figure V.8 : Spectres RMN du deutérium (intensité relative) des systèmes DMPC-d₂₇/DCPC et DMPC/DCPC-d₂₂. (A) Bicelles isotropes seules (DMPC-d₂₇ 100% ; DCPC-d₂₂ 100%) ; (B) Précipités C/Bicelles (1/1.2) (DMPC-d₂₇ 25% ; DCPC-d₂₂ 20%). [L] = 60mM ; [T] = 50mM. T = 37°C. Nombre d’acquisitions : 12k pour les bicelles seules, 67-100k pour les précipités. Les centres des spectres sont arbitrairement positionnés à 0Hz.

$$S_{CD} = \frac{4\Delta\nu_Q(0)}{3A_Q} \quad (\text{V.1})$$

Contrairement aux cas observés pour des phases lamellaires (**figure III.1**) et hexagonale de type I (**annexe 6**), l'allure du spectre ^2H est de forme triangulaire et le profil d'ordre présente une décroissance linéaire le long de la chaîne acyle. Ces deux caractéristiques, bien étudiées dans la littérature sont spécifique à une phase hexagonale H_{II} (Thurmond et al., 1993).

Le spectre ^2H du précipité obtenu en utilisant du DCPC- $^2\text{H}_{22}$ a également été réalisé (**figure V.8B**). Dans ce cas, on obtient un spectre de poudre d'une phase solide qui coexiste avec le spectre d'une phase isotrope de contribution plus importante. Ce résultat indique : (i) la présence de DCPC dans le précipité ; (ii) la présence de micelles de DCPC en quantité importante dans l'eau résiduelle imbibant le précipité (non séché). Du fait de la FID tronquée lors de l'acquisition, le signal relatif à la phase solide est ici faiblement résolu et ne permet pas de discuter sur la nature de cette phase. Toutefois, la faible largeur spectrale, de l'ordre de celle obtenue sur cet échantillon en deutérant le DMPC laisse supposer aussi une phase hexagonale.

Diffusion des rayons X

Afin de conforter les résultats obtenus en RMN sur la caractérisation structurale du précipité, celui-ci a été analysé par diffusion des rayons X aux petits angles. Ce travail a été effectué en collaboration avec le Pr. Frédéric Nallet du CRPP (Centre de Recherche Paul Pascal, Pessac). Un cliché de diffusion à deux dimensions a été obtenu, montrant un cercle de diffusion intense relatif au pic de Bragg principal et un deuxième cercle de diffusion peu intense relatif à une raie secondaire (**figure V.9A**). L'obtention de cette raie secondaire nous a permis de déterminer la nature de la phase lipidique.

Après intégration du signal (intégration circulaire), le profil d'intensité représentant l'intensité diffusée I en fonction du vecteur d'onde de diffusion q , a été obtenu (**figure V.9B**). Trois pics de Bragg sont visibles sur ce profil à $q_0 = 1.50\text{nm}^{-1}$, $q_1 = 2.59\text{nm}^{-1} = \sqrt{3} q_0$ et $q_2 = 3.97\text{nm}^{-1} = \sqrt{7} q_0$ (ce dernier pic trop peu intense n'est pas visible sur le cliché 2D). Les facteurs de structure $\sqrt{3}$ et $\sqrt{7}$ sont caractéristiques d'une phase hexagonale (Kulkarni et al., 2011). Les résultats obtenus en diffusion des rayons confirment la nature hexagonale de la phase lipidique du précipité démontrée par RMN.

Par ailleurs, l'obtention du vecteur d'onde de diffusion q_0 , nous a permis de calculer, à l'aide des équations II.49 et II.52, la distance de répétition, a , de la structure étudiée. Celle-ci a été trouvée égale à 48.6\AA . Dans le cas d'une phase hexagonale, la distance de répétition, a , correspond à la distance entre les centres de deux tubes adjacents composant la phase hexagonale (**figure V.9C**). De ce fait, connaissant l'épaisseur de la bicouche, le diamètre de la couche aqueuse, d_w , peut être déterminé à partir de la relation suivante :

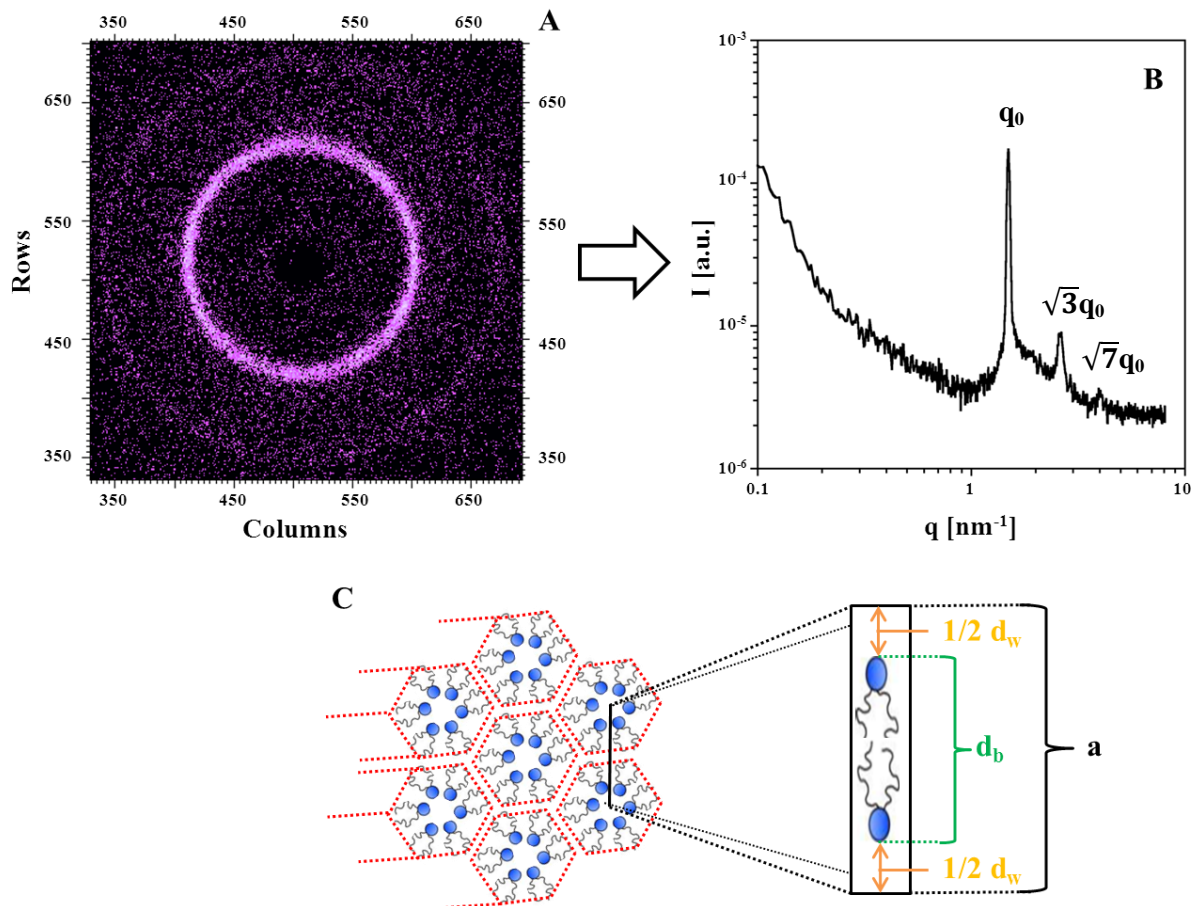


Figure V.9 : (A) Cliché 2D de diffusion de rayons X aux petits angles du précipité C/Bicelle (1/1.2). $[L] = 60\text{mM}$. (B) Profil d'intensité en fonction du vecteur d'onde de diffusion q de ce même système obtenu après une intégration circulaire. (C) Schéma représentant le motif de répétition dans le cas d'une phase hexagonale.

$$d_w = a - d_b \quad (\text{V.2})$$

Au vu des pourcentages respectifs de DMPC et de DCPC dans le précipité (40.7% et 59.3%), nous avons considéré que l'épaisseur de la bicouche lipidique dans le précipité était celle d'une bicouche de DMPC, lipide présentant la chaîne grasse la plus longue, soit $36 \pm 2 \text{ \AA}$ (Lewis & Engelman., 1983 ; Cevc, 1993 ; Kucerka et al., 2011). Ainsi, le diamètre de la couche aqueuse est estimé à $12.6 \pm 2 \text{ \AA}$.

V.A.3 Influence du tannin, cas de l'EC et de l'EGCG

L'ajout d'une forte concentration de tannin sur le modèle des bicelles isotropes a aussi été étudié avec l'EC et l'EGCG afin de savoir si la nature du tannin a une influence sur la formation et l'organisation du précipité.

Dans le cas de l'EC, aucune précipitation n'a été constatée. Cette singularité par rapport au cas de la catéchine peut s'expliquer par la très faible solubilité observée de l'EC dans le D_2O . Par conséquent, le rapport 1/1.2 n'est jamais atteint en solution et donc le seuil de précipitation non plus. Dans le cas de l'EGCG, un précipité a été mis en évidence lors de l'ajout croissant de tannin. Le spectre phosphore du système EGCG/bicelles isotropes pour un rapport T/L de 1/1 (**figure V.10**) montre la coexistence d'un spectre de poudre et d'une phase isotrope comme c'était le cas avec la catéchine. De la même manière, la phase liquide et le précipité ont été séparés par centrifugation et analysés respectivement en RMN du liquide et du solide. Il a été constaté que le surnageant présentait un aspect plus trouble que dans le cas de la catéchine. Cette turbidité due à la présence d'objets plus gros dans le milieu a conduit à un spectre proton de la phase liquide de faible résolution rendant impossible la détermination des proportions de tannin et de lipides. Pour contourner ce problème, de l'acétone deutérée (50% volumique) a été ajoutée à la solution pour casser les agrégats colloïdaux et ainsi diminuer leur taille. Un spectre de meilleure résolution a alors pu être obtenu et exploité. Les pourcentages d'EGCG présent dans la phase liquide et solide ont été déterminés à partir de ce spectre et sont présentés dans le **tableau V.3**.

	C	C/L	EGCG	EGCG/L
Surnageant	29	1/1.44	40	1/0.75
Précipité	71	1/0.82	60	1/1.14
Système avant précipitation	50	1	50	1

Tableau V.3 : Rapport molaire T/L et pourcentages de C et d'EGCG dans le surnageant et dans le précipité issus d'une addition de tannin sur des bicelles isotropes de DMPC/DCPC pour un rapport molaire T/L de 1/1. [L] = 30mM pour C, 50mM pour EGCG; T = 37°C. L'erreur est estimée à $\pm 1.5\%$ pour le système C/MLV et $\pm 3\%$ pour le système EGCG/MLV. Les valeurs pour le système avant précipitation sont données à titre indicatif.

La phase solide a été quant à elle analysée par RMN 2H et ^{31}P (**figure V.11C**). Le spectre ^{31}P du système EGCG/Bicelles présente une allure et une largeur spectrale proche de celles observées

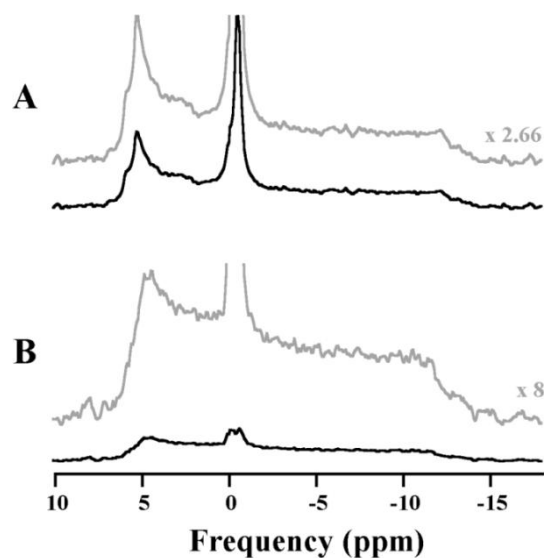


Figure V.10 : Spectres RMN du phosphore (intensité absolue) du précipité pour le système tannin/bicelles isotropes (1/1). (A) C/Bicelles, (B) EGCG/Bicelles. [L] = 50mM. T = 37°C. Taux d'hydratation 97%

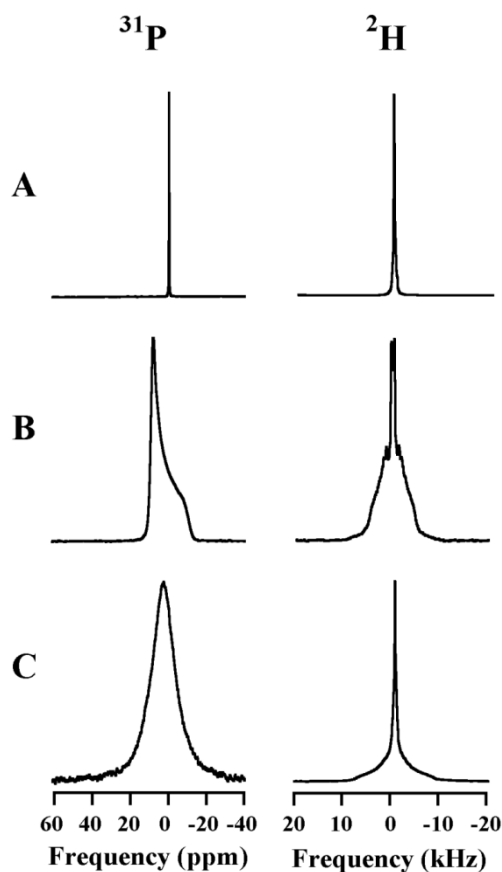


Figure V.11 : Spectres RMN du deutérium et du phosphore de différents systèmes lipidiques de DMPC-d₂₇. (A) Bicelles isotropes seules, (B) C/Bicelles (1/1.2), (C) EGCG/Bicelles (1/0.7). [L]_{bicelles} = [L]_{MLV} = 60mM. T = 37°C. Le pourcentage de DMPC deutéré est de 25% dans le cas de C/Bicelles et de 20% dans le cas d'EGCG/Bicelles. Nombre d'acquisitions en phosphore: 128 dans le cas des bicelles seules, 2k dans les deux autres cas. Nombre d'acquisitions en deutérium : 12k pour les bicelles seules, 26k pour EGCG/Bicelles et 64k pour C/Bicelles. Les spectres du phosphore sont référencés par rapport à H₃PO₄. Pour les spectres du deutérium, le centre des spectres est arbitrairement positionné à 0 Hz.

dans le cas du système C/Bicelles (**figure V.11B**) étudié précédemment. En outre, le spectre deutérium de ce système présente une contribution isotrope importante. Ainsi, ces résultats suggèrent une coexistence entre une phase isotrope et une phase hexagonale pour cet échantillon. Ce résultat laisse donc supposer que, comme pour la catéchine, l'EGCG déstabilise et réorganise une partie des bicelles isotropes. Toutefois, cet effet semble moins intense que dans le cas du système C/Bicelles, la réorganisation du modèle lipidique n'étant ici pas totale. Malheureusement, le profil d'ordre relatif au précipité obtenu pour le système EGCG/Bicelles n'a pu être obtenu ni par simulation, ni par « de-Pake-ing » du fait de la résolution trop faible du spectre RMN ^2H .

V.A.4 Influence du modèle lipidique, effet de la catéchine sur des vésicules multilamellaires

Afin de voir l'influence du modèle lipidique sur le comportement des tannins, une expérience similaire a été réalisée en ajoutant de la catéchine sur des vésicules multilamellaires de DMPC pour un même rapport molaire T/L de 1/1.2. Dans ce cas, l'apparition d'un précipité a été à nouveau observée (photo, **figure V.12B**). L'étude de la phase liquide et solide (obtenues après centrifugation) a également été réalisée en RMN du proton et en RMN du phosphore et du deutérium.

Le spectre phosphore du précipité C/MLV (**figure V.12B**) est caractéristique d'un spectre de poudre à symétrie axiale typique d'une phase lamellaire fluide L_α avec une valeur de CSA de 36 ± 1 ppm légèrement inférieure à celle trouvée pour la phase lamellaire des MLV de DMPC seules (42 ± 1 ppm). La nature lamellaire de la phase lipidique du précipité C/MLV (1/1.2) est confortée par le spectre obtenu en RMN du deutérium (**figure V.12B**). En effet, celui-ci est également un spectre de poudre à symétrie axiale relatif à une phase lamellaire L_α avec des éclatements quadrupolaires bien résolus. Dans ces conditions, il a été possible de simuler le spectre (**figure V.13A**) et d'établir le profil des paramètres d'ordre S_{CD} (**figure V.13B**) correspondant. Les paramètres de la simulation sont présentés dans l'**annexe 4**. Le profil d'ordre du précipité a une allure comparable à celle d'une phase lamellaire avec néanmoins des valeurs inférieures sauf pour le méthyl terminal de la chaîne acyle et le méthyl adjacent, positionnés au centre de la bicouche. L'ensemble de ces résultats montre que le précipité obtenu dans le cas du système C/MLV est une phase lamellaire moins ordonnée que dans le cas des MLV seules.

V.A.5 Influence de la phase du lipide, cas du DPoPE

Il a été montré dans la partie précédente que l'addition d'une forte concentration de catéchine sur des bicelles isotropes engendre la précipitation du système et la formation d'une phase hexagonale H_{II} . Ainsi, il nous a semblé intéressant d'étudier l'effet de ce tannin sur le polymorphisme lipidique d'un lipide dont la structure spatiale favorise la formation d'une phase hexagonale de type II comme

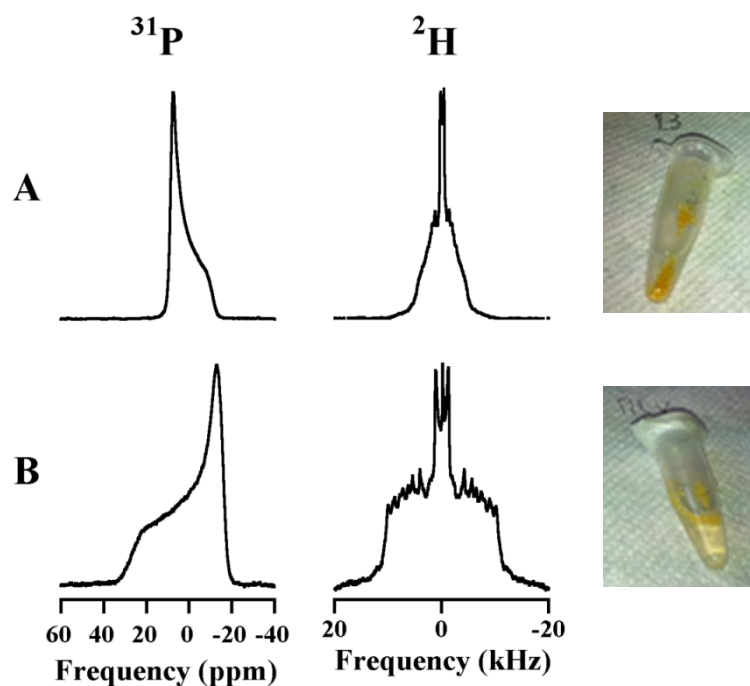


Figure V.12 : (A) Spectres RMN du deutérium et du phosphore (intensité relative) du précipité C/Bicelles isotropes (1/1.2). [L] = 60mM, T = 37°C. Le DMPC est deutéré à 25%. Nombre d’acquisitions : 67k pour le deutérium, 2k pour le phosphore. (B) Spectres RMN du deutérium et du phosphore (intensité relative) du précipité C/MLV (1/1.2). [L] = 60mM. T = 37°C. Le DMPC est deutéré à 20%. Nombre d’acquisitions : 12k pour le deutérium, 2k pour le phosphore. L’aspect visuel de chaque échantillon est présenté sur la droite. Les centres des spectres sont arbitrairement positionnés à 0Hz.

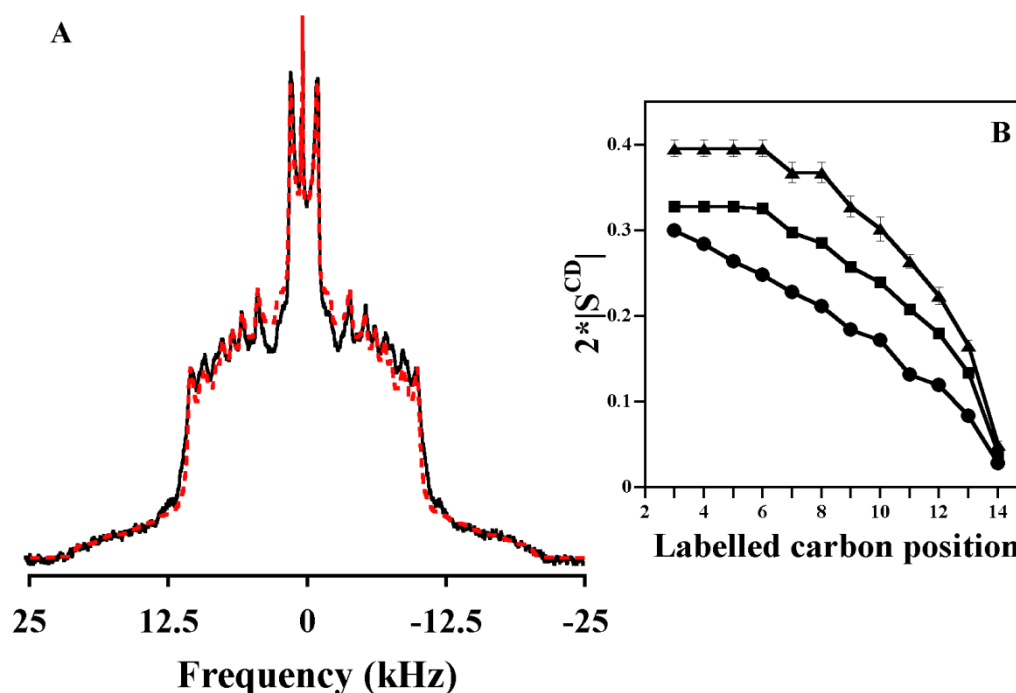


Figure V.13 : (A) Spectre RMN du deutérium (en noir) du précipité C/MLV deutérées à 20% par du DMPC-d₂₇ (1/1.2). [L] = 60mM. T = 37°C. Nombre d’acquisitions : 12k. Le centre du spectre est arbitrairement positionné à 0Hz. Le spectre simulé est représenté en pointillés rouge. (B) Profil d’ordre représentant les paramètres d’ordre locaux S_{CD} en fonction de la position du carbone de la liaison C-D sur la chaîne sn-2 du DMPC-d₂₇ dans le cas du précipité C/Bicelles (●), du précipité C/MLV (■) et de MLV de DMPC-d₂₇ (▲). Les données sont issues de simulations pour les systèmes C/Bicelles et C/MLV et de spectre « de-Pake-ing » pour le système MLV seules. T = 37°C. L’erreur estimée est de ±0.5-2.5%.

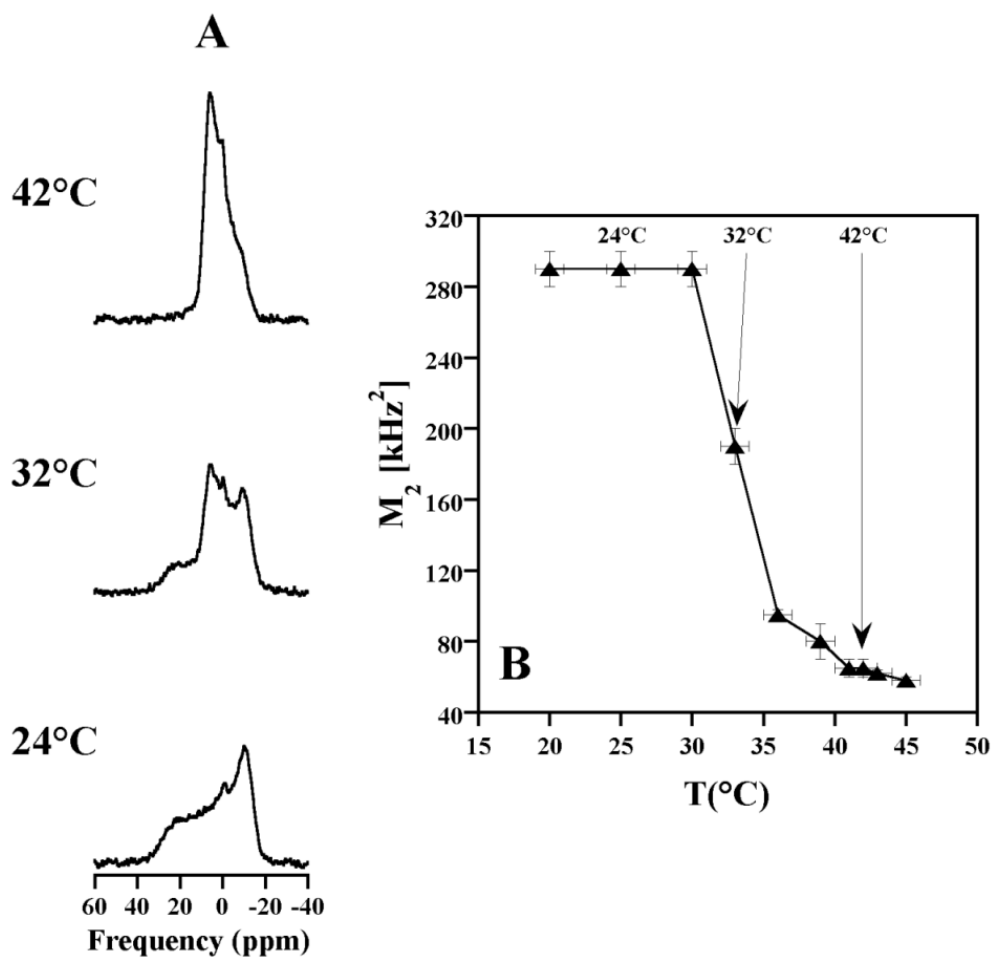


Figure V.14 : (A) Spectres RMN du phosphore du DPoPE à trois températures, 24, 32 et 42°C. [L] = 196mM. Les lipides sont hydratés en large excès d'eau deutérée (88%). Nombres d'acquisitions : 1k. Les spectres sont référencés par rapport à H₃PO₄. (B) Moments spectraux M₂ issus des spectres de la figure A en fonction de la température (▲). L'erreur est estimée à ± 1.5°C pour les températures et à ± 3.5% les moments.

c'est le cas des phosphatidyléthanolamines insaturés (Isrealachvili et al. 1980). L'étude a donc été menée avec du DPOPE (C16:1 ; C16:1).

V.A.5.a Etude de la transition de phase T_h du DPOPE par RMN du phosphore

La **figure V.14A** présente les spectres phosphore du DPOPE obtenus à trois températures, 24, 32 et 42°C. A 24°C, l'allure du spectre est celui d'un spectre de poudre à symétrie axiale typiquement observé dans le cas d'une phase lamellaire fluide L_α . A 42°C, le spectre est inversé et plus étroit. Ce spectre est donc caractéristique d'une phase hexagonale de type H_{II} avec un CSA (-16 ppm) environ deux fois plus petit que celui relatif au spectre de la phase lamellaire à 24°C (36 ppm). Le spectre obtenu à 32°C est un mélange entre ceux obtenus à 24 et 42°C suggérant ainsi une coexistence entre les phases L_α et H_{II} à cette température.

La température de transition de phase lamellaire/hexagonale T_h est, comme dans le cas d'une température de transition de phase gel/fluide T_m , déterminé au point d'inflexion de la courbe représentant les moments spectraux M_2 en fonction de la température (**figure V.14B**). Celle-ci est estimée à $33 \pm 1^\circ\text{C}$. Dans le cas de température inférieure à la T_h , les valeurs de M_2 obtenues sont élevées alors que pour des températures supérieures à la T_h , les valeurs de M_2 sont beaucoup plus faibles. La différence notable entre les valeurs de M_2 pour des températures inférieures ($290 \pm 10 \text{ MHz}^2$) et supérieures ($80\text{-}60 \text{ MHz}^2$) s'explique par le mouvement supplémentaire de rotation autour de l'axe du cylindre auquel sont soumis les lipides en phase H_{II} par rapport au cas d'une phase L_α .

V.A.5.b Effet de la catéchine sur le thermotropisme du DPOPE

Les systèmes mixtes catéchine/DPOPE à deux rapports molaires tannin/lipide différents, 1/3.3 et 1/33 ont été étudiés par RMN ^{31}P et comparées aux résultats obtenus sur le système lipidique sans catéchine. Pour les deux rapports étudiés la concentration en lipide restant inchangée, par rapport au cas du DPOPE seul vu précédemment (196mM), la catéchine se trouve respectivement sous forme monomérique ($[T] = 6\text{mM} < \text{CMC}$) et micellaire ($[T] = 60 \text{ mM} > \text{CMC}$).

Les spectres phosphores du DPOPE seul et en présence de catéchine sont présentés sur la **figure V.15**. Par comparaison au système sans tannin, on remarque, dans le cas du système C/DPOPE à un rapport T/L de 1/3.3, que, quelque soit la température, tous les spectres ^{31}P obtenus sont ceux d'une phase lamellaire fluide L_α (**figure V.15B**). C'est également le cas des spectres obtenus à 24 et 32°C pour le système C/DPOPE à un rapport T/L de 1/33 (**figure V.15C**). En revanche, à 36 et 42°C, les spectres se déforment et perdent en résolution. Cet effet, observé à 32°C dans le cas du DPOPE seul, suggère que le système entre dans le domaine de la transition lamellaire/hexagonale.

L'étude des moments spectraux M_2 en fonction de la température a été réalisée à des températures entre 20 et 45°C (**figure V.16**). A un rapport T/L de 1/1.33, les valeurs de M_2 varient peu

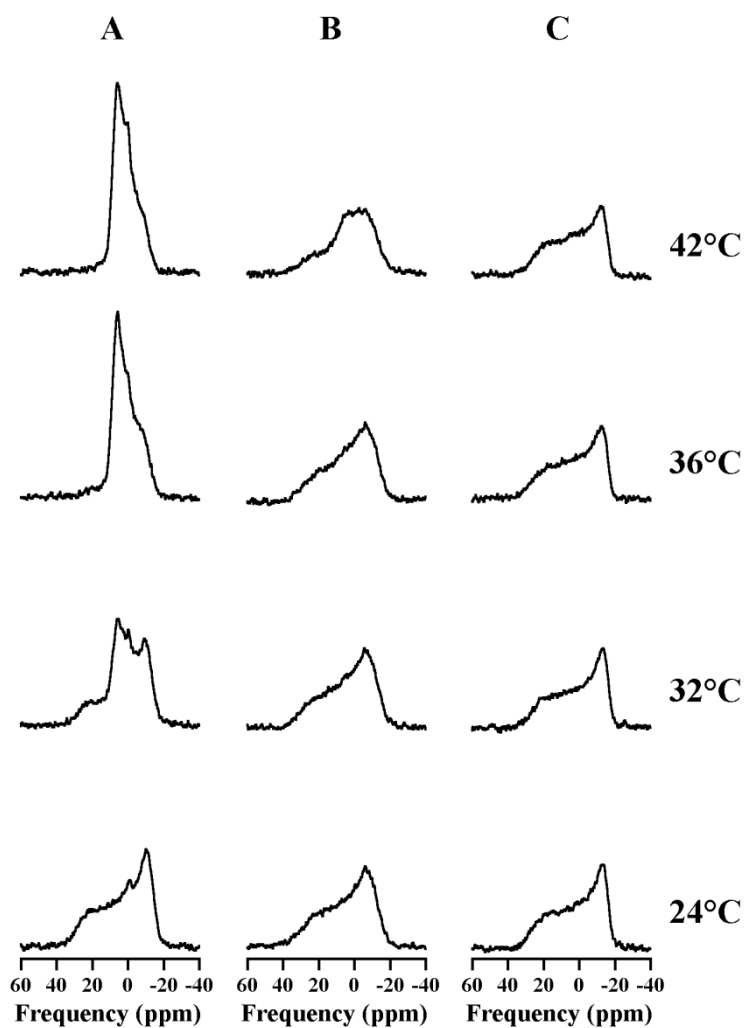


Figure V.15 : Spectres RMN du phosphore de DPOPE en absence et en présence de catéchine avant et après la température de transition de phase lamellaire-hexagonale T_h du lipide, 33°C. (A) DPOPE seul. (B) C/DPOPE (1/33) avec [C] = 6mM. (C) C/DPOPE (1/3.3) avec [C] = 60mM. [L] = 196mM. Nombre d'acquisitions : 1k.

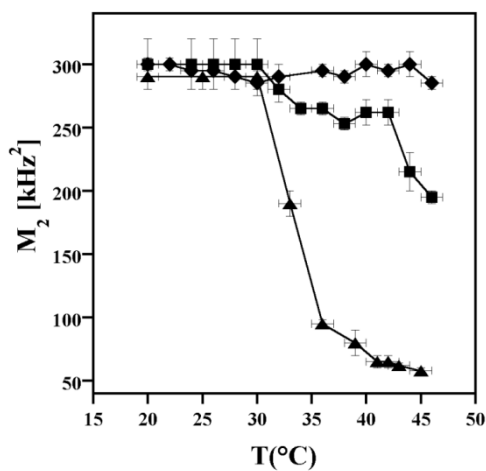


Figure V.16 : Moments spectraux M_2 calculés à partir des spectres du phosphore en fonction de la température pour les systèmes DPOPE seul (▲), C/DPOPE (1/33) avec [C] = 6mM (■) et C/DPOPE (1/3.3) avec [C] = 60mM (◆). L'erreur est estimée à $\pm 1.5^\circ\text{C}$ pour les températures et à $\pm 2-6.5\%$ pour les moments M_2 .

et fluctuent entre 300 et 280 MHz². Pour le système C/MLV à un rapport T/L de 1/33, on observe une diminution des valeurs de M₂ beaucoup moins prononcée que dans le cas du lipide seul. Deux allures semblent se dessiner sur le profil, une première diminution progressive jusqu'à 42°C correspondant à une diminution des moments spectraux d'environ 50 MHz², suivie d'une brusque décroissance au delà. Ce résultat suggère que la transition de phase lamellaire/hexagonale dans le cas du système C/DPoPE à un rapport tannin/lipide de 1/33 va avoir lieu à une température supérieure à 46°C et qu'il pourrait exister une pré-transition entre 32 et 42°C. En revanche, aucune transition n'a été observée dans le cas du système C/DPoPE à un rapport T/L de 1/3.3 dans la gamme de température étudiée. Ces résultats suggèrent donc que la catéchine va stabiliser la phase lamellaire aux dépens de la phase hexagonale de façon dose-dépendante.

V.A.6 Discussion

L'étude de l'effet d'un ajout de catéchine sur les bicelles isotropes DMPC/DCPC a pu mettre en évidence que sous forme micellaire, l'addition de catéchine sur ce système induit sa précipitation au-delà d'un rapport molaire tannin/lipide seuil de 1/1.6. Cette précipitation entraîne un changement au niveau de la phase lipidique avec l'émergence d'une nouvelle phase, hexagonale de type II qui a été caractérisée par RMN ²H et ³¹P et par SAXS. Ce phénomène de précipitation est aussi observé avec un autre tannin, l'EGCG, ainsi qu'avec un autre modèle lipidique, les MLV. Néanmoins, dans ce dernier cas, il a été montré que la précipitation n'affectait pas la phase du système, la phase lamellaire fluide étant conservée. Enfin, l'effet de la catéchine sur des dispersions de DPoPE présentant une transition de phase lamellaire/hexagonale a été étudiée. Il a été établi que le tannin retardait l'apparition de la phase hexagonale du lipide et que cet effet était dose-dépendant. L'ensemble de ces résultats sont discutés dans cette partie, en les reliant à la littérature et en essayant de les replacer dans le contexte de la dégustation du vin.

V.A.6.a Les tannins déstabilisent les bicelles isotropes et entraînent la formation d'une phase hexagonale de type II

Il a été montré que les deux modèles lipidiques utilisés, les bicelles isotropes et les MLV précipitaient par fort ajout de catéchine. Or, contrairement au cas des vésicules multilamellaires où la nature de la phase lipidique est conservée, la précipitation du système C/Bicelles isotropes engendre une nouvelle phase, hexagonale de type H_{II}. Le **tableau V.4** obtenu à l'aide des tableaux V.2 et V.3 présente les rapports molaires DMPC/DCPC/C calculés pour le précipité et la phase surnageante dans le cas du système C/Bicelle.

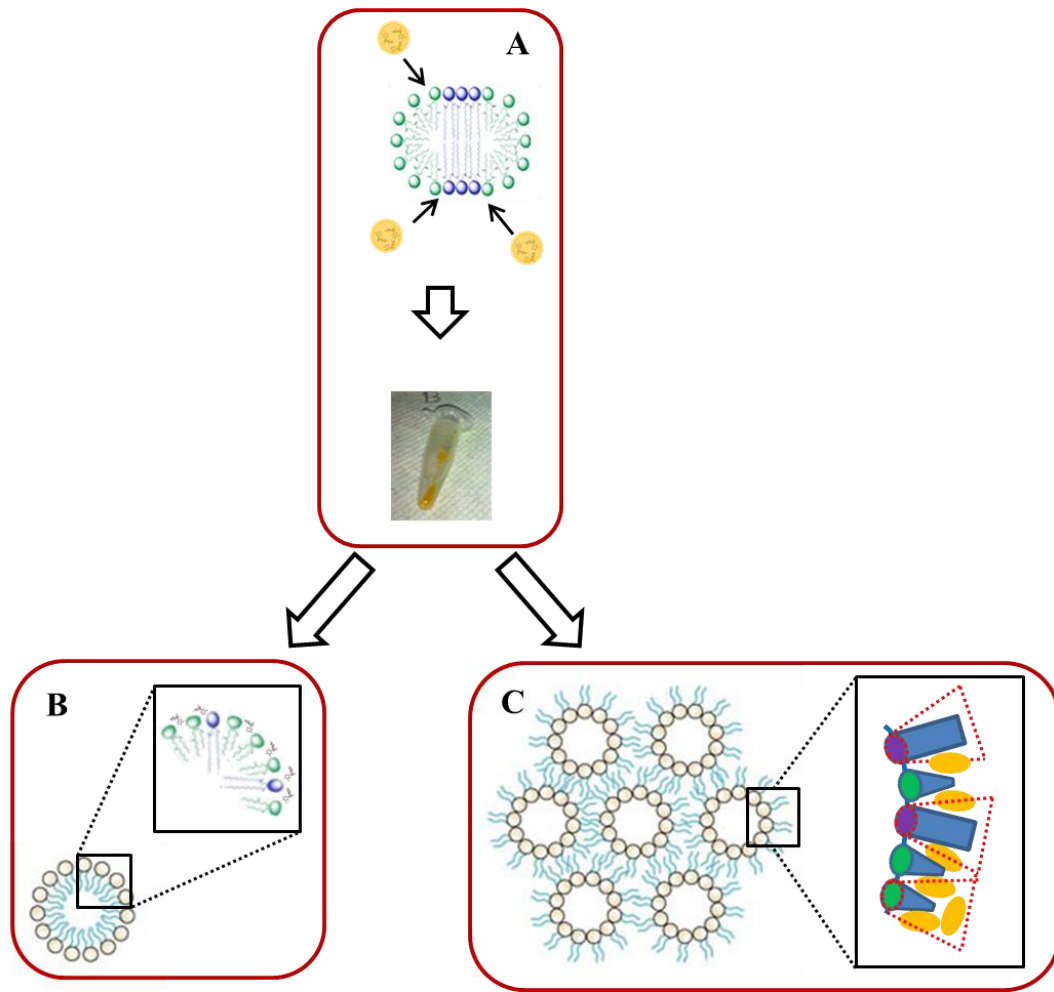


Figure V.17 : Modèle proposé de l'addition de micelle de tannin sur des bicelles isotropes entraînant l'apparition d'un précipité. L'interaction tannin-lipide engendre le départ du lipide à chaîne courte entraînant la précipitation du système (i). Tannins et lipides sont alors séparés en deux phases : une phase surnageant constitué de micelle dont le rapport molaire DMPC/DCPC/C est de 1/3.3/3.2 (ii) et un précipité adoptant une phase hexagonale inverse (iii). Le rapport molaire DMPC/DCPC/C de ce dernier est de 1/1.45/3.

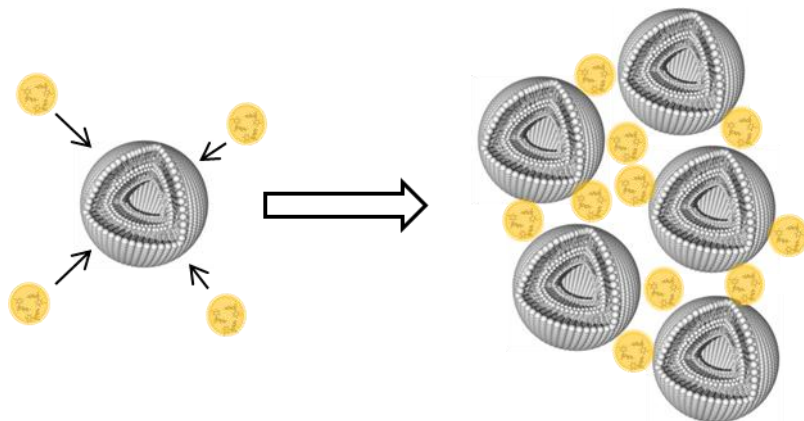


Figure V.18 : Schéma expliquant la sédimentation des MLV par interaction avec les micelles de tannins. Pour une $[T] > CMC$, les micelles de tannins interagissent avec plusieurs MLV et enclenchent la précipitation du système.

	DMPC	DCPC	C	n_{DMPC}	n_{DCPC}	n_C	T/L
Surnageant	1 (13%)	3.3 (44%)	3.2 (43%)	2.8	9.6	8.7	1/1.34
Précipité	1 (18.4%)	1.45 (26.6%)	3 (55%)	7.2	10.36	21.3	1/0.82
Avant précipitation	1 (17%)	2 (33%)	3 (50%)	10	20	30	1

Tableau V.4 : Fractions molaires (pourcentages molaires correspondant), nombres de moles (mM) de DMPC, de DCPC et de catéchine et rapports molaires tannin/lipide dans le surnageant et dans le précipité issus d'une addition de tannin sur des bicelles isotropes de DMPC/DCPC pour un rapport molaire T/L de 1. [L] = 30mM ; T = 37°C. Les valeurs pour le système avant précipitation sont données à titre indicatif.

La comparaison entre la fraction molaire DMPC/DCPC/C obtenue pour le précipité de 1/1.45/3 et celle du système avant précipitation de 1/2/3 permet d'envisager un modèle expliquant la formation d'un précipité accompagné de l'apparition d'un nouvel objet colloïdal. En effet, les pourcentages molaires de DMPC et de DCPC initialement de 33.3% et 66.7% dans les bicelles isotropes (*cf.* **tableau V.2**) évoluent et sont égaux dans le précipité à 40.8% et 59.2%. Ainsi, les micelles de tannins, en interagissant avec les bicelles isotropes entraînent une perte du petit lipide (qui se retrouve désormais majoritairement dans le surnageant) au profit du tannin qui devient le composé majoritaire du précipité. On peut donc supposer que l'enrichissement de la phase lipidique en tannin provoque la sédimentation du système (comme dans le cas des MLV) conduisant à la formation d'un précipité adoptant une morphologie hexagonale de type H_{II} . Cette dernière est à relier à une modification du paramètre de compactage p (Israelachvili, 1980) induite par la substitution du DCPC par du tannin qui entraîne une nouvelle répartition entre le volume de la partie polaire, a_0 , et celui de la partie hydrophobe dans le précipité, v (*cf.* I.C.3.a). En effet, lorsque l'on passe de bicelles isotropes à un système lipidique en phase H_{II} , le volume de la partie hydrophobe devient supérieur à celui de la partie polaire. Cette inversion suggère que le tannin vient grossir le volume hydrophobe des chaînes carbonées des lipides (DMPC et DCPC) et serait donc localisé pour ce système au niveau du cœur hydrophobe comme c'est proposé sur le modèle de la **figure V.17**.

Dans le cas des vésicules multilamellaires, le non changement de phase du précipité par ajout de catéchine peut s'expliquer par la courbure de ce système. En effet, dans le cas des bicelles isotropes, la courbure importante induit une élasticité faible, favorable à la déstructuration du modèle par l'ajout de tannin. Dans le cas des vésicules multilamellaires, la courbure est faible, le système lipidique présente alors une élasticité importante qui lui permet de s'adapter à des changements provoqués par l'interaction avec le tannin au niveau de sa surface empêchant ainsi sa déstructuration. Cette précipitation, laisse plutôt penser à une agrégation des MLV entre elles. L'expérience ayant été réalisée à une concentration en tannins supérieure à la CMC, on peut supposer que les micelles de tannins vont interagir en surface avec plusieurs vésicules ce qui va induire un rapprochement des MLV entre elles et provoquer leur sédimentation (**figure V.18**).

Il est par ailleurs intéressant de constater qu'outre la nature du modèle lipidique, la nature du tannin, et plus particulièrement la présence d'un groupement galloylé, influe sur la précipitation. En

effet, pour le cas d'un ajout d'une concentration en tannin supérieure à la CMC, une précipitation du complexe tannin-lipide est constatée dans tous les cas. A l'inverse, les études réalisées sur des MLV de DMPC dans le chapitre IV ont montré que lors d'un ajout d'une concentration en tannin inférieure à la CMC, les tannins galloylés (ECG, EGCG) entraînent la précipitation des vésicules multilamellaires (**figure IV.14C et IV.16C**) tandis que les tannins ne possédant pas de groupement galloylé (C et EC) n'induisent pas leur précipitation (**figure IV.14C**). Cette observation peut être reliée à l'effet de désordre plus important observé au niveau du cœur hydrophobe des MLV de DMPC pour EGCG comparé à celui obtenu pour C et EC (**cf. chapitre III.A.2, figure III.2B et III.4A**).

Il est à noter que les déstabilisations des modèles lipidiques observées notamment pour EGCG durant ce chapitre et lors du chapitre IV concordent avec les effets détergents décrits dans la littérature. En effet, des observations similaires furent constatées par Tamba et al. (2007) qui montrèrent par microscopie de fluorescence par contraste de phase qu'un ajout de 30 μM d'EGCG sur des GUV (Giant Unilamellar Vesicles) de phosphatidylcholines d'œuf entraîne un éclatement des vésicules lipidiques, une diminution de leur diamètre et la formation d'objets de petites tailles. Sun et al. (2009) constatèrent également un léger effet détergent pour une concentration en tannins ajoutés de 10 μM .

V.A.6.b Les tannins stabilisent la phase lamellaire des phosphoéthanolamines en induisant une augmentation de la température de transition de phase lamellaire/hexagonale

Les résultats obtenus avec le DPOPE montrent que la catéchine augmente la température de transition de phase lamellaire L_{α} /hexagonale H_{II} du lipide, pour des additions à des concentrations de 6 et 60mM. La phase lamellaire est ainsi favorisée aux dépens de la phase hexagonale. Une molécule est dite chaotrope lorsqu'elle déstabilise les structures de macromolécules dans l'eau telles que les protéines en interférant avec les interactions intramoléculaires faibles (liaison hydrogène, forces de Van der Waals, effet hydrophobe) et en augmentant l'aire à l'interface (Takahashi et al., 2000). A l'inverse, une substance est dite cosmotrope lorsqu'elle stabilise ces structures. Ces deux effets peuvent être transposés aux cas d'auto-assemblages lipidiques. Koynova et al. (1997) montrèrent dans le cas d'étude de calorimétrie sur des phosphoéthanolamines (DHPE, DSPE, DPPE) que les molécules présentant un effet chaotrope ou cosmotrope influent sur l'organisation des lipides. Des molécules cosmotropes, tel le saccharose, stabilisent la phase hexagonale en diminuant la température de transition de phase $L_{\alpha} \rightarrow H_{II}$. A l'inverse, les molécules dites chaotropes, tel le thiocyanate de sodium ou l'urée, vont favoriser la phase lamellaire fluide en augmentant la température de transition de phase lamellaire/hexagonale. Ce comportement suggère un effet chaotrope de la catéchine. Les travaux de Cray et al. (2013) ont permis d'établir une échelle de chaotropie qui met en évidence un effet

chaotrope important pour les alcools et plus particulièrement dans le cas des phénols. Il n'est donc pas surprenant de voir que la catéchine, en tant que polyphénol, possède le même effet.

De plus, la stabilisation de la phase lamellaire par addition de catéchine peut être reliée à la localisation du tannin au niveau des dispersions de DPOPE. En effet, d'après la théorie d'Israelachvili (Israelachvili., 1980), le paramètre de compactage des lipides, p , indicateur de la géométrie des lipides, influence la nature de la phase lipidique. Ce paramètre est donné par la relation suivante :

$$p = \frac{v}{a_0 l_c} \quad (\text{V.3})$$

où v , représente le volume de la partie hydrophobe, a_0 , le volume de la partie hydrophile et l_c , la longueur de la chaîne carbonée du lipide. Ainsi, dans le cas des PE, le volume de la partie hydrophobe étant supérieure à celui de la tête polaire, la phase hexagonale H_{II} est favorisée. Or en présence de catéchine, la phase lamellaire est stabilisée, ce qui suggère une localisation de la catéchine au niveau de la tête polaire des PE comme le montre la **figure V.19**. Dans ces conditions, la catéchine induit une augmentation du volume de la partie hydrophile ; le paramètre de compactage diminue. On est alors dans une géométrie favorable à la formation d'une phase lamellaire

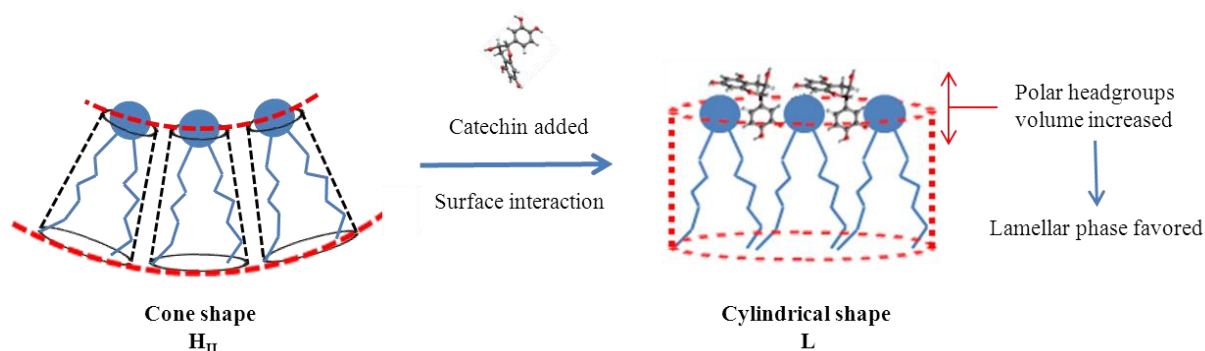


Figure V.19 : Modèle représentant la localisation du tannin sur des dispersions de DPOPE. La localisation du tannin au niveau de la tête polaire entraîne une augmentation du volume de la partie hydrophile en contact avec l'eau.

D'autre part, l'étude des M_2 calculés à partir des spectres phosphore montre une diminution des M_2 d'environ 50kHz^2 entre 32 et 42°C pour le système C/DPOPE à un rapport T/L de 1/33 qui pourrait être attribuée à une pré-transition. Celle-ci peut avoir deux origines : l'émergence d'une nouvelle phase ou la modification de la dynamique de la tête polaire due à l'augmentation de la température. Comme vu dans la littérature (Kirk et al. 1988 ; Erbes et al. 1994 ; Lindblom et al., 1989), une phase cubique peut apparaître sous certaines conditions d'hydratation et de température, lors de la transition entre la phase lamellaire fluide L_α et la phase hexagonale inverse H_{II} . Cependant, le spectre phosphore obtenu dans notre cas n'est pas celui d'une phase cubique dont le signal, présenté sur la **figure V.20**, est isotrope et large (5ppm), (Lindblom et al., 1989).

Par conséquent, la diminution des M_2 dans la zone de pré transition peut-être expliquée une augmentation de la mobilité de la tête polaire des lipides due à l'augmentation de la température.

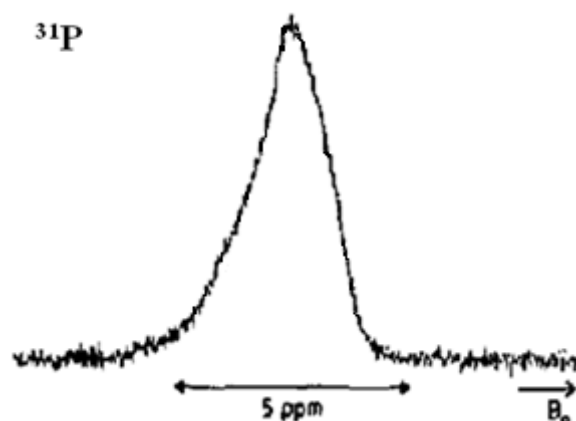


Figure V.20 : Exemple de Spectre RMN ^{31}P de phase cubique (cas d'un échantillon de PaLPC à 25°C). La figure est extraite des travaux de Lindblom et al. (1989).

V.A.6.c Implications possibles dans la dégustation d'un vin

Comme il a été dit précédemment, la sensation d'assèchement en bouche, aussi appelé astringence résulte d'interactions entre les tannins du vin et les protéines de la salive. Il a été vu, dans une étude récente, que, lors d'un ajout de tannin sous forme micellaire, il y a formation et précipitation d'un complexe tannin/protéines (Cala et al., 2010). Les protéines nécessaires à la lubrification du palais emprisonnées dans le complexe ne peuvent plus jouer leurs rôles d'où la sensation d'astringence. Les travaux présentés dans cette partie montrent qu'une précipitation est possible entre les tannins et les lipides colloïdaux des aliments. Cependant, bien que les bicelles isotropes reproduisent l'amphiphilie globale des gouttelettes lipidiques avec une surface hydrophile et un cœur hydrophobe, elles restent néanmoins un modèle grossier qu'il sera nécessaire d'améliorer pour conclure avec certitude que les tannins engendrent la précipitation des gouttelettes lipidiques lorsque vin et aliments sont consommés en même temps. Néanmoins, ce résultat met en évidence la forte interaction entre les tannins et notre modèle de gouttelettes lipidiques. Ainsi, lors de la dégustation d'un vin pendant le repas, les tannins peuvent interagir avec les protéines de la salive ($K_d = 12\text{mM}$, Cala et al., 2010), les lipides des membranes buccales ($K_d \sim 3.6\text{-}6.4\text{mM}$) (cf. chapitre IV) et les lipides des aliments. L'hypothèse d'une compétition entre ces trois interactions peut raisonnablement être envisagée. Ainsi, le fait de manger durant la dégustation d'un vin réduit la disponibilité des tannins pour les protéines salivaires et *in fine* module la sensation d'astringence.

V.B/ Effet de l'EGCG sur un modèle d'émulsion lipidique directe

Une limitation des bicelles isotropes en tant que modèle de gouttelettes du bol alimentaire réside dans la taille de ces objets lipidiques (quelques nanomètres). De plus, la faible stabilité des bicelles isotropes pour des concentrations en lipides inférieures à 130 mM (Glover et al., 2001) rend ce modèle inadéquat pour des études à faibles concentrations. Notre choix s'est porté dans un deuxième temps sur un autre modèle : les émulsions huile dans eau, dites directes dont la taille est plus représentative de ces gouttelettes et qui sont stables à de faibles concentrations. Celles-ci sont constituées d'un cœur hydrophobe composé par l'huile et d'un tensio-actif amphiphile qui en s'adsorbant à l'interface eau-huile va former une couche plus hydrophile en surface et ainsi stabiliser l'émulsion (Genot et al., 2010). Les émulsions furent préparées à partir d'huile de tournesol oléique stabilisées par un tensio-actif, le tween80 (ou polysorbate 80). Cette huile est actuellement très utilisée par l'industrie agro-alimentaire et est donc très répandue dans les aliments. En effet, l'huile de tournesol oléique est une huile de tournesol dont la composition en acide gras a été modifiée pour obtenir un taux d'acide oléique (C18 :1, n-9) proche de celle de l'huile d'olive. C'est donc une huile monoinsaturée aux effets neutres sur la santé mais donc le goût moins prononcé est plus apprécié des consommateurs. Celle utilisée est composée à 82% de 1,2,3-trioléyl-sn-glycérol (C18:1, n-9) les 18% restant étant un mélange de triglycérides présentant des chaînes acyles palmitique (C16:0 ; 4%), stéarique (C18:0 ; 3%) et linoléique (C18:2, n-6 ; 11%).

L'émulsion sera dans un premier temps étudiée seule puis en interaction avec le tannin, EGCG. Ce tannin a été utilisé dans cette partie car c'est celui qui induit la plus grande variation de déplacement chimique au niveau des signaux du lipide lors des études sur les constantes d'association (chapitre IV). L'émulsion huile dans eau possédant des propriétés anisotropes du fait de sa taille. Les signaux obtenus en RMN du proton en condition statique sont trop larges, rendant impossible le suivi des variations de déplacement chimique induites par ajout de tannin. C'est pourquoi l'ensemble de cette étude a été réalisée par RMN en rotation à l'angle magique. Celle-ci permettant, en moyennant les interactions anisotropes, de s'affranchir de la dépendance angulaire des objets et ainsi d'obtenir des spectres RMN dont la résolution est similaire à celle obtenue en RMN des liquides (*cf.* chapitre II.C.2.c)

V.B.1 Caractérisation structurale des constituants de l'émulsion

La caractérisation des constituants de l'émulsion fut dans un premier temps effectuée par RMN du proton (dans du chloroforme deutéré, CDCl₃) afin de faciliter son attribution.

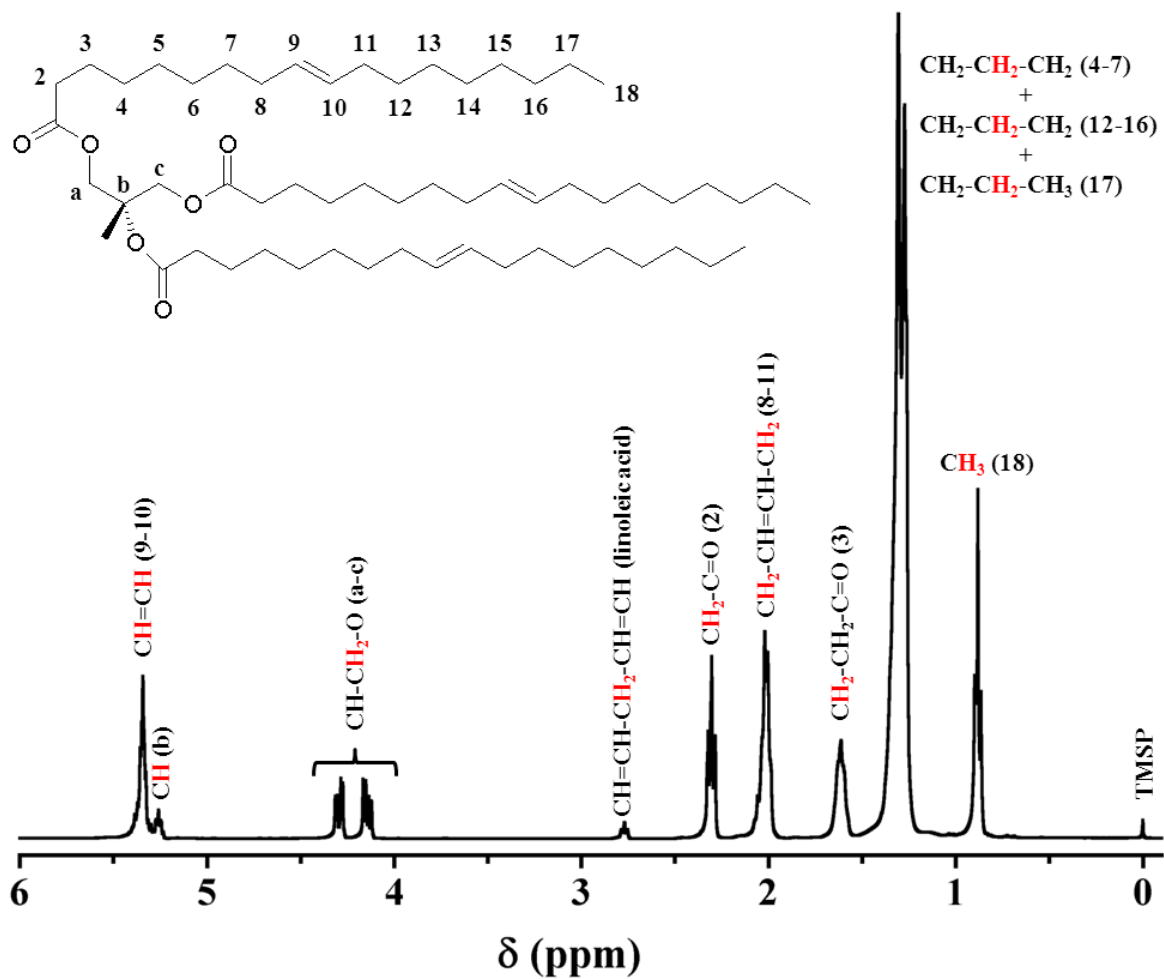


Figure V.21 : Structure numérotée du principal triglycéride (1,2,3-trioléyl-sn-glycérol) constituant l'huile utilisée pour l'émulsion et son spectre de RMN du proton attribuée dans du chloroforme deutéré CDCl₃. Le rapport volumique CDCl₃/huile est de 90/10. T = 37°C. Le triglycéride étant homogène, seule la chaîne sn-1 a été numérotée. Le spectre est référencé par rapport au TMS, fixé à 0ppm.

V.B.1.a Attribution par RMN ¹H de l'huile de tournesol oléique

Le spectre proton de cette huile dans le chloroforme deutéré (**figure V.21**) est un spectre très résolu où chaque résonance a pu être attribuée soit au proton du squelette glycérol, soit à ceux des chaînes acyles (**tableau V.5**).

Groups	δ (ppm)
CH=CH (9-10)	5.34
CH (b)	5.25
CH-CH ₂ (a-c)	4.22
CH=CH-CH ₂ -CH=CH (acide linoléique)	2.77
CH ₂ -C=O (2)	2.3
CH ₂ -CH=CH-CH ₂	2.02
CH ₂ -CH ₂ -C=O (3)	1.61
chaînes acyles	1.3-1.27
CH _{3term}	0.88

Tableau V.5 : Déplacements chimiques (en ppm) des protons présents sur les triglycérides constituant l'huile utilisée pour l'émulsion modèle, solubilisée dans CDCl₃. T = 37°C. Le rapport volumique CDCl₃/huile est de 90/10. Les déplacements chimiques sont référencés par rapport au TMS, fixé à 0ppm.

V.B.1.b Attribution par RMN du tween 80

Le tween 80 est un tensioactif non ionique utilisé en agroalimentaire. C'est un sorbitan polyéthoxylé dont un groupement éthoxy a été estérifié par l'acide oléique. Il est ainsi soluble dans l'eau et permet la stabilisation des émulsions huile dans eau en interagissant avec l'huile *via* la chaîne oléique hydrophobe et avec la phase aqueuse *via* le polyéther hydrophile. Le spectre de ce composé dans du chloroforme deutéré et son attribution sont présentés sur la **figure V.22** et le **tableau V.6**. Les résonances relatives à la chaîne oléique sont retrouvées comme vu précédemment à 5.34, 2.3, 2.02, 1.61, 1.3 et 0.88ppm. Deux résonances à 3.64 et 4.21ppm appartiennent au groupement polyéther. Le massif à 3.64ppm correspond à une superposition de plusieurs résonances. Le déplacement chimique théorique d'une fonction éther se situe entre 3.5 et 4ppm, ainsi ce massif a été attribué comme étant la somme de plusieurs résonances relatives au groupement polyether. Ces résonances étant superposées, l'attribution individuelle de chaque proton du polyéther n'est pas réalisable. Toutefois, la résonance à 4.21ppm a pu être attribuée. En effet, celle-ci présente un déplacement chimique typiquement observé dans le cas d'un CH₂ en alpha d'une fonction ester. De plus, l'aire de ce signal est identique à celui du CH₂ en position 2 de la chaîne oléique. Ainsi, ce signal correspond à la résonance des deux protons en alpha du groupement ester du tween (noté α sur le spectre). Les taches de corrélation retrouvées en utilisant une séquence de RMN à deux dimensions de type COSY entre les protons à 3.64 et 4.21ppm viennent conforter cette hypothèse. Enfin, la résonance à 2.84ppm particulièrement large et intense présente une allure caractéristique d'une fonction hydroxyle. Cette résonance a donc été attribuée aux fonctions hydroxyles du groupement polyéther du tween 80.

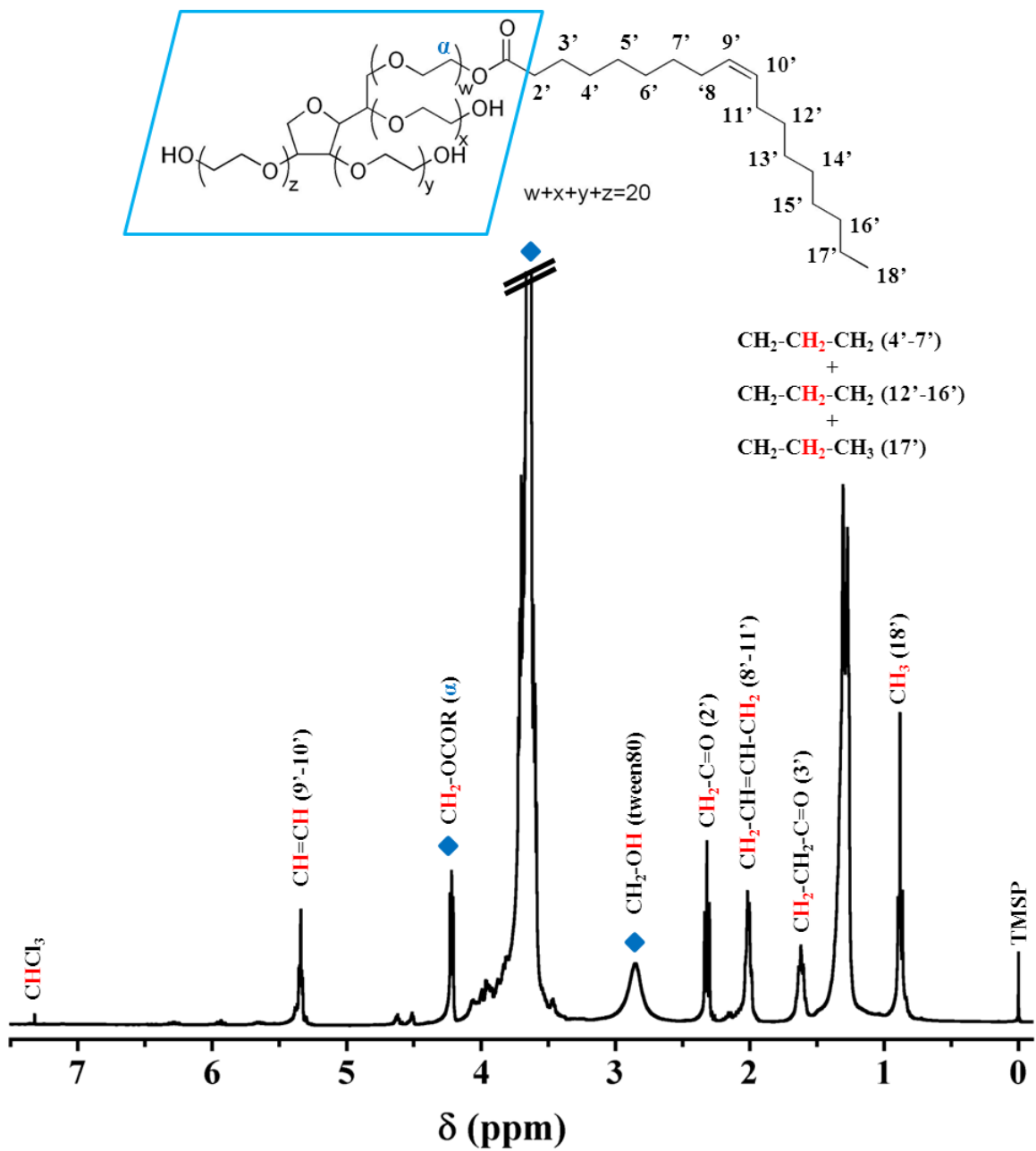


Figure V.22 : Spectre RMN ^1H du tween 80 dans du chloroforme deutéré, CDCl_3 . Le rapport volumique entre le chloroforme et le tween est de 90/10. $T = 37^\circ\text{C}$. Les signaux identifiés par \blacklozenge sur le spectre sont relatifs à la tête polaire des composés. Le spectre est référencé par rapport au TMS, fixé à 0ppm.

Les résonances visibles à 6.26, 5.92, 5.64, 4.61, 4.50ppm n'ont pu être attribuées aux protons du tween 80 et sont, au vu de leurs très faible intensité, probablement dues à des impuretés.

Groups	δ (ppm)
CH=CH (9-10)	5.34
CH ₂ -OCOR (a)	4.21
Tête polaire	3.72-3.58
CH ₂ -OH	2.84
CH ₂ -C=O (2)	2.3
CH ₂ -CH=CH-CH ₂	2.02
CH ₂ -CH ₂ -C=O (3)	1.61
chaînes acyles	1.3-1.2
CH _{3term}	0.88

Tableau V.6 : Déplacements chimiques (en ppm) des protons du tween 80 solubilisé dans du chloroforme deutéré, CDCl₃. T = 37°C. Le rapport volumique CDCl₃/tween est de 90/10. Les déplacements chimiques sont référencés par rapport au TMS, fixé à 0ppm.

V.B.2 Etude de l'émulsion lipidique par RMN

L'effet d'un ajout croissant d'EGCG sur l'émulsion huile dans eau a été examiné. Le spectre RMN du proton de l'émulsion seule sera présenté dans une première partie. Les variations de déplacements chimiques dues à l'ajout de tannin et les résultats induits par celui-ci seront ensuite analysés.

V.B.2.a Emulsion seule

Le spectre proton de l'émulsion obtenu pour un rapport molaire huile/tween 80 de 30/1 est présenté sur la **figure V.23**. Seule la résonance à 3.64ppm relative au tween 80 est visible sur le spectre. En effet, dans ces proportions, le tween 80 est très minoritaire, ainsi les autres résonances relatives sont masquées par celles de l'huile. L'attribution de l'émulsion est présentée dans le **tableau V.7**.

Groups	δ (ppm)
CH=CH (9-10)	5.33
CH (b)	5.25
CH-CH ₂ (a-c)	4.22
Tête polaire du tween 80	3.72-3.66
CH ₂ -C=O (2)	2.25
CH ₂ -CH=CH-CH ₂	2.02
CH ₂ -CH ₂ -C=O (3)	1.61
chaînes acyles	1.3-1.2
CH _{3term}	0.90

Tableau V.7 : Déplacements chimiques (en ppm) des protons de l'émulsion dans l'eau deutérée. T = 37°C. [L] = 43.5mM. Les déplacements chimiques sont référencés par rapport au TMS, fixé à 0ppm.

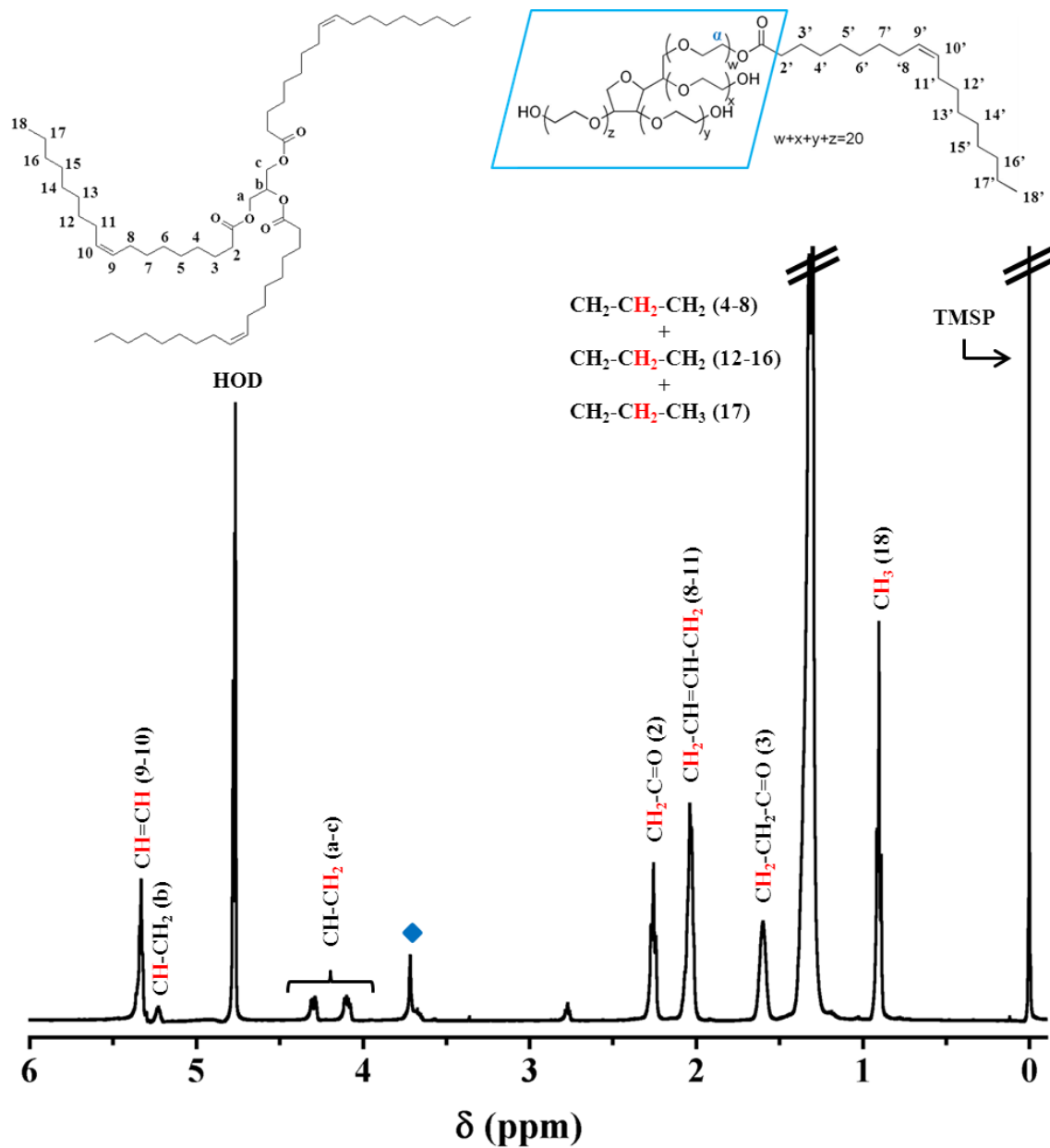


Figure V.23 : Spectre RMN du proton de l'émulsion modèle dans l'eau deutérée D_2O . $T = 37^\circ\text{C}$. $[\text{L}] = 43.5\text{mM}$. Le rapport molaire huile/tween est de 30/1. Le signal de la tête polaire du tween est identifié par \blacklozenge . Les structures des composés majoritaires sont rappelées en haut du spectre. Les valeurs des déplacements chimiques sont présentées dans le tableau V-6. Ceux-ci sont référencés par rapport au TMS, fixé à 0ppm.

V.B.2.b Effet du tannin sur l'émulsion lipidique

L'objectif de cette étude a été d'étudier l'effet de l'EGCG sur l'émulsion et notamment de mettre en évidence l'interaction du tannin avec les gouttelettes lipidiques. Dans un premier temps, une comparaison a été effectuée entre le spectre de l'émulsion seule et celui de l'émulsion en présence de tannin à un rapport molaire EGCG/lipide de 1/11, pour une température de 37°C. Tout d'abord, sur le spectre du système EGCG/émulsion (**figure V.24B**), aucun recouvrement entre les signaux de l'émulsion et du tannin n'est constaté. L'ensemble des résonances relatives à l'émulsion et au tannin sont ainsi visibles. La différence notable observée entre les deux spectres se situe au niveau du signal à 3.7ppm relatif à la tête polaire du tween 80. Un élargissement du signal avec une diminution de l'intensité est constaté, de même qu'un déplacement du pic à 3.71ppm vers les hauts champs. A l'inverse, aucun changement n'est à noter sur les signaux relatifs à l'huile. Ce résultat laisse sous-entendre que l'EGCG interagirait seulement avec le tween 80 localisé à la surface des gouttelettes lipidiques et ne pénétrerait pas dans le cœur hydrophobe.

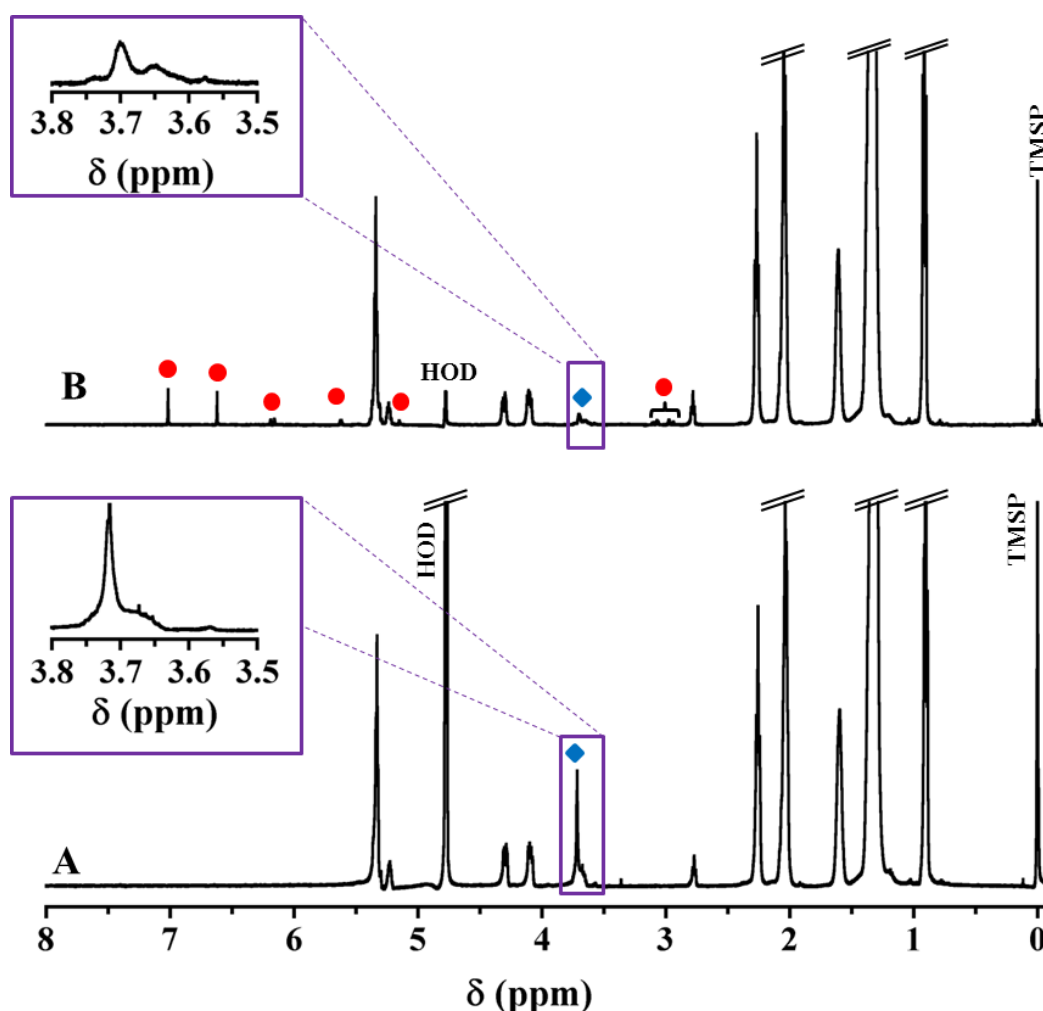


Figure V.24 : Spectres RMN du proton de l'émulsion réalisée dans de l'eau deutérée en absence et en présence d'EGCG. (A) Emulsion seule, [L] = 43.5mM, (B) Emulsion en présence d'EGCG, [L] = 43.5mM, [T] = 4mM. Le rapport molaire EGCG/lipide est de 1/11. T = 37°C. Les résonances du tween 80 et du tannin sont identifiées respectivement par ♦ et par •. Un agrandissement de la région relative à la tête polaire polyéther du tween 80 est présenté en haut à gauche (intensité relative). Les déplacements chimiques sont référencés par rapport au TMSP, fixé à 0ppm.

Dans un deuxième temps, afin d'aller plus loin dans l'étude de la localisation du tannin au niveau des gouttelettes lipidiques de l'émulsion, une étude en RMN à deux dimensions a été réalisée avec des séquences de type NOESY et ROESY. Au rapport molaire T/L de 1/11, aucune corrélation intermoléculaire n'a été identifiée malgré les différences observées sur le spectre ^1H . Dans l'espoir de mettre en évidence une corrélation, plusieurs expériences ont été réalisées : (i) en variant le temps de mélange de manière à optimiser le transfert d'aimantation entre les spins du tannin et ceux du lipide et (ii) en augmentant le rapport tannin/lipide pour favoriser l'interaction. L'EGCG étant sous forme monomérique comme dans les conditions du vin (Quideau et al., 2011), la concentration en lipides a été diminuée afin de garder une concentration en EGCG inférieure à la CMC du tannin ($6\pm 2\text{mM}$, Pianet et al., 2008). L'ensemble des conditions expérimentales sont présentées dans le **tableau V.7**.

Test	[Lipides]	[EGCG]	Rapport T/L	t_m
1	43.5	0	0	
2	43.5	4	1/11	50 ; 100 ; 150
3	8.7	3	1/3	40 ; 100 ; 200 ;
4	4.35	4	1/1	100 ; 200
5	2	4	2/1	250

Tableau V.7 : Rapports tannin/lipide et temps de mélange utilisés pour les séquences NOESY et ROESY

Quelque soit le rapport T/L mis en jeu, aucune tache de corrélation n'est observée pour des temps de mélange courts (50, 100ms). De plus, seule de la diffusion de spin est observée pour des temps de mélange supérieurs à 150ms. Ainsi, aucune corrélation intramoléculaire n'a été observée quelque soit les conditions expérimentales utilisées. Ce résultat vient renforcer l'affirmation comme quoi le tannin ne pénétrerait pas dans le cœur hydrophobe. Une absence de tache de corrélation est aussi constatée entre les signaux du tannin et celui du tween 80. Ce résultat serait apparemment en contradiction avec l'observation sur l'élargissement et le shift du signal du tween 80 observé en comparant les spectres proton de l'émulsion en absence et en présence d'EGCG. Cette absence de corrélation pourrait être expliquée par un échange chimique de type intermédiaire entre les formes libre et liée d'EGCG qui aurait pour effet d'augmenter la largeur des signaux NOE qui ne seraient ainsi plus visibles sur le spectre.

Enfin, dans un troisième temps, afin de mieux caractériser l'interaction entre le modèle de gouttelettes lipidiques utilisé et l'EGCG, nous avons étudié les variations de déplacements chimiques de chaque groupement constituant l'émulsion provoquées par l'addition de tannin pour les rapports T/L de 1/1 et 2/1 (**figure V.25**). Deux constats peuvent être effectués : (1) La tête polaire du tween 80 présente la variation de déplacement chimique la plus importante comparée à celles des groupements des triglycérides qui restent faibles (0.05 vs. 0.03ppm). Par conséquent, nous pouvons confirmer l'hypothèse d'une localisation du tannin en surface des gouttelettes lipidiques de l'émulsion. (2) Les déplacements chimiques des groupements du cœur hydrophobe varient de façon homogène quelque soit le rapport T/L. L'absence d'inhomogénéité et les faibles variations de déplacement chimique

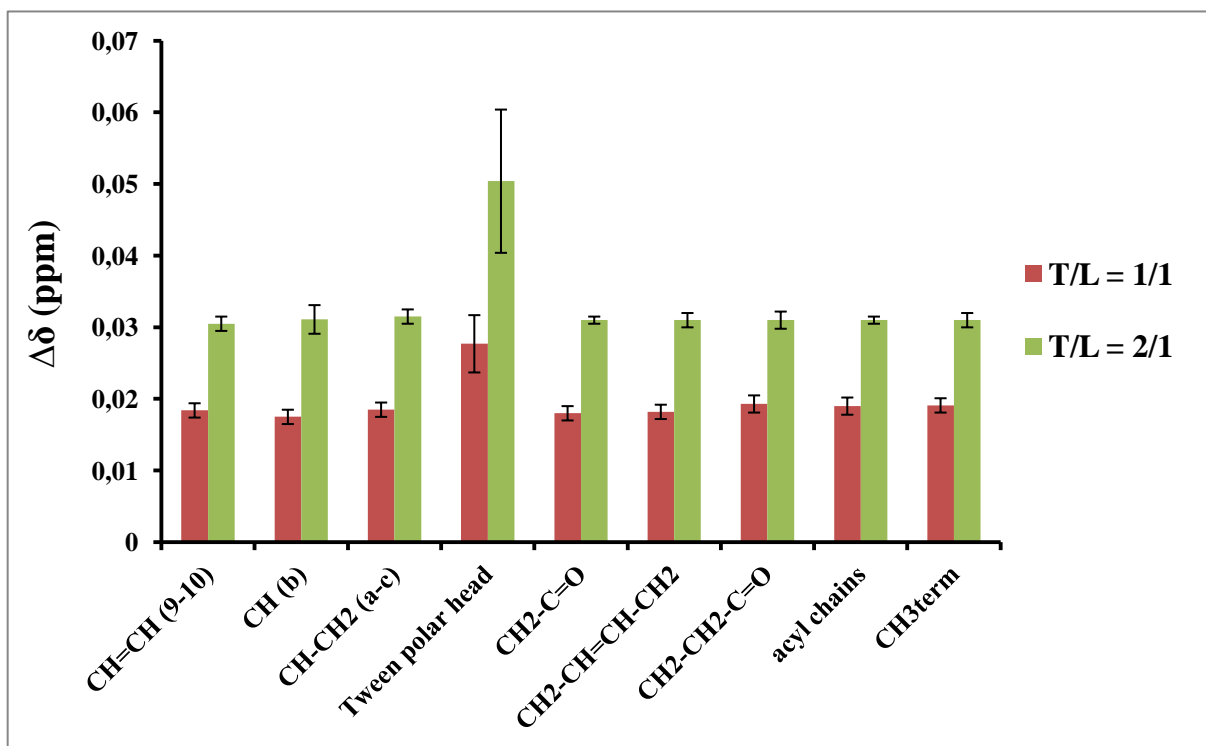


Figure V.25 : Variations de déplacement chimique des différents groupements de l'émulsion après addition d'EGCG aux rapports tannins/lipide 1/1 et 2/1. T = 37°C.

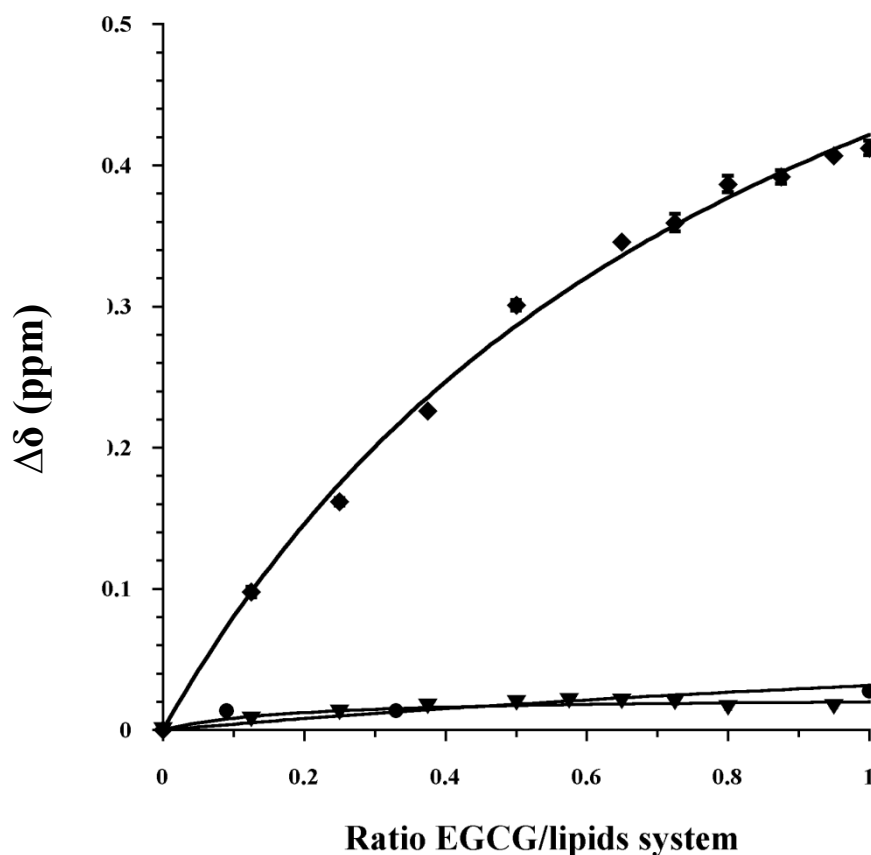


Figure V.26 : Courbe représentant la variation de déplacements chimiques en fonction du rapport molaire EGCG/lipide sur différents systèmes. (♦) $N^+(CH_3)_3$ du système EGCG/MLV, (▼) CH_2 des chaînes acyles du système EGCG/MLV, (●) Tête polaire du tween 80 du système EGCG/émulsion. T = 37°C. L'erreur au niveau des variations de déplacement chimique est estimée à $\pm 0.5-4\%$ pour le $N^+(CH_3)_3$, $\pm 0.5-15\%$ pour les chaînes acyles et $\pm 10-14\%$ pour la tête polaire du tween.

des groupements issus du cœur hydrophobe des gouttelettes même pour un rapport T/L élevé rendent peu probable une diffusion de l'EGCG à l'intérieur de celles-ci et donc *in fine* une interaction avec le cœur hydrophobe. Cette absence d'interaction avec le cœur hydrophobe des gouttelettes peut être expliquée par l'existence de contraintes stériques dues à la tête polaire du tween 80 qui empêche le tannin de pénétrer. Les variations homogènes restent explicables par un réarrangement des lipides du cœur hydrophobe induit par l'interaction entre l'EGCG et le tween 80.

Une étude des variations des déplacements chimiques en fonction du rapport molaire tannin/lipide du groupement le plus affecté dans le cas du système EGCG/émulsion a également été effectuée (**figure V.26**). Cette variation a ensuite été comparée à celle obtenue dans le cas du modèle EGCG/MLV (cf. chapitre IV) pour le groupement le plus affecté par le tannin, le $N^+(CH_3)_3$ de la tête choline, et pour un type de groupements non affectés par la présence du polyphénol, les CH_2 des chaînes acyles. Le but est de comparer la variation de déplacement chimique obtenu pour le signal du tween 80 avec celle relative à un groupement présentant une forte interaction avec le tannin ($N^+(CH_3)_3$) et avec celle relative à un groupement présentant une faible interaction avec celui-ci (les CH_2 des chaînes acyles).

On constate que les variations de déplacement chimique de la tête polaire du tween 80 du système EGCG/émulsion sont quinze fois plus faibles que celles du $N^+(CH_3)_3$ du système EGCG/MLV. De plus, elles sont de même ordre de grandeur que celles des CH_2 des chaînes acyles des MLV, groupements au cœur de la bicouche lipidique interagissant faiblement avec le tannin. Ces observations suggèrent que le tannin interagit faiblement avec les gouttelettes lipidiques de l'émulsion.

V.B.2.c Discussion sur la pertinence du modèle utilisé

Nous avons vu précédemment que l'interaction entre l'EGCG et l'émulsion modèle était localisée en surface, au niveau de la tête polaire du tween 80, mais que cette interaction était faible. Ainsi, la nature de la surface des gouttelettes lipidiques de l'émulsion va jouer un rôle important dans la pertinence du modèle. Le tween 80 est un émulsifiant couramment utilisé dans l'agro-alimentaire (pour la stabilisation des crèmes glacées notamment) et peu coûteux, ce qui le rend intéressant pour des études préliminaires. Néanmoins, malgré sa chaîne grasse oléique bien représentée dans les phospholipides, sphingolipides et monoglycérides recouvrant la surface des gouttelettes lipidiques présentes dans les aliments (Dalglish., 2006 ; Lopez., 2008), la nature polyéther de sa tête polaire n'est pas un modèle optimal pour mimer la surface des gouttelettes lipidiques. A ce titre, le modèle des bicelles isotropes constituées de phospholipides utilisé dans la première partie de ce chapitre mime mieux la nature chimique de la surface des gouttelettes.

Les résultats obtenus avec ces deux modèles en termes d'affinité entre le tannin et le modèle lipidique semblent corroborer cette conclusion. En effet, tandis que dans le cas des bicelles isotropes, une forte interaction entre le tannin et les phospholipides est mise en évidence (précipitation du

système), celle-ci s'est avérée très faible pour le système EGCG/émulsion. Cette différence d'affinité peut s'expliquer par la nature des interactions entre EGCG et les lipides qui varie selon la tête polaire des lipides mis en jeu. En effet, dans le cas des bicelles isotropes, les liaisons hydrogène et les interactions de type cation- π (entre le groupement $N^+(\text{CH}_3)_3$ des têtes polaires des lipides et les cycles aromatiques des tannins) favorisent l'interaction entre le tannin et les phospholipides. A l'inverse, l'absence de liaisons hydrogène (les éthers ne pouvant pas en former) et la contrainte stérique induite par le volume du groupement polyéther du tween 80 peut être un frein à l'interaction. Ainsi, bien que le modèle utilisé reste pertinent, celui-ci, du fait de la grande dépendance des interactions entre les tannins et les lipides alimentaires vis-à-vis de la surface du modèle lipidique, doit être amélioré pour étudier ces interactions.

V.C Conclusion et perspectives

L'objectif de ce chapitre a été de proposer un modèle pertinent pour l'étude par résonance magnétique nucléaire des interactions entre les tannins et les gouttelettes lipidiques. Pour ce faire, le choix s'est porté sur deux types de modèles, les bicelles isotropes DMPC/DCPC et une émulsion huile dans eau stabilisée par un émulsifiant, le tween 80. Les bicelles isotropes présentent l'avantage de bien mimer le cœur hydrophobe des gouttelettes lipidiques, mais aussi la composition lipidique de leurs surfaces. *A contrario*, la taille de ces objets est trop petite pour en faire un modèle optimal des gouttelettes lipidiques (10-15 nm *vs.* 10-20 μm). Toutefois, la précipitation des bicelles isotropes en présence de tannin est une preuve de l'interaction entre les tannins et la tête polaire des phospholipides.

Les gouttelettes lipidiques alimentaires sont mieux mimées en utilisant un système d'émulsion huile dans la taille est plus représentative (5-9 μm *vs.* 10-20 μm). De plus, le cœur hydrophobe est ici typiquement celui que l'on retrouve dans les gouttelettes du bol alimentaire (triglycérides). Néanmoins, la différence de nature chimique de la surface, qui est ici défavorable à l'interaction avec le tannin, fait de l'émulsion stabilisée par le tween 80 un modèle qui n'est pas le plus représentatif des gouttelettes lipidiques alimentaires.

Ainsi, afin d'utiliser un modèle encore plus représentatif des gouttelettes lipidiques alimentaires, une perspective d'étude vise à modifier la nature de l'émulsifiant utilisé afin de mieux mimer la surface des gouttelettes. Les lécithines d'œuf ou de soja peuvent par exemple être utilisées. Cet assemblage de phospholipides comprenant notamment des PC et des PE présente des résonances au niveau des têtes polaires ($N^+(\text{CH}_3)_3$ des PC, NH_3^+ des PE) situées entre 3 et 4 ppm qui ne seront pas recouvertes par celles des triglycérides. Une étude d'affinité à partir de la variation des déplacements chimiques de ces signaux peut donc être envisagée par RMN.

CHAPITRE VI

Conclusion et perspectives

VI.A Conclusion générale

Les tannins présents dans le vin induisent deux propriétés organoleptiques qui vont être ressenties lors de la dégustation, l'astringence et l'amertume. Grâce aux différentes études réalisées lors de vingt dernières années, les mécanismes à l'origine de ces deux sensations commencent à être élucidés (Charlton et al., 2002 ; Chandrashekar et al., 2006 ; Cala et al., 2010). Dans le cas de l'amertume, l'origine de cette sensation proviendrait de l'interaction entre les tannins et les récepteurs du goût amer, tandis que dans le cas de l'astringence, la sensation est due à des interactions entre les tannins et les protéines salivaires qui vont entraîner une diminution de la lubrification de la cavité buccale. L'affinité entre cinq tannins (C, B1, B2, B3, B4 et C2) et trois peptides mimant les protéines salivaires (IB7₁₄, IB9₃₇, His₃) a pu être quantifiée au sein de laboratoire pour la première fois *via* la détermination de constantes de dissociation tannin-protéine de l'ordre du milli-molaire à la dizaine de milli-molaire (Cala et al., 2010).

Cependant, d'autres facteurs comme le pH ou la température peuvent influencer sur ces propriétés organoleptiques. Les interactions tannin-protéine et tannin-récepteur peuvent aussi être influencées par la présence de molécules externes comme les sucres (Carvalho et al., 2006) l'éthanol (Fontoin et al., 2008) ou les lipides (He et al., 2006) présents en bouche au niveau des membranes buccales mais aussi apportés par les aliments lors d'un repas. En effet, ceux-ci, en interagissant avec les tannins, pourraient influencer sur le goût ressenti en perturbant les récepteurs gustatifs (effet sur l'amertume) et/ou les interactions entre les tannins et les protéines de la salive (effet sur l'astringence). Ainsi, Au cours de cette thèse, nous nous sommes intéressés aux interactions entre les tannins et les lipides afin d'étudier l'impact de celles-ci sur le goût ressenti lors de la consommation d'un vin.

Pour ce faire, la RMN a été la technique préférentiellement utilisée. C'est en effet une technique non invasive, qui ne nécessite pas l'utilisation, comme dans le cas de la fluorescence ou de la résonance paramagnétique électronique, de sondes pouvant potentiellement perturber les systèmes lipidiques. Elle est donc particulièrement adaptée pour l'étude de tels systèmes. Deux types de résonance magnétique nucléaire ont été particulièrement utilisés durant ce travail :

- La RMN des solides nous a permis d'étudier la perturbation induite par la présence de tannins sur la dynamique et l'ordre de différents modèles membranaires tels que l'on peut les mesurer du point de vue des lipides.
- La RMN haute résolution en rotation à l'angle magique nous a permis d'obtenir les constantes d'association pour nos systèmes lipidiques modèles en interaction avec les tannins. L'affinité entre les tannins et les lipides a ainsi pu être quantifiée.

Nous rappellerons dans ce chapitre de conclusion les trois points ayant été abordés au cours de cette thèse. Dans une première partie, nous avons déterminé l'influence des tannins sur la fluidité des membranes afin d'évaluer l'influence de l'interaction tannin-lipide sur la perturbation des

récepteurs gustatifs, et donc sur la sensation d'amertume, due à un changement dans la dynamique membranaire. Dans une seconde partie, nous avons réussi à quantifier, par la mesure de constantes d'association, l'affinité de trois tannins (C, EC et EGCG) pour un modèle mimant les membranes buccales, ce qui nous a permis de conclure à une modulation de l'astringence due à aux interactions tannin-lipide. Enfin, dans une troisième partie, nous nous sommes intéressés aux interactions entre les tannins et deux modèles mimant les gouttelettes lipidiques issues de l'alimentation. Bien que ce chapitre présente les résultats les moins aboutis, des premiers résultats prometteurs ont pu être mis en évidence.

VI.A.1 Effet des tannins sur la fluidité membranaire (chapitre III)

Les études antérieures effectuées sur l'effet des tannins sur la fluidité des membranes s'accordent à dire que ceux-ci ont bien un effet sur la fluidité. Toutefois, deux écoles s'affrontent ; pour l'une (Kajjya et al., 2001 ; Uekusa et al., 2011 ; Yu et al., 2011), les tannins ont un effet fluidifiant sur la membrane alors que pour l'autre (Tsuchiya et al., 1999, 2001, 2008 ; Caturla et al., 2003 ; Abram et al., 2013), les tannins ont un effet rigidifiant. Ainsi, notre étude s'ancre dans un contexte qui est peu clair.

Notre étude, effectuée sur trois modèles membranaires, du plus grossier au plus représentatif de la membrane buccale, montre quatre résultats d'importance. (i) les tannins induisent une fluidification globale des modèles membranaires et une désorganisation de leur cœur hydrophobe, dont l'intensité, dose-dépendante, dépend de la structure du tannin mise en jeu. (ii) une perturbation plus importante de l'organisation du modèle membranaire a été observée pour un système lipidique enrichi en cholestérol (18% molaire). Une diffusion du cholestérol des régions riches vers les régions pauvres en stérols a ainsi été observée, entraînant une désorganisation plus importante de la membrane. (iii) A l'inverse, l'éthanol, connu pour son caractère fluidifiant, a tendance à atténuer les effets du tannin sur la fluidité et l'organisation de la membrane rendue plus fluide en sa présence. Ainsi, l'effet fluidifiant du tannin semble être atténué sur des membranes présentant une fluidité importante (iv) De même, aucun effet fluidifiant n'a été observé sur le modèle membranaire présentant une teneur en cholestérol importante (39% molaire), ce qui pourrait suggérer que les tannins n'auraient pas d'effet sur la dynamique de membranes trop rigides qui empêcherait leur pénétration.

Ainsi, lors de la dégustation d'un vin, l'effet fluidifiant de l'éthanol va prédominer par rapport à ceux des tannins. **L'interaction tannin-lipide ne serait donc pas le principal facteur modulant la sensation d'amertume. Le changement dans la dynamique de la membrane induisant la perturbation des récepteurs gustatifs serait principalement dû à l'effet fluidifiant de l'éthanol. Toutefois, les résultats obtenus sur le système DMPC/CH (82/18) laissent penser que les tannins fluidifieraient légèrement la membrane pour des systèmes pauvres en cholestérol. Ainsi, les**

récepteurs du goût amer situés dans de telles régions s'en trouveraient perturbés. A l'inverse, les tannins n'auraient aucun effet sur des régions riches en stérols.

VI.A.2 Effet des interactions tannins-lipides sur l'astringence – Détermination de constantes d'affinité tannin-lipide (chapitre IV)

L'affinité de certains tannins pour les lipides a été étudiée dans la littérature. Toutefois, la plupart de ces études reste qualitative et utilise parfois des conditions peu représentatives des conditions physiologiques (utilisation de solvants polaires (acétonitrile) en tant que phase mobile en HPLC, Uekusa et al., 2008). Une seule étude, effectuée par Kamihara et al. (2008) a permis d'obtenir des constantes d'associations entre quatre tannins (C, EC, ECG et EGCG) et des multicouches supportées de DMPC. L'échelle d'affinité suivante a été obtenue : $K_a(\text{ECG}) = (3.75 \pm 0.997) \cdot 10^6 \text{M}^{-1} > K_a(\text{EGCG}) = (2.16 \pm 0.791) \cdot 10^6 \text{M}^{-1} \gg K_a(\text{EC}) = (1.86 \pm 0.128) \cdot 10^3 \text{M}^{-1} > K_a(\text{EGC}) = (1.33 \pm 0.124) \cdot 10^3 \text{M}^{-1}$. Cependant, du fait de la forte influence de la masse du ligand interagissant avec le support lipidique sur la constante d'association ligand-support mesurée, le QCM est une technique peu appropriée pour mesurer des constantes d'association. Les résultats présentés dans cette publication sont donc à prendre avec des réserves. Ainsi, aucune donnée quantitative fiable n'a pu être obtenue sur les interactions tannins-lipides avant cette étude. De même, aucune étude sur l'affinité entre les tannins et les lipides n'a été menée en utilisant une teneur en alcool proche de celle rencontrée dans le vin.

L'objectif de cette partie a donc été de déterminer les constantes d'associations entre les tannins du vin (C, EC, ECG, EGCG) et un modèle de membrane buccale, les MLV de DMPC, afin d'étudier l'impact des interactions tannin-lipide sur la sensation d'astringence. Cet objectif a été atteint *via* la mise en place d'un protocole permettant d'obtenir ces constantes par RMN. Celui-ci repose sur le suivi des variations du signal d'un des groupements du lipide le plus affecté par le tannin, le $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ de la tête choline, en fonction de la concentration en tannin dans le milieu et leur ajustement mathématique par l'équation déterminée par Baxter et al. (1996). Des constantes d'association variant de 179 à 2233M^{-1} selon le tannin et les conditions du milieu (pH, éthanol, température) utilisées ont pu être obtenues.

Ces résultats nous ont permis d'étudier l'influence de la structure du tannin et des conditions du milieu sur l'interaction tannin-lipide. Plusieurs conclusions peuvent être apportées. (i) La nature des chaînes grasses des lipides et l'isomérisation cis/trans des carbones 2 et 3 du cycle pyrane des tannins ne semblent pas influencer sur l'affinité des tannins pour les lipides. (ii) la présence d'un groupement galloylé dans la structure du tannin augmente considérablement son affinité pour le modèle membranaire, ce résultat étant à relier d'une part à l'augmentation du caractère hydrophobe du tannin dû à ce groupement ($K_{ow}(\text{EGCG}) = 12.1 > K_{ow}(\text{EC}) = 2.4$, Hagerman et al., 1998) et d'autre part au nombre d'interactions décrites comme prédominantes dans la littérature entre les tannins et les lipides

(liaisons hydrogène entre les fonctions hydroxyles des tannins et les doublets non liant des oxygènes des carbonyles et du groupement phosphate du lipide, interaction de type cation- π entre l'ammonium quaternaire de la tête choline du lipide et les cycles aromatiques des tannins). (iii) A l'inverse, une diminution du pH et de la température ainsi que la présence d'éthanol entraînerait une importante diminution de la constante d'association tannin-lipide.

L'ensemble de ces résultats a permis d'étudier l'influence de l'interaction tannin-lipide sur la sensation d'astringence en les comparant, dans le cas de la catéchine en présence d'éthanol, aux travaux effectués au laboratoire par O. Cala sur les interactions tannins-protéine (Cala et al., 2010). Nous avons ainsi montré que les constantes d'association pour les interactions tannin-lipides et tannin-protéines de la salive étaient du même ordre de grandeur. Ainsi, ces deux interactions sont en compétition lors de la dégustation d'un vin, ce qui va induire une modulation de l'astringence. De ce fait, **les lipides jouent un rôle sur l'astringence d'un vin.**

Enfin, nous avons aussi montré, par l'étude des variations de déplacements chimiques des signaux du lipide induites par la présence du tannin, que le tannin était localisé préférentiellement à l'interface du modèle membranaire. De plus, un ancrage plus important dans le cas des tannins galloylés a été montré.

VI.A.3 Etude des interactions entre les tannins et des modèles de gouttelettes lipidiques (chapitre V)

L'étude de l'interaction entre les tannins et les lipides issus de l'alimentation n'ayant, à notre connaissance, jamais été effectuée précédemment, l'objectif de cette partie a donc été de proposer un modèle pertinent pour l'étude par résonance magnétique nucléaire des interactions entre les tannins et les gouttelettes lipidiques. Pour ce faire, le choix s'est porté sur deux types de modèles, les bicelles isotropes DMPC/DCPC et une émulsion huile dans eau stabilisée par un émulsifiant alimentaire, le tween 80.

Les bicelles isotropes présentent l'avantage de bien mimer le cœur hydrophobe des gouttelettes lipidiques, mais aussi la composition lipidique de leurs surfaces. *A contrario*, la taille de ces objets est trop petite pour en faire un modèle optimal des gouttelettes lipidiques (10-15 nm vs. 10-20 μ m). Toutefois, la précipitation des bicelles isotropes en présence de tannin constatée et analysée par RMN ^2H , ^{31}P et par diffusion des rayons X aux petits angles met bien en évidence la forte interaction entre les tannins et ce modèle de gouttelettes lipidiques

Les gouttelettes lipidiques alimentaires sont mieux mimées en utilisant un système d'émulsion huile dans eau dont la taille est plus représentative (5-9 μ m vs. 10-20 μ m). De plus, le cœur hydrophobe est ici typiquement celui que l'on retrouve dans les gouttelettes du bol alimentaire

(triglycérides). Néanmoins, la différence de nature chimique de la surface, qui est ici défavorable à l'interaction avec le tannin, fait de l'émulsion stabilisée par le tween 80 un modèle inadéquat des gouttelettes lipidiques alimentaires. Le point positif de cette étude est que nous sommes parvenus à obtenir des spectres RMN ^1H de l'émulsion présentant une bonne résolution, ce qui est nécessaire au suivi des variations chimiques permettant la détermination de constantes d'association. De ce fait, l'étude de telles constantes reste possible en choisissant un émulsifiant plus adapté, comme la lécithine de soja, laquelle composée d'un mélange de phospholipides pourrait mimer convenablement la surface des gouttelettes. **Ainsi cette étude ouvre la voie à des perspectives intéressantes quant à la détermination de constantes d'association par résonance magnétique nucléaire entre les tannins et un modèle mimant de façon quasiment optimal les gouttelettes lipidiques issues de l'alimentation : l'émulsion huile dans eau.**

VI.B Perspectives

L'effet des interactions tannin-lipide sur l'amertume a été étudié en profondeur au cours de cette thèse, toutefois quelques points restent encore à éclaircir. Il peut être dans un premier temps intéressant d'étudier l'effet du tannin sur un modèle DMPC/CH fortement enrichi en cholestérol (39% molaire) ou sur le système POPC/POPE/GSL/SM/CH (1.5/1.8/1.5/1.2/4) en absence d'éthanol afin de déterminer si le tannin possède un effet sur la dynamique du modèle membranaire dans ces conditions. Ainsi, ce résultat permettrait de conclure si, de manière générale, les tannins fluidifient ou non les régions riches en cholestérol. Une autre étude intéressante à mener sur l'impact des tannins sur la fluidité membranaires serait d'étudier l'influence d'autres tannins, notamment des dimères et des trimères, sur la dynamique de nos modèles membranaires les plus représentatifs de la membrane buccales. De plus, en les comparant avec des mesures de constantes d'association qui pourraient être envisagées pour ces tannins, un parallèle pourrait être effectué entre l'effet des tannins sur la dynamique membranaire et leur affinité pour les lipides. Enfin, afin de tendre vers des conditions de plus en plus proches de celles de la dégustation, l'influence d'un mélange de tannins sur la dynamique membranaire pourrait être envisagée.

En termes de localisation des tannins dans la membrane, des expériences de modélisation se basant sur nos résultats obtenus au cours du chapitre IV (nombre de sites de fixation, variation de déplacement chimique) pourraient être envisagées afin de modéliser l'interaction tannin-lipide et donc valider nos résultats obtenus en RMN.

De même, nos travaux ouvrent la voie à un grand nombre d'études possibles dans l'objectif d'étudier l'effet des interactions tannin-lipide sur l'astringence. Ainsi, comme pour la dynamique membranaire, il peut être intéressant de déterminer des constantes d'association pour des dimères et des trimères afin de voir l'influence du degré de polymérisation du tannin sur son affinité pour les

lipides et ainsi agrandir l'échelle d'affinité que nous avons établie. De même, l'étude du système ECG/MLV doit être à nouveau effectuée en prenant une concentration lipidique plus faible afin de tendre vers un rapport T/L de 1 permettant l'obtention de la valeur plateau afin de déterminer la constante d'association pour ce système. Enfin, la détermination des constantes d'association tannin-lipides et tannin-protéines salivaires pour le système MLV de DMPC en présence du peptide modèle IB7₁₄ des protéines salivaires permettrait de mieux cibler les interactions déterminantes pour le goût d'un vin.

Enfin, des constantes d'association entre les tannins et les émulsions huile dans eau mimant les gouttelettes lipidiques pourraient être obtenues en changeant la nature de l'émulsifiant utilisé dans cette étude. Comme dit précédemment, les lécithines de soja ou d'œuf constituent de bonnes alternatives. En effet, en plus de mimer convenablement la surface lipidique des émulsions, ces assemblages de phospholipides (comprenant notamment des PC et des PE) présentent des résonances au niveau des têtes polaires ($N^+(CH_3)_3$ des PC, NH_3^+ des PE) situées entre 3 et 4 ppm qui ne seront pas recouvertes par celles des triglycérides, rendant ainsi la détermination de la constante d'association possible. Une vision globale des effets des lipides sur l'astringence pourrait alors être effectuée en comparant les constantes d'association obtenues pour les interactions tannins-lipides membranaires et tannin-protéines salivaires avec celles qui seraient obtenues pour l'interaction tannins-gouttelettes lipidiques alimentaires.

Bibliographie

~A~

Abragam, A., and Hebel, L. C. (1961) The Principles of Nuclear Magnetism. *American Journal of Physics* **29**, 860-861

Abram, V., Berlec, B., Ota, A., Sentjurc, M., Blatnik, P., and Ulrih, N. P. (2013) Effect of flavonoid structure on the fluidity of model lipid membranes. *Food Chemistry* **139**, 804-813

Alanko, S. M. K., Halling, K. K., Maunula, S., Slotte, J. P., and Ramstedt, B. (2005) Displacement of sterols from sterol/sphingomyelin domains in fluid bilayer membranes by competing molecules. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes* **1715**, 111-121

Almeida, P. F. F., Vaz, W. L. C., and Thompson, T. E. (1992) Lateral diffusion in the liquid-phases of dimyristoylphosphatidylcholine cholesterol lipid bilayers - a free-volume analysis. *Biochemistry* **31**, 6739-6747

Arnold, A., Labrot, T., Oda, R., and Dufourc, E. J. (2002) Cation modulation of bicelle size and magnetic alignment as revealed by solid-state NMR and electron microscopy. *Biophysical Journal* **83**, 2667-2680

Arnold, R. A., Noble, A. C., and Singleton, V. L. (1980) Bitterness and astringency of phenolic fractions in wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **28**, 675-678

Arora, A., Byrem, T. M., Nair, M. G., and Strasburg, G. M. (2000) Modulation of liposomal membrane fluidity by flavonoids and isoflavonoids. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **373**, 102-109

Auriol, M. M., and Le Charpentier, Y. (1998) Histologie de la muqueuse buccale et des maxillaires. *Encyclopédie médico-chirurgicale (Elsevier, Paris) Stomatologie* **22-007-M-10**, 1-9

Aussenac, F., Laguerre, M., Schmitter, J. M., and Dufourc, E. J. (2003) Detailed structure and dynamics of bicelle phospholipids using selectively deuterated and perdeuterated labels. H-2 NMR and molecular mechanics study. *Langmuir* **19**, 10468-10479

~B~

Barry, J. A., and Gawrisch, K. (1994) Direct NMR evidence for ethanol binding to the lipid-water interface of phospholipid-bilayers. *Biochemistry* **33**, 8082-8088

Barry, J. A., and Gawrisch, K. (1995) Effects of ethanol on lipid bilayers containing cholesterol, gangliosides, and sphingomyelin. *Biochemistry* **34**, 8852-8860

Baxter, N. J., Lilley, T. H., Haslam, E., and Williamson, M. P. (1997) Multiple interactions between polyphenols and a salivary proline-rich protein repeat result in complexation and precipitation. *Biochemistry* **36**, 5566-5577

Baxter, N. J., Williamson, M. P., Lilley, T. H., and Haslam, E. (1996) Stacking interactions between caffeine and methyl gallate. *Journal of the Chemical Society-Faraday Transactions* **92**, 231-234

Beck, J. G., Mathieu, D., Loudet, C., Buchoux, S., and Dufourc, E. J. (2007) Plant sterols in "rafts": a better way to regulate membrane thermal shocks. *Faseb Journal* **21**, 1714-1723

- Beidler, L. M. (1978) *Biophysics and chemistry of taste*. In *Handbook of perception, IVA, tasting and smelling* (Carterette, E. C., and Friedman, M. P., eds) pp. 21-49, New York : Academic Press.
- Bloom, M., Davis, J. H., and Mackay, A. L. (1981) Direct determination of the oriented sample nmr-spectrum from the powder spectrum for systems with local axial symmetry. *Chemical Physics Letters* **80**, 198-202
- Blouin, J., and Cruège, J. (2008) Analyse et composition des vins comprendre le vin.
- Boselli, E., Boulton, R. B., Thorngate, J. H., and Frega, N. G. (2004) Chemical and sensory characterization of DOC red wines from Marche (Italy) related to vintage and grape cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **52**, 3843-3854
- Bottier, C., Géan, J., Artzner, F., Desbat, B., Pézolet, M., Renault, A., Marion, D., and Vié, V. (2007) Galactosyl headgroup interactions control the molecular packing of wheat lipids in Langmuir films and in hydrated liquid-crystalline mesophases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1768**, 1526-1540
- Breslin, P. A. S., Gilmore, M. M., Beauchamp, G. K., and Green, B. G. (1993) Psychophysical evidence that oral astringency is a tactile sensation. *Chemical Senses* **18**, 405-417
- Brethenoux, L. (2012) Etudes de l'interaction des tannins avec les lipides alimentaires modelises par une émulsion huile dans eau par spectrometrie de fluorescence. Université de Bordeaux. Rapport de Master I.
- Buchoux, S. (2008) Vers un nouveau modèle de déstabilisation des membranes biologiques par les lipopeptides: Apport de la RMN a travers l'exemple de la surfactine. Université de Bordeaux. Thèse.
- Burnett, L. J., and Muller, B. H. (1971) Deuteron Quadrupole Coupling Constants in Three Solid Deuterated Paraffin Hydrocarbons: C₂D₆, C₄D₁₀, C₆D₁₄. *The Journal of Chemical Physics* **55**, 5829-5831

~C~

- Cala, O. (2010) Approche moléculaire de l'astringence par l'étude des interactions entre les tanins du vin et les protéines de la salive. Université de Bordeaux. Thèse.
- Cala, O., Fabre, S., Pinaud, N., Dufourc, E. J., Fouquet, E., Laguerre, M., and Pianet, I. (2011) Towards a Molecular Interpretation of Astringency: Synthesis, 3D Structure, Colloidal State, and Human Saliva Protein Recognition of Procyanidins. *Planta Medica* **77**, 1116-1122
- Cala, O., Pinaud, N., Simon, C., Fouquet, E., Laguerre, M., Dufourc, E. J., and Pianet, I. (2010) NMR and molecular modeling of wine tannins binding to saliva proteins: revisiting astringency from molecular and colloidal prospects. *Faseb Journal* **24**, 4281-4290
- Carlotti, C., Aussenac, F., and Dufourc, E. J. (2002) Towards high-resolution H-1-NMR in biological membranes: magic angle spinning of bicelles. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes* **1564**, 156-164
- Carlson, J. M., and Sethna, J. P. (1987) Theory of the ripple phase in hydrated phospholipid-bilayers. *Physical Review A* **36**, 3359-3374
- Carvalho, E., Mateus, N., Plet, B., Pianet, I., Dufourc, E., and De Freitas, V. (2006) Influence of wine pectic polysaccharides on the interactions between condensed tannins and salivary proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**, 8936-8944

- Caturla, N., Vera-Samper, E., Villalain, J., Mateo, C. R., and Micol, V. (2003) The relationship between the antioxidant and the antibacterial properties of galloylated catechins and the structure of phospholipid model membranes. *Free Radical Biology and Medicine* **34**, 648-662
- Cevc, G. (1993) Phospholipids Handbook.
- Chandrashekar, J., Hoon, M. A., Ryba, N. J. P., and Zuker, C. S. (2006) The receptors and cells for mammalian taste. *Nature* **444**, 288-294
- Chandrashekar, J., Mueller, K. L., Hoon, M. A., Adler, E., Feng, L. X., Guo, W., Zuker, C. S., and Ryba, N. J. P. (2000) T2Rs function as bitter taste receptors. *Cell* **100**, 703-711
- Charlton, A. J., Baxter, N. J., Khan, M. L., Moir, A. J. G., Haslam, E., Davies, A. P., and Williamson, M. P. (2002) Polyphenol/peptide binding and precipitation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**, 1593-1601
- Charlton, A. J., Baxter, N. J., Lilley, T. H., Haslam, E., McDonald, C. J., and Williamson, M. P. (1996) Tannin interactions with a full-length human salivary proline-rich protein display a stronger affinity than with single proline-rich repeats. *Febs Letters* **382**, 289-292
- Chemicalize, 2003. Chemicalize.org. www.chemicalize.org [23 spectembre 2013]
- Chiantia, S., Kahya, N., Ries, J., and Schwille, P. (2006) Effects of ceramide on liquid-ordered domains investigated by simultaneous AFM and FCS. *Biophysical Journal* **90**, 4500-4508
- Chin, J. H., and Goldstein, D. B. (1977) Drug tolerance in biomembranes - spin label study of effects of ethanol. *Science* **196**, 684-685
- Connor, S. L., Zhu, N., Anderson, G. J., Hamill, D., Jaffe, E., Carlson, J., and Connor, W. E. (2000) Cheek cell phospholipids in human infants: a marker of docosahexaenoic and arachidonic acids in the diet, plasma, and red blood cells. *American Journal of Clinical Nutrition* **71**, 21-27
- Cray, J. A., Russell, J. T., Timson, D. J., Singhal, R. S., and Hallsworth, J. E. (2013) A universal measure of chaotropicity and kosmotropicity. *Environmental Microbiology* **15**, 287-296
- Cruciani, O., Mannina, L., Sobolev, A. P., Cametti, C., and Segre, A. (2006) An improved NMR study of liposomes using 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine as model. *Molecules* **11**, 334-344

~D~

- Dalgleish, D. G. (2006) Food emulsions - their structures and structure-forming properties. *Food Hydrocolloids* **20**, 415-422
- Davies, M. A., Brauner, J. W., Schuster, H. F., and Mendelsohn, R. (1990) A quantitative infrared determination of acyl chain conformation in gramicidin dipalmitoylphosphatidylcholine mixtures. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **168**, 85-90
- Davis, J. H. (1979) Deuterium magnetic-resonance study of the gel and liquid-crystalline phases of dipalmitoyl phosphatidylcholine. *Biophysical Journal* **27**, 339-358
- Davis, J. H. (1983) The description of membrane lipid conformation, order and dynamics by H-2-NMR. *Biochimica Et Biophysica Acta* **737**, 117-171
- Davis, J. H., Jeffrey, K. R., Bloom, M., Valic, M. I., and Higgs, T. P. (1976) Quadrupolar echo deuterium magnetic-resonance spectroscopy in ordered hydrocarbon chains. *Chemical Physics Letters* **42**, 390-394

Diaz-del-Consuelo, I., Jacques, Y., Pizzolato, G. P., Guy, R. H., and Falson, F. (2005) Comparison of the lipid composition of porcine buccal and esophageal permeability barriers. *Archives of Oral Biology* **50**, 981-987

Diller, A., Loudet, C., Aussenac, F., Raffard, G., Fournier, S., Laguerre, M., Grelard, A., Opella, S. J., Marassi, F. M., and Dufourc, E. J. (2009) Bicelles: A natural 'molecular goniometer' for structural, dynamical and topological studies of molecules in membranes. *Biochimie* **91**, 744-751

Dinnella, C., Recchia, A., Fia, G., Bertuccioli, M., and Monteleone, E. (2009) Saliva Characteristics and Individual Sensitivity to Phenolic Astringent Stimuli. *Chemical Senses* **34**, 295-304

Douliez, J. P., Leonard, A., and Dufourc, E. J. (1995) Restatement of order parameters in biomembranes - calculation of C-C bond order parameters from C-D quadrupolar splittings. *Biophysical Journal* **68**, 1727-1739

Douliez, J. P., Leonard, A., and Dufourc, E. J. (1996) Conformational order of DMPC sn-1 versus sn-2 chains and membrane thickness: An approach to molecular protrusion by solid state H-2-NMR and neutron diffraction. *Journal of Physical Chemistry* **100**, 18450-18457

Drelon, N. (2006) Elaboration et consolidation thermique de gels à base de substances émulsionnées cristallisables. Université de Bordeaux. Thèse.

Drewnowski, A., and Gomez-Carneros, C. (2000) Bitter taste, phytonutrients, and the consumer: a review. *American Journal of Clinical Nutrition* **72**, 1424-1435

Dufourc, E. J. (1986) La résonance magnétique nucléaire du deutérium et du phosphore dans les milieux organisés. Théorie et applications à l'étude de l'action de la mélittine et de la delta-lysine sur les membranes biologiques. Université de Bordeaux. Thèse.

Dufourc, E. J., Mayer, C., Stohrer, J., Althoff, G., and Kothe, G. (1992) Dynamics of phosphate head groups in biomembranes - comprehensive analysis using P-31 nuclear-magnetic-resonance lineshape and relaxation-time measurements. *Biophysical Journal* **61**, 42-57

Dufourc, E. J., Parish, E. J., Chitrakorn, S., and Smith, I. C. P. (1984) Structural and dynamical details of cholesterol lipid interaction as revealed by deuterium NMR. *Biochemistry* **23**, 6062-6071

Dufourc, E. J., and Smith, I. C. P. (1986) A detailed analysis of the motions of cholesterol in biological-membranes by h-2-nmr relaxation. *Chemistry and Physics of Lipids* **41**, 123-135

Dufourc, E. J., Smith, I. C. P., and Jarrell, H. C. (1983) A H-2-NMR analysis of dihydrostercuoyl-containing lipids in model membranes - structural effects of a cyclopropane ring. *Chemistry and Physics of Lipids* **33**, 153-177

~E~

Erbes, J., Czeslik, C., Hahn, W., Winter, R., Rappolt, M., and Rapp, G. (1994) On the existence of bicontinuous cubic phases in dioleoylphosphatidylethanolamine. *Berichte Der Bunsen-Gesellschaft-Physical Chemistry Chemical Physics* **98**, 1287-1293

~F~

Fabre, S., Pinaud, N., Fouquet, E., and Pianet, I. (2010) Colloidal behavior of wine galloylated tannins. *Comptes Rendus Chimie* **13**, 561-565

Faure, C. (1996). Effet comparé du sulfate de cholestérol et du cholestérol sur la formation, la dynamique et l'hydratation de bicouches lipidiques modèles. Une approche par RMN des solides, diffraction des rayons X et des neutrons. Université de Bordeaux. Thèse.

Feller, S. E., Brown, C. A., Nizza, D. T., and Gawrisch, K. (2002) Nuclear overhauser enhancement spectroscopy cross-relaxation rates and ethanol distribution across membranes. *Biophysical Journal* **82**, 1396-1404

Finegold, L. (1993) Cholesterol in membrane models. pp. 67-136

Fontoin, H., Saucier, C., Teissedre, P. L., and Glories, Y. (2008) Effect of pH, ethanol and acidity on astringency and bitterness of grape seed tannin oligomers in model wine solution. *Food Quality and Preference* **19**, 286-291

Foo, L. Y., and Porter, L. J. (1983) Synthesis and conformation of procyanidin diastereoisomers. *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 1*, 1535-1543

Fujimoto, T., Ohsaki, Y., Cheng, J., Suzuki, M., and Shinohara, Y. (2008) Lipid droplets: a classic organelle with new outfits. *Histochem. Cell Biol.* **130**, 263-279

~G~

GanemQuintanar, A., FalsonRieg, F., and Buri, P. (1997) Contribution of lipid components to the permeability barrier of oral mucosa. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **44**, 107-120

Gawel, R. (1998) Red wine astringency : a review. *Australian Journal of grape and wine research* **4**, 74-95

Gawel, R., Iland, P. G., and Francis, I. L. (2001) Characterizing the astringency of red wine: a case study. *Food Quality and Preference* **12**, 83-94

Genot, C., and Michalski, M.-C. (2010) Impact métabolique des structures et de l'oxydation des lipides dans les aliments. *Innovations agronomiques* **10**, 43-67

Glover, K. J., Whiles, J. A., Wu, G. H., Yu, N. J., Deems, R., Struppe, J. O., Stark, R. E., Komives, E. A., and Vold, R. R. (2001) Structural evaluation of phospholipid bicelles for solution-state studies of membrane-associated biomolecules. *Biophys. J.* **81**, 2163-2171

~H~

Hagerman, A. E., and Butler, L. G. (1981) The specificity of proanthocyanidin-protein interactions. *Journal of Biological Chemistry* **256**, 4494-4497

Hagerman, A. E., Rice, M. E., and Ritchard, N. T. (1998) Mechanisms of protein precipitation for two tannins, pentagalloyl glucose and epicatechin(16) (4 -> 8) catechin (procyanidin). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **46**, 2590-2595

Hahn, E. L. (1950) SPIN ECHOES. *Physical Review* **80**, 580-594

Harris, D., and Robinson, J. R. (1992) Drug delivery via the mucous-membranes of the oral cavity. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **81**, 1-10

Hashimoto, T., Kumazawa, S., Nanjo, F., Hara, Y., and Nakayama, T. (1999) Interaction of tea catechins with lipid bilayers investigated with liposome systems. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* **63**, 2252-2255

Haslam, E. (1988) Plant polyphenols (syn vegetable tannins) and chemical defense - a reappraisal. *Journal of Chemical Ecology* **14**, 1789-1805

Haslam, E., Lilley, T. H., Cai, Y., Martin, R., and Magnolato, D. (1989) Traditional herbal medicines - the role of polyphenols. *Planta Medica*, 1-8

Hatano, T., and Hemingway, R. W. (1997) Conformational isomerism of phenolic procyanidins: Preferred conformations in organic solvents and water. *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 2*, 1035-1043

Heimburg, T. (2000) A model for the lipid pretransition: Coupling of ripple formation with the chain-melting transition. *Biophysical Journal* **78**, 1154-1165

Hemingway, R. W., and Karchesy, J. J. (1989) *Chemistry and significance of condensed tannins*

He, Q., Shi, B., and Yao, K. (2006) Interactions of gallotannins with proteins, amino acids, phospholipids and sugars. *Food Chemistry* **95**, 250-254

Hill, S. Y., Zubenko, G. S., Gronlund, S., and Teply, I. (1991) Ethanol fluidizing effects on RBC membranes from children at risk for alcoholism. *Alcohol* **8**, 405-407

Holte, L. L., and Gawrisch, K. (1997) Determining ethanol distribution in phospholipid multilayers with MAS-NOESY spectra. *Biochemistry* **36**, 4669-4674

Hsueh, Y. W., Zuckermann, M., and Thewalt, J. (2005) Phase diagram determination for phospholipid/sterol membranes using deuterium NMR. *Concepts in Magnetic Resonance Part A* **26A**, 35-46

~I~

Iftime, A., Popescu, A., and Ganea, C. (2010) Effects of epigallocatechin gallate on artificial lipid membranes. *Romanian Journal of Biophysics* **20**, 323-334

Ikeda, K. (2002) New seasonings. *Chemical Senses* **27**, 847-849

Ipsen, J. H., Mouritsen, O. G., and Bloom, M. (1990) relationships between lipid-membrane area, hydrophobic thickness, and acyl-chain orientational order - the effects of cholesterol. *Biophysical Journal* **57**, 405-412

Israelachvili, J. N., Marcelja, S., and Horn, R. G. (1980) Physical principles of membrane organization. *Quarterly Reviews of Biophysics* **13**, 121-200

Israelachvili, J. N., Mitchell, D. J., and Ninham, B. W. (1976) Theory of self-assembly of hydrocarbon amphiphiles into micelles and bilayers. *Journal of the Chemical Society-Faraday Transactions II* **72**, 1525-1568

~J~

Jobstl, E., O'Connell, J., Fairclough, J. P. A., and Williamson, M. P. (2004) Molecular model for astringency produced by polyphenol/protein interactions. *Biomacromolecules* **5**, 942-949

Jourdes, M., Michel, J., Saucier, C., Quideau, S., and Teissedre, P. L. (2011) Identification, amounts, and kinetics of extraction of C-glucosidic ellagitannins during wine aging in oak barrels or in stainless steel tanks with oak chips. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **401**, 1531-1539

~K~

Kajiya, K., Kumazawa, S., and Nakayama, T. (2001) Steric effects on interaction of tea catechins with lipid bilayers. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* **65**, 2638-2643

Kajiya, K., Kumazawa, S., and Nakayama, T. (2002) Effects of external factors on the interaction of tea catechins with lipid bilayers. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* **66**, 2330-2335

- Kajiya, K., Kumazawa, S., Naito, A., and Nakayama, T. (2008) Solid-state NMR analysis of the orientation and dynamics of epigallocatechin gallate, a green tea polyphenol, incorporated into lipid bilayers. *Magnetic Resonance in Chemistry* **46**, 174-177
- Kallithraka, S., Bakker, J., and Clifford, M. N. (1997) Evaluation of the bitterness and astringency of (+) catechin and (-) epicatechin in red wine and model solution. *Journal of Sensory Studies* **12**, 25-38
- Kallithraka, S., Bakker, J., and Clifford, M. N. (1998) Evidence that salivary proteins are involved in astringency. *Journal of Sensory Studies* **13**, 29-43
- Kamihira, M., Nakazawa, H., Kira, A., Mizutani, Y., Nakamura, M., and Nakayama, T. (2008) Interaction of tea catechins with lipid bilayers investigated by a quartz-crystal microbalance analysis. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* **72**, 1372-1375
- Kaneda, H., Watari, J., Takashio, M., and Okahata, Y. (2002) Adsorption of tannins on lipid membrane in the presence of peptides as related to astringency. *Journal of Food Science* **67**, 3489-3492
- Kawamoto, H., and Nakatsubo, F. (1997) Effects of environmental factors on two-stage tannin-protein co-precipitation. *Phytochemistry* **46**, 479-483
- Kawamoto, H., Nakatsubo, F., and Murakami, K. (1995) Quantitative-determination of tannin and protein in the precipitates by high-performance liquid-chromatography. *Phytochemistry* **40**, 1503-1505
- Kinnamon, S. C., and Margolskee, R. F. (1996) Mechanisms of taste transduction. *Current Opinion in Neurobiology* **6**, 506-513
- Kirk, G. L., Gruner, S. M., and Stein, D. L. (1984) A thermodynamic model of the lamellar to inverse hexagonal phase-transition of lipid-membrane water-systems. *Biochemistry* **23**, 1093-1102
- Kitano, K., Nam, K. Y., Kimura, S., Fujiki, H., and Imanishi, Y. (1997) Sealing effects of (-)-epigallocatechin gallate on protein kinase C and protein phosphatase 2A. *Biophysical Chemistry* **65**, 157-164
- Koynova, R., Brankov, J., and Tenchov, B. (1997) Modulation of lipid phase behavior by kosmotropic and chaotropic solutes - Experiment and thermodynamic theory. *European Biophysics Journal with Biophysics Letters* **25**, 261-274
- Kucerka, N., Nieh, M. P., and Katsaras, J. (2011) Fluid phase lipid areas and bilayer thicknesses of commonly used phosphatidylcholines as a function of temperature. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes* **1808**, 2761-2771
- Kulkarni, C. V., Wachter, W., Iglesias-Salto, G., Engelskirchen, S., and Ahualli, S. (2011) Monoolein: a magic lipid? *Physical Chemistry Chemical Physics* **13**, 3004-3021
- Kumazawa, S., Kajiya, K., Naito, A., Saito, H., Tuzi, S., Tanio, M., Suzuki, M., Nanjo, F., Suzuki, E., and Nakayama, T. (2004) Direct evidence of interaction of a green tea polyphenol, epigallocatechin gallate, with lipid bilayers by solid-state nuclear magnetic resonance. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* **68**, 1743-1747



- Landon, J. L., Weller, K., Harbertson, J. F., and Ross, C. F. (2008) Chemical and sensory evaluation of astringency in Washington State red wines. *American Journal of Enology and Viticulture* **59**, 153-158
- Lawless, H. T., Corrigan, C. J., and Lee, C. B. (1994) Interactions of astringent substances. *Chemical Senses* **19**, 141-154

- Law, S., Wertz, P. W., Swartzendruber, D. C., and Squier, C. A. (1995) Regional variation in content, composition and organization of porcine epithelial barrier lipids revealed by thin-layer chromatography and transmission electron microscopy. *Archives of Oral Biology* **40**, 1085-1091
- Lee, B. W., Faller, R., Sum, A. K., Vattulainen, I., Patra, M., and Karttunen, M. (2005) Structural effects of small molecules on phospholipid bilayers investigated by molecular simulations. *Fluid Phase Equilibria* **228**, 135-140
- Lee, C. B., and Lawless, H. T. (1991) Time-course of astringent sensations. *Chemical Senses* **16**, 225-238
- Lewis, B. A., and Engelman, D. M. (1983) Lipid bilayer thickness varies linearly with acyl chain-length in fluid phosphatidylcholine vesicles. *J. Mol. Biol.* **166**, 211-217
- Lindblom, G., and Rilfors, L. (1989) Cubic phases and isotropic structures formed by membrane-lipids - possible biological relevance. *Biochimica Et Biophysica Acta* **988**, 221-256
- Lindemann, B. (1996) Taste reception. *Physiological Reviews* **76**, 719-766
- Lindemann, B., Ogiwara, Y., and Ninomiya, Y. (2002) The discovery of umami. *Chemical Senses* **27**, 843-844
- Long, J. R., Sun, B. Q., Bowen, A., and Griffin, R. G. (1994) Molecular-dynamics and magic-angle-spinning NMR. *J. Am. Chem. Soc.* **116**, 11950-11956
- Lopez, C., Briard-Bion, V., Menard, O., Rousseau, F., Pradel, P., and Besle, J. M. (2008) Phospholipid, sphingolipid, and fatty acid compositions of the milk fat globule membrane are modified by diet. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **56**, 5226-5236
- Loudet, C., Diller, A., Grelard, A., Oda, R., and Dufourc, E. J. (2010) Biphenyl phosphatidylcholine: A promoter of liposome deformation and bicelle collective orientation by magnetic fields. *Progress in Lipid Research* **49**, 289-297
- Luck, G., Liao, H., Murray, N. J., Grimmer, H. R., Warminski, E. E., Williamson, M. P., Lilley, T. H., and Haslam, E. (1994) Polyphenols, astringency and proline-rich proteins. *Phytochemistry* **37**, 357-371

~M~

- Marcotte, I., and Auger, M. (2005) Bicelles as model membranes for solid- and solution-state NMR studies of membrane peptides and proteins. *Concepts in Magnetic Resonance Part A* **24A**, 17-37
- Matsunami, H., Montmayeur, J. P., and Buck, L. B. (2000) A family of candidate taste receptors in human and mouse. *Nature* **404**, 601
- McManus, J. P., Davis, K. G., Lilley, T. H., and Haslam, E. (1981) The association of proteins with polyphenols. *Journal of the Chemical Society-Chemical Communications*, 309-311
- McMullen, T. P. W., and McElhaney, R. N. (1995) New aspects of the interaction of cholesterol with dipalmitoylphosphatidylcholine bilayers as revealed by high-sensitivity differential scanning calorimetry. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes* **1234**, 90-98
- McRae, J. M., and Kennedy, J. A. (2011) Wine and Grape Tannin Interactions with Salivary Proteins and Their Impact on Astringency: A Review of Current Research. *Molecules* **16**, 2348-2364
- Moncelli, M. R., Becucci, L., and Guidelli, R. (1994) The intrinsic pKa values for phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine, and phosphatidylserine in monolayers deposited on mercury electrodes. *Biophysical journal* **66**, 1969-1980

Mueller, K. L., Hoon, M. A., Erlenbach, I., Chandrashekar, J., Zuker, C. S., and Ryba, N. J. P. (2007) The receptors and coding logic for bitter taste (vol 434, 225, 2005). *Nature* **446**, 342-342

Murray, N. J., Williamson, M. P., Lilley, T. H., and Haslam, E. (1994) Study of the interaction between salivary proline-rich proteins and a polyphenol by ¹H-NMR spectroscopy. *European Journal of Biochemistry* **219**, 923-935

Muzolf, M., Szymusiak, H., Gliszczynska-Swiglo, A., Rietjens, I., and Tyrakowska, B. E. (2008) pH-dependent radical scavenging capacity of green tea catechins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **56**, 816-823

~N~

Nakayama, T., Ono, K., and Hashimoto, K. (1998) Affinity of antioxidative polyphenols for lipid bilayers evaluated with a liposome system. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* **62**, 1005-1007

Noble, A. C. (1994) Bitterness in wine. *Physiology & Behavior* **56**, 1251-1255

Noble, A. (1998) Why do wines taste better and feel astringent ? In *Chemistry of Wine Flavor* (Waterhouse, A., and Ebeler, S., eds) Vol. 714 pp. 156-165, ACS Symposium Series

~O~

Oh, H. I., Hoff, J. E., Armstrong, G. S., and Haff, L. A. (1980) Hydrophobic interaction in tannin-protein complexes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **28**, 394-398

Ohvo-Rekila, H., Ramstedt, B., Leppimaki, P., and Slotte, J. P. (2002) Cholesterol interactions with phospholipids in membranes. *Progress in Lipid Research* **41**, 66-97

Ollila, F., Halling, K., Vuorela, P., Vuorela, H., and Slotte, J. P. (2002) Characterization of flavonoid-biomembrane interactions. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **399**, 103-108

~P~

Pandey, S., Kumar, S., Prajapati, S. K., and Satheev Madhav, N. V. (2010) An overview on taste physiology and masking of bitter drugs. *International Journal of Pharma and Bio Sciences* **1**, 1-11

Patra, M., Salonen, E., Terama, E., Vattulainen, I., Faller, R., Lee, B. W., Holopainen, J., and Karttunen, M. (2006) Under the influence of alcohol: The effect of ethanol and methanol on lipid bilayers. *Biophysical Journal* **90**, 1121-1135

Peet, M., Murphy, B., Shay, J., and Horrobin, D. (1998) Depletion of omega-3 fatty acid levels in red blood cell membranes of depressive patients. *Biological Psychiatry* **43**, 315-319

Peleg, H., Gacon, K., Schlich, P., and Noble, A. C. (1999) Bitterness and astringency of flavan-3-ol monomers, dimers and trimers. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **79**, 1123-1128

Pianet, I., Andre, Y., Ducasse, M. A., Tarascou, I., Lartigue, J. C., Pinaud, N., Fouquet, E., Dufourc, E. J., and Laguerre, M. (2008) Modeling procyanidin self-association processes and understanding their micellar organization: A study by diffusion NMR and molecular mechanics. *Langmuir* **24**, 11027-11035

~Q~

Quideau, S., Deffieux, D., Douat-Casassus, C., and Pouysegou, L. (2011) Plant Polyphenols: Chemical Properties, Biological Activities, and Synthesis. *Angewandte Chemie-International Edition* **50**, 586-621

~R~

- Raffard, G., Steinbruckner, S., Arnold, A., Davis, J. H., and Dufourc, E. J. (2000) Temperature-composition diagram of dimyristoylphosphatidylcholine-dicaproylphosphatidylcholine "bicelles" self-orienting in the magnetic field. A solid state H-2 and P-31 NMR study. *Langmuir* **16**, 7655-7662
- Rance, M., and Byrd, R. A. (1983) Obtaining high-fidelity spin-1/2 powder spectra in anisotropic media - phase-cycled hahn echo spectroscopy. *Journal of Magnetic Resonance* **52**, 221-240
- Raynal-Ljutovac, K., Bouvier, J., Gayet, C., Simon, N., Joffre, F., Fine, F., Vendevre, J.-L., Lopez, C., Chardigny, J.-M., Michalski, M.-C., Genot, C., and Lissal, M. D. R. (2011) Organisation structurale et moléculaire des lipides dans les aliments : impacts possibles sur leur digestion et leur assimilation par l'Homme. *OCL* **18**, 324-351
- Ricardo-Da-Silva, J. M., Rosec, J. P., Bourzeix, M., Mourgues, J., and Moutounet, M. (1992) Dimer and trimer procyanidins in carignan and mourvedre grapes and red wines. *Vitis* **31**, 55-63
- Rossetti, D., Bongaerts, J. H. H., Wantling, E., Stokes, J. R., and Williamson, A. M. (2009) Astringency of tea catechins: More than an oral lubrication tactile percept. *Food Hydrocolloids* **23**, 1984-1992
- Rouser, G., Fleische, S., and Yamamoto, A. (1970) 2 dimensional thin layer chromatographic separation of polar lipids and determination of phospholipids by phosphorus analysis of spots. *Lipids* **5**, 494-&

~S~

- Sankaram, M. B., and Thompson, T. E. (1991) Cholesterol-induced fluid-phase immiscibility in membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**, 8686-8690
- Scheidt, H. A., Pampel, A., Nissler, L., Gebhardt, R., and Huster, D. (2004) Investigation of the membrane localization and distribution of flavonoids by high-resolution magic angle spinning NMR spectroscopy. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes* **1663**, 97-107
- Schwarz, B., and Hofmann, T. (2008) Is there a direct relationship between oral astringency and human salivary protein binding? *European Food Research and Technology* **227**, 1693-1698
- Seelig, J. (1977) Deuterium magnetic-resonance - theory and application to lipid-membranes. *Quarterly Reviews of Biophysics* **10**, 353-418
- Shojaei, A. H. (1998) Buccal mucosa as a route for systemic drug delivery: a review. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Science* **1**, 15-30
- Sikorski, Z. E., and Kolakowska, A. (2002) *Chemical and functional properties of food lipids*
- Simon, C., Barathieu, K., Laguerre, M., Schmitter, J., Fouquet, E., Pianet, I., and Dufourc, E. J. (2003) Three-dimensional structure and dynamics of wine tannin-saliva protein complexes. A multitechnique approach. *Biochemistry* **42**, 10385-10395
- Simon, S. A., Disalvo, E. A., Gawrisch, K., Borovyagin, V., Toone, E., Schiffman, S. S., Needham, D., and McIntosh, T. J. (1994) Increased adhesion between neutral lipid bilayers - interbilayer bridges formed by tannic-acid. *Biophysical Journal* **66**, 1943-1958
- Singleton V, L., and Noble A, C. (1976) Wine Flavor and Phenolic Substances. In *Phenolic, Sulfur, and Nitrogen Compounds in Food Flavors* Vol. 26 pp. 47-70, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY

- Sirk, T. W., Brown, E. F., Sum, A. K., and Friedman, M. (2008) Molecular dynamics study on the biophysical interactions of seven green tea catechins with lipid bilayers of cell membranes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **56**, 7750-7758
- Squier, C. A., Cox, P., and Wertz, P. W. (1991) Lipid-content and water permeability of skin and oral-mucosa. *Journal of Investigative Dermatology* **96**, 123-126
- Strenk, L. M., Westerman, P. W., and Doane, J. W. (1985) A model of orientational ordering in phosphatidylcholine bilayers based on conformational-analysis of the glycerol backbone region. *Biophysical Journal* **48**, 765-773
- Sun, Y., Hung, W. C., Chen, F. Y., Lee, C. C., and Huang, H. W. (2009) Interaction of Tea Catechin (-)-Epigallocatechin Gallate with Lipid Bilayers. *Biophysical Journal* **96**, 1026-1035

~T~

- Taillandier, P., and Bonnet, J. (2005) *Le vin : composition et transformations chimiques*
- Takahashi, H., Matsuo, A., and Hatta, I. (2000) Effects of chaotropic and kosmotropic solutes on the structure of lipid cubic phase: Monoolein-water systems. *Molecular Crystals and Liquid Crystals* **347**, 475-482
- Takaoka, Y., Pasenkiewicz-Gierula, M., Miyagawa, H., Kitamura, K., Tamura, Y., and Kusumi, A. (2000) Molecular dynamics generation of nonarbitrary membrane models reveals lipid orientational correlations. *Biophysical Journal* **79**, 3118-3138
- Tamba, Y., Ohba, S., Kubota, M., Yoshioka, H., Yoshioka, H., and Yamazaki, M. (2007) Single GUV method reveals interaction of tea catechin (-)-epigallocatechin gallate with lipid membranes. *Biophysical Journal* **92**, 3178-3194
- Tarascou, I., Barathieu, K., Simon, C., Ducasse, M. A., Andre, Y., Fouquet, E., Dufourc, E. J., de Freitas, V., Laguerre, M., and Pianet, I. (2006) A 3D structural and conformational study of procyanidin dimers in water and hydro-alcoholic media as viewed by NMR and molecular modeling. *Magnetic Resonance in Chemistry* **44**, 868-880
- Terashi, H., Izumi, K., Rhodes, L. M., and Marcelo, C. L. (2000) Human stratified squamous epithelia differ in cellular fatty acid composition. *Journal of Dermatological Science* **24**, 14-24
- Thompson, I. O. C., van der Bijl, P., van Wyk, C. W., and van Eyk, A. D. (2001) A comparative light-microscopic, electron-microscopic and chemical study of human vaginal and buccal epithelium. *Archives of Oral Biology* **46**, 1091-1098
- Thorngate, J. H. (1993) Flavan-3-ols and Their Polymers. In *Beer and Wine Production* (Gump, B.H., and Pruet, D.J., eds) Vol. 536 pp. 51-63, ACS Symposium Series
- Thorngate, J. H., and Noble, A. C. (1995) Sensory evaluation of bitterness and astringency of 3R(-)-epicatechin and 3S(+)-catechin. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **67**, 531-535
- Thorngate, J. H., and Singleton V, L. (1994) Localization of procyanidins in grape seeds. *American Journal of Enology and Viticulture* **45**, 259-262
- Thurmond, R. L., Lindblom, G., and Brown, M. F. (1993) Curvature, order, and dynamics of lipid hexagonal phases studied by deuterium NMR-spectroscopy. *Biochemistry* **32**, 5394-5410
- Tsuchiya, H. (1999) Effects of green tea catechins on membrane fluidity. *Pharmacology* **59**, 34-44
- Tsuchiya, H. (2001) Stereospecificity in membrane effects of catechins. *Chemico-Biological Interactions* **134**, 41-54

Tsuchiya, H., Tanaka, T., and Nagayama, M. (2008) Antiproliferative effects associated with membrane lipid interaction of green tea catechins. *Journal of Health Science* **54**, 576-580

~U~

Uekusa, Y., Kamihira-Ishijima, M., Sugimoto, O., Ishii, T., Kumazawa, S., Nakamura, K., Tanji, K., Naito, A., and Nakayama, T. (2011) Interaction of epicatechin gallate with phospholipid membranes as revealed by solid-state NMR spectroscopy. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes* **1808**, 1654-1660

Uekusa, Y., Kamihira, M., and Nakayama, T. (2007) Dynamic behavior of tea catechins interacting with lipid membranes as determined by NMR spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **55**, 9986-9992

Uekusa, Y., Takeshita, Y., Ishii, T., and Nakayama, T. (2008) Partition Coefficients of Polyphenols for Phosphatidylcholine Investigated by HPLC with an Immobilized Artificial Membrane Column. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* **72**, 3289-3292

Ulrih, N. P., Ota, A., Sentjerc, M., Kure, S., and Abram, V. (2010) Flavonoids and cell membrane fluidity. *Food Chemistry* **121**, 78-84

~V~

Veatch, S. L., and Keller, S. L. (2002) Organization in lipid membranes containing cholesterol. *Physical Review Letters* **89**:268101.

Vist, M. R., and Davis, J. H. (1990) phase-equilibria of cholesterol dipalmitoylphosphatidylcholine mixtures - H-2 nuclear magnetic-resonance and differential scanning calorimetry. *Biochemistry* **29**, 451-464

~W~

Warschawski, D. E., Arnold, A. A., Beaugrand, M., Gravel, A., Chartrand, E., and Marcotte, I. (2011) Choosing membrane mimetics for NMR structural studies of transmembrane proteins. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes* **1808**, 1957-1974

White, T. (1957) Tannins - their occurrence and significance. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **8**, 377-385

~Y~

Yeagle, P. C. (1988) *The Biology of Cholesterol*. pp. 121-146

Yoshida, S., Okazaki, Y., Yamashita, T., Ueda, H., Ghadimi, R., Hosono, A., Tanaka, T., Kuriki, K., Suzuki, S., and Tokudome, S. (2008) Analysis of human oral mucosa ex vivo for fatty acid compositions using fourier-transform infrared spectroscopy. *Lipids* **43**, 361-372

Yu, X. T., Chu, S. D., Hagerman, A. E., and Lorigan, G. A. (2011) Probing the Interaction of Polyphenols with Lipid Bilayers by Solid-State NMR Spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **59**, 6783-6789

~Z~

Zhendre, V., Grelard, A., Garnier-Lhomme, M., Buchoux, S., Larijani, B., and Dufourc, E. J. (2011) Key Role of Polyphosphoinositides in Dynamics of Fusogenic Nuclear Membrane Vesicles. *Plos One* **6**:e233859.

Liste des annexes

Annexe 1 : Détermination des constantes d'auto-association des tannins K_{aa} d'après un modèle d'empilement isodesmique (d'après Pianet, HDR)

Annexe 2 : Structures chimiques

Annexe 3 : Test phosphate

Annexe 4 : Paramètres des simulations ($\Delta\nu_O$, $\nu_{1/2}$ et P) utilisés pour simuler les spectres de RMN du deutérium relatifs aux systèmes EGCG/MLV (chapitre III) et aux précipités des systèmes C/MLV et C/Bicelle (chapitre V) à l'aide d'un programme FORTRAN (Dufourc, non publié)

Annexe 5 : Détermination de la constante d'association tannin-lipide par l'équation de Baxter (d'après Pianet, HDR, tirée de Baxter et al. 1996, 1997)

Annexe 6 : Spectres RMN du deutérium et du phosphore de différentes phases lipidiques

Annexe 7 : Moments spectraux en fonction de la température (chapitre III)

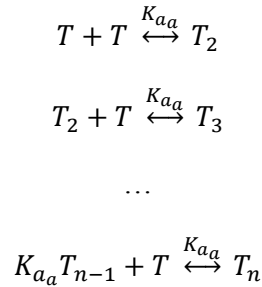
Annexe 8 : Déplacements chimiques en fonction de la concentration en tannin inséré (chapitre III)

Annexe 9 : Paramètres d'ordre $2|S_{CD}|$

Annexe 1 : Détermination des constantes d'auto-association des tannins K_{a_a} d'après un modèle d'empilement isodesmique (d'après Pianet, HDR)

Mesure de K_{a_a} d'après un modèle d'empilement isodesmique :

Le modèle isodesmique d'auto-association des tannins est basé sur l'hypothèse que les tannins peuvent s'associer par empilement (deux tannins s'auto-associant formant des dimères T_2 , trois des trimères T_3, \dots , et n , des n -mères T_n) ou la constante d'équilibre K_{a_a} pour chaque étape est la même :



K_{a_a} s'écrit donc :

$$K_{a_a} = \frac{[T_2]}{[T]^2} = \frac{[T_3]}{[T_2][T]} = \dots = \frac{[T_n]}{[T_{n-1}][T]} \quad (\text{A.1})$$

On peut déduire d'après ces relations que :

$$[T] + [T_2] + [T_3] + \dots + [T_n] = \sum [T_n] = T + K_{a_a}[T]([T] + [T_2] + [T_3] + \dots + [T_n])$$

Et donc :

$$\sum [T_n] = T + K_{a_a}[T] \sum [T_n]$$

Soit :

$$\sum [T_n] = \frac{[T]}{1 - K_{a_a}[T]} \quad (\text{A.2})$$

D'autre part, si on appelle $[T]_0$ la concentration totale de tannins capables de s'auto-associer, on peut écrire :

$$[T]_0 = [T] + 2[T_2] + 3[T_3] + 4[T_4] + \dots + n[T_n] = \sum n[T_n] \quad (\text{A.3})$$

Des équations (A.1) et (A.3), on peut écrire :

$$[T]_0 = [T](1 + 2K_{a_a}[T_2] + 3K_{a_a}^2[T_3]^2 + 4K_{a_a}^3[T_4]^3 + \dots + nK_{a_a}^{n-1}[T]^{n-1})$$

$$[T]_0 = [T] + K_{a_a}[T](2[T] + 3[T_2] + 4[T_3] + \dots + n[T_{n-1}])$$

$$[T]_0 = [T] + K_{a_a}[T]([T] + [T_2] + [T_3] + \dots + [T_n])([T] + 2[T] + 3[T_2] + 4[T_3] + \dots + n[T_n])$$

Soit :

$$[T]_0 = [T] + [T]K_{aa}(\sum[T_n] + [T]_0) \quad (\text{A.4})$$

Donc, en insérant l'équation (A.2) dans l'équation (A.4), on trouve :

$$[T]_0 = \frac{[T]}{(1 - K_{aa}[T])^2} \quad (\text{A.5})$$

Ou encore :

$$[T] = [T]_0 \left(\frac{2}{1 + \sqrt{1 + 4K_{aa}[T]_0}} \right)^2 \quad (\text{A.6})$$

D'autre part, si on fait l'hypothèse que la variation de déplacement chimique observée pour un tannin fixé à une extrémité de l'empilement est égale à la moitié de la variation de déplacement chimique d'un tannin se trouvant au milieu de l'empilement, on peut écrire la relation suivante, pour un n donné :

$$\delta_{tn} = \frac{(n-2)\delta_{micelle} + \frac{2\delta_{micelle}}{2} + \delta_{libre}}{n}$$

Ou encore :

$$\delta_{tn} = \frac{(n-1)\delta_{micelle} + \delta_{libre}}{n}$$

Où δ_{libre} représente le déplacement chimique du tannin T non associé, et $\delta_{micelle}$, le déplacement chimique quand tous les tannins sont associés.

Ainsi, la contribution de :

$$\text{T est : } \delta_{libre} \left(\frac{[T]}{[T]_0} \right)$$

$$\text{T}_2 : (\delta_{micelle} + \delta_{libre}) \frac{1}{2} \left(\frac{2[T_2]}{[T]_0} \right)$$

$$\text{T}_3 : (2\delta_{micelle} + \delta_{libre}) \frac{1}{3} \left(\frac{3[T_3]}{[T]_0} \right)$$

$$\text{T}_n : [(n-1)\delta_{micelle} + \delta_{libre}] \frac{1}{n} \left(\frac{n[T_n]}{[T]_0} \right)$$

Et donc le déplacement chimique δ observé sera :

$$\delta = \delta_{libre} \left(\frac{[T] + [T_2] + [T_3] + \dots + [T_n]}{[T]_0} \right) + \delta_{micelle} \left(\frac{[T_2] + 2[T_3] + 3[T_4] + \dots + (n-1)[T_n]}{[T]_0} \right)$$

$$\delta = \delta_{libre} \left(\frac{\sum[T_n]}{[T]_0} \right) + \delta_{micelle} \left(\frac{\sum n[T_n] - \sum[T_n]}{[T]_0} \right)$$

$$\delta - \delta_{libre} = \left(\frac{\delta_{micelle} - \delta_{libre}}{[T]_0} \right) ([T]_0 - \sum[T_n])$$

$$\delta - \delta_{libre} = \left(\frac{\delta_{micelle} - \delta_{libre}}{[T]_0} \right) \left[\left(\frac{[T]}{1 - K_{a_a}[T]} \right)^2 - \frac{[T]}{1 - K_{a_a}[T]} \right]$$

$$\delta - \delta_{libre} = (\delta_{micelle} - \delta_{libre}) K_{a_a} [T]$$

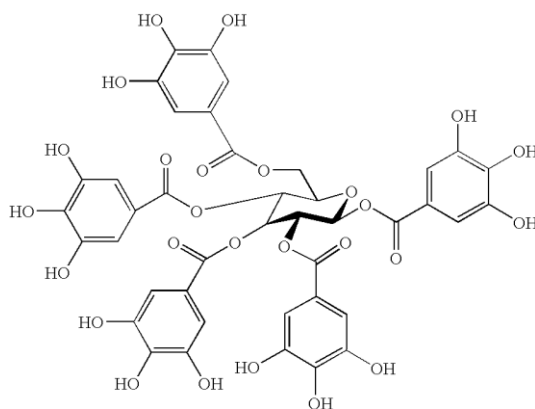
Et si on remplace [T] par l'équation (A.6), on trouve :

$$\delta - \delta_{libre} = (\delta_{micelle} - \delta_{libre}) K_{a_a} [T]_0 \left(\frac{2}{1 + \sqrt{1 + 4K_{a_a}[T]_0}} \right)^2 \quad (\mathbf{A.7})$$

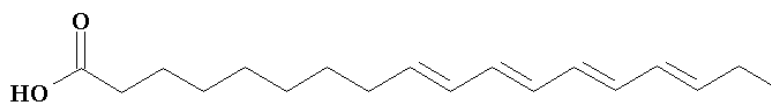
où δ représente le déplacement chimique observé, δ_{libre} , le déplacement chimique du tannin non associé et $\delta_{micelle}$, le déplacement chimique de l'agrégat de tannin saturé.

Annexe 2 : Structures chimiques

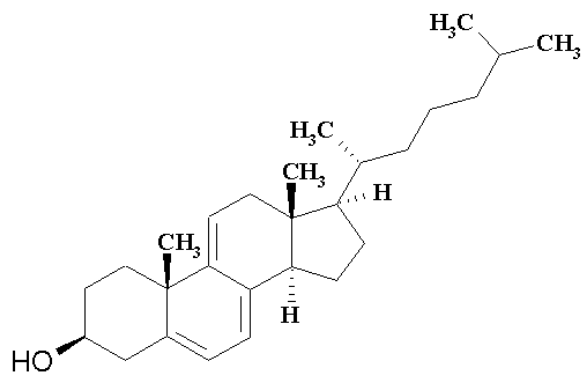
- ❖ PGG : 1,2,3,4,6-penta-*O*-galloyl- β -Dglucopyranose



- ❖ Acide parinarique



- ❖ Cholestatrienol : Cholesta-5,7,9(11)-trien-3 β -ol



Annexe 3 : Test phosphate

D'après Rouser, G., Fleisher, S., Yamamoto, A. (1970). *Lipids*, 5(5), 494-496.

Principe :

La détermination du phosphore inorganique s'effectue en deux étapes. La première consiste en une hydrolyse acide des phosphates présents dans l'échantillon. Dans la seconde étape, l'ion orthophosphate réagit avec l'ion molybdate pour former un complexe phosphomolybdate. Ce dernier est réduit avec l'acide ascorbique en milieu acide pour provoquer l'apparition du bleu de molybdène, dont l'absorbance à 660 nm est proportionnelle à la concentration de l'ion orthophosphate présent dans l'échantillon.

Produits chimiques :

- Dihydrogénophosphate de sodium NaH_2PO_4 à 20 mM (au frigo, étagère du bas, portoir jaune)
- Molybdate d'ammonium $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}, 4\text{H}_2\text{O}$ à 2.5% (au frigo sur le même portoir que NaH_2PO_4)
 - 1.25 g + 50 mL d' H_2O (si préparation à faire)
- Acide perchlorique HClO_4 à 70% (armoire ventilée, ref n°93, étagère E)
- Acide ascorbique (vitamine C) $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ (grande armoire blanche, tiroir du haut, n°33)
- H_2O Milli-Q (dans salle des armoires ventilées)

Protocole :

1/ Utiliser tubes en borosilicate jetables 16*125

- 2 tubes pour chaque échantillon
- 7 tubes pour la gamme étalon (à refaire à chaque test).

Placer les 9 tubes sur le portoir.

2/ Préchauffez le bain à sec à 180°C pendant 30 min.

3/ Préparation de la gamme étalon

- Préparer 400 μL de solution de NaH_2PO_4 à 1 mM.
 - 20 μL de solution de NaH_2PO_4 à 20 mM + 380 μL d' H_2O .
- Mettre dans 7 tubes différents 0, 5, 10, 20, 40, 80 et 160 μL de solution NaH_2PO_4 1 mM correspondant à 0, 5, 10, 20, 40, 80 et 160 nmol.

Tubes	Gamme étalon en phosphate						
	0	1	2	3	4	5	6
NaH_2PO_4 1 mM (μL)	0	5	10	20	40	80	160
$n(\text{PO}_4^{3-})$ (nmol)	0	5	10	20	40	80	160

4/ Préparation des échantillons de lipides

Le nombre de mole doit être compris dans la gamme, soit entre 0 et 160 nmol. Pour le dosage de LUV de phospholipides, se placer autour de 50nmol.

Tubes	Echantillons	
	7	8
n(PO ₄ ³⁻) (nmol)	~ 50	~ 50

4/ Séchez les tubes au bain à sec pendant 15-20 minutes.

5/ Refroidir ensuite les échantillons sous hotte à température ambiante (5-10 min).

6/ Hydrolyse à l'acide perchlorique sous hotte

- Verser environ 2-3 mL dans un petit bécher
- Verser 300 µL dans chaque tube et fermer le tube avec une bille.
- Vortexer quelques secondes

7/ Placer les tubes au bain à sec à 180°C pendant 30min (à mesurer au timer).

8/ Préparation de la vitamine C à 10% (pendant les 30min de bain à sec)

- 0.5 g d'acide ascorbique + 5 mL d'H₂O. La pesée est effectuée dans un tube à hémolyse.
- Mettre le tube à l'appareil rotatif afin de mélanger le tout.

9/ Préparer le bain-marie à 100°C

10/ Sortir les tubes du bain à sec et laissez refroidir à température ambiante

11/ Ajouter 1.4 mL d'eau Milli-Q sous hôte et vortexer. Garder la bille jusqu'à l'étape finale.

NB : Les étapes suivantes (12 et 13) doivent être effectuées très rapidement.

12/ Ajouter 200 µL de molybdate d'ammonium à 2.5% et vortexer.

13/ Ajouter 200 µL de vitamine C à 10% et vortexer. Placer ensuite les tubes dans le portoir circulaire.

14/ Plonger le portoir circulaire dans le bain-marie et attendre 5 minutes précisément (à mesurer au timer).

15/ Refroidir dans la glace puis transvaser les échantillons dans les cuves spectrophotométriques.

16/ Mesurer l'absorbance à 797 nm pour tous les échantillons contre le blanc.

- Choisir « Mode basique » : appuyer sur 1
- Choisir « Absorbance » : appuyer sur 1
- Entrer la valeur d'absorbance de travail : 797 nm.

Vérifier qu'il n'y a pas de bulles au niveau du trajet optique. Sécher les parois pour éviter une éventuelle condensation

Réactifs	Blanc (tube 0)
Acide perchlorique 70%	300 µL
H ₂ O	1.4 mL
Molybdate d'ammonium 2.5%	200 µL
Vitamine C 10%	200 µL

Annexe 4 : Paramètres des simulations ($\Delta\nu_0$, $\nu_{1/2}$ et P) utilisés pour simuler les spectres de RMN du deutérium relatifs aux systèmes EGCG/MLV (chapitre III) et aux précipités des systèmes C/MLV et C/Bicelle (chapitre V) à l'aide d'un programme FORTRAN (Dufourc, non publié)

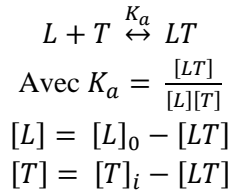
Position du carbone	MLV/EGCG			Poids
	$\Delta\nu_0$ (kHz)	$\Delta\nu_0$ (kHz)	$\Delta\nu_{1/2}$ (Hz)	
	exp	simulation		
2S/2R	nd	nd	nd	1/1
3	22.69	24.26	700	2
4	22.69	23.34	700	2
5	22.69	22.94	700	2
6	22.69	22.21	600	2
7	21.32	21.61	600	2
8	20.11	20.41	500	2
9	17.53	17.82	500	2
10	16.20	16.34	450	2
11	13.90	14.22	450	2
12	11.72	11.92	400	2
13	8.80	8.96	400	2
14	2.64	2.70	125	3

Position du carbone	C/MLV : phase L_α			C/Bicelle : phase H_{II}			Poids
	$\Delta\nu_0$ (kHz)	$\Delta\nu_0$ (kHz)	$\Delta\nu_{1/2}$ (Hz)	$\Delta\nu_0$ (kHz)	$\Delta\nu_0$ (kHz)	$\Delta\nu_{1/2}$ (Hz)	
	exp	simulation		exp	simulation		
2S*	nd	12.18	1200	nd	2.76	1200	1
2R*	nd	19.05	1200	nd	6.81	1200	1
3	20.20	20.66	400	nd	9.48	1000	2
4	20.20	20.60	400	nd	8.9	900	2
5	20.20	20.55	400	nd	8.34	800	2
6	20.20	20.40	400	nd	7.80	800	2
7	18.58	18.66	400	nd	7.18	700	2
8	17.82	17.90	400	nd	6.60	700	2
9	15.87	16.17	400	nd	5.83	700	2
10	14.71	14.97	350	nd	5.36	700	2
11	12.85	13.04	350	nd	4.21	700	2
12	11.19	11.23	350	3.71	3.76	400	2
13	8.25	8.42	350	2.60	2.70	250	2
14	2.25	2.5	180	0.61	0.72	80	3

nd = non déterminé

Annexe 5 : Détermination de la constante d'association tannin-lipide par l'équation de Baxter (d'après Pianet, HDR, tirée de Baxter et al. 1996, 1997)

Lorsqu'une interaction s'effectue entre un ligand (ici le tannin) et son hôte (ici le lipide), l'environnement chimique de certains protons de celui-ci va s'en trouver modifié. On observera alors un changement dans la valeur des déplacements chimiques de ces protons. On peut ainsi suivre les variations de déplacement chimique des protons du lipide en fonction de la concentration en tannin ajouté. Ceci nous permet de mesurer la constante d'association relative à l'interaction tannin-lipide dans le cas d'une fixation spécifique, c'est-à-dire lorsque l'on a l'équilibre suivant :



et

Dans le cas d'un échange rapide, à l'échelle de temps de la RMN, un seul déplacement chimique est observé, δ_{obs} , qui correspond à :

$$\delta_{obs} = \left(\frac{[L]}{[L]_0} \right) \delta_L + \left(\frac{[LT]}{[L]_0} \right) \delta_{LT}$$

Si on note $\Delta\delta_{max} = \delta_L - \delta_{LT}$, on peut écrire la variation de déplacement chimique $\Delta\delta$ à une concentration en tannin et en lipide fixées de la façon suivante :

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

$$\Delta\delta = \delta_L - \left[\left(\frac{[L]}{[L]_0} \right) \delta_L + \left(\frac{[LT]}{[L]_0} \right) \delta_{LT} \right]$$

$$\Delta\delta = \left(\frac{[L]_0 - [L]}{[L]_0} \right) \delta_L - \left(\frac{[LT]}{[L]_0} \right) \delta_{LT}$$

$$\Delta\delta = \left(\frac{[LT]}{[L]_0} \right) \delta_L - \left(\frac{[LT]}{[L]_0} \right) \delta_{LT}$$

Soit :

$$\Delta\delta = \Delta\delta_{max} \left(\frac{[LT]}{[L]_0} \right) \tag{A.7}$$

De l'ensemble de ces équations, on peut écrire la relation suivante :

$$K_a = \frac{[LT]}{([L]_0 - [LT])([T]_i - [LT])}$$

Soit :

$$[LT]^2 - [LT] \left([T]_i [L]_0 + \frac{1}{K_a} \right) + [L]_0 [T]_i = 0$$

Donc :

$$\frac{[LT]}{[L]_0} = \frac{1}{2} \left(1 + \frac{[T]_i}{[L]_0} + \frac{1}{[L]_0 K_a} - \left\{ \left(1 + \frac{[T]_i}{[L]_0} + \frac{1}{[L]_0 K_a} \right)^2 - \frac{4[T]_i}{[L]_0} \right\}^{1/2} \right)$$

Si on intègre cette dernière équation dans l'équation (A.7), on obtient :

$$\Delta\delta = \frac{1}{2} \Delta\delta_{max} \left\{ \left(1 + \frac{[T]_i}{[L]_0} + \frac{1}{[L]_0 K_a} \right) - \left[\left(1 + \frac{[T]_i}{[L]_0} + \frac{1}{[L]_0 K_a} \right)^2 - \frac{4[T]_i}{[L]_0} \right]^{1/2} \right\} \tag{A.8}$$

Cette équation peut être étendue à la fixation indépendante de n tannins sur le lipide à condition que chaque site de fixation ait la même affinité pour le tannin et s'écrit donc :

$$\Delta\delta = \frac{1}{2}\Delta\delta_{max} \left\{ \left(1 + \frac{[T]_i}{n[L]_0} + \frac{1}{n[L]_0K_a} \right) - \left[\left(1 + \frac{[T]_i}{n[L]_0} + \frac{1}{n[L]_0K_a} \right)^2 - \frac{4[T]_i}{n[L]_0} \right]^{1/2} \right\} \quad (\text{A.9})$$

où n représente le nombre de tannins fixés par lipide, $[L]_0$ la concentration totale de lipide et $[T]_i$ la quantité de tannin disponible compte tenu de sa capacité à s'auto-associer :

$$[T]_i = \frac{[T]}{(1 - K_{a_a}[T])}$$

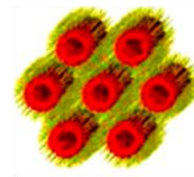
Et

$$[T] = \frac{(1 + 2K_{a_a}[T]_0) + (1 + 4K_{a_a}[T]_0)^{1/2}}{2[T]_0K_{a_a}^2}$$

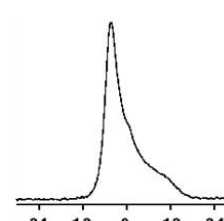
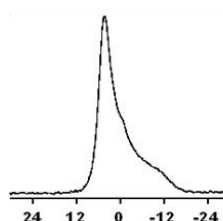
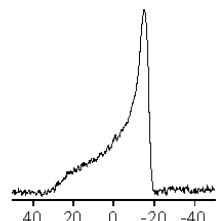
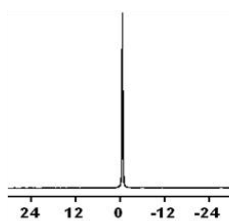
où $[T]_0$ représente la concentration totale en tannin et K_{a_a} la constante d'association décrite dans l'annexe 1.

Annexe 6 : Spectres RMN du deutérium et du phosphore de différentes phases lipidiques

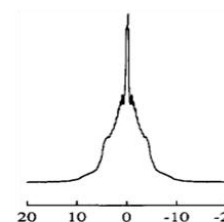
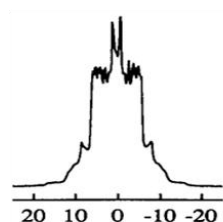
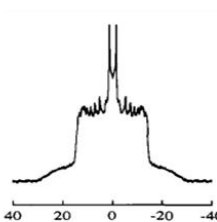
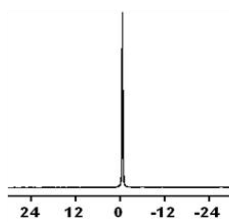
Lipid phase



³¹P chemical shift (ppm)



²H chemical shift (kHz)



Isotropic

Lamellar

Hexagonal I

Hexagonal II

Annexe 7 : Moments spectraux en fonction de la température (chapitre III)

1/ MLV de DMPC-d₂₇

T (°C)	DMPC		C/DMPC		EC/DMPC		EGCG/DMPC	
	M ₁ (kHz)	Erreur (+/-)	M ₁ (kHz)	Erreur (+/-)	M ₁ (kHz)	Erreur (+/-)	M ₁ (kHz)	Erreur (+/-)
10	112	4	109.5	1	109	4	110	2
15	104	1	102	1	99.3	1.5	102	0.5
20	92.5	1.5	54	0.5	53	0.5	48	1
25	55	1	47	1	47.2	0.2	44	1
30	50	0.5	44.5	0.5	44.4	0.3	41.5	1.5
35	46.5	1	41.5	1	41	0.2	39.4	0.2
40	44	0.6	40	0.25	38.7	0.3	36.5	0.2

T (°C)	DMPC		C/DMPC		EC/DMPC		EGCG/DMPC	
	M ₂ (kHz ²)	Erreur (+/-)	M ₂ (kHz ²)	Erreur (+/-)	M ₂ (kHz ²)	Erreur (+/-)	M ₂ (kHz ²)	Erreur (+/-)
10	135	5	105	5	102	4	135	15
15	125	5	105	3	99	3	122	5
20	110	1	60	3	60	3	72	5
25	66	2	61	1	55	2	69	2
30	64	3	59	1	51	2	61	2
40	63	1	52	2	55	5	59	1

T (°C)	DMPC		C/DMPC 1/20		C/DMPC 1/8	
	M ₁ (kHz)	Erreur (+/-)	M ₁ (kHz)	Erreur (+/-)	M ₁ (kHz)	Erreur (+/-)
10	113	0.5	110	0.3	109.7	0.3
15	107	0.7	104.7	0.3	104.1	0.9
20	95.3	1.5	84.5	1.5	55	0.4
25	55.1	0.2	54.2	0.1	47.5	0.2
30	50.5	0.1	48.3	0.2	45.5	0.2
35	46.5	0.2	44.7	0.2	42	0.2
40	43.5	0.1	42.1	0.2	39.8	0.1

1/ MLV de DMPC-d₅₄

DMPC			C/DMPC 1/8			DMPC + EtOH			C/DMPC 1/8 + EtOH		
T (°C)	M ₁ (kHz)	Erreur (+/-)	T (°C)	M ₁ (kHz)	Erreur (+/-)	T (°C)	M ₁ (kHz)	Erreur (+/-)	T (°C)	M ₁ (kHz)	Erreur (+/-)
10	110.4	0.5	8	108.5	0.5	8	110	0.5	8	112.6	0.2
12	109	1	10	104.3	0.1	10	106.3	0.5	10	110.7	0.1
14	103.8	0.6	12	103.7	0.3	12	101.6	0.6	12	107.5	0.1
16	99	1	14	91.251	0.4	14	97.8	0.4	14	77.7	0.1
18	80.4	0.4	16	63	1	16	73.1	0.4	16	49.2	0.2
20	60	0.5	18	58.5	2.5	18	51.9	0.2	18	47.7	0.1
22	54.6	0.1	20	nd	nd	20	49.1	0.2	20	45.6	0.2
24	51.9	0.2	22	51	0.2	22	47.9	0.1	22	nd	nd
26	51.7	0.2	24	48.7	0.25	24	45.2	0.2	24	42.8	0.1
28	50.6	0.3	26	48	2	26	44.4	0.2	26	42.5	0.2
30	49.6	0.2	30	47	3	30	42.1	0.3	30	40.3	0.1
34	47.7	0.2	34	46.2	0.1	34	39.3	0.3	34	38.4	0.1
38	45.8	0.2	38	41.5	0.4	38	37.2	0.2	38	36.6	0.1

nd = non déterminé

3/ Modèle DMPC/CH (82/18)

T (°C)	DMPC/CH		C/DMPC/CH 1/8		C/DMPC/CH 1/20		DMPC/CH 1/8+ EtOH		C/DMPC/CH 1/8 + EtOH		C/DMPC/CH 1/20 + EtOH	
	M ₁ (kHz)	Erreur (+/-)	M ₁ (kHz)	Erreur (+/-)	M ₁ (kHz)	Erreur (+/-)	M ₁ (kHz)	Erreur (+/-)	M ₁ (kHz)	Erreur (+/-)	M ₁ (kHz)	Erreur (+/-)
2	115	5	115	0.5	115	2	113	0.2	114.7	0.2	113.1	0.2
6	115	1	115	3.5	115	2	112	1	113	0.2	110.8	0.7
10	114	0.5	91	5	107.3	0.2	108.5	0.2	95.8	0.3	107	0.1
14	107.7	0.2	74	5	85.2	0.1	96.5	3.5	66	3	76.5	0.1
18	92.5	1	68.5	1.5	78.6	0.3	81.5	1.5	59	1	67.8	0.3
22	90	1	61.5	0.2	75	0.5	77.2	1	56	1	63.8	0.1
26	89.7	0.5	58.8	0.5	71.6	0.2	69.5	0.3	54.5	0.5	58	1
30	81.3	1.3	54	1	67.7	0.5	62	1	52.9	0.2	55.5	0.3
34	74	1	50.7	0.7	62.3	0.1	55.5	2	51.9	0.2	52.6	0.6
38	65.3	0.5	49.2	0.1	59	0.2	51.5	2.5	49.4	0.2	50.8	0.1

4/ Modèle POPC-d₃₁/POPE/GSL/SM/CH (1.5/1.8/1.5/1.2/4)

T (°C)	MLV		C/MLV		MLV		C/MLV	
	M ₁ (kHz)	Erreur (+/-)	M ₁ (kHz)	Erreur (+/-)	M ₁ (kHz)	Erreur (+/-)	M ₁ (kHz)	Erreur (+/-)
30	77	0.3	75.8	0.3	496	10	492	2
32	76.3	0.4	76	0.3	490	7	483	5
34	74.6	0.4	74.1	0.2	520	20	475	10
36	73.8	0.3	74.3	0.2	490	5	487	5
38	73.5	0.4	72.6	0.4	510	10	510	5
40	72.4	0.3	72.4	0.1	490	15	483	10
42	72.2	0.3	71	0.1	483	10	500	15

Annexe 8 : Déplacements chimiques en fonction de la concentration en tannin inséré (chapitre III)

1/ Systèmes C/MLV et C/LUV

C/MLV			C/LUV		
[T] (M)	$\Delta\delta$ (ppm)	Erreur (+/-)	[T] (M)	$\Delta\delta$ (ppm)	Erreur (+/-)
0	0	0	0	0	0
0.0005	0.0237	0.0003	0.0005	0.0167	0.001
0.001	0.0383	0.0002	0.001	0.03085	0.001
0.0015	0.0473	0.0003	0.0015	0.04165	0.0005
0.002	0.0577	0.0002	0.002	0.04925	0.00165
0.0025	0.06135	0.0008	0.0025	0.05695	0.00255
0.003	0.0681	0.0015	0.003	0.062	0.00245
0.0033	0.07185	0.001	0.0033	0.06565	0.00315
0.0037	0.0779	0.0013	0.0037	0.0677	0.0028
0.004	0.0788	0.0003	0.004	nd	nd

nd = non déterminé

2/ Variations de déplacement chimique en fonction de la structure du tannin

C/MLV			EC/LMLV			EGCG/MLV			ECG/MLV		
[T] (M)	$\Delta\delta$ (ppm)	Erreur (+/-)	[T] (M)	$\Delta\delta$ (ppm)	Erreur (+/-)	[T] (M)	$\Delta\delta$ (ppm)	Erreur (+/-)	[T] (M)	$\Delta\delta$ (ppm)	Erreur (+/-)
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.0005	0.0237	0.0003	0.0005	0.0231	0.0001	0.0005	0.09775	0.00365	0.00025	0.0453	0.00095
0.001	0.0383	0.0002	0.001	0.03865	0.00095	0.001	0.1617	0.0027	0.0005	0.0867	0.0042
0.0015	0.0473	0.0003	0.0015	0.04595	0.00135	0.0015	0.22625	0.00035	0.00075	0.12735	0.00615
0.002	0.0577	0.0002	0.002	0.05725	0.00075	0.002	0.30085	0.00375	0.001	0.15455	0.00785
0.0025	0.06135	0.0008	0.0023	0.06005	0.00315	0.0026	0.3457	0.0001	0.0013	0.18345	0.00095
0.003	0.0681	0.0015	0.0026	0.0643	0.0009	0.0029	0.35935	0.00625	0.0016	0.2136	0.0088
0.0033	0.07185	0.001	0.0032	0.0684	0.0001	0.0032	0.3868	0.0058	0.0019	0.23755	0.00955
0.0037	0.0779	0.0013	0.0035	0.07365	0.00195	0.0035	0.3918	0.00475	0.0022	0.2585	0.005
0.004	0.0788	0.0003	0.004	0.078	0.0003	0.0038	0.40685	0.0007	0.0025	0.2815	0.009
						0.004	0.41235	0.0052			

3/ Variations de déplacement chimique en fonction des conditions du milieu

T = 31°C			pH = 3.5			12% d'éthanol		
[T] (M)	$\Delta\delta$ (ppm)	Erreur (+/-)	[T] (M)	$\Delta\delta$ (ppm)	Erreur (+/-)	[T] (M)	$\Delta\delta$ (ppm)	Erreur (+/-)
0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.0005	0.024	0.0007	0.0005	0.02075	0.00055	0.0005	0.0115	0.0004
0.001	0.0377	0.0007	0.001	0.03455	0.00115	0.001	0.02115	0.00105
0.0015	0.0487	0.0022	0.0015	0.043	0.0001	0.0015	0.02655	0.00035
0.002	0.0596	0.004	0.002	0.05125	0.00045	0.002	0.03275	0.00015
0.0025	0.0679	0.0019	0.0025	0.05765	0.00015	0.0025	0.03885	0.00015
0.003	0.0745	0.0013	0.003	0.0635	0.0005	0.003	0.0447	0.0021
0.0033	0.0777	0.0021	0.0033	nd	nd	0.0033	0.04805	0.00075
0.0037	0.0825	0.0025	0.0037	0.0723	0.0009	0.0037	0.05075	0.00155
0.004	0.0869	0.0043	0.004	0.0756	0.0014	0.004	0.05465	0.00205

nd = non déterminé

4/ Système C/MLV de POPC

C/MLV de POPC		
[T] (M)	$\Delta\delta$ (ppm)	Erreur (+/-)
0	0	0
0.0005	0.022	0.0006
0.001	0.03635	0.00115
0.0015	0.0445	0.0022
0.002	0.0608	0.0068
0.003	0.06845	0.00165
0.0035	0.07265	0.00225
0.004	0.07535	0.00365

Annexe 9 : Paramètres d'ordre 2/|S_{CD}|

1/ Figure III.4 ; T = 30°C

Position du carbone	MLV	C/MLV	EC/MLV	EGCG/MLV
3	0.43	0.39	0.384	0.37
4	0.43	0.374	0.38	0.37
5	0.43	0.374	0.376	0.37
6	0.43	0.374	0.37	0.37
7	0.408	0.36	0.352	0.346
8	0.408	0.36	0.344	0.326
9	0.376	0.322	0.31	0.284
10	0.35	0.302	0.288	0.26
11	0.306	0.26	0.25	0.226
12	0.26	0.224	0.212	0.19
13	0.19	0.166	0.16	0.144
14	0.058	0.048	0.048	0.043

2/ Figure III.6 ; T = 37°C

Position du carbone	MLV		C/MLV 8/1		EC/MLV 20/1	
	2 S _{CD}	Erreur (+/-)	2 S _{CD}	Erreur (+/-)	2 S _{CD}	Erreur (+/-)
3	0.396	0.01	0.366	0.008	0.394	0.01
4	0.396	0.01	0.366	0.008	0.394	0.01
5	0.396	0.01	0.366	0.008	0.394	0.01
6	0.396	0.01	0.354	0.02	0.394	0.01
7	0.368	0.012	0.34	0.008	0.37	0.012
8	0.368	0.012	0.33	0.017	0.356	0.016
9	0.328	0.012	0.29	0.01	0.322	0.012
10	0.302	0.014	0.27	0.01	0.3	0.012
11	0.264	0.008	0.23	0.01	0.256	0.012
12	0.224	0.01	0.198	0.008	0.218	0.01
13	0.166	0.006	0.146	0.006	0.16	0.008
14	0.05	0.004	0.044	0.002	0.048	0

3/ Figure V.7 et V.13 : précipité C/MLV et C/Bicelle, T = 37°C

Position du carbone	C/MLV (phase L _a)		C/Bicelle (phase H _{II})	
	2 S _{CD}	Erreur (+/-)	2 S _{CD}	Erreur (+/-)
3	0.328	0.004	0.3	0.004
4	0.328	0.004	0.284	0.004
5	0.328	0.004	0.264	0.004
6	0.326	0.004	0.248	0.004
7	0.298	0.004	0.228	0.004
8	0.286	0.004	0.212	0.004
9	0.258	0.004	0.184	0.004
10	0.24	0.004	0.172	0.004
11	0.208	0.004	0.132	0.004
12	0.18	0.004	0.12	0.004
13	0.134	0.004	0.084	0.004
14	0.04	0.004	0.028	0.004