

THÈSE PRÉSENTÉE
POUR OBTENIR LE GRADE DE
DOCTEUR DE
L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES
SPÉCIALITÉ CHIMIE-PHYSIQUE

Ahmad A. Saad

**Les tannins du vin et les lipides de la bouche et du bol
alimentaire : vers une modification des marqueurs du goût.
Une approche moléculaire et sensorielle.**

Sous la direction de : Dr. Julie Géan et Dr. Erick Dufourc

Soutenue le 20 Décembre 2017.

Président du jury : M. James Sturgis

Membres du jury :

Mme. Agnès Girard-Egrot
M. Alain Milon
M. James Sturgis
M. Gilles De Revel
M. Antoine Loquet
M. Laurent Charlier

Professeur, Université de Lyon
Professeur, Université de Toulouse
Professeur, Université de la Méditerranée
Professeur, Université de Bordeaux
Chargé de recherche, CNRS
Ingénieur agronome, CIVB

Rapporteur
Rapporteur
Examinateur
Examinateur
Invité
Invité

THÈSE PRÉSENTÉE
POUR OBTENIR LE GRADE DE
DOCTEUR DE
L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES
SPÉCIALITÉ CHIMIE-PHYSIQUE

Ahmad A. Saad

**Les tannins du vin et les lipides de la bouche et du bol
alimentaire : vers une modification des marqueurs du goût.
Une approche moléculaire et sensorielle.**

Sous la direction de : Dr. Julie Géan et Dr. Erick Dufourc

Soutenue le 20 Décembre 2017.

Président du jury : M. James Sturgis

Membres du jury :

Mme. Agnès Girard-Egrot
M. Alain Milon
M. James Sturgis
M. Gilles De Revel
M. Antoine Loquet
M. Laurent Charlier

Professeur, Université de Lyon
Professeur, Université de Toulouse
Professeur, Université de la Méditerranée
Professeur, Université de Bordeaux
Chargé de recherche, CNRS
Ingénieur agronome, CIVB

Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Invité
Invité

Titre : Les tannins du vins et les lipides de la bouche et du bol alimentaire : vers une modification des marqueurs du goût. Une approche moléculaire et sensorielle.

Résumé :

Les tannins sont des polymères de polyphénols présents en quantité significative dans le vin rouge, et responsables de l'astringence et de l'amertume. L'astringence est une sensation de sécheresse et de rugosité en bouche résultant d'une forte interaction entre les tannins et les protéines de la salive impliquées dans la lubrification de la cavité buccale. L'amertume, quant à elle, est un goût *stricto sensu* résultant de l'interaction spécifique des tannins avec les récepteurs du goût situés dans les papilles linguales. Des études récentes ont montré que les tannins sont susceptibles d'interagir avec les lipides. Or les lipides sont présents lors de la dégustation d'un vin comme composants des membranes buccales ou des aliments gras. Cependant, le rôle des lipides dans les perceptions sensorielles d'un vin n'est pas bien connu d'un point de vue œnologique.

L'objectif de cette thèse était d'étudier au niveau moléculaire les interactions tannin-lipide, pour mieux comprendre leur rôle dans les propriétés gustatives du vin. Le présent travail décrit l'effet de deux entités représentatives des tannins du vin : un monomère, la catéchine, et un dimère, la procyanidine B₁, sur deux modèles lipidiques. Le premier modèle est un modèle membranaire représenté par des vésicules multilamellaires composées de POPC/Cholestérol (70/30), qui mime la composition lipidique des membranes buccales. Le deuxième modèle est une émulsion huile dans l'eau (H/E) stabilisée par le DMPC, qui mime les gouttelettes lipidiques présentes dans les aliments gras. L'organisation et la dynamique des lipides composant ces deux modèles ont été étudiées par la spectroscopie RMN (¹H, ²H, ¹³C) en présence et en absence des deux entités de tannins. Leur localisation dans les membranes lipidiques a également été explorée, de même que leur affinité pour les lipides avec la détermination des constantes d'association tannin-lipide.

Les résultats ont mis en évidence un effet fluidifiant des tannins à la fois sur le modèle de membranes buccales et sur le modèle de gouttelettes lipidiques. On a démontré que cet effet de désordre est lié à la nature chimique des tannins, ainsi qu'à leur position dans la membrane. De plus, les résultats sur l'affinité tannin-lipide sont en faveur d'une compétition avec les protéines salivaires. En outre, les résultats de biophysique se sont avérés conformes avec ceux d'une analyse sensorielle menée en parallèle qui a révélé que les aliments gras sont susceptibles de diminuer l'astringence du vin.

Ces travaux montrent l'impact des composés phénoliques sur l'ordre membranaire et soulignent pour la première fois un rôle potentiel des lipides sur le goût du vin. D'une part, les interactions tannin-lipide, en perturbant l'environnement lipidique des récepteurs du goût enchâssés dans les membranes buccales, pourraient affecter la fonctionnalité du récepteur et son interaction avec les tannins, et donc l'amertume. D'autre part, une éventuelle compétition entre les interactions tannin-lipide et tannin-protéine de la salive pourrait diminuer l'astringence durant la dégustation d'un vin. Dans le domaine de l'œnologie, cette thèse vient étayer le ressenti des dégustateurs à savoir la modification du goût du vin due aux aliments et ouvre de nouvelles perspectives dans le cadre de l'association mets-vins.

Mots clés : Tannins, lipides, RMN, dynamique des membranes, amertume, astringence.

Title: Wine tannins and lipids of the mouth and foods: towards a modification of the markers of taste. A molecular and sensory approach.

Abstract:

Tannins are polyphenol polymers present in significant amounts in red wine responsible for astringency and bitterness. The former is a tactile perception involving dryness and roughness in the mouth due to the interaction between tannins and saliva proteins and the latter is a primary taste due to the interaction between tannins and taste receptors in taste buds. Tannins are now known to also interact with lipids. Although not present in wine, lipids are yet present during tasting in the oral membranes of tasters and in fatty foods when wine is consumed during a meal. However, although the influence of lipids is well known to wine tasters through food pairing, there is no scientific evidence to support this hedonic feeling.

The aim of the thesis is to study tannin-lipid interactions at molecular level in order to better understand their implication in wine gustative properties. The present work describes the effect of the main representative grape tannin subunits, the catechin monomer and the B₁ dimer, both on a model of oral membranes and food fat globules. They are represented by a dispersion of POPC/cholesterol multilamellar vesicles and an olive oil in water emulsion stabilized by DMPC as emulsifier, respectively. The organization and dynamics of the lipids composing these two models were investigated by solid-state NMR spectroscopy (¹H, ²H, and ¹³C) in the absence and the presence of the two tannin subunits. The affinity of tannins for lipids was also explored by the determination of the thermodynamic association constant.

The results pointed out a fluidizing effect of tannins both on the membrane model, and on the emulsion lipid droplets. The disorder caused by tannins was shown to be related to their location in the lipid structure depending on the tannin chemical nature. Moreover, the strength of the interaction between tannins and membrane lipids was revealed to be in the same order of magnitude of that between tannins and saliva. In addition, the biophysical results were in accordance with those of a sensory analysis led in parallel that revealed that fatty foods are prone to decrease wine astringency.

These pioneering works shows the impact of phenolic compounds on the membrane order and highlight for the first time the potential role of the tannin-lipid interactions on wine taste. On the one hand, by disrupting the lipid environment of taste receptors embedded in oral membranes, tannin-lipid interactions could affect the receptor functionality and therefore the interaction with tannin molecules, so bitterness. On the other hand, the existence of a possible competition between lipids and saliva proteins for interacting with tannins during tasting could reduce astringency. In the domain of oenology this thesis open a new perspectives in the context of food and wine pairing.

Keywords : Tannins, lipids, NMR, membrane dynamic, bitterness, astringency.

Unité de recherche

Chimie et Biologie des Membranes et de Nano-objets, UMR 5248,

Allée Geoffroy Saint Hilaire, B14

33600 Pessac

Table des matières

Introduction générale	1
I. Le vin	3
I.1. La composition du vin	5
I.2. La qualité du vin.....	5
I.3. Le goût du vin	7
I.3.1. La sensation d'amertume	9
I.3.2. La sensation d'astringence	9
II. Les tannins.....	13
II.1. Les tannins hydrolysables.....	13
II.2. Les tannins condensés	15
II.3. La teneur et la composition en procyanidines des vins rouges	17
II.4. Les propriétés physicochimiques des tannins	19
II.5. L'influence des tannins sur les sensations d'astringence et d'amertume	21
III. Les lipides impliqués dans le goût du vin.....	25
III.1. Les lipides des membranes buccales	25
III.1.1. Les différents types de muqueuses buccales	25
III.1.2. La fonction des muqueuses buccales.....	27
III.1.3. La composition lipidique des muqueuses buccales	29
III.2. Les lipides des aliments.....	31
III.2.1. La nature des lipides alimentaires.....	31
III.2.2. L'organisation des lipides dans les aliments.....	33
III.3. Les modèles lipidiques utilisés dans cette thèse.....	33
III.3.1. Les membranes artificielles comme modèle des membranes buccales	35
III.3.2. Les émulsions comme modèle des gouttelettes lipidiques des aliments	41
IV. Les interactions tannin-lipide, état de l'art.....	46
IV.1. L'effet des tannins sur la dynamique des membranes lipidiques	47
IV.2. La localisation des tannins dans les membranes lipidiques	48
IV.3. La nature des interactions tannin-lipide.....	50
V. Objectif et plan de thèse	51

Chapitre I.....	55
I. Matériel	59
I.1. Produits chimiques	59
I.2. Solvants	59
II. Préparation des systèmes lipidiques	60
II.1. Préparation des vésicules multilamellaires	60
II.2. Préparation des larges vésicules unilamellaires	60
II.3. Préparation des petites vésicules unilamellaires	61
II.4. Préparation des émulsions huile dans l'eau.....	61
III. Techniques d'analyse physico-chimique	61
III.1. Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire	61
III.1.1. Notions théoriques de la RMN.....	62
III.1.1.1. Spin nucléaire et moment magnétique associé.....	63
III.1.1.2. Hamiltonien de spin nucléaire.....	63
III.1.1.2.1. Couplage externe	65
III.1.1.2.2. Couplage avec le champ radiofréquence B1	67
III.1.1.2.3. Couplage interne	72
III.1.2. Application de la RMN des solides aux biomembranes.....	73
III.1.2.1. RMN du deutérium ^2H	73
III.1.2.2. RMN haute résolution par rotation à l'angle magique	79
III.1.3. Paramètres expérimentaux	79
III.1.3.1. Expériences RMN de solide : séquence d'écho.....	79
III.1.3.2. Transfert de polarisation : séquence INEPT	81
III.1.3.3. Paramètres d'acquisition.....	82
III.1.4. Exploitation des spectres RMN- ^2H	83
III.1.4.1. Premier moment spectral M_1	83
III.1.4.2. Paramètre d'ordre S_{CD}	85
III.1.4.3. Détermination des paramètres d'ordre	87
III.1.4.4. Longueur des chaînes hydrophobes.....	91
III.2. Résonance plasmonique aux ondes guidées (PWR).....	93
III.3. Cryo-microscopie électronique (Cryo-EM)	97
III.4. Calorimétrie de titration isotherme (ITC)	99

III.5. Granulométrie laser	102
III.6. Dynamique moléculaire.....	103
IV. Analyse sensorielle	106
IV.1. Mise en œuvre	106
IV.1.1. Matériel.....	106
IV.1.2. Préparation des échantillons	106
IV.1.3. Protocole de dégustation	107
IV.2. Analyse statistique	109
IV.2.1. Test de Student.....	109
IV.2.2. Analyse en composantes principales.....	109
Chapitre II	115
I. Effet des tannins sur l'organisation et la dynamique des membranes	121
I.1. Effet des tannins en milieu aqueux.....	121
I.2. Effet des tannins en milieu hydro-alcoolique	129
II. Localisation des tannins dans les membranes lipidiques	135
II.1. Etude RMN 1D	135
II.2. Etude RMN 2D	139
II.3. Etude <i>in silico</i>	145
III. Discussions des résultats de l'effet des tannins sur l'organisation et la dynamique des membranes lipidiques	150
III.1. Effet fluidifiant des tannins sur les membranes lipidiques.....	150
III.2. Effet fluidifiant conjugué des tannins et de l'éthanol sur les membranes lipidiques	151
III.3. Localisation des tannins à l'interface des membranes lipidiques.....	152
III.4. Implication des interactions tannin-lipide dans le goût du vin.....	155
Chapitre III	159
I. Détermination des constantes d'association par RMN-¹H	165

I.1. Affinité de la catéchine pour les membranes de POPC/CH.....	167
I.2. Discussion des résultats obtenus par RMN.....	173
II. Détermination des constantes d'affinité par spectroscopie PWR	
.....	175
II.1 Affinité de la catéchine pour les membranes de POPC/CH	175
II.2 Affinité du dimère B ₁ pour les membranes de POPC/CH	177
II.3 Affinité de la catéchine pour les membranes lipidiques en absence de cholestérol	179
II.4 Discussion des résultats obtenus par PWR	179
III. Etude préliminaire des constantes d'affinité par ITC	185
IV. Discussion des résultats de l'affinité des tannins pour les	
lipides membranaires	186
IV.1. Paramètres de l'interaction des tannins avec les membranes lipidiques	186
IV.2. Influence de l'affinité tannin/lipide sur le goût du vin.....	189
Chapitre IV.....	193
I. Optimisation d'un modèle d'émulsion alimentaire stable.....	197
I.1. Caractérisation des émulsions alimentaires modèles	199
I.1.1. Analyse macroscopique	199
I.1.2. Analyse microscopique	201
I.1.3. Analyse granulométrique.....	203
II. Caractérisation de l'émulsion DMPC/huile d'olive.....	205
II.1. Analyse macroscopique	205
II.2. Analyse microscopique	207
II.3. Analyse granulométrique.....	207
II.4. Caractérisation par cryo-microscopie électronique.....	207
II.5. Caractérisation par RMN- ¹ H	211
II.5.1. Caractérisation par RMN- ¹ H de l'huile d'olive.....	211
II.5.2. Caractérisation par RMN- ¹ H du DMPC.....	211
II.5.3. Caractérisation de l'émulsion par RMN- ¹ H	213

III. Interaction entre la catéchine et les gouttelettes lipidiques ..217

III.1. Analyse macroscopique	217
III.2. Analyse microscopique	217
III.3. Analyse granulométrique.....	219
III.4. Effet de la catéchine sur la dynamique des lipides en émulsion	219
III.5. Localisation de la catéchine dans l'émulsion.....	225
III.6. Répartition de la catéchine entre les deux phases de l'émulsion	225

IV. Discussion228

IV.1. Modèle de gouttelettes lipidiques alimentaires.....	228
IV.2. Emulsion DMPC/huile d'olive.....	231
IV.3. Organisation des lipides en émulsion	233
IV.4. La catéchine interagit avec les gouttelettes lipidiques	234

V. Analyse sensorielle des interactions tannin-lipide237

V.1. Profils sensoriels des huiles et des tannins	239
V.2. Analyse en composantes principales	241
V.3. Discussion et conclusion.....	243

Chapitre V247

Conclusion et perspectives.....247

I. Conclusion générale249

II. Perspectives253

Bibliographie257

Annexes279

Liste des abréviations

Å : Angstrom

A0.15 : Tannins d'acacia à 0.15 g/L

A1.16 : Tannins d'acacia à 1.16 g/L

Ac : Acidité

ACP : Analyse en composantes principales

AFM : Microscopie à force atomique (Atomic Force Microscopy)

AG : Acide gras

Am : Amertume

As : Astringence

ATR : Réflexion totale atténuée (Attenuated Total Reflectance)

C : Catéchine

Cer : Céramide

Chol : Cholestérol

CHE : Ester de cholestérol

CHS : Sulfate de cholestérol

CM : Champ magnétique

CMC : Concentration micellaire critique

CPMAS : Polarisation croisée avec rotation à l'angle magique

Cryo-ME : Cryo-microscopie électronique

d : Dimère

DM : Dynamique moléculaire

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

DMPC_{d₂₇} : 1,2-dimyristoyl-*d*₂₇-*sn*-glycéro-3-phosphocholine

DMPC_{d₅₄} : 1,2-dimyristoyl-*d*₅₄-*sn*-glycéro-3-phosphocholine

DOPC : 1,2-dioleoyl-*sn*-glycéro-3-phosphocholine

DP : Degré de polymérisation

DSS : 4,4-diméthyl-4-silapentane-1-sulfonique

E/H : Eau/Huile

EC : Epicatéchine

ECG : Epicatéchine gallate

EGC : Epigallocatechine

EGCG : Epigallocatechine gallate

Egg-PC : Lécithine du jaune d'œuf

EPR : Résonance paramagnétique électronique (Electron Paramagnetic Resonance)

EtOH : Ethanol

FID : Signal de précession libre (Free Induction Decay)

Fr : Fruité

G : Huile de pépins de raisin

G0.15 : Tannins de pépins de raisin à 0.15 g/L

G1.16 : Tannins de pépins de raisin à 1.16 g/L

GCE : Gradient de champ électrique

GPCR : Récepteur couplé aux protéines G

GROMACS : GRONingen MACHine for Chemical Simulations

GSL : Glucosylcéramide

GT : Trioléate de Glycérol

GUV : Grandes vésicules unilamellaires (Giant Unilamellar Vesicles)

H/E : Huile/Eau

H₂O_mQ : Eau ultra-pure

HRP : Protéine riche en histidine

IG : Intensité du goût

INEPT : Insensitive Nuclei Enhanced by Polarisation Transfert

InSat : (Acide gras) insaturé

ITC : Calorimétrie de titration isotherme (Isothermal Titration Calorimetry)

K_A : Constante d'association

K_D : Constante de dissociation

LB : Line Broadening

L-R : Ligand-Récepteur

L₀ : Phase liquide ordonnée

LUV : Grandes vésicules unilamellaires (Large Unilamellar Vesicles)

L_α : Phase lamellaire fluide

L_β : Phase lamellaire gel

m : Monomère

M₁ : Moment spectral d'ordre 1

mdeg : Milli degré

MLV : Vésicules multilamellaires (MultiLamellar Vesicles)

NA : Nombre d'acquisition

NPT : Nombre de moles, Pression, Température

O : Huile d'olive

PC : Phosphatidylcholine

PG : Persistance du goût

PGG : 1,2,3,4,6-penta-*O*-galloyl-β-D-glucopyranose

PI : Phosphatidylinositol

PL : Phospholipide

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

POPC_{d₃₁} : 1-palmitoyl-*d*₃₁-2-oleoyl-*sn*-glycéro-3-phosphocholine

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

ppm : Partie par million

PRP : Protéine riche en Proline

PS : Phosphatidylsérine

PWR : Résonance plasmonique aux ondes guidées (Plasmon Waveguide Resonance)

QCM : Microbalance à cristal de quartz (Quartz Crystal Microbalance)

R : Huile de colza

RF : Radiofréquence

RMN : Résonance magnétique nucléaire

RMN HR-MAS : RMN haute résolution en rotation à l'angle magique

Sat : (Acide gras) saturé

sc : Scan

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

SM : Sphingomyéline

SPR : Résonance des plasmons de surface (Surface Plasmon Resonance)

SUV : Petites vésicules unilamellaires (Small Unilamellar Vesicles)

T : Température

t : Trimère

T/L : Rapport molaire Tannin/Lipide

TF : Transformée de Fourier

TG : Triglycéride

TIR : Réflexion totale interne

T_m : Température de transition de phase gel/fluide

TMS : Tétraméthylsilane

TMSP : Acide triméthylsilylpropanoïque

VA : Vitesse d'agitation

VP : Vecteur propre

VR : Vitesse de rotation

x_{eau} : Fraction molaire dans l'eau

$\Delta\delta$: Variation de déplacement chimique

$\Delta\nu_Q$: Eclatement quadripolaire

Production scientifique et technique

➤ **Publication :**

Grape tannin catechin and ethanol fluidify oral membrane mimics containing moderate amounts of cholesterol: Implications on wine tasting? A. L. Furlan & A. Saad, E. J. Dufourc, J. Géan, Biochimie (2016), **130**, 41-48

➤ **Communications orales :**

1) YSS 2017, 10th Young Scientist Symposium (Pessac, France, 18-19 May 2017).

A. Saad, A. Loquet, E. J. Dufourc, J. Géan.

The role of tannin-lipid interactions in wine gustative properties: a biophysical study.

2) Journée scientifique de CBMN 2017 (Pessac, France, 6-7 Avril 2017).

A. Saad, A. Loquet, E. J. Dufourc, J. Géan.

The role of tannin-lipid interactions in wine gustative properties: a biophysical study.

3) 19th Chemistry Doctoral School day (Talence, France, 5 May 2017).

A. Saad, A. Loquet, E. J. Dufourc, J. Géan.

The role of tannin-lipid interactions in wine gustative properties: a biophysical study.

4) Joint Meeting of the Membrane Sections of the French and German Biophysical Societies, Biophysics of protein-membrane interactions: From model to cells (Bad Herrenalb, Germany, 11-14 April 2016).

A. Saad, E. J. Dufourc, J. Géan.

NMR study of the interaction between grape tannins and buccal membrane lipids.

➤ **Communications par affiche :**

1) ISMAR 2017, 20th Meeting of the International Society of Magnetic Resonance (Québec city, Canada, 23-28 July 2017).

A. Saad, A. Loquet, E. J. Dufourc, J. Géan.

The role of tannin-lipid interactions in wine gustative properties: a biophysical study.

2) 13^{eme} Journée technique du CIVB (Bordeaux, France, 14 février 2017).

A. Saad, J. Bousquet, N. F. Castro, E. J. Dufourc, J. Géan.

Rôle des interactions tannins-lipides dans les propriétés gustatives du vin.

3) GERLI 2016, The 12th GERLI international lipidomics meeting, Microbe and host lipids (Toulouse, France, 23-26 October 2016).

A. Saad, E. J. Dufourc, J. Géan.

Impact of food lipids on wine taste: a biophysical approach.

4) Journée scientifique de CBMN 2016 (Pessac, France, 7 avril 2016).

A. Saad, E. J. Dufourc, J. Géan.

NMR study of the interaction between grape tannins and buccale membrane lipids.

5) 4th meeting of the aquitaine NMR network (Pessac, France, 8 June 2015).

A. Saad, E. J. Dufourc, J. Géan.

Study of the modification of sensory perception induced by grapes tannins in the presence of buccal membrane lipids by NMR.

➤ **Prix :**

Best poster communication award for the poster entitled : ‘‘Impact of food lipids on wine taste: a biophysical approach’’ presented at the 12th GERLI international lipidomics meeting, 23-26 October 2016, Toulouse, France.

Introduction générale

I. Le vin

‘‘Celui qui sait déguster ne boit plus jamais de vin, mais il goûte ses suaves secrets’’ (Salvador Dali). Le vin est une boisson qui ne se boit pas mais se déguste. Il ne s’agit pas d’en boire pour se désaltérer mais plutôt d’en analyser et apprécier ses caractéristiques organoleptiques.

Le vin est présent depuis l’antiquité. Son histoire est si ancienne que ce breuvage est mentionné dans le premier texte littéraire écrit sur des tablettes d’argile, au II^{ème} millénaire de l’épopée de Gilgamesh, dans les récits Babylonien ou bien sur les bas-reliefs égyptiens. Certaines religions ou sociétés lui confèrent un caractère sacré ou divin. Dans la Bible, la culture de la vigne est attribuée à Noé, le père du vin. Dans le christianisme, il est symbole du sang du Christ, et dans la mythologie grecque, c’est Dionysos le dieu du vin. Aujourd’hui, le vin est devenu une science appelée l’œnologie. Cette science a pour objet d’étudier la vigne, le raisin et le vin. Elle s’intéresse à l’étude de la culture, la composition, ainsi que des propriétés biologiques, physicochimiques et organoleptiques.

Le vin représente un élément central de notre alimentation et de notre cuisine. Il fait même partie de la culture et de la tradition en France. Comprendre et analyser ses propriétés gustatives et organoleptiques est un challenge qui n’arrête pas de progresser, dans le but de décrypter ses qualités sensorielles et satisfaire les dégustateurs. La dégustation d’un vin est considérée comme l’art de décrire et d’apprécier ses qualités, durant laquelle le dégustateur mobilise tous ses sens et ses organes sensoriels, dans le but d’identifier les caractéristiques des sensations perçues. Il s’agit d’un examen qui se fait en plusieurs étapes. D’abord, l’examen visuel qui permet d’analyser la couleur et les nuances du vin, sa brillance et la limpidité de sa robe, ce qui donne l’information sur l’âge du vin et son degré d’alcool. Ensuite, l’examen olfactif qui permet de déterminer la complexité du mélange à partir des différents arômes qui se dégagent. Et finalement, l’étape la plus importante est l’examen gustatif. Au moment où le vin est mis en bouche, différents arômes et saveurs sont ressentis. Des sensations d’amertume, d’acidité, ou de moelleux sont perçues et renseignent sur l’équilibre du vin. Puis, vient la période d’évolution du goût dans la bouche, où le dégustateur ressent un effet tactile, ce qui informe sur la structure du vin et sa charpente. Et enfin, la sensation de persistance du goût dans la bouche, une fois que le vin est avalé ou craché. Cette étape doit être agréable et aromatique pour que l’impression globale du goût soit équilibré et plaisante pour déterminer la qualité du vin. Toutes ces sensations sont fonction de la

composition du vin, qui est très complexe et qui contient un mélange de différents types de molécules et composés qui contribuent ensemble à sa qualité et son goût.

I.1. La composition du vin

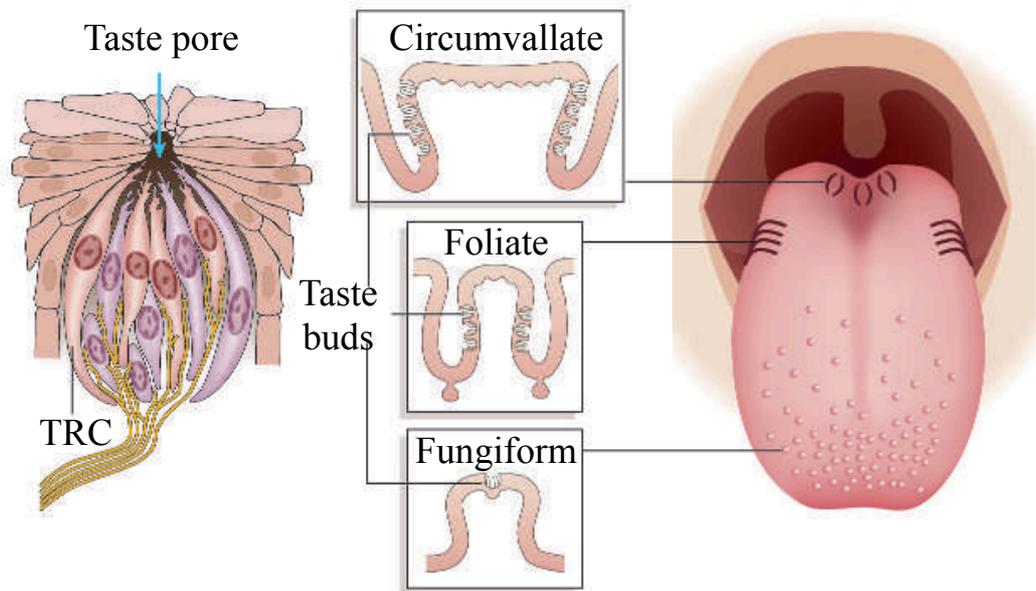
Le vin est une boisson constituée d'un mélange de substances très complexes. Plus de 500 composés ont été identifiés dans le vin, dont la majorité ont des concentrations comprises entre 10^{-1} et 10^{-6} mg/L (Soleas *et al.*, 1997). Le vin est constitué essentiellement d'eau (80%) et d'éthanol (10 à 15%). L'éthanol résulte de la transformation du sucre en alcool pendant la fermentation. Il joue un rôle important dans la stabilité, le vieillissement et les propriétés sensorielles du vin. De plus, le vin est constitué de sucres, majoritairement du glucose et fructose, d'acides, comme l'acide tartrique, malique, lactique, citrique qui contrôlent le pH du vin et d'autres constituants comme les vitamines, protéines, sels minéraux. Cependant, les constituants les plus importants du vin sont les phénols. Il s'agit d'un large groupe de complexes et de composés qui jouent un rôle crucial dans la qualité des vins rouges (Soleas *et al.*, 1997, Taillandier et Bonnet, 2005, Quideau *et al.* 2011, Mercurio *et al.*, 2010). Ils contribuent à leur apparence, leur fragrance, leur goût, et leurs perceptions organoleptiques.

I.2. La qualité du vin

La qualité d'un vin rouge est liée à un équilibre entre trois facteurs principaux : l'onctuosité, l'acidité, et la présence des tannins (Blouin, 1996). L'onctuosité est la sensation de gras et de rondeur en bouche. Elle est apportée par la présence des sucres et de l'alcool. L'acidité est due à la présence des acides tartrique, citrique et lactique. Les tannins sont des composés qui appartiennent à la famille des polyphénols. Ils jouent un rôle clef dans la qualité des vins rouges. Pour certains œnologues, la qualité des vins rouges est liée à leur pouvoir tannique. Lorsque les tannins développent un sens fin, élégant, et soyeux, il s'agit d'un vin de bonne qualité et qui est bien équilibré. Par contre, le côté rugueux des tannins, qui génèrent des sensations agressives, grossières ou âpres, caractérise les mauvais vins rouges.

Durant la dégustation d'un vin, les tannins interagissent avec la cavité buccale et induisent notamment les sensations d'amertume et d'astringence. La première est une sensation gustative, qui résulte d'une interaction spécifique entre les tannins et les récepteurs du goût dans la cavité buccale. Alors que l'astringence est une sensation tactile qui provient de

A



B

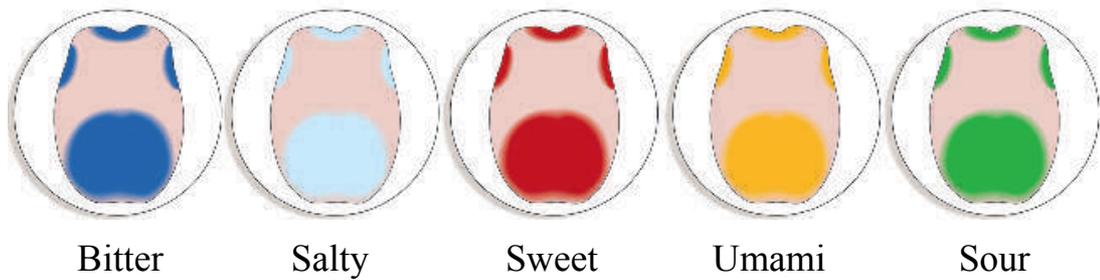


Figure 1 : Représentation schématique d'un bourgeon de goût constitué de 50 à 100 cellules réceptrices du goût (TRC). Les bourgeons de goût sont localisés dans les papilles linguales, réparties sur les différentes zones de la langue (A). Cartes du goût : les goûts amer, salé, sucré, umami et acide sont ressentis par les différentes parties de la langue (B). D'après Chandrashekar *et al.*, 2006.

l'interaction des tannins avec les protéines de la salive. Dans la partie qui suit, nous allons détailler les propriétés et les mécanismes de ces deux sensations. Les propriétés chimiques des tannins, leurs classes, leurs cibles et leurs rôles dans le goût du vin seront également développés.

I.3. Le goût du vin

Chez les êtres humains, le système gustatif agit comme un capteur qui permet de reconnaître et d'évaluer les stimuli chimiques externes et de déterminer la composition nutritive des aliments. Cela se fait grâce à des récepteurs du goût qui transmettent les signaux sensoriels vers une région spécifique du cerveau, qui sépare, évalue et distingue les stimuli, conduisant à l'expérience connue sous le nom de goût (Small, 2012, Chandrashekar *et al.*, 2006). Il est bien reconnu qu'on distingue cinq goûts différents : l'amer, le sucré, le salé, l'acide et l'umami (goût savoureux). Chaque goût peut nous renseigner sur la nature des aliments qu'on mange, et parfois nous protéger contre des substances toxiques. Un goût sucré est indicatif d'un aliment riche en énergie, l'umami nous permet de reconnaître les acides aminés présents dans les aliments riches en protéines, le goût amer est sensé nous prévenir contre l'ingestion de substances chimiques toxiques (Chandrashekar *et al.*, 2006). La perception du goût s'effectue par l'intermédiaire des cellules sensorielles assemblées dans de petits organes appelés bourgeons du goût au sein des papilles gustatives (**Fig.1.A**). Chez les êtres humains, il existe entre 5 000 et 10 000 bourgeons du goût, dont la majorité sont distribués à la surface de la langue, et en quantité plus faible au niveau du palais et l'épiglotte (Chaudhari et Roper 2010, Chandrashekar *et al.*, 2006). Pendant un certain temps, il a été couramment supposé, que chaque goût était ressenti au niveau d'une zone spécifique de la langue. A titre d'exemple, le goût amer à l'arrière de la langue, sucré sur le bout, salé sur les côtés, ce qui a abouti à de fausses cartes de goût. Cependant, des études récentes ont montré que chaque bourgeon de goût est formé de 50 à 100 cellules neuro-épithéliales, qui expriment différentes familles de récepteurs spécifiques à chaque goût, et qui sont distribués sur toute la langue (**Fig.1.B**) (Chandrashekar *et al.*, 2006). Ce qui montre que toutes les parties de la langue perçoivent les cinq goûts.

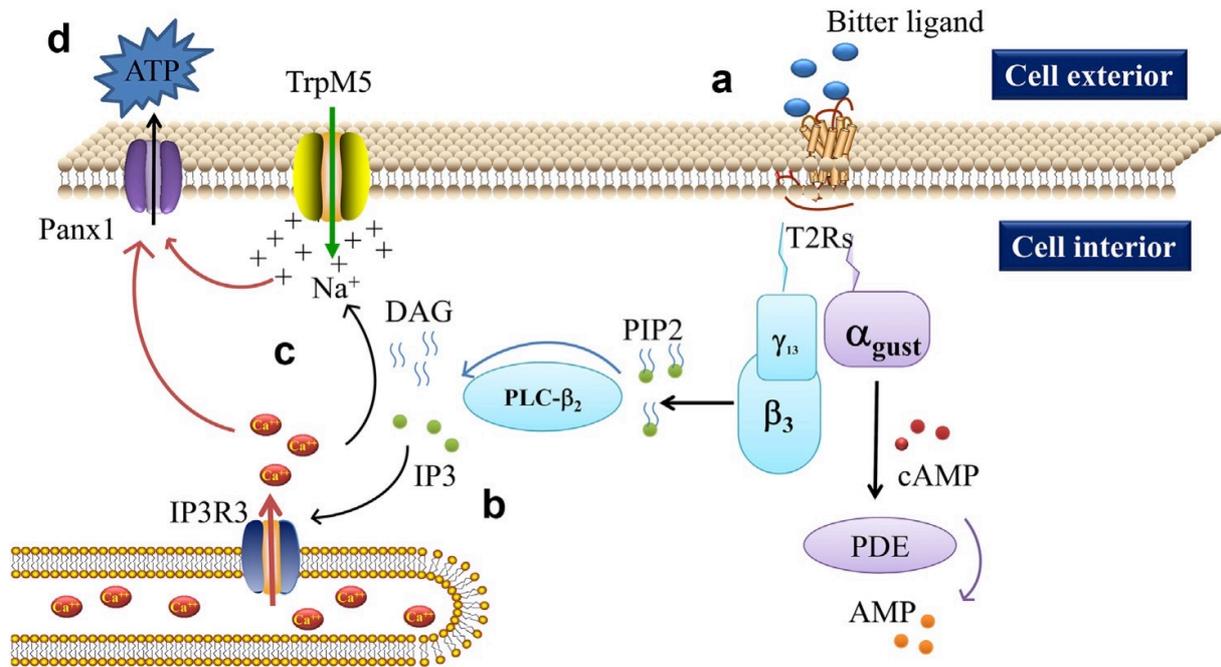


Figure 2 : Représentation schématique du mécanisme de la transduction du signal du goût amer. Il est initié par la fixation d'un ligand sur le récepteur du goût amer T2Rs, et la dissociation du complexe $G\alpha\beta\gamma$ en $G\alpha$ et $G\beta\gamma$ (a). Le complexe $G\beta\gamma$ va activer la phospholipase C (PLC- β_2), qui va générer de l'inositol-1,4,5-triphosphate (IP3) et entraîner la libération du calcium du compartiment intracellulaire (b). L'augmentation du taux de calcium va induire l'ouverture du canal ionique TrpM5 et la rentrée du sodium Na^+ , ce qui va aboutir à une dépolarisation de la cellule (c). L'effet combiné du calcium et de la dépolarisation de la cellule va conduire à l'ouverture du canal Panx 1 et la libération de l'adénosine triphosphate l'ATP. Ce qui favorise la sécrétion des neurotransmetteurs, et la transduction du signal nerveux vers le cerveau (d). D'après Ma *et al.*, 2013.

I.3.1. La sensation d'amertume

En ce qui concerne la sensation d'amertume, elle est provoquée par divers types de molécules tels que les acides aminés, les peptides, les alcaloïdes, et les polyphénols comme les tannins du vin. Le goût amer est détecté par une famille d'environ 30 récepteurs différents, couplés aux protéines G (GPCR), identifiée comme la famille des récepteurs T2Rs (Adler *et al.*, 2000, Chandrashekar *et al.*, 2006, Ma *et al.*, 2014). Le mécanisme de la transduction du signal du goût amer est bien identifié et étudié dans la littérature. Il est initié par la fixation des molécules amères au niveau du récepteur T2R, ce qui va activer la protéine G hétérotrimérique, et conduire à la libération du complexe Gβγ (**Fig.2**). Le complexe Gβγ va activer la phospholipase C (PLC-β₂), qui va induire l'hydrolyse du phosphatidylinositol-4,5-biphosphate (PIP₂) en inositol-1,4,5-triphosphate (IP₃) et diacylglycérol (DAG). L'IP₃ entraîne la libération du calcium du compartiment intracellulaire. L'augmentation du taux de calcium va entraîner l'ouverture du canal ionique TrpM5 et la rentrée du sodium Na⁺, ce qui va aboutir à une augmentation de la charge positive, et une dépolarisation de la cellule. Les cellules libèrent alors des neurotransmetteurs. De l'adénosine triphosphate (ATP) est secrétée, ce qui va entraîner la transmission du signal par les fibres nerveuses au niveau du cerveau, qui va le reconnaître comme un goût amer (Ma *et al.*, 2014, Kinnamon, 1996).

I.3.2. La sensation d'astringence

L'astringence est définie comme une sensation tactile qui se traduit par une perception de sécheresse, de rugosité, et de plissement de la muqueuse buccale. Elle est ressentie lors de l'ingestion d'aliments ou de boissons généralement riches en tannins comme les raisins, le chocolat, le thé noir et le vin rouge (Green 1993, Lee et Lawless, 1991). Bien que d'autres composés ou molécules comme les sels de cations multivalents (aluminium, zinc, calcium), les acides, les agents déshydratants et les polyphénols sont capables de générer cette sensation gustative (Halsam et Lilley, 1988). Elle est le résultat d'une forte 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. La précipitation des complexes tannins-protéines est à l'origine d'une modification de la lubrification de la bouche, suite à une augmentation des frottements entre les épithéliums buccaux. Il en résulte des sensations de plissement, de dureté et de dessèchement (Baxter *et al.*, 1997, Charlton *et al.*, 2002, Cala *et al.*, 2010). Selon Charlton *et al.* (2002), le mécanisme d'interaction entre les tannins et les

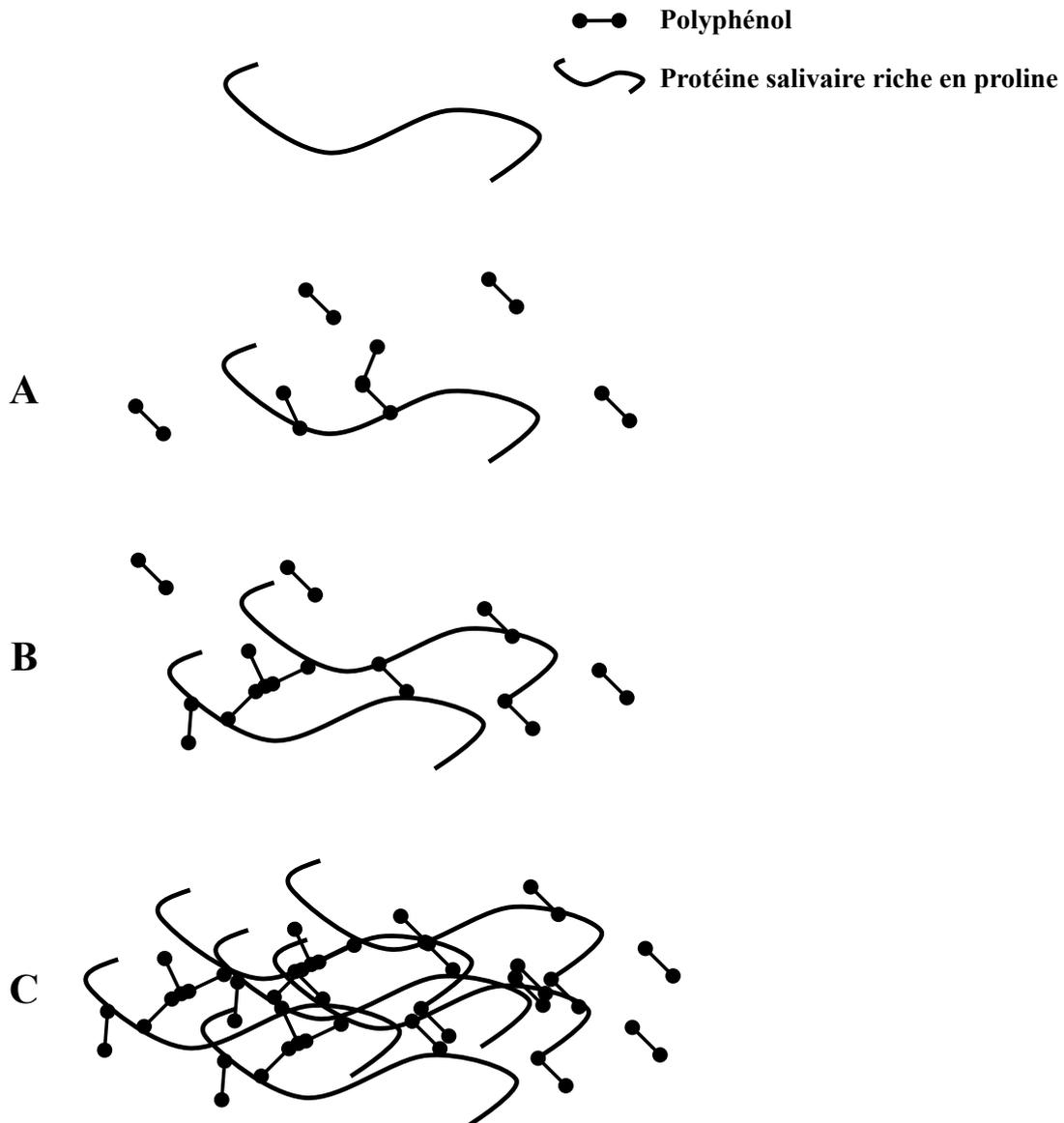


Figure 3 : Représentation schématique du mécanisme d'interaction entre les polyphénols et les protéines de la salive. (A) L'addition des polyphénols aboutit à la formation d'un complexe soluble entre les tannins et les protéines salivaires riches en proline. (B) En ajoutant plus de polyphénols, deux complexes s'assemblent entre eux et forment des dimères insolubles. (C) Les dimères s'agrègent entre eux, et forment des grands complexes tannins-protéine salivaires. D'après Charlton *et al.*, 2002.

protéines de la salive peut être résumé en trois étapes (**Fig.3**). D'abord, il y a formation de liaisons entre les tannins et les protéines salivaires. Plusieurs molécules de tannins peuvent se lier à la même protéine, *via* des interactions hydrophobes entre les noyaux aromatiques des tannins et les noyaux pyrrolidine des résidus de prolines des protéines salivaires, ce qui aboutit à la formation des complexes solubles composés d'une seule protéine liée à plusieurs tannins. Ensuite, le complexe protéine-tannin s'assemble avec un autre complexe, à travers des liaisons de pontage intermoléculaires formées par les tannins, ce qui conduit à la formation d'un dimère insoluble de taille plus grande. Enfin, ces dimères s'agrègent entre eux pour former des complexes plus grands, ce qui va favoriser leur précipitation (**Fig.3**).

En revanche, d'autres études ont montré que certaines molécules comme l'alum ou des solutions de tannins hydrolysables connues pour avoir un caractère astringent ne sont pas capables de précipiter les protéines salivaires (Lee *et al.*, 2012, Obreque-Slier *et al.*, 2010). De plus, une autre étude a rapporté qu'une réduction du volume de salive dans la bouche conduit à une augmentation de la perception d'astringence après l'ingestion d'une solution de thé noir riche en tannins (Nayak et Carpenter, 2008). Les auteurs concluent que l'astringence impliquerait non pas les protéines salivaires dans la salive mais celles adhérant à la muqueuse buccale. Ainsi, la salive en formant un film protecteur empêcherait une exposition directe de la muqueuse buccale aux molécules astringentes. Ces travaux indiquent donc que la sensation d'astringence est un phénomène complexe et que l'augmentation de la friction au niveau de l'épithélium buccal n'est pas uniquement causée par la précipitation des protéines salivaires mais pourrait être liée à une interaction des molécules astringentes avec des composants de la muqueuse buccale.

Finalement, il est bien connu chez les œnologues que les tannins sont à l'origine des sensations d'amertume et d'astringence durant la dégustation des vins rouges. Bien que les avancées et les progrès scientifiques ont permis de comprendre en grande partie les mécanismes moléculaires et physiologiques de la perception du goût, il faut savoir que l'analyse sensorielle reste la seule approche existante aujourd'hui qui permet d'établir les caractéristiques organoleptiques de ces composés.

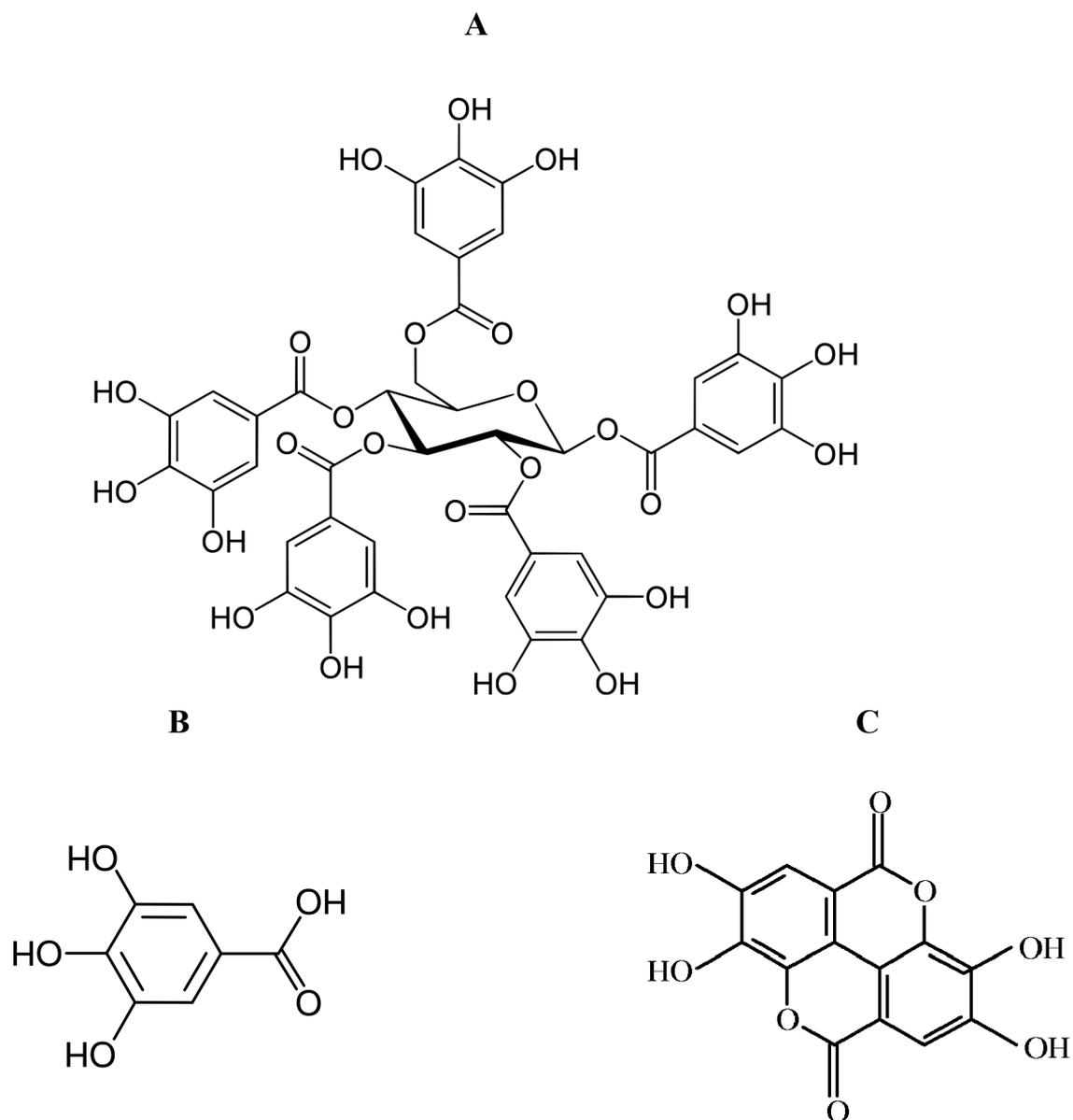


Figure 4 : Structure chimique des unités de base constituant les gallotannins et ellagitannins. Le noyau β -1,2,3,4,6-pentagalloyl-D-glucose (A). L'acide gallique (B). L'acide ellagique (C). D'après Manchado-Sarni et Cheynier, 2006.

II. Les tannins

Les tannins sont des composants naturels des plantes qui appartiennent à la famille des polyphénols. Connus pour leur capacité à se lier aux protéines en solution et à les précipiter, ils sont utilisés depuis l'antiquité par l'homme, pour le traitement des peaux des animaux afin de les transformer en cuir. Bate-Smith (1954) a défini les tannins comme des composés phénoliques solubles dans l'eau, ayant une masse moléculaire comprise entre 500 et 3 000 Da, et qui ont la capacité de précipiter les alcaloïdes, la gélatine et d'autres protéines. Les tannins sont présents dans de nombreux végétaux dans le bois, l'écorce, les feuilles ou bien dans les fruits (raisins, dattes, pommes...). L'intérêt de la recherche scientifique porté aux tannins augmente de plus en plus. D'une part, pour le rôle biologique important de ces polyphénols ; ils possèdent une activité antioxydante, anticancéreuse, antimicrobienne et ont même un rôle préventif contre les maladies cardiovasculaires (Aron *et al.*, 2008, Pourcel *et al.*, 2007, Quideau *et al.*, 2011). D'autre part, pour le rôle important des tannins sur le plan organoleptique, surtout en œnologie ; ils sont responsables des sensations d'amertume et d'astringence des vins rouges comme évoqué plus haut, mais également de leurs couleurs et leurs saveurs.

On distingue deux grands groupes de tannins qui sont classés suivant leur nature chimique et leur réactivité : les tannins condensés et les tannins hydrolysables. Dans le vin, ces tannins peuvent provenir de différentes sources. Les tannins condensés sont majoritaires dans le vin rouge, ils proviennent des parties solides des raisins tels que les pépins et les pellicules (Hanlin *et al.*, 2010). Alors que les tannins hydrolysables, en quantité plus faible, sont issus du bois des barriques utilisées lors de l'élevage ou des copeaux de bois ajoutés aux vins lors de la macération. Les deux types de tannins sont présents dans le vin mais à des teneurs différentes, les tannins condensés étant le groupe majoritaire.

II.1. Les tannins hydrolysables

Les tannins hydrolysables sont caractérisés par le fait qu'ils peuvent être dégradés par hydrolyse chimique ou enzymatique. Ils sont constitués d'une unité de base comportant un noyau β -1,2,3,4,6-pentagalloyl-D-glucose (**Fig.4.A**), qui est estérifié au niveau de ces groupements hydroxyles par l'acide gallique ou ellagique (**Fig.4.B et C**), formant respectivement les gallo-tannins et les ellagi-tannins (Okuda *et al.*, 1993). La vescalagine et la

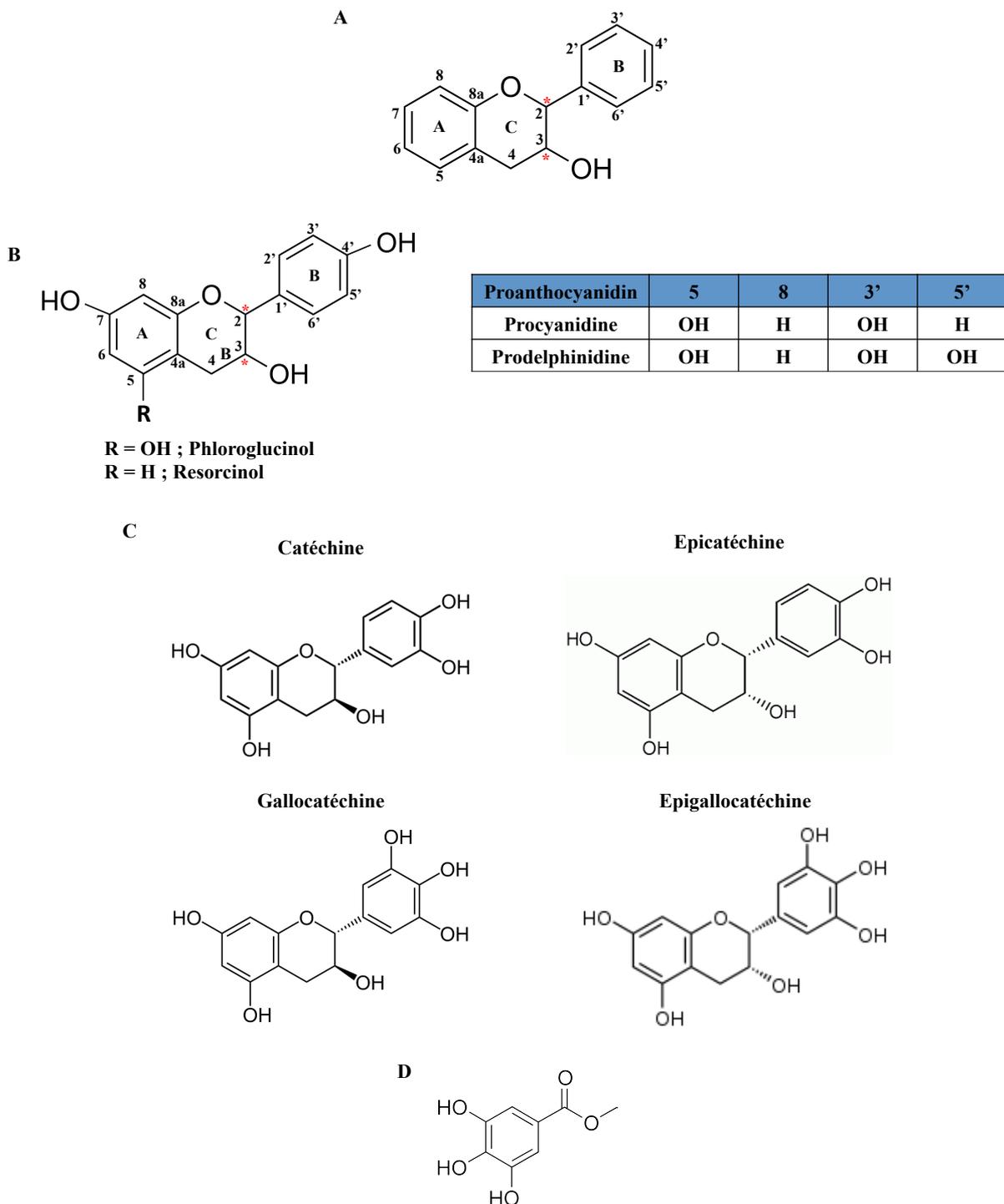


Figure 5 : Structure chimique du squelette flavan-3-ol composé de deux cycles aromatiques A et B et d'un cycle pyrane C (A). Présentation de la différence structurale entre les deux types de proanthocyanidines majoritairement présentes dans les vins (B). Structure chimique des unités de base des procyanidines et des prodelfhinidines (C). Structure chimique du groupement galloyle (D). Les centres chiraux sont représentés par un astérisque rouge (*). D'après Aron et Kennedy, 2008.

castalagine constituent les deux principaux tannins hydrolysables présents dans les vins rouges et/ou blanc (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006), avec des concentrations respectives de 0.002-0.02 g/L et 0.001-0.1 g/L (Jourdes *et al.*, 2011). Dans les vins, la concentration des tannins hydrolysables est généralement trop faible pour influencer leur goût (Pocock *et al.*, 1994). Ce sont plutôt les tannins condensés qui contribuent majoritairement au goût et aux qualités des vins rouges.

II.2. Les tannins condensés

Les tannins condensés appartiennent à la famille des flavonoïdes dont la structure de base est formée par deux cycles aromatiques reliés par trois carbones (C₆-C₃-C₆). Ce sont plus particulièrement des polymères de flavans-3-ols constitués de deux cycles aromatiques (cycles A et B) et d'un noyau central appelé cycle pyrane (cycle C) qui présente deux centres chiraux sur les positions 2 et 3 (**Fig.5.A**). Ils sont également appelés proanthocyanidines pour leur capacité à libérer des pigments de couleurs rougeâtres (anthocyanidines), suite à leur chauffage en milieu acide. Ces composés présentent une grande diversité de structure, différant par la structure des flavan-3-ols les composant (stéréochimie des centres chiraux en position 2 et 3 du cycle pyrane, nombre, position, nature des substituants : groupement hydroxyle et/ou galloyle), mais également par leur degré de polymérisation. On distingue deux classes de flavan-3-ols suivant la nature du substituant en position 5 du cycle A (Aron et Kennedy, 2008). S'il s'agit d'un groupement hydroxyle, ce sont des phloroglucinols, tandis que si le substituant est un proton, ce sont des résorcinols (**Fig.5.B**). Les flavan-3-ols des tannins condensés présents dans le raisin sont des phloroglucinols dont la stéréochimie du carbone en position 2 est toujours R, alors que celle du carbone en position 3 peut être R ou S (Thorngate et noble, 1993). Ils regroupent les procyanidines et les prodelphinidines, des dérivés de la (+)-catéchine (2R, 3S) ou de ses isomères, et constituent la classe des tannins catéchiques. Les deux unités de base des procyanidines et des prodelphinidines sont respectivement, la (+)-catéchine et la (-)-épicatéchine (2R, 3R), et la gallocatéchine et l'épigallocatéchine caractérisés par la présence de 3 groupements hydroxyles sur le cycle B (**Fig.5.C**). On trouve également des monomères dont la position 3 du cycle pyrane peut être estérifiée par un groupement galloyle (**Fig.5.D**). On parle dans ce cas de monomère galloylé.

Dans les tannins condensés, les procyanidines sont retrouvées sous forme de dimères (masse molaire autour de 600 g/mol) ou d'oligomères constituées de 3 à 10 unités de flavonols, avec

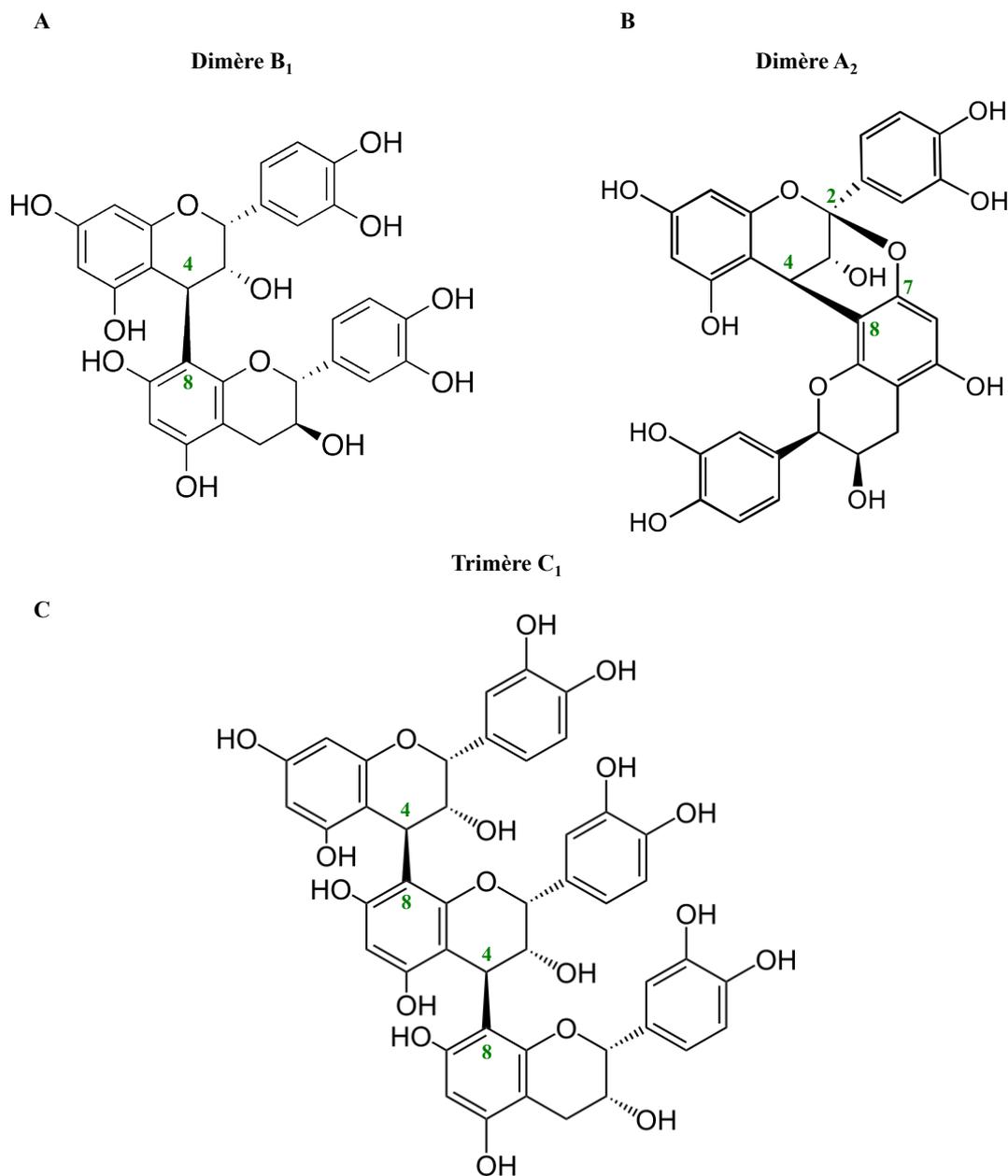


Figure 6 : Structure chimique d'un dimère de type B avec une liaison interflavane C₄-C₈, procyanidine B₁ (A), d'un dimère de type A avec deux liaisons interflavanes C₄-C₈ et C₂-C₇, procyanidine A₂ (B), et d'un trimère, la procyanidine C₁ (C).

des masses molaires allant de 900 à 3 000 g/mol. Leur degré de polymérisation évolue avec l'âge du vin (Blouin, 2008). Les dimères de procyanidines peuvent être classés en deux catégories : les procyanidines de types B et les procyanidines de types A. Les dimères de types B résultent de la condensation de deux unités monomériques par une liaison interflavane de type C₄-C₆ ou C₄-C₈ (**Fig.6.A**). Par contre, les dimères de types A possèdent non seulement une liaison interflavane de type C₄-C₆ ou C₄-C₈, mais aussi une liaison de type éther entre le carbone C₂ et les carbones C₅ ou C₇ (**Fig.6.B**). Dans le vin, ce sont les dimères de procyanidines de type B qui sont majoritairement présents. Les formes oligomériques peuvent adopter des structures linéaires si elles possèdent uniquement des liaisons interflavanes C₄-C₆ ou C₄-C₈, ou des structures ramifiées si elles sont liées entre elles par deux types de liaisons interflavanes (**Fig. 6.C**).

Dans la suite de cette thèse, pour des raisons de commodité, le terme « tannins » sous-entendra tannins condensés et regroupera également les formes monomériques même si *stricto sensu* elle ne répondent pas à la définition de Bate-Smith car leur masse moléculaire est inférieure à 500 g/mol.

II.3. La teneur et la composition en procyanidines des vins rouges

Différents types de procyanidines ont été identifiés dans les vins rouges : des monomères tels que la catéchine, l'épicatéchine, ou l'épigallocatechine, des dimères comme les procyanidines B₁ et B₂ et des trimères comme la procyanidine C₁ (Carando *et al.*, 1999, Monagas *et al.*, 2003, Gómez-Alonso *et al.*, 2007, Silva *et al.*, 2012). Les concentrations des tannins sont différentes d'un vin à l'autre. Elles sont influencées par la nature du cépage, les conditions climatiques, le millésime, ainsi que par les méthodes de vinification utilisées. La concentration totale en tannins dans les vins rouges peut être comprise entre 2 et 6 g/L avec une large contribution des tannins condensés, qui peuvent avoir une concentration qui varie entre 1 et 4 g/L (Quideau *et al.*, 2011). Les concentrations des unités monomériques les plus abondantes dans les tannins condensés sont respectivement autour de 0.1-0.2 g/L pour la (+)-catéchine et de 0.08 g/L pour la (-)-l'épicatéchine (Quideau *et al.*, 2011). La concentration en tannins dans les vins blancs est plus faible avec des concentrations allant de 0.1 à 0.3 g/L car dans ce cas, il n'y a pas de macération prolongée du jus avec la peau et les pépins du raisin (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006). Le diagramme de la **figure 7** montre la teneur en procyanidines de différents vins rouges français d'après Silva *et al.* (2012). On remarque que,

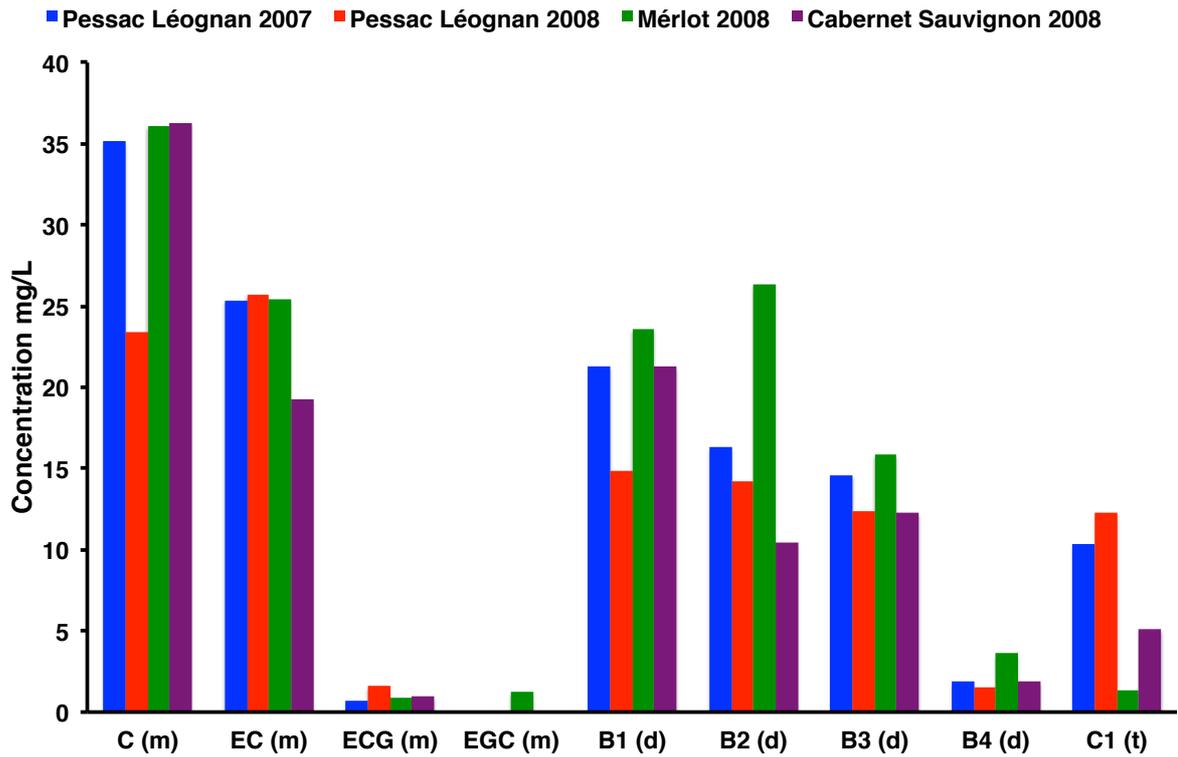


Figure 7 : Variation de la concentration en procyanidines dans différents vins rouges français. C : Catéchine, EC : Epicatéchine, EGC : Epigallocatechine, ECG : Epicatéchine gallate, m : monomère, d : dimère, t : trimère. D’après Silva *et al.*, 2012.

quel que soit le vin considéré, les procyanidines les plus représentées sont pour les monomères, la catéchine et l'épicatéchine, et pour les dimères, B₁, B₂ et B₃. Pour le trimère C₁, sa concentration est variable selon le vin, tandis que les espèces ECG (épicatéchinegallate), EGC (épigallocatechine) et B₄ sont peu ou pas représentées.

En se basant sur les différentes analyses de composition en procyanidines dans les vins rouges rapportées dans la littérature et malgré les différences en concentration en fonction du vin, on constate que les procyanidines les plus abondantes dans les vins rouges sont la catéchine pour les espèces monomériques et le B₁ pour les espèces dimériques. C'est pour cela qu'on a choisi ces deux polyphénols comme modèles de tannins condensés du vin dans notre étude.

II.4. Les propriétés physicochimiques des tannins

D'un point de vue physico-chimique, les tannins ont des propriétés colloïdales. Différentes études ont montré que les tannins sont capables de s'auto-associer entre eux au-delà d'une certaine concentration, appelée concentration micellaire critique (CMC), et de former des agrégats micellaires (Baxter *et al.*, 1996, Riou *et al.*, 2002, Pianet *et al.*, 2008). Ces interactions sont favorisées *via* des interactions hydrophobes de type π - π stacking entre les noyaux aromatiques des tannins. Cette auto-association est dépendante de la nature chimique du tannin ainsi que du milieu (Poncet-Legrand *et al.*, 2003). La force d'auto-association va dépendre de la valeur de la CMC. Les CMC de différents procyanidines monomériques, dimériques et trimériques ont été déterminés par Pianet *et al.* (2008). Ils ont mis en évidence que la CMC dépend de l'état oligomérique des tannins : la CMC du dimère est plus importante que celle du monomère correspondant. Ces différences ont été reliées au degré d'hydratation des tannins, ainsi qu'à leur structure tridimensionnelle. Les monomères ont un faible degré d'hydratation, sont moins solubles dans l'eau que les oligomères, et possèdent une structure plane qui favorise l'empilement intermoléculaire, ce qui aboutit à la formation de micelles de grande taille ou même de précipités. Par contre, pour les dimères, la présence d'une liaison interflavane de type C₄-C₈ peut engendrer deux rotamères avec deux conformations différentes, compacte ou étendue (Tarascou *et al.*, 2006). Ce type d'arrangement favorise le stacking intramoléculaire entre les cycles aromatiques aux dépens des interactions intermoléculaires. La CMC dépend également de la nature du milieu. Les valeurs de CMC dans un milieu hydro-alcoolique contenant 12% d'éthanol sont plus

Tannins	CMC (mM) dans D ₂ O
Catéchine	9 ± 2
Epicatéchine	< 5
Epicatéchinegallate	2.8 ± 0.3
Epigallocatechinegallate	6 ± 2
B ₁	17 ± 3
B ₂	18 ± 3
B ₃	24 ± 4
B ₄	17 ± 4
C ₂	15 ± 2

Tableau 1 : Valeurs (en mM) des concentrations micellaires critiques (CMC) des différents sous-unités polyphénoliques de tannins. D'après Pianet *et al.*, 2008.

Tannins (mM)	Pessac Léognan 2007	Pessac Léognan 2008	Merlot 2008	Cabernet Sauvignon 2008
Catéchine	0,122	0,081	0,124	0,125
Epicatéchine	0,088	0,088	0,087	0,066
Epicatéchinegallate	0,002	0,004	0,002	0,002
Epigallocatechine	nd	nd	0,004	nd
B ₁	0,037	0,026	0,041	0,037
B ₂	0,028	0,024	0,045	0,018
B ₃	0,025	0,021	0,027	0,021
B ₄	0,003	0,003	0,006	0,003
C ₁	0,012	0,014	0,002	0,006

Tableau 2 : Teneurs (en mM) des sous-unités polyphénoliques de tannins retrouvés dans différents vins. D'après Silva *et al.*, 2012.

importantes que dans un milieu contenant 100% d'eau. En effet, l'éthanol augmente la solubilité des tannins dans l'eau, ce qui conduit à une augmentation de la CMC. Au vu des valeurs de la CMC des tannins condensés (**Tableau 1**) et en se basant sur les concentrations en procyanidines trouvées dans le vin (**Tableau 2**), on peut dire que les concentrations en procyanidines vont se situer sous la CMC : ces dernières vont donc être présentes sous forme libre non agrégée. En conséquence, nous avons donc choisi de travailler à des concentrations inférieures à la CMC pour les deux modèles de tannins (catéchine et dimère B₁) qui ont servi à notre étude.

II.5. L'influence des tannins sur les sensations d'astringence et d'amertume

Comme déjà dit, l'interaction des tannins avec les protéines de la salive est à l'origine de la sensation d'astringence durant la dégustation d'un vin. Différents paramètres tels que la concentration des tannins, leur degré de polymérisation (DP) et leur structure peuvent influencer ces interactions et par suite moduler l'astringence. Des études par analyse sensorielle ont montré que les vins ayant une teneur importante en procyanidines sont les plus astringents (Kallithraka *et al.*, 2011, Cliff *et al.*, 2007, Kennedy *et al.*, 2006), ce qui montre que l'intensité d'astringence augmente avec la concentration en tannins dans les vins. D'autres études ont également montré que l'intensité d'astringence augmente avec le degré de polymérisation des tannins (Chira *et al.*, 2009, Vidal *et al.*, 2003, Peleg *et al.*, 1999). Cela pourrait être relié à la capacité des tannins à se lier aux protéines de la salive. En effet, Cala *et al.* (2010) ont montré que l'affinité des trimères de tannins pour les protéines de la salive est plus importante que celle des dimères. De plus, avec l'augmentation du DP des tannins, le nombre des cycles aromatiques augmente, ce qui favorise l'interaction des tannins avec les protéines de la salive riche en proline *via* des interactions hydrophobes. D'autres facteurs comme la stéréochimie des tannins, la présence d'un groupement galloyle, ou le type de liaison interflavane peuvent aussi affecter l'intensité d'astringence (Peleg *et al.*, 1999, Rosseti *et al.*, 2009).

La sensation d'amertume, quant à elle, résulte d'une interaction spécifique entre les tannins et les récepteurs du goût amer enchâssés dans les membranes cellulaires de la muqueuse buccale. Les tannins monomères sont plus amers que les oligomères. Contrairement à l'astringence, l'intensité d'amertume diminue avec l'augmentation du degré de

polymérisation des tannins (Noble *et al.*, 1994, Peleg *et al.*, 1999). La stéréochimie des tannins contribue également à l'intensité d'amertume ; l'épicatéchine induit une sensation d'amertume plus importante que la catéchine (Thorngate et Noble, 1995).

Outre la structure chimique des tannins, il existe d'autres facteurs qui peuvent moduler les sensations d'amertume et d'astringence dans le vin tels que le pH, la température, la force ionique, ou la présence de l'éthanol dans le milieu (Noble *et al.*, 1994, Poncet-Legrand *et al.*, 2003, Fontoin *et al.*, 2008). En plus des interactions avec les protéines, les tannins sont capables d'interagir avec les polysaccharides qui sont des constituants essentiels dans le vin. Selon la littérature, ces interactions peuvent empêcher l'agrégation entre les tannins et les protéines de la salive, et ainsi diminuer l'astringence des vins riches en polysaccharides (Escot *et al.*, 2001, Carvalho *et al.*, 2006, Rinaldi *et al.*, 2012, Faurie *et al.*, 2016).

Les tannins sont capables également d'interagir avec une autre famille de molécules, les lipides. Bien que les lipides soient absents dans le vin, ils sont néanmoins présents au cours de la dégustation en tant que composants des membranes buccales ou du bol alimentaire lors d'un repas. Cependant, bien que les relations entre les tannins du vin, les protéines salivaires, les sucres et le goût sont relativement bien établies au niveau moléculaire, l'implication des lipides dans les perceptions sensorielles d'un vin est, jusqu'à ce jour, un sujet très peu exploité tant du point de vue moléculaire qu'œnologique. Dans la gastronomie, les accords mets-vins sont évoqués au travers des recommandations des sommeliers comme par exemple : "un Sancerre se mariera bien avec un fromage de chèvre", "un vin liquoreux comme le Sauternes s'associera bien avec du fromage à pâte persillée" ou "un morceau de bœuf saignant s'accordera bien avec des vins rouges puissants et tanniques". Il s'agit des combinaisons entre des aliments et du vin qui permettent de rendre l'expérience de dégustation d'un vin plus agréable. Néanmoins, ces suggestions ainsi que les ressentis des dégustateurs sont basés uniquement sur des considérations empiriques et non sur des preuves scientifiques. Il existe relativement peu d'études sur l'impact des aliments sur le goût du vin. Des analyses sensorielles ont montrées qu'une sauce hollandaise et un fromage bleu diminuent l'intensité du goût acide d'un vin blanc (Nygren *et al.*, 2001, 2002) ou l'ingestion du fromage diminue la perception d'astringence d'un vin rouge (Madrigan-Galan *et al.*, 2006). Bien que les lipides soient des composants essentiels de la majorité des aliments qui accompagnent le vin (viande, poulet, fromage, gâteau...), aucune étude n'a encore actuellement été menée au niveau sensoriel ou moléculaire pour déterminer l'implication des interactions tannins-lipides dans le goût du vin. C'est pourquoi dans cette thèse nous nous sommes intéressés aux interactions

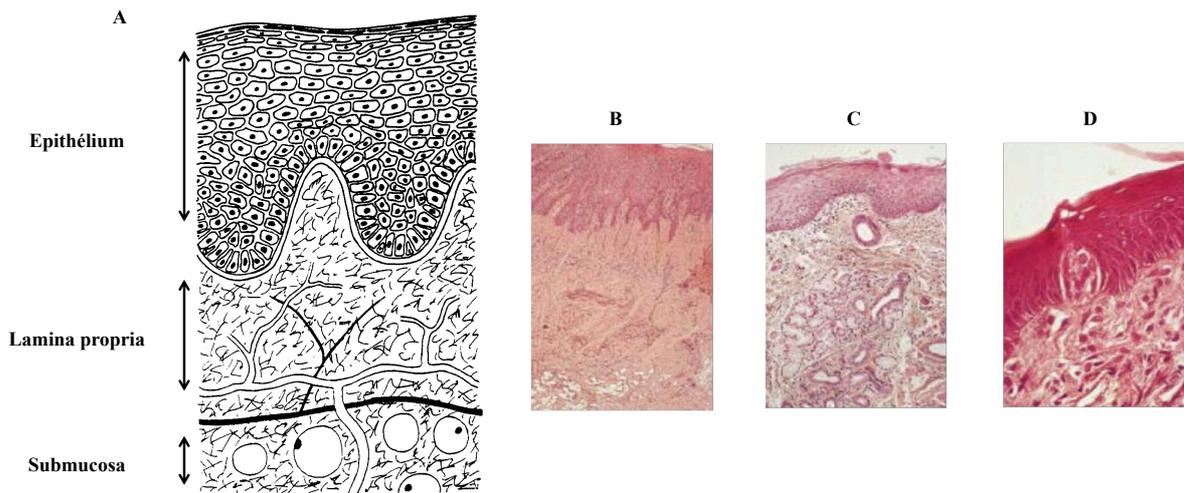


Figure 8 : Organisation anatomique de la muqueuse buccale (A). Coupes histologiques des muqueuses masticatrices (B), bordantes (C) et spécialisées (D). D'après Harris et Robinson, 1992.

entre les tannins du vin et les lipides, que ce soit ceux des membranes buccales ou des aliments gras. Dans la partie suivante, nous allons présenter les membranes buccales et les globules gras des aliments, ces deux architectures moléculaires étant le siège des lipides comme cible potentielle pour les tannins du vin.

III. Les lipides impliqués dans le goût du vin

Dans la bouche, les tannins peuvent interagir avec les lipides endogènes qui composent les membranes buccales et les lipides exogènes qui sont apportés par l'alimentation sous forme de gouttelettes lipidiques. Ceux-ci font partie d'assemblages moléculaires complexes. Pour étudier les interactions des tannins avec ces lipides, il est nécessaire d'utiliser des modèles qui miment ces assemblages lipidiques afin de se rapprocher des conditions de dégustation. Dans un premier temps, on va décrire les assemblages moléculaires susceptibles d'interagir avec les tannins, représentés par les membranes buccales et les gouttelettes lipidiques du bol alimentaire. Ensuite, on va présenter les modèles lipidiques utilisés dans cette thèse qui miment les membranes et les gouttelettes.

III.1. Les lipides des membranes buccales

III.1.1. Les différents types de muqueuses buccales

On définit sous le terme de muqueuses buccales l'ensemble des tissus tapissant l'intérieur de la bouche (langue comprise). Elles sont anatomiquement divisées en trois couches (**Fig.8.A**) : la couche la plus externe est un assemblage de cellules organisées en différentes strates, l'épithélium stratifié pavimenteux. Celui-ci repose sur un tissu conjonctif appelé la *lamina propria*, elle-même située sur une couche basale, la sous-muqueuse (Harris et Robinson 1992).

Il existe trois types différents de muqueuses buccales : les muqueuses masticatrices, les muqueuses bordantes et les muqueuses spécialisées. Chaque muqueuse est située dans une région différente de la cavité buccale, et possède des caractéristiques uniques. Les muqueuses masticatrices (**Fig.8.B**) se trouvent au niveau de la gencive et du palais dur, elles couvrent

25% de la surface buccale. Elles possèdent un épithélium kératinisé¹ et aident à la compression mécanique des aliments. Elles disposent également d'une faible perméabilité (Squier *et al.*, 1991). Les muqueuses bordantes (**Fig.8.C**) revêtent le versant muqueux des lèvres, l'intérieur des joues, le plancher buccal, le palais mou, et couvrent 60% de la cavité buccale. Elles possèdent un épithélium non kératinisé, ce qui augmente leur perméabilité. C'est pourquoi elles sont considérées comme une cible de choix pour l'administration de molécules thérapeutiques. Les muqueuses spécialisées représentent 15% de la surface buccale (**Fig.8.D**), sont localisées sur la face dorsale de la langue et possèdent des régions kératinisées et non kératinisées. Elles se caractérisent surtout par la présence des papilles linguales (Shojaei, 1998).

Ils existent trois types de papilles linguales (Coujat et Poirier 1980) : (i) les papilles filiformes, localisées sur les deux tiers antérieurs de la face dorsale de la langue. Elles sont très nombreuses, possèdent un épithélium kératinisé et confèrent au dos de la langue son aspect râpeux. Ces papilles ne jouent aucun rôle dans la reconnaissance du goût ; (ii) les papilles fongiformes, légèrement kératinisées, sont localisées sur les bords de la langue ; (iii) les papilles caliciformes, non kératinisées, sont les plus volumineuses mais les moins nombreuses sur la langue (une douzaine). C'est dans ces deux derniers types de papilles (caliciformes et fongiformes) que sont localisées les bourgeons du goût (**Fig.1.A**).

III.1.2. La fonction des muqueuses buccales

Les muqueuses buccales peuvent jouer plusieurs fonctions. Une fonction de protection contre les forces mécaniques mises en jeu durant la mastication des aliments, ainsi qu'un rôle de barrière de protection contre les micro-organismes saprophytes présents dans la cavité buccale. Les muqueuses buccales jouent également un rôle sensoriel représenté par des nocicepteurs, des thermorécepteurs, et des récepteurs du goût qui nous permettent de sentir la douleur, la température et le goût des aliments (Auriol et Charpentier, 1998). De plus, les muqueuses buccales sont considérées comme une voie d'administration des médicaments. Cette fonction est liée à la perméabilité de ses tissus qui dépend de plusieurs facteurs, telles que la kératinisation de l'épithélium et la composition lipidique des membranes buccales (Squier *et al.*, 1991, Diaz del Consuelo *et al.*, 2005).

¹ Se dit d'un épithélium dont la couche superficielle est riche en kératine (une protéine fibreuse).

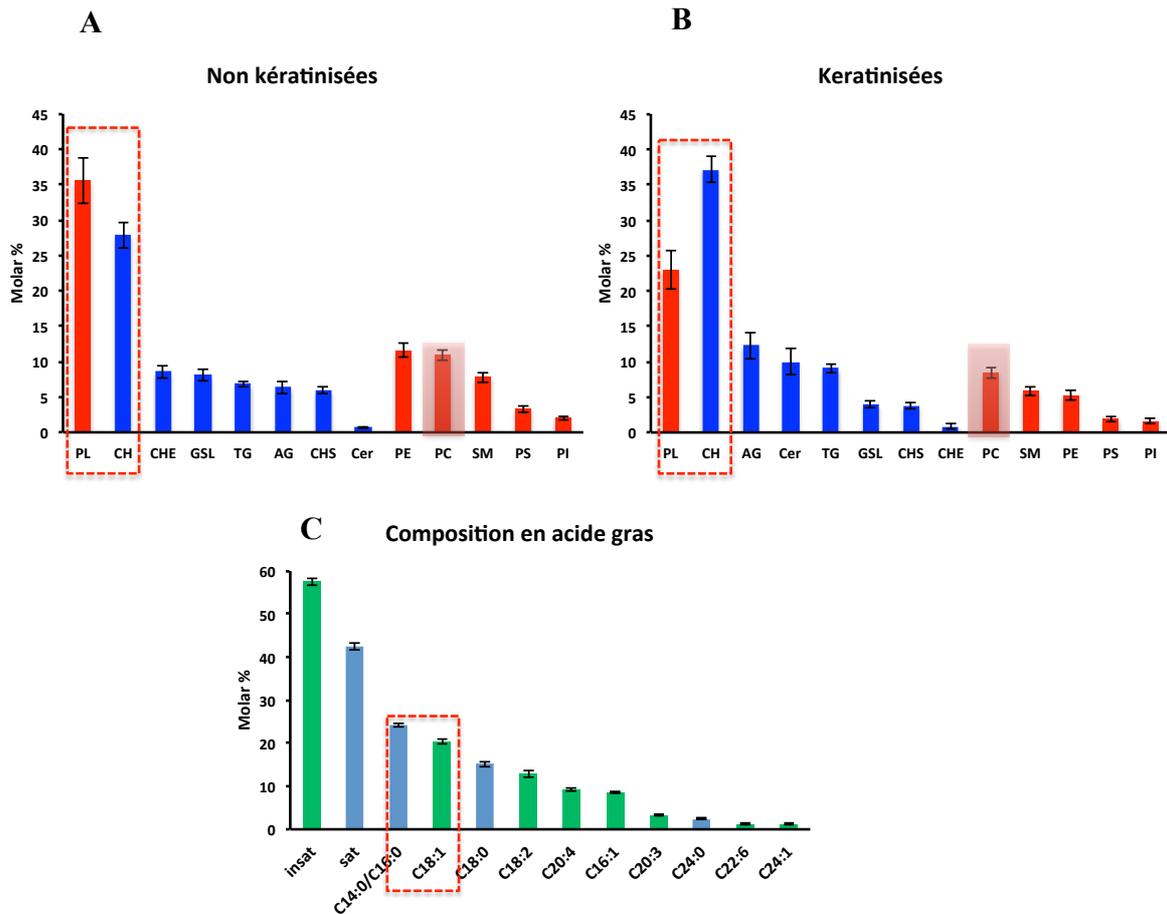


Figure 9 : Représentation de la composition lipidique molaire, des muqueuses buccales non kératinisées (A) et kératinisées (B), ainsi que leurs compositions en acide gras (C). PL : Phospholipides, CH : Cholestérol, CHE : Esters de cholestérol, GSL : Glucosylcéramides, TG : Triglycérides, AG : Acides gras, CHS : Sulfate de cholestérol, Cer : Céramides, PE : Phosphatidyléthanolamine, PC : Phosphatidylcholine, SM : Sphingomyéline, PS : Phosphatidylserine, PI : Phosphatidylinositol. Sat : acide gras saturé, Insat : acide gras insaturé. Les deux lipides et chaînes grasses majoritaires sont visualisés par un cadre rouge.

III.1.3. La composition lipidique des muqueuses buccales

La composition lipidique des muqueuses buccales a été étudiée dans la littérature dans le but de déterminer le rôle des lipides dans la fonction de perméabilité de ces membranes. Dans la cavité buccale, on distingue des régions kératinisées comme les muqueuses masticatrices (palais, gencive) et des régions non kératinisées comme les muqueuses bordantes (joues et plancher buccal). Les muqueuses spécialisées de la face dorsale de la langue présentent des régions à la fois kératinisées et non kératinisées. La composition lipidique des membranes buccales varie en fonction de la muqueuse considérée. Nous avons d'abord rassemblé les données de la littérature puis nous avons déterminé la composition lipidique moyenne des muqueuses buccales selon qu'elles appartiennent à des régions kératinisées ou non kératinisées (**Fig.9**). Les données ont été recueillies à partir de la composition lipidique de muqueuses masticatrices et bordantes car nous n'avons pas trouvé de données concernant les muqueuses spécialisées (Wertz *et al.*, 1985, Squier *et al.*, 1991, Law *et al.*, 1995, Thomson *et al.*, 2001, Diaz del Consuelo *et al.*, 2005). La **figure 9** montre que les muqueuses buccales ont une composition lipidique hétérogène où les phospholipides (PL) zwitterioniques et le cholestérol sont majoritaires dans les deux types de muqueuses, kératinisées et non kératinisées avec des pourcentages molaires respectivement de 23% de PL et 37% de cholestérol dans les muqueuses kératinisées et de 35% de PL et 27% de cholestérol dans les muqueuses non kératinisées (**Fig.9.A et B**). On remarque également que la phosphatidylcholine (PC) est le phospholipide majoritairement présent dans les deux muqueuses. De plus, on observe que les muqueuses kératinisées sont plus riches en céramides et en cholestérol, ce qui explique leur faible perméabilité par rapport aux muqueuses non kératinisées (Squier *et al.*, 1991). En ce qui concerne les acides gras composant les lipides des muqueuses buccales, on remarque que les lipides insaturés (57.5%) sont plus représentés que les lipides saturés (42.5%) (**Fig.9.C**). Dans ces deux classes de lipides, l'ensemble {acide myristique C14:0, acide palmitique C16:0} est majoritaire pour les acides gras saturés, tandis que l'acide oléique (C18:1) est prédominant pour les acides gras insaturés (Terashi *et al.*, 2000).

Les lipides des muqueuses buccales sont issus principalement des membranes des cellules qui composent les différentes couches. Pour représenter les muqueuses buccales, nous avons donc choisi de travailler avec un modèle de membrane qui mime la composition lipidique des muqueuses recouvrant la cavité buccale. Conformément aux données de la **figure 9**, nous avons sélectionné les deux lipides majoritairement présents dans les muqueuses buccales : les

phospholipides et le cholestérol. D'un point de vue quantitatif, on a pris la quantité moyenne de cholestérol dans les muqueuses buccales (kératinées et non kératinisées) soit 30% molaire, et les 70% restant ont été représentées par le phospholipide POPC (16:0-18:1), dont les chaînes grasses représentent les deux principaux acides gras trouvés dans les muqueuses buccales à savoir l'acide palmitique et l'acide oléique, et dont la tête polaire zwitterionique est représentative de celle des phospholipides présents dans les muqueuses buccales.

III.2. Les lipides des aliments

L'alimentation apporte les nutriments nécessaires au fonctionnement énergétique de l'organisme. Chez l'homme, les lipides doivent représenter 35 à 40% de l'apport énergétique total (Afssa, 2010), soit environ 20% en masse de l'ensemble des nutriments (glucides, lipides et protéines). Dans les aliments, les lipides assurent des fonctions nutritionnelles, sensorielles et technologiques. Sur le plan nutritionnel, ils sont connus pour leurs forts apports énergétiques, ainsi que pour leurs rôles comme précurseurs de certains composés actifs et métaboliques (Abedi et Sahari, 2014). D'un point de vue technologique, les lipides participent à la structure des aliments, leurs qualités sensorielles et leur conservation (Genot et Michalski, 2010).

III.2.1. La nature des lipides alimentaires

Les lipides sont présents en quantités variables dans les différents aliments d'origine végétale (olives, noix, fruits, légumes, grains) et animales (viande, poisson, œuf, lait). Les lipides alimentaires consommés par l'homme sont principalement composés de triglycérides (90%), et en quantité plus faible de phospholipides (1 à 10%), de cholestérol (principalement sous forme estérifié) et d'autres composés lipidiques mineurs tels que les vitamines liposolubles et les caroténoïdes (Turgeon et Rioux, 2011, Raynal-Ljutovac *et al.*, 2011). Les triglycérides sont des triesters d'acides gras et de glycérol. Ils sont les composants principaux des huiles et de la matière grasse alimentaires, alors que les phospholipides proviennent essentiellement des œufs, de la viande, du poisson ainsi que des lécithines de soja utilisées pour leur pouvoir émulsifiant dans l'industrie agro-alimentaire. Les acides gras libres (non estérifiés) sont présents en faibles concentrations dans les lipides alimentaires (quelques %), et sont issus des triglycérides, des phospholipides et des esters du cholestérol. Dans les aliments, on trouve des acides gras saturés, mono-insaturés et poly-insaturés, dont la

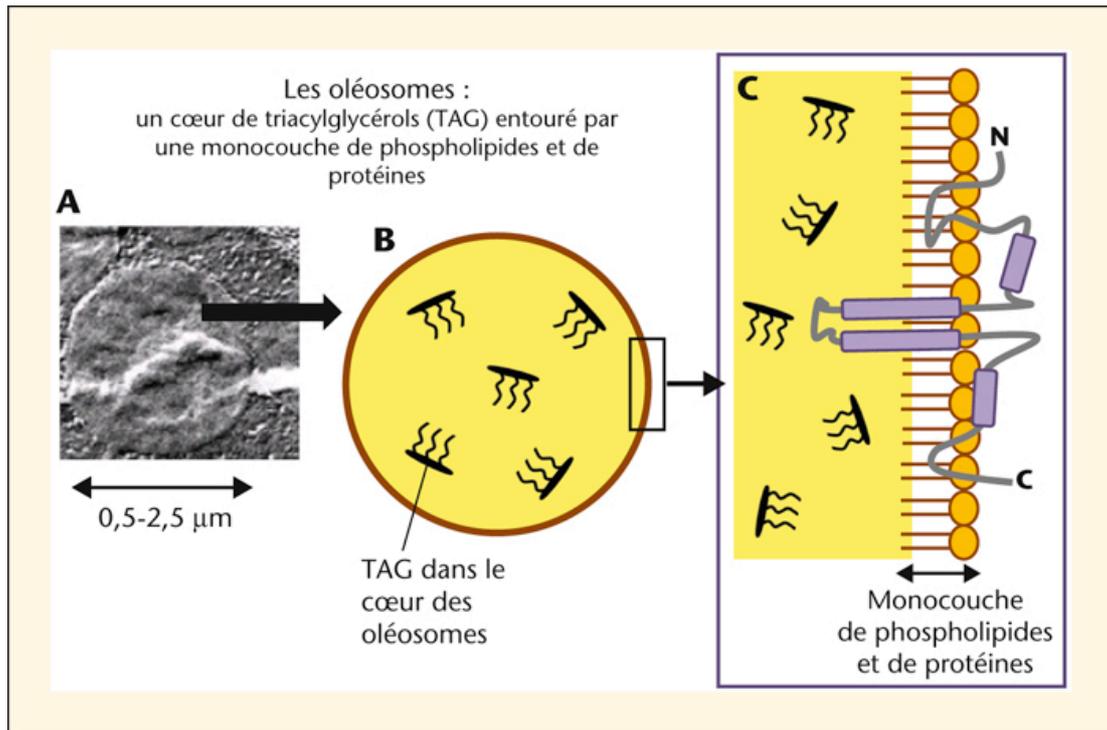


Figure 10 : Organisation des lipides dans un oléosome. Vue en microscopie électronique (A), schéma représentatif (B) et agrandissement de la membrane d'un oléosome (C). D'après Raynal-Ljutovac *et al.*, 2011.

composition varie suivant les aliments. L'acide palmitique (C16:0) et l'acide oléique (C18:1) représentent les acides gras majoritairement présents dans les aliments (Raynal-Ljutovac *et al.*, 2011).

III.2.2. L'organisation des lipides dans les aliments

Les lipides entrent dans la constitution des différents aliments consommés par l'Homme. Ils peuvent soit conserver leur organisation native qu'ils avaient dans les organes et les tissus biologiques, soit ils se réorganisent en fonction des divers traitements appliqués au cours de leur préparation. Ainsi dans les aliments ne subissant pas de traitement préalable, les lipides sont organisés selon leur structure moléculaire d'origine. On trouve des structures comme les globules gras dans le lait, des adipocytes (tissus adipeux) dans le cas des viandes et des poissons et des oléosomes (cœur de lipides entouré d'une monocouche de phospholipides et de protéines) dans le cas de graines oléagineuses (**Fig.10**). On retrouve également des structures cellulaires comme les membranes biologiques et les organites cellulaires. Dans le cas des aliments transformés, les lipides sont organisées soit sous forme d'une phase continue, homogène (huile) ou dans laquelle peuvent être dispersée des gouttelettes dans le cas des émulsions eau dans huile E/H (margarines, beurre, pâtes à tartiner), soit sous forme de gouttelettes dispersées dans une phase aqueuse dans le cas des émulsions huile dans eau H/E (mayonnaise, sauces, vinaigrette, lait), soit dispersé sous forme d'inclusions de tailles très variables (allant d'une dizaine de μm jusqu'à quelques mm), ou enchâssés dans des matrices protéiques et/ou glucidiques (viandes, fromages, gâteaux...) (Genot et Michalski, 2010).

III.3. Les modèles lipidiques utilisés dans cette thèse

Les membranes biologiques, ainsi que les gouttelettes lipidiques alimentaires sont des systèmes complexes qui possèdent une grande diversité au niveau de leur structure et de leur composition lipidique. Pour étudier les propriétés et l'organisation des lipides dans de tels systèmes, nous avons eu recours à des modèles lipidiques simples et représentatifs de l'architecture et la composition des systèmes réels, qui peuvent être étudiés par diverses techniques physico-chimiques ou spectroscopiques comme la RMN. Dans cette partie, nous présenterons les modèles lipidiques que nous avons utilisés pour mimer les membranes buccales et les gouttelettes dans les aliments.

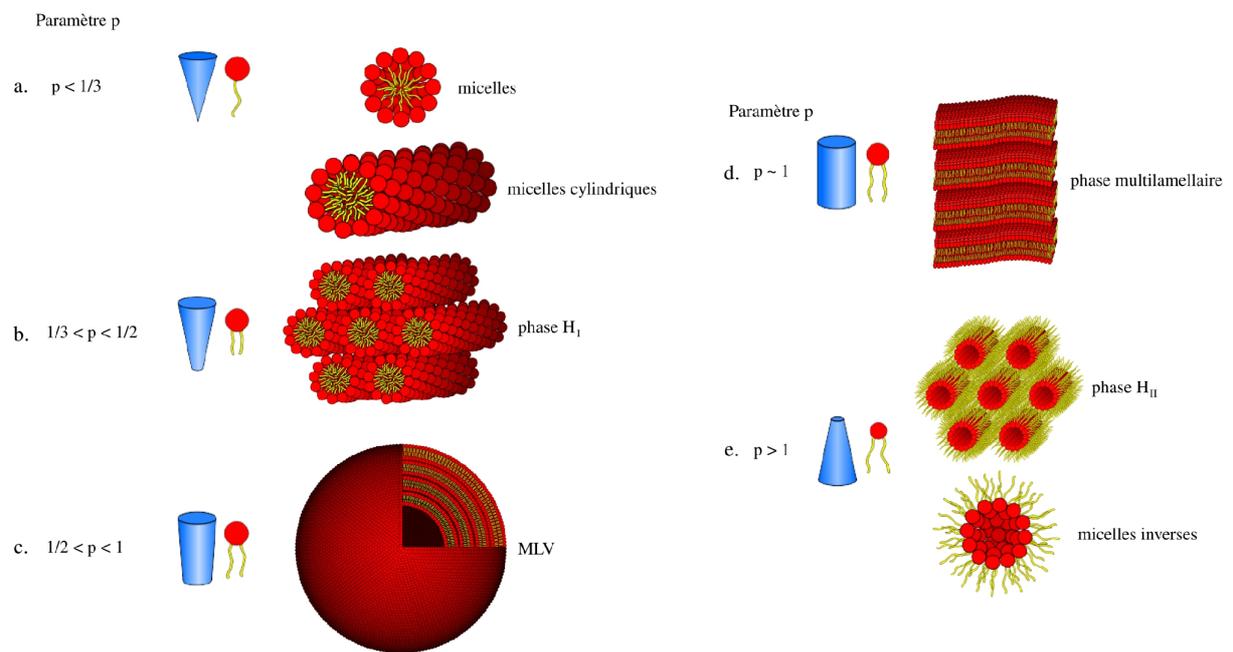


Figure 11 : Illustration des différentes organisations et phases lipidiques en fonction du paramètre de compactage p (d'après Israelachvili *et al.*, 1976, 1980). Image extraite de la thèse de Buchoux, 2008.

III.3.1. Les membranes artificielles comme modèle des membranes buccales

a. Polymorphisme lipidique

Les lipides sont des molécules amphiphiles qui ont la capacité de s'auto-assembler en phase aqueuse, pour des concentrations supérieures à la concentration micellaire critique CMC. Les agrégats lipidiques ainsi formés, contrairement aux tannins, s'organisent en phases structurées de telle façon que les répulsions entre la partie hydrophobe/polaire des lipides et l'eau soient respectivement minimisées/optimisées (Cevc, 1993). La morphologie de ces phases va dépendre des volumes respectifs des parties hydrophobes et hydrophiles des lipides qui les constituent. Israelachvili *et al.* (1976, 1980) ont notamment défini le paramètre de compactage, p , qui explique la formation de ces objets :

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

Avec v le volume de la partie hydrophobe, a_0 la surface optimale entre l'eau et la partie hydrophile et l_c la longueur de la chaîne carbonée du lipide. Il est intéressant de signaler que le paramètre de compactage p tient compte également d'autres facteurs propres à chaque système lipidique, comme la charge des lipides ou la présence de liaison hydrogène (Cevc, 1993). Selon les valeurs de p , les lipides peuvent adopter différents types de phases.

- Lorsque $p < 1/3$, la tête hydrophile est plus importante que la partie hydrophobe. Le lipide prend une forme conique où la tête polaire est située à la base. Afin de minimiser les contacts des chaînes hydrophobes avec l'eau, les lipides s'organisent sous la forme de micelles sphériques (**Fig.11.A**).
- Lorsque $1/3 < p < 1/2$, le volume de la partie hydrophobe augmente légèrement. Le lipide est schématisé sous forme d'un cône tronqué, et adopte une phase hexagonale de type H_1 . Il s'organise sous forme de micelles cylindriques (**Fig.11.B**).
- Lorsque $1/2 < p < 1$, le sommet du cône schématisant les lipides est plus large. Les lipides s'organisent spontanément en liposomes constitués de plusieurs bicouches, les MLV (Multilamellar Large Vesicles) (**Fig.11.C**). La plupart des lipides dans les membranes biologiques adoptent ce type de phase.

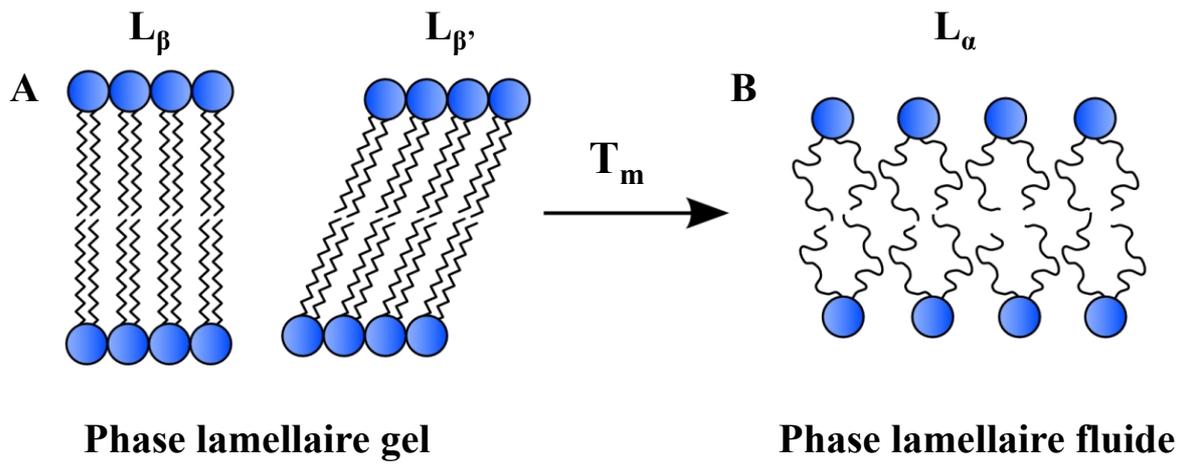


Figure 12 : Représentation schématique de la transition de phase d'une phase lamellaire gel L_{β} ou $L_{\beta'}$ (A) vers une phase lamellaire fluide L_{α} (B). T_m est la température de transition de phase gel-fluide.

- Lorsque $p \approx 1$, le lipide est représenté sous forme d'un cylindre. Le rayon de courbure de la membrane formé tend vers l'infini, et la phase observée est un empilement de bicouches de lipides (**Fig.11.D**).
- Lorsque $p > 1$, la partie hydrophobe devient plus volumineuse que la partie hydrophile. Le lipide est schématisé sous forme d'un cône, mais cette fois où la tête polaire est située au sommet. Dans ce cas, les lipides s'organisent sous la forme de micelles inversées, ou d'une phase hexagonale inversée de type H_{II} (**Fig.11.E**).

En plus du paramètre de compactage p , d'autres facteurs tels que la concentration en lipides ou la température peuvent avoir une influence sur la nature de la phase lipidique observée.

b. Influence de la température sur la phase lipidique des systèmes membranaires

La température a un effet très important sur la nature de la phase lipidique. En effet, les chaînes aliphatiques des lipides ne s'organisent pas de la même manière à basse et à haute température. A basse température, les chaînes des lipides se trouvent dans la conformation la plus favorable dite tout *trans*, où chaque liaison C-C est en conformation *trans*. Elle est caractérisée par le fait que les chaînes acyles sont étendues au maximum, alignées entre elles et proches des unes des autres, ce qui se traduit par une faible mobilité des lipides, correspondant à une bicouche rigide. Il s'agit d'une phase ordonnée ou phase lamellaire gel notée L_{β} si les chaînes sont parallèles au plan de la bicouche, ou $L_{\beta'}$ si elles sont inclinées (**Fig.12.A**). A haute température, il y a une augmentation de la mobilité des chaînes acyles des lipides, avec l'apparition de défauts (on parle dans ce cas de conformation *gauche*). Les chaînes alternent entre des conformations *trans* et *gauche*, les chaînes s'éloignent alors les unes des autres et la bicouche devient plus fluide (**Fig.12.B**). Il s'agit d'une phase désordonnée ou phase lamellaire fluide notée L_{α} .

La transition entre la phase lamellaire gel et la phase fluide a lieu à partir d'une certaine température appelée T_m . Elle dépend de la longueur des chaînes acyles, de leur degré d'insaturation et de la configuration des doubles liaisons. Plus les chaînes sont longues, plus la température de transition de phase augmente. En revanche, la présence d'une ou plusieurs insaturations va créer des défauts de compactage des chaînes, ce qui entraîne à une diminution de la T_m . De même, une double liaison de configuration *cis* crée plus de désordre qu'une configuration *trans* dans la chaîne lipidique.

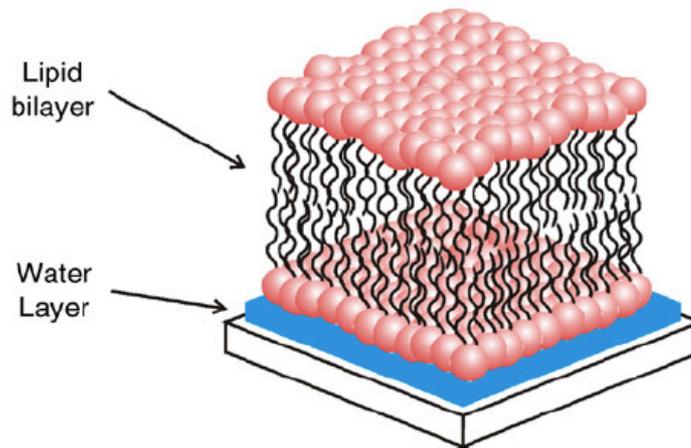
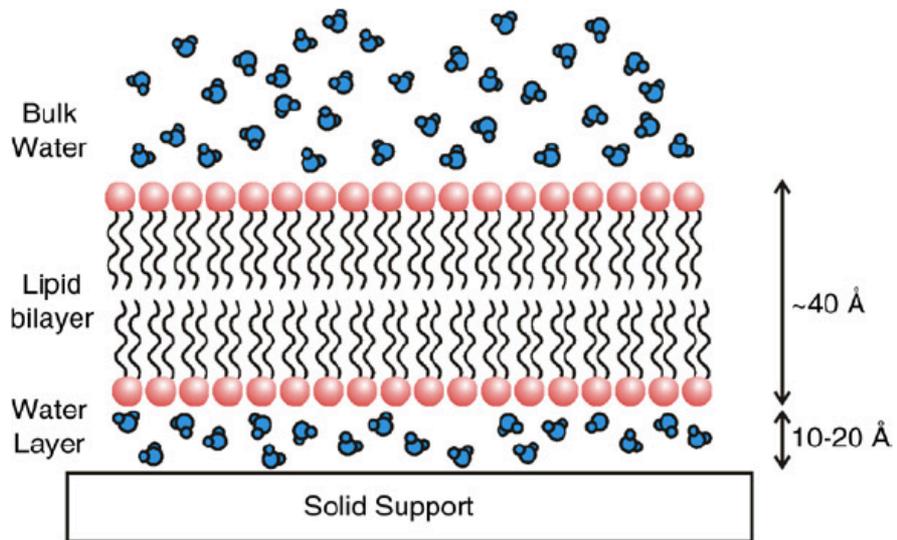


Figure 13 : Représentation schématique d'une bicouche supportée de phospholipides sur un support solide. D'après Castellana et Cremer, 2006.

c. Description des modèles lipidiques

Dans cette thèse, nous avons choisi les modèles de liposomes et bicouches supportées pour représenter les membranes buccales. Leurs structures reproduisent la bicouche lipidique des membranes biologiques (Bangham, 1993, Rongen *et al.*, 1997, Castellana et Cremer, 2006, Peelta *et al.*, 2009, Hardy *et al.*, 2013) et il est possible d'en fabriquer avec des lipides variés en particulier avec les deux principaux lipides trouvés dans les membranes buccales (POPC et cholestérol).

Les liposomes sont des vésicules lipidiques sphériques ayant un compartiment interne aqueux. Ils peuvent être multilamellaires (MLV) ou unilamellaires (SUV, LUV ou GUV). Pour les MLV, il s'agit d'un empilement de sphères concentriques de lipides organisés en bicouches et séparées par des couches d'eau avec des tailles variables comprises entre 0.5 et 5 μm . Nous sommes capables de former des vésicules unilamellaires à partir des MLV des vésicules unilamellaires, soit par sonication² pour former des SUV (Small Unilamellar Vesicle) avec des tailles de l'ordre de la dizaine de nanomètres ; soit par extrusion³ pour former des LUV (Large Unilamellar Vesicles) avec des tailles de l'ordre de quelques centaines de nanomètres (Chatterjee et Agarwal, 1988). Les liposomes sont utilisés en tant que modèles de membranes pour analyser l'organisation et la dynamique des membranes biologiques, pour étudier les processus membranaires telles que l'adhésion cellulaire, la formation de pores ou la fusion membranaire (Deleu *et al.*, 2014). Ils sont également utilisés comme des vecteurs de médicaments dans le domaine pharmaceutique (Peelta *et al.*, 2009). Ces systèmes lipidiques sont bien adaptés aux techniques d'analyse volumétrique comme la calorimétrie, la spectroscopie RMN, la spectroscopie de fluorescence (Heerklotz, 2004, Grélard *et al.*, 2010, Düzgüneş *et al.*, 2010).

Les bicouches supportées sont des systèmes lipidiques plans qui s'assemblent sur des supports solides comme le mica, la silice, l'alumine ou l'oxyde de titane (Castellana et Cremer, 2006, Richter *et al.*, 2006). Dans ces systèmes, la bicouche lipidique est séparée du support solide par une fine couche d'eau de 10 à 20 Å, avec les têtes polaires de la première monocouche dirigée vers la phase aqueuse et celles de la deuxième monocouche face au support solide (**Fig.13**). Différents procédés sont utilisés pour former les bicouches supportées. On peut citer la méthode de Langmuir-Blodgett qui implique le transfert de deux monocouches de lipides

² Procédé utilisant de l'énergie sonore (ultra-sons) pour fragmenter les vésicules multilamellaires.

³ Procédé utilisant de l'énergie mécanique qui consiste à pousser les vésicules à travers un filtre avec une taille de pores définie pour les fragmenter.

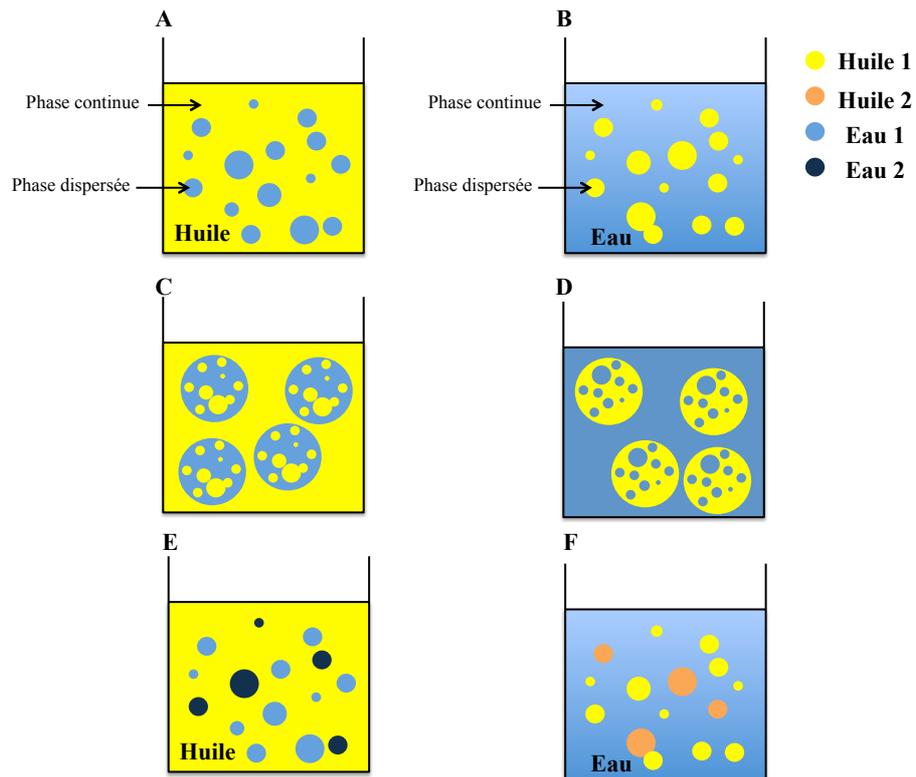


Figure 14 : Schéma représentant les différents types d'émulsions. Les émulsions simples, indirecte E/H (A) et directe H/E (B), les émulsions multiples, H/E/H (C) et E/H/E (D), et les émulsions mixtes, $E_1 + E_2/H$ (E) ou $H_1 + H_2/E$. E = eau , H = huile.

à l'interface air/eau vers le support solide ou la méthode de fusion des vésicules unilamellaires sur le support solide après leur adsorption et leur déformation. Ces modèles membranaires sont utilisés dans l'étude de la biophysique et l'organisation des membranes, ainsi que dans les études d'interaction de biomolécules avec les têtes polaires des lipides ou des protéines membranaires. Leur géométrie plane fournit un environnement approprié pour l'application de différentes techniques analytiques surfaciques non réalisables sur des liposomes en suspension comme la PWR, la SPR, l'ATR ou l'AFM (Salamon et Tollin, 2001, Abdiche et Myszkka 2004, Hull *et al.*, 2005, Mingeot-Leclerc *et al.*, 2008)

III.3.2. Les émulsions comme modèle des gouttelettes lipidiques des aliments

En ce qui concerne les gouttelettes lipidiques dans les aliments, les émulsions sont couramment utilisées comme modèle d'étude (Rahmati *et al.*, 2014, Komaiko *et al.*, 2015, Chung *et al.*, 2017). Une émulsion est un système comprenant au moins deux liquides non miscibles, dont l'un est dispersé dans l'autre sous forme de gouttelettes. Il existe différents types d'émulsion selon la dispersion des phases aqueuse ou huileuse (McClements, 2010) : (i) les émulsions simples constituées d'une phase continue et d'une phase dispersée. Elles sont appelées émulsions directes lorsque l'huile est la phase dispersée et l'eau la phase continue (émulsion H/E), et émulsions inverses lorsque la phase dispersée est l'eau et l'huile la phase continue (émulsion E/H) (**Fig.14.A et B**) ; (ii) les émulsions multiples (émulsions d'émulsion) lorsqu'une émulsion simple est dispersée dans une phase continue. On distingue les émulsions H/E/H et E/H/E (**Fig.14.C et D**) ; (iii) les émulsions mixtes lorsque les émulsions sont formées de gouttelettes de composition en liquide différente. Elles peuvent être de type E_1+E_2/H ou H_1+H_2/H (**Fig.14.E et F**).

En fonction de la taille des gouttelettes dispersées, on distingue trois catégories d'émulsions : (i) les émulsions ou macro-émulsions dont le diamètre moyen des gouttelettes varie entre 0.1 et 100 μm . Ces émulsions sont thermodynamiquement instables et ont un aspect visuel laiteux opaque (**Fig.15**) ; (ii) les nano-émulsions dont le diamètre moyen varie entre 20 et 200 nm. Elles sont plus ou moins stables avec une apparence quasi transparente (Solans *et al.*, 2005) ; (iii) les microémulsions dont le diamètre moyen varie entre 0.1 et 100 nm. Vu leur faible



Emulsion

Microémulsion

Nano-émulsion

Figure 15 : Images représentant l'aspect visuel des différentes catégories d'émulsions.
D'après Kale et Deore, 2017.

taille, elles sont thermodynamiquement stables avec un aspect visuel transparent (Solans et Kunieda, 1996).

Les émulsions sont des systèmes thermodynamiquement instables, qui nécessite l'utilisation d'un émulsifiant qui s'adsorbe à l'interface des gouttelettes, et stabilise l'émulsion en diminuant la tension interfaciale et l'énergie du système. Il existe plusieurs familles d'émulsifiants tels que les protéines, les phospholipides et les polysaccharides (Komaiko *et al.*, 2015, Ozturc et McClements 2016). Dans cette étude, nous nous sommes intéressés aux émulsifiants de nature phospholipidique. Les phospholipides sont des émulsifiants naturels utilisés pour stabiliser des émulsions de types huile dans l'eau (Kabalnov *et al.*, 1996, McClements, 2010). Ils possèdent des propriétés tensioactives liées à la présence des chaînes carbonées hydrophobes et des têtes polaires hydrophiles, ce qui leur permet de s'adsorber à l'interface huile-eau, d'augmenter la surface de séparation entre les gouttelettes et ainsi de stabiliser les émulsions. La lécithine est le phospholipide généralement utilisé dans la stabilisation des émulsions alimentaires (Kralova et Sjoblom, 2009, Komaiko *et al.*, 2015, Chung *et al.*, 2017).

Les émulsions huile dans l'eau sont préparées en homogénéisant les phases huileuse et aqueuse en présence de l'émulsifiant. Ce processus demande l'utilisation d'équipements spécifiques qui permettent de générer l'énergie nécessaire à la dispersion des gouttelettes lipidiques et la réduction de leur taille. Elle peut être apportée par des forces mécanique, sonore ou électrique qui vont favoriser le cisaillement ou la cavitation⁴. Le cisaillement est effectué avec des matériels tels que les broyeurs colloïdaux, les dispositifs rotor-stator ou les disperseurs à grande vitesse. Pour la cavitation, des techniques à ultrasons, des homogénéiseurs haute pression ou des microfluidiseurs sont utilisées (McClements, 2010). Il est possible d'obtenir des tailles de gouttelettes variées selon les procédés et les paramètres d'émulsification employés. Les techniques tels que les disperseurs à grande vitesse ou des broyeurs colloïdaux donnent des macro-émulsions de quelques micromètres (Tadros *et al.*, 2004, Rao et McClements 2011), alors que les méthodes par ultrasons sont capables de générer des gouttelettes avec des tailles inférieures à 100 nm (Kentish *et al.*, 2008, Leong *et al.*, 2009, Zhang *et al.*, 2016). L'augmentation de l'intensité et du nombre de cycles d'émulsification aboutit également à une diminution de la taille des gouttelettes (Floury *et al.*, 2000, Hussain *et al.*, 2016).

⁴ Formation de bulles gazeuses dans un liquide soumis à une dépression.

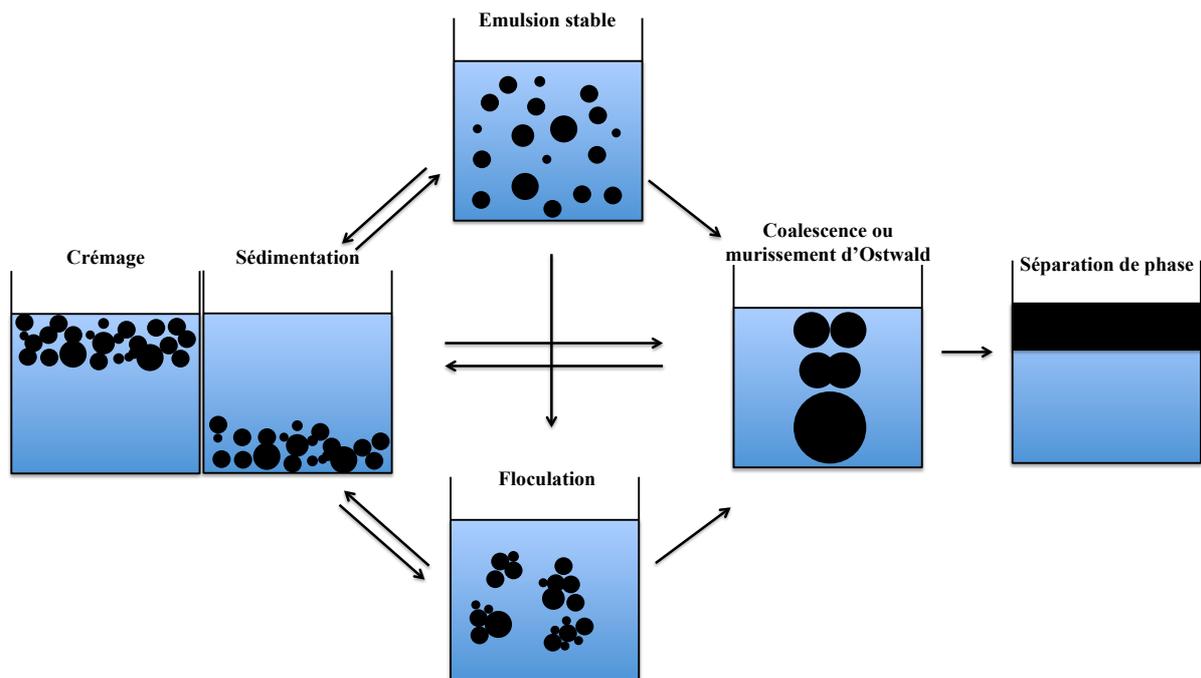


Figure 16 : Représentation schématique des mécanismes d'instabilité les plus fréquemment trouvés dans les émulsions. D'après McClements, 2010.

Comme on l'a déjà introduit, une émulsion n'est pas un système thermodynamiquement stable, l'état le plus stable correspondant à la séparation macroscopique des deux phases ou démixtion des phases. Les principaux mécanismes de déstabilisation d'une émulsion sont la migration gravitationnelle (crémage ou sédimentation), la floculation, la coalescence et le mûrissement d'Ostwald (Dickinson, 1996, McClements, 2010) (**Fig.16**). La migration gravitationnelle est une forme de déstabilisation caractérisée par la migration des gouttelettes vers le haut (crémage) ou vers le bas (sédimentation) due à la différence de densité entre la phase continue et la phase dispersée. Il s'agit d'un phénomène réversible, pour lequel l'émulsion revient à son état initial par simple agitation. La floculation est décrite comme un rapprochement des gouttelettes lipidiques, lorsque les forces d'attraction de van der Waals sont supérieures aux forces de répulsion, ce qui aboutit à la formation d'agrégats de gouttelettes. Comme le crémage et la sédimentation, la floculation est un phénomène réversible. La coalescence est la fusion irréversible de deux ou plusieurs gouttelettes pour former une seule grosse gouttelette. Elle résulte de la rupture du film interfacial entre les gouttelettes. La coalescence aboutit à la séparation finale de la phase aqueuse et de la phase dispersée. Le mûrissement d'Ostwald est un phénomène irréversible qui a lieu lorsque la phase dispersée est légèrement soluble dans la phase continue. Il en résulte un transfert de matière depuis les gouttelettes de petite taille vers les grosses gouttelettes à travers la phase continue. Il est dû à la différence de pression de Laplace entre les gouttelettes, qui est inversement proportionnelle à leur taille. En effet, la pression de surface est plus élevée dans les gouttelettes de petite taille, ce qui aboutit à un flux de matière vers les gouttes de plus grand diamètre, et à l'augmentation de la taille moyenne des gouttelettes.

Dans notre étude, pour représenter les gouttelettes lipidiques dans les aliments, nous avons choisi le modèle d'émulsion directe de type huile dans l'eau préparée par sonication en utilisant des huiles végétales et des émulsifiants phospholipidiques (la lécithine d'œuf et le DMPC). Ces types d'émulsions sont couramment utilisés dans l'industrie alimentaire et on les trouve dans une variété d'aliments, comme le lait, les vinaigrettes, la mayonnaise, les sauces et les desserts (McClements, 2010).

IV. Les interactions tannin-lipide, état de l'art

Les polyphénols, en particulier les tannins, possèdent une grande variété d'activités biologiques antioxydante, antibactérienne ou anticancéreuse qui influencent un grand nombre de processus cellulaires impliquant les membranes (Pietta et Simonetti, 1998, Chung *et al.*, 1999, Spencer *et al.*, 2001, Pandey et Rizvi 2009, Quideau *et al.*, 2011, Li *et al.*, 2014). Au cours de ces dernières années, un certain nombre d'études ont été effectuées sur les interactions entre les tannins et les membranes lipidiques dans le but de comprendre le mécanisme et le rôle des tannins dans ces processus biologiques (Tsushiya, 1999, Caturla *et al.*, 2003, Kajiya *et al.*, 2008, Sun *et al.*, 2009, Abram *et al.*, 2013, Furlan *et al.*, 2014, Phan *et al.*, 2014, Furlan *et al.*, 2016). Parmi ces études, les travaux effectués par Furlan *et al.* ont suggéré pour la première fois que les interactions tannin-lipide peuvent jouer un rôle dans le goût du vin. Dans cette partie, nous allons d'abord présenter les différentes méthodologies qui ont été utilisées pour étudier les interactions tannin-lipide. Ensuite, nous discuterons les résultats obtenus sur ces interactions.

Selon la littérature, nous avons trouvé que les liposomes, qu'ils soient multilamellaires (Caturla *et al.*, 2003, Poklar Ulrich *et al.*, 2010, Yu *et al.*, 2011, Furlan *et al.*, 2014 et 2016) ou unilamellaires (Sun *et al.*, 2009, Tamba *et al.*, 2007) sont les modèles lipidiques fréquemment utilisés dans les études des interactions entre les tannins et les lipides. Cela peut être expliqué par la facilité de préparation de ces modèles, et par leur organisation en bicouches qui mime bien les membranes biologiques. En ce qui concerne les tannins, la plupart des études ont été faites avec des tannins condensés qu'on trouve souvent dans les fruits (raisins, pommes) ou les boissons (thé noir, vin rouge). Des monomères (C, EC, ECG, EGC, EGCG) ou des oligomères (C₃, B₂, A₁, A₂) ont été utilisés dans le but de déterminer l'implication de la nature chimique, la structure, et la stéréochimie des tannins dans les interactions avec les lipides (Kajiya *et al.*, 2001, Uekusa *et al.*, 2011, Yu *et al.*, 2011, Abram *et al.*, 2013, Furlan *et al.*, 2014, Phan *et al.*, 2014, Zhu *et al.*, 2016).

En outre, les interactions des tannins avec les membranes lipidiques ont été caractérisées par différentes techniques et méthodes analytiques. On peut citer la chromatographie en phase liquide (Kajia *et al.*, 2001, Uekusa *et al.*, 2008), la dynamique moléculaire (Sirk *et al.*, 2008, Zhu *et al.*, 2016), la calorimétrie différentielle à balayage (Abram *et al.*, 2013) ou la technique de microbalance à cristal de quartz (Kamihira *et al.*, 2008). Cependant, les deux principales techniques fréquemment employées sont la résonance magnétique nucléaire (RMN) (Scheidt

et al., 2004, Kumazawa *et al.*, 2004, Kajiya *et al.*, 2008, Uekusa *et al.*, 2007 et 2011, Yu *et al.*, 2011, Furlan *et al.*, 2014, et 2016) et la spectroscopie de fluorescence (Hashimoto *et al.*, 1999, Kajiya *et al.*, 2001, Abram *et al.*, 2013, Tamba *et al.*, 2007, Tsuchiya *et al.*, 1999, 2008). La RMN a l'avantage d'être quantitative et non invasive, comparé aux autres techniques qui nécessitent des traitements spécifiques telle que l'utilisation des sondes exogènes qui peuvent altérer l'intégrité des systèmes utilisés. De plus, la RMN permet d'obtenir des informations à l'échelle moléculaire sur les interactions tannins-lipides.

Les thématiques abordées dans ces différentes études peuvent être résumées en trois points : (i) l'effet des tannins sur l'organisation et la dynamique des membranes lipidiques, (ii) leur localisation dans les membranes, et (iii) la nature des interactions des tannins avec les lipides.

IV.1. L'effet des tannins sur la dynamique des membranes lipidiques

L'effet des tannins sur la dynamique des membranes lipidiques est controversable, certaines études ont montré que les tannins fluidifient les membranes lipidiques alors que d'autres ont démontré l'inverse, un effet rigidifiant.

Furlan *et al.* (2014) ont montré que les tannins ont un effet fluidifiant sur des modèles simples de membranes qui miment la composition lipidique de la cavité buccale, représentées par des MLV de DMPC. En effet, ils ont démontré par RMN-²H que les tannins augmentent le désordre dans le cœur hydrophobe des membranes, et induisent une stabilisation de la phase fluide, décrite par une diminution de la température de transition de phase gel-fluide du lipide. Cet effet est plus important pour le tannin galloylé EGCG de caractère hydrophobe ($K_{ow} = 12.1$, $x_{eau} = 8\%$) comparé à celui des deux tannins non galloylés, la catéchine et l'épicatéchine, qui ont un caractère plus hydrophile ($K_{ow} = 2.4$, $x_{eau} = 29\%$). Ils considèrent que le tannin le plus hydrophobe interagit plus avec les chaînes acyles du lipide que les tannins moins hydrophobes qui restent plus à l'interface. De plus, ils ont montré que la catéchine a un effet de désordre sur des membranes plus complexes contenant 18% molaire de cholestérol, alors qu'ils n'ont pas d'effet en présence de 40% de cholestérol (Furlan *et al.*, 2016). Ainsi, l'effet fluidifiant des tannins est d'autant plus marqué que la membrane est moyennement fluide, alors qu'il est annihilé sur des membranes très fluides ou très rigides. Ces résultats concordent avec ceux d'autres études qui ont montré par RMN de ³¹P et ²H que les tannins augmentent la fluidité des membranes lipidiques, et que cet effet est plus important

dans le cas des tannins de nature hydrophobe plus marquée (Kumazawa *et al.*, 2004, Yu *et al.*, 2011, Uekusa *et al.*, 2011). En outre, d'autres études ont montré que les tannins augmentent la perméabilité des membranes lipidiques par des mesures de fuite de calcéine (Kajiya *et al.*, 2001, Tamba *et al.*, 2007), ce qui a été relié à une fluidification de la membrane par les tannins.

D'un autre côté, plusieurs études ont montré que les tannins augmentent l'ordre des chaînes acyles et par suite ont un effet rigidifiant sur les membranes lipidiques (Tsuchiya *et al.*, 1999, 2001, Caturla *et al.*, 2003, Abram *et al.*, 2013, Phan *et al.*, 2014). Abram *et al.* (2013) ont montré par des études d'EPR que les tannins diminuent la fluidité des membranes lipidiques. Toutefois, dans ce type d'analyse, les lipides sont marqués avec des sondes exogènes placées à l'interface ou dans le cœur des membranes, et la fluidité est évaluée en se basant sur des variations d'un temps de corrélation empirique qui est inversement proportionnel à la dynamique de la sonde dans les membranes. Ils ont démontré qu'en présence de tannins ce temps augmente, ce qui montre une diminution de la dynamique de la sonde, sous-entendu celle de la membrane lipidique. Par contre, les études effectuées par Tsushia *et al.* (1999), basées sur des mesures de l'anisotropie de fluorescence qui nécessite l'ancrage des sondes fluorescentes dans les membranes lipidiques, ont montré que les tannins ont un effet rigidifiant sur les membranes. Cet effet est plus important pour les tannins qui possèdent un groupement galloyle et une conformation *cis* au niveau du cycle pyrane comme l'épicatéchine.

Jusqu'à aujourd'hui, l'effet des tannins sur la dynamique des membranes lipidiques reste donc sujet à controverse. Cependant, il faut prendre en considération que pour les études effectuées par les techniques de fluorescence ou d'EPR, l'utilisation de marqueurs exogènes est susceptible de changer les propriétés physico-chimiques des membranes lipidiques, et donc que l'effet des tannins est évalué de façon indirecte. En revanche, avec l'utilisation des techniques spectroscopiques telle que la RMN, les modèles lipidiques restent intacts et les analyses sont faites directement sur les lipides qui les constituent.

IV.2. La localisation des tannins dans les membranes lipidiques

La localisation des tannins dans les membranes lipidiques a été caractérisée par différentes techniques comme la RMN, la dynamique moléculaire, et l'anisotropie de fluorescence. La plupart des études ont montré que les tannins ont une localisation à l'interface des membranes

lipidiques. Cependant, il n'y a pas de consensus sur leur position dans les membranes lipidiques. Certaines études considèrent que les tannins sont ancrés dans les membranes, alors que d'autres suggèrent que les tannins restent à l'interface eau/lipide.

Furlan *et al.* (2014) ont montré à travers des études de RMN du proton que les tannins sont localisés à l'interface des membranes du DMPC avec une pénétration plus profonde pour les tannins galloylés (EGCG, ECG) comparés aux tannins non galloylés (C, EC). En effet, ils ont observé des variations importantes de déplacements chimiques des protons de la tête polaire du lipide, alors que ceux des chaînes acyles sont très faibles, indiquant que les tannins interagissent avec les lipides à l'interface et ne pénètrent pas dans le cœur hydrophobe de la membrane. Ils considèrent que la localisation des tannins dans les membranes dépend de leur nature chimique. Un tannin plus hydrophobe comme l'EGCG ($K_{ow} = 12.1$, $x_{eau} = 8\%$) s'insère plus dans la membrane que les tannins moins hydrophobes comme la catéchine ($K_{ow} = 2.4$, $x_{eau} = 29\%$). Ce résultat est en accord avec celui de Yu *et al.* (2011) qui ont observé qu'un tannin très hydrophobe tel que le PGG ($K_{ow} = 100$, $x_{eau} = 0.99\%$) est localisé au niveau des chaînes acyles du lipide, alors que le trimère C₃ très hydrophile ($K_{ow} = 0.12$, $x_{eau} = 89\%$) est positionné à l'interface. Kumazawa *et al.* (2004) ont également montré par RMN-³¹P que l'EGCG est ancré dans les membranes lipidiques au niveau des groupements phosphates. Par ailleurs, une étude de dynamique moléculaire sur des membranes de POPC/POPE a révélé que la catéchine, l'épicatéchine et l'EGCG sont ancrés dans la membrane avec une localisation plus profonde de l'EGCG (Sirk *et al.*, 2008). Pareillement, une autre étude *in silico* a démontré que des dimères d'EGCG et d'ECG s'insèrent plus profondément dans les membranes que des dimères non galloylés (B₂, A₂) qui restent en contact avec la surface des lipides (Zhu *et al.*, 2016). En outre, Caturla *et al.* (2003) ont dévoilé par une étude de quenching de fluorescence que les tannins non-galloylés (C, EC) sont localisés à l'interface des membranes de DMPC. Cependant, contrairement à ce qui a été décrit ci-dessus, ils ont trouvé que les tannins galloylés (EGCG, ECG) sont positionnés en profondeur au niveau des chaînes acyles du lipides. D'un autre côté, des études effectuées par Uekusa *et al.* (2007, 2011) ont mis en évidence des taches de corrélation en NOESY entre les protons du groupement galloyle ou du noyau aromatique B des tannins (EGC, ECG) et les protons de l'ammonium quaternaire du DMPC, indiquant que les tannins sont localisés à la surface des membranes. Ils suggèrent que la présence d'un groupement galloyle va favoriser la formation de liaison de type cation- π entre le cycle aromatique du tannin et la tête choline du lipide. De plus, l'ajout de tannins sur des membranes lipidiques constituées de sondes fluorescentes

d'hydrophobicité différente entraîne une diminution de la fluorescence relative aux sondes de nature plus hydrophile donc plutôt localisées à la surface des membranes (Kitano *et al.*, 1997, Kajiya *et al.*, 2001, Abram *et al.*, 2013).

Au vu des résultats de la littérature, à l'exception de l'étude de Caturla *et al.* (2003), il semblerait que les tannins adoptent une localisation interfaciale et qu'ils ne diffusent pas dans le cœur hydrophobe des membranes lipidiques. Leur position dans la membrane serait fonction de leur hydrophobicité, de leur structure et de la nature de leurs interactions avec les composants membranaires.

IV.3. La nature des interactions tannin-lipide

Différentes études ont suggéré que les tannins sont capables de former des liaisons hydrogène avec les lipides (Sirk *et al.*, 2008, Abram *et al.*, 2013, Phan *et al.*, 2014, Zhu *et al.*, 2016). Ces liaisons s'établissent entre les fonctions hydroxyles des tannins et les oxygènes des lipides tels que le POPC, DMPC, DOPC ; que ce soit les oxygènes du groupement phosphate pour les tannins localisés en surface, ou ceux du squelette glycérol pour les tannins ancrés dans la membrane. De plus, dans les cas des études sur des membranes de POPC/POPE des liaisons hydrogène sont formées entre les protons du groupement éthanolamine du POPE et les oxygènes des tannins (Sirk *et al.*, 2008, Zhu *et al.*, 2016). De plus, les tannins galloylés sont capables de former plus de liaisons hydrogène avec les lipides que les tannins non galloylés. Cela est dû à l'augmentation du nombre des fonctions hydroxyles apportées par le groupement galloyle. Outre les interactions par liaisons hydrogène, des interactions de type cation- π peuvent se développer entre les cycles aromatiques B des tannins ou le cycle du groupement galloyle des tannins galloylés et la charge positive portée par l'ammonium quaternaire des lipides possédant une tête choline tels que les phospholipides (Uekusa *et al.*, 2007, 2011). De plus, Yu *et al.*, (2011) suggèrent que les tannins très hydrophobes localisés dans le cœur de la membrane, forment des interactions hydrophobes avec les chaînes acyles des lipides.

V. Objectif et plan de thèse

Les tannins du vin sont responsables de l'amertume et de l'astringence en bouche. Les mécanismes à l'origine de ces deux sensations ont été bien décryptés durant ces dernières années. L'amertume résulte d'une interaction spécifique entre des molécules amères, tels que les tannins, et les récepteurs du goût situés dans les papilles linguales (Chandrashekar *et al.*, 2006). L'astringence est le résultat d'une forte interaction entre les tannins et les protéines de la salive, responsables de la lubrification de la cavité buccale (Cala *et al.*, 2010). Outre les interactions avec les protéines, des interactions entre les tannins et les lipides ont été mises en évidence. Les lipides sont présents lors de la dégustation d'un vin, comme composants des membranes buccales ou des aliments gras. Cependant, leurs rôles dans les perceptions sensorielles d'un vin ne sont pas bien connus d'un point de vue œnologique et moléculaire. Furlan *et al.* (2014) ont démontré qu'une interaction entre des lipides modélisant d'une manière très simple les membranes buccales et des monomères des tannins du vin est susceptible de se développer lors de l'ingestion d'un verre de vin. Cette interaction s'est notamment caractérisée par un effet fluidifiant des lipides sur les membranes lipidiques. Ce dernier résultat semble indiquer que les lipides, en tant que composants des membranes buccales et plus largement des aliments, pourraient jouer un rôle important dans les sensations d'amertume et d'astringence pendant la dégustation d'un vin.

Ce rôle pourrait s'expliquer par les deux hypothèses suivantes :

- L'astringence serait modulée suite à une compétition entre l'interaction tannins-protéines de la salive et tannins-lipides des membranes buccales ou provenant de l'alimentation. Pour l'instant, seules les constantes de dissociation tannins-protéines de la salive ont été déterminées par Cala *et al.* (2010).
- L'interaction tannins-lipides membranaires et l'effet fluidifiant qui en découle pourrait induire une perturbation des récepteurs du goût enchâssés dans les membranes buccales conduisant à une modification des interactions récepteurs-tannins qui modifierait la sensation d'amertume d'un vin.

Le goût du vin et les marqueurs du goût ne sont considérés jusqu'à maintenant que du point de vue des molécules constitutives du vin. Or le goût du vin est indissociable du consommateur et de son alimentation. L'objectif de cette thèse a donc été d'étudier au niveau moléculaire et sensoriel les interactions entre les tannins du vin et les lipides de paroi buccale ou des aliments, pour mieux comprendre leurs rôles dans les propriétés gustatives du vin.

La thèse va se décliner en trois axes :

- L'étude biophysique de l'interaction entre les tannins et les lipides des membranes buccales.
- L'étude biophysique des interactions entre les tannins et les lipides des aliments.
- L'étude par analyse sensorielle des interactions tannins-lipides.

Les différentes études présentées dans cette thèse ont été réalisées principalement par la technique de résonance magnétique nucléaire (RMN). Le chapitre I sera consacré au « Matériel et Méthodes » dans lequel nous présenterons les bases théoriques de cette technique, ainsi que des autres techniques d'analyse utilisées dans cette thèse, et les différentes méthodes de préparation des échantillons. Ensuite, la partie « Résultats » sera développée dans les chapitres II, III et IV.

Dans le chapitre II, nous allons présenter l'étude de l'interaction de deux tannins, le monomère la catéchine et le dimère B₁, avec un modèle qui mime la structure et composition des membranes buccales représenté par des vésicules multilamellaires (MLV) composées de POPC/Cholestérol. L'effet des tannins sur l'organisation et la dynamique de ces membranes, ainsi que leur localisation dans le système lipidique modèle seront explorées par la RMN ¹H, ²H et ¹³C.

Dans le chapitre III, nous allons présenter l'étude de l'affinité des tannins pour différents modèles de membranes lipidiques par diverses techniques physico-chimiques, la RMN-¹H, la résonance plasmonique aux ondes guidées (PWR) et la calorimétrie de titration isotherme (ITC). Les constantes de dissociations tannin-lipide seront analysées et comparées avec celles des interactions tannin-protéine salivaire, puis discutées dans le contexte du goût du vin.

Dans le chapitre IV, nous allons présenter l'étude de l'interaction de la catéchine avec un modèle de gouttelettes lipidiques qui mime les aliments gras, représenté par une émulsion huile dans l'eau formulée avec des composants alimentaires. Dans un premier temps, l'effet de la catéchine sur la morphologie, la taille et l'organisation des lipides émulsionnés sera examiné grâce à différentes techniques tels que la microscopie optique, la granulométrie et la RMN (¹H et ²H). Dans un deuxième temps, nous allons explorer les interactions tannin-lipide par des tests d'analyse sensorielle, afin de déterminer si les lipides ont une influence sur l'amertume et l'astringence d'un vin, et les sensations organoleptiques induites par les tannins. Pour finir, nous allons comparer les résultats que nous avons obtenus par la

biophysique avec ceux d'une analyse sensorielle impliquant tannins et lipides que nous avons menée pour voir si une corrélation peut être établie entre eux.

Enfin, nous terminerons par une conclusion générale en rappelant les principaux résultats obtenus au cours de cette thèse et nous efforcerons de répondre à la problématique de cette thèse, à savoir le rôle des interactions tannin-lipide dans les propriétés sensorielles du vin.

Chapitre I

Matériel et méthodes

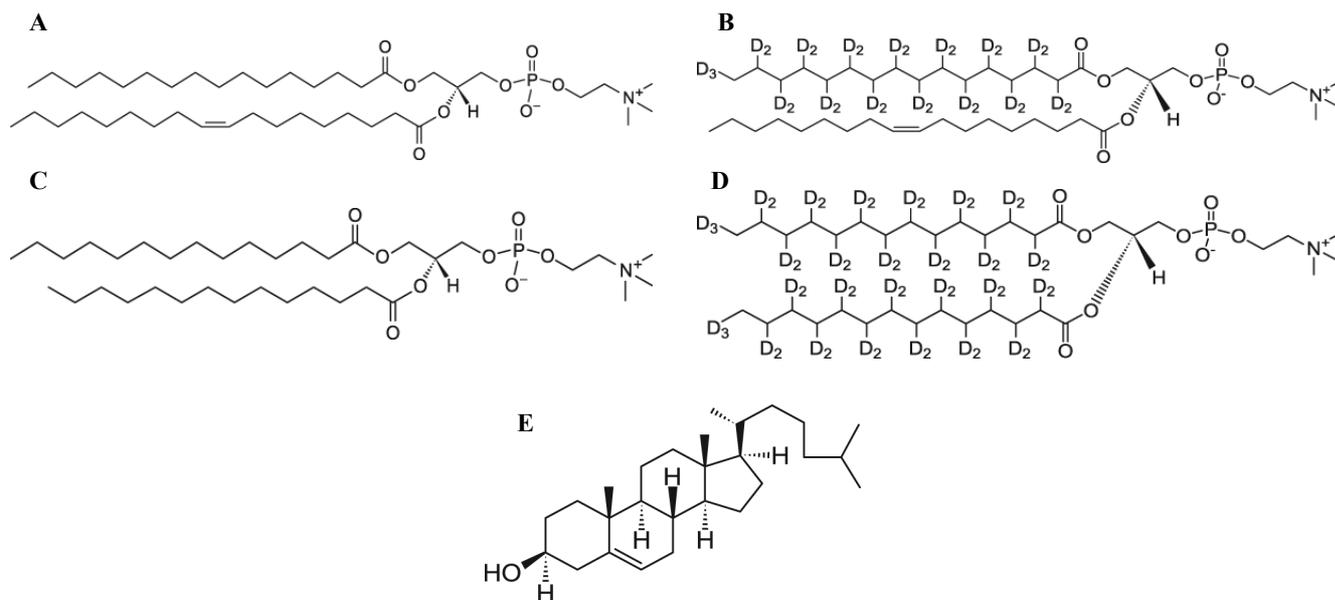


Figure 1 : Structure chimique du POPC (A), du POPCd₃₁ (B), du DMPC (C), du DMPCd₅₄ (D) et du cholestérol (E). D'après Avanti Polar Lipids.

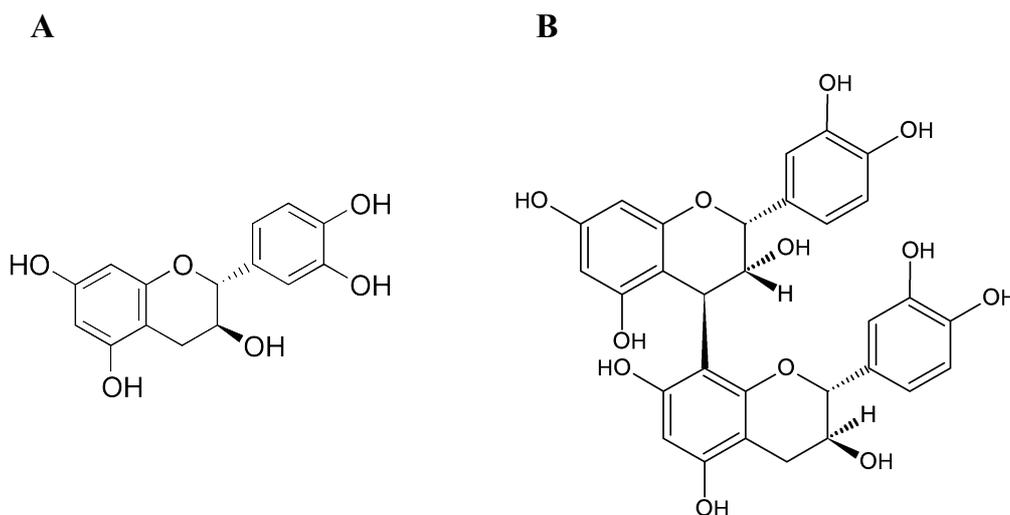


Figure 2 : Structure chimique de la catéchine (A) et la procyanidine B₁ (B).

Pour 100g de lipides	Huile de tournesol Lesieur	Huile d'olive Puget
Acide gras saturés	8-17 (g)	15 (g)
Acide gras monoinsaturés	14-40 (g)	78 (g)
Acide gras polyinsaturés	62-70 (g)	7 (g)

Tableau 1 : Composition en acides gras des huiles végétales utilisées. D'après la fiche technique des fournisseurs.

I. Matériel

I.1. Produits chimiques

Les phospholipides : la 1-palmitoyl-2-oléoyl-*sn*-glycéro-3-phosphocholine (POPC), la 1,2-dimyristoyl-*sn*-glycéro-3-phosphocholine (DMPC), la 1-palmitoyl-*d*₃₁-2-oléoyl-*sn*-glycéro-3-phosphocholine (POPC*d*₃₁), la 1,2-dimyristoyl-*d*₅₄-*sn*-glycéro-3-phosphocholine (DMPC*d*₅₄), le cholestérol (CH, ovine wool, >98%), la L- α -Phosphatidylcholine (Egg, chicken), ont été achetés chez Avanti Polar Lipids (Albaster, AL, USA) (**Fig.1**).

Les résidus de tannins : la (+)-catéchine (C) et la procyanidine B₁ (epicatéchine-(4 β →8)-catéchine) ont été achetées chez Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France) (**Fig.2**).

Les sels : le phosphate de sodium monobasique monohydrate (NaH₂PO₄, H₂O), le phosphate de sodium dibasique octahydrate (Na₂HPO₄, 8H₂O) et le chlorure de sodium (NaCl) ont été achetés chez Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France).

Les huiles : l'huile d'olive extra vierge de la marque PUGET, l'huile de tournesol de la marque Lesieur proviennent du supermarché et le trioléate de glycérol (97%) de chez Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France).

Les références utilisées pour les études de RMN : l'acide 4,4-diméthyl-4-silapentane-1-sulfonique (DSS), l'acide triméthylsilylpropanoïque (TMSP) et le tétraméthylsilane (TMS) ont été achetés chez Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France).

I.2. Solvants

Les solvants organiques : le méthanol (CH₃OH, 99.9%), l'éthanol (CH₃CH₂OH, 99.8%) et le chloroforme (CHCl₃, 99.5%) ont été achetés chez Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). Les solvants deutérés : l'eau deutérée D₂O (99.9%), le chloroforme deutéré (CDCl₃ 99.7%) et l'eau dépletée en deutérium (≤ 1 ppm D₂O) de chez Eurisotop (St. Aubin, France). L'eau ultra-pure, MilliQ, de résistivité de 18.2 M Ω .cm provient de chez Millipore (Molsheim, France).

II. Préparation des systèmes lipidiques

II.1. Préparation des vésicules multilamellaires

Les vésicules multilamellaires (MLV) utilisées pour les études en RMN-²H sont réalisées selon la procédure suivante : 3.2 mg de POPC_{d₃₁} et 0.69 mg de cholestérol sont pesés et solubilisés dans un mélange de chloroforme/méthanol 2/1. Le solvant est ensuite évaporé sous vide dans un concentrateur SpeedVac® (Savant AES 1010, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) afin d'obtenir un film lipidique. Le film lipidique obtenu est hydraté avec de l'eau ultra-pure milli-Q puis lyophilisé pendant 24h. La poudre de lipides est hydratée soit avec 100 µL d'eau déplétée en deutérium, soit avec 100 µL d'une solution de catéchine de concentration 6 mM ou une solution de B₁ de concentration 2 mM. Les vésicules multilamellaires sont homogénéisées par trois cycles froid-chaud (1 min de vortex, 1 min dans l'azote liquide à -196°C et 10 min au bain-marie à 37°C). Cette procédure conduit à l'obtention d'une dispersion homogène d'aspect laiteux constituée de vésicules multilamellaires ayant une concentration lipidique totale (POPC + cholestérol) de 60 mM et de rapport molaire tannins/lipides, T/L, de 1/10 dans le cas des vésicules formées avec la solution de la catéchine et de 1/30 avec la solution de B₁.

Les MLV utilisées pour les études en RMN HR-MAS sont réalisées à partir de vésicules formées selon la même procédure mais avec du POPC non deutéré et de l'eau deutérée pour hydrater le film lipidique contenant du DSS utilisé comme référence pour calibrer les spectres RMN ¹H à 0 ppm.

II.2. Préparation des larges vésicules unilamellaires

Les vésicules unilamellaires (LUV) utilisées pour les études en calorimétrie (ITC) sont obtenues à partir d'une dispersion de MLV de POPC à 5 mM. Elles sont préparées de la façon suivante : 19 mg de POPC sont pesés et hydratés avec 5 mL d'une solution tampon phosphate (20 mM, 150 mM NaCl, pH 7.4). Cette solution est homogénéisée par trois cycles froid-chaud et ensuite passée à travers un mini-extrudeur équipé d'un filtre de polycarbonate (Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL, USA). Les lipides sont passés successivement à travers des filtres de différentes porosités 800, 400 et 100 nm afin d'obtenir une solution de LUV monodisperse de taille 100 nm. Un test phosphate est enfin effectué sur la solution de LUV pour quantifier la quantité de lipides dans l'échantillon final (Rousel *et al.*, 1970).

II.3. Préparation des petites vésicules unilamellaires

Les petites vésicules unilamellaires (SUV) de POPC ou de POPC/CH (70/30 molaire) de concentration 6.5 mM dans de l'eau milli-Q utilisées pour les études en PWR sont préparées par sonication (4 cycles de 10 min, puissance 40%, impulsion 10 s on / 5 s off) à partir d'une dispersion de MLV de POPC ou POPC/CH obtenue comme en II.1. Pour éviter une montée en température due à la sonication exothermique de la solution, celle-ci est plongée dans un bain-marie à 0 °C. Après sonication, la dispersion est centrifugée à 6000 rpm pendant 2 min pour éliminer les éventuels résidus métalliques provenant de la sonde.

II.4. Préparation des émulsions huile dans l'eau

Les émulsions huile dans l'eau ont été préparées par les deux méthodes décrites ci-dessous.

Dans la méthode 1, l'émulsion est préparée avec un rapport volumique huile/eau de 1/5. Elle est réalisée de la façon suivante : 25 mg de poudre d'émulsifiant (DMPC ou Egg-PC) sont hydratés par 5 mL d'eau ultrapure puis homogénéisés par trois cycles froid-chaud (1 min de vortex, 1 min dans l'azote liquide à -196°C et 10 min au bain-marie à 37°C) formant ainsi une dispersion de MLV. A cette dispersion est ajouté 1 mL d'huile (olive, tournesol ou GT). L'émulsion est obtenue par sonication (3 cycles de 30 s, puissance 30 %) du mélange placé dans un bain marie à 0°C.

Dans la méthode 2, l'émulsion de rapport volumique huile/eau de 1/10 est réalisée de la façon suivante : 25 mg de DMPC (émulsifiant) sont solubilisés dans 500 µL d'huile d'olive sous agitation (1200 rpm) pendant 30 minutes à 50°C. Ensuite 5 mL d'eau ultrapure à 50°C sont ajoutés à la solution de DMPC dans l'huile sous agitation. Le mélange est agité pendant 30 minutes à 50°C puis soniqué pendant 4 minutes (puissance 30%) dans un bain-marie à 0°C. Le rapport molaire DMPC/huile d'olive dans l'émulsion est de 1/14.

III. Techniques d'analyse physico-chimique

III.1. Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire

La spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN) est une technique physico-chimique qui permet de caractériser les molécules en solution, en poudre et en milieu dispersé

(cristaux liquides, liposomes, protéines, colloïdes). Il s'agit d'une technique quantitative non destructive qui étudie l'environnement électronique des atomes dont leurs noyaux possèdent un spin nucléaire non nul. Dans le cadre de cette thèse, nous avons utilisé la RMN des solides pour les études de dynamique des lipides dans les membranes ou les émulsions en présence de tannins et la RMN-HR-MAS pour les études de localisation et d'interaction des tannins dans les membranes. De plus, nous avons utilisé la RMN des liquides pour la caractérisation des émulsions et de leurs constituants. Dans cette partie, nous allons d'abord décrire brièvement les notions de base de la RMN. Ensuite nous allons présenter l'application de la RMN des solides pour l'étude des biomembranes, puis les différents paramètres expérimentaux et méthodologies utilisés pour l'exploitation des résultats.

III.1.1. Notions théoriques de la RMN

III.1.1.1. Spin nucléaire et moment magnétique associé

Un noyau atomique est un ensemble de protons chargés positivement et de neutrons non chargés. Ces particules de nature quantique sont dotées d'un moment cinétique intrinsèque le spin noté \vec{I} qui n'est pas lié à leur rotation, à la différence de leur moment cinétique orbital. Le spin n'a pas d'équivalent en mécanique classique. C'est une propriété intrinsèque des particules quantiques au même titre que leur masse et leur charge électrique. \vec{I} est une grandeur vectorielle quantique dont seule la norme $\|\vec{I}\|$ et une seule de ses composantes peuvent être connues simultanément à la différence de la mécanique classique où l'on peut connaître la norme et les trois composantes en même temps.

Par convention, le champ magnétique \vec{B}_0 étant fixé selon l'axe z vertical, on fixe \bar{I}_z la composante de \vec{I} selon cet axe. Les nombres quantiques qui quantifient le spin nucléaire sont : I pour la norme $\|\vec{I}\|$ et m_i pour la composante \bar{I}_z tel que :

$$\|\vec{I}\| = \sqrt{I(I+1)}\hbar \quad (1)$$

$$\bar{I}_z = m_i\hbar \quad (2)$$

Avec \hbar est la constante de Planck divisé par 2π ($\hbar = 1.054.10^{-34}$ J.s). La valeur du nombre quantique I dépend de la composition nucléaire et ne peut prendre que des valeurs entières ou $\frac{1}{2}$ entières. Le nombre quantique m_i ne peut prendre que $(2I+1)$ valeurs de $-I$ à $+I$ par pas de 1. Ainsi, dans le cas des atomes de spin $I = \frac{1}{2}$ comme le proton (^1H) ou le carbone (^{13}C) utilisés dans cette thèse, m_i prend deux valeurs $-\frac{1}{2}$ et $+\frac{1}{2}$, alors que dans le cas des atomes de spin $I = 1$ comme le deutérium (^2H), m_i prend trois valeurs $-1, 0, +1$. Ainsi, le nombre de spin définit le nombre des états distincts $(2I+1)$ dans lesquels le spin peut se trouver s'il est soumis à un champ magnétique.

Au spin \vec{I} est associé un moment magnétique de spin $\vec{\mu}$ selon la relation :

$$\vec{\mu} = \gamma \vec{I} \quad (3)$$

Où γ est le rapport gyromagnétique caractéristique de chaque noyau. Il représente la sensibilité au champ magnétique des noyaux. Ainsi, les noyaux peuvent être assimilés à des petits aimants microscopiques. Seuls les noyaux de numéro atomique Z impair et de nombre de masse $A = Z + N$ pair ou impair sont dotés d'un spin (^1H , ^2H , ^{31}P , ^{13}C ...). Les noyaux composés d'un nombre pair de protons et de neutrons (^{12}C , ^{16}O ...) ont un spin nul. Le moment magnétique de spin est la grandeur qui va interagir avec le champ magnétique externe en spectroscopie de RMN.

III.1.1.2. Hamiltonien de spin nucléaire

Abragam & Hebel (1961) ont développé le concept d'hamiltonien de spin nucléaire \hat{H} qui décrit le couplage des spins nucléaires avec leur environnement. Lorsqu'un système de spins nucléaires \vec{I} est placé dans un champ magnétique, il est soumis à plusieurs interactions : l'interaction des spins nucléaires du système avec le champ magnétique externe au système et les interactions des spins entre eux. L'hamiltonien \hat{H} peut alors 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} :

$$\hat{H} = \hat{H}_{ext} + \hat{H}_{int} \quad (4)$$

Nous décrirons successivement le couplage externe avec le champ magnétique et ses effets sur le système de spins, puis le couplage interne et ses conséquences.

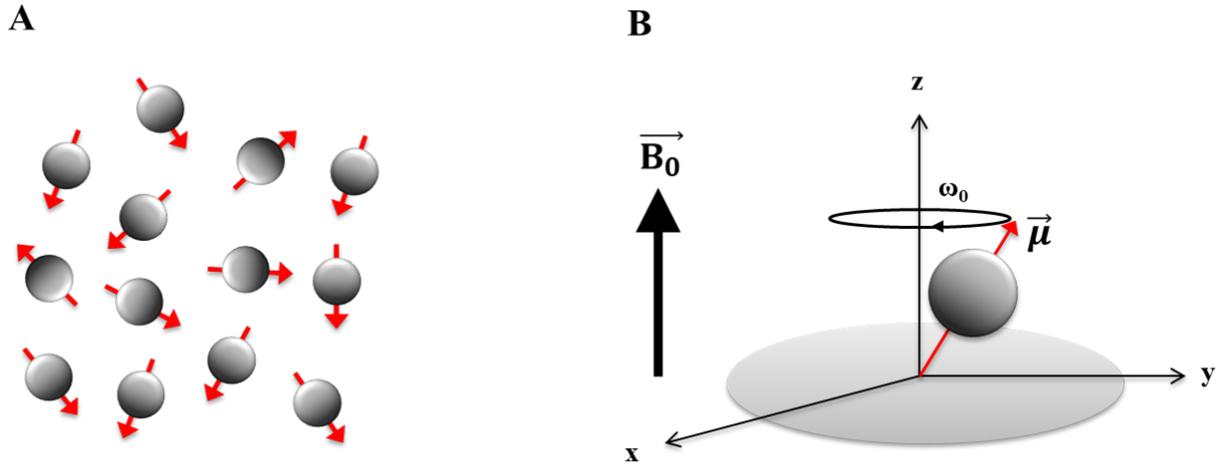


Figure 3 : Orientation des spins avant (A) et après (B) application d'un champ magnétique \vec{B}_0 . En absence de champ magnétique, les spins ont une orientation aléatoire (A). Une fois que \vec{B}_0 est appliqué, les spins entrent en mouvement de précession autour de l'axe directeur du champ magnétique à la pulsation de Larmor ω_0 .

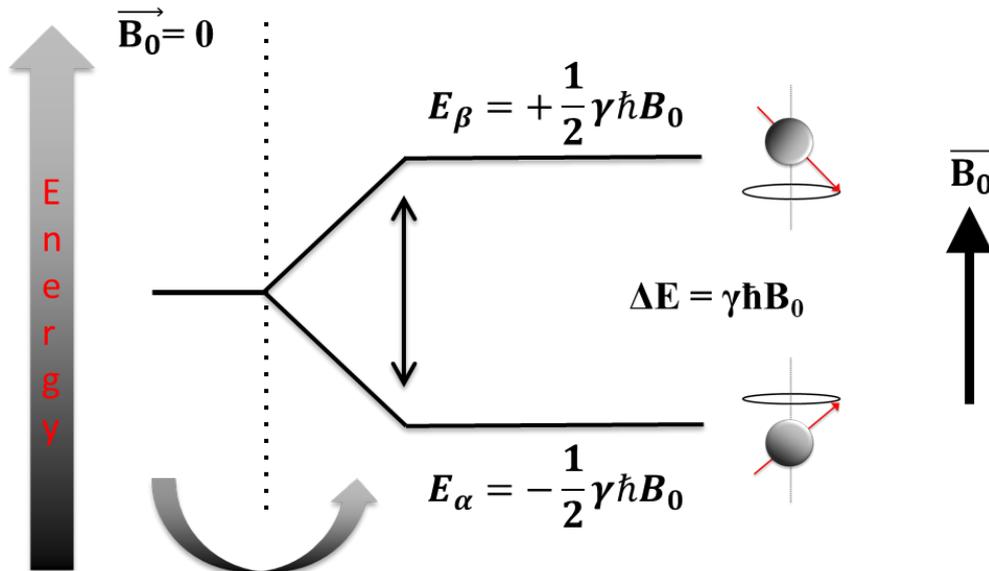


Figure 4 : Représentation schématique des niveaux d'énergie d'un noyau de spin $I = \frac{1}{2}$ en absence et en présence d'un champ magnétique statique \vec{B}_0 . En présence de \vec{B}_0 , les spins nucléaires s'orientent par rapport à \vec{B}_0 avec une levée de dégénérescence de $(2I+1) = 2$ niveaux (effet Zeeman).

III.1.1.2.1. Couplage externe

Couplage avec le champ magnétique statique \vec{B}_0 : effet Zeeman

En absence de champ magnétique, les moments magnétiques de spins nucléaires ont une orientation aléatoire. Tous les spins sont dans un même état d'énergie et sont dit dégénérés. Lorsqu'on applique un champ magnétique \vec{B}_0 (parallèle à l'axe z), une interaction apparaît avec les moments magnétiques de spin qui vont entrer dans un mouvement de précession (tournent sur eux-mêmes) autour de l'axe directeur du champ \vec{B}_0 à la fréquence de Larmor qui est proportionnelle au champ magnétique appliqué (**Fig.3**) :

$$\nu_0 = \frac{\gamma B_0}{2\pi} \quad (5)$$

En RMN, on parle préférentiellement de la pulsation de Larmor ω_0 qui est reliée à la fréquence de Larmor par la relation :

$$\omega_0 = 2\pi\nu_0 \quad (6)$$

L'effet Zeeman provient du couplage entre le moment magnétique nucléaire $\vec{\mu}$ et le champ magnétique statique \vec{B}_0 parallèle à l'axe z qui est décrit par l'hamiltonien \hat{H}_Z :

$$\hat{H}_Z = -\hat{\mu}_z \hat{B}_0 = -\gamma \hat{I}_z \hat{B}_0 \quad (7)$$

Ce couplage aboutit à une levée de dégénérescence de l'énergie en $(2I+1)$ niveaux dont les valeurs sont déterminées par la relation :

$$E_m = -\gamma \hbar m_i B_0 \quad (8)$$

Dans le cas des noyaux de spin $I = 1/2$ comme le ^1H et le ^{13}C , il existe deux états d'énergie correspondants à m_i égale $+1/2$ noté E_α et m_i égale $-1/2$ noté E_β (**Fig.4**), l'écart entre les deux niveaux d'énergie est donné par la relation :

$$\Delta E_m = E_\beta - E_\alpha = \gamma \hbar B_0 \quad (9)$$

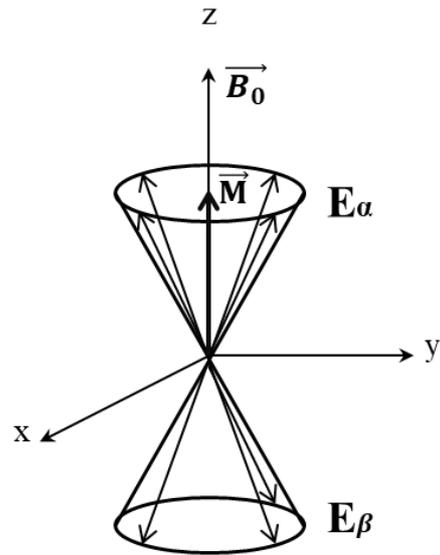


Figure 5 : Représentation schématique de la précession des spins des états α et β autour de \vec{B}_0 . L'aimantation \vec{M} résulte de la somme des moments magnétique de spins.

Comme pour toute spectroscopie, une transition peut avoir lieu entre ces deux niveaux d'énergie si le système obéit à la loi de Bohr ($\Delta E = h\nu$) où ν est la fréquence de rayonnement électromagnétique à laquelle sont soumis les noyaux. L'incorporation de l'équation (5) dans l'équation (9) montre que c'est le cas si $\nu = \nu_0$. Ainsi, la fréquence nécessaire pour induire la transition entre deux niveaux énergétiques est la fréquence de Larmor appelée fréquence de résonance.

Aimantation nucléaire

La répartition des moments magnétiques de spin sur les deux niveaux d'énergie E_α et E_β obéit à la loi statistique de Boltzmann avec :

$$\frac{N_\beta}{N_\alpha} = e^{-\frac{\Delta E}{kT}} = e^{-\frac{(E_\beta - E_\alpha)}{kT}} \quad (10)$$

Avec k la constante de Boltzmann ($k = 1.381 \cdot 10^{-23} \text{ J.K}^{-1}$) et T la température.

A température ambiante, la population de l'état α de faible énergie est très légèrement supérieure à celle de l'état β . Il y a donc un excès de spins nucléaire dans l'état α . Par conséquent, la résultante de la somme des vecteurs moments magnétiques de spins des états α et β n'est pas nulle. Elle est définie par l'aimantation nucléaire notée \vec{M} , orientée parallèlement par rapport au champ magnétique \vec{B}_0 avec (Fig.5) :

$$\vec{M} = \sum_i \vec{\mu}_i \quad (11)$$

III.1.1.2.2. Couplage avec le champ radiofréquence \vec{B}_1

Principe d'une expérience RMN simple

Durant une expérience RMN, on perturbe l'état d'équilibre des spins nucléaires par l'application d'une impulsion radiofréquence (RF) pendant un temps très court qui conduit au basculement de l'aimantation hors de son axe z . Une fois terminée, les spins retournent à leur état d'équilibre (de Boltzmann) par le phénomène de relaxation. Nous allons décrire ci-dessous les différentes étapes qui décrivent le comportement des spins au cours d'une

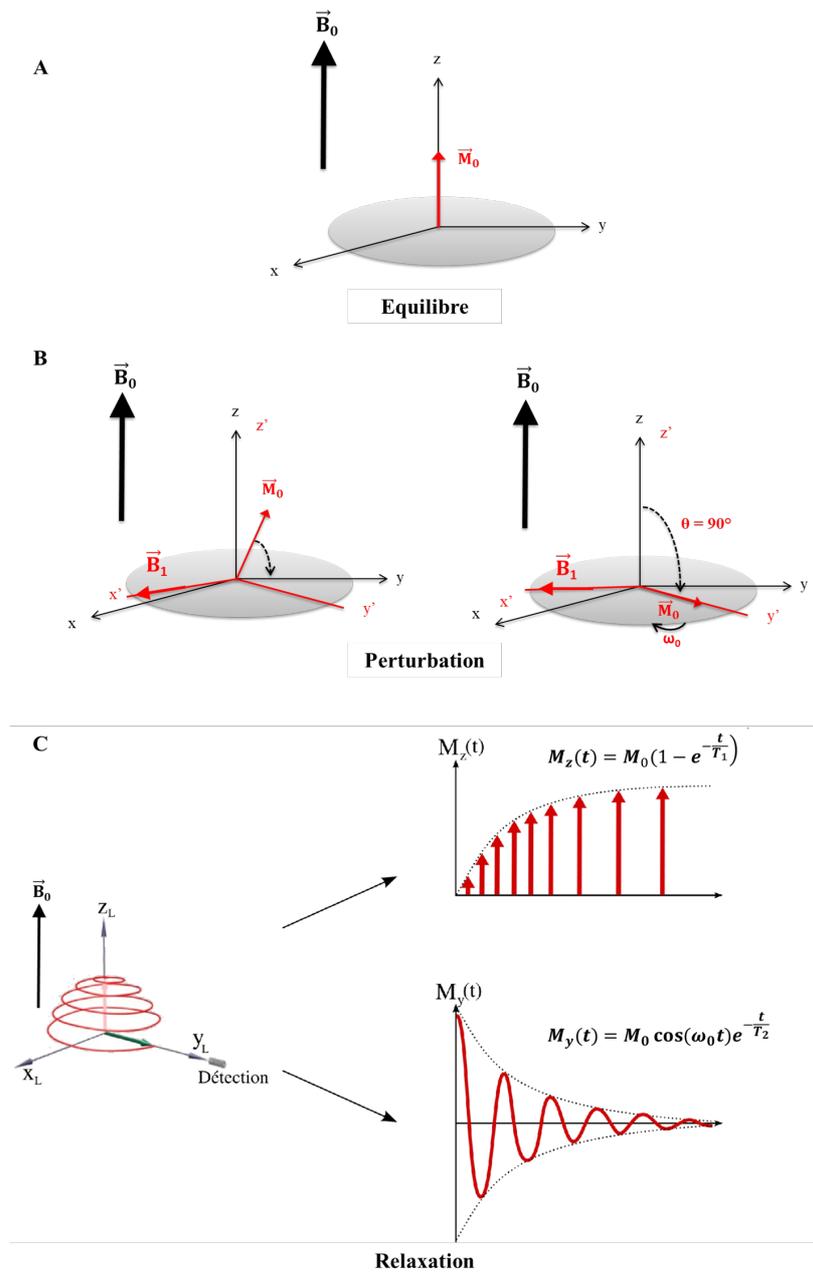


Figure 6 : Représentation schématique des différentes étapes d'une expérience RMN. (A) l'équilibre, (B) la perturbation, (C) la relaxation. Les axes (x, y, z) représentent le référentiel du laboratoire et les axes (x', y', z') le référentiel tournant à la fréquence de Larmor ω_0 .

expérience RMN simple, en prenant l'exemple d'une impulsion RF de 90° correspondant à un basculement de l'aimantation dans le plan (xy). Nous allons prendre le cas d'un système simple soumis uniquement à l'interaction externe Zeeman.

a. L'équilibre

A l'état d'équilibre, les spins nucléaires placés dans un champ magnétique \vec{B}_0 précessent autour de l'axe z (colinéaire à \vec{B}_0) à la fréquence de Larmor du noyau étudié. La répartition des spins sur les niveaux d'énergie $(2I+1)$ obéit à la distribution statistique de Boltzmann, il en résulte l'apparition d'une aimantation nucléaire macroscopique \vec{M}_0 alignée avec \vec{B}_0 et de norme M_0 (**Fig.6.A**).

b. Perturbation

La perturbation des spins nucléaires est due à l'application d'un champ radiofréquence \vec{B}_1 , perpendiculaire à \vec{B}_0 oscillant à la fréquence de Larmor. Le champ \vec{B}_1 va fournir l'énergie nécessaire à la transition entre les différents niveaux énergétiques, ce qui a pour conséquence de perturber la population des spins à l'équilibre. A cause de la précession de Larmor, un nouveau référentiel tournant (O, x', y', z') est défini dont l'axe z' est parallèle à l'axe z du référentiel du laboratoire (O, x, y, z) . C'est dans ce référentiel que le champ \vec{B}_1 est appliqué le long de l'axe x' , ce qui a pour effet de déplacer \vec{M} de sa position d'équilibre avec un angle de basculement θ en direction de l'axe y' , qui est proportionnelle à la durée d'impulsion τ du champ \vec{B}_1 tels que $\theta = \gamma B_0 \tau$ (**Fig.6.B**).

c. Relaxation

Après l'arrêt de l'impulsion d'excitation RF, l'aimantation nucléaire retourne à sa position d'équilibre en précessant autour de \vec{B}_0 . Ce retour à l'équilibre est défini par deux temps de relaxations caractéristiques : le temps de relaxation longitudinal T_1 selon l'axe z et le temps de relaxation transversal T_2 selon (x, y).

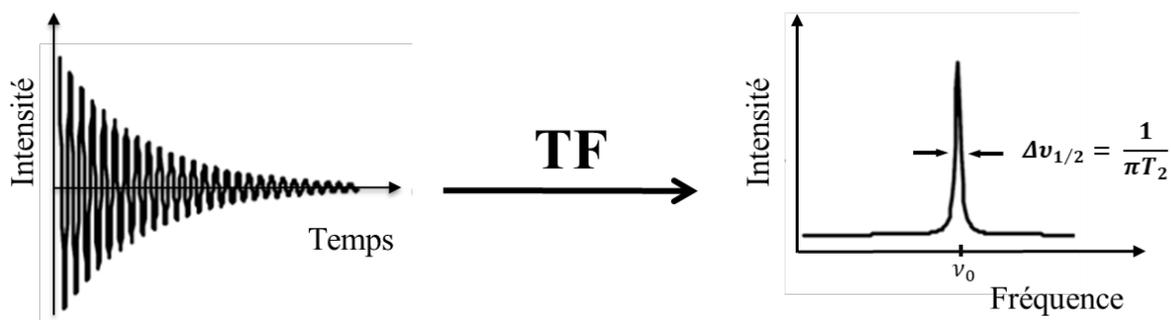


Figure 7 : Utilisation de la transformée de Fourier pour passer du domaine temporel au domaine fréquentiel : la FID est transformée en un pic de résonance (cas d'un noyau isolé sans environnement électronique) à la fréquence de Larmor ν_0 .

Le temps de relaxation longitudinal T_1 décrit le temps selon lequel l'aimantation \vec{M}_z retourne à son état d'équilibre parallèle à \vec{B}_0 . Ce retour à l'équilibre suit une exponentielle croissante au cours du temps donné par l'équation (**Fig.6.C**) :

$$M_z(t) = M_0(1 - e^{-\frac{t}{T_1}}) \quad (12)$$

La relaxation longitudinale est associée à un échange d'énergie du système vers l'environnement ou réseau *via* les mouvements moléculaires, c'est pourquoi elle est aussi appelée relaxation spin-réseau.

Le temps de relaxation transversal T_2 décrit la perte de l'aimantation dans le plan (x, y) qui décroît d'une façon exponentielle au cours du temps lors du retour à l'équilibre selon l'équation pour la composante y :

$$M_y(t) = M_0 \cos(\omega_0 t) e^{-\frac{t}{T_2}} \quad (13)$$

Le temps de relaxation T_2 est lié aux interactions entre les différents spins du noyau, c'est pourquoi la relaxation transversale est appelée relaxation spin-spin. Il donne des informations sur la dynamique du système. La relaxation transversale contribue à l'élargissement des signaux RMN tel que la largeur à mi-hauteur d'une raie de résonance soit inversement proportionnel à T_2 :

$$\Delta\nu_{1/2} = \frac{1}{\pi T_2} \quad (14)$$

d. La détection du signal RMN

En RMN, c'est la relaxation transversale selon les axes (x, y) qui est détectée et qui est à l'origine du signal RMN. Le signal RMN est appelé "signal de précession libre" (ou FID, Free Induction Decay). On obtient un signal RMN dont l'intensité varie en fonction du temps. Pour obtenir le spectre RMN qui correspond à un signal dont l'intensité varie en fonction de la fréquence, un traitement du signal est effectué à l'aide d'une fonction mathématique représentée par la transformée de Fourier (TF) qui permet le passage du domaine temporel au domaine fréquentiel (**Fig.7**).

III.1.1.2.3. Couplage interne

Le couplage interne provient de l'interaction entre le noyau et les champs locaux induits par les autres spins présents dans le système. Ces interactions sont décrites par l'hamiltonien relatif aux interactions internes \hat{H}_{int} qui comprend l'interaction de blindage électronique (\hat{H}_σ), le couplage scalaire J (\hat{H}_J), les interactions dipolaires (\hat{H}_D), et les interactions quadripolaires (\hat{H}_Q) comme suit :

$$\hat{H}_{int} = \hat{H}_\sigma + \hat{H}_J + \hat{H}_D + \hat{H}_Q \quad (15)$$

Le blindage électronique dépend de la densité du nuage électronique autour du noyau. Les électrons qui circulent autour du noyau vont créer un champ magnétique induit opposé à \vec{B}_0 . Un noyau isolé est partiellement protégé du champ magnétique \vec{B}_0 par ces électrons. Par contre, lorsque ces électrons sont engagés dans des liaisons chimiques, la densité électronique autour du noyau diminue, et le noyau ressent de manière plus importante le champ magnétique global. La fréquence de résonance de chaque noyau est donc dépendante de son environnement électronique. Un noyau est dit blindé lorsque la densité électronique autour de lui est forte, et déblindé lorsqu'elle est faible. Ceci est quantifié par l'expression du déplacement chimique δ (en parties par million ; ppm) par rapport à la fréquence de résonance d'une référence interne dont le signal est arbitrairement fixé à 0 ppm :

$$\delta = \frac{(v_{ref} - v)}{v_{ref}} \times 10^6 \quad (16)$$

Le couplage J résulte de l'interaction entre les moments magnétiques de deux noyaux d'une même molécule par le biais des électrons de liaison. Il s'agit d'interaction intramoléculaire. On parle de couplage spin-spin indirect ou couplage scalaire qui est indépendant de l'intensité du champ magnétique \vec{B}_0 et peut être homonucléaire ou hétéronucléaire.

Le couplage dipolaire ou couplage spin-spin direct, décrit le couplage entre deux noyaux A et B voisins dans l'espace, à travers leurs moments magnétiques. Ce couplage dépend de la distance entre les noyaux A et B et décroît rapidement avec celle-ci (en $1/r^3$). Cette interaction présente une dépendance orientationnelle liée à l'angle entre les dipôles A et B. Dans un milieu isotrope, l'orientation et la distance entre les noyaux varient trop rapidement pour permettre d'observer du couplage dipolaire. L'interaction dipolaire est donc moyennée et nulle. Il s'agit donc d'une interaction caractéristique des milieux anisotropes, et peut être homonucléaire ou hétéronucléaire.

Le couplage quadripolaire concerne des noyaux ayant un spin supérieur à $\frac{1}{2}$ (comme le noyau ^2H). En plus du moment magnétique nucléaire, ces noyaux possèdent un moment électrique quadripolaire (eQ) dû à une distribution non sphérique des charges autour du noyau. Ce couplage résulte d'une interaction entre le moment quadripolaire du noyau et le gradient de champ électrique (GCE) généré par les charges extérieures au noyau. Comme le couplage dipolaire, l'interaction quadripolaire n'est observable que pour des systèmes anisotropes.

En résumé, les couplages internes et externes d'un spin nucléaire placé dans un champ magnétique sont décrits par l'Hamiltonien total, somme de l'Hamiltonien associé à l'interaction externe Zeeman (H_Z) et de l'Hamiltonien relatif aux interactions internes :

$$\hat{H} = \hat{H}_Z + \hat{H}_\sigma + \hat{H}_J + \hat{H}_D + \hat{H}_Q \quad (17)$$

Les interactions présentes dans un système de spin vont dépendre du noyau étudié, ainsi que des propriétés physico-chimiques de l'échantillon, particulièrement sa dynamique. Certaines interactions seront favorisées par rapport aux autres suivant la nature du système étudié, anisotrope (RMN des solides) ou isotrope (RMN des liquides). Dans un milieu isotrope, la dynamique du système et les mouvements moléculaires sont importants et rapides ; les interactions dipolaires et quadripolaires sont donc nulles. C'est le blindage électronique et le couplage spin-spin indirect qui prédominent. Dans un milieu anisotrope dans lequel les propriétés du système dépendent de l'orientation des molécules, ce sont le couplage dipolaire et le couplage quadripolaire qui prédominent en faveur des autres interactions. De plus la dynamique des systèmes va influencer sur les temps de relaxation (retour à l'équilibre). En RMN des liquides, les temps de relaxation sont relativement longs (plusieurs secondes), par comparaison à ceux de la RMN des solides où les temps de relaxations sont courts (de l'ordre de la milliseconde).

III.1.2. Application de la RMN des solides aux biomembranes

III.1.2.1. RMN du deutérium ^2H

La RMN de deutérium est une technique de choix pour l'étude de l'organisation et de la dynamique des membranes lipidiques. Le deutérium étant un atome avec une faible abondance naturelle (0.015%), nous utilisons donc des phospholipides dont au moins une des chaînes acyles est marquée au deutérium (POPC d_{31} et DMPC d_{54}), ce qui va nous permettre

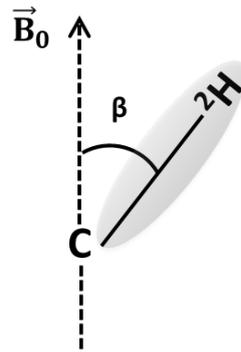


Figure 8 : Représentation de l'angle β entre le gradient champ électrique d'un noyau deutérium (ovale gris) et le champ magnétique \vec{B}_0 .

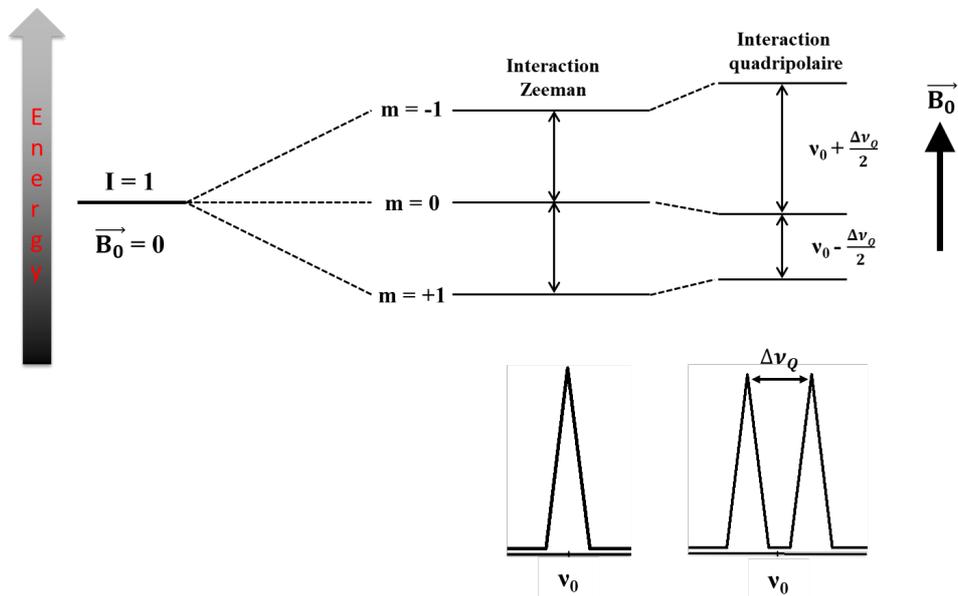


Figure 9 : Représentation schématique des niveaux d'énergie et des raies de résonance d'un noyau de spin $I = 1$ soumis aux interactions Zeeman et quadripolaire.

d'explorer l'ordre du cœur hydrophobe des membranes. De nombre de spin $I = 1$, le deutérium possède un moment quadripolaire. L'effet Zeeman et l'interaction quadripolaire contribuent ainsi tous les deux à l'hamiltonien avec :

$$\hat{H} = \hat{H}_z + \hat{H}_Q \quad (18)$$

Selon Davis (1983), l'hamiltonien relatif à l'interaction quadripolaire dans un système membranaire fluide est représenté par l'équation :

$$\hat{H}_Q = \frac{e^2 q Q}{4I(2I-1)} [3\hat{I}_z^2 - I(I+1)] \left(\frac{3\cos^2\beta - 1}{2} \right) \quad (19)$$

Où e représente la charge élémentaire, $e^2 q Q$ provient du moment quadripolaire (eQ) multiplié par la composante du gradient champ électrique eq et β l'angle entre le champ magnétique B_0 et l'axe principal du GCE (**Fig.8**).

L'équation de l'hamiltonien total s'écrit alors :

$$\hat{H} = -\hbar\omega_0\hat{I}_z + \frac{e^2 q Q}{4I(2I-1)} [3\hat{I}_z^2 - I(I+1)] \left(\frac{3\cos^2\beta - 1}{2} \right) \quad (20)$$

Le deutérium de nombre de spin 1, possède trois niveaux d'énergie ($2I+1$), correspondant aux trois valeurs possibles pour m : -1, 0 et 1. L'expression des niveaux d'énergie du deutérium peut être obtenue :

$$E_m = -\hbar\omega_0\hat{I}_z + \frac{e^2 q Q}{4} [3m^2 - 2] \left(\frac{3\cos^2\beta - 1}{2} \right) \quad (21)$$

Il y a donc deux transitions possibles entre les trois niveaux d'énergie ce qui conduit à l'obtention de deux raies de résonance sur le spectre centré à la fréquence de Larmor (ν_0) ayant comme fréquences (**Fig.9**) :

$$\nu_1 = \nu_0 + \frac{3}{4} \frac{e^2 q Q}{h} \left(\frac{3\cos^2\beta - 1}{2} \right) \quad (22)$$

$$\nu_2 = \nu_0 - \frac{3}{4} \frac{e^2 q Q}{h} \left(\frac{3\cos^2\beta - 1}{2} \right) \quad (23)$$

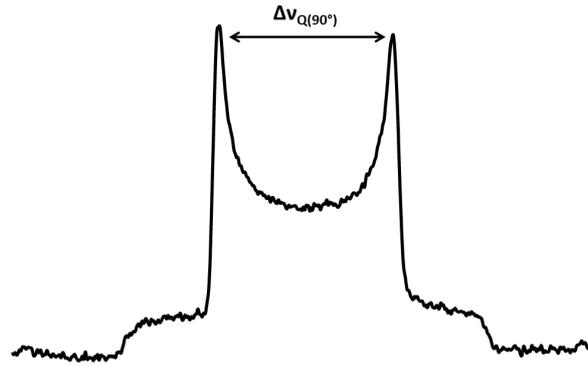


Figure 10 : Représentation d'un doublet de Pake d'une liaison C-²H. L'écart entre les deux raies correspond à l'éclatement quadripolaire $\Delta\nu_Q$.

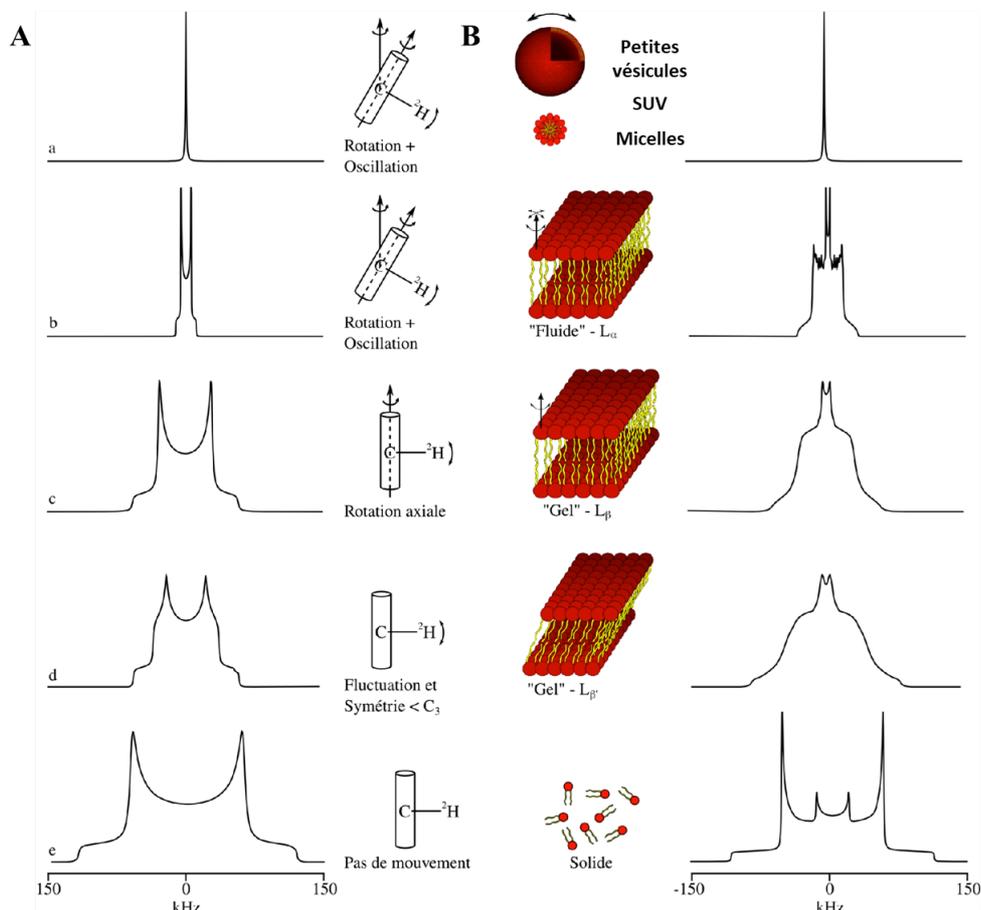


Figure 11 : Représentation des différentes formes de spectres RMN-²H en fonction des mouvements moléculaires et de la phase lipidique. (A) Spectres simulés pour une seule liaison C-²H. (B) Spectres simulés pour un lipide de type DMPC_{d54} pour différents types d'organisation lipidique. D'après Buchoux (2008), et adaptée de Dufourc et Smith (1986).

L'écart entre les deux raies $\Delta\nu_Q$ est appelé l'éclatement quadripolaire avec :

$$\Delta\nu_Q = \frac{3}{2} \frac{e^2 q Q}{h} \left(\frac{3 \cos^2 \beta - 1}{2} \right) \quad (24)$$

Avec $\frac{e^2 q Q}{h}$ la constante de couplage quadripolaire statique noté A_Q , elle est égale à 167 kHz pour une liaison C-²H (Burnett & Muller, 1971). L'équation précédente s'écrit alors :

$$\Delta\nu_Q = \frac{3}{2} A_Q \left(\frac{3 \cos^2 \beta - 1}{2} \right) \quad (25)$$

Le signal RMN d'une liaison C-²H isolée correspond à un signal en forme de doublet, appelé doublet de Pake (**Fig.10**). L'éclatement quadripolaire, $\Delta\nu_Q$, dépend uniquement de l'angle β entre le champ magnétique et l'axe principal du GCE, c'est-à-dire de l'orientation de la liaison C-²H par rapport au champ magnétique. Par conséquent, l'éclatement quadripolaire va dépendre des mouvements moléculaires. Plus la dynamique de la liaison C-²H augmente, plus l'éclatement quadripolaire devient petit jusqu'à s'annuler lorsque la liaison C-²H peut explorer toutes les orientations. Le spectre RMN du deutérium d'un lipide deutéré en membrane résulte de la superposition des différents doublets de Pake relatifs à chaque liaison C-²H. Puisque l'éclatement quadripolaire dépend de la dynamique de la liaison C-²H, il va donc varier selon sa position sur la chaîne du lipide. Ainsi, l'éclatement quadripolaire augmente en se déplaçant sur la chaîne acyle du lipide en allant du groupement méthyle le plus mobile vers le groupe méthylène adjacent à la fonction ester le plus contraint. De plus, l'éclatement quadripolaire va dépendre de la phase du lipide dont va dépendre la dynamique des chaînes au sein de la membrane. Ainsi, dans le cas d'un système lipidique rigide en phase gel L_β , le spectre est large et peu résolu car les chaînes sont peu mobiles. 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 d'objets lipidiques de petites tailles soumis à de nombreux mouvements dans toutes les directions de l'espace (SUV, micelles) et qui tournent sur eux-mêmes très rapidement, le spectre deutérium est composé d'une seule raie isotrope (**Fig.11**). Au contraire, dans le cas d'un échantillon lipidique sous forme de poudre, la dynamique du système est quasi-nulle. Les chaînes acyles ne sont soumises à aucun mouvement, toutes les orientations sont possibles. Le spectre RMN

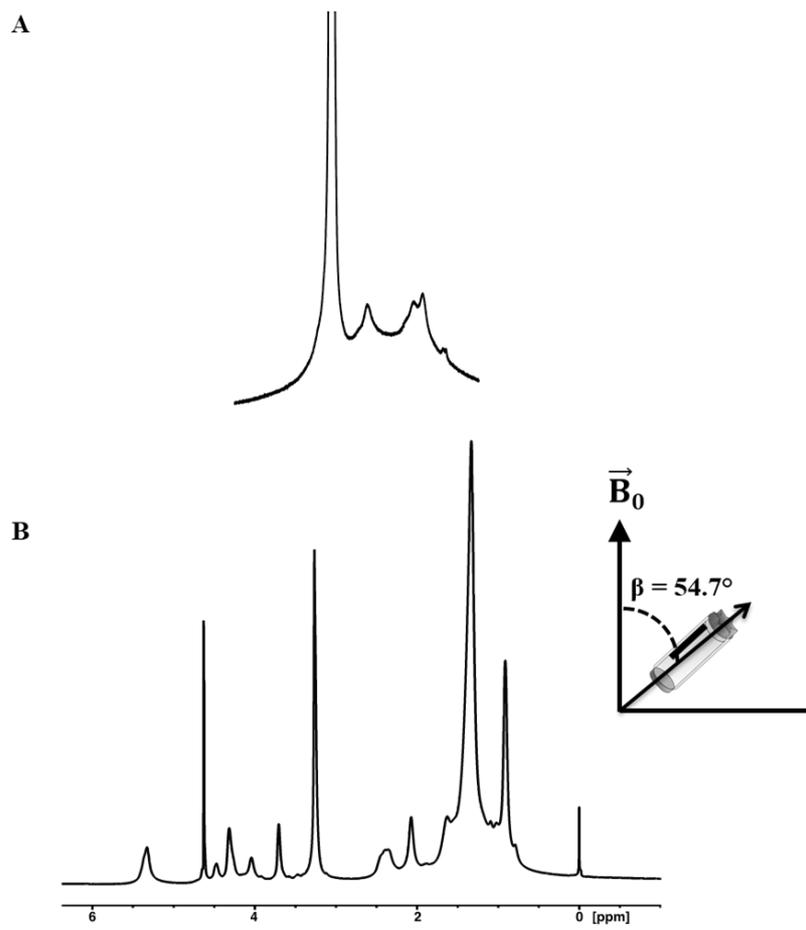


Figure 12 : Spectre RMN d'une membrane lipidique de POPC en statique (A) et en rotation à l'angle magique $\beta = 54.7^\circ$ à la vitesse de 10 kHz (B).

correspond donc à la superposition des raies de résonances associées à chaque orientation selon leur probabilité d'existence.

III.1.2.2. RMN haute résolution par rotation à l'angle magique

L'application de la RMN des liquides sur des échantillons solides anisotropes tels que les MLV va aboutir à l'obtention de spectres avec des raies larges de faible résolution (**Fig.12.A**). Dans ce cas, il est difficile d'attribuer les différentes résonances du lipide (^1H et ^{13}C dans le cas de notre étude). Pour s'affranchir de cette limitation, on a recours à la technique RMN haute résolution en rotation à l'angle magique (HR-MAS). Cette technique de RMN des solides appliquée à des échantillons anisotropes permet d'affiner le signal RMN et d'obtenir des spectres avec des signaux de faible largeur, dont la résolution est comparable à celle obtenue pour la RMN en phase liquide.

La technique HR-MAS consiste à faire tourner mécaniquement l'échantillon orienté à un angle de 54.7° par rapport au champ magnétique externe (**Fig.12.B**). A cet angle, la dépendance angulaire des interactions magnétiques anisotrope s'annule ($\frac{3\cos^2\beta-1}{2}$) et la rotation de l'échantillon à une fréquence supérieure à celle des interactions magnétiques anisotropes permet de moyenniser ces interactions à zéro, et donc de s'en affranchir. Les interactions qui subsistent alors sont l'effet Zeeman, le blindage électronique et le couplage spin-spin indirect.

III.1.3. Paramètres expérimentaux

Dans cette partie nous allons présenter les différents paramètres et conditions expérimentaux qui ont été utilisés dans cette thèse.

III.1.3.1. Expériences RMN de solide : séquence d'écho

En RMN des solides, des puissances importantes (plusieurs centaines de Watt) sont utilisées pour générer le champ radiofréquence, qui permet de faire basculer les spins de 90° de l'échantillon. Après une impulsion RF, un délai machine appelé temps mort, pendant lequel il n'est pas possible de faire une acquisition, est induit. En RMN des solides, les temps de relaxations sont tellement courts que le système peut retourner à l'équilibre pendant le temps

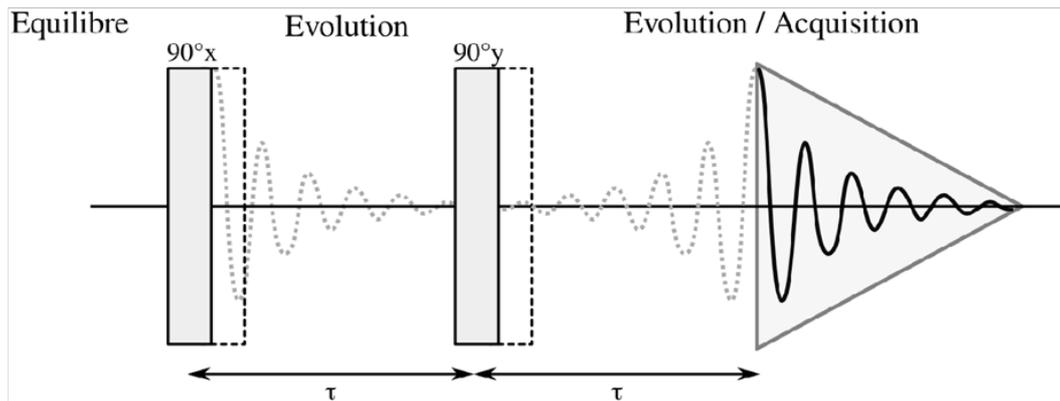


Figure 13 : Séquence RMN d'écho solide utilisée pour les expériences RMN du deutérium. Les traits en pointillés représentent le temps mort machine.

mort, ce qui peut aboutir à une perte d'informations. Ce qui n'est pas le cas en RMN des liquides car les temps de relaxation sont beaucoup plus lents, de sorte que la perte d'informations pendant le temps mort est négligeable.

Pour s'affranchir de cette limite, des séquences d'écho de spin ont été développées (Hahn, 1950), dans le but de déplacer l'origine du signal RMN au-delà du temps mort machine. Elles sont composées de deux étapes : une première impulsion d'excitation fait basculer les spins de 90°_x . Ensuite après un temps τ , une deuxième impulsion à 90°_y est appliquée dans le but de refocaliser le système de spin 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 constituant le signal sont décalées d'un temps égal à 2τ par rapport à la première impulsion (impulsion de lecture). L'acquisition est donc décalée de la même façon sans perte d'information. La séquence d'écho quadripolaire (développée par Davis *et al.*, 1976) a été utilisée pour effectuer les études en RMN- ^2H (**Fig.13**).

III.1.3.2. Transfert de polarisation : séquence INEPT

Le proton, du fait de sa grande abondance naturelle (99.98%) et de son rapport gyromagnétique élevé ($26.75 \cdot 10^7 \text{ rad.s}^{-1} \cdot \text{T}^{-1}$) est un noyau qui possède une sensibilité très importante en RMN, ce qui n'est pas le cas du carbone. Le carbone est un noyau qui possède deux isotopes stables, le ^{12}C et le ^{13}C . Seul le ^{13}C avec un nombre de spin de $\frac{1}{2}$ est détectable en RMN (le ^{12}C a un nombre de spin nul). Cependant, il possède une abondance naturelle très faible (1.07%) et un rapport gyromagnétique faible ($6.72 \cdot 10^7 \text{ rad.s}^{-1} \cdot \text{T}^{-1}$), ce qui le rend moins sensible au phénomène de RMN. Afin d'observer ce noyau, des techniques de transfert d'aimantation du proton (noyau riche) vers les hétéronoyaux (noyau pauvre comme le ^{13}C) *via* le couplage J hétéronucléaire ont été développées comme la méthode INEPT (« Insensitive Nuclei Enhanced by Polarisation Transfert »). Ce type de séquence est couramment utilisé pour l'étude des membranes lipidiques en phase fluide dont la mobilité des chaînes acyles des lipides est élevée (Gross *et al.*, 1995, Warschawski et Devaux, 2000). Elle permet de détecter les parties mobiles des molécules. Puisque le transfert se fait *via* les couplages J hétéronucléaire du proton vers le carbone, les carbones quaternaires ne sont pas détectés dans ce type d'analyse. Cette séquence a été appliquée pour l'étude de localisation des tannins dans les membranes lipidiques.

III.1.3.3. Paramètres d'acquisition

RMN du deutérium

Les expériences RMN- ^2H , ont été effectuées sur un spectromètre Bruker Avance Biospin 500 MHz (sonde Dual Resonance $^1\text{H}/^{109}\text{Ag}-^{13}\text{C}$ Broad band 4 mm CPMAS) avec la séquence d'écho solide quadripolaire : la fenêtre spectrale utilisée est de 500 kHz. La durée d'impulsion 90° est de $3.5 \mu\text{s}$, le délai entre deux impulsions τ est de $40 \mu\text{s}$. La fenêtre spectrale utilisée est de 500 kHz. Le nombre de point est de 2k, le nombre d'acquisition est de 10k scans. Le centre des spectres a été fixé arbitrairement à 0 ppm. L'échantillon est laissé s'équilibrer en température pendant 30 minutes avant chaque acquisition. Un LB de 300 Hz est appliqué avant la transformé de Fourier.

RMN du proton

Les expériences RMN du proton solide HR-MAS ont été effectuées sur un spectromètre Bruker Avance Biospin 500 MHz (sonde Dual Resonance $^1\text{H}/^{109}\text{Ag}-^{13}\text{C}$ Broad band 4 mm CPMAS) avec une séquence standard présentant une impulsion à 90° . La durée d'impulsion 90° est de $3.1 \mu\text{s}$. La fenêtre spectrale utilisée est de 7.5 kHz. Le nombre de point est de 32k, le nombre d'acquisition est de 64 et 128 scans. La vitesse de rotation est de 10 kHz. Les déplacements chimiques sont référencés par rapport au signal du DSS fixé à 0 ppm.

Les expériences RMN- ^1H liquide ont été réalisées sur un spectromètre 400MHz (sonde QNP Dual Resonance $^{13}\text{C}/^{19}\text{F}/^{31}\text{P}/^1\text{H}/^2\text{H}$) avec une séquence d'impulsion à 90° . La durée d'impulsion 90° est de $10 \mu\text{s}$. La fenêtre spectrale utilisée est de 8 kHz. Le nombre de point est de 32k, le nombre d'acquisition est de 16, 32, 64 et 128 scans. Les déplacements chimiques sont référencés par rapport au signal du TMS ou TMSP fixé à 0 ppm.

RMN 2D

Les expériences HR-MAS 2D $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ INEPT ont été réalisées sur un spectromètre Bruker 600 MHz (sonde BioSolids Triple Resonance $^1\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ DUT 3.2 mm CPMAS). La fenêtre spectrale utilisée pour le ^{13}C est de 55 kHz, celle pour le ^1H de 7 kHz. Le nombre de point est de 1.66k pour le ^{13}C et 179 pour le ^1H . Le nombre d'acquisition est de 160. La vitesse de rotation est de 19 kHz. Les déplacements chimiques sont référencés par rapport au signal du DSS fixé à 0 ppm.

L'analyse des données et le traitement des spectres RMN ont été faits à l'aide du logiciel TopSpin (version 3.2).

III.1.4. Exploitation des spectres RMN-²H

III.1.4.1. Premier moment spectral M₁

Un moment est une grandeur spectrale calculée à partir de l'intensité S(ω) d'un spectre RMN par rapport à une fréquence de référence ω₀ (la fréquence de Larmor). Le moment spectral d'ordre n est défini suivant l'équation (Davis *et al.*, 1979) :

$$M_n = \frac{\int_{-\infty}^{+\infty} (\omega - \omega_0)^n S(\omega) d\omega}{\int_{-\infty}^{+\infty} S(\omega) d\omega} \quad (26)$$

Dans le cas de spectres symétriques, comme c'est le cas de ceux obtenus en RMN du deutérium, les moments d'ordre impair sont nuls. Les moments sont donc redéfinis de la façon suivante :

$$M_n = \frac{\int_0^{+\infty} (\omega - \omega_0)^n S(\omega) d\omega}{\int_0^{+\infty} S(\omega) d\omega} = \frac{1}{A} \int_0^{+\infty} (\omega - \omega_0)^n S(\omega) d\omega \quad (27)$$

Il a été montré que dans le cas des bicouches lipidiques, du fait de leur symétrie axiale (Davis, 1983), les moments peuvent être reliés à la distribution des éclatements quadripolaires moyennés sur l'ensemble des mouvements par la relation :

$$M_n = A_n (2\pi)^n \langle \Delta\nu_Q^n \rangle \quad (28)$$

Où A_n est une constante dépendante de l'ordre du moment spectral. Dans cette thèse, nous nous sommes intéressés au premier moment spectral M₁ (n = 1), avec A₁ = $\frac{2}{3\sqrt{3}}$ (Davis, 1983).

Son expression devient alors :

$$M_1 = \frac{4\pi}{3\sqrt{3}} \langle \Delta\nu_Q \rangle \quad (29)$$

Le premier moment spectral M₁ rend compte de la distribution d'intensité en fonction de la fréquence et donc de la forme d'un spectre RMN-²H. De plus, proportionnel à l'éclatement quadripolaire moyen $\langle \Delta\nu_Q \rangle$, M₁ est un indicateur des changements de mouvements moléculaires et donne des informations globales sur l'ordre et la dynamique du système lipidique en fonction de la température (Davis *et al.*, 1983). Plus la valeur de M₁ est élevée, plus le système est ordonné (système rigide). En revanche, des faibles valeurs de M₁ sont caractéristiques d'un système désordonné (système fluide). La température de transition de

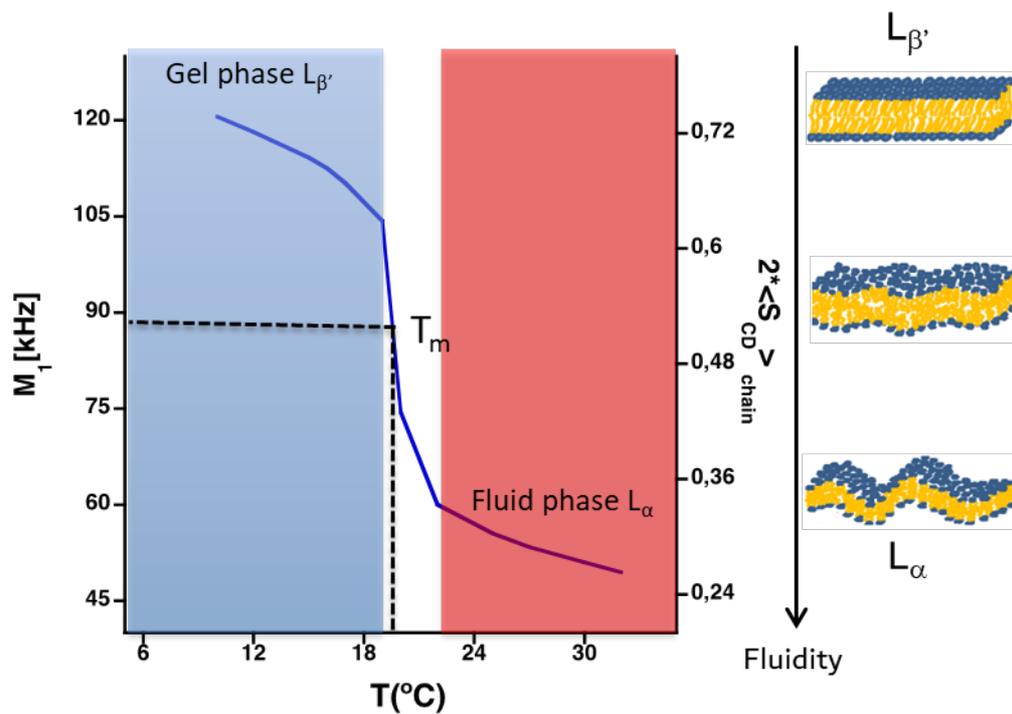


Figure 14 : Variation du moment spectral M_1 en fonction de la température. T_m représente la température de transition entre la phase gel $L_{\beta'}$ et la phase fluide L_{α} de la membrane lipidique. $2*\langle S_{CD} \rangle_{\text{chain}}$ représente le paramètre d'ordre moyen des chaînes acyles deutérées.

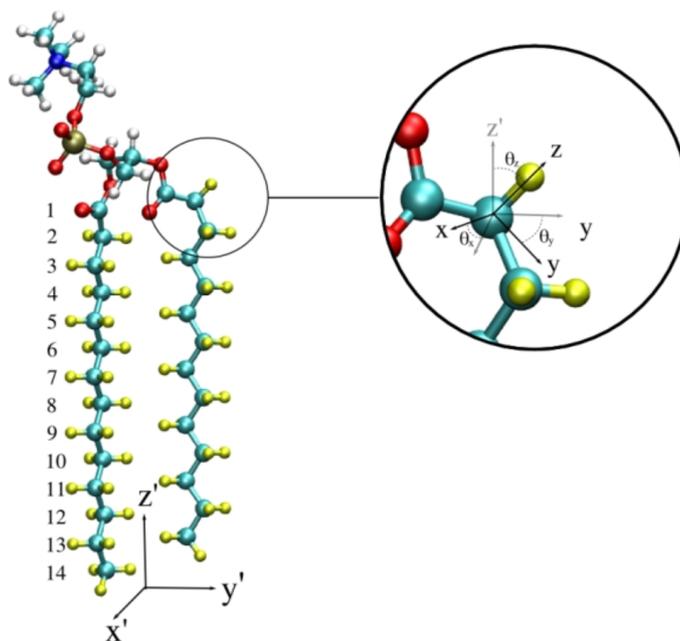


Figure 15 : Structure du $DMPCd_{54}$ et représentation des angles $\theta_i(x, y, z)$. D'après Buchoux 2008.

phase, T_m , est déterminée au point d'inflexion de la courbe représentant M_1 en fonction de la température (**Fig.14**). Le calcul du premier moment spectral M_1 a été fait à l'aide du programme NMR-Depaker (Version 1.0rc1, Buchoux, 2008).

III.1.4.2. Paramètre d'ordre S_{CD}

Dans le but de décrire les mouvements moléculaires au sein des membranes lipidiques, une nouvelle grandeur a été développée par Seelig (1977) : le paramètre d'ordre. Dans le cas des bicouches de lipides, on définit θ_i les trois angles permettant le passage des axes principaux du GCE aux axes du lipide (x' , y' , z') (**Fig.15**). Les fluctuations de la liaison C-²H par rapport à la normale à la bicouche peuvent être estimées par les paramètres d'ordre S_{ii} :

$$S_{ii} = \frac{3\langle \cos^2 \theta_i \rangle - 1}{2} \quad (30)$$

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

$$\Delta\nu_Q(\beta') = \frac{3}{2}A_Q \left(\frac{3\cos^2 \beta' - 1}{2} \right) S_{zz'} \quad (31)$$

Où β' est l'angle entre l'axe directeur du lipide z' et le champ magnétique \vec{B}_0 . Dans le cas de liaison C-²H, l'axe principal de GCE est quasiment colinéaire à l'axe de la liaison. Ainsi $S_{zz'}$ peut être noté S_{CD} , et les fluctuations des liaisons C-²H sont reliées à l'éclatement quadripolaire par la relation :

$$\Delta\nu_Q(\beta') = \frac{3}{2}A_Q \left(\frac{3\cos^2 \beta' - 1}{2} \right) S_{CD} \quad (32)$$

A partir de cette relation, on peut calculer les paramètres d'ordre pour chaque liaison C-²H sur les chaînes lipidiques en mesurant les éclatements quadripolaires visibles sur le spectre RMN-²H. Sachant que pour $\beta' = 90^\circ$ (l'orientation la plus probable qui correspond aux raies les plus intenses), le terme $\left| \frac{3\cos^2 \beta' - 1}{2} \right|$ est égale $\frac{1}{2}$. Les différents S_{CD} calculés dans notre étude ont été obtenus à partir de la relation suivante :

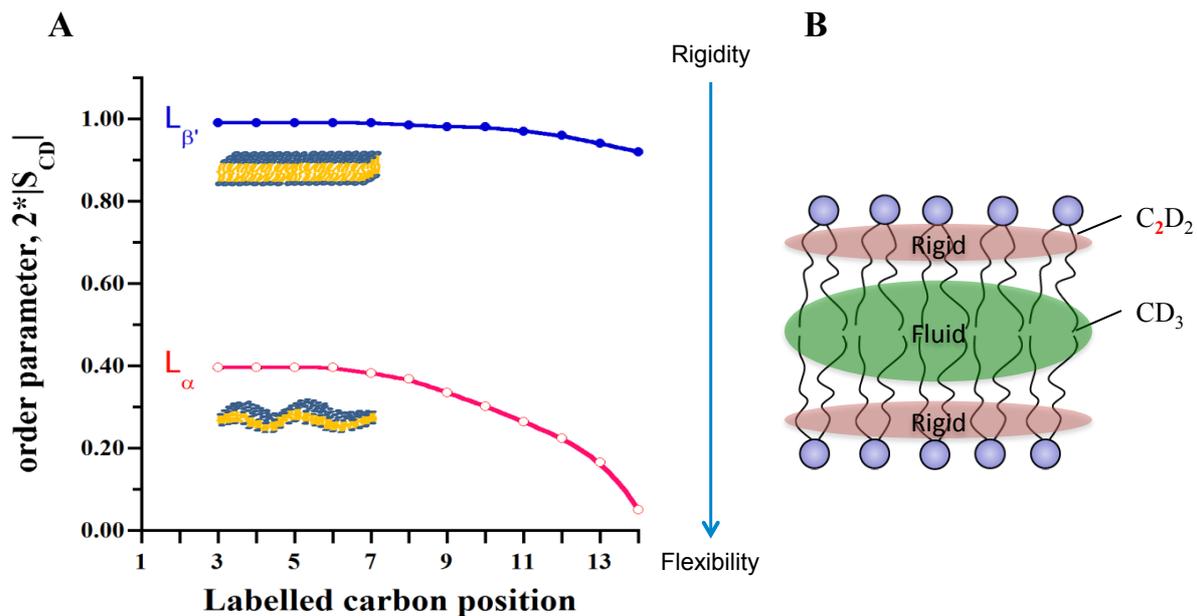


Figure 16 : Profil des paramètres d'ordre S_{CD} en fonction de la position de la liaison C-D sur la chaîne du lipide $DMPCd_{27}$ en membrane, pour les phases lamellaire gel (rigide) $L_{\beta'}$ et fluide L_{α} (A). Dynamique des chaînes acyles du lipide en fonction de la profondeur membranaire (B).

$$\Delta\nu_Q(90^\circ) = \frac{3}{4}A_Q S_{CD} \quad (33)$$

D'après les équations (30) et (33), le paramètre d'ordre peut être lié au premier moment spectral par la relation :

$$\langle S_{CD} \rangle_{\text{chaîne}} = \frac{\sqrt{3}}{\pi A_Q} M_1 \quad (34)$$

La détermination du premier moment spectral va donc nous permettre d'avoir une estimation de l'ordre global des chaînes lipidiques.

Le paramètre d'ordre S_{CD} décrit les mouvements moléculaires à l'intérieur d'une membrane lipidique et donne une information locale sur l'ordre et la dynamique des chaînes carbonées. Dans un système rigide (comme une phase lamellaire gel $L_{\beta'}$), les chaînes acyles sont alignées les unes par rapport aux autres et sont soumises à peu de mouvement, les valeurs de S_{CD} tendent alors vers 1 (**Fig.16.A**). Dans un système plus fluide (L_{α}), les chaînes acyles ont une mobilité importante, les valeurs de S_{CD} sont proches de 0. Ainsi, les valeurs de S_{CD} diminuent avec l'augmentation de la dynamique des groupements moléculaires présents sur les chaînes acyles. Ainsi, plus on pénètre profondément à l'intérieur de la membrane lipidique, plus la fluidité augmente (**Fig.16.B**). Il faut noter que le facteur 2 dans le paramètre $2\langle S_{CD} \rangle_{\text{chain}}$ (**Fig.14**) est lié au fait que l'orientation moyenne de presque toutes les liaisons $C-^2H$ est de 90° par rapport à l'axe directeur du lipide. Cette affirmation n'est pas totalement vraie pour le CD_3 terminal (rotation rapide) et pour les deutérons en position 2 de la chaîne sn-2 (les liaisons $C-^2H$ ne sont pas équivalentes) dont l'orientation des liaisons $C-^2H$ est différente de 90° . Dans ces cas, un facteur géométrique doit être utilisé (Beck *et al.*, 2007).

III.1.4.3. Détermination des paramètres d'ordre

En raison de la dépendance orientationnelle des liaisons $C-^2H$, il y a recouvrement de certains signaux relatifs à chaque position marquée sur la chaîne acyle du lipide ; il est alors difficile de mesurer avec précision la valeur des éclatements quadripolaires $\Delta\nu_Q$ pour chaque liaison $C-^2H$ sur le spectre RMN- 2H . On y parvient avec une méthode de déconvolution spectrale, le de-Pake-ing et la simulation des spectres RMN.

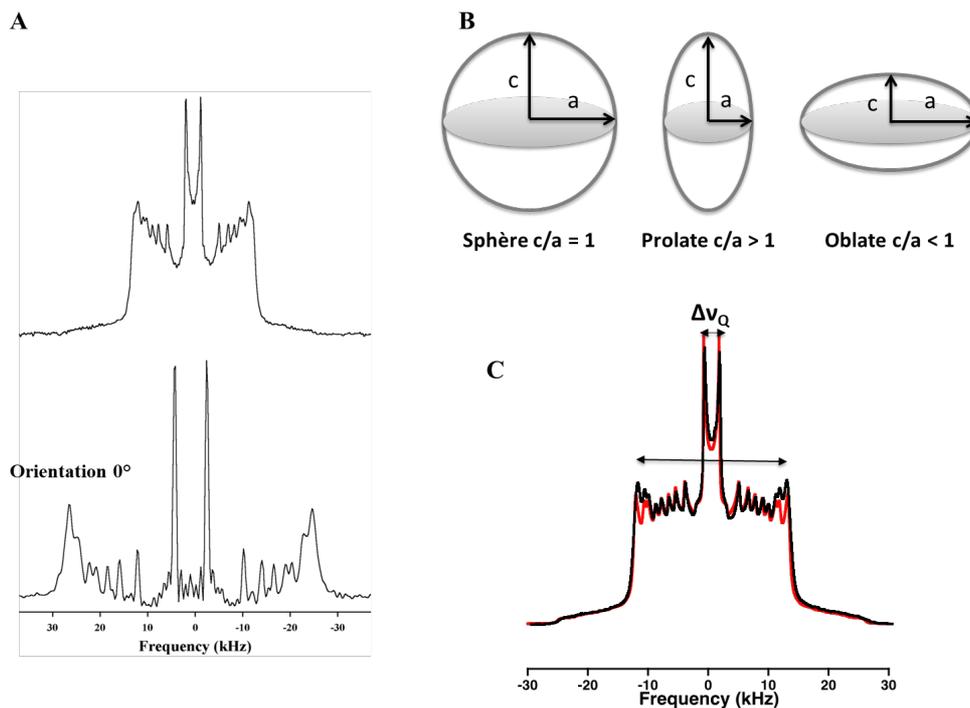


Figure 17 : Principe de la technique de déconvolution spectrale d'un spectre RMN- ^2H du DMPCd₂₇ en MLV. Spectre expérimental (en haut) et spectre déconvolué (en bas) (image extraite de la thèse d'Aurélien Furlan (2013)) (A). Illustration des déformations oblate et prolate des membranes lipidiques sous l'effet du champ magnétique (B). Superposition entre un spectre RMN- ^2H expérimental (noir) et un spectre simulé (rouge) (C).

Le de-Pake-ing

Le de-Pake-ing est une méthode mathématique développée par Blomm *et al.* (1981), qui permet de construire un spectre orienté à un angle β' donné (0° dans notre cas) à partir d'un spectre expérimental (**Fig.17.A**). Dans cette méthode, chaque doublet de Pake sur le spectre RMN- ^2H est déconvolué, de façon à obtenir une superposition de $2N$ raies de résonances, avec N le nombre de liaisons C- ^2H non équivalentes. Celles-ci correspondent aux éclatements quadripolaires pour chaque position sur la chaîne acyle. Il est ainsi possible de déterminer les éclatements quadripolaires sur le spectre déconvolué, et par suite de calculer les paramètres d'ordre. Cependant, lorsque le spectre est de faible résolution, il est difficile d'extraire tous les éclatements quadripolaires par cette méthode. Dans ce cas, on a recours à la simulation numérique du spectre deutérium.

La méthode de simulation des spectres RMN- ^2H

La simulation des spectres deutérium a été effectuée grâce à un programme informatique en FORTRAN développé dans le laboratoire (E.J. Dufourc, non publié). La simulation est basée sur la connaissance des 4 paramètres présentés dans le tableau ci-dessous :

Paramètres	Descriptif
$\Delta\nu_{Q(0)}$ (kHz)	Eclatement quadripolaire à 0° déterminé à partir du de-Pake-ing
$\Delta\nu_{1/2}$ (Hz)	Largeur à mi-hauteur du doublet de Pake relatif à la position marquée i
P	Nombre de deutérons par position marquée ; $i = 2$ pour les CD_2 , et 3 pour le méthyle terminale
c/a	Déformation globale du système lipidique par rapport au cas sphérique ; c et a représentent respectivement le $\frac{1}{2}$ grand axe vertical et horizontal d'une ellipse.

Tableau 2 : Tableau représentant les différents paramètres utilisés pour effectuer la simulation des spectres expérimentaux de RMN- ^2H .

D'abord, on commence la simulation par le dénombrement (**P**) du nombre de liaisons C- ^2H sur la chaîne du lipide. Dans le cas du $\text{POPC}_{d_{31}}$ utilisé dans notre étude, il existe 15 positions marquées sur sa chaîne acyle sn-1 où chaque liaison C- ^2H porte deux deutérons à l'exception du méthyl terminal qui en possède trois. Ensuite, les valeurs initiales des éclatements quadripolaires $\Delta\nu_Q$ et les largeurs à mi-hauteur $\Delta\nu_{1/2}$ pour chaque position sont fixées à la valeur obtenue par de-Pake-ing. Pour le paramètre c/a , il est fixé par défaut à 1, cas de MLV de forme parfaitement sphérique. Il peut prendre une valeur différente de 1, si les MLV sont déformées en forme prolata ($c/a > 1$) ou oblate ($c/a < 1$) sous l'effet du champ magnétique

(Fig17.B). Enfin, les autres paramètres sont ajustés de manière à obtenir un spectre simulé superposable au spectre expérimental (Fig.17.C).

III.1.4.4. Longueur des chaînes hydrophobes

L'épaisseur hydrophobe d'une membrane lipidique peut être estimée à partir de la longueur moyenne des chaînes acyles en effectuant la somme de tous les paramètres d'ordre carbone-carbone S^{CC} sur la chaîne. Les paramètres d'ordre carbone-carbone S_{CC} sont reliés aux paramètres d'ordre carbone-deutérium S_{CD} par la relation :

$$S_k^{CC} + S_{k+1}^{CC} = -2S_k^{CD} \quad (35)$$

A partir des S_{CD} mesurés, nous sommes capables de calculer les S_{CC} sur chaque position de la chaîne lipidique et par suite de déterminer la longueur moyenne de la chaîne acyle du lipide $\langle L_{Chain} \rangle$ par l'équation (Douliez *et al.*, 1995, 1996) :

$$\langle L_{Chain} \rangle = \frac{(1 + \sqrt{1 + 8S_{mol}})}{4} \left[\langle l_{C_n-H} \rangle + 1.25 \sum_{k=2}^n \left(\frac{1}{2} + \frac{S_k^{CC}}{S_{mol}} \right) \right] \quad (36)$$

Où S_{mol} représente le paramètre d'ordre intermoléculaire, il est égal à 1. l_{C_n-H} est la contribution de la liaison C_n-D du méthyl terminal qui est estimée à 0.81 Å. Dans le cas du POPC utilisé dans cette thèse, n est égal à 16. On obtient alors l'équation réduite :

$$\langle L_{Chain} \rangle = \left[0.81 + 1.25 \sum_{k=2}^{16} \left(\frac{1}{2} + S_k^{CC} \right) \right] \quad (37)$$

Selon Douliez *et al.* (1995), le paramètre d'ordre S_k^{CC} du méthyl terminal est déterminé par l'équation :

$$S_k^{CC} = \frac{S_k^{CD}}{(3\cos^2(111^\circ) - 1)/2} \quad (38)$$

Avec 111° l'angle entre la liaison C_k-D et la liaison $C_{k-1}-C_k$. Une fois obtenu, nous sommes donc capables de calculer le paramètre d'ordre C-C de la position $(k-1)$ par rapport au méthyl terminal (position 15 sur le POPC) ainsi que celui des autres positions en appliquant l'équation (35).

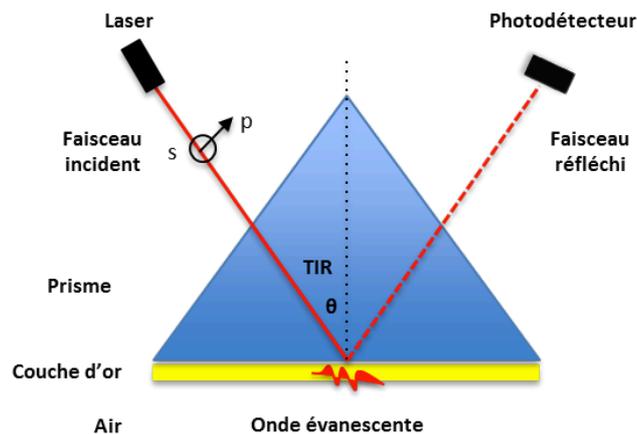


Figure 18 : Illustration du phénomène de réflexion totale interne (TIR) qui s'accompagne de la formation d'une onde évanescente à l'interface métal/air.

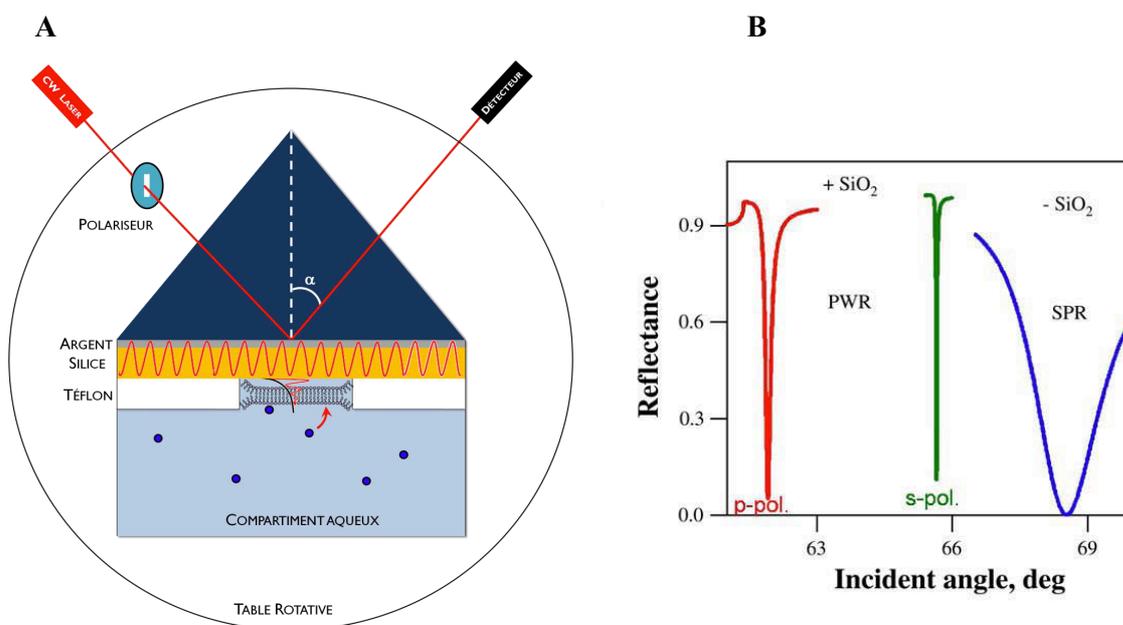


Figure 19. Montage expérimental de la spectroscopie PWR (A). Le système est déposé sur une table rotative qui permet de varier l'angle du faisceau incident. Un bloc de téflon est déposé sur le prisme constitué d'une couche de silice et d'une couche d'argent. Spectres PWR pour les polarisations p (rouge) et s (vert) comparés au spectre SPR (bleu) (B). D'après Hurby et Tollin, 2007.

III.2. Résonance plasmonique aux ondes guidées (PWR)

La technique de résonance plasmonique aux ondes guidées a été utilisée pour l'étude des interactions entre les tannins et les lipides membranaires et notamment pour estimer les constantes d'association tannins-lipides. Ce travail a été fait en collaboration avec Isabel Alves de l'équipe de S. Lecomte de CBMN.

III.2.1. Principe

La technique de spectroscopie de résonance plasmonique aux ondes guidées (PWR) est une technique optique utilisée pour étudier les interactions entre des biomolécules et des membranes lipidiques supportées. A partir de cette méthode, on peut notamment étudier les changements de conformation et d'orientation des lipides qui se produisent dans la membrane en présence de tannins et déterminer les constantes d'association tannins-lipides. Lorsqu'un faisceau lumineux incident atteint l'interface entre deux milieux d'indices de réfraction différents (milieu incident/milieu émergent), il subit une réflexion totale interne (TIR) pour des angles d'incidence supérieurs à un angle critique (θ_c), c'est-à-dire que la lumière incidente est totalement réfléchi (absence de rayon lumineux transmis). Le phénomène de réflexion totale interne s'accompagne de la formation d'une onde, appelée onde évanescente, qui se propage le long de l'interface et dont l'amplitude décroît exponentiellement dans la direction perpendiculaire à l'interface (**Fig.18**). La profondeur de pénétration de l'onde évanescente est inférieure à la longueur d'onde de la lumière incidente. Si un film métallique (or, argent) est présent entre le milieu incident et le milieu émergent, l'onde évanescente peut, sous certaines conditions (réflexion totale interne, surface métallique riche en électrons libres, couche métallique ultra-mince) se coupler avec les plasmons de surface qui correspondent à un mode d'oscillation collective des électrons libres à la surface du métal. Il en résulte un phénomène de résonance appelé résonance plasmonique de surface (SPR). L'excitation des plasmons de surface induit un transfert d'énergie entre l'onde incidente et l'onde évanescente qui s'accompagne d'une diminution de l'intensité réfléchi (réflectance). La résonance des plasmons de surface se traduit sur la courbe de réflectance par un pic d'absorption (**Fig.19**). L'approche couramment utilisée pour générer un résonateur SPR, *i.e.* exciter des plasmons de surface, est celle du couplage de la lumière dans un prisme de Kretschmann exploitant la réflexion totale interne (TIR). Le prisme est recouvert d'une couche métallique nanométrique. Le plasmon se propage à l'interface entre cette couche et le milieu diélectrique externe. Cette

configuration présente l'avantage d'être sensible à des changements d'indice de réfraction du milieu extérieur et est exploitée pour étudier les interactions entre un ligand et un récepteur adsorbé à la surface du métal. La technique PWR représente une variante de la technique SPR qui couple la résonance plasmonique de surface avec des ondes électromagnétique qui se propagent dans une couche de diélectrique qui joue le rôle de guide d'onde (Hurby et Tollin, 2007). Le résonateur PWR est composé d'un prisme sur lequel est déposée une couche métallique d'argent (50 nm) recouverte d'une couche diélectrique de silice (460 nm) (**Fig. 19.A**). A la différence du résonateur SPR, le résonateur PWR du fait des propriétés optiques de la couche supplémentaire de silice, permet d'exciter les plasmons de surface non seulement avec la polarisation p de la lumière (champ électrique perpendiculaire à la surface du prisme) mais également avec la polarisation s de la lumière (champ électrique parallèle à la surface du prisme). Ainsi, il est possible de sonder les propriétés optiques (indice de réfraction n , coefficient de d'extinction k) de systèmes anisotropes, telle qu'une membrane lipidique fixée à la couche de silice, lesquels sont sensibles à l'organisation et l'orientation des molécules dans la membrane et à son épaisseur. Par ailleurs, la couche de silice en jouant le rôle d'amplificateur optique permet d'améliorer la sensibilité (augmentation de l'intensité du champ électrique) et la résolution spectrale (diminution de la largeur du pic de résonance) (**Fig.19.B**).

Le montage expérimental PWR que nous avons utilisé est constitué d'un résonateur PWR surmonté d'un bloc de téflon qui constitue la cellule PWR de volume 250 μ L. C'est dans cette cellule qu'est injectée la solution de SUV pour la formation de la membrane supportée et la solution de tannins pour l'étude de l'interaction tannins-lipides. Le système PWR (résonateur + cellule) est monté sur une table tournante qui permet de faire varier l'angle du faisceau incident avec une résolution de 1 mdeg. Le faisceau incident à 51° (par rapport à la normale à la surface du prisme) est généré par un laser à onde continue He-Ne qui émet à la longueur d'onde de 632.8 nm. Un polariseur permet de sélectionner la polarisation p ou s du faisceau incident.

III.2.2. Mise en œuvre expérimentale

L'étude de l'interaction tannins-lipides est menée en PWR est constituée de trois étapes :

- i) Formation de la bicouche supportée dans la cellule PWR
- ii) Introduction de quantités croissantes de tannins dans la cellule PWR

iii) Analyse des courbes de résonance de la bicouche supportée en absence et en présence des tannins.

Pour former la bicouche, on procède comme suit : 250 μL d'une dispersion de SUV à 5mg/mL sont introduits dans la cellule PWR à l'aide d'une seringue de 1 mL (Terumo, Louvain, Belgique). La bicouche lipidique se forme par éclatement des SUV à la surface de la silice induit par des interactions hydrophiles entre la surface polaire de la silice et les têtes polaires des lipides. Lorsque la membrane supportée est formée, les SUV en excès sont éliminés par un rinçage délicat à l'eau ultrapure.

L'étude de l'interaction de la bicouche avec des tannins est réalisée par ajouts successifs dans la cellule PWR de 25 μL d'une solution de tannins dans l'eau ultrapure de concentration c_i croissante variant de 2 mM à 20 mM par pas de 2 mM pour la catéchine et de 0.05 mM à 1.7 mM par pas de 0.05 mM pour le B₁. La concentration de la catéchine dans la cellule PWR, c_f , est obtenue par le calcul suivant :

$$c_f = \frac{c_i \times 25}{250} = 0.1c_i \quad (39)$$

III.2.3. Exploitation des résultats

Pour confirmer la formation de la bicouche supportée à la surface du prisme, on étudie les variations des minimums de résonance des polarisations p (ΔR_p) et s (ΔR_s) avant ($\text{H}_2\text{O}m\text{Q}$) et après injection de la solution des SUV dans le compartiment PWR. Un décalage du minimum de résonance supérieur ou égal à 70 milli degré pour les polarisations p et s indique qu'une membrane compacte s'est formée à la surface du prisme (Szunerits et Boukerroub, 2015). De plus, les variations des valeurs du TIR sont suivies durant l'étape de rinçage de la cellule PWR. Un retour du TIR à sa valeur initiale (valeur en présence de $\text{H}_2\text{O}m\text{Q}$) indique que toutes les molécules de lipides en excès sont éliminées. Les injections des solutions de tannins peuvent alors être initiées.

Afin de déterminer les constantes d'association tannins-lipides, les courbe des variations des minimums de résonance des polarisations p et s entre la bicouche avec tannins et la bicouche préformée sans tannin ont ensuite été tracées en fonction de la concentration en catéchine ou en B₁ dans la cellule PWR, puis ajustées par une équation mathématique sur le logiciel GraphPad Prism (version 6.0). Deux types d'équation mathématique ont été utilisées selon la

composition de la bicouche supportée. L'équation de Hill (équation 40) a été utilisée pour la bicouche de POPC/CH, et l'équation d'interaction spécifique (équation 41) dans le cas de la bicouche de POPC.

$$Y = \frac{B_{max} * X^n}{K_D^n + X^n} \quad (40)$$

$$Y = \frac{B_{max} * X}{K_D + X} \quad (41)$$

III.3. Cryo-microscopie électronique (Cryo-EM)

Au cours de cette thèse, on a eu recours à la technique de cryo-microscopie électronique en transmission pour caractériser les émulsions huile dans eau (1/10) formées à partir de l'huile d'olive et de DMPC. Ce travail était fait en collaboration avec l'équipe d'O. Lambert de CBMN. Les échantillons et les images ont été réalisés par Marion Decossas.

La cryo-microscopie électronique à transmission est une technique basée sur la formation d'une image à partir de l'interaction des électrons avec la matière et de leur détection après avoir traversé l'échantillon. Le principe de fonctionnement est similaire à celui de la microscopie photonique. La différence principale réside dans le fait que les lentilles électromagnétiques au contraire des lentilles optiques concentrent un faisceau d'électrons émis à grande vitesse au lieu de la lumière. La cryo-EM consiste à analyser l'échantillon à très basse température, d'une façon directe sans l'utilisation d'agent de contraste. Pour cela, l'échantillon est congelé dans de l'éthane liquide (-183°C) dans le but d'obtenir une glace vitreuse transparente non cristalline, sachant que la formation de cristaux de glace rend l'échantillon opaque aux électrons et peut endommager la structure des particules étudiées. De plus, la température très basse empêche l'eau de s'évaporer, même sous vide, ce qui permet l'observation de l'échantillon dans un état hydraté quasi-natif (Orlova et Saibil, 2011).

La procédure de congélation est faite à l'aide d'un automate de congélation (EM GP, LEICA) qui possède une chambre dont la température et l'humidité sont contrôlées. D'abord, les émulsions (phase crémée, phase dispersée) sont diluées (facteur dilution = 1/10) dans l'eau milli-Q. Ensuite, 5 µL de la solution d'émulsion sont déposées sur une grille de microscopie

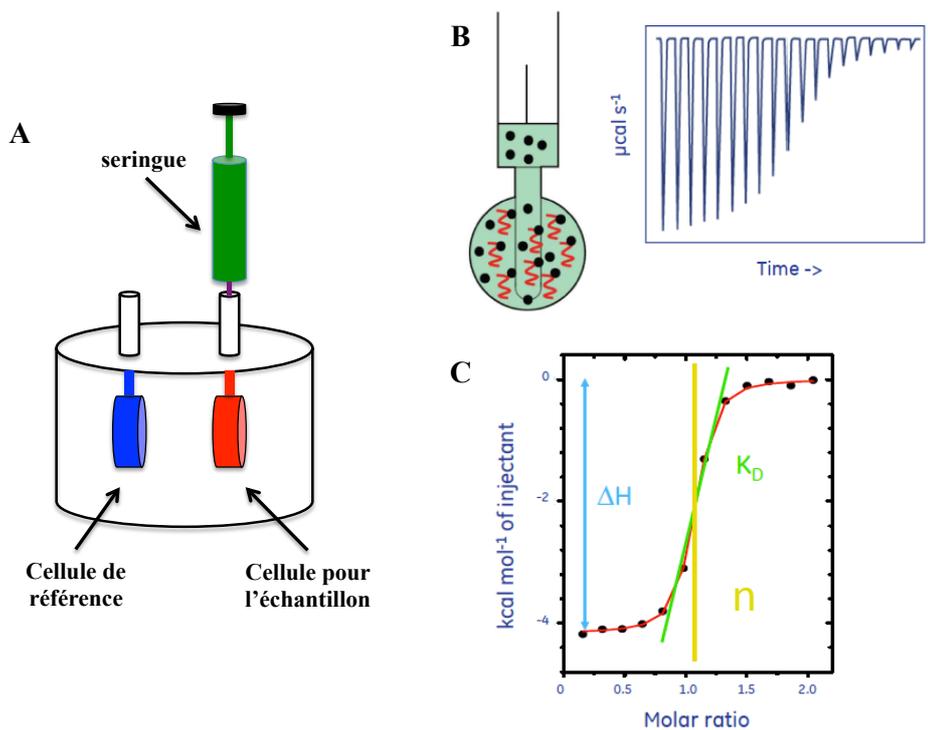


Figure 20. Principe de mesure de la technique d'ITC. Eléments constitutifs du microcalorimètre : seringue contenant le ligand, cellule de référence et cellule échantillon contenant le récepteur (A). Courbe des variations de chaleur résultant de l'interaction entre un ligand et un récepteur (B). Courbe de titration dont l'ajustement par un modèle de liaison adéquat permet de déterminer les constantes de dissociation (K_D), la stœchiométrie (n) et l'enthalpie du système (ΔH) (C).

en cuivre recouverte d'un film de carbone à 300 trous (Lacey/Formvar/Carbon 300Mesh copper grids) maintenue dans la chambre de l'automate. Cette grille a subi au préalable un traitement de surface par un système d'effluage (Glow discharge system, ELMO, Cordouan) (3 mA/40 s/0.3 mBar) qui permet de rendre sa surface plus hydrophile pour une absorption optimale de l'échantillon. L'échantillon sur grille est incubé pendant 10 secondes en chambre humide (70% humidité et 15°C), puis congelé dans de l'éthane liquide (à -183°C) après absorption de l'excès de solution avec du papier Whatman. Cela permet la formation d'une couche mince de glace vitreuse non cristalline. La grille est ensuite conservée dans l'azote liquide (-196°C) jusqu'à observation. Les échantillons ont été observés au microscope électronique à transmission TecnaïF20 G2 (FEI) à 200 kV. L'acquisition des images a été réalisée à l'aide d'une caméra USC1000 2k × 2k (GATAN).

III.4. Calorimétrie de titration isotherme (ITC)

La titration calorimétrique isotherme est une technique utilisée pour étudier les interactions entre les biomolécules. Elle repose sur la mesure des variations de la chaleur libérée ou absorbée durant les interactions moléculaires. Le système ITC est constitué de deux cellules identiques placées dans une enceinte adiabatique. La première est utilisée comme cellule de référence et la deuxième comme cellule échantillon. Les deux cellules sont reliées par un thermopile qui permet de détecter une différence de température entre elles et d'estimer la puissance nécessaire (chaleur) pour maintenir une température identique entre les deux cellules. Le dispositif est également constitué d'une seringue qui permet d'injecter des volumes très précis d'une solution titrante (ligand) dans la cellule échantillon qui contient la solution titrée (récepteur) (**Fig.20.A**).

Durant une expérience ITC, la cellule de référence est remplie par de l'eau ou la solution tampon qui a servi à préparer la solution contenue dans la cellule échantillon. Après équilibration du système en température, des injections successives des molécules présentes dans la seringue sont effectuées dans la cellule échantillon sous agitation. Si le ligand se lie au récepteur, il se produit un échange thermique qui résulte des interactions moléculaires ligand-récepteur dans la cellule échantillon. L'énergie échangée lors de ces interactions est calculée indirectement par la mesure de la puissance apportée à la cellule échantillon pour maintenir sa température à une température identique à celle de la cellule de référence. Si l'interaction est exothermique, la puissance apportée au système diminue, ce qui se traduit par un signal

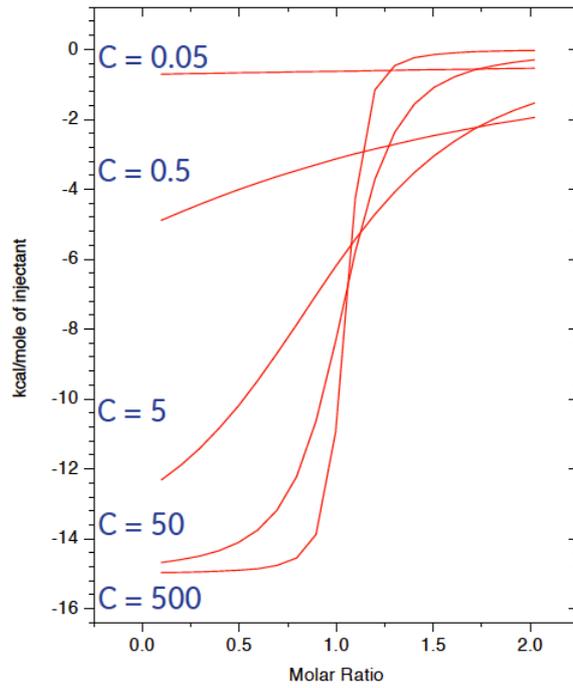


Figure 21 : Représentation de l'allure de la courbe de chaleur en fonction de la valeur du paramètre c .

négalif sur le calorigramme (**Fig.20.B**). A l'inverse, si l'interaction est endothermique, la puissance augmente et le signal est positif. Grâce à un traitement informatique intégré au logiciel de contrôle du microcalorimètre, les pics de chaleur sont intégrés et convertis en une courbe de variation de l'enthalpie en fonction du rapport molaire ligand/récepteur. L'ajustement de la courbe obtenue par un modèle de liaison adéquat permettra une détermination précise de la constante thermodynamique de dissociation (K_D), la stœchiométrie (n), l'enthalpie (ΔH) et l'entropie (ΔS) de la réaction (**Fig.20.C**) (Freyer et Lewis, 2008).

Avant de commencer une expérience ITC, une étape d'optimisation des paramètres expérimentaux est nécessaire de sorte que le changement de chaleur soit mesurable et varie pour chaque injection successive afin de produire un calorigramme exploitable (courbe sigmoïdale). Certains de ces paramètres sont reliés à l'appareillage tels que le nombre d'injection, le volume d'injection, le temps d'injection et la propreté de la seringue et de la cellule de mesure. Il faut que le nombre d'injections soit suffisant pour que l'on arrive à saturation du système (récepteur) à la fin de la titration (obtention d'un plateau sur le calorigramme). Le temps d'injection doit être suffisant long pour permettre au signal de revenir à la ligne de base après chaque injection pour avoir des pics de variation de chaleur bien résolus. Le volume d'injection doit être relativement faible pour ne pas saturer le système après les premières injections. Les éléments du microcalorimètre doivent être propres car la présence de contaminant peut altérer les échanges de chaleur aboutissant à des signaux positifs et négatifs sur le calorigramme. D'autres paramètres sont liés à l'échantillonnage tels que le solvant, la présence de bulle de gaz et les concentrations respectives entre ligand et récepteur. Il faut que les solutions de ligand et de récepteur soient préparées avec le même solvant (concentrations en sels, pH) au risque de générer des variations de chaleur dues à la différence de composition des deux solutions, qui ont un effet de dilution sur les chaleurs d'interaction ligand/récepteur. Le choix des concentrations du ligand et du récepteur est primordial dans une expérience ITC. La concentration du récepteur peut être estimée en se référant au paramètre c suivant :

$$c = \frac{n \times [\text{Macromolécule}]}{K_D} \quad (42)$$

Pour obtenir des courbes de titration exploitables, il faut que c soit compris entre 10 et 500 (**Fig.21**). Cela nécessite néanmoins d'avoir une idée de la stœchiométrie (n) et de l'ordre de

grandeur du K_D . D'autre part, un rapport de 1/10 entre la concentration du récepteur et la concentration du ligand est classiquement utilisé pour s'assurer qu'à la fin de l'expérience le récepteur soit saturé par le ligand.

Dans notre cas, l'ITC a été utilisée pour étudier les interactions entre des LUV de POPC et le B_1 . Plusieurs essais ont été nécessaires pour optimiser les concentrations en lipide et en tannin selon les considérations ci-dessus. Le protocole expérimental qui a nous permis d'obtenir les meilleurs résultats en ITC est le suivant : 40 μ L de LUV (taille moyenne de 100 nm selon la mesure de DLS) à 1 mM dans du tampon phosphate (20 mM + NaCl 150 mM, pH 7.4) sont déposés dans la seringue, et 230 μ L de B_1 à 50 μ M dans la cellule prévue pour l'échantillon. Les solutions tampon, de lipides et de tannins sont préalablement dégazées pour éviter la présence de bulles d'air. Les titrations ont été effectuées sur une machine Micro Cal ITC 200, à une température de 25 °C sous agitation à 300 rpm. 2.6 μ L de LUV sont injectés toutes les deux minutes dans la cellule contenant les tannins, avec un nombre total de 15 injections. L'analyse des données a été effectuée en utilisant le logiciel Origin 7 MicroCal (7.0) en appliquant le modèle mathématique one set of site propre au logiciel. Ce travail a été réalisé en collaboration avec Anne Bourdoncle de l'équipe J.L. Mergny à l'IECB.

III.5. Granulométrie laser

La taille des gouttelettes lipidiques des émulsions formulées dans cette thèse a été déterminée en utilisant la technique de granulométrie. Il s'agit d'une technique optique qui permet de déterminer la distribution de tailles de particules en mesurant la variation angulaire de l'intensité de lumière diffusée lorsqu'un faisceau laser traverse un échantillon de particules dispersées. Les grosses particules diffusent la lumière aux petits angles, tandis que les petites particules diffusent de faibles intensités aux grands angles. Les intensités diffusées sont ensuite analysées pour calculer la taille des particules en utilisant la théorie de diffusion de Mie¹. La taille des particules représente le diamètre de la sphère équivalente ayant le même volume que la particule.

Nous avons utilisé un granulomètre Mastersizer 2000 (Malvern) équipé d'une cellule de mesure externe et d'une unité de dispersion en voie liquide munie d'un agitateur et d'une pompe qui permet de disperser et d'envoyer l'échantillon dans la cellule de mesure. Avant de

¹ Cas de particules de forme sphérique dont le rayon est de l'ordre de grandeur de la longueur d'onde de la lumière incidente.

commencer la mesure, l'émulsion a été homogénéisée par une simple agitation manuelle. Ensuite, quelques gouttes d'émulsion ont été introduites dans l'unité de dispersion contenant de l'eau distillée sous agitation (1800 tr/min). Trois mesures consécutives de taille ont été effectuées. Les résultats obtenus représentent la moyenne de la distribution volumique (%) de la taille des gouttelettes.

III.6. Dynamique moléculaire

La localisation de la catéchine dans la bicouche de POPC/CH 70/30 a été étudiée par une approche de dynamique moléculaire. Ce travail a été fait en collaboration avec l'équipe d'I. Bestel de CBMN. Il a été réalisé par Dr. Nada Taib-Maamar.

La dynamique moléculaire est une méthode de modélisation qui permet de donner une description temporelle d'un système de particules (atome ou groupe d'atomes). Elle est basée sur la mécanique Newtonienne, où les particules sont considérées comme des sphères impénétrables et les liaisons covalentes comme des ressorts. Elles sont caractérisées par leur rayon, leur masse et leur charge partielle. Les coordonnées de chaque particule évoluent en fonction du temps sur la base des équations de mouvement et des forces. En conséquence, l'objectif de la dynamique moléculaire est de résoudre l'équation du mouvement de Newton pour un nombre N de particules, où les forces sont dépendantes des interactions liantes et non-liantes présentes dans le système. Dans cette partie, nous décrirons les différentes techniques et conditions de simulation par dynamique moléculaire qui ont été utilisées. Cette étude a été réalisée en utilisant principalement l'approche gros-grain. Il s'agit d'une méthode qui permet de réduire le nombre de particules du système moléculaire dans laquelle des groupes d'atomes sont représentés par des grains ou sphères et ainsi de limiter les temps de simulation dans le cas de gros systèmes (cas des membranes lipidiques). Avant de commencer la dynamique, il a été nécessaire d'effectuer une simulation tout-atome de la catéchine dans le but de la paramétrer dans les champs de force utilisés pour la dynamique et de valider son modèle gros-grain qui n'existait pas. Les différentes étapes de paramétrisation de la catéchine ainsi que les conditions de simulation sont décrites ci-dessous.

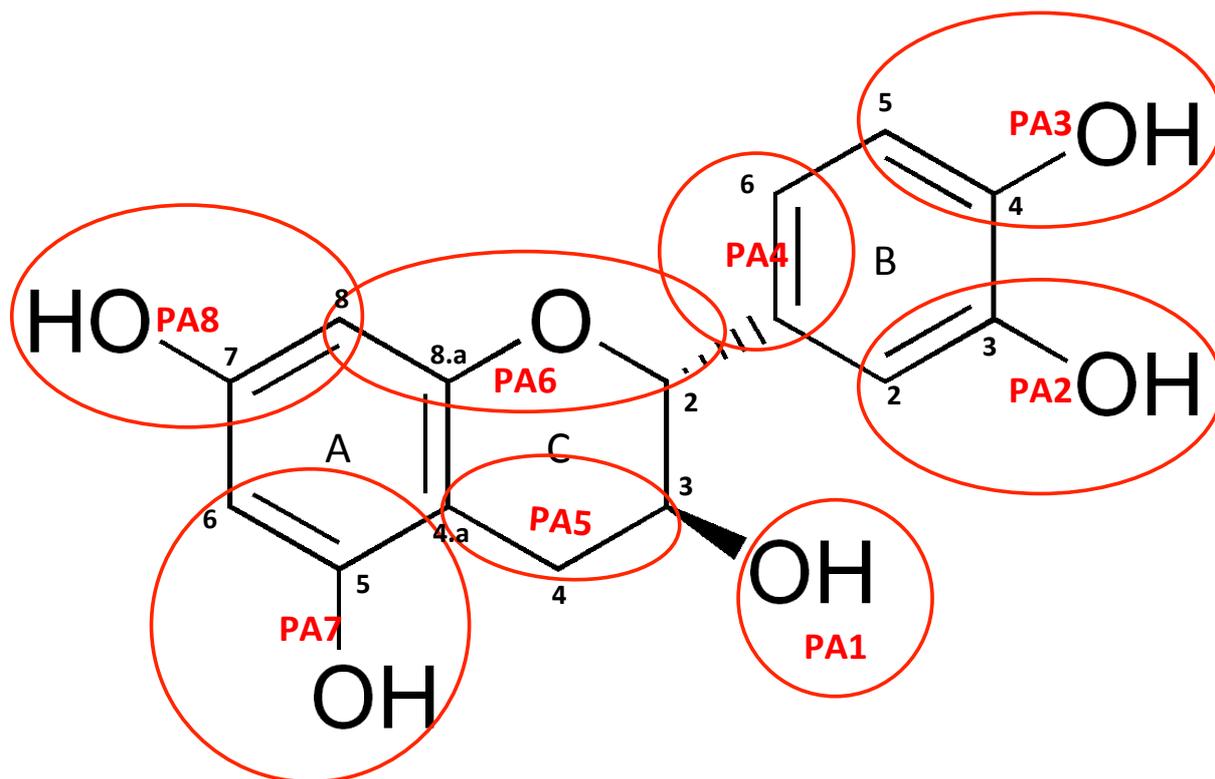


Figure 22 : Représentation de la topologie gros-grain de la catéchine.

Paramétrisation de la catéchine

La topologie tout-atome de la catéchine a été réalisée en utilisant un serveur en ligne appelé Automated Topology Builder (ATB, version 2.0). Un premier modèle de structure a été généré à partir d'un ensemble de calculs quantiques semi-empiriques en utilisant le champ de force GROMOS54a7 (Shmid *et al.*, 2011) dans le but de déterminer les charges partielles, les paramètres de liaisons et d'angles, les motifs aromatiques et les groupements polaires ou chiraux de la catéchine. Après avoir obtenu le modèle tout-atome, la topologie gros-grain de la catéchine a été créée en utilisant le champ de force MARTINI sur la base décrite par Periole et Marrink (2013). La première étape consiste à réaliser le découpage du modèle tout-atome en grains contenant environ quatre atomes chacun ou deux s'il s'agit d'une particule de cycle.

Plusieurs divisions ont été envisagées. Celle qui a été retenue pour notre étude est présentée **figure 22**. La partie chromane (cycles A et C) de la catéchine est représentée par 5 grains : PA1 pour représenter le groupement hydroxyle en position 3 ; PA5 pour représenter les carbones 3, 4, et 4a ; PA6 pour représenter l'oxygène, les carbones 2 et 8a ; PA7 pour représenter les carbones 5 et 6 ; PA8 pour représenter l'hydroxyle en position 7, les carbones 7 et 8. Quant à la partie dihydroxyphenyle (cycle B), elle est représentée par 3 grains : PA2 qui représente l'hydroxyle en position 3, les carbones 2 et 3 ; PA3 qui représente l'hydroxyle en position 4, les carbones 4 et 5 ; PA4 qui représente les carbones 1 et 6.

Après le découpage, une carte de correspondance atomes/grains est obtenue, puis elle est soumise à un script qui permet de générer une première topologie gros-grain. Ensuite, un processus itératif est lancé. Il permet d'effectuer pour chaque nouvelle itération une cascade dynamique gros-grain comportant une minimisation de l'énergie potentielle, une équilibration dans l'ensemble NPT (nombre de moles, pression, température constantes) de 500 ps et une production de 2 ns. Lors de la première itération, une boîte de simulation est créée, solvatée et neutralisée avec les contres-ions nécessaires. Les distributions gros-grain réelles sont extraites de la trajectoire pour l'ensemble des interactions liantes. Elles sont ensuite comparées à celles obtenues avec la simulation tout-atome. Une fois les distributions validées, le script génère un fichier coordonné et un fichier topologie gros-grain définitif de la catéchine qui seront utilisés pour le reste des simulations.

Conditions de simulation

Des simulations par dynamique moléculaire gros-grain de 5 μs ont été réalisées pour étudier l'insertion de catéchines dans une bicouche de POPC seul ou de POPC/Cholestérol 70/30 en utilisant le champ de force MARTINI et le logiciel GROMACS V.5.1.4. Dans un premier temps, une bicouche de 100% POPC (479 molécules) ou de 70 % de POPC (335 molécules) et 30% de cholestérol (142 molécules) en gros-grain ont été construites dans une boîte de simulation de dimension $15.3 \times 9.5 \times 19.5$ nm en utilisant l'outil INSANE. Puis, elles ont été hydratées respectivement par 18146 ou 18157 particules d'eau et équilibrées à pression et température constantes (1 bar, 330 K). Les systèmes lipidiques ont enfin été soumis à une série de minimisation avant de commencer les simulations par dynamique moléculaire. Dans un deuxième temps, 50 catéchines ont été dispersées dans l'eau de chaque côté de la bicouche (100 au total dans la boîte). La fréquence d'enregistrement des trajectoires est de 50 ps.

IV. Analyse sensorielle

IV.1. Mise en œuvre

IV.1.1. Matériel

L'acide citrique et la caféine ont été achetés chez Cooper (Melun, France) et le sulfate de potassium aluminium dodécahydraté ($\text{AlK}(\text{SO}_4)_2, 12\text{H}_2\text{O}$) chez VWR (Fontenay-sous-Bois, France). Les arômes utilisés pour les tests olfactives du vin proviennent de chez Jean Lenoir (Carnoux-en-Provence, France), les tannins d'acacia et de pépins de raisin ont été fournis par la Société Laffort (Bordeaux, France) et les huiles de colza, d'olive et de pépins de raisin sont de la marque Lesieur. De l'eau naturelle (Cristaline) a été utilisée pour la solubilisation, la dilution et le lavage de la bouche. Des biscottes sans sel ajouté de la marque Heudebert ont été utilisées pour éliminer l'huile restante dans la bouche après son ingestion.

IV.1.2. Préparation des échantillons

Les solutions utilisées pour évaluer l'acidité, l'amertume et l'astringence ont été préparées par dilution à partir de solutions stock d'acide citrique, de caféine et de sulfate de potassium et d'aluminium aux concentrations respectives de 1.2, 0.54, 1.6 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Les solutions de tannins

d'acacia et de pépins de raisins ont été préparées par hydratation des poudres de tannins aux concentrations de 0.15 et 1.16 g·L⁻¹.

IV.1.3. Protocole de dégustation

Les tests de dégustations ont été effectués par des étudiants âgés entre 18 et 22 ans du département Génie Biologique de l'Institut Universitaire de Technologie de Bordeaux à Périgueux. Les dégustateurs ont assisté à des séances de formation et d'évaluation sur une durée de 2 semaines. Ces séances avaient pour but de former les étudiants à classer des solutions selon leurs concentrations, à reconnaître les arômes du vin et à se familiariser avec les descripteurs gustatifs liées aux huiles (intensité globale du goût, acidité, fruité, herbacé, fruits secs, amertume, astringence, persistance du goût) et aux tannins (intensité globale du goût, acidité, fruité, amertume, astringence, persistance du goût). Des solutions d'acide citrique pour l'acidité (0.13, 0.25, 0.38, 0.48, 0.60, et 1.2 g/L), de caféine pour l'amertume (0.06, 0.11, 0.17, 0.22, 0.27, et 0.54 g/L), et de sulfate de potassium et d'aluminium pour l'astringence (0.20, 0.35, 0.50, 0.65, 0.80, et 1.6 g/L) ont été présentées aux étudiants qui devaient les classer par ordre de concentration croissante. Des séries de cinq arômes différents de vin choisis aléatoirement parmi 24 (abricot, fraise, poire, pêche, ananas, citron, melon, orange, cassis, framboise, mûre, cassis, pamplemousse, coings, myrtilles, pommes, amandes amères, litchi, noisette, noix, vanille, miel, réglisse, noisette rôtie) ont été préparées. Chaque étudiant devait inhaler les flacons d'une seule série puis identifier les cinq arômes à l'aveugle c'est-à-dire sans connaître la liste des 24 arômes.

La première séance d'évaluation a été consacrée à l'analyse sensorielle des huiles et la deuxième à l'analyse sensorielle des solutions de tannins. Durant la première séance, les 3 huiles ont été dégustées successivement et lors de la deuxième séance, les solutions de tannins ont été dégustées seules et après l'ingestion d'une cuillère à soupe d'huile. Les panelistes devaient évaluer l'intensité gustative des huiles et des solutions de tannins pour chaque descripteur sur une échelle de 10 points : 0 = nul, 1-2 = faible, 3-4 = plutôt faible, 5-6 = modéré, 7-8 = plutôt fort, 9-10 = fort. Entre deux échantillons, la bouche était rincée successivement par de l'eau pour diluer le goût, de la biscotte pour absorber les particules de gras et de nouveau de l'eau pour éliminer les morceaux de biscotte restants.

Les tests de dégustations ont été effectués dans une salle dédiée à la dégustation équipée de cabines individuelle à la température ambiante 20°C. Tous les participants ont suivi la même procédure de test à la fois pour les sessions de formation et d'évaluation. Chaque session a duré au maximum 30 minutes. Le nombre de dégustateurs variait de 33 à 78 selon la session. L'évaluation des solutions de tannins goûtées seules et après ingestion d'huile a été effectuée par le même groupe de dégustateurs. Chaque échantillon a été évalué une fois par chaque paneliste.

16 dégustations au total ont été réalisées : les 4 solutions de tannins goûtées seules et après ingestion des 3 huiles. Elles représentent les 16 expériences nommées par la suite tannin-huile.

IV.2. Analyse statistique

IV.2.1. Test de Student

Pour observer les différences significatives entre les huiles et les solutions de tannins, le test de Student a été appliqué par paires pour chaque descripteur afin de définir les différences significatives entre les notes moyennes en utilisant la fonction "t-test" du logiciel de calcul statistique R (version 3.1.2). Le seuil d'acceptation statistique a été fixé à 5%, ce qui signifie que deux échantillons ne sont pas significativement différents si la probabilité (notée p ou p -value en anglais) est supérieure ou égale à 0.05. Si $0.01 \leq p < 0.05$, il y a une différence significative avec une probabilité de 95% notée avec le symbole *. Si $0.001 \leq p < 0.01$, il y a une différence significative avec une probabilité de 99% notée avec le symbole **. Si $p < 0.001$, il y a une différence significative avec une probabilité de 99.9% notée avec le symbole ***.

IV.2.2. Analyse en composantes principales

L'analyse en composantes principales (ACP) a été mise en place dans le but d'évaluer l'impact de l'huile sur le goût des solutions de tannins. L'ACP a été appliquée aux résultats obtenus par l'analyse sensorielle pour les n échantillons composés par les n expériences tannins-huiles décrit ci-dessus ($n = 16$) avec les k descripteurs des solutions de tannins ($k = 6$). Le principe de l'ACP est décrit ci-dessous.

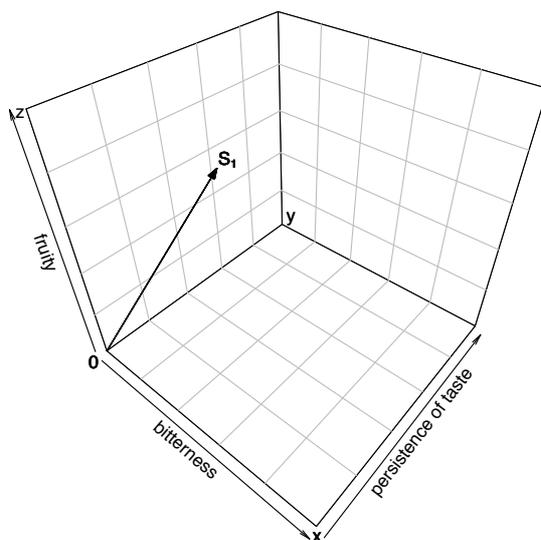


Figure 23. Représentation dans l'espace du vecteur d'une expérience tannin-huile S1 pour trois descripteurs x, y et z correspondant par exemple à l'amertume, à la persistance du goût et au fruité respectivement.

Les données d'entrée pour l'ACP sont répertoriées dans une matrice M de dimension $n \times k$, où les lignes sont représentées par les n expériences et les colonnes par les k descripteurs des solutions de tannins. Les coefficients de la matrice M sont constitués par les notes moyennes données par chaque individu aux expériences tannins-huiles (solutions de tannins goûtées seules et après ingestion des 3 huiles) pour chaque descripteur. Ainsi, la différence de jugement entre chaque individu est limitée. Les coefficients de matrice sont notés $x_{i,j}$ où i et j correspondent à une expérience et un descripteur respectivement. Si les colonnes de la matrice représentent les coordonnées d'un vecteur dans l'espace orthonormé \mathbb{R}^k , chaque expérience de tannin-huile peut être décrite graphiquement par son vecteur associé dans l'espace \mathbb{R}^k (**Fig.23**). Cette représentation dans l'espace pour une dimension k implique que les résultats obtenus pour une expérience tannin-huile sont indépendants, ce qui n'est pas nécessairement vrai. En effet, une perception sensorielle d'un goût pourrait être influencée par un autre goût.

Cependant, cette représentation ne devrait pas affecter les résultats de l'ACP puisque l'ACP doit révéler une tendance à la corrélation des descripteurs dépendants.

Le nuage des k vecteurs associés à la matrice M contribue à expliquer les résultats des expériences dans un espace de dimension k , qui ne peut pas être représenté graphiquement dans le plan pour $k > 3$. L'objectif de l'ACP est de produire une représentation bidimensionnelle qui conserve la meilleure dispersion du nuage de dimension k , la dispersion représentant l'éloignement plus ou moins grand des points les uns par rapport aux autres. La méthode de l'ACP consiste à projeter les vecteurs de \mathbb{R}^k sur le plan le plus approprié tel que la dispersion du nuage projeté soit aussi proche que possible de celle du nuage initial.

D'un point de vue mathématique, la dispersion du nuage est évaluée par l'inertie du nuage, I_g , définie par la somme des carrés des distances entre les points du nuage et son centre de gravité :

$$I_g = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^{16} (x_i - \bar{x}_i)^2 \quad (43)$$

Ainsi, l'inertie du nuage I_g correspond à la somme des variances dans chaque dimension de l'espace \mathbb{R}^k et est égale à la trace (somme des termes diagonaux) de la matrice de covariance $k \times k$ du nuage d'expériences représenté par la matrice M :

$$I_g = tr(Cov(M)) \quad (44)$$

Lorsque le nuage est projeté sur le plan de \mathbb{R}^k , le nuage projeté est compacté par rapport au nuage initial puisque certaines dimensions sont supprimées. Par conséquent, l'inertie du nuage projeté est nécessairement inférieure à l'inertie initiale du nuage, I_g . Le plan résultant de l'ACP pour lequel le nuage projeté présente l'inertie la plus proche de I_g correspond au plan de projection porté par les deux vecteurs propres associés aux deux valeurs propres les plus importantes de la matrice de covariance du nuage d'expériences.

Chapitre II

Interaction entre les tannins du vin et les membranes buccales

La cavité buccale, segment initial du tube digestif qui permet d'ingérer les aliments, est le premier organe qui entre en contact avec le vin durant sa dégustation. En plus de ces fonctions digestives (mastication, dégradation enzymatique des aliments), elle participe aux fonctions gustatives *via* les récepteurs du goût situés dans les papilles linguales. Ces récepteurs sont des protéines membranaires qui appartiennent à la famille des GPCR, enchâssés dans les matrices lipidiques des muqueuses qui tapissent la cavité buccale (Chaudhari et Roper, 2010). Il existe trois types différents de muqueuses buccales (Harris et Robinson, 1992) avec une composition lipidique hétérogène qui varie en fonction de la muqueuse considérée (Wertz *et al.*, 1985, Squier *et al.*, 1991, Thomson *et al.*, 2001). Les phospholipides zwitterioniques et le cholestérol représentent les lipides majoritairement présents dans ces muqueuses. Lors de l'ingestion d'un verre de vin, les tannins vont avoir plusieurs cibles dans la bouche : les protéines salivaires, les récepteurs du goût et les lipides des membranes des cellules épithéliales des muqueuses buccales. Il est actuellement admis que les interactions entre les tannins et les protéines salivaires participent à l'astringence d'un vin (Cala *et al.*, 2010) et que les interactions avec les récepteurs du goût sont responsables de la sensation d'amertume (Chandrashekar *et al.*, 2006). Concernant les interactions tannins-lipides, des études récentes ont montré que des monomères constitutifs des tannins du vin interagissent avec des membranes modèles de DMPC et augmentent leur fluidité (Furlan *et al.*, 2014, 2015). Ces résultats nous laissent penser que les lipides de la cavité buccale pourraient également jouer un rôle dans les perceptions sensorielles d'un vin. Ce rôle pourrait s'expliquer par les hypothèses qui considèrent qu'une interaction tannins-lipides membranaires et l'effet fluidifiant qui en découle pourrait induire une perturbation de l'environnement lipidique des récepteurs du goût amer conduisant à une modification des interactions tannins-récepteurs qui affecterait la sensation d'amertume. Ou une compétition entre les interactions tannins-lipides et tannins-protéines salivaires dans la bouche pourrait moduler l'astringence. Ainsi les lipides de la cavité buccale peuvent être considérés comme des nouveaux acteurs moléculaires dans le goût du vin.

L'objectif de ce chapitre est d'étudier à l'échelle moléculaire les interactions entre les tannins condensés du vin et les lipides endogènes des membranes buccales en montrant notamment l'effet de ces interactions sur l'organisation et la dynamique de ces membranes. Cette étude a été menée avec un modèle de membranes buccales en interaction avec des résidus de tannins condensés du vin. Les membranes buccales ont été modélisées par des vésicules multilamellaires (MLV) composées de POPC et de cholestérol dans un rapport molaire 70/30

qui miment la composition en lipides et en acide gras de la cavité buccale. Pour les tannins, nous avons choisi de travailler avec deux flavan-3-ols majoritairement présents dans le vin rouge, le monomère la catéchine et le dimère B₁ (Monagas *et al.*, 2003, Silva *et al.*, 2012).

Dans la première partie de ce chapitre, nous allons étudier par la RMN des solides du noyau deutérium (²H) l'effet des tannins sur l'organisation et la dynamique des membranes de POPC/Cholestérol (70/30) en milieu aqueux et en milieu hydro-alcoolique contenant 12% d'éthanol dans le but de se rapprocher des conditions de dégustation. Dans la deuxième partie, nous allons explorer la localisation des tannins dans les membranes lipidiques en milieu aqueux par des études HRMAS-RMN 1D et 2D des noyaux ¹H et ¹³C. La localisation des tannins dans les membranes sera également explorée par une approche de dynamique moléculaire avec une membrane de POPC/CH (70/30) en interaction avec la catéchine. Pour terminer, nous discuterons des résultats obtenus et verront de quelle manière les interactions entre les tannins et les lipides des membranes buccales peuvent avoir une influence sur le goût du vin.

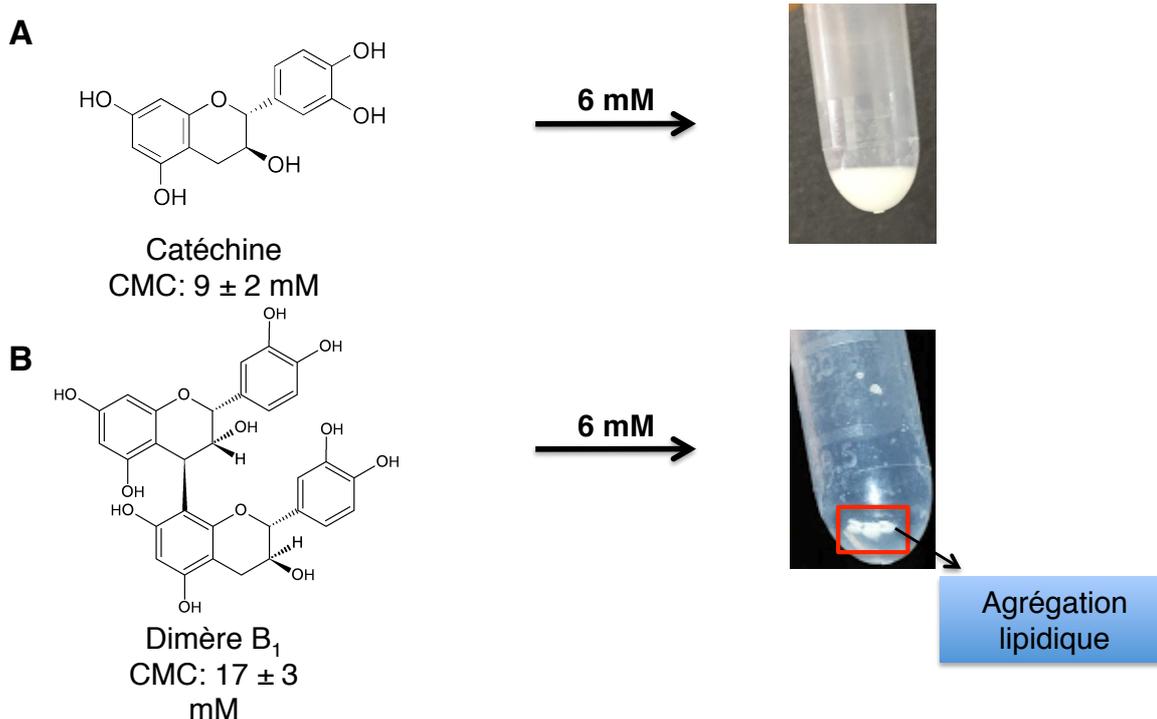


Figure 1 : Dispersion de vésicules multilamellaires d'aspect laiteux en présence de 6 mM de catéchine (A). Agrégats lipidiques suite à l'ajout de 6 mM du dimère B₁ (B). [Lipide] = 60 mM (POPC/Cholestérol 70/30), T/L = 1/10, CMC : Concentration micellaire critique selon Pianet *et al.*, 2008.

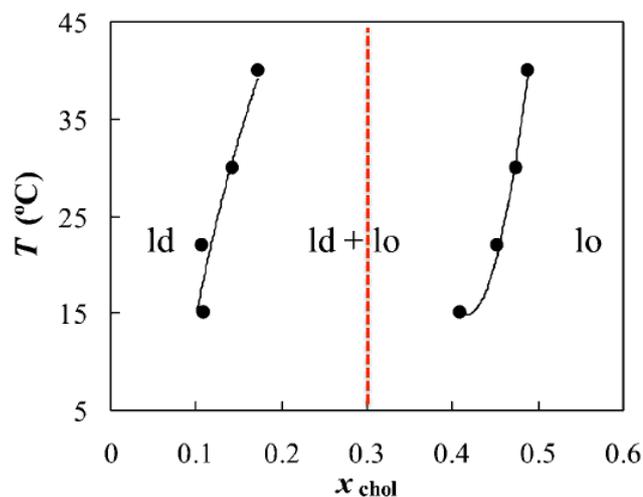


Figure 2 : Diagramme de phase partiel du système POPC/Cholestérol selon Almeida *et al.*, 2003. ld = phase liquide désordonnée, lo = phase liquide ordonnée.

I. Effet des tannins sur l'organisation et la dynamique des membranes

En utilisant un phospholipide deutéré sur sa chaîne acyle, il est possible grâce à la RMN du deutérium de sonder l'effet des tannins sur l'ordre et la dynamique des lipides membranaires. Pour cela du POPC d_{31} deutéré sur sa chaîne palmitique sn-1 a été utilisé. Le système POPC/Cholestérol 70/30 a été étudié en présence de la catéchine et du dimère B₁ à un rapport molaire tannins/lipides de 1/10. Sachant que la concentration en lipides est de 60 mM, la concentration en tannins de 6 mM reste au-dessous de la concentration micellaire critique des tannins comme dans le vin rouge (Pianet *et al.*, 2008, Quideau *et al.*, 2011). A cette concentration (6 mM), la dispersion de MLV obtenue en mélangeant les tannins avec les lipides a un aspect laiteux avec la catéchine. Par contre, on obtient un phénomène de précipitation avec le dimère B₁ (**Fig.1**). Ce résultat indique une forte interaction entre le B₁ et les membranes lipidiques causant leur agrégation. La concentration du B₁ a été diminuée à 2 mM, de telle manière à obtenir une solution laiteuse sans particules solides comme celle obtenue avec la catéchine. Ainsi, le rapport molaire tannins/lipides en présence du B₁ est de 1/30 et en présence de la catéchine de 1/10.

I.1. Effet des tannins en milieu aqueux

Nous avons étudié l'effet des tannins sur les vésicules multilamellaires de POPC/Cholestérol en fonction de la température dans une gamme entre 0 et 50°C. Cette série de température est supérieure à la température de transition de phase gel-fluide du POPC d_{31} estimée à -6°C (Thewalt J. *et al.*, 1992). De plus, en présence de 30% molaire de cholestérol l'ordre des chaînes hydrocarbonées du POPC va augmenter et la transition gel-fluide est abolie (Vist et Davis, 1990), sachant que le cholestérol a un effet rigidifiant sur les membranes lipidiques. Dans ces conditions (30% cholestérol) et selon le diagramme de phase du POPC/Cholestérol (**Fig.2**), le système lipidique adopte une phase mixte caractérisée par la coexistence d'une phase liquide désordonnée et liquide ordonnée L_d + L_o (Mateo *et al.*, 1995, Almeida *et al.*, 2003, Hsueh *et al.*, 2007) pour une température comprise entre 10 et 40°C. Le terme liquide signifie la nature fluide de la phase des lipides, alors que les termes ordonnée-désordonnée font référence à l'ordre conformationnel des chaînes acyles du POPC. Dans la phase liquide ordonnée (L_o), les chaînes acyles des lipides ont des propriétés intermédiaires entre la phase gel L_β et la phase fluide L_α. Elles sont étendues à leur maximum comme dans la phase gel,

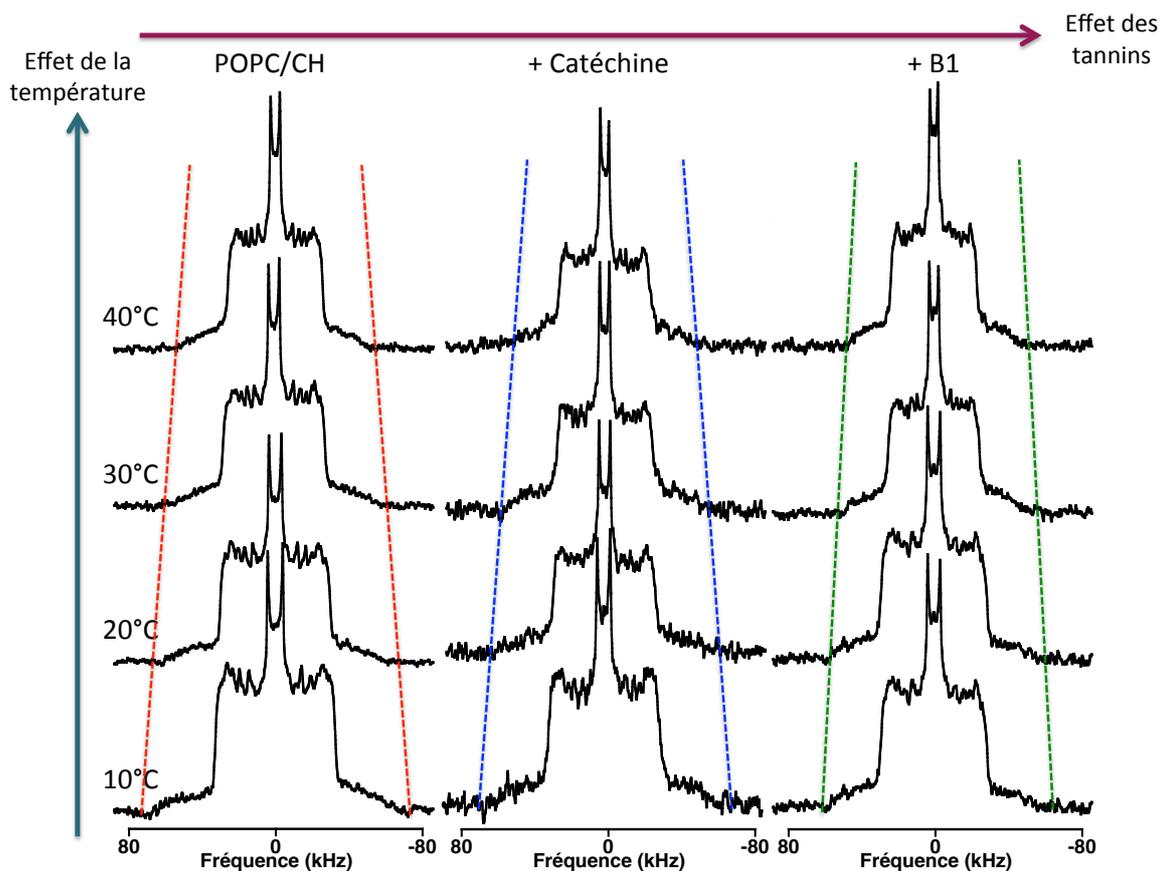


Figure 3 : Spectres RMN du deutérium des vésicules multilamellaires de POPCd₃₁/Cholestérol (70/30) en absence et en présence de tannins à différentes températures. Rapport molaire Catéchine/Lipide 1/10 et B₁/Lipide 1/30. [Lipide] = 60 mM, [Catéchine] = 6 mM, [B₁] = 2 mM. CM = 500 MHz, NA = 8k sc, LB = 300 Hz.

Température (°C)	Largeur des spectres en kHz		
	POPC _{d31} /CH	POPC _{d31} /CH/CAT	POPC _{d31} /CH/B ₁
10	99.6	92.3	81.6
20	87.5	85.7	78.2
30	82.6	80.6	74.5
40	80.2	81.5	69.3

Tableau 1 : Largeur des spectres RMN-²H en kHz des membranes de POPC/Cholestérol en absence et en présence de tannins, déterminées à partir des spectres de la figure 3.

mais elles présentent une mobilité latérale (échanges entre deux lipides voisins) et une rotation axiale (les lipides tournent autour de leur axe) rapide analogue à celle de la phase fluide L_α (L_d) (Vist et Davis, 1990, Almeida *et al.*, 1992, Dufourc, 2008).

La **figure 3** montre les spectres RMN- ^2H des MLV en absence et en présence des tannins à 10, 20, 30 et 40°C. Les spectres présentent une allure caractéristique d'une phase lamellaire fluide. Ils montrent une symétrie axiale avec superposition des différents doublets de Pake relatifs aux liaisons C-D le long de la chaîne acyle du POPC. Le doublet le plus intense correspond aux groupements méthyles terminaux les plus mobiles au bout de la chaîne acyle. On remarque que pour chacun des trois systèmes, les spectres deviennent plus étroits avec l'augmentation de la température. Cet effet est dû à l'augmentation de la dynamique des chaînes acyles du lipide donnant lieu à un système de plus en plus fluide. De plus, on remarque que la largeur des spectres à une température donnée en présence des tannins est inférieure à celle du système lipidique seul avec un rétrécissement plus important dans le cas du dimère B_1 comparé à celui de la catéchine (**Tableau 1**).

Pour le confirmer, le thermotropisme des trois systèmes a été étudié avec le calcul du premier moment spectral M_1 . Ce paramètre correspondant à la distribution de l'intensité en fonction de la fréquence rend compte de la forme d'un spectre RMN- ^2H . Proportionnel à l'éclatement quadripolaire moyen $\langle \Delta\nu_Q \rangle$, le paramètre M_1 est relié à la phase du système lipidique (gel ou fluide), M_1 est un indicateur des changements de mouvements moléculaires et donne des informations globales sur l'ordre et la dynamique du système lipidique en fonction de la température (Davis *et al.*, 1983). Plus la valeur du M_1 est élevée, plus le système est ordonné (système rigide). Par contre, des faibles valeurs de M_1 sont caractéristiques d'un système désordonné (système fluide). Le paramètre d'ordre globale $2^* \langle S_{CD} \rangle_{\text{Chain}}$ est présenté sur un double axe y afin de traduire les M_1 en termes de fluidité ou de rigidité. Les valeurs de M_1 obtenues à partir des spectres RMN- H^2 en fonction de la température sont représentées sur la **figure 4.A**. On observe une diminution des valeurs de M_1 avec l'augmentation de la température pour les trois systèmes (**Annexe 1**). Les résultats montrent qu'en ajoutant du tannin, il y a conservation du profil du premier moment spectral mais diminution de la valeur des M_1 comparativement au système seul, avec un effet plus important du B_1 qui persiste à haute température. Ces résultats indiquent que les tannins ont un effet fluidifiant sur l'organisation des lipides en membrane et que cet effet est autant plus marqué que le système lipidique est ordonné au départ. En effet, les écarts relatifs des valeurs de M_1 sont plus importants à basse température,

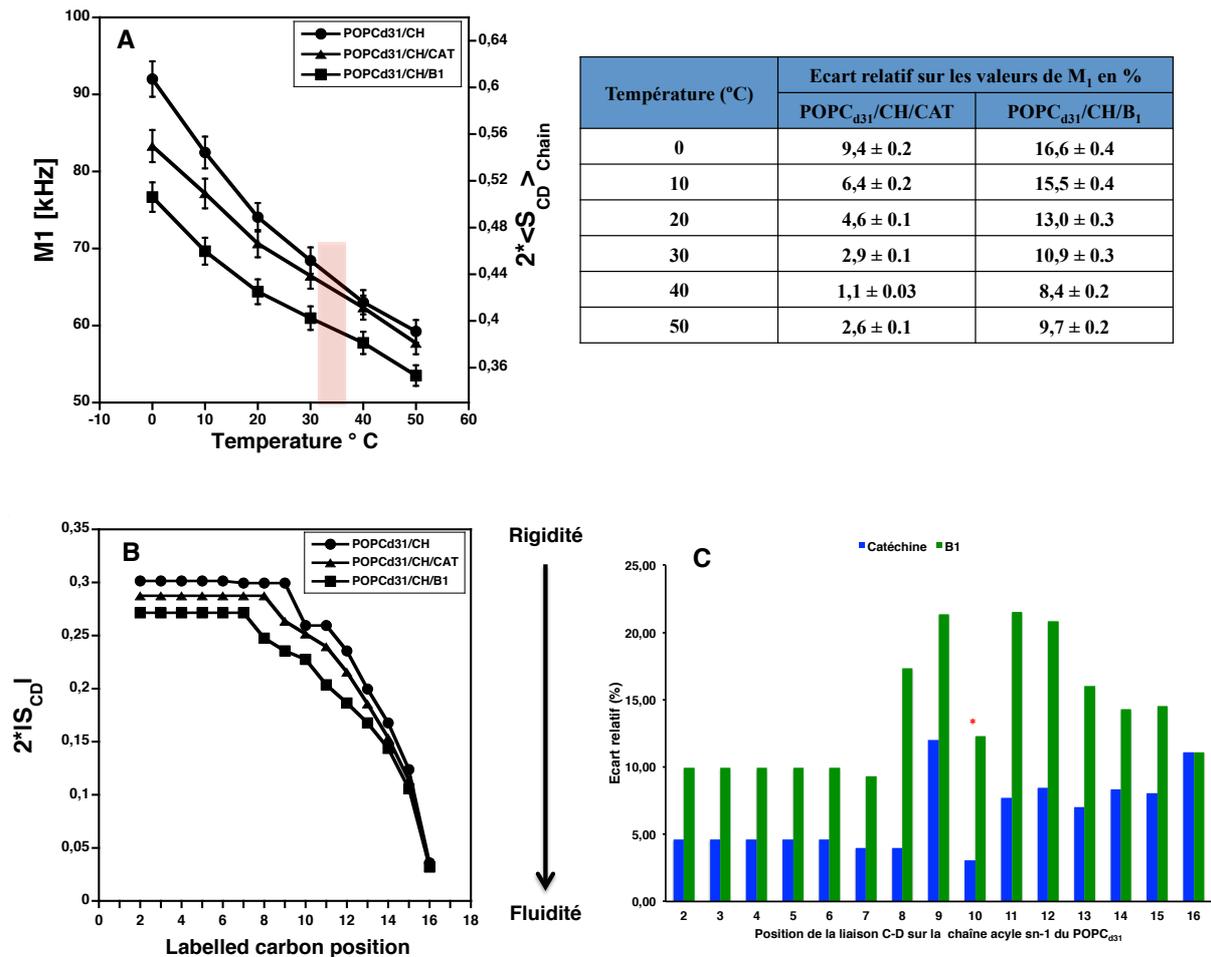


Figure 4 : Variation en fonction de la température des moments spectraux d'ordre 1, M_1 et du paramètre d'ordre moyen des chaînes acyles deutérées $2^* \langle S_{CD} \rangle_{Chain}$ (A). Ecarts relatifs sur les valeurs de M_1 pour le système POPC/CH en présence de tannins comparé au système sans tannin (**Tableau 2**). Paramètre d'ordre local $2^* |S_{CD}|$ en fonction de la position de la liaison C-D sur la chaîne acyle sn-1 du POPC_{d31} à 30°C (B). Ecarts relatifs sur les valeurs de S_{CD} pour le système en présence de tannins comparé au système sans tannin (C). Le rectangle rouge (Fig.4.A) représente la zone de la température moyenne des membranes buccales.

qu'à haute température où le système est plus désordonné (**Tableau 2, Fig.4**). On voit également que l'effet du tannin à provoquer du désordre dans la membrane dépend de sa structure. De plus, on remarque une diminution moyenne des M_1 de 2% en présence de la catéchine et 9.6% en présence du B_1 pour des températures comprises entre 30 et 40 °C, proches de la température moyenne de la bouche, ce qui indique que l'effet fluidifiant des tannins est effectif dans la bouche pendant la dégustation d'un vin.

Dans le but d'étudier l'effet des tannins à l'échelle locale et plus particulièrement sur les chaînes des lipides qui constituent le cœur hydrophobe des membranes lipidiques, nous avons calculé le paramètre d'ordre S_{CD} des chaînes deutérées de POPC en absence et en présence des tannins. Le paramètre d'ordre S_{CD} décrit les mouvements moléculaires à l'intérieur d'une membrane lipidique, et donne une information locale sur l'ordre et la dynamique des chaînes carbonées. Il est fonction de l'éclatement quadripolaire de chaque liaison C-D $\langle \Delta v_Q \rangle$ sur la chaîne palmitique. Par une méthode de simulation du spectre RMN- 2H , nous sommes capables de calculer la valeur de S_{CD} pour chaque position des deutérons sur la chaîne acyle. Ainsi, on peut tracer le profil d'ordre en fonction de la profondeur membranaire. Un système rigide présentera des valeurs de S_{CD} proche de 1 tandis qu'un système plus fluide tendra théoriquement vers des valeurs proches de 0. Les valeurs de S_{CD} diminuent donc avec l'augmentation du désordre. La **figure 4.B** montre le profil d'ordre obtenu pour les trois systèmes calculé à partir des spectres 2H à une température de 30°C, considérée comme une température moyenne de la bouche durant la dégustation d'un vin. Le profil de paramètre d'ordre du système POPC/Cholestérol est caractérisé par une région "plateau" de la position C2 à C9 où les valeurs des S_{CD} ne varient pas, suivie d'une deuxième région où le paramètre d'ordre chute brusquement puis diminue rapidement le long de la chaîne carbonée jusqu'au méthyl terminal caractérisant le milieu de la bicouche lipidique. En présence de tannins, le profil d'ordre reste inchangé, avec toutefois une diminution globale des valeurs de S_{CD} comparé au système seul excepté pour le méthyl terminal et une région "plateau" réduite. En effet, la brusque chute de S_{CD} a lieu respectivement après les positions C8 et C7 pour la catéchine et le B_1 . En calculant les écarts relatifs des S_{CD} par rapport à la membrane sans tannin (**Fig.4.C**), on remarque que la catéchine et le B_1 induisent une perturbation sur l'ensemble de la chaîne acyle du lipide, avec un effet plus marqué après les positions C8 et C7 respectivement pour la catéchine et pour le B_1 . On observe également que les écarts les plus importants sont entre les positions C9 et C12 sur la chaîne palmitique. De plus, les écarts sont

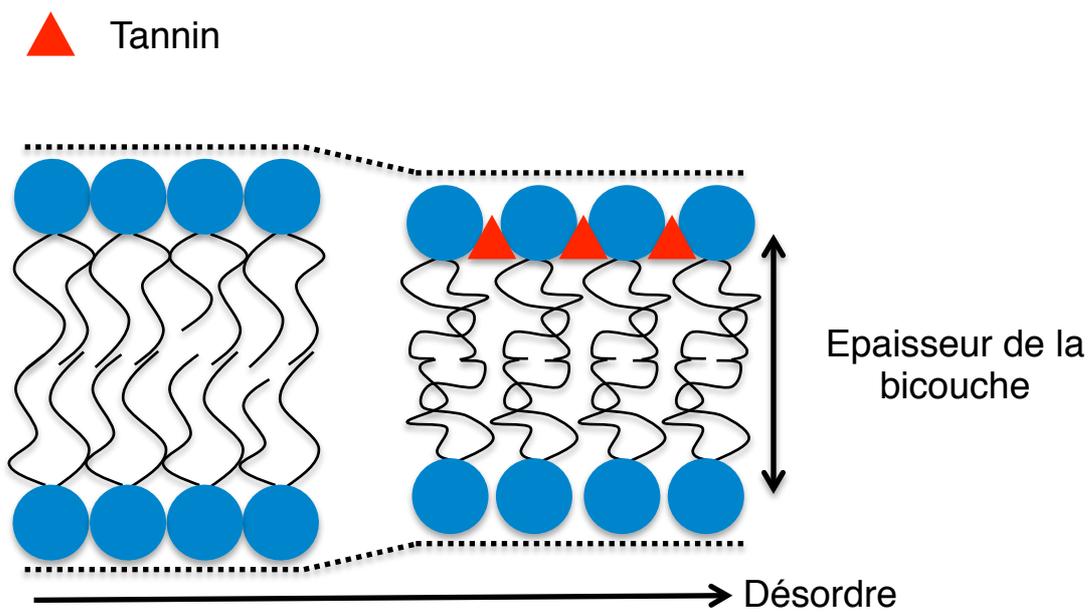


Figure 5 : Illustration de l'augmentation du désordre dans la bicouche lipidique d'une membrane sous l'effet des tannins qui conduit à des chaînes moins redressées et se traduit par une diminution de l'épaisseur de la bicouche.

2 fois plus grands en présence du B₁ comparé à la catéchine hormis pour le méthyl terminal (position 16). Ces résultats montrent que les tannins ont un effet de désordre sur les membranes de POPC/CH avec un effet de désordre plus important pour le B₁ comparé à la catéchine et que cet effet est d'autant plus marqué qu'on se rapproche du centre de la bicouche.

A partir des paramètres d'ordre S_{CD} de l'ensemble de la chaîne palmitique du POPC, la longueur moyenne de la chaîne acyle $\langle L_{\text{Chain}} \rangle$ a pu être calculée, comme décrit dans l'article de Douliez *et al.*, (1996), pour les membranes de POPC/CH en absence de tannin, en présence de la catéchine et en présence de B₁ à une température de 30°C. En tenant compte de l'épaisseur du squelette glycérol estimée à 3 Å ± 0.5 (Douliez *et al.*, 1996) et de l'épaisseur de la tête choline du lipide estimée à 4 Å ± 0.5 (Tu *et al.*, 1995), l'épaisseur moyenne de la bicouche du POPC/CH a pu être déterminée. Elle est de 44.0 ± 0.5 Å pour le système POPC/CH, de 43.5 ± 0.5 Å en présence de la catéchine (-1.14%) et de 42.7 ± 0.5 Å en présence du B₁ (-2.86%). Les valeurs des épaisseurs trouvées montrent que les tannins induisent une diminution de l'épaisseur de la membrane avec une diminution 2.5 fois plus grande pour le B₁ comparé à la catéchine. Par conséquent, ce résultat confirme l'effet fluidifiant des tannins sur les membranes lipidiques. L'impact des tannins sur l'épaisseur de la membrane est à relier à l'effet de désordre qu'ils provoquent sur la chaîne acyle des lipides. En effet, le désordre conduit à des chaînes plus lâches et donc moins verticales, d'où un cœur hydrophobe plus petit (**Fig.5**).

Par ailleurs, l'épaisseur de la membrane de POPC/CH que nous avons calculée est conforme à celle trouvée dans la littérature. Nezil et Bloom (1992) ont obtenu une épaisseur membranaire de 29.9 Å pour une membrane de POPC/CH 70/30 à 25°C, sans tenir compte de l'épaisseur de la tête du lipide. En ajoutant la contribution du glycérol et la tête choline nous obtiendrons une valeur similaire (43.9 Å) à celle que nous avons obtenue. Toutefois, l'épaisseur de la membrane de POPC/CH que nous avons obtenue est supérieure à celle d'une bicouche composée de POPC seulement (39.8 Å à 25°C selon Nezil et Bloom, 1992, et 41.8 Å à 20°C selon Grélard *et al.*, 2013). Ce résultat confirme l'effet rigidifiant du cholestérol sur les membranes lipidiques fluides qui augmente l'ordre des chaînes acyles et l'épaisseur de la bicouche lipidique (Hung *et al.*, 2007, Hsueh *et al.*, 2007, Pencer *et al.*, 2005).

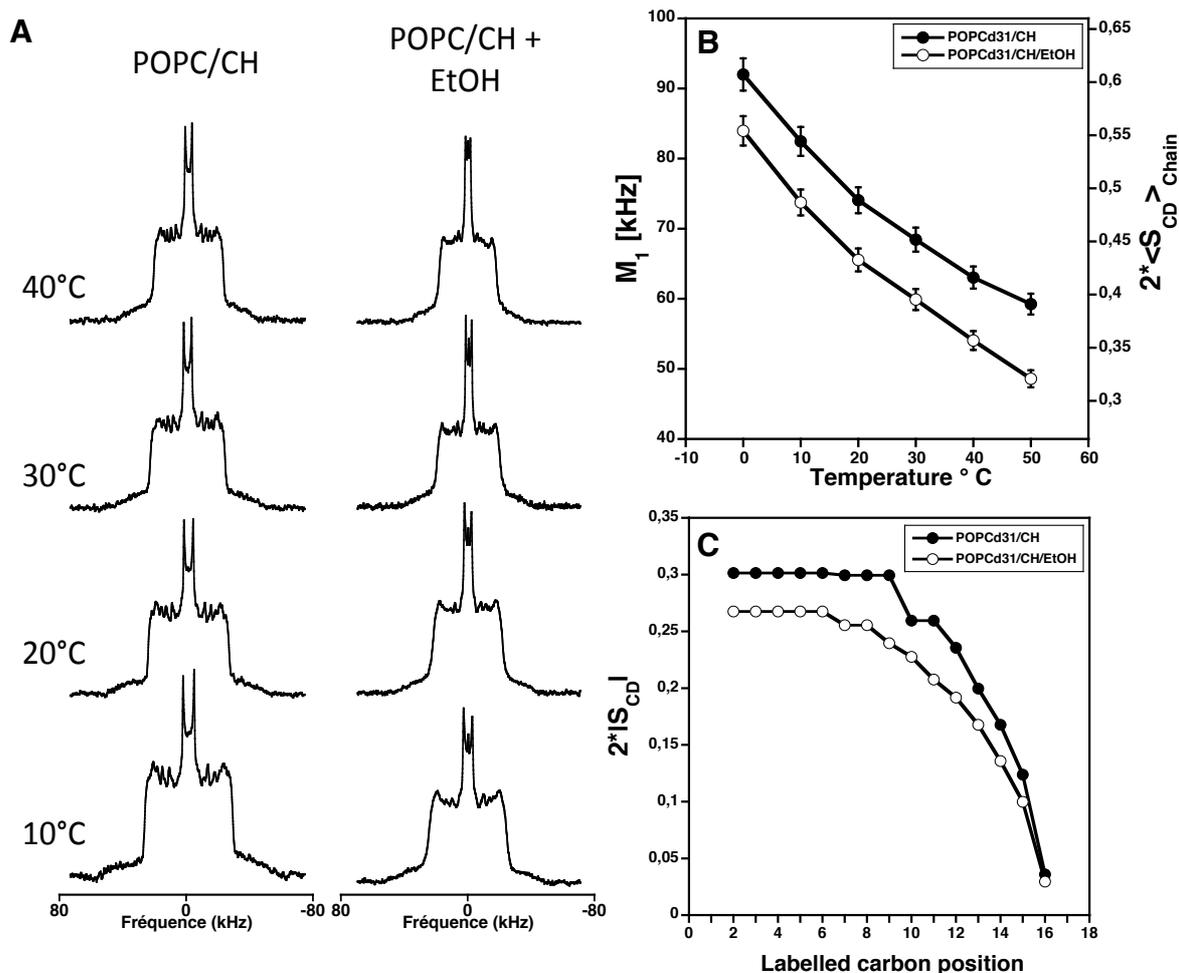


Figure 6 : Spectres RMN du deutérium des vésicules multilamellaires de POPCd₃₁/Cholestérol (70/30) en absence et en présence d'éthanol à différentes températures (A). Variation en fonction de la température des moments spectraux d'ordre 1, M_1 et du paramètre d'ordre moyen des chaînes acyles deutérées $2 \cdot \langle S_{CD} \rangle_{Chain}$ en absence et en présence d'éthanol (B). Paramètre d'ordre local $2 \cdot |S_{CD}|$ en fonction de la position de la liaison C-D sur la chaîne acyle sn-1 du POPCd₃₁ à 30°C en présence d'éthanol (C). [Lipide] = 60 mM, [POPC] = 42 mM, [Cholestérol] = 18 mM, Ethanol = 12% v/v. CM = 500 MHz, NA = 8k sc, LB = 300 Hz.

I.2. Effet des tannins en milieu hydro-alcoolique

Dans le but de se rapprocher des conditions de dégustation du vin, nous avons étudié le rôle de l'éthanol sur les interactions tannins-lipides pour voir notamment si l'effet fluidifiant des tannins persiste en présence de l'éthanol, une molécule connue par son effet de désordre sur les membranes lipidiques (Furlan *et al.*, 2016, Patra *et al.*, 2006). Des expériences similaires à celles réalisées en milieu aqueux ont été effectuées en présence de 12% (v/v) d'éthanol, un pourcentage volumique moyen qu'on trouve dans le vin rouge.

D'abord, nous avons étudié l'effet de l'éthanol sur la dynamique des membranes de POPC/Cholestérol en absence de tannin. La **figure 6.A** montre les spectres RMN-²H des MLV en absence et en présence d'éthanol entre 10 et 40°C. En présence d'éthanol, les spectres présentent une allure caractéristique d'une phase lamellaire fluide comme pour le système POPC/Cholestérol seul. On remarque à une température donnée, une diminution de la largeur spectrale pour le système en présence de l'éthanol comparé à celle du système seul (**Tableau 3**). L'étude des M_1 calculés à partir des spectres ²H de la figure 6 montre bien que le profil est conservé en présence d'éthanol, avec une diminution importante des valeurs de M_1 par comparaison à celles du système sans éthanol sur toute la gamme de température (**Fig.6.B**). On observe également que la baisse du M_1 est relativement identique quelle que soit la température. La détermination des S_{CD} montre que la région "plateau" du profil d'ordre est réduite et que les valeurs des S_{CD} sont fortement diminuées sur l'ensemble de la chaîne lipidique, excepté pour le méthyl terminal (**Fig.6.C**). Ces résultats confirment l'effet fluidifiant bien connu de l'éthanol sur les membranes qui désorganise le cœur hydrophobe de la membrane lipidique (Patra *et al.*, 2006).

Température (°C)	Largeur des spectres en kHz		Ecart relatif (%)
	POPC _{d31} /CH	POPC _{d31} /CH + EtOH	
10	99.6	93.9	5.7
20	87.5	84.6	3.3
30	82.6	78.3	5.2
40	80.2	70.1	12.5

Tableau 3 : Largeurs spectrales des spectres RMN-²H en absence et en présence d'éthanol déterminées à partir des spectres de la figure 6.A.

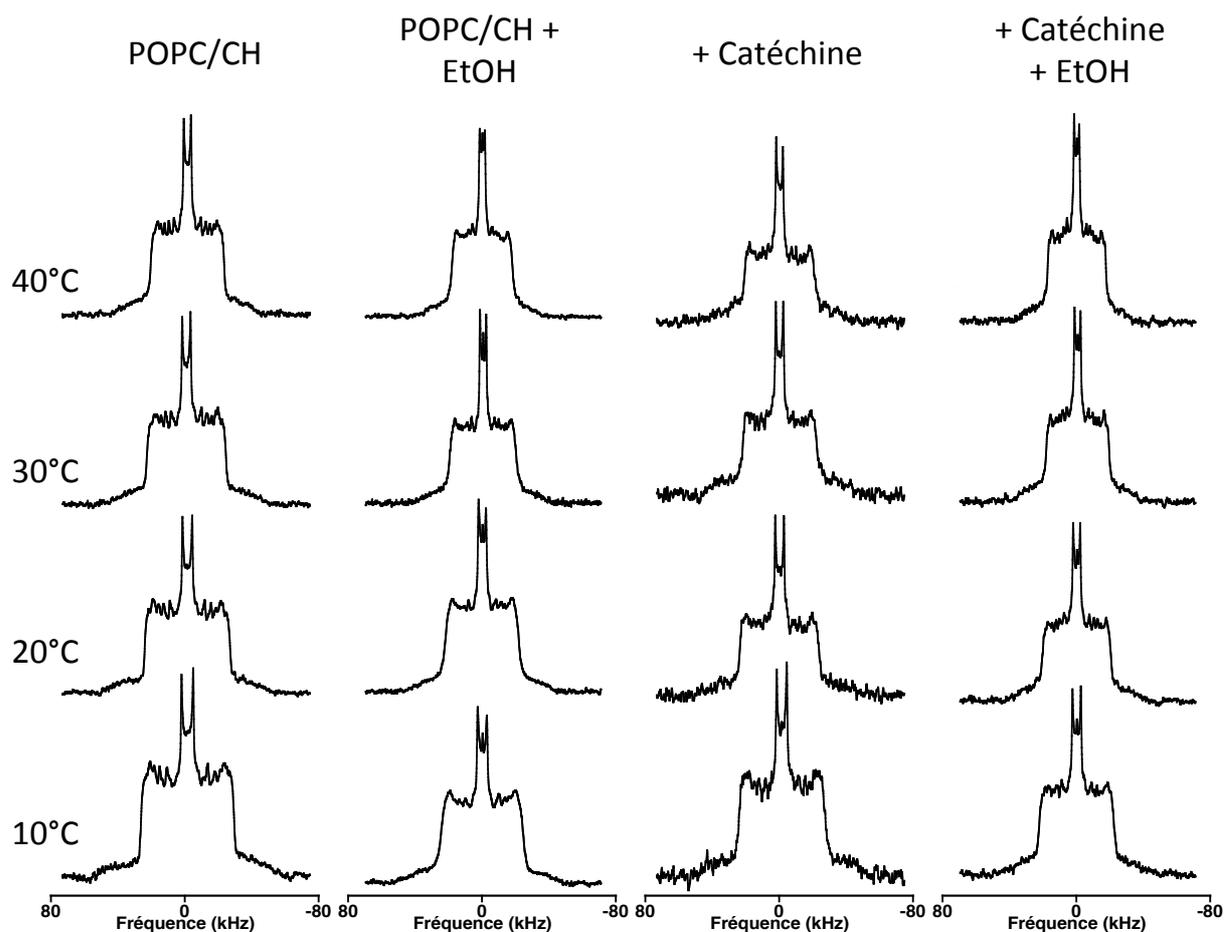


Figure 7 : Spectres RMN du deutérium des vésicules multilamellaires de POPCd₃₁/Cholestérol (70/30) en absence et en présence d'éthanol et/ou de catéchine à différentes températures. Rapport molaire Catéchine/Lipide 1/10. [Lipide] = 60 mM, [POPC] = 42 mM, [Cholestérol] = 18 mM, Ethanol = 12% v/v. CM = 500 MHz, NA = 8k sc, LB = 300 Hz.

Température (°C)	Largeur des spectres en kHz					
	POPC _{d31} /CH	POPC _{d31} /CH + EtOH	POPC _{d31} /CH/ CAT	POPC _{d31} /CH/ CAT + EtOH	POPC _{d31} /CH/B ₁	POPC _{d31} /CH/B ₁ + EtOH
10	99.6	93.9	92.3	88.9	81.6	79.9
20	87.5	84.6	85.7	81.1	78.2	73.1
30	82.6	78.3	80.6	76.2	74.5	70.2
40	80.2	70.1	81.5	68	69.3	63

Tableau 4 : Largeurs spectrales des spectres RMN-²H en absence et en présence d'éthanol et/ou de tannins déterminées à partir des spectres de la figure 7 et de l'annexe 2.

Ensuite, nous avons étudié l'effet concomitant de l'éthanol et des tannins sur les MLV de POPC/CH. La **figure 7** (cas de la catéchine) et **l'annexe 2** (cas du B₁) montrent que la présence d'éthanol ne modifie pas l'allure des spectres RMN-²H des membranes de POPC/CH en présence de tannin, quelle que soit la température. Elle reste caractéristique d'une phase lamellaire fluide. On remarque indépendamment du tannin que la largeur spectrale diminue dans l'ordre suivant : MLV > MLV + tannin > MLV + EtOH ≥ MLV + EtOH + tannin (**Tableau 4**).

Pour quantifier ces résultats, les M₁ ont été calculés en fonction de la température (**Fig.8.A et B**). On remarque une diminution des valeurs de M₁ pour tous les systèmes en présence d'éthanol comparé à ceux sans éthanol avec des profils sensiblement identiques. Si l'on compare les systèmes POPC/CH/tannin et POPC/CH/EtOH, on observe des différences de comportement entre les deux tannins. Alors que le système lipidique avec la catéchine a un profil d'ordre toujours au-dessus du système avec éthanol, ceci n'est vrai pour le B₁ que pour des températures supérieures à 30°C. De plus, on observe que le profil d'ordre dont les valeurs de M₁ sont les plus basses correspond au système où tannins et éthanol sont présents ensembles. En comparant à une température donnée les valeurs de M₁ entre les systèmes POPC/CH/EtOH, POPC/CH/tannin et POPC/CH/tannin/EtOH, on remarque qu'il y a additivité des valeurs (**Tableau 5**). L'ensemble de ces résultats met en évidence un effet additif entre celui de l'éthanol et des tannins, avec toutefois une différence de comportement entre les deux tannins. À basse température (< 30°C), le B₁ a un effet fluidifiant sur le système lipidique plus important que celui de l'éthanol contrairement à la catéchine. A plus haute température, alors que seul l'effet fluidifiant de l'éthanol persiste dans le cas du système avec catéchine, la présence du B₁ continue d'être ressentie par la membrane.

Température (°C)	Ecart absolue sur les valeurs de M ₁				
	POPC/CH/ EtOH	POPC/CH/CAT	POPC/CH/CAT/ EtOH	POPC/CH/B ₁	POPC/CH/B ₁ / EtOH
0	8,0 ± 0.20	8.7 ± 0.21	16.5 ± 0.41	15,3 ± 0.38	16,3 ± 0.41
10	8,7 ± 0.21	5.3 ± 0.14	14.2 ± 0.35	12,8 ± 0.32	14,6 ± 0.37
20	8,5 ± 0.21	3.4 ± 0.08	13.4 ± 0.33	9,7 ± 0.24	13,4 ± 0.33
30	8,5 ± 0.21	2 ± 0.05	10.7 ± 0.26	7,5 ± 0.19	14,7 ± 0.37
40	9,0 ± 0.22	0.7 ± 0.02	10.5 ± 0.26	5,3 ± 0.13	14,2 ± 0.35
50	10,6 ± 0.26	1.5 ± 0.04	11.8 ± 0.29	5,7 ± 0.14	15,5 ± 0.39

Tableau 5 : Ecart absolu sur les valeurs de M₁ entre le système POPC/CH en présence et en absence de tannins avec ou sans éthanol.

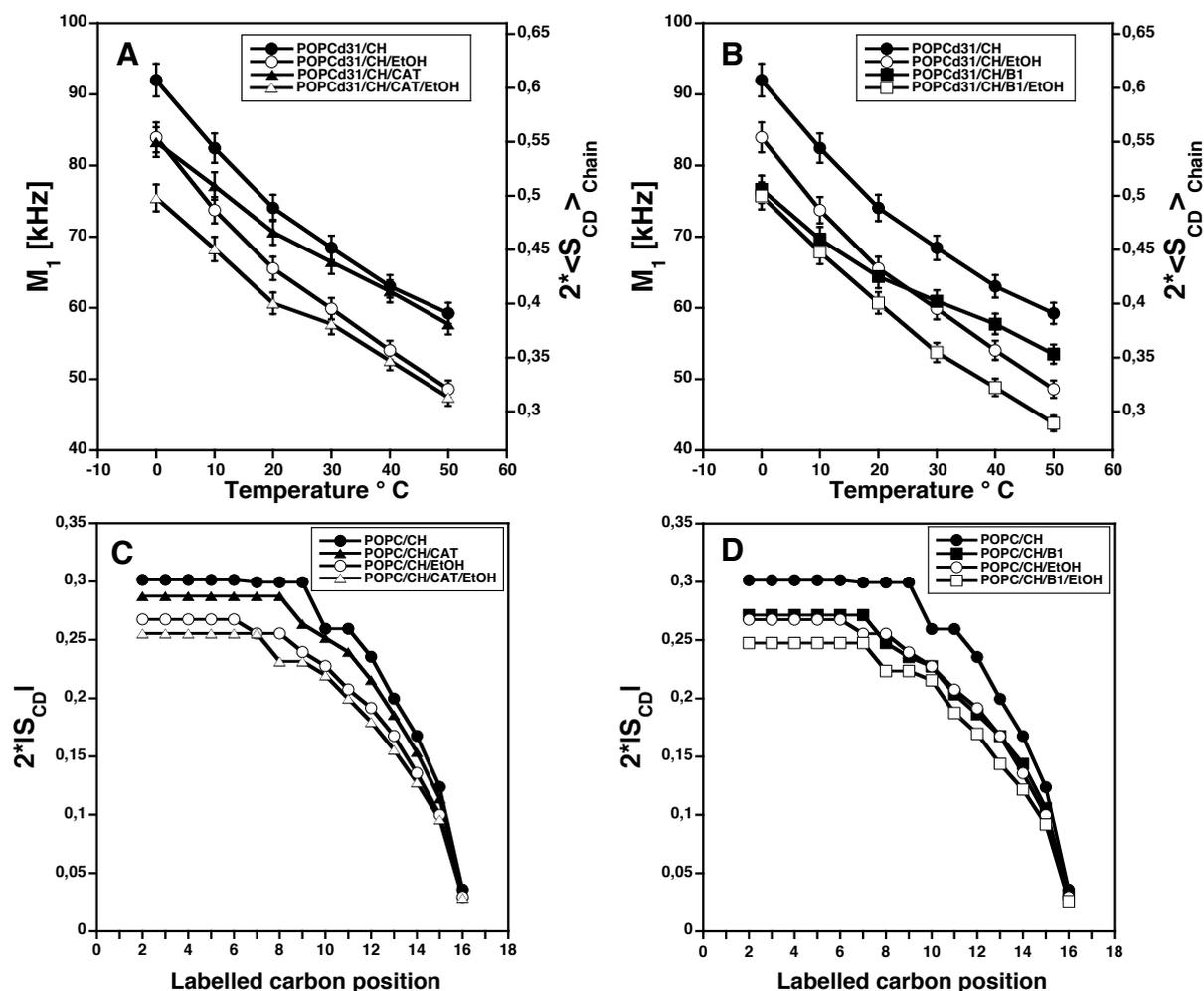


Figure 8 : Variation en fonction de la température des moments spectraux d'ordre 1, M_1 et du paramètre d'ordre moyen des chaînes acyles deutérées $2^* \langle S_{CD} \rangle_{Chain}$ en absence et en présence de catéchine (A) ou de B₁ (B) avec ou sans éthanol. Paramètre d'ordre local $2^* |S_{CD}|$ en fonction de la position de la liaison C-D sur la chaîne acyle sn-1 du POPCd₃₁ à 30°C en présence de catéchine (C) ou de B₁ (D) avec ou sans éthanol.

Système lipidique	Epaisseur (Å)		Ecart relatif (%)			
	- EtOH	+ EtOH	Effet de l'EtOH	Effet des tannins		Effet des tannins + EtOH
				- EtOH	+EtOH	
POPC/CH	43.98	42.67	-2.98			
POPC/CH/CAT	43.48	42.22	-2.9	-1.14	-1.05	-4
POPC/CH/B ₁	42.72	41.94	-1.83	-2.86	-1.71	-4.64

Tableau 6 : Ecarts relatifs en % sur les valeurs de l'épaisseur de la membrane de POPC/Cholestérol en absence et en présence de tannins et/ou d'éthanol.

De nouveau, nous avons étudié l'effet des tannins sur l'ordre de la chaîne acyle sn-1 du POPC en présence de l'éthanol à 30°C (**Fig.8.C et D**). On remarque que le profil d'ordre global du système lipidique avec ou sans tannin est inchangé en présence de l'éthanol. Seules les valeurs de S_{CD} sont globalement modifiées avec des résultats similaires à ceux trouvés pour les M_1 ; la catéchine a un effet de désordre sur les chaînes acyles des lipides plus faible que l'éthanol alors que le B_1 les désorganisent de la même manière que l'éthanol. L'effet de désordre des tannins et de l'éthanol est cumulé.

Nous avons aussi calculé l'épaisseur de la bicouche de lipides en présence de l'éthanol à la température de 30°C. Elle est de $42.67 \pm 0.5 \text{ \AA}$ pour le système POPC/CH/EtOH, elle diminue à $42.22 \pm 0.5 \text{ \AA}$ pour le système POPC/CH/CAT/EtOH et à $41.94 \pm 0.5 \text{ \AA}$ en présence du B_1 . Les écarts relatifs d'épaisseur des systèmes avec ou sans tannin en présence ou non d'éthanol à $T = 30^\circ\text{C}$ sont reportés dans le **tableau 6**. On constate que (i) l'effet des tannins sur l'épaisseur de la membrane est moins marqué en présence d'éthanol ; (ii) l'effet de l'éthanol est moins marqué en présence des tannins ; (iii) l'effet de l'éthanol est plus important que celui de la catéchine et du même ordre de grandeur que celui du B_1 .

Fort de l'ensemble de ces résultats, nous pouvons conclure que l'effet fluidifiant des tannins bien que moindre persiste en présence d'éthanol, que le B_1 a un effet fluidifiant plus fort que la catéchine et que l'effet fluidifiant de l'éthanol et des tannins est plus important lorsque les deux sont en présence comme c'est le cas dans le vin.

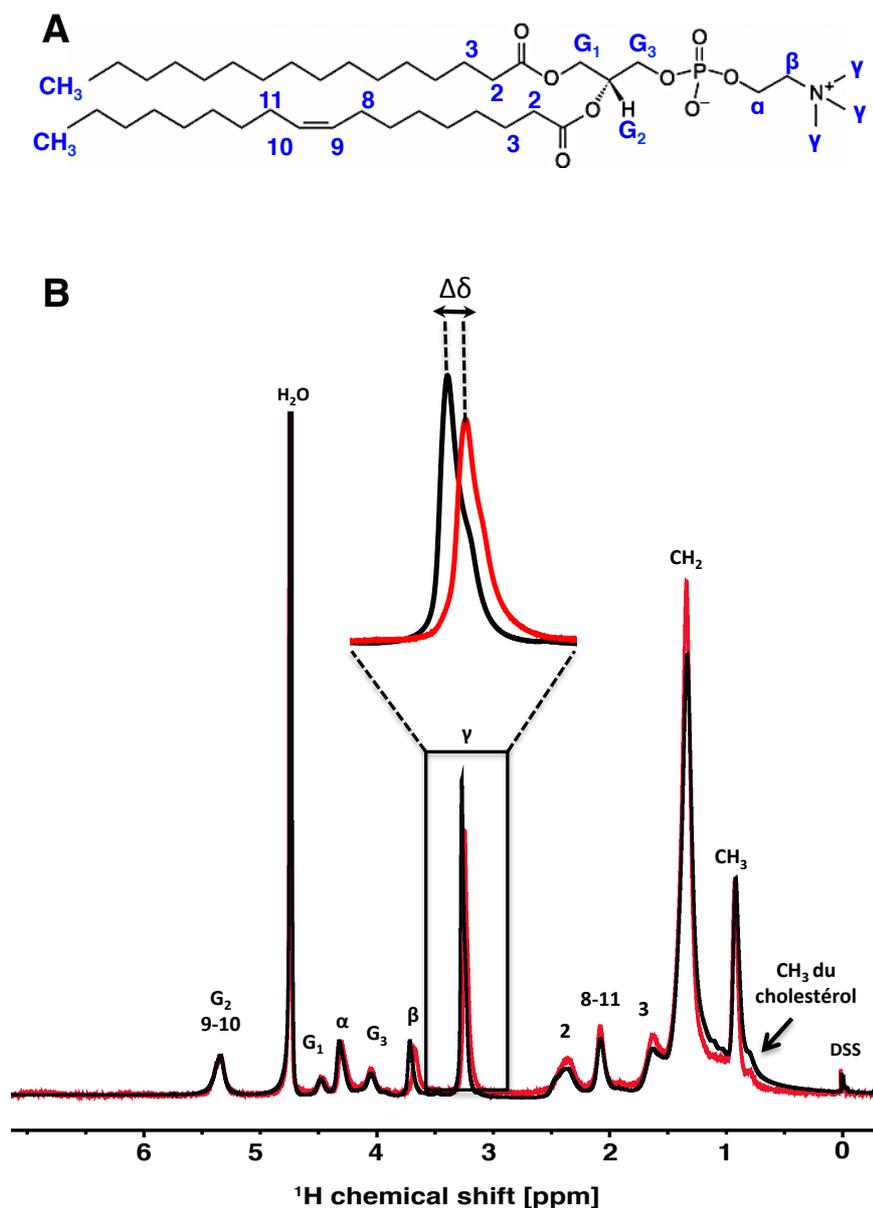


Figure 9 : (A) Structure chimique du POPC. (B) Spectres RMN- ^1H HR-MAS des vésicules multilamellaires de POPC/Cholestérol en absence (noir) et en présence de catéchine (rouge), avec agrandissement de la zone de résonance du groupement $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ (γ) du POPC à 3.25 ppm. Les déplacements chimiques sont référencés par rapport au signal du DSS à 0 ppm. Rapport molaire Catéchine/Lipide = 1/10. [Lipide] = 60 mM, [POPC] = 42 mM, [Cholestérol] = 18 mM, [Catéchine] = 6 mM. T = 30°C, CM = 500 MHz, NA = 64 sc, VR = 10 kHz.

II. Localisation des tannins dans les membranes lipidiques

Les tannins augmentent la dynamique des chaînes acyles du POPC et désorganisent le cœur hydrophobe de la membrane lipidique. En se basant sur les résultats des paramètres d'ordre S_{CD} , on a constaté que les tannins induisent une perturbation sur l'ensemble de la chaîne du POPC. Nous avons donc cherché à savoir comment les tannins se positionnaient dans la membrane. Sont-ils situés à l'interface ou bien dans le cœur de la bicouche lipidique ? Pour cela, nous avons étudié l'effet des tannins sur les déplacements chimiques des protons des membranes de POPC/CH par RMN- 1H et ^{13}C . Cette étude a été faite en milieu aqueux uniquement en absence d'éthanol.

II.1. Etude RMN 1D

Les MLV possédant des propriétés anisotropes, pour cette étude on a eu recours à la RMN haute résolution à la rotation à l'angle magique (HR-MAS RMN). Cette méthode permet en effet d'obtenir des spectres avec une résolution comparable à celle obtenue avec la RMN en phase liquide. Ainsi, il est possible d'étudier l'effet des tannins sur le spectre des lipides en membrane en analysant les déplacements chimiques des protons du squelette lipidique en absence et en présence des tannins. La **figure 9** présente les spectres RMN- 1H des membranes de POPC/CH (70/30) en présence et en absence de catéchine. Chaque signal correspond à un proton ou un groupe de protons équivalents (proton avec le même environnement chimique) présents sur les lipides constituant le modèle membranaire. L'attribution du spectre des MLV seules a été réalisée dans un premier temps puis en présence de catéchine. Les déplacements chimiques des deux spectres sont donnés dans **l'annexe 3**. Selon Weizenmann *et al.* (2012), nous avons attribué chaque signal du POPC. Les signaux liés aux protons des chaînes carbonées compris entre 0.8 et 2.5 ppm sont attribués respectivement par ordre de déplacement chimique croissant : aux protons des méthyles terminaux (CH_3), aux protons des groupes méthylènes (CH_2), aux protons en β des fonctions ester (CH_2-CH_2-COO-), aux protons allyliques ($CH_2-C=C-$) et aux protons en α des fonctions ester (CH_2-COO-). Les signaux au-delà de 3 ppm sont dus aux protons de la tête choline et du squelette glycérol par ordre de déplacement chimique croissant : aux protons des CH_3 de l'ammonium quaternaire ($N^+(CH_3)_3$), aux protons en β du groupement phosphate ($PO_4^-CH_2-CH_2-$), aux protons en position sn-3 du glycérol, aux protons en position α du groupement phosphate ($PO_4^-CH_2-$),

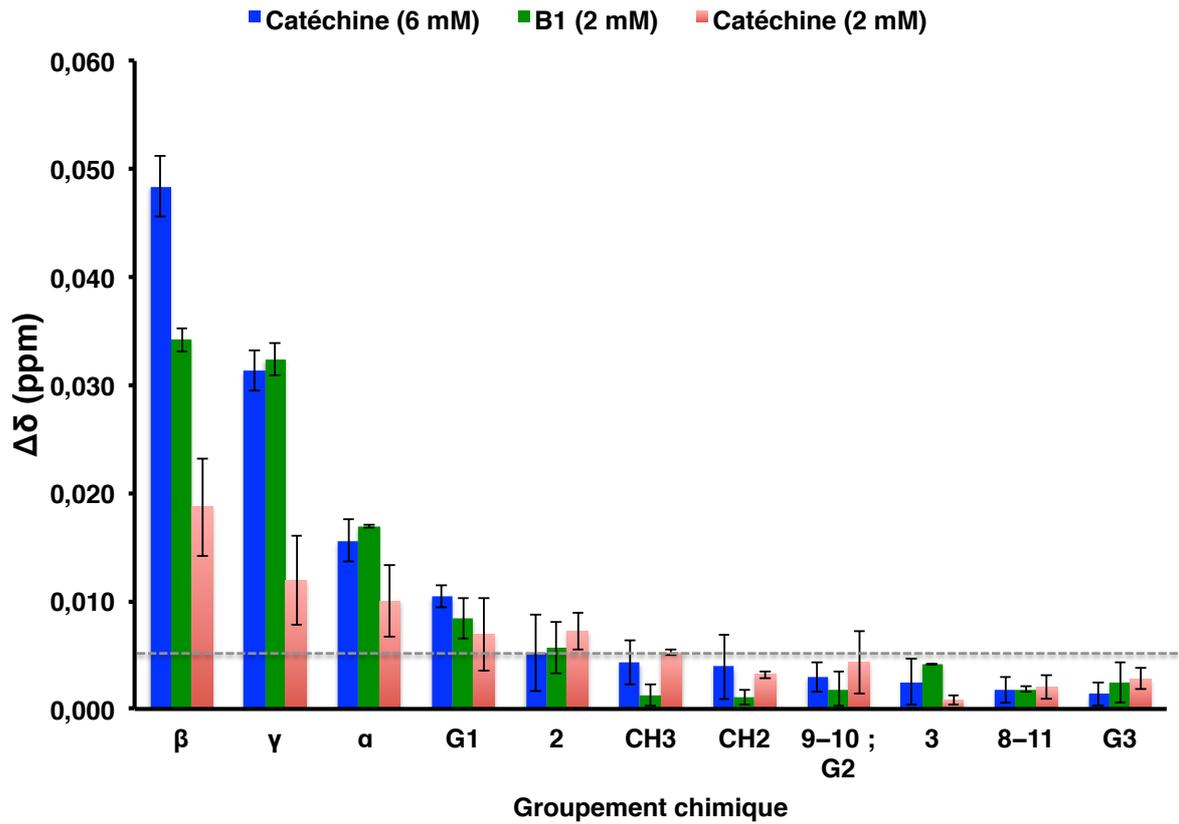


Figure 10 : Variations des déplacements chimiques ($\Delta\delta$) des signaux du POPC en fonction de la position des protons sur le squelette lipidique suite à l'ajout des tannins sur les MLV de POPC/Cholestérol (70/30). [Lipides] = 60 mM, T = 30°C, rapport molaire tannin/lipide.

aux protons en position sn-1 du glycérol, aux protons vinyliques et aux protons en position sn-2 du glycérol. Le pic le plus intense à 4.7 ppm est dû à l'eau résiduelle dans l'échantillon. Pour les signaux du cholestérol, nous ne sommes pas capables de les discriminer sur le spectre 1D proton, car la majorité de ses résonances chevauchent celles du POPC. Cependant, nous observons un très faible signal à 0.8 ppm qui peut être attribué aux protons des groupements méthyles du cholestérol.

En présence du tannin, on remarque que les déplacements chimiques du POPC subissent un effet de blindage, c'est-à-dire un décalage vers les basses valeurs. Ce phénomène indique une augmentation de la densité électronique autour des protons du lipide qui peut être attribuée au courant de cycle des noyaux benzéniques de la catéchine avec un effet plus ou moins important en fonction de la position des protons sur les lipides (**Annexe 4**). Cet effet peut donner une information sur l'orientation des protons du lipide par rapport au plan des cycles aromatiques de la catéchine. L'effet de blindage montre que les protons du POPC sont localisés dans le plan des cycles aromatiques de la catéchine. Les variations des déplacements chimiques des signaux du lipide dépendent de la distance entre les protons du lipide et le cycle aromatique du tannin. Plus la distance est proche, plus la perturbation de l'environnement électronique des protons du lipide est importante (Scheidt *et al.*, 2004, Williamson, 2013). L'analyse du spectre des lipides constituant les MLV de POPC/CH a été également réalisée en présence du tannin B₁. Des résultats similaires ont été observés (**Annexe 5**).

Afin de déterminer les groupements chimiques les plus affectés par la présence des tannins, nous avons reporté les variations des déplacements chimiques ($\Delta\delta$) des signaux du POPC en présence de la catéchine et du B₁ en fonction de la position des protons sur le POPC. Les résultats de la **figure 10** montrent que pour les deux tannins les variations les plus grandes (> 0.005 ppm) sont pour les protons des groupes CH₂ (β), N⁺CH₃ (γ), et CH₂ (α) situés sur le groupement choline du POPC. Les protons en position G₁ et C₂ sont également affectés mais dans une moindre mesure. Par contre, on voit des variations de déplacements chimiques pour les protons des chaînes acyles peu significatives. En comparant les écarts de déplacements chimiques des protons de la tête polaire entre les deux tannins, on constate que les variations de déplacement chimiques sont du même ordre de grandeur pour la catéchine à 6 mM et le B₁ à 2 mM, hormis pour la position β . Ceci semble dire que le B₁, bien que moins concentré, a un effet plus important sur l'environnement des lipides. Pour le vérifier, nous avons réalisé la

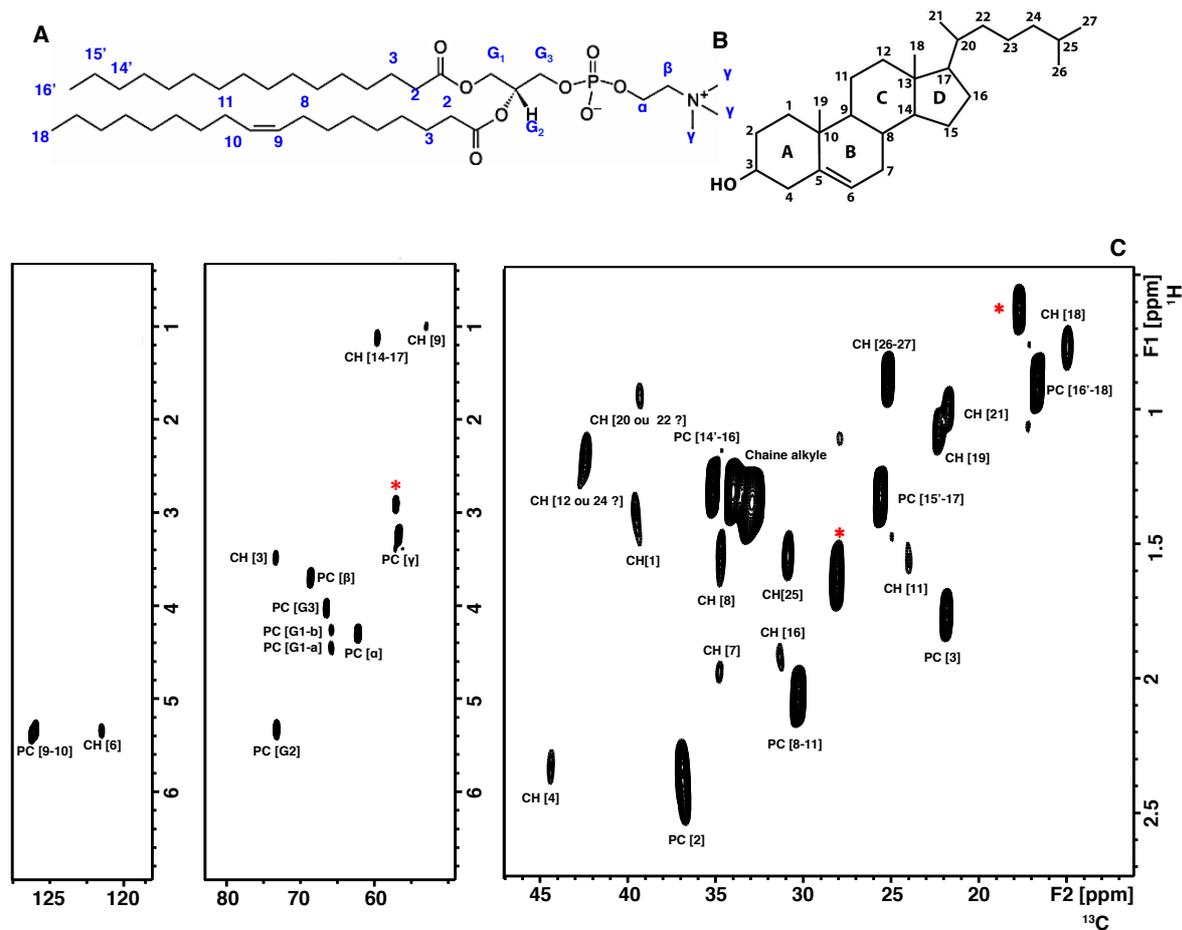


Figure 11 : (A) Structure chimique du POPC. (B) Structure chimique du cholestérol. (C) Spectre RMN-MAS INEPT 2D de corrélation hétéro-nucléaire ^1H (axe vertical) ^{13}C (axe horizontal) pour des vésicules multilamellaires de POPC/Cholestérol (70/30). Les déplacements chimiques sont référencés par rapport au signal du DSS à 0 ppm. Les taches marquées d'un astérisque rouge sont liées à des impuretés qui proviennent du DSS. [Lipides] = 180 mM, [POPC] = 126 mM, [Cholestérol] = 54 mM. T = 2°C, CM = 600 MHz, NA = 160 sc, VR = 19 kHz.

même expérience avec la catéchine mais cette fois à la même concentration de 2 mM que le B₁. On peut voir qu'à cette concentration, les variations de déplacement chimique de la catéchine sont plus faibles que celles du B₁.

A l'issue de ces résultats, nous pouvons conclure que les tannins perturbent préférentiellement l'environnement de la tête polaire des lipides des MLV et qu'ils ont peu d'impact sur celui des chaînes carbonées. Cet effet dépend du tannin et est dose-dépendant. Par conséquent, les tannins en interaction avec les lipides des MLV semblent adopter une position interfaciale dans la bicouche lipidique. L'effet plus important du B₁ pourrait s'expliquer par le fait que le B₁ possédant plus de fonctions hydroxyles que la catéchine, est capable de former plus de liaisons hydrogène avec les doublets non liants des oxygènes des groupements carbonyle et phosphate de la tête polaire du POPC. Les interactions de type cation- π entre la tête choline des lipides et les cycles aromatiques des tannins sont également susceptibles de se développer et participer à l'interaction tannin-lipide.

II.2. Etude RMN 2D

Pour aller plus loin dans la caractérisation des interactions tannins/lipides et dans le but d'obtenir des informations supplémentaires sur la localisation des tannins dans les membranes, nous avons mis en place une étude des corrélations hétéro-nucléaires entre le proton ¹H et le carbone ¹³C par la méthode de transfert de polarisation INEPT MAS. Ce type d'expérience RMN est classiquement utilisé pour l'étude des membranes lipidiques en phase fluide dont la mobilité des chaînes acyles des lipides est élevée (l'interaction dipolaire et l'anisotropie de déplacement chimique est plus faible que celle des systèmes solides rigides). Dans ces conditions, il est possible d'obtenir des spectres de haute résolution (Gross *et al.*, 1995, Warschawski et Devaux, 2000). De plus, le passage en 2D et l'étude en ¹³C vont permettre d'avoir des informations concernant les déplacements chimiques du cholestérol qu'on ne visualisait pas sur les spectres 1D. En effet, dans ce cas, la majorité des déplacements chimiques des groupements du cholestérol en ¹³C ne chevauchent pas ceux du POPC. Les expériences INEPT ayant été réalisées en abondance naturelle, il a fallu augmenter la concentration des lipides à 180 mM (trois fois plus que pour les expériences de RMN ¹H) pour augmenter la sensibilité du noyau ¹³C et ainsi avoir des temps d'acquisition raisonnables (environ 10 heures).

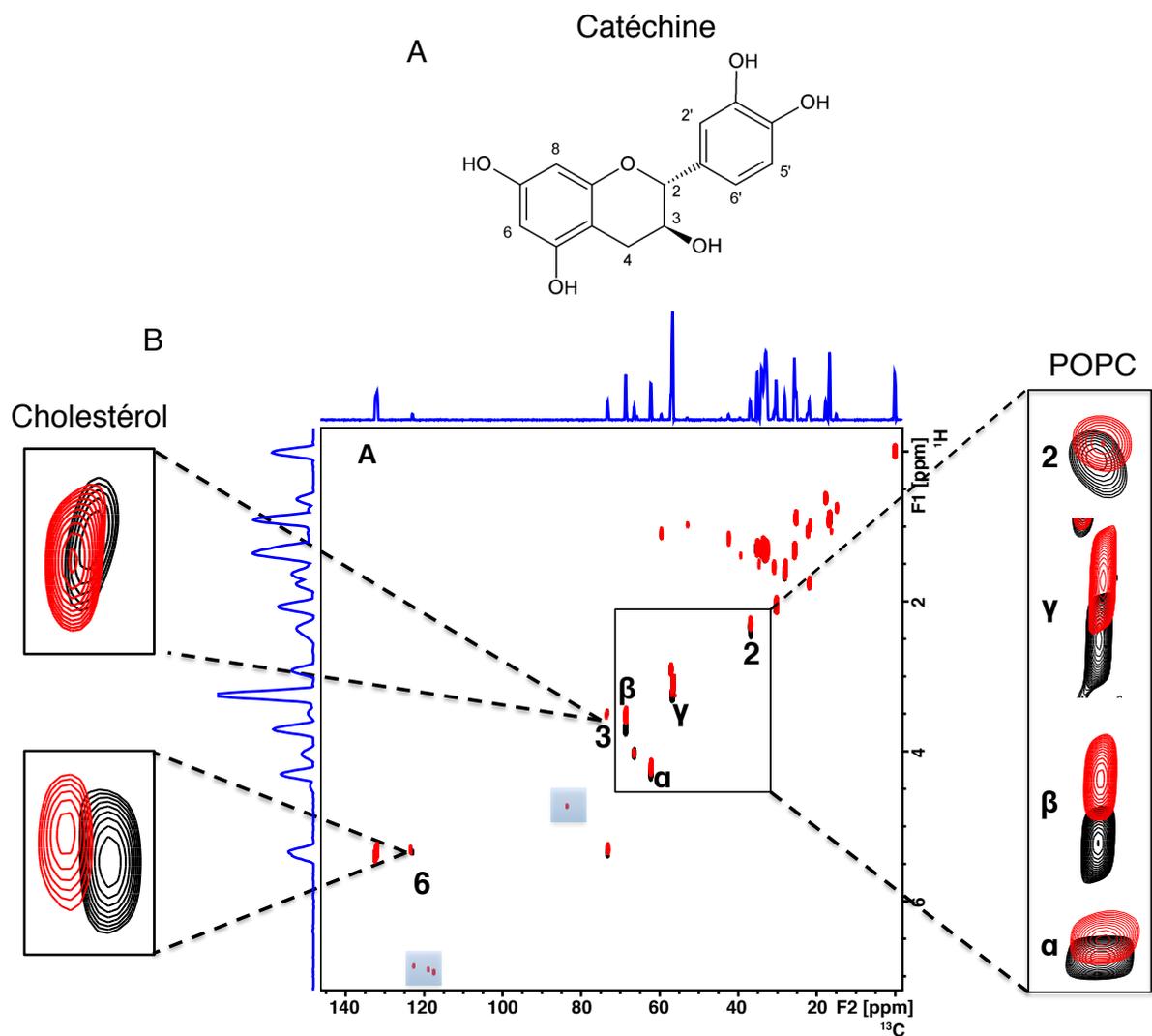


Figure 12 : (A) Structure chimique de la catéchine. (B) Spectres RMN-MAS INEPT 2D de corrélation hétéro-nucléaire ^1H - ^{13}C pour des vésicules multilamellaires de POPC/Cholestérol (70/30) en absence (noire) et en présence (rouge) de catéchine, avec agrandissement de la zone des variations des déplacements chimiques les plus importants du POPC et du cholestérol. Les taches de corrélations encadrées en bleu correspondent aux signaux de la catéchine. Les déplacements chimiques sont référencés par rapport au signal du DSS à 0 ppm. [Lipide] = 180 mM, [Catéchine] = 30 mM, rapport molaire Catéchine/Lipide = 1/6. T = 2 °C, CM = 600 MHz, NA = 160 sc, VR = 19kHz.

Avant d'analyser l'impact des tannins, une étude des MLV de POPC/CH (70/30) a été réalisée au préalable. Le spectre RMN 2D ^1H - ^{13}C INEPT des vésicules seules est présenté sur **la figure 11**. Sur la carte 2D, la dimension F1 (axe vertical) est relative au spectre 1D du ^1H et la dimension F2 (axe horizontal) au spectre 1D du ^{13}C . La haute résolution du spectre de corrélation (taches de corrélation bien séparées les unes des autres) et les données de la littérature nous ont permis d'attribuer chaque tache de corrélation (Soubias *et al.*, 2004, Soubias *et al.*, 2002, Ferreira *et al.*, 2013). Comme c'était prévu, grâce à cette méthode, il a été possible d'attribuer non seulement les résonances des protons et des carbones du POPC, mais également la majorité de celles du cholestérol, (hormis les carbones quaternaires C5, C10 et C13 non détectés en INEPT et les carbones C2, C15 et C23 pour lesquels aucune tache de corrélation relative à ces positions n'a été détectée), alors que ces dernières n'avaient pu l'être à partir du spectre 1D proton.

Après cette analyse préliminaire, nous avons étudié l'effet des tannins sur les déplacements chimiques des signaux du POPC et du cholestérol. La **figure 12** montre la superposition des spectres 2D ^1H - ^{13}C en absence et en présence de la catéchine. On remarque qu'en ajoutant la catéchine de nouvelles taches de corrélation ^1H - ^{13}C apparaissent sur le spectre 2D aux positions (4.72-83.51 ppm), (6.86-122.55 ppm), (6.91-118.91 ppm) et (6.95-117.46 ppm) (cadre bleu). Le spectre 1D ^1H de la catéchine en solution aqueuse a permis d'attribuer ces quatre nouvelles taches de corrélation respectivement aux protons 2, 6', 2' et 5' du tannin (**Annexe 6**). L'analyse détaillée des taches de corrélation montre qu'il y a un déplacement de certaines d'entre elles. Les modifications les plus importantes sont obtenues pour certaines positions comme les groupes $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ (γ), CH_2 (β), CH_2 (α) et C2 du POPC dans la dimension F1 (^1H) et pour les positions C3 et C6 du cholestérol dans la dimension F2 (^{13}C). Des expériences similaires ont été effectuées avec les MLV de POPC/CH en présence du B_1 . Comme pour la catéchine, les variations les plus importantes sont pour les groupes $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ (γ) et CH_2 (β) du POPC et pour les positions C3 et C6 du cholestérol.

L'analyse des variations de déplacement chimique du proton ^1H et du carbone ^{13}C à la fois pour la catéchine et le B_1 est détaillée sur la **figure 13**. Pour les variations de déplacement chimique du ^{13}C , on peut constater que l'ensemble des positions sur le POPC sont affectées de manière sensiblement identique en présence de la catéchine ou du B_1 , avec des variations importantes pour les carbones du squelette glycérol (G1, G2 et G3). Dans le cas du cholestérol, des différences notables sont observées selon le tannin. La catéchine semble

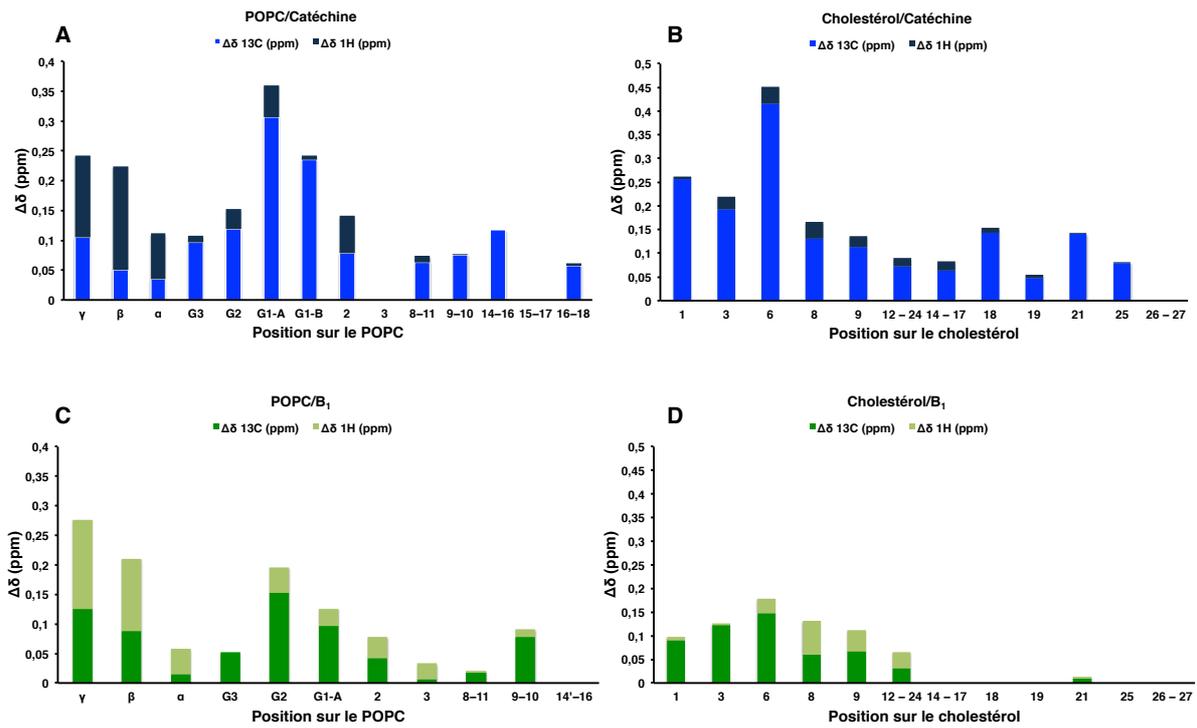


Figure 13 : Variations des déplacements chimiques ($\Delta\delta$) ^1H et ^{13}C respectivement des signaux du POPC et du cholestérol en fonction de leurs positions sur le squelette lipidique suite à l'ajout de la catéchine (A) et (B) et du B₁ (C) et (D) pour les MLV de POPC/Cholestérol (70/30).

affectée toutes les positions alors que le B₁ n'affecte que les positions C1, C3, C6, C8, C9 et C12, les positions C3 et C6 étant les plus affectées. Les variations des déplacements chimiques du proton montrent pour le POPC des résultats proches de ceux obtenus lors de l'expérience 1D protons (**Fig.10**) : pour les deux tannins, les variations les plus importantes sont observées pour les protons de la tête choline (positions γ , β et α) tandis que les groupements du glycérol montrent des variations plus faibles. Concernant le cholestérol, on peut voir pour la catéchine que les variations sont faibles et touchent l'ensemble des protons de la molécule, alors que pour le B₁, les positions affectées sont semblablement les mêmes que celles du ¹³C.

Les résultats des expériences 2D concordent avec ceux de l'expérience 1D proton. La présence des tannins, catéchine ou B₁, affecte plus particulièrement les protons de la tête polaire du POPC et a également un impact sur les carbones du squelette glycérol. En outre, les variations sur le cholestérol montrent que la catéchine a un effet reparté sur l'ensemble du squelette carboné contrairement au B₁. Toutefois, on remarque dans les deux cas un effet plus marqué au niveau de la fonction hydroxyle et de la double liaison du cholestérol. Cela est en faveur d'une position interfaciale pour les deux tannins, avec une pénétration de la catéchine dans la membrane un peu plus importante que le B₁, ce qui pourrait expliquer qu'elle perturbe les lipides sur l'ensemble de leur structure.

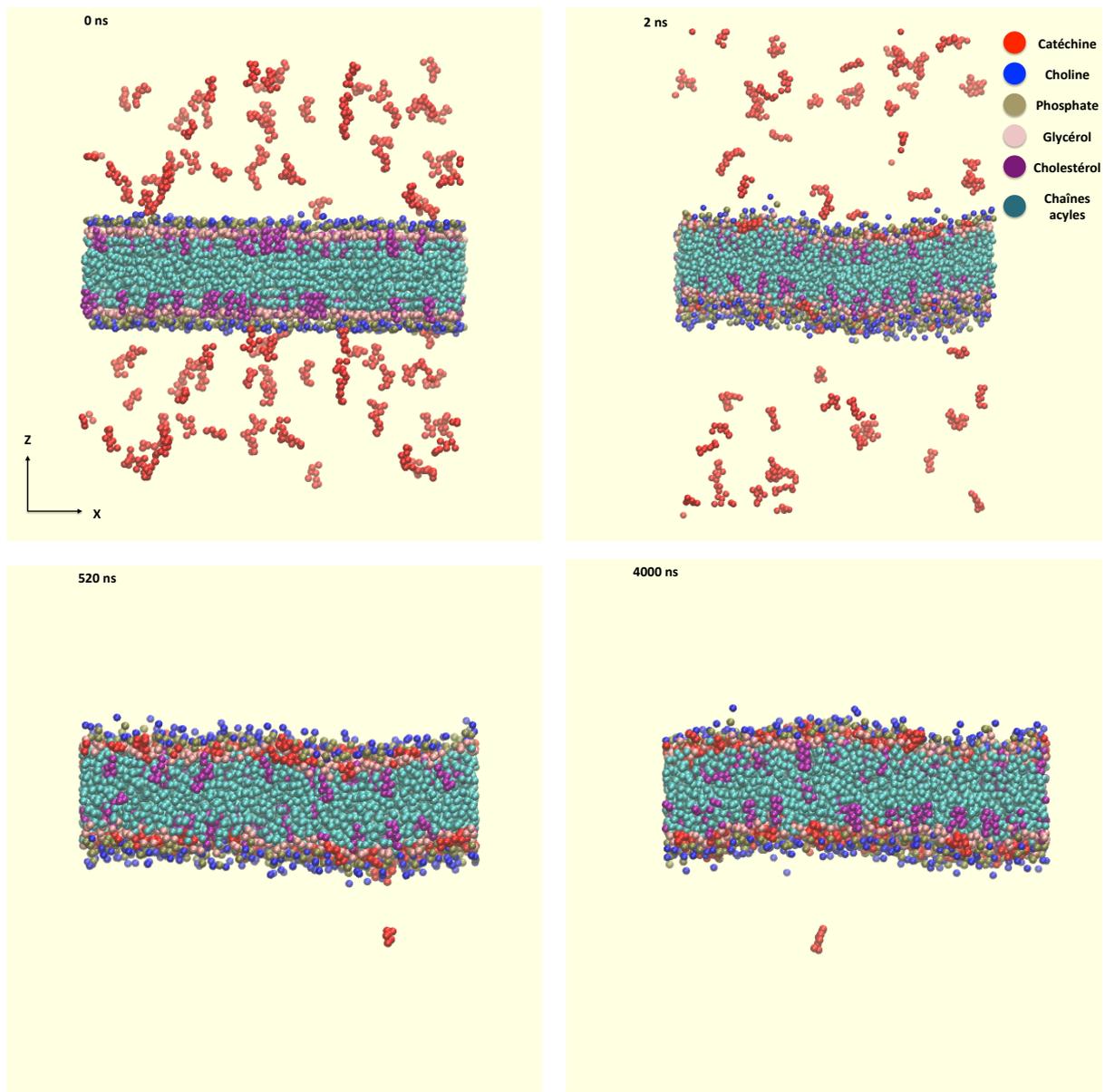


Figure 14 : Représentation instantanée de l'évolution de la dynamique moléculaire d'une bicouche de POPC/CH (335 molécules de POPC et 142 de CH) en présence de catéchine (100 molécules) à 0, 2, 520 et 4000 ns dans une boîte contenant 18157 particules d'eau (non représentées pour plus de clarté). Les catéchines sont représentées en rouge, les groupements du POPC cholines en bleu, phosphates en vert, le squelette glycérol en rose, les chaînes acyles en bleu-vert et le cholestérol en violet. $T = 37^{\circ}\text{C}$. La boîte de simulation est cubique, de dimensions : $15.3 \times 9.5 \times 19.5$ nm.

II.3. Etude *in silico*

Pour avoir des informations supplémentaires sur la localisation des tannins dans les membranes lipidiques, des études de dynamique moléculaire (DM) ont été réalisées en parallèle de la RMN. En premier lieu, une membrane de POPC/CH (70/30) composée de 335 molécules de POPC et 142 molécules de cholestérol a été construite et équilibrée dans une boîte contenant 18157 particules d'eau. Puis une simulation de 4 μ s a été faite en présence de 100 molécules de catéchine à une température de 37°C (voir Chapitre I, partie III.6). Dans ces conditions, une étude de DM préalable a montré que la catéchine est sous forme agrégée, c'est-à-dire à une concentration au-dessus de sa CMC. Cette étude a été faite en collaboration avec Dr. Nada Taib-Maamar de l'équipe d'Isabelle Bestel de CBMN.

La figure 14 présente l'évolution du système au cours de la dynamique. Avant la simulation, les molécules de catéchine ont été réparties de façon aléatoire dans l'eau en dehors de la bicouche de POPC/CH comme on peut le voir sur l'image à $t = 0$ ns. On remarque également que les molécules de catéchines sont principalement sous forme agrégée conformément au fait que la simulation a été réalisée au-delà de la CMC. Très vite après que la dynamique a débuté, on constate que plusieurs molécules de catéchine ont déjà pénétrées dans la membrane lipidique ($t = 2$ ns) et une ondulation de celle-ci. A 520 ns, toutes les molécules, sauf une, sont insérées à l'intérieur de la bicouche. Cette situation reste inchangée jusqu'à la fin de la simulation ($t = 4$ μ s). On observe sur l'image à 4 μ s que toutes les catéchines sont restées à l'interface de la bicouche lipidique et qu'aucune molécule n'est présente dans le cœur hydrophobe. Elles sont par ailleurs très majoritairement sous forme monomérique. La localisation des molécules de catéchine au sein de la bicouche est donnée en détail sur la **figure 15**. Par rapport aux molécules de POPC, on constate qu'elles sont localisées sous les groupements cholines et entre les groupes phosphates et les squelettes glycérol (**Fig.15.A et B**). Par rapport aux molécules de cholestérol, les catéchines sont positionnées juste au-dessus (**Fig.15.C et D**). Pour confirmer ces résultats, un profil de densité des différents groupements moléculaires a été réalisé.

Puisque la normale à la bicouche est parallèle à l'axe Z, le profil de densité le long de cet axe est un bon indicateur pour étudier la position moyenne et la pénétration de la catéchine à l'intérieure de la membrane lipidique. Dans un souci de clarté, les profils de densité des groupements cholines, phosphates et glycérols par rapport à celui des catéchines ont été montrés séparément du profil des cholestérols (**Fig.16**). Conformément aux images, on peut

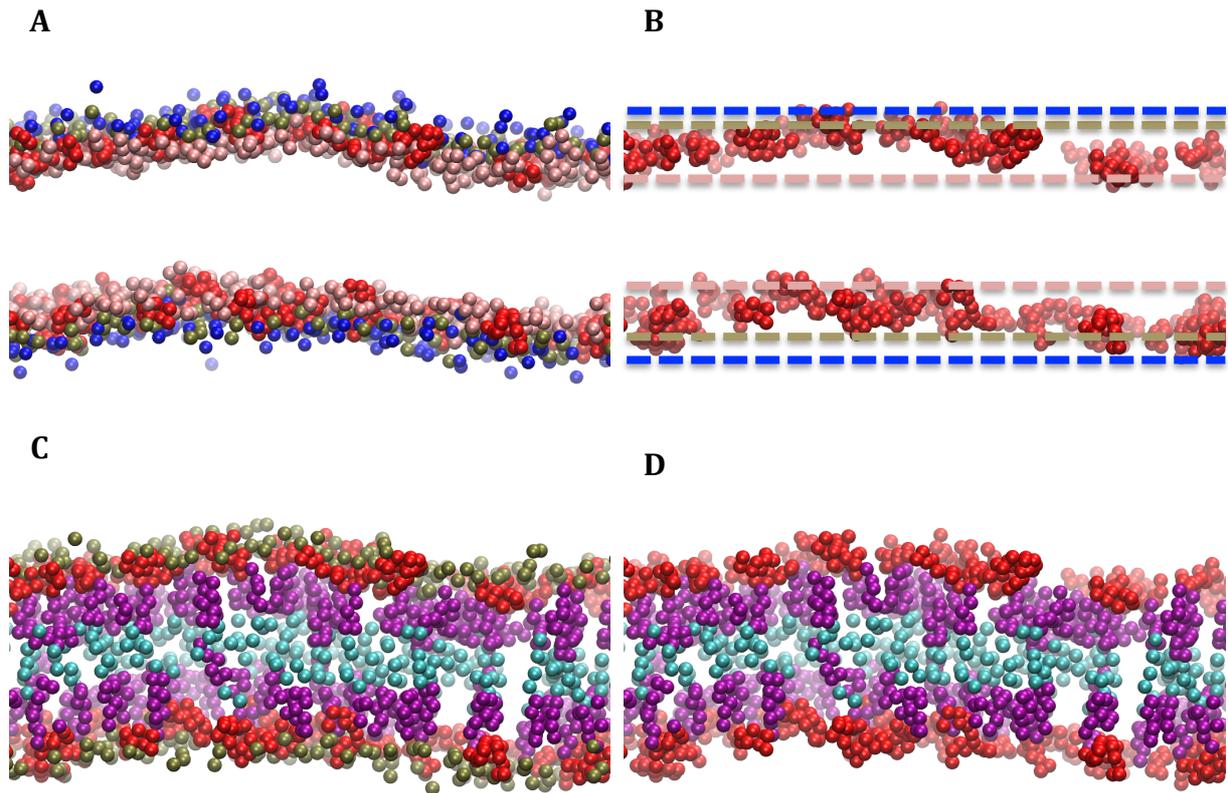


Figure 15 : Différentes représentations à 4 μ s de la bicouche de POPC/CH en interaction avec les catéchines pour visualiser le positionnement des molécules de tannins. Les catéchines sont représentées en rouge, les groupements cholines en bleu, les groupes phosphates en vert, les squelettes glycérol en rose, les chaînes acyles en bleu-vert et les molécules de cholestérol en violet. Représentation des catéchines, des cholines, des phosphates et des glycérols (A). Représentation des catéchines uniquement par rapport à la position moyenne des cholines, des phosphates et des glycérols (B). Représentation des catéchines, des phosphates et des cholestérols (C). Représentation des catéchines et des cholestérols (D).

voir que la densité des catéchines est distribuée entre les trois groupements du POPC ; elle se superpose en partie à celle des phosphates et son maximum de densité est situé entre celui des glycérols et des cholines (**Fig.16.A**). On observe également que sa densité maximale se situe au-dessus de celle des cholestérols (**Fig.16.B**).

Afin de savoir si l'effet fluidifiant de la catéchine est visible en dynamique moléculaire, nous avons étudié l'évolution de l'épaisseur de la bicouche lipidique (distance entre les barycentres des groupements phosphates des deux monocouches) durant la simulation (**Fig.17**). On observe deux phases : une première phase jusqu'à 900 ns où l'épaisseur de la membrane oscille autour de 40 Å avec deux fluctuations importantes vers 600 ns et 800 ns. Cette première phase est suivie d'une deuxième phase où l'épaisseur de la membrane augmente d'abord de 40 à 60 Å jusqu'à 1000 ns puis oscille ensuite autour de cette valeur jusqu'à la fin de la simulation. Finalement à 4000 ns, la membrane a une épaisseur d'environ 50 Å.

Les résultats issus de l'étude par dynamique moléculaire montrent d'une part, par la formation d'agrégats de tannins dans l'eau avant de lancer la simulation, que le comportement de la catéchine par l'approche *in silico* est conforme à son comportement expérimental, à savoir sa capacité de s'auto-associer dans l'eau pour une concentration supérieure à sa CMC (Pianet *et al.*, 2008). En présence d'une membrane, cet équilibre est déplacé vers la forme monomérique, suggérant que les interactions catéchine-lipide sont favorisées par rapport aux interactions catéchine-catéchine. Concernant l'interaction tannin-membrane, la simulation numérique a montré que la catéchine s'insère dans la membrane de POPC/CH et qu'elle reste à l'interface de la bicouche au niveau des groupements phosphates sans diffuser vers le cœur hydrophobe de la membrane. En outre, au vu des images et des profils de densité moléculaire, la position de la catéchine proche de la tête polaire du POPC et son positionnement au-dessus du cholestérol, suggère qu'elle interagit avec les groupements polaires des lipides (groupements phosphates, cholines et fonctions carbonyles sur le squelette glycérol du POPC et fonction hydroxyle du cholestérol). De plus, nous avons observé lors de la simulation que les molécules de catéchine se dirigent très rapidement vers la membrane (après 2 ns) et qu'une fois qu'elles sont insérées, elles restent à l'intérieur de la bicouche sans retourner dans l'eau. Ce comportement concorde avec la nature chimique hydrophobe de la catéchine dont le coefficient de partage octanol/eau K_{ow} est de 2.4 (soit une fraction molaire dans l'octanol de 71%). Ainsi, en présence d'une membrane, la catéchine a plus tendance à interagir avec la bicouche lipidique de nature amphiphile qu'avec les molécules d'eau hydrophiles de la phase continue.

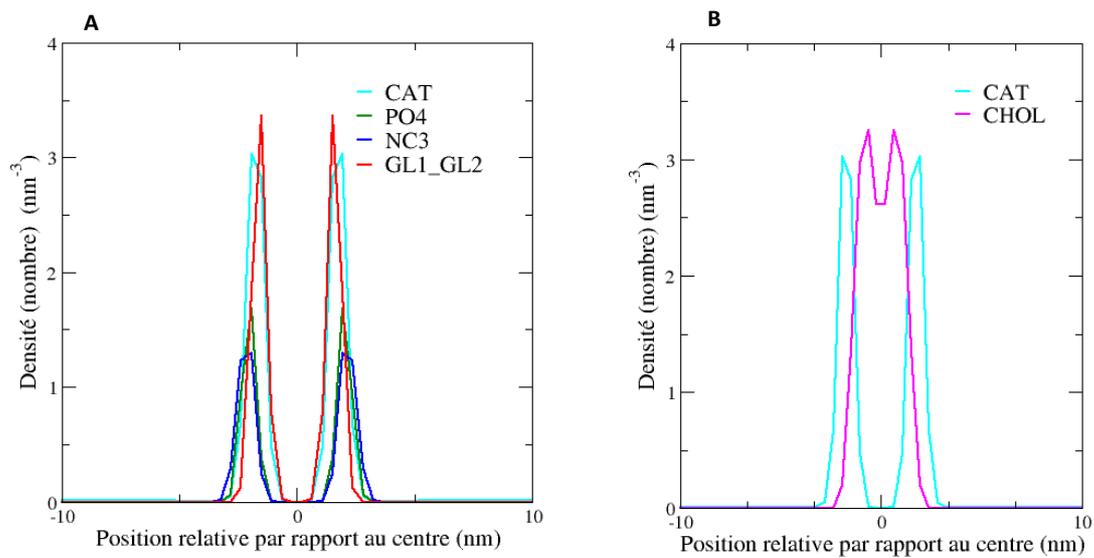


Figure 16 : (A) Profil de densité de la catéchine (CAT), du groupement phosphate (PO4), de la tête choline (NC3) et du groupement glycérol (GL1-GL2) (A) et celui de la catéchine et du cholestérol (CHOL) (B) par rapport au centre de la bicouche (0 nm).

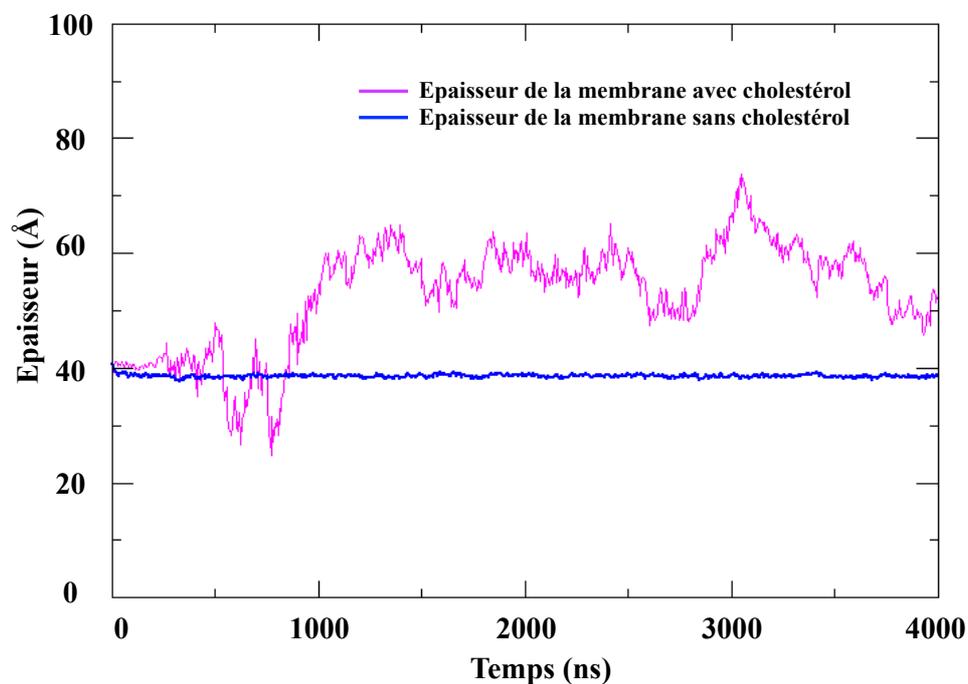


Figure 17 : Evolution de l'épaisseur membranaire au cours de la dynamique moléculaire du système lipidique avec de la catéchine en absence (courbe bleue) et en présence du cholestérol (couleur rose). L'épaisseur membranaire est définie par la distance des barycentres des groupements phosphates entre les deux monocouches de la membrane.

Concernant les résultats obtenus à partir du profil de l'épaisseur membranaire de la membrane de POPC/CH, les diminutions d'épaisseur observées jusqu'à 900 ns sont sans doute à attribuer à une réorganisation de la membrane causée par l'insertion des molécules de catéchine. En effet, les images de la figure 14 montrent qu'à 520 ns toutes les catéchines sont insérées dans la bicouche lipidique de POPC/CH. Une fois cette phase de réorganisation passée, l'épaisseur membranaire subit des variations mais reste sensiblement identique jusqu'à la fin de la simulation. L'interaction de la membrane avec le tannin se traduit au final par une augmentation de son épaisseur, c'est-à-dire en termes d'ordre à une augmentation de l'ordre membranaire. Ce résultat étant contraire à l'effet fluidifiant des tannins observés en RMN, on a voulu s'assurer que l'augmentation d'épaisseur était bien liée à un effet du tannin. Pour cela, nous avons réalisé la même expérience avec une membrane de POPC seul ne comprenant pas de cholestérol, dont l'équilibration et la dynamique en présence de catéchine ont été réalisées dans les mêmes conditions que pour la membrane de POPC/CH. Dans ce cas, aucune variation de l'épaisseur n'est observée (**Fig.17, courbe bleue**). Ce qui signifie que l'insertion de la catéchine dans la membrane n'est pas à l'origine de l'augmentation d'épaisseur observée dans le cas de la membrane de POPC/CH. Toutes choses égales par ailleurs, seule la présence de cholestérol pourrait expliquer cette différence de comportement entre les deux membranes étudiées. Ainsi, l'augmentation de l'épaisseur sur la membrane de POPC/CH n'est que la traduction de l'effet rigidifiant bien connu du cholestérol sur une membrane fluide comme c'est le cas d'une membrane de POPC seul (Hung *et al.*, 2007, Hsueh *et al.*, 2007, Pencer *et al.*, 2005). Ainsi à 37°C, la catéchine a un effet neutre (ni fluidifiant, ni rigidifiant) sur la membrane en dynamique moléculaire. Ce qui corrobore les résultats que nous avons obtenus par RMN. En effet, les profils du premier moment spectral M_1 ont montré que l'effet fluidifiant de la catéchine sur les membranes lipidiques diminue avec l'augmentation de la température, et que notamment à 37°C, l'effet de désordre de la catéchine n'est presque plus visible (**Fig.4.A**).

III. Discussions des résultats de l'effet des tannins sur l'organisation et la dynamique des membranes lipidiques

III.1. Effet fluidifiant des tannins sur les membranes lipidiques

D'après nos résultats, la catéchine et le B₁, deux résidus majoritairement présents dans les tannins condensés du vin rouge, exercent un effet fluidifiant sur des MLV de POPC/CH (70/30) ; ils augmentent le désordre des chaînes acyles du POPC et diminuent l'épaisseur de la bicouche des membranes lipidiques. Les interactions tannins-lipides ont déjà fait l'objet de plusieurs études dans la littérature. Furlan *et al.* (2014, 2016) ont montré que les tannins ont un effet fluidifiant sur deux types de membranes synthétiques : des MLV de DMPC et des MLV de DMPC/CH (82/18). Les tannins diminuent la température de transition de phase gel-fluide du DMPC et augmentent le désordre du cœur hydrophobe des lipides, avec un effet plus important à l'interface qu'au centre de la bicouche lipidique. En revanche, ils ont montré que la catéchine a un faible effet de désordre sur des membranes de DMPC contenant 40% molaire de cholestérol, indiquant que l'effet fluidifiant des tannins est plus effectif sur des membranes semi-fluides. Nos résultats sont en accord avec ce qui a été démontré et confirment l'effet fluidifiant des tannins sur un modèle de membranes buccales contenant majoritairement du POPC mais qui reste néanmoins en phase fluide bien qu'il contienne 30% de cholestérol, composé connu pour son effet rigidifiant sur les membranes lipidiques fluides (Hung *et al.*, 2007, Dufourc, 2008, Meyer *et al.*, 2009). De plus, Furlan *et al.* ont démontré qu'un tannin hydrophobe tel que l'EGCG (avec un coefficient de partage octanol/eau K_{ow} de 12.1 correspondant à une fraction molaire dans l'eau x_{eau} de 7.6%) a un effet fluidifiant plus important sur les membranes lipidiques que la catéchine ou l'épicatéchine ($K_{ow} = 2.4$, $x_{eau} = 29.4\%$). Par ailleurs, Yu *et al.* (2011) ont mis en évidence que la polarité du polyphénol influe sur son interaction avec la membrane lipidique. Ils ont montré que, plus le caractère lipophile des tannins est important, plus ils sont capables de désorganiser les membranes du DMPC. Ils ont notamment démontré qu'un tannin apolaire tel que le PGG ($K_{ow} = 100$, $x_{eau} = 1\%$) induit une diminution plus importante des éclatements quadripolaires des spectres RMN-²H des lipides qu'un tannin polaire tels que le trimère C₃ ($K_{ow} = 0.12$, $x_{eau} = 89.3\%$), ce qui va à l'encontre de nos résultats qui montrent que l'effet fluidifiant du B₁ est plus important que celui de la catéchine sur les membranes lipidiques. Or d'un point de vue chimique, le B₁ ($K_{ow} = 0.3$) est plus hydrophile que la catéchine ($x_{eau} = 77\%$ vs $x_{eau} = 29.4\%$). Cependant, il a été montré que d'autres facteurs tels que la masse moléculaire, la structure des tannins, et le

nombre de groupements hydroxyles peuvent également jouer un rôle sur la réactivité des tannins pour les lipides et sur leurs effets sur l'organisation et la dynamique des membranes (Phan *et al.*, 2014). Ainsi, le B₁ qui possède plus de substituants hydroxyles (10 vs 5) que la catéchine, serait donc capable de former plus de liaisons hydrogène avec les groupements oxygénés du lipide que la catéchine. En conséquence, son affinité plus marquée pour les lipides que la catéchine se traduit par un effet de désordre plus important. Selon les résultats que nous avons obtenus sur les paramètres d'ordre, les deux tannins induisent un désordre sur l'ensemble de la chaîne acyle du lipide avec un effet plus important pour le B₁. Le B₁, ayant une masse moléculaire deux fois plus importante que celle de la catéchine (578 vs 290 g/mol), va occuper un volume plus important au niveau du squelette glycérol. En occupant plus de place au niveau l'interface, il va induire une expansion latérale des têtes polaires, ce qui va conduire à l'éloignement des chaînes acyles qui vont devenir plus mobiles et dynamiques car elles ont plus de place pour se mouvoir. Par conséquent, l'interaction des tannins avec les lipides conduit donc non seulement à une expansion latérale de la bicouche mais également à une compression longitudinale, du fait d'un désordre plus important des chaînes, ce qui se traduit par une diminution de l'épaisseur membranaire (*cf. Figure 5*). Nos résultats vont donc dans le sens d'études antérieures qui ont mis en évidence une relation entre la dynamique de la membrane et l'aire par molécule de lipide (Lee *et al.*, 2004, Meyer *et al.*, 2009, Zhu *et al.*, 2016). Meyer *et al.* (2009) ont montré que le cholestérol, une molécule qui a un effet rigidifiant sur les membranes lipidiques fluides, diminue l'aire par molécule de lipide, et augmente l'épaisseur membranaire. Lee *et al.* (2005) ont montré, en présence de molécules comme le DMSO ou le MeOH qui diminuent l'ordre des systèmes membranaires, une augmentation de l'aire par molécule de lipide dans la membrane, ce qui indique qu'une augmentation de la fluidité des membranes lipidiques est liée à une augmentation de l'aire par molécule de lipide. C'est ce que nous suggérons dans c'est le cas de notre système lipidique de POPC/CH (70/30) en présence des tannins.

III.2. Effet fluidifiant conjugué des tannins et de l'éthanol sur les membranes lipidiques

L'éthanol fluidifie le système lipidique de POPC/CH (70/30), ce qui est en accord avec l'effet de désordre bien connu de l'éthanol sur les membranes lipidiques (Furlan *et al.*, 2016, Patra *et al.*, 2006, Armbrecht *et al.*, 1983). L'éthanol s'insère dans les membranes lipidiques au

niveau du glycérol et forme des liaisons hydrogène avec les groupements carbonyles et phosphates du lipide (Patra *et al.*, 2006). Nos résultats montrent que l'effet de désordre de l'éthanol est plus important pour des positions proches du squelette glycérol du lipide qu'en profondeur comme c'est le cas pour les tannins, ce qui indique que les tannins et l'éthanol sont vraisemblablement localisés au même niveau dans les membranes. Ainsi, un effet stérique plus important pourrait être créé au niveau des têtes polaire du lipide lorsque les tannins et l'éthanol sont présents ensembles. Ce qui pourrait expliquer l'effet fluidifiant plus important perçus par les lipides en présence des tannins et d'éthanol ensembles. Si on compare les rapports molaires tannin/lipide et éthanol/lipide (0.1 vs 13 en présence de catéchine et 0.033 vs 13 en présence du B₁) on voit qu'il y a plus de molécules d'éthanol que de tannins dans le milieu. L'effet fluidifiant par molécule produit par les tannins est donc plus important pour que celui produit par les molécules d'éthanol. L'effet de désordre des tannins sur les membranes lipidiques est plus important que celui de l'éthanol, il persiste en présence de l'éthanol et s'ajoute à ce dernier. Ainsi, durant la dégustation d'un vin, les deux molécules étant présentes ensemble, elles vont exercer un effet fluidifiant concomitant sur les membranes buccales.

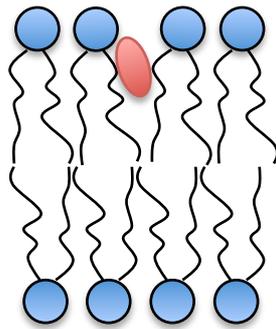
III.3. Localisation des tannins à l'interface des membranes lipidiques

Nous avons étudié la localisation des tannins dans les membranes de POPC/CH (70/30) en utilisant deux approches : la RMN et la dynamique moléculaire. Nous avons montré par RMN 1D et 2D que l'interaction entre les tannins et les lipides se fait au niveau de la tête polaire du POPC à proximité de la tête choline et des groupements du glycérol, et que les tannins sont localisés préférentiellement à l'interface des membranes buccales. Ces résultats sont accord avec ceux de la littérature, où la plupart des études ont montré que les tannins restent à l'interface des membranes lipidiques et ne diffusent pas dans le cœur hydrophobe. Uekusa *et al.* (2007, 2011) ont signalé que les tannins restent à l'interface des membranes de DMPC au niveau des groupements cholines et phosphates. Furlan *et al.* (2014) ont observé grâce à des études par RMN du proton des variations importantes de déplacements chimiques des groupements de la tête polaire du lipide, alors que ceux des chaînes acyles sont très faibles, indiquant que les tannins interagissent avec les lipides à l'interface et ne pénètrent pas dans le cœur hydrophobe. Ces études considèrent que la localisation des tannins dans les membranes lipidiques dépend de leurs propriétés hydrophiles-hydrophobes (coefficient de partage octanol/eau). Un tannin hydrophobe s'insère plus dans les membranes lipidiques pour

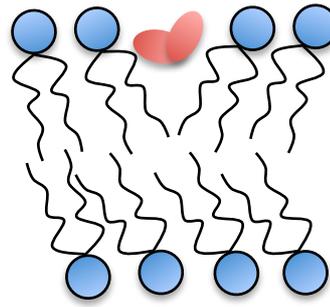
interagir avec les chaînes hydrophobes qu'un tannin hydrophile qui reste à l'interface eau-lipide et génèrent des liaisons hydrogène avec les groupements oxygénés de la tête polaire. La catéchine est plus hydrophobe que le B₁ ; dans un mélange octanol/eau, sa fraction molaire dans l'eau est 2.6 fois plus petite que celle du B₁ ($x_{eau} = 29.4\%$ vs $x_{eau} = 77\%$). Elle devrait normalement pénétrer plus dans la membrane que le B₁. Les résultats des déplacements chimiques du cholestérol viennent confirmer cette suggestion. Dans cette étude, nous avons montré pour la première fois une interaction entre les tannins et le cholestérol dans une membrane lipidique. Grâce aux expériences 2D ¹H-¹³C-INEPT, nous avons attribué les signaux des protons et des carbones du cholestérol dans un milieu membranaire anisotrope. Nous avons alors observé que la catéchine perturbe l'environnement électronique de l'ensemble du squelette carboné du cholestérol alors que le B₁ touche plus particulièrement des positions sur le cholestérol proches de l'interface membranaire (positions 6 et 3), sachant que le cholestérol s'insère perpendiculairement par rapport au plan de la bicouche avec son groupement hydroxyle (position 3) localisé au niveau du squelette glycérol et sa chaîne alkyle qui s'étend en profondeur vers le centre hydrophobe du lipide (Dufourc, 2008, Léonard *et al.*, 2001, Ferreira *et al.*, 2013). Les résultats de la dynamique moléculaire confirment la localisation interfaciale des tannins dans les membranes lipidiques. Les études de densité ont montré que la catéchine est localisée au niveau des groupements glycérol et phosphate du POPC, en dessous de la tête choline. De plus, ils ont mis en évidence un recouvrement entre la densité de la catéchine et celle du cholestérol, ce qui est en faveur d'une interaction entre la catéchine et le cholestérol.

En s'appuyant sur cette localisation, on peut rendre compte des interactions qui peuvent se développer entre les tannins et les membranes lipidiques. Avec le phospholipide, des interactions de type liaisons hydrogène sont capables de se former entre les tannins et les groupements oxygénés des phosphates et des fonctions esters du glycérol. Des interactions de type cation- π sont également susceptibles de se former entre les cycles aromatiques des tannins et l'ammonium quaternaire de la fonction choline. Avec le cholestérol, des liaisons hydrogène sont favorables entre la fonction hydroxyle du cholestérol et les fonctions alcool des tannins. Des interactions de type π - π peuvent aussi avoir lieu entre les cycles aromatiques des tannins et la double liaison du cholestérol.

Les résultats obtenus sur le désordre membranaire induits par les tannins et leur localisation laissent supposer que le dimère B₁ est plutôt localisé au niveau des têtes polaires des lipides de par son caractère hydrophile et provoque par sa taille plus importante que la catéchine une



Catéchine
 $x_{\text{eau}} = 29.4\%$



B₁
 $x_{\text{eau}} = 77\%$

Figure 18 : Schéma expliquant l'effet des tannins sur l'ordre des chaînes acyles du POPC en fonction de leur localisation dans la membrane.

expansion de la membrane au niveau des têtes, conduisant à un écartement des chaînes. Celles-ci ont alors plus de place pour se mouvoir ce qui explique l'effet de désordre plus important du B₁ sur la chaîne acyle du lipide. La catéchine, quant à elle, plus hydrophobe et plus petite est sans doute un peu plus ancrée dans le cœur de la membrane et par interaction avec les chaînes induit leur rapprochement. Celles-ci plus compactes sont moins dynamiques d'où un effet de désordre moins important. Une illustration de ces résultats est proposée sur la **figure 18**.

III.4. Implication des interactions tannin-lipide dans le goût du vin

Durant la dégustation d'un vin, les membranes buccales, les protéines salivaires et les récepteurs du goût entrent en contact avec les molécules présentes dans le vin et notamment les tannins. Des interactions complexes sont à l'origine des perceptions complexes senties dans la bouche, parmi lesquelles l'amertume et l'astringence. L'amertume est le résultat des interactions entre les tannins et les récepteurs du goût enchâssés dans des matrices lipidiques à l'intérieur de la bouche, alors que l'astringence est la sensation de sécheresse ressentie dans la bouche suite à l'interaction entre les tannins et les protéines salivaires. Des interactions entre les tannins et les lipides des membranes buccales, des nouveaux acteurs moléculaires, vont venir s'ajouter à ces interactions et participer de façon indirecte aux sensations d'astringence et d'amertume.

Dans cette étude, nous avons montré que des modèles de tannins du vin comme la catéchine et le B₁ interagissent avec des modèles lipidiques qui miment les membranes buccales, fluidifient et augmentent le désordre de ces membranes. Les récepteurs du goût amer sont des protéines membranaires qui appartiennent à la famille des récepteurs couplés aux protéines G (GPCR) (Chandrachekar *et al.*, 2006). L'interaction des molécules de goût avec ces récepteurs va créer une cascade de réactions qui conduit à un signal de transduction du goût qui sera interprété par le cerveau. Un changement dans les propriétés physiques des membranes tels que la fluidité, l'épaisseur de la bicouche et la distribution des charges à la surface des membranes lipidiques est capable de modifier l'activité, la fonction et la structure des protéines membranaires (Tillman et Cascio 2003). Niu *et al.* (2002) ont démontré par exemple que le cholestérol inhibe l'activité de la rhodopsine (une protéine qui appartient à la famille des GPCR) d'une façon indirecte en augmentant l'ordre des chaînes acyles des lipides, ce qui induit un changement dans l'équilibre conformationnel entre les deux états actif-inactif

de la protéine et par suite une modification de son activité. En se basant sur ces études, on peut s'attendre à ce que l'effet de désordre des tannins (ou tannins + éthanol) sur les membranes buccales affecte la fonction et l'activité des récepteurs du goût par un changement conformationnel ou une diffusion latérale des protéines. Par conséquent, la transduction du signal vers le cerveau en serait affectée et la sensation d'amertume modifiée.

Dans le contexte de l'astringence, puisque les tannins interagissent avec les protéines de la salive et sont susceptibles d'interagir avec les lipides, on peut supposer qu'au moment de la dégustation d'un vin, une compétition puisse avoir lieu entre les interactions tannin-protéine de la salive et tannin-lipide. L'astringence pourrait ainsi s'en trouver modifiée. L'étude menée au chapitre suivant sur l'affinité tannin-lipide permettra d'affirmer ou d'infirmer cette hypothèse en comparant notamment les constantes thermodynamiques de dissociation tannin-protéine de la salive trouvées de l'ordre du milli-molaire (Cala *et al.*, 2010) et celles relatives à l'interaction tannin-lipide.

Chapitre III

Affinité entre les tannins et les lipides membranaires

Dans la bouche, les tannins sont à l'origine de l'amertume et de l'astringence. L'amertume résulte d'une interaction spécifique des tannins avec les récepteurs du goût situés dans les papilles linguales (Chaudhari et Roper 2010), alors que l'astringence est une sensation de sécheresse dans la bouche, qui résulte d'une forte interaction entre les tannins et les protéines de la salive impliquées dans la lubrification de la cavité buccale, entraînant leur précipitation (Cala *et al.*, 2010, Green 1993). Le mécanisme de l'astringence a beaucoup été étudié dans la littérature, ainsi que la nature des interactions entre les tannins et les protéines de la salive (Haslam, 1988, Charlton *et al.*, 2002). Les travaux effectués par Cala *et al.* (2010) ont permis de quantifier les interactions tannin/protéine de la salive d'un point de vue thermodynamique. Des constantes de dissociation à l'échelle du millimolaire ont été déterminées entre des modèles de tannins (catéchine, B₁, C₂) et des fragments de protéines de la salive riches en proline impliquées dans la lubrification de la cavité buccale (IB₇₋₁₄, IB₉₋₃₇).

Des études récentes ont montré que les tannins sont susceptibles d'interagir avec les lipides (Furlan *et al.*, 2016 et 2014, Uekusa *et al.*, 2007). Nos résultats du chapitre II ont également mis en évidence une interaction entre des tannins du vin et un modèle de membrane buccale représenté par des MLV de POPC/CH (70/30). Or, les lipides sont présents lors de la dégustation d'un vin comme composants des membranes buccales dans la bouche ou des aliments gras. Nous sommes partis de l'hypothèse qu'une compétition entre les interactions tannin/lipide et tannin/protéine de la salive était susceptible de modifier la sensation d'astringence durant la dégustation d'un vin. Notre objectif a donc été d'étudier la force d'interaction entre les tannins et les lipides afin de déterminer les constantes d'association thermodynamiques et de les comparer avec celles des interactions tannin/protéine de la salive, pour enfin discuter des résultats obtenus dans le contexte de la dégustation du vin. Notre étude a plus particulièrement porté sur l'interaction entre les tannins et les lipides endogènes constituant les membranes buccales. Ces dernières ont été modélisées par des modèles membranaires composés de POPC/CH (70/30 molaire), les lipides majoritaires des membranes buccales. Nous avons utilisé deux modèles de tannins majoritairement présents dans les vins rouges, un monomère, la catéchine, et un dimère, la procyanidine B₁ (Silva *et al.*, 2012, Quideau *et al.*, 2011). Le dimère B₁ possède des cycles aromatiques et des groupements hydroxyles supplémentaires comparés à la catéchine, ce qui va nous permettre de regarder l'influence de la nature chimique des tannins sur leur affinité pour les lipides.

L'étude de l'affinité tannin/lipide a été effectuée par la titration des modèles de membranes buccales avec les deux composés tanniques, la catéchine et le B₁. Nous avons utilisé trois modèles différents de membranes buccales, selon la technique employée pour effectuer la titration : des MLV, des bicouches supportées et des LUV, respectivement pour les techniques de RMN, PWR et d'ITC. La RMN permet de suivre l'effet des tannins sur les déplacements chimiques des groupements des lipides. La PWR permet d'observer les variations des réflectances des polarisations p et s de la lumière suite à l'addition des tannins. L'ITC est capable de mesurer les échanges de chaleur induits par l'interaction entre les tannins et les lipides.

Dans ce chapitre, nous allons d'abord étudier l'affinité de la catéchine pour des MLV de POPC/CH par RMN du proton. La constante de dissociation sera déterminée à partir des courbes de variations de déplacements chimiques des groupements N⁺(CH₃)₃ et CH₂-N⁺ du POPC en fonction de la concentration en catéchine. Ensuite, nous allons étudier l'interaction de la catéchine et du B₁ avec une bicouche supportée de POPC/CH par PWR. Les constantes d'affinité seront déterminées par l'analyse des courbes de variation de résonance en fonction de la concentration en tannins. Dans la troisième partie, nous allons présenter une étude préliminaire par ITC de l'interaction des tannins avec des LUV. Enfin, nous allons mener une discussion sur les différents résultats obtenus, qui seront comparés avec ceux de la littérature et replacés dans le contexte de la dégustation du vin.

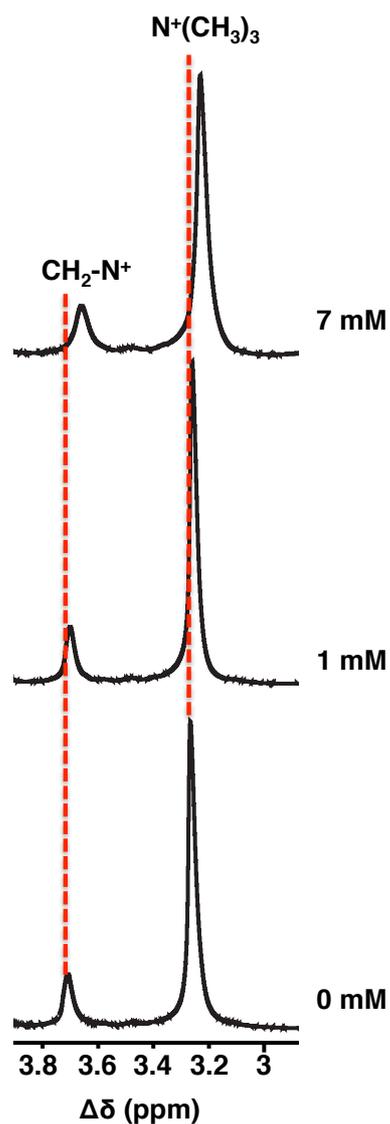


Figure 1 : Signal RMN- ^1H obtenu sur un spectromètre opérant à 500 MHz pour la région relative aux groupements $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ et $\text{CH}_2\text{-N}^+$ de MLV de POPC/CH en absence (0 mM) et en présence de catéchine (1 et 7 mM) dans du D_2O . Les déplacements chimiques sont référencés par rapport au signal du DSS fixé à 0 ppm. [Lipide] = 60 mM dont [POPC] = 42 mM et [CH] = 18 mM, T = 30°C, vitesse de rotation à l'angle magique = 10 kHz, nombre d'acquisitions additionnées = 256.

I. Détermination des constantes d'association par RMN-¹H

L'interaction des tannins avec les membranes lipidiques peut être quantifiée en suivant les variations des déplacements chimiques des protons des signaux des lipides en fonction de la concentration en tannins par RMN-¹H HR-MAS. Cette technique déjà vue au chapitre II (Partie II) permet de sonder l'effet des tannins sur l'environnement électronique des lipides. Pour l'étude de l'interaction entre deux types de molécules, tannins-lipides dans notre cas, il s'agit de reporter les variations de déplacement chimique des protons du (des) groupement(s) moléculaire(s) le plus perturbé en fonction de la concentration en tannins, puis d'ajuster la courbe expérimentale par une équation mathématique modélisant l'interaction afin de déterminer la constante de dissociation thermodynamique. Cette méthodologie a déjà été mise en œuvre pour l'étude de l'interaction entre les tannins et un modèle de peptide (IB₇₋₁₄) mimant les protéines de la salive riches en proline (Cala *et al.*, 2010). En effet, les auteurs ont suivi les variations des déplacements chimiques des protons des acides aminés du peptide en fonction de la concentration en tannins par RMN. Puis, à partir des courbes des variations des déplacements chimiques des protons des acides aminés les plus perturbés en fonction de la concentration en tannins, ils ont déterminé les constantes de dissociation tannin-peptide, en les ajustant avec l'équation mathématique dite de Baxter (Baxter *et al.*, 1997).

Notre étude a consisté à étudier l'interaction entre une dispersion de MLV de POPC/CH (70/30) avec des concentrations croissantes de catéchine, allant de 1 à 25 mM. Nous avons utilisé des concentrations inférieures et supérieures à la CMC de la catéchine (9 ± 2 mM) dans le but de savoir si elle interagit d'une manière différente avec les lipides, selon qu'elle est à l'état monomérique ou agrégé. L'étude a été réalisée à la température de 30°C, considérée comme la température moyenne de la bouche pendant la dégustation d'un vin. Dans un premier temps, nous avons suivi les variations de déplacement chimique des protons du lipide à une concentration de catéchine donnée afin de déterminer les protons les plus affectés par la présence de tannin. Conformément aux résultats du chapitre II (partie II), nous avons observé un effet de blindage (décalage vers les régions de faibles déplacements chimiques) de la catéchine sur les résonances des lipides. Cet effet augmente avec la concentration de catéchine (**Fig.1**). Comme vu précédemment, l'impact du tannin n'est pas uniforme pour l'ensemble des protons du lipide mais dépend de sa position dans la structure. Ainsi les variations de déplacement chimique les plus importantes correspondent aux protons des méthyles de l'ammonium quaternaire $N^+(CH_3)_3$ et aux protons en β du groupement phosphate ($PO_4^- - CH_2 - CH_2 - N^+(CH_3)_3$) du POPC (Fig.10, chapitre II). C'est pourquoi nous avons choisi

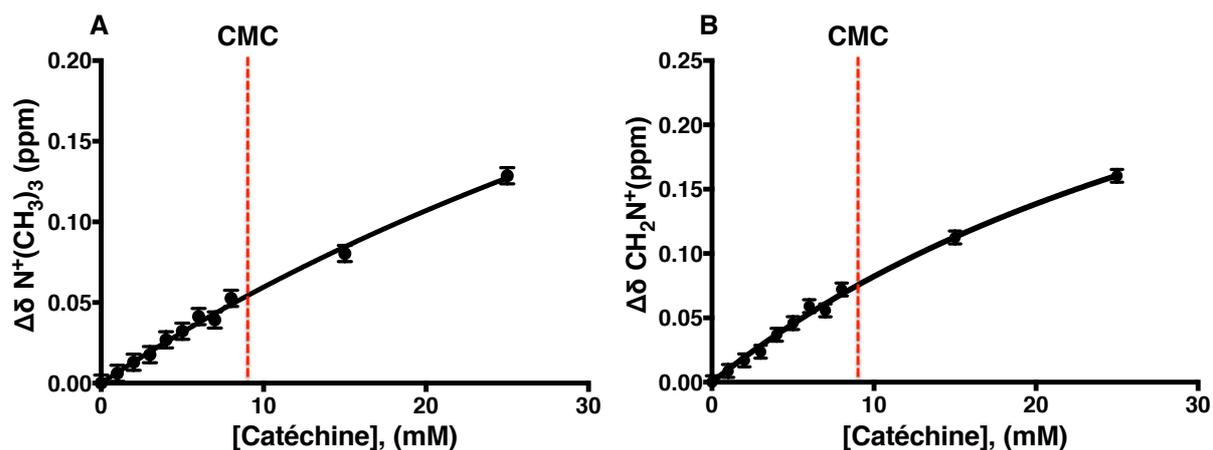


Figure 2 : Courbes de variation de déplacement chimique des protons des groupements $N^+(CH_3)_3$ (A) et CH_2-N^+ (B) du système POPC/CH en fonction de la concentration en catéchine. Les courbes sont ajustées avec l'équation d'interaction spécifique (voir texte). La ligne pointillée en rouge représente la CMC de la catéchine. L'erreur sur les variations des déplacements chimiques est estimée à ± 0.005 ppm.

de suivre les variations de déplacements chimiques de ces deux groupements afin de déterminer les constantes d'association tannins/lipides membranaires.

I.1. Affinité de la catéchine pour les membranes de POPC/CH

Les variations de déplacement chimique des groupements $N^+(CH_3)_3$ et CH_2-N^+ en fonction de la concentration de la catéchine sont présentées sur la **figure 2**. Nous observons des courbes croissantes où les variations de déplacements chimiques augmentent avec la concentration en catéchine. Celles-ci semblent tendre vers un palier pour les très hautes concentrations. Cette allure de courbe est à rapprocher de celle observée dans la littérature pour des interactions de type ligand-récepteur (L-R) (McPherson *et al.*, 1983, Sklar *et al.*, 1984). Par conséquent, afin de modéliser l'interaction tannins/lipides, les points expérimentaux ont été ajustés avec deux types d'équation mathématique classiquement utilisées dans le cadre d'une interaction ligand-récepteur, à savoir : le modèle de Hill et le modèle d'interaction spécifique, qui représente un cas particulier du modèle de Hill (McPherson *et al.*, 1983, Goutelle *et al.*, 2008, Hulme *et al.*, 2010). Ces modèles sont largement utilisés en pharmacologie, biochimie et physiologie pour analyser l'équilibre de liaison dans le cadre de l'interaction d'un ligand avec un récepteur ayant des sites d'interaction multiples (Weiss, 1997). L'équation de Hill décrit la liaison de α molécules de ligand (L) avec un même récepteur (R) :



Ces deux modèles correspondent respectivement aux deux équations mathématiques suivantes :

$$Y = \frac{B_{max} * X^n}{K_D^n + X^n} \quad (1)$$

$$Y = \frac{B_{max} * X}{K_D + X} \quad (2)$$

où ;

X représente la concentration du ligand à l'équilibre, et B_{max} la valeur au palier qui correspond à la valeur vers laquelle tend Y quand X tend vers $+\infty$. En effet dans ce cas, l'équation peut être écrite sous la forme :

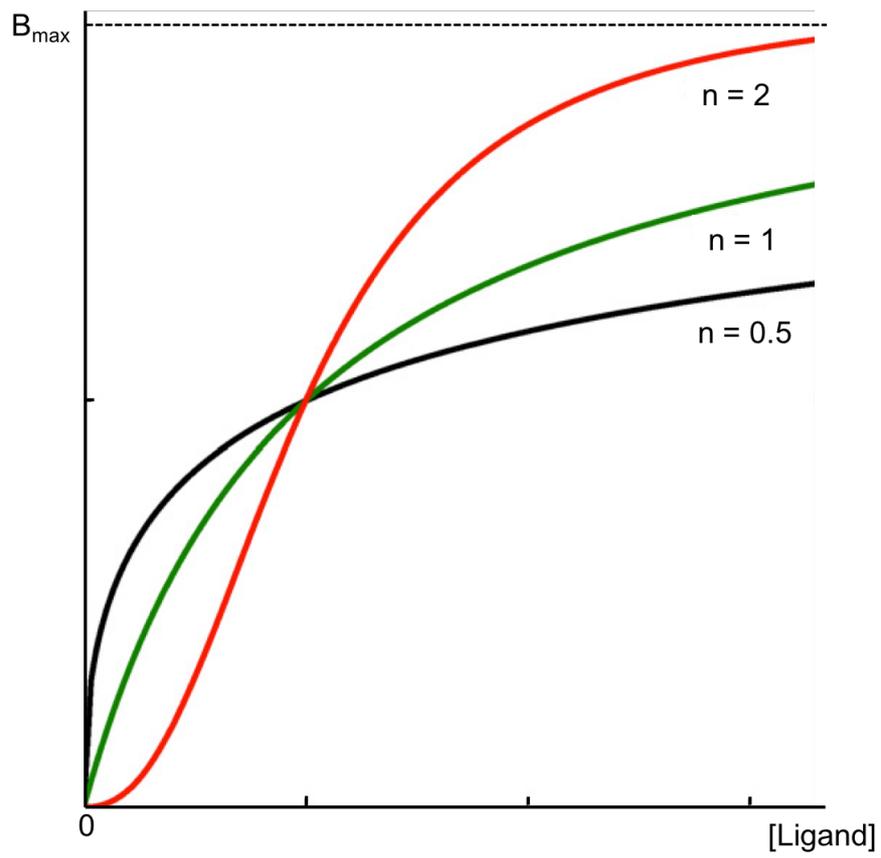


Figure 3 : Représentation de l'allure de la courbe d'interaction en fonction de la valeur du coefficient de Hill, n .

$$Y = \frac{B_{max}}{\left(\frac{K_D}{X}\right)^n + 1} \quad (3)$$

K_D est la constante de dissociation thermodynamique. Appliquée à notre cas, Y représente la variation de déplacement chimique des signaux du lipide $\Delta\delta$, X la concentration en catéchine et B_{max} le maximum de variation de déplacement chimique provoqué par la catéchine.

Le paramètre n est défini comme le coefficient de Hill. Il est couramment utilisé pour estimer le nombre de molécules de ligand qui sont nécessaires pour se lier à un récepteur afin de produire un effet fonctionnel. Cependant, le coefficient de Hill ne représente pas le nombre de sites de liaisons entre le ligand et le récepteur (stœchiométrie), quand plusieurs molécules de ligand se lient à un récepteur. La valeur de n est en effet généralement inférieure au nombre de sites de liaison. Il reflète plutôt le degré de coopérativité de la fixation du ligand (Weiss, 1997, Goutelle *et al.*, 2008). La coopérativité est une propriété qui rend compte du fait que les fixations des différents ligands au récepteur ne sont pas indépendantes l'une de l'autre. L'occupation d'un site donné par un ligand peut provoquer une augmentation ou une diminution de l'affinité de la fixation d'un autre ligand à un autre site d'interaction, on parle alors respectivement de coopérativité positive ou négative. Trois cas de figure peuvent se présenter selon la valeur du paramètre n :

- i) $n = 1$, la liaison des ligands aux différentes sites du récepteur est indépendante, il n'y a pas de coopérativité. Si on remplace n par 1 dans l'équation de Hill, on retrouve alors le modèle d'interaction spécifique.
- ii) $n > 1$, il s'agit d'une coopérativité positive. La fixation d'un ligand au récepteur augmente l'affinité de fixation d'un autre ligand à un autre site du récepteur. Dans le cas d'une coopérativité positive, n peut renseigner sur le nombre minimal de sites d'interaction (Weiss, 1997).
- iii) $0 < n < 1$, il s'agit d'une coopérativité négative, la fixation d'un ligand à un récepteur rend moins efficace la fixation d'un autre ligand au récepteur.

L'allure de la courbe d'interaction varie alors en fonction de la valeur de n (**Fig.3**). Dans le cas ou $n = 1$, la tangente à l'origine est positive et la courbe tend vers un plateau. Lorsque $n > 1$, la courbe est sigmoïdale avec une tangente à l'origine nulle, alors que pour $0 < n < 1$ la tangente à l'origine tend vers l'infini.

La méthodologie suivie pour déterminer les constantes de dissociation K_D a consisté à réaliser l'ajustement des variations de déplacement chimique par l'équation de Hill et l'équation

Groupement chimique	Type d'équation	$\Delta\delta_{\max}$ (ppm)	K_D (mM)	R^2	n
$N^+(CH_3)_3$	Interaction spécifique	0.53 ± 0.09	78 ± 17 (22%)	0.99	-
	Equation de Hill	1.13 ± 2.08	234 ± 588 (251%)	0.99	1.1 ± 0.1
CH_2-N^+	Interaction spécifique	0.44 ± 0.04	44 ± 6 (14%)	0.99	-
	Equation de Hill	0.33 ± 0.08	27 ± 11 (40%)	0.99	1.1 ± 0.1

Tableau 1 : Comparaison des paramètres obtenus entre l'ajustement des courbes avec l'équation d'interaction spécifique et l'équation de Hill. $\Delta\delta_{\max}$ = Valeur de déplacement chimique maximale (au plateau) en ppm, K_D = Constante de dissociation en mM, R^2 = Coefficient de détermination, n = Coefficient de Hill. La valeur en % correspond à l'erreur relative pour les valeurs de K_D .

d'interaction spécifique (cas de l'équation de Hill avec $n = 1$) avec le logiciel GraphPad Prism (version 6.0). L'ajustement retenu fut celui pour lequel les quatre conditions suivantes étaient réunies :

- i) Convergence de l'ajustement ;
- ii) Coefficient de détermination $R^2 \geq 0.90$; ce paramètre permet de déterminer à quel point l'équation de régression linéaire est adaptée pour décrire la distribution des points. Il varie entre 0 et 1. Lorsqu'il est proche de 1 le pouvoir prédictif du modèle mathématique utilisé est fort, alors que lorsqu'il est proche de 0 le pouvoir prédictif du modèle est faible.
- iii) Valeur du coefficient de Hill n cohérent avec l'allure de la courbe expérimentale ;
- iv) Erreur relative $e \leq 25\%$ pour la valeur du $\Delta\delta_{\max}$ et du K_D .

Les résultats obtenus pour les deux groupements moléculaires considérés sont présentés dans le **tableau 1**. Dans les deux cas, on constate que les résultats obtenus avec l'équation de Hill ne sont pas satisfaisants : écarts relatifs supérieurs à 25%, valeurs de $n > 1$ correspondant à une courbe sigmoïdale non conforme à l'allure de la courbe expérimentale. En revanche, on peut voir que les résultats de l'ajustement obtenu avec l'équation d'interaction spécifique répondent aux quatre critères de validation. Dans ce cas, nous avons obtenu une constante de dissociation moyenne K_D de 61 ± 11 mM et une valeur de $\Delta\delta_{\max}$ moyenne de 0.48 ± 0.07 ppm.

Une étude similaire n'a pu être réalisée pour le B_1 . En effet, dans le cas du système mixte MLV/ B_1 , une précipitation a été observée pour des rapports molaires B_1 /lipides supérieurs à 1/30 (Chapitre II, Fig.1.B). De plus, au rapport 1/30, les variations de déplacement chimique des signaux des lipides observées sont faibles, de l'ordre de 0.03 ppm (Fig.10, chapitre II). Ce qui signifie que pour réaliser une courbe de titration dans les conditions d'une dispersion vraie (sans présence de précipité), il aurait fallu travailler à des rapports B_1 /lipide inférieurs à 1/30 impliquant des variations de déplacement chimique de plus en plus faibles. Or l'erreur sur la variation de déplacement chimique entre deux pics de résonance déterminée sur le logiciel Topspin étant de 0.005 ppm, l'imprécision sur les mesures aurait été trop importante pour estimer une constante de dissociation fiable.

I.2. Discussion des résultats obtenus par RMN

A partir des résultats de l'ajustement des courbes de variation de déplacement chimique, nous avons calculé les constantes d'association catéchine/membrane lipidique. Nous avons obtenu un K_A moyen de $16 \pm 2.8 \text{ M}^{-1}$, ce qui montre que la catéchine a une affinité pour les membranes de POPC/CH, mais que celle-ci est relativement faible.

Par ailleurs, les tannins sont capables de former des agrégats micellaires au-dessus de leur concentration micellaire critique (Pianet *et al.*, 2008). Dans le cas de la catéchine, la CMC est de $9 \text{ mM} \pm 2$, ce qui indique que pour les concentrations utilisées pour l'étude de l'affinité tannins/lipides en dessous de 8 mM , la catéchine interagit avec les lipides à l'état monomérique, alors que pour les concentrations de 15 et de 25 mM , elle est à l'état d'agrégat. Toutefois, nous n'avons pas observé un changement dans l'allure des courbes de variation de déplacement chimique pour des concentrations en catéchine au-delà de la CMC. Ceci montre que l'interaction de la catéchine avec les membranes lipidiques est indépendante de sa CMC. Ce résultat peut être interprété par l'hypothèse que la CMC des tannins varie en présence des membranes lipidiques. L'équilibre entre les formes monomères/agrégats est déplacé vers les formes monomériques des tannins, qui vont interagir avec les lipides plutôt que de s'associer entre eux. Cette hypothèse est supportée par les résultats de Pianet *et al.*, (2008) qui ont démontré que la CMC des tannins ou leur solubilité, est plus importante dans un milieu hydro-alcoolique ($16 \pm 1 \text{ mM}$ pour la catéchine) que dans un milieu aqueux ($9 \pm 2 \text{ mM}$). C'est pourquoi il n'y a pas de différence observée pour des concentrations inférieures ou supérieures à la CMC.

Afin de valider les résultats obtenus par la méthode RMN et par ailleurs pour s'affranchir des conditions expérimentales limitantes dans le cas du B_1 , une étude d'affinité des tannins pour les membranes lipidiques a également été menée en utilisant la technique de spectroscopie plasmonique aux ondes guidées (PWR).

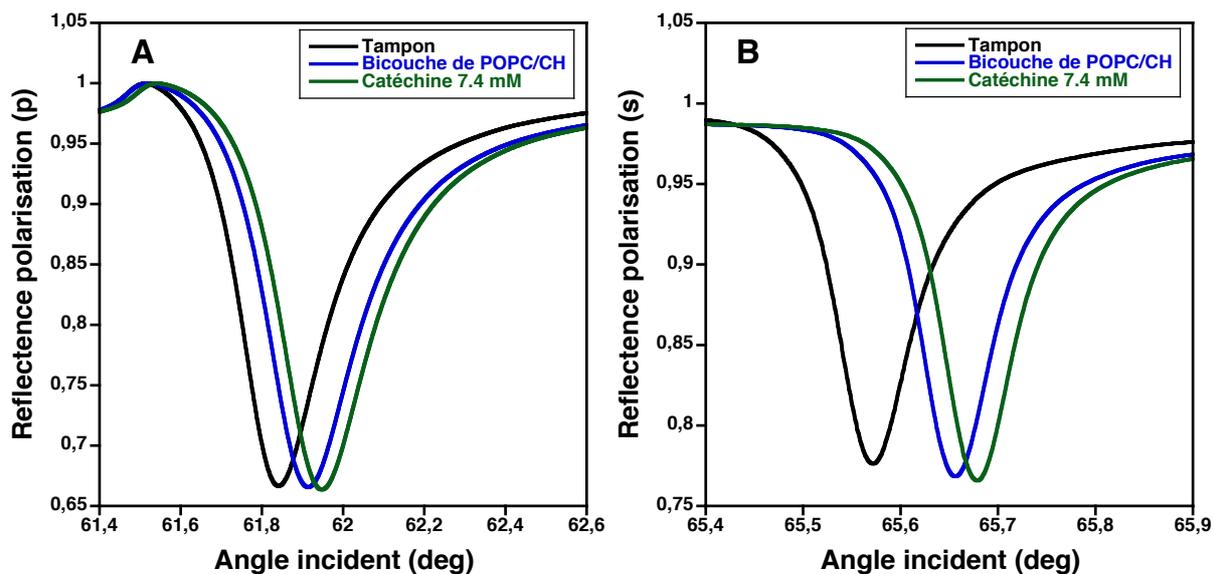


Figure 4 : Spectres PWR du tampon H₂O (eau milliQ, courbe noire), de la bicouche de POPC/CH 70/30 (courbe bleu) et de la bicouche de POPC/CH 70/30 en présence de 7 mM de catéchine (courbe verte) pour les polarisations p (A) et s (B). Résolution spectrale angulaire de l'appareil = 1 mdeg. [POPC] = 4.55 mM, [CH] = 1.95 mM, T = 23 °C.

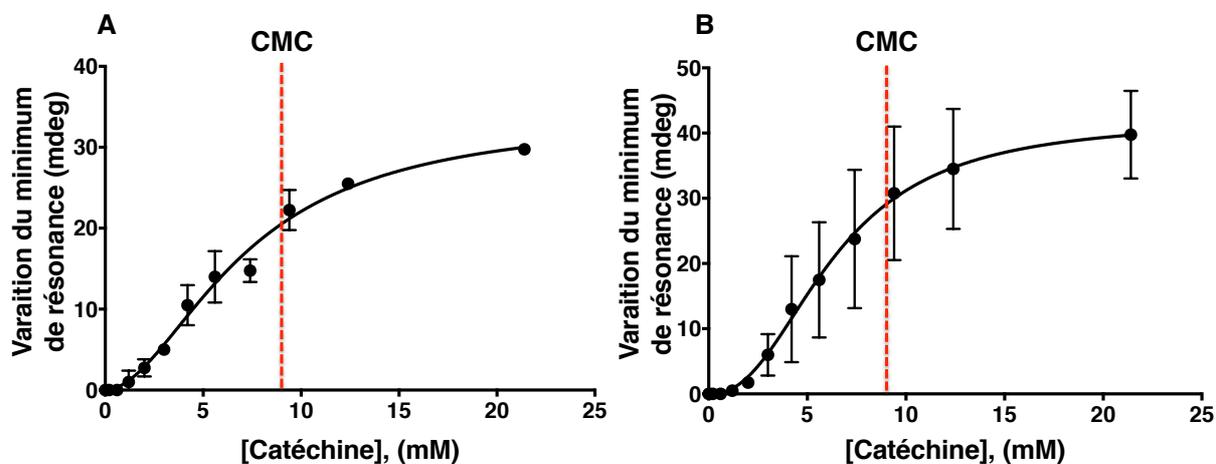


Figure 5 : Variation du minimum de résonance en fonction de la concentration en catéchine pour les polarisations p (A) et s (B). Les variations de décalage de résonance sont calculées par rapport à la membrane de POPC/CH (70/30) sans catéchine. La ligne pointillée en rouge représente la CMC de la catéchine. Les courbes sont ajustées avec l'équation de Hill (équation 1) grâce au logiciel GraphPad Prism. Les barres d'erreur correspondent à l'écart-type obtenu à partir des résultats de deux expériences de PWR indépendantes.

II. Détermination des constantes d'affinité par spectroscopie PWR

Comme on l'a déjà introduit dans le chapitre I (partie III.2), la PWR est une technique qui permet d'obtenir des informations sur l'affinité, la cinétique et l'interaction des macromolécules avec les membranes lipidiques. L'affinité tannin/lipide a été explorée en utilisant des SUV de POPC/CH (70/30). La première étape consiste à former une bicouche supportée par éclatement des SUV à la surface du prisme. Après s'être assuré qu'une bicouche compacte et orientée s'est bien formée, des concentrations croissantes de tannins sont ajoutées dans le compartiment PWR. L'interaction des tannins avec la bicouche supportée induit un changement dans le minimum de résonance des polarisations p et s du spectre PWR, qui est proportionnelle aux quantités de tannins fixées aux lipides. Finalement, l'analyse des courbes du minimum de résonance des polarisations p et s en fonction de la concentration totale en tannins va permettre de déterminer les constantes d'affinité tannin/lipide.

II.1 Affinité de la catéchine pour les membranes de POPC/CH

Les courbes de réflectance du système avant (tampon H₂O_{mQ}) et après injection des SUV de POPC/CH présentées dans la **figure 4** montrent un décalage du minimum de résonance, respectivement de 73 et 84 milli degré (mdeg) pour les résonances p et s, indiquant qu'une membrane supportée orientée compacte a bien été formée à la surface du prisme à partir des SUV de POPC/CH (70/30) (Szunerits et Boukerroub, 2015). Ces changements spectraux sont dus à une augmentation de masse à la surface du résonateur, suite à la formation de la bicouche lipidique (Hruby *et al.*, 2007). L'ajout de catéchine dans la cellule PWR conduit également à une augmentation des valeurs des angles de résonance pour les polarisations p et s sur les spectres PWR par rapport à la bicouche sans catéchine. La figure 4 montre une augmentation respectivement de 14 et 23 mdeg des minimums de résonance pour les polarisations p et s en présence de 7.4 mM de catéchine par rapport à la bicouche sans catéchine, ce qui indique que les molécules de catéchine se lient à la surface de la bicouche lipidique, conformément à des études menées avec des peptides (Pénétratine) en interaction avec une bicouche d'Egg-PC, où des variations des angles de résonances après l'ajout de la Pénétratine dans le compartiment PWR ont été observées (Alves *et al.*, 2009). La courbe des variations des minimums de résonance p et s en fonction de la concentration en catéchine est représentée sur la **figure 5**. Celle-ci est d'allure sigmoïdale. En effet, pour des concentrations

Equation de Hill	Polarisation p	Polarisation s	Moyenne
B_{\max} (mdeg)	33.9 ± 2.5	42.0 ± 5.2	38.0 ± 3.8
K_D (mM)	7.2 ± 0.7 (10%)	6.4 ± 1.0 (15%)	6.8 ± 0.9 (13%)
R^2	0.98	0.91	0.94
n	1.9 ± 0.2	2.3 ± 0.6	2.0 ± 0.4

Tableau 2 : Paramètres de l'ajustement pour le système POPC/CH avec l'équation de Hill obtenus à partir des variations du minimum de résonance des polarisations p et s en fonction de la concentration en catéchine. B_{\max} = Variation maximale du minimum de résonance en mdeg, K_D = Constante de dissociation en mM, R^2 = Coefficient de détermination, n = Coefficient de Hill. La valeur en % correspond à l'erreur relative pour les valeurs de K_D .

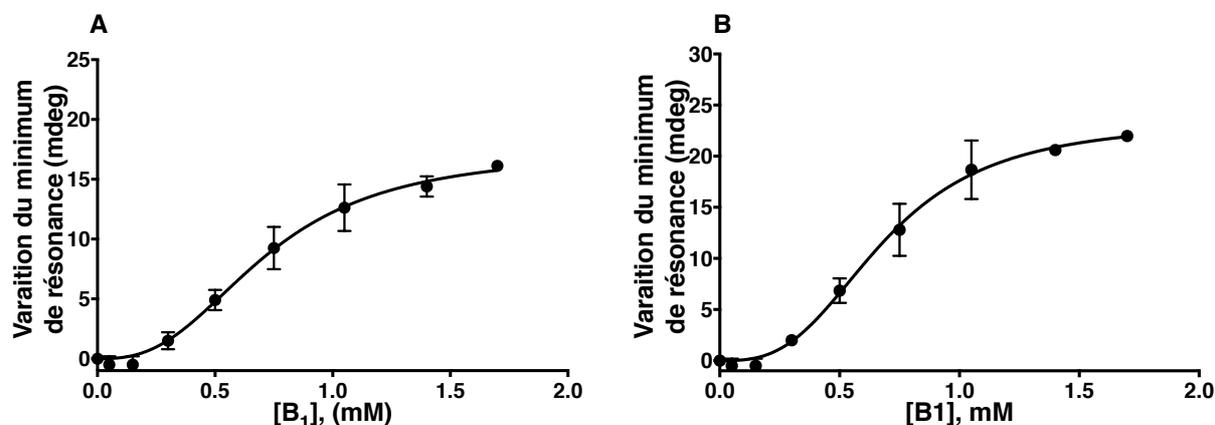


Figure 6 : Variation du minimum de résonance en fonction de la concentration en B₁ pour les polarisations p (A) et s (B). Les variations de décalage de résonance sont calculées par rapport à la membrane de POPC/CH (70/30) sans B₁. Les courbes sont ajustées avec l'équation de Hill (équation 1) grâce au logiciel GraphPad Prism. Les barres d'erreur correspondent à l'écart-type obtenu à partir des résultats de deux expériences de PWR indépendantes.

en catéchine entre 0 et 2 mM, les variations de minimum de résonance tendent vers 0. Puis elles augmentent progressivement avec la concentration en catéchine et tendent vers un palier pour les très hautes concentrations. Cette allure suggère une courbe de Hill avec un paramètre n tel que $n > 1$. L'ajustement des points expérimentaux avec l'équation de Hill a effectivement été concluante. Les résultats de l'ajustement sont présentés dans le **tableau 2**. Nous avons obtenu des constantes de dissociation K_D de l'ordre du milli molaire de 7.2 ± 0.7 mM et de 6.4 ± 1.0 mM respectivement pour les polarisations p et s. L'écart relatif entre les deux valeurs étant de 12%, nous pouvons donner les valeurs moyennes suivantes pour le système POPC/CH/Catéchine : un K_D de 6.8 ± 0.9 mM, un B_{\max} de 38.0 ± 3.8 mM, un coefficient de détermination de 0.94 et un coefficient de Hill de 2.0 ± 0.4 .

II.2 Affinité du dimère B_1 pour les membranes de POPC/CH

Comme pour la catéchine, nous avons étudié l'affinité du dimère B_1 pour la membrane supportée de POPC/CH (70/30). Après formation de la bicouche lipidique, nous avons injecté des concentrations croissantes de B_1 dans le compartiment de la cellule PWR. La **figure 6** montre les variations des minimums de résonance pour les polarisations p et s. Les courbes montrent une allure similaire à celles obtenues dans le cas de la catéchine, avec une forme sigmoïdale qui tend vers un palier à la fin de la titration. En effet, on observe une augmentation de la valeur de minimum de résonance des polarisations p et s avec l'augmentation de la concentration en B_1 . Les variations de minimum de résonance tendent vers 0 pour des concentrations de B_1 entre 0 et 0.15 mM, puis elles augmentent progressivement avec l'augmentation de la concentration en B_1 jusqu'à atteindre un palier. La constante de dissociation pour le système membrane de POPC/CH/ B_1 a été déterminée par l'ajustement des points expérimentaux avec la fonction mathématique de Hill. Dans ce cas, nous avons obtenu un K_D de 0.70 ± 0.05 mM, un B_{\max} de 20.4 ± 1.3 mM, un coefficient de détermination de 0.98 et un coefficient de Hill de 2.8 ± 0.4 (**Tableau 3**).

Equation de Hill	Polarisation p	Polarisation s	Moyenne
B_{\max} (mdeg)	17.3 ± 1.3	23.4 ± 1.3	20.4 ± 1.3
K_D (mM)	0.70 ± 0.06 (9%)	0.70 ± 0.04 (6%)	0.70 ± 0.05 (7%)
R^2	0.98	0.98	0.98
n	2.6 ± 0.4	2.9 ± 0.4	2.8 ± 0.4

Tableau 3 : Paramètres de l'ajustement pour le système POPC/CH avec l'équation de Hill obtenus à partir des variations du minimum de résonance des polarisations p et s en fonction de la concentration en B_1 . B_{\max} = variation maximale du minimum de résonance en mdeg, K_D = Constante de dissociation en mM, R^2 = Coefficient de détermination, n = Coefficient de Hill. La valeur en % correspond à l'erreur relative pour les valeurs de K_D .

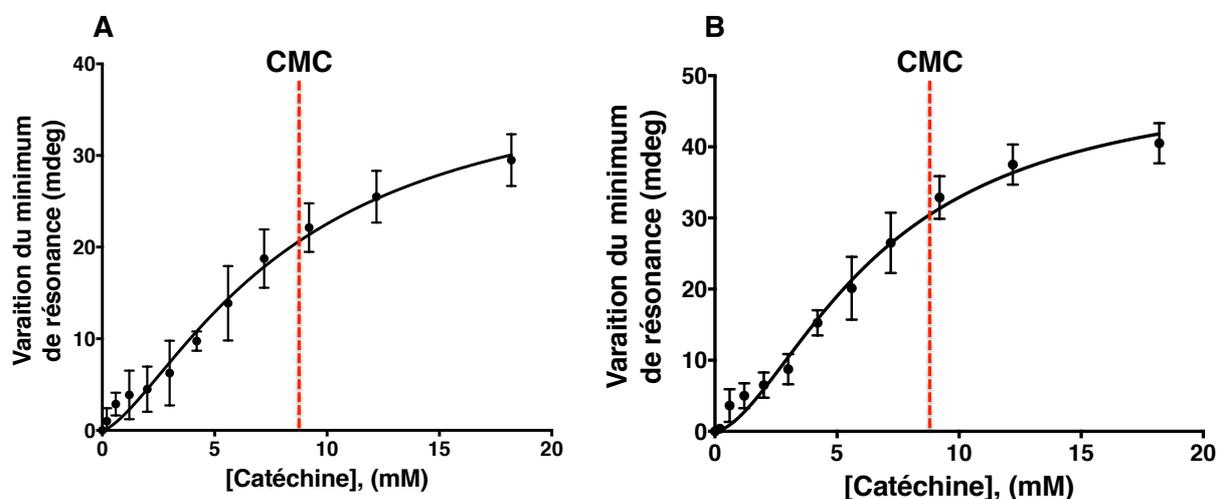


Figure 7 : Variation du minimum de résonance en fonction de la concentration en catéchine pour les polarisations p (A) et s (B). Les variations de décalage de résonance sont calculées par rapport à la membrane de POPC sans catéchine. Les courbes sont ajustées avec l'équation d'interaction spécifique (équation 2) grâce au logiciel GraphPad Prism. Les barres d'erreur correspondent à l'écart-type obtenu à partir des résultats de deux expériences de PWR indépendantes. $[POPC] = 6.5$ mM.

II.3 Affinité de la catéchine pour les membranes lipidiques en absence de cholestérol

Dans le but d'analyser l'effet du cholestérol sur l'affinité du monomère des tannins par rapport aux membranes lipidiques, une étude analogue aux deux précédentes a été menée avec une bicouche supportée de POPC en interaction avec la catéchine. Les variations de minimum de résonance pour les deux polarisations en fonction de la concentration en catéchine sont représentées sur la **figure 7**. On remarque une augmentation du décalage du minimum de résonance avec l'augmentation de la concentration en catéchine jusqu'à un palier. Cependant, à l'inverse des cas étudiés avec la membrane supportée mixte de POPC/CH, la tangente à l'origine est non nulle et suggère un ajustement des points expérimentaux avec l'équation d'interaction spécifique (équation 2). L'ajustement comparé des points expérimentaux avec l'équation d'interaction spécifique et l'équation de Hill a montré effectivement que le meilleur ajustement correspondait à un ajustement par l'équation d'interaction spécifique. Les résultats obtenus sont résumés dans le **tableau 4** et indique dans le cas du système membrane de POPC/Catéchine, une constante de dissociation de 19.0 ± 5.0 mM, un B_{\max} de 75.5 ± 12.7 mM et un coefficient de détermination de 0.95.

II.4 Discussion des résultats obtenus par PWR

La résonance plasmonique aux ondes guidée est une technique optique qui nous a permis d'obtenir des informations concernant l'affinité des tannins par rapport aux membranes lipidiques. L'ajout des tannins dans le compartiment de la cellule PWR après formation d'une bicouche supportée de lipides conduit à une augmentation des valeurs des angles de résonances sur les spectres PWR quel que soit le système lipidique ou le tannin envisagé. Ces résultats signifient qu'il y a une augmentation de masse du système (Hruby *et al.*, 2007, Calmet *et al.*, 2016), résultant de l'addition de molécules de tannins à la surface du prisme. Ainsi, la technique de PWR est capable de détecter une interaction entre les tannins et les membranes lipidiques, ce qui est en accord avec les résultats obtenus par RMN. Dans le cas du système POPC/CH (Fig.5 et 6), l'allure sigmoïdale des courbes obtenues avec les deux tannins valide le choix d'utilisation de la fonction mathématique de Hill pour ajuster les points expérimentaux. En effet, les coefficients de Hill respectivement de 2.01 ± 0.40 (catéchine) et 2.80 ± 0.41 (B_1) sont bien supérieurs à 1. A l'inverse, pour le système POPC,

Specific binding	Polarisation p	Polarisation s	Moyenne
B_{\max} (mdeg)	65.4 ± 12.2	85.7 ± 12.8	75.5 ± 12.7
K_D (mM)	20.3 ± 5.8 (29%)	17.6 ± 4.1 (23%)	19.0 ± 5.0 (26%)
R^2	0.95	0.96	0.95

Tableau 4 : Paramètres de l'ajustement pour le système POPC avec l'équation d'interaction spécifique obtenus à partir des variations du minimum de résonance en fonction de la concentration en catéchine. B_{\max} = Variation maximale du minium de résonance en mdeg, K_D = Constante de dissociation en mM, R^2 = Coefficient de détermination. La valeur en % correspond à l'erreur relative pour les valeurs de K_D .

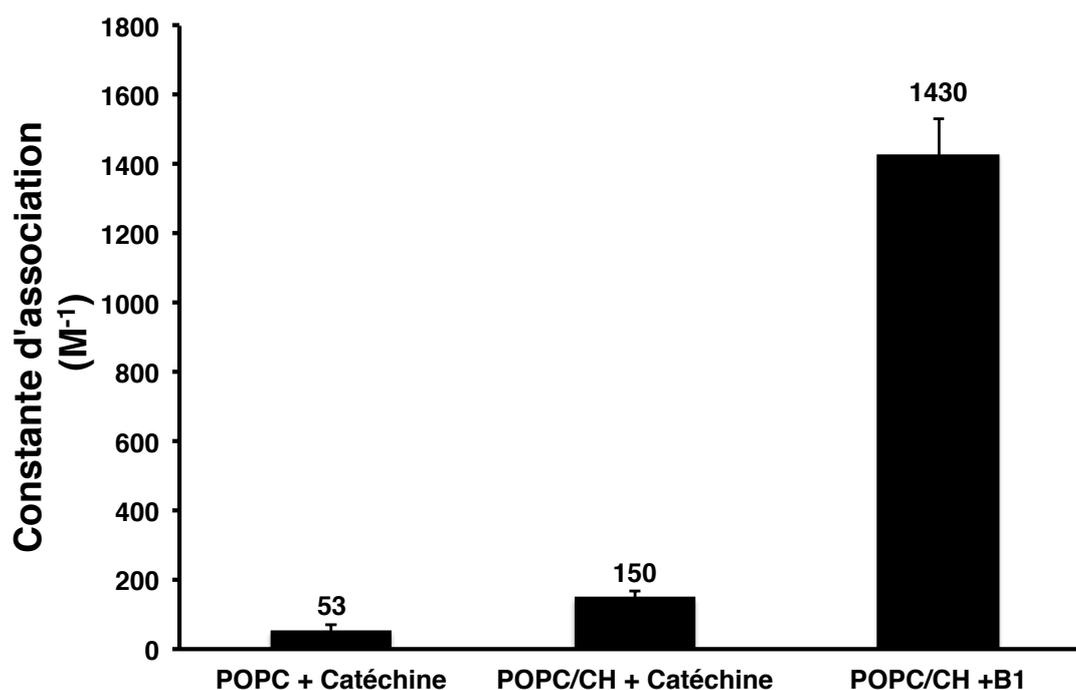


Figure 8 : Constantes d'associations tannin/lipide K_A déterminées par PWR pour la bicouche de POPC en présence de catéchine et pour la bicouche mixte POPC/CH en présence de catéchine ou de B_1 .

l'allure des courbes est hyperbolique (Fig.7), ce qui valide l'utilisation de l'équation d'interaction spécifique correspondant au cas $n = 1$ dans l'équation de Hill.

En ce qui concerne l'affinité des tannins pour les membranes lipidiques, nos résultats montrent que l'affinité du dimère B_1 pour les membranes de POPC/CH est plus importante que celle de la catéchine (**Fig.8**). En effet, la constante d'association du B_1 aux membranes de POPC/CH est quasiment dix fois plus importante que celle de la catéchine (1430 vs 150 M^{-1}). Ceci corrobore les résultats obtenus dans le chapitre II. En effet, nous avons observé une précipitation au sein de la dispersion de MLV pour un rapport molaire B_1 /lipide supérieure à 1/30, alors que pour des rapports molaires catéchine/lipide plus importants (1/10), la dispersion a conservé un aspect laiteux homogène. Ces résultats sont en faveur d'une interaction plus forte du B_1 avec les membranes lipidiques pouvant conduire jusqu'à leur précipitation. On peut supposer que les molécules de B_1 sont capables d'interagir avec plusieurs vésicules lipidiques *via* des liaisons de pontage, ce qui va favoriser le rapprochement des MLV entre elles, et ainsi leur précipitation suite à la formation d'un gros agrégat. Ce phénomène a déjà été observé par Furlan *et al.*, (2014), qui ont remarqué une précipitation des membranes lipidiques de DMPC par la catéchine et l'EGCG. Sachant que dans cette étude le rapport molaire tannin/lipide (1/1.2) est 25 fois plus important que celui B_1 /lipide (1/30), ceci est en faveur d'une affinité plus importante du B_1 pour les lipides, que la catéchine et l'EGCG. De plus, les résultats de la RMN- 2H ont montré que le B_1 a un effet de désordre plus important sur les membranes de POPC/CH que la catéchine, ce qui montre que plus l'affinité des tannins pour les membranes augmente, plus leur effet de désorganisation est important. Cela peut s'expliquer par la différence de nature chimique des deux tannins. Le B_1 possède plus de substituants hydroxyles que la catéchine (10 vs 5), on peut donc supposer qu'il est capable de former davantage de liaisons hydrogène avec les groupements oxygénés du lipide que la catéchine. De plus, il possède un cycle aromatique supplémentaire par rapport à la catéchine. Son aire surfacique est donc plus importante que celle de la catéchine (221 vs 110 \AA^2 , selon Pubchem 2017). Sa surface de contact avec les lipides est donc plus grande, ce qui favorise son interaction avec les membranes lipidiques.

Par ailleurs, dans le cas de la bicouche de POPC/CH, le coefficient de Hill est trouvé positif ce qui montre qu'ils existent plusieurs sites de fixation sur la membrane et que la coopérativité est positive. La membrane étant composée d'un assemblage de lipides, il semble cohérent que les tannins soient en interaction avec plusieurs lipides. La coopérative positive est en adéquation avec l'effet fluidifiant des tannins observés sur les membranes. On peut en

effet imaginer qu'un deuxième tannin se fixe plus facilement sur une membrane rendue plus fluide et donc moins compacte après la fixation d'un premier tannin : un tannin a d'autant plus de place pour s'insérer que le désordre dans les chaînes lipidiques est important. Ce résultat corrobore le coefficient de Hill environ 1.5 fois plus grand dans le cas du B₁ que dans le cas de la catéchine (2.8 ± 0.4 vs 2.0 ± 0.4). Nous avons en effet montré dans le chapitre précédent que l'effet fluidifiant est plus important pour le B₁ : sa coopérativité est donc plus forte comparativement au monomère.

En ce qui concerne l'effet du cholestérol sur l'affinité des tannins pour les membranes lipidiques, la constante d'association K_A de la catéchine pour le système de POPC/CH est plus importante que celle au système de POPC tout seul (150 vs 53 M^{-1}). Cela montre que l'affinité des tannins pour les membranes lipidiques est plus importante en présence du cholestérol. Ce résultat est à rapprocher de ceux sur la localisation de la catéchine dans les membranes lipidiques dans le chapitre II. En effet, nous avons mis en évidence une perturbation de l'environnement électronique pour les groupements en position 3 et 6 du cholestérol, et les groupements $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$, $\text{CH}_2\text{-N}^+$, et $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}^+$ du POPC. Ainsi, la catéchine interagit avec les lipides au niveau des têtes polaires, à proximité du cholestérol, sachant que ce dernier s'insère perpendiculairement au plan de la bicouche, avec son groupement OH (porté par le carbone en position 3) orienté vers le squelette glycérol du lipide, et sa chaîne alkyle qui s'étend dans le cœur de la bicouche (Dufourc, 2008). Par conséquent, la présence de cholestérol dans les bicouches va renforcer ces interactions, et donc augmenter l'affinité des tannins pour les membranes lipidiques.

Les résultats de cette partie obtenus avec une nouvelle technique confortent les résultats obtenus par RMN et confirment l'interaction entre les tannins et les membranes lipidiques. De nouveau, on constate un comportement exacerbé du dimère B₁ avec une affinité beaucoup plus importante de ce tannin pour les membranes lipidiques par comparaison avec le monomère, la catéchine. De plus, la présence du cholestérol dans les membranes favoriserait l'affinité des tannins pour les membranes lipidiques. Il existe cependant des variations importantes des constantes d'affinité déterminées par RMN ou par PWR. Elles seront discutées plus tard.

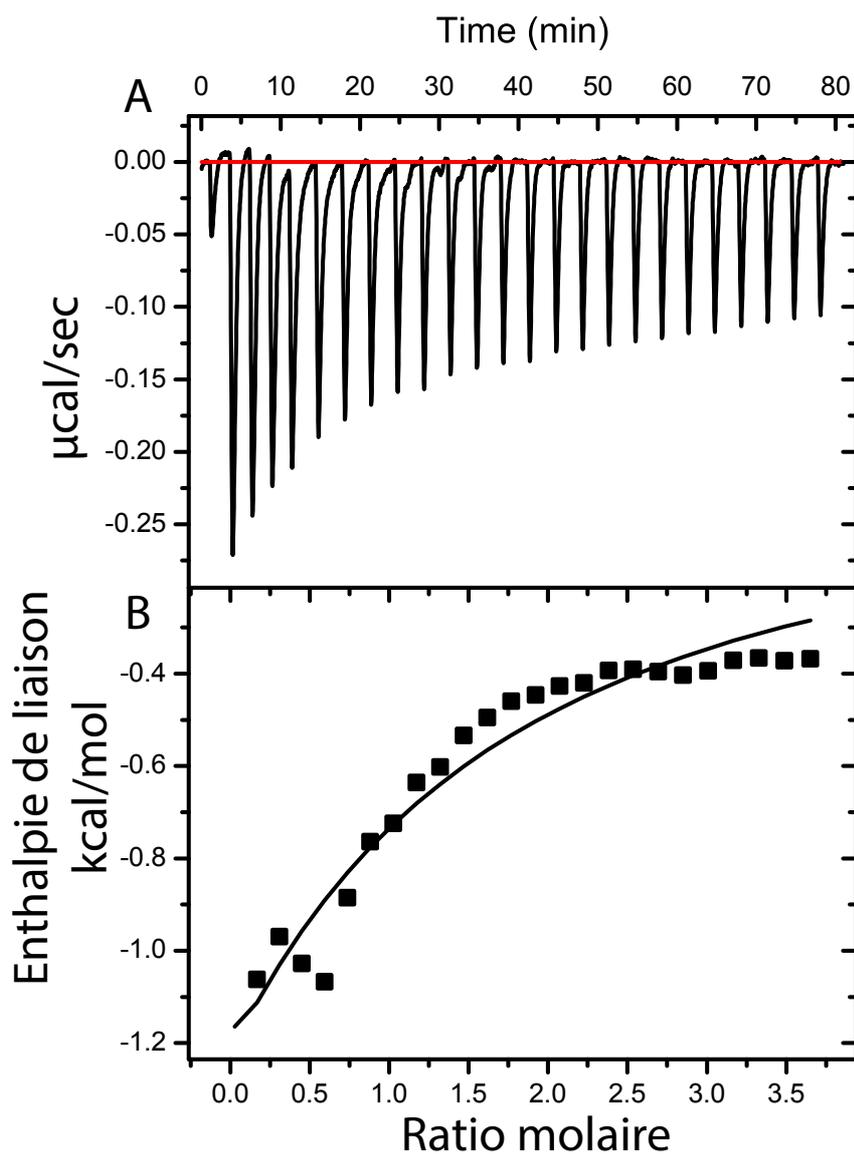


Figure 9 : Calorigramme résultant de la titration d'une solution de B_1 ($50 \mu\text{M}$) par des aliquotes de $2.6 \mu\text{L}$ de LUV de POPC (1 mM) (A). Isotherme représentant la variation de l'enthalpie de liaison en fonction du rapport molaire LUV/ B_1 obtenu à partir de l'intégration des signaux du calorigramme (B). $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$, $VA = 300 \text{ rpm}$.

III. Etude préliminaire des constantes d'affinité par ITC

Dans les deux études précédentes, les constantes d'association des tannins aux membranes lipidiques ont été déterminées de façon indirecte et présentent certaines variabilités selon la technique utilisée. Afin d'avoir une idée plus précise des paramètres thermodynamiques associés à une interaction, nous avons donc choisi de compléter cette étude en utilisant la titration calorimétrique isotherme (ITC). Cette technique est en effet basée sur une mesure directe de la chaleur libérée ou absorbée au cours d'une interaction et donc associée à une véritable mesure d'un équilibre thermodynamique. Elle permet non seulement d'avoir accès à la constante d'association thermodynamique mais également à la stœchiométrie, à l'entropie et à l'enthalpie de la réaction de liaison (Freyer et Lewis 2008). Bien que cette technique ait largement fait ses preuves pour l'étude de l'interaction ligand/protéine (Day *et al.*, 2002, Wright et Serpersu, 2005, Buczek et Horvath, 2006), elle reste toutefois moins documentée pour l'interaction membrane/biomolécule et la mise en œuvre ne fait pas forcément l'objet d'un consensus (Jodko-Piorecka et Litwinienko, 2013, Eeman *et al.*, 2014, Nasir *et al.*, 2016). L'étude de l'interaction entre des membranes lipidiques et les tannins par ITC a donc fait l'objet de beaucoup d'essais pour tenter d'obtenir un calorigramme associé à un isotherme d'allure sigmoïdale qui permette de déterminer les différents paramètres thermodynamiques. Bien que nous eussions montré que l'affinité du B₁ pour les membranes était plus importante que celle de la catéchine, les premiers essais ont été réalisés avec des LUV de POPC et la catéchine, meilleur marché que le dimère B₁. Après de nombreuses tentatives infructueuses, nous avons dans un deuxième temps travaillé avec le B₁. Les meilleurs résultats que nous avons obtenus à ce jour sont présentés sur la **figure 9**. Ils correspondent à la titration d'une solution de B₁ à 50 μ M par une dispersion de LUV de POPC correspondant à une concentration en lipides de 1 mM. Chaque pic de la figure 9.A correspond à une injection de 2.6 μ L de la dispersion de LUV dans la cellule ITC contenant la solution de B₁. Des variations de chaleur négatives de l'ordre de la quinzaine de μ cal sont détectées, ce qui indique un échange de chaleur exothermique. Bien que les chaleurs dégagées soient relativement faibles comparées à celles dégagées pour une interaction de type ligand/membrane (Eiman *et al.*, 2014) ou ligand/protéine (Day *et al.*, 2002), ces résultats préliminaires montrent néanmoins qu'il y a bien une interaction entre les membranes lipidiques et le tannin et confirment les résultats déduits des expériences de RMN et de PWR. Ces résultats dont la reproductibilité a été vérifiée sur 6 expériences sont certes encourageants mais ne donnent pas un calorigramme exploitable qui permettrait d'extraire à la fois la

constante d'association et la stœchiométrie (Fig.9.B). En effet, la saturation rapide du système après quelques injections indique que le rapport entre la concentration des LUV et celle du B₁ doit être encore optimisé pour obtenir le début de la courbe en « s ».

IV. Discussion des résultats de l'affinité des tannins pour les lipides membranaires

Dans cette partie nous allons discuter les résultats obtenus sur l'affinité des tannins vis-à-vis des membranes lipidiques. Nous allons notamment comparer nos résultats avec ceux de la littérature, et avec les constantes d'affinité tannin/protéine de la salive déterminées par Cala et *al.* (2010). Pour finir, nous examinerons ces résultats dans le contexte du goût du vin afin de mieux comprendre l'effet des lipides sur la sensation d'astringence induite par les tannins du vin.

IV.1. Paramètres de l'interaction des tannins avec les membranes lipidiques

Dans cette étude, on a eu recours à deux méthodes physiques, la RMN et la PWR, pour déterminer les constantes d'affinité tannin/lipide, la troisième l'ITC ayant pour l'instant donné des résultats trop préliminaires pour que nous puissions en discuter. Nous avons choisi de travailler avec des modèles de membranes de POPC/CH (70/30) qui miment la composition lipidique de l'épithélium buccal. Les tannins ont été représentés par la catéchine et le dimère B₁ majoritairement présents dans le vin rouge (Silva et *al.*, 2012, Quideau et *al.*, 2011). Pour la catéchine, les valeurs des constantes d'association obtenues avec les deux méthodes sont différentes, mais restent de l'ordre d'une dizaine de M⁻¹. La constante d'association K_A de la catéchine pour les membranes de POPC/CH obtenue par PWR est de 150 M⁻¹, plus importante que la K_A obtenues par RMN pour les groupements CH₂-N⁺ et N⁺(CH₃)₃ qui est de l'ordre de 16 M⁻¹. Cet écart peut être dû à la différence entre les modèles lipidiques utilisés dans les deux techniques. En RMN, nous avons utilisé des vésicules multilamellaires (MLV), qui sont constitué de plusieurs bicouches de lipides concentriques séparées par des couches d'eau. Pour la PWR, il s'agit de bicouches supportées formées à la surface du prisme. On peut alors supposer que dans le cas des bicouches supportées, la géométrie plane des membranes est plus favorable pour l'interaction avec les tannins que celle des MLV, qui contiennent

plusieurs bicouches présentant une courbure au niveau de leur structure, qui pourraient conduire ainsi à un nombre de contacts réduits entre les lipides et les tannins. Il serait certainement intéressant de répéter les résultats de RMN en utilisant des vésicules comportant une seule bicouche comme des LUV ou des SUV. On peut donc estimer que les constantes d'affinité obtenues sur des MLV sont sous évaluées.

En comparant les constantes d'association des deux tannins déterminées par PWR (seule technique permettant de comparer l'effet des 2 polyphénols), on remarque que le B₁ a plus d'affinité pour les membranes de POPC/CH que la catéchine (1430 ± 100 vs 150 ± 18 M⁻¹). Cette différence d'affinité peut être reliée à la structure chimique des deux tannins. La relation entre la nature chimique des tannins et leur affinité envers les membranes lipidiques a été bien étudiée dans la littérature, surtout pour les tannins galloylés (Fig.10). Il a été démontré que la présence d'un groupement galloyle dans la structure des tannins favorise leur interaction avec les membranes lipidiques (Hashimoto *et al.*, 1999, Kajiya *et al.*, 2001). L'étude de Kamihara *et al.* (2008), la seule étude trouvée dans la littérature qui présente des données quantitatives sur les constantes d'associations tannin/lipide, montre également que l'affinité augmente avec le caractère hydrophobe des tannins. En effet, l'affinité de l'ECG est supérieure à celle de l'EGCG suivie de celle de l'EC, sachant que le coefficient de partage octanol/PBS de ces tannins diminue dans le même ordre ($23.9 > 16 > 1.4$). Les auteurs ont déterminé les constantes d'associations des monomères de tannins avec des multicouches de DMPC, en utilisant la technique de microbalance à cristal de quartz (QCM). L'échelle d'affinité suivante a été obtenue : K_A EGC = $(3.75 \pm 0.99) \cdot 10^6$ M⁻¹, K_A EGCG = $(2.16 \pm 0.79) \cdot 10^6$ M⁻¹, K_A EC = $(1.86 \pm 0.12) \cdot 10^3$ M⁻¹. On remarque que l'affinité des tannins galloylés (ECG, EGCG) est mille fois plus importante que celle du tannin non galloylé l'EC. Cependant, vu que nous n'avons pas utilisé des tannins galloylés, il est difficile de comparer les constantes d'association de la catéchine et du B₁ que nous avons obtenues, avec celles de l'EGC et l'EGCG de cette étude. Pour le tannin non galloylé l'EC, on remarque que sa constante d'association est du même ordre que celle du dimère B₁ (1860 ± 120 vs 1430 ± 100 M⁻¹), mais douze fois plus importante que son isomère la catéchine (1860 ± 120 vs 150 ± 18 M⁻¹). Ceci est en accord avec les données de la littérature qui considèrent que l'affinité pour les lipides est plus importante dans le cas des tannins de stéréochimie de type *cis* (EC), que les tannins de type *trans* (C) (Hashimoto *et al.*, 1999, Kajiya *et al.*, 2001). Néanmoins, il faut tenir compte que

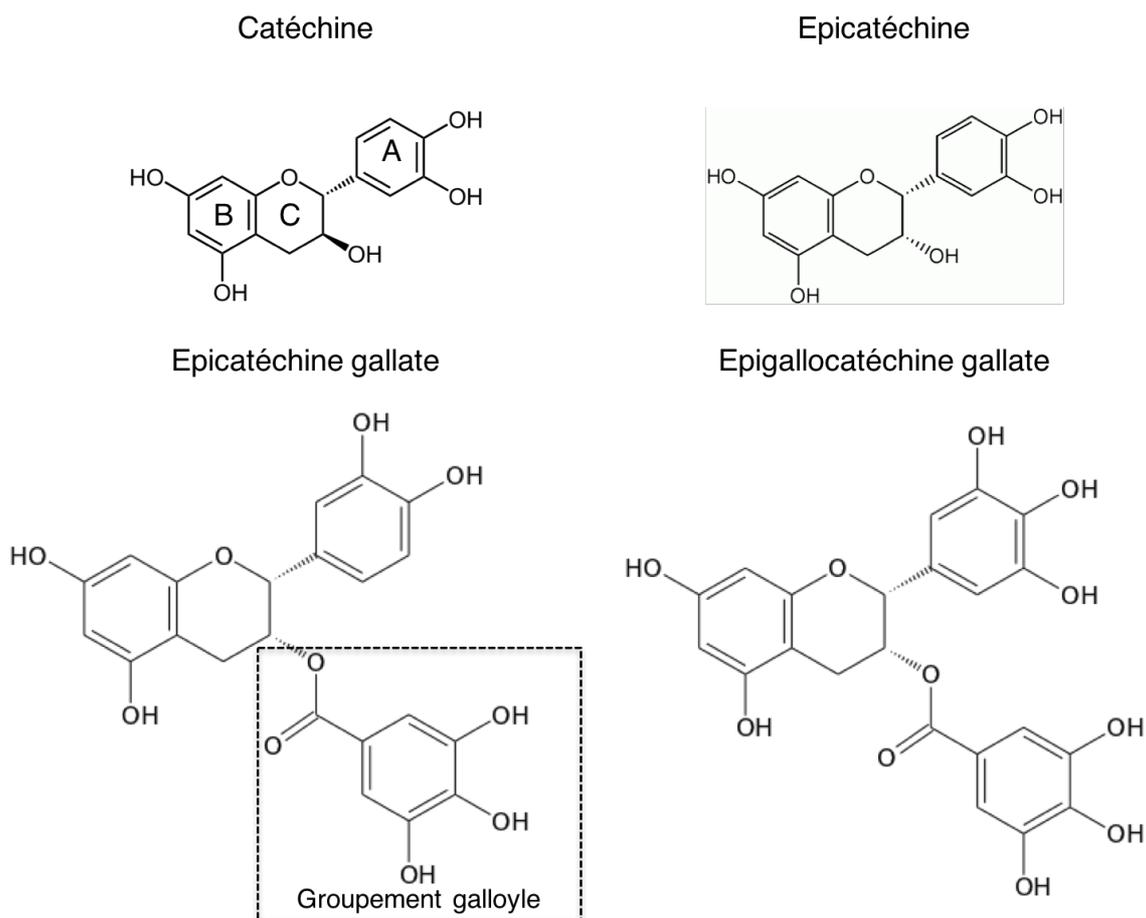


Figure 10 : Structures des tannins non galloylés, catéchine et épicatechine (EC), et des tannins galloylés, ECG (épicatechine gallate) et EGCG (épigallocatechine gallate).

Modèles	K_A Catéchine (M^{-1})	K_A B_1 (M^{-1})
Membrane lipidique POPC/CH	150 ± 18	1430 ± 100
Protéine de la salive IB₇₋₁₄	77 ± 1	345 ± 166

Tableau 5 : Comparaison des constantes d'association tannin/ lipide et tannin/protéine de la salive, obtenues par Cala et *al.* (2010).

les conclusions établies jusqu'à présent sont basées sur des études qualitatives, d'où la nécessité d'une étude quantitative avec l'EC pour valider ce résultat.

Par ailleurs, Uekusa *et al.* (2011) suggèrent que le groupement galloylé et le cycle aromatique en position B de l'ECG sont capables de former des interactions de type cation- π avec l'ammonium quaternaire de la tête du lipide. Ils considèrent également que ce type d'interaction stabilisent les polyphénols à l'interface lipide/eau de la bicouche ce qui augmentent leur affinité. D'autre part, la présence de trois fonctions hydroxyles va permettre à l'ECG de former plus de liaisons hydrogène avec les lipides, et par suite augmenter son interaction. En effet, Ollila *et al.* (2002) ont mis en évidence une relation entre l'augmentation de nombre de fonctions hydroxyles chez des flavonoïdes et l'augmentation de leur affinité pour les lipides. Le B₁ possède cinq fonctions hydroxyles de plus que la catéchine, ainsi qu'un cycle aromatique supplémentaire. Il est donc capable de former plus de liaisons hydrogène avec les groupements oxygénés du POPC que la catéchine. Une étude de dynamique moléculaire a montré également que la procyanidine B₂ est localisée à l'interface d'une membrane de POPC/POPE, et qu'elle est capable de former trois liaisons hydrogène avec le POPC. De plus, ces deux cycles aromatiques en position B sont en contact avec la surface de la bicouche en formant une configuration en "V" inversé (Zhu *et al.*, 2016). Donc on peut supposer que la procyanidine B₁ est capable de former des liaisons de type cation- π avec l'ammonium quaternaire du POPC, sachant qu'on a démontré qu'elle est localisée à l'interface des membranes lipidiques. Ainsi, l'affinité plus importante du B₁ que la catéchine pour les membranes lipidiques pourrait être expliquée par sa capacité à former plus de liaisons avec les lipides, ce qui stabilise son interaction, et augmente son affinité.

IV.2. Influence de l'affinité tannin/lipide sur le goût du vin

Durant la dégustation d'un vin, des sensations complexes sont ressenties. D'un point de vue œnologique, les tannins sont responsables des deux propriétés gustatives du vin, l'amertume et l'astringence. Les forces d'interaction tannin/protéine de la salive ont été étudiées d'un point de vue quantitatif par Cala *et al.* (2010). Ils ont déterminé par RMN les constantes de dissociation entre différents tannins (monomère, dimère et trimère) et un peptide qui mime les protéines de la salive (IB₇₋₁₄). Pour la catéchine, un K_D de 12.9 ± 0.3 mM a été déterminé, soit une constante d'association K_A de 77.5 ± 1.2 M⁻¹. Pour le B₁, le K_D est de 2.9 ± 1.4 mM correspondant à un K_A de 345 ± 166 M⁻¹. En comparant les constantes d'association

tannin/protéine de la salive et tannin/lipide, on remarque que l'affinité des tannins pour les membranes de POPC/CH est plus importante que l'affinité pour les protéines de la salive (**Tableau 5**). Il faut toutefois noter que les expériences d'interaction tannin/protéine de la salive ont été faites dans des conditions mimant le milieu du vin (pH 3.5, T = 25°C, et 12% d'éthanol), tandis que notre étude a été faite dans des conditions mimant celles de la bouche (pH 7.4, T = 23°C, milieu aqueux). Cependant, on peut supposer que durant la dégustation du vin, il va exister une compétition entre l'interaction des tannins avec les lipides et l'interaction entre les tannins et les protéines de la salive, ce qui pourrait conduire à une diminution de la sensation d'astringence.

Du point de la sensation d'amertume, les récepteurs du goût sont des protéines membranaires qui appartiennent à la famille des récepteurs couplés aux protéines G (GPCR) (Chandrachekar *et al.* 2006). Au mieux de notre connaissance, nous n'avons aucune donnée thermodynamique concernant les interactions des tannins avec ces récepteurs. Cependant, on pourrait s'attendre à des constantes de dissociation de l'ordre du nanomolaire, conformément à des données de la littérature au sujet de l'affinité de l'enképhaline DPDPE ou de son antagoniste le naltrindol (NTI) pour le récepteur membranaire de type δ -opioïde (Salamon *et al.*, 2000). Ceci laisse supposer qu'il n'y a pas de compétition entre les interactions tannin/lipide et tannin/récepteur du goût. Ce serait plutôt l'effet de désordre des tannins sur les membranes buccales qui serait susceptible de modifier l'activité et la fonction de ces récepteurs, et donc l'amertume (chapitre II partie III.4).

On peut aussi imaginer qu'une telle compétition pourrait se produire entre les tannins et les lipides du bol alimentaire et moduler l'astringence lors de dégustations de vin en présence de lipides dans l'alimentation. Pour cela, il a été nécessaire de démontrer au préalable l'existence d'une interaction entre les tannins et les lipides des aliments. Ce fut l'objectif du chapitre IV.

Chapitre IV

Interaction entre la catéchine et les gouttelettes lipidiques

Durant sa dégustation, le vin est généralement accompagné d'aliments riches en lipides, comme du fromage ou de la viande. Les lipides de l'alimentation sont essentiellement des triglycérides (plus de 90%), et en quantité plus faible des phospholipides et des esters du cholestérol (1 à 10%) (Genot et Michalski 2010). Dans les aliments, les lipides sont organisés sous différentes formes : sous forme d'une phase continue, homogène (huiles) ou dans laquelle peuvent être dispersées des gouttelettes dans le cas des émulsions eau dans huile E/H (beurre, margarine) ; sous forme de gouttelettes, dispersées dans une phase aqueuse dans le cas des émulsions huile dans eau H/E (vinaigrette, mayonnaise, lait) ou enchâssées dans des matrices protéiques et/ou glucidiques (viandes, fromages, gâteaux...) (McClement 2010). C'est au niveau de la bouche que les stimuli sensoriels des aliments vont être libérés et sentis. Suite à la destruction de la matrice alimentaire par l'action conjuguée de la mastication et de la salive, la taille des particules est réduite progressivement et une dispersion de gouttelettes lipidiques de différentes tailles va recouvrir toute la surface de la bouche. Lors de la consommation du vin, les gouttelettes lipidiques résiduelles dans la bouche vont entrer en contact avec les molécules présentes dans le vin et notamment les tannins. Si l'interaction entre les tannins et les particules de gras était avérée, cela conduirait à rendre les tannins moins disponibles pour interagir avec les récepteurs du goût, les membranes buccales ou les protéines de la salive. Ainsi, les aliments lipidiques seraient susceptibles d'influencer le goût du vin durant sa consommation par le biais de l'interaction tannin-lipide, et l'amertume et l'astringence s'en trouver modifier.

L'objectif de ce chapitre est de montrer l'existence d'une interaction entre les tannins et les lipides exogènes apportés par l'alimentation et comment cette interaction pourrait agir sur le goût du vin. Dans cette étude, l'interaction tannin-lipide alimentaire a été étudiée entre un résidu des tannins du vin et un modèle de gouttelettes lipidiques.

Les gouttelettes lipidiques alimentaires ont été modélisées par une émulsion huile dans eau H/E. La stabilité de l'émulsion doit être garantie sur une durée suffisante pour réaliser des études par RMN, l'enregistrement d'un seul spectre pouvant parfois durer plusieurs jours. Dans un premier temps, nous avons donc cherché à formuler une émulsion stable. Une fois obtenue, l'émulsion a été étudiée par différentes techniques tels que la microscopie optique et électronique, la diffusion de la lumière et la RMN (^1H , ^2H), afin de caractériser sa taille et sa structure, ainsi que l'organisation des lipides dans les gouttelettes. Puis, comme nous avons mis préalablement en évidence une interaction entre les tannins et un modèle de membranes buccales, nous avons étudié l'interaction de la catéchine, le principal monomère des tannins

du vin (Silva *et al.*, 2012), avec le modèle de gouttelettes lipidiques choisi, et plus particulièrement son effet sur l'organisation et la dynamique des lipides en émulsion. Dans un deuxième temps, nous avons étudié l'interaction tannin-lipide du point de vue organoleptique par des tests d'analyse sensorielle afin de déterminer si les lipides ont une influence sur l'amertume et l'astringence du vin. Des tests de dégustation croisée entre des solutions de tannins alimentaires et des aliments gras (huiles alimentaires) ont été mis en place. Les descripteurs gustatifs liés aux tannins et aux huiles ont d'abord été définis. L'intensité de chaque goût, ainsi que l'impact de l'huile sur la saveur des solutions de tannins ont ensuite été évalués par les dégustateurs *via* des analyses statistiques tels que le test Student et l'analyse en composantes principales (ACP). Enfin, les résultats d'analyse sensorielle ont été comparés avec ceux de biophysique pour voir si une corrélation pouvait être établie entre l'interaction tannin-lipide au niveau moléculaire et l'interaction tannin-lipide au niveau sensoriel.

I. Optimisation d'un modèle d'émulsion alimentaire stable

Dans notre étude, les lipides des aliments ont été modélisés par une émulsion H/E. Une émulsion est un système dispersé métastable constitué de deux liquides non miscibles, l'un des deux liquides étant dispersé dans le second sous forme de gouttelettes dont la taille peut varier de 0.1 à plusieurs dizaines de microns. Une émulsion n'est pas un système thermodynamiquement stable, l'état le plus stable correspondant à la séparation macroscopique des deux phases. Pour éviter ce phénomène, l'émulsion est stabilisée par un émulsifiant amphiphile qui en se localisant à l'interface eau/huile va diminuer la tension superficielle des gouttelettes (Bibette et Leal-Calderon 1996). Le principal facteur de destruction d'une émulsion est la coalescence des gouttelettes qui se traduit par une augmentation de leur taille jusqu'à la séparation macroscopique des liquides non miscibles. Il s'agit donc de trouver un couple émulsifiant/huile qui réponde à ces critères. Une émulsion a été considérée stable (pas de séparation de phase) si sa durée de vie était supérieure à 7 jours, le temps suffisant pour pouvoir réaliser des études par RMN. Dans cette partie, on va présenter les différentes formulations testées. Deux méthodes de préparation, ainsi que plusieurs couples émulsifiant/huile ont été étudiés dans le but d'obtenir un modèle d'émulsion alimentaire stable, avec l'utilisation de composants présents dans les aliments ; les triglycérides et les phospholipides utilisés respectivement pour représenter la phase grasseuse et l'émulsifiant. Pour la phase grasseuse, notre choix s'est porté sur des huiles végétales commerciales, une huile de tournesol et une huile d'olive, et un triglycéride pur présent dans toutes les huiles végétales, le trioléate de glycérol (GT) à 97% de pureté. Pour l'émulsifiant, nous avons expérimenté deux lécithines, une catégorie d'émulsifiants fréquemment utilisée en alimentation : la lécithine d'œuf (Egg-PC) et le DMPC synthétique (Chung *et al.*, 2017, Cui et Decker 2016). L'Egg-PC est un mélange de phosphocholines (95,5%) et de sphingomyéline, les phosphocholines étant majoritairement représentées par des chaînes carbonées saturées en C16:0 et insaturées en C18:1, tandis que le DMPC est composé uniquement de deux chaînes saturées en C14:0 (Avanti Polar Lipids, 2017). L'intérêt d'utiliser ces deux émulsifiants est qu'il existe une forme deutérée commerciale pour l'étude des émulsions stabilisées par ces deux émulsifiants : le POPC_{d31} et le DMPC_{d54}, pour des études sur la dynamique et l'organisation des lipides en émulsion par RMN de deutérium.

Les couples émulsifiant/huile testés ont été : Egg-PC/huile de tournesol, Egg-PC/huile d'olive, Egg-PC/GT, DMPC/huile d'olive, DMPC/huile de tournesol et DMPC/GT. L'ensemble des émulsions testées décrites dans le paragraphe suivant ont été réalisées selon la méthode

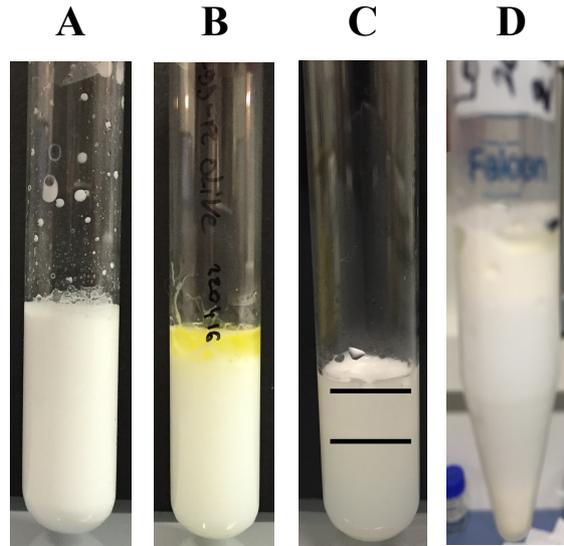


Figure 1 : Aspect visuel des émulsions testées pour représenter un modèle d'émulsion alimentaire avec l'Egg-PC comme émulsifiant : Egg-PC/GT après préparation (A), Egg-PC/huile d'olive après préparation (B), Egg-PC/GT 24 heures après sa préparation. (D), Egg-PC/huile de tournesol après préparation. Les deux traits noirs sur le tube de la photo C représentent la zone de crémage de l'émulsion. Rapport volumique huile/eau 1/5, [Egg-PC] = 5 mg/mL.



Figure 2 : Aspect visuel des émulsions testées pour représenter un modèle d'émulsion alimentaire avec le DMPC comme émulsifiant : DMPC/huile d'olive (A) et DMPC/GT en présence de Rouge de Nil (B). Les deux traits noirs sur le tube de la photo B représentent la zone de crémage de l'émulsion. Rapport volumique huile/eau 1/5, [DMPC] = 5 mg/mL.

décrite dans la partie II.4 du chapitre I (méthode 1). Elles ont été obtenues par dispersion de l'émulsifiant dans l'eau puis sonication du mélange huile/eau avec un rapport volumique huile/eau de 1/5 et une concentration d'émulsifiant de 5 mg/mL.

I.1. Caractérisation des émulsions alimentaires modèles

D'abord, nous avons étudié l'aspect et la morphologie des différentes émulsions à l'œil nu, puis par microscopie optique. Ensuite, la granulométrie nous a permis d'obtenir la distribution volumique de tailles des gouttelettes lipidiques.

I.1.1. Analyse macroscopique

Juste après sonication, toutes les émulsions présentaient une seule phase dispersée d'aspect laiteux (**Fig.1.A**). Par analyse macroscopique des tubes, deux types d'évolution ont pu être observées : soit une démixtion de l'émulsion, soit l'apparition d'un crémage. La démixtion résulte de la séparation nette des deux phases : une phase supérieure grasseuse et une phase inférieure aqueuse. Elle est apparue souvent très rapidement après la sonication et s'est manifestée par l'apparition progressive d'une couche d'huile en surface du tube (**Fig.1.B**). Le crémage, quant à lui, correspond à une phase supérieure dispersée composée des plus grosses gouttelettes de gras qui ont migré en haut du tube, la densité de l'huile étant inférieure à celle de l'eau. Il est caractérisé par une phase de couleur blanche opaque. La phase inférieure correspondante présente un aspect laiteux d'une couleur blanche plus claire et plus diffuse (**Fig.1.C**). Afin de caractériser au mieux le comportement des émulsions, nous avons été amenés à utiliser pour certains systèmes un colorant de nature hydrophobe, le rouge de Nil, qui a la propriété de s'insérer dans les gouttelettes lipidiques. Il est ainsi plus facile de les localiser dans la dispersion (Greenspan *et al.*, 1985). Dans le cas où nous avons utilisé l'Egg-PC comme émulsifiant, les émulsions à base d'huiles alimentaires ont présenté les signes d'une démixtion du système : soit par la présence de gouttelettes d'huile dispersées dans une phase dispersée laiteuse (système Egg-PC/tournesol, **Fig.1.C**), soit par la présence d'une couche d'huile de couleur jaune en surface (système Egg-PC/huile d'olive, **Fig.1.B**). Pour le système Egg-PC/GT, nous avons obtenu une émulsion homogène d'aspect laiteux juste après la sonication qui a évolué vers un crémage quelques heures après la préparation (**Fig.1.A et C**).

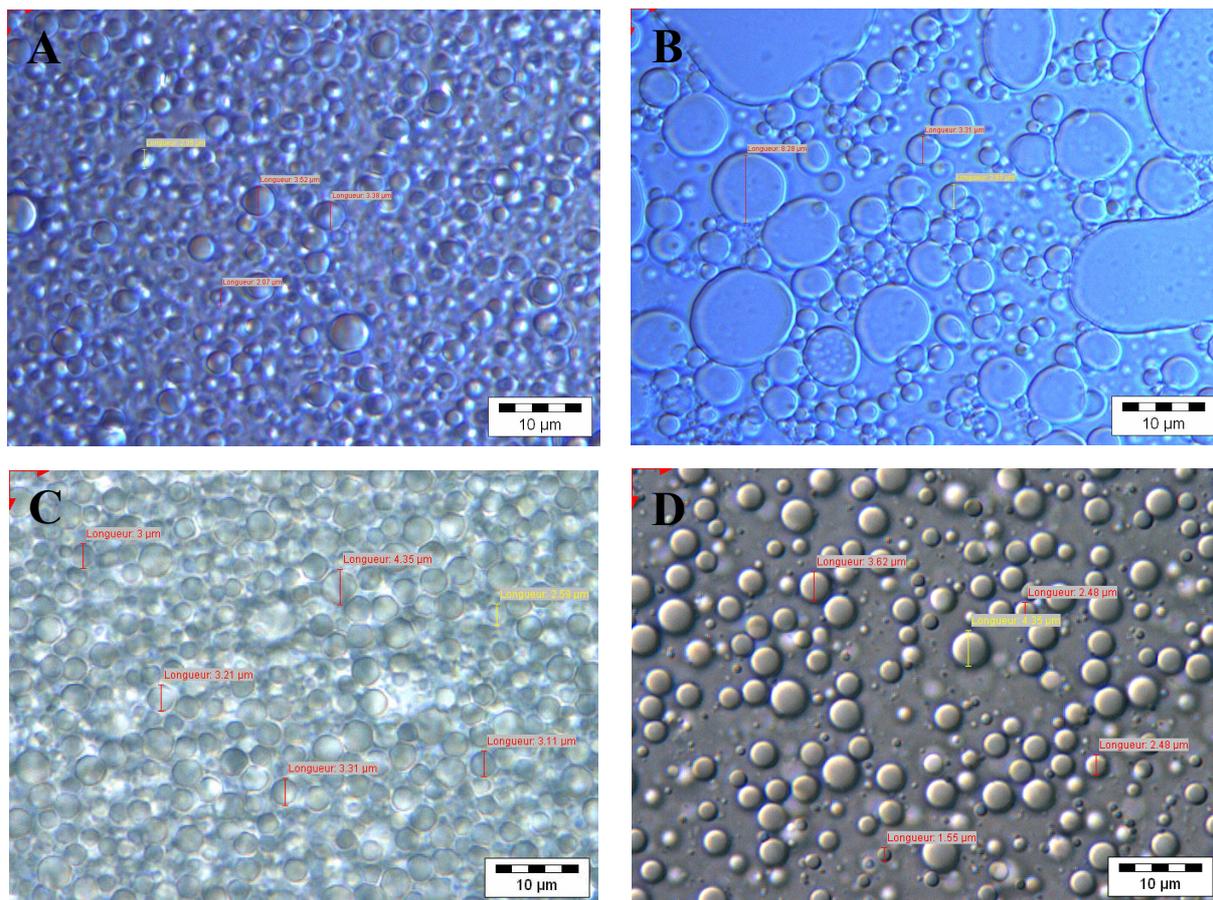


Figure 3 : Images de microscopie optique des émulsions formées avec les couples émulsifiant/huile suivants : Egg-PC/huile d'olive (A), Egg-PC/huile de tournesol (B), Egg-PC/GT phase crémée (C) et Egg-PC/GT phase dispersée (D). Grossissement microscope x100.

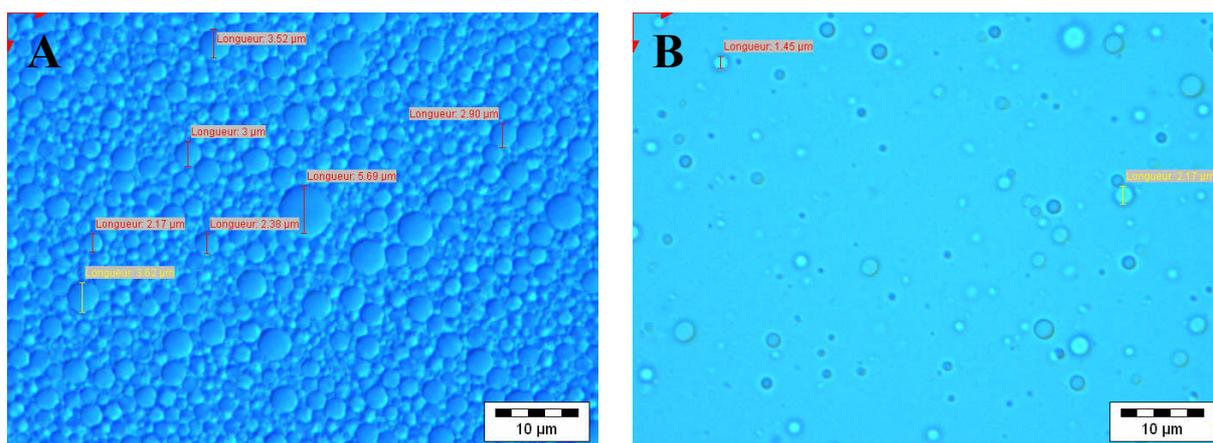


Figure 4 : Images de microscopie optique de la phase crémée (A) et la phase dispersée (B) de l'émulsion formée avec le système DMPC/huile d'olive. Grossissement microscope x100.

Concernant les émulsions préparées avec le DMPC comme émulsifiant, seul le système DMPC/huile de tournesol a démixé avec l'apparition de gouttelettes d'huile à la surface du tube 48 heures après la préparation de l'émulsion. Pour les deux autres systèmes DMPC/huile d'olive et DMPC/GT, nous avons observé l'apparition d'un crémage après la sonication (**Fig.2.A et B**).

Après l'aspect visuel, les émulsions ont été caractérisées par microscopie optique afin d'obtenir des informations sur la taille et la morphologie des gouttelettes.

I.1.2. Analyse microscopique

Une fois stabilisées, les émulsions ont été observées par microscopie optique. L'analyse des émulsions du système Egg-PC/huile d'olive montre de nombreuses gouttelettes de forme sphérique parfois déformées avec des tailles comprises entre 1 et 4 μm (**Fig.3.A**). Pour le système Egg-PC/huile de tournesol, nous avons obtenu des gouttelettes déformées de tailles plus grosses comprises entre 2 et 10 μm (**Fig.3.B**). Pour l'émulsion obtenue avec le système Egg-PC/GT, nous avons analysé la phase crémée et la phase dispersée. On remarque que les gouttelettes lipidiques sont de forme sphérique avec des tailles comprises entre 1 et 4 μm pour les deux phases. Elles sont beaucoup plus nombreuses et compactes dans la phase crémée que dans la phase dispersée (**Fig.3.C et D**).

Concernant les émulsions fabriquées en présence de DMPC, pour le système DMPC/huile d'olive, nous avons observé des gouttelettes de forme sphérique avec des tailles comprises entre 1 et 6 μm dans la phase crémée beaucoup plus nombreuses et compactes que dans la phase dispersée inférieure dont les tailles comprises entre 1 et 2 μm sont plus petites (**Fig. 4.A et 4.B**). Des observations similaires ont été faites pour le système DMPC/GT avec des gouttelettes sphériques de taille comprise entre 1 et 4 μm pour les deux phases. Pour l'émulsion DPMC/huile de tournesol qui a partiellement démixé, nous avons observé des gouttelettes sphériques de taille comprise entre 1 et 4 μm (**Annexe 1**).

Par analyse des différents résultats obtenus, et en récapitulant sur les différentes expériences que nous avons faites, on remarque que les émulsions préparées avec les systèmes Egg-PC/huile d'olive, Egg-PC/huile de tournesol et DMPC/huile de tournesol sont instables ; elles démixent après leur préparation (**Annexe 2**). De plus, les gouttelettes lipidiques présentent une déformation au niveau de leur morphologie. En revanche, avec les systèmes Egg-PC/GT,

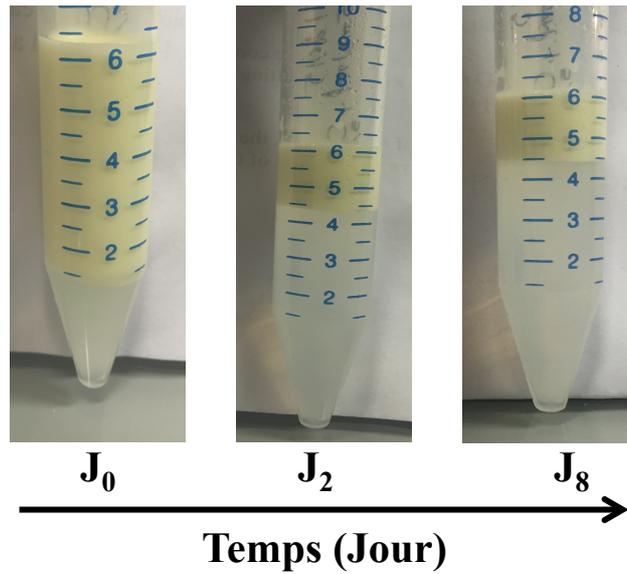


Figure 5 : Photos représentant l'évolution de l'aspect visuel de l'émulsion DMPC/huile d'olive en fonction du temps à J_0 , le jour de préparation de l'émulsion ; à J_2 , après deux jours ; à J_8 , après huit jours. Rapport volumique huile/eau 1/5, [DMPC] = 5 mg/mL.

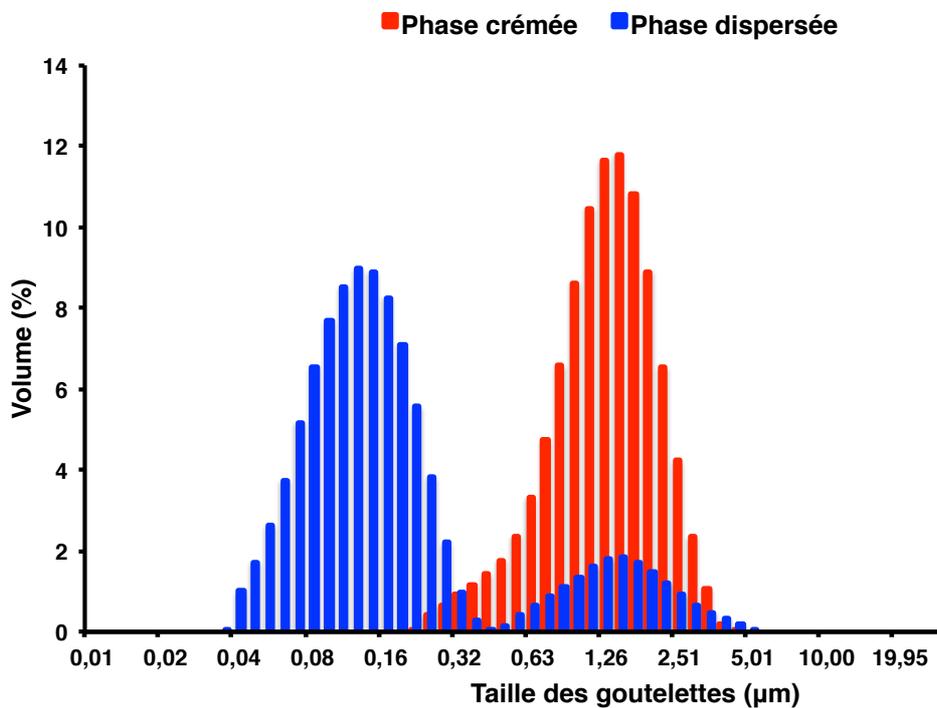


Figure 6 : Comparaison de la distribution volumique de tailles des gouttelettes lipidiques de la phase crémée (courbe rouge) et de la phase dispersée (courbe bleue) pour l'émulsion DMPC/huile d'olive mesurée par granulométrie.

DMPC/GT et DMPC/huile d'olive, nous avons obtenu des émulsions stables après le crémage avec des gouttelettes de forme sphérique dans les deux phases. En effet, aucune démixtion n'a été observée sur plus de huit jours après leur préparation, et même plus d'un mois dans le cas de l'émulsion DMPC/huile d'olive (**Fig.5**).

Après la caractérisation des émulsions par microscopie optique, nous avons mené une étude en granulométrie uniquement sur les trois émulsions stables que nous avons obtenues, afin d'avoir des informations plus précises sur la taille des gouttelettes dans la phase crémée et la phase dispersée.

I.1.3. Analyse granulométrique

La **figure 6** montre la distribution volumique des tailles des gouttelettes lipidiques pour le système DMPC/huile d'olive. On remarque que la distribution de taille de la phase dispersée s'étend de 0.04 à 5 μm . Il existe deux populations de gouttelettes, une population majoritaire entre 0.04 et 0.3 μm centrée autour de 0.15 μm (83% des gouttelettes), et une population minoritaire entre 0.3 et 5 μm centrée autour de 1.5 μm (17% des gouttelettes). La phase crémée, quant à elle, présente une seule distribution de taille entre 0.3 et 5 μm , avec une valeur moyenne centrée autour de 1.5 μm .

Dans le cas des systèmes DMPC/GT et Egg-PC/GT, les profils de distribution de taille sont à peu près similaires à ceux du système DMPC/huile d'olive (**Annexe 9**). En effet, la phase dispersée est plutôt polydisperse, avec une population majoritaire entre 0.04 et 0.6 μm centrée autour de 0.18 μm qui représente 96% des gouttelettes pour le système DMPC/GT et 70% pour le système Egg-PC/GT. La phase crémée, quant à elle, est plus monodisperse, avec une taille moyenne des gouttelettes plus grande centrée autour 2.5 μm pour le système Egg-PC/GT, et 1.5 μm pour le système DMPC/GT. Pour ce dernier, on observe également une très faible population entre 11 et 39 μm centrée à 18 μm (1.5% des gouttelettes).

Ces résultats montrent que, quel que soit le système, la taille des gouttelettes dans la phase crémée est supérieure à celle dans la phase dispersée dont la distribution de taille est plus polydisperse. De plus, pour le système DMPC/GT, la présence des gouttelettes de grande taille ($\sim 17 \mu\text{m}$) dans la phase crémée est indicatrice d'une déstabilisation de l'émulsion non détectée à l'œil nu résultant vraisemblablement de la fusion de gouttelettes de plus petites tailles. Il est probable que cette émulsion évolue jusqu'à la démixtion.

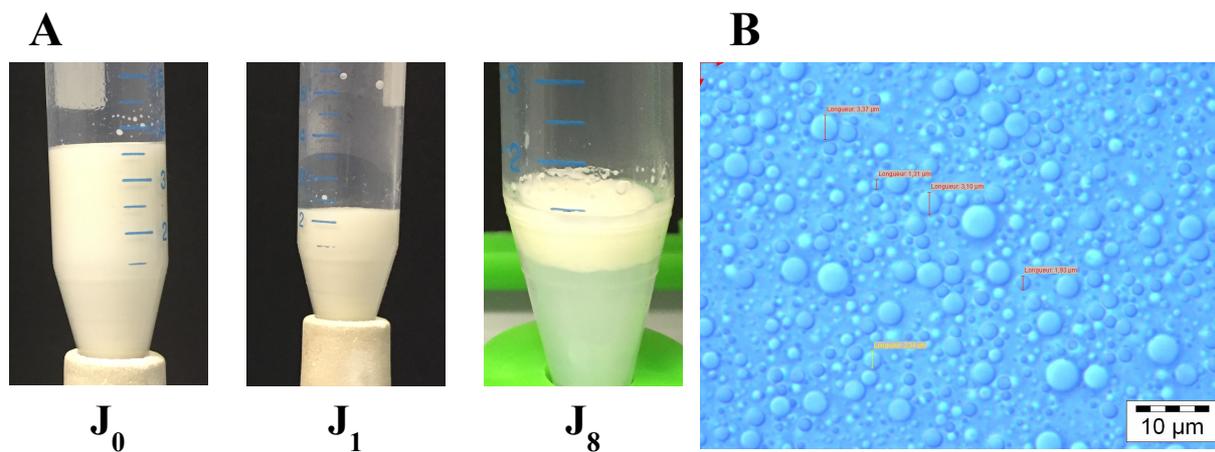


Figure 7 : Photos représentant l'aspect visuel de l'émulsion DMPC/huile d'olive préparée selon la méthode 2 en fonction du temps à J₀, le jour de préparation de l'émulsion ; à J₁, après un jour ; à J₈, après huit jours (A). Image de microscopie optique de l'émulsion (B). Rapport volumique huile/eau 1/10, [DMPC] = 5 mg/mL.

Notre objectif était d'obtenir une émulsion stable qui mime les gouttelettes lipidiques des aliments gras. En se basant sur les différents résultats obtenus, c'est le système DMPC/huile d'olive qui répond le mieux à nos critères. En effet, bien que le système Egg-PC/GT se soit avéré stable, le trioléate de glycérol est un triglycéride synthétique moins représentatif en termes de diversité de composition que l'huile d'olive. De plus, il existe une forme deutérée du DMPC commerciale qui va nous permettre de réaliser des émulsions dans des conditions identiques à celles effectuées avec le DMPC non deutéré. Ainsi, il sera possible d'effectuer des études sur la dynamique et l'organisation des lipides en émulsion par RMN de deutérium.

II. Caractérisation de l'émulsion DMPC/huile d'olive

L'émulsion du système DMPC/huile d'olive précédente évolue vers un crémage tout de suite après sa préparation. Nous avons donc cherché dans un deuxième temps à optimiser la méthode de fabrication pour tenter d'empêcher ce phénomène (méthode 2). Celle-ci est précisément décrite dans la partie II.4 du chapitre I. Les différences avec la méthode précédente sont : la dissolution du DMPC dans l'huile et non plus sa dispersion dans l'eau ; une diminution du rapport volumique H/E fixé à 1/10 au lieu de 1/5 ; l'ajout d'une étape d'agitation mécanique précédant la sonication du mélange. C'est l'émulsion réalisée dans ces conditions qui va être décrite dans la suite.

II.1. Analyse macroscopique

Contrairement à l'émulsion DMPC/huile d'olive préparée selon la méthode 1, l'émulsion résultant de la méthode 2 n'a pas crémé juste après sa préparation (J_0). Elle présentait une seule phase dispersée d'aspect laiteux qui est restée homogène après 24h (J_1) (**Fig.7A**). C'est seulement à partir de J_2 (48h) que nous avons observé un crémage de l'émulsion avec l'apparition d'une phase crémée au-dessus de la phase dispersée. L'état biphasique de l'émulsion a perduré après huit jours (J_8), mais on a pu observer une évolution de la phase inférieure d'aspect laiteux qui s'est éclairci au cours du temps.

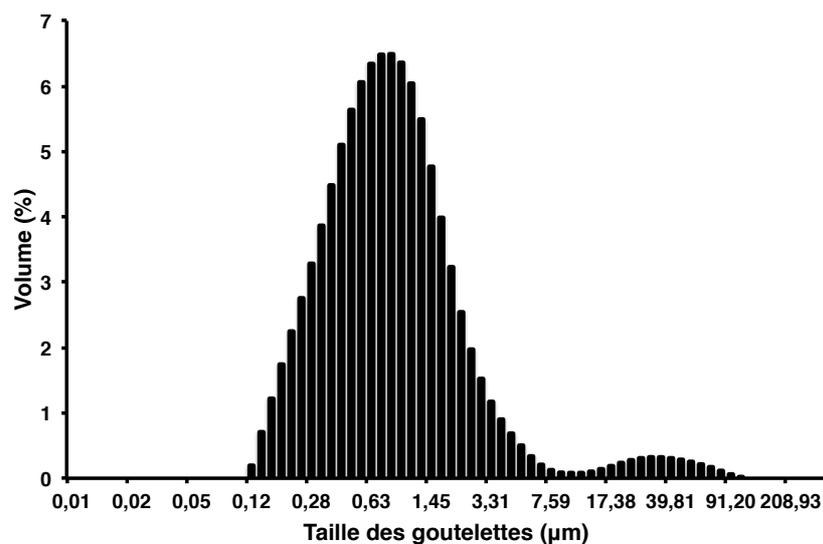


Figure 8 : Analyse granulométrique de la distribution de tailles des gouttelettes lipidiques de l'émulsion DMPC/huile d'olive après sa préparation correspondant à une phase dispersée monophasique (méthode 2). Rapport volumique huile/eau 1/10, [DMPC] = 5 mg/mL.

II.2. Analyse microscopique

Nous avons ensuite observé l'aspect et la morphologie des gouttelettes lipidiques par microscopie optique sur l'émulsion homogénéisée par agitation manuelle douce c'est-à-dire composée d'une seule phase. La **figure 7.B** montre une dispersion constituée de gouttelettes lipidiques de forme sphérique, polydisperse, avec des tailles comprises entre 1 et 4 μm .

II.3. Analyse granulométrique

Nous avons ensuite étudié la distribution de tailles des gouttelettes lipidiques de l'émulsion DMPC/huile d'olive par granulométrie sur l'émulsion homogénéisée comme pour la microscopie optique. La courbe de la **figure 8** montre une population de gouttelettes très majoritaire (96%) centrée autour de 0,8 μm dont la taille s'étend de 0.12 à 10 μm . La deuxième population centrée autour de 32 μm est quant à elle un artefact puisque la résolution maximale du granulomètre est de 18 μm . Après élimination de cette contribution, la taille moyenne des gouttelettes a été déterminée à 2.2 μm .

II.4. Caractérisation par cryo-microscopie électronique

Pour aller plus loin dans la caractérisation de l'émulsion DMPC/huile d'olive, nous avons mené une étude par cryo-microscopie électronique (cryo-ME) afin d'avoir des informations sur la structure des gouttelettes lipidiques et savoir notamment comment s'organise l'émulsifiant, le DMPC, dans ces gouttelettes. Forme-t-il une couche mono ou multimoléculaire à la surface des gouttelettes ? S'insère-t-il dans le cœur hydrophobe ? Pour cela, l'émulsion a fait l'objet de deux observations : i) après sa préparation et avant l'apparition du crémage avec l'analyse de la phase dispersée homogène ; ii) après neuf jours, avec l'analyse séparément de la phase crémée et la phase dispersée.

Les images de cryo-ME de l'émulsion après sa préparation montrent trois types d'objets (**Fig.9.A**) : i) des objets sphériques de quelques dizaines de nanomètres entourés d'une seule couche plus dense que l'intérieur de l'objet, lui-même de densité similaire à celle de l'extérieur de l'objet (flèche noire du bas, **Fig.9.A**) ; ii) des objets sphériques, de taille sensiblement identique à celle des objets précédents, entourés de plusieurs couches, des couches foncées alternant avec des couches claires, la densité des couches claires étant identique à celle de l'intérieur et de l'extérieur de l'objet (flèche noire du haut, **Fig.9.A**)

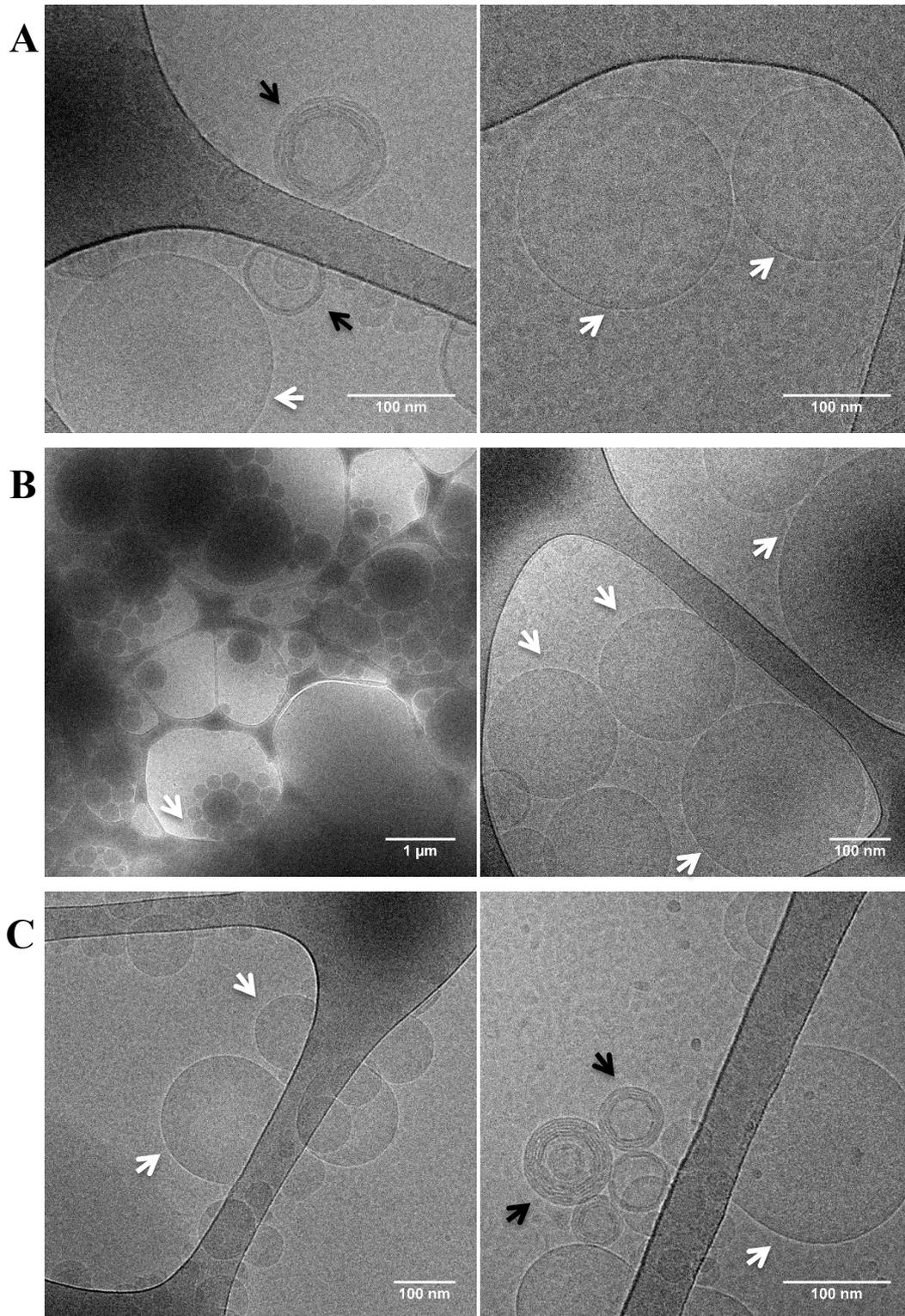


Figure 9 : Clichés de cryo-microscopie électronique de l'émulsion DMPC/huile d'olive : de la phase dispersée homogène obtenue après sa préparation et avant le crémage (A) ; de la phase crémée (B) et de la phase dispersée (C) 9 jours après sa préparation. Les flèches noires et les flèches blanches indiquent respectivement les vésicules multilamellaires et les gouttelettes lipidiques. Rapport volumique huile/eau 1/10. [DMPC] = 5mg/mL. Collaboration Equipe Lambert, CBMN, Marion Dacossas et Olivier Lambert.

; iii) des objets sphériques sans couche superficielle de plus grande taille de l'ordre de la centaine de nanomètre dont la densité est plus élevée que celle de l'extérieur (flèches blanches, **Fig.9.A**). Ces images nous renseignent donc sur les différents types d'architectures moléculaires rencontrées dans l'émulsion. Les deux premiers objets correspondent très vraisemblablement à des vésicules uni ou multilamellaires formées d'une seule ou plusieurs bicouches de lipides dont la densité est différente de celle de l'eau interne ou de la phase continue de l'émulsion ; les troisièmes objets coïncident plutôt avec des gouttelettes d'huile d'olive stabilisées par le DMPC dispersées dans l'eau dont la densité est supérieure à celle de l'eau qui les entoure. Dans ce dernier cas, l'absence de contraste entre la surface et le cœur des gouttelettes indique que le DMPC est très certainement structuré en une monocouche avec une densité très proche de celle de l'huile constituant le cœur des gouttelettes, formant ainsi un continuum ; les têtes polaires du DMPC pointant vers l'extérieur et les chaînes grasses étant tournées vers l'intérieur.

Les résultats de cryo-ME de l'émulsion après le crémage montrent dans la phase crémée des objets sphériques, dont leur densité intérieure est plus importante qu'à l'extérieur, avec des tailles allant de la centaine de nanomètres à quelques micromètres de diamètre (flèches blanches, **Fig.9.B**), correspondant à des gouttelettes lipidiques. En revanche, nous n'avons pas observé de liposomes uni ou multilamellaires dans cette phase. Dans la phase dispersée, les images de cryo-ME montrent, comme pour la phase crémée, la présence de gouttelettes d'huiles avec un diamètre allant de quelques dizaines à une centaine de nanomètres (flèches blanches, **Fig.9.C**) et de quelques liposomes avec une ou plusieurs bicouches (flèches noires). Ces observations confirment que les gouttelettes d'huiles de plus grosse taille sont dans la phase crémée.

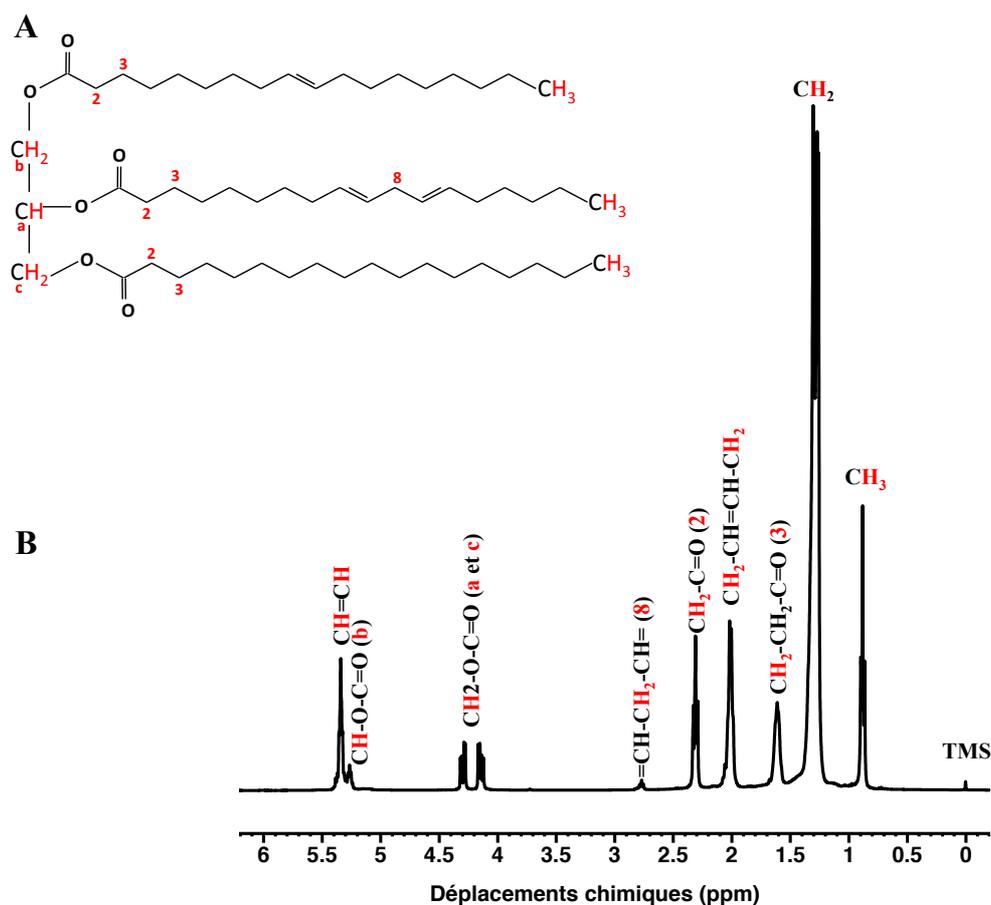


Figure 10 : Structure du triglycéride de l'huile d'olive constitué de 3 chaînes grasses majoritaires (C18:1, C18:2, C16 :0) (A). Spectre RMN du proton de l'huile d'olive dans du CDCl_3 (B). Le rapport volumique CDCl_3 /huile d'olive est de 90/10. Les déplacements chimiques sont référencés par rapport au signal du TMS fixé à 0 ppm. T = 25°C, CM 400 MHz, NA 16 sc.

Groupements chimiques	Composé	δ (ppm)
CH=CH	AG insaturé	5.34
CH-O-C=O (b)	glycérol	5.26
CH₂-O-C=O (a et c)	glycérol	4.22
=CH-CH₂-CH= (8)	Acide linoléique	2.78
CH₂-C=O (2)	Tous les chaînes acyles	2.3
CH₂-CH=CH-CH₂	AG insaturé	2.01
CH₂-CH₂-C=O (3)	Tous les chaînes acyles	1.61
CH₂	Tous les chaînes acyles	1.28
CH₃	Tous les chaînes acyles	0.88

Tableau 1 : Déplacements chimiques des protons des groupements chimiques des triglycérides constituant l'huile d'olive (en ppm) obtenus à partir de la **figure 10**.

II.5. Caractérisation par RMN-¹H

Après avoir obtenu des informations sur la stabilité de l'émulsion DMPC/huile d'olive et la taille et la morphologie des gouttelettes lipidiques la constituant, nous avons effectué une analyse par RMN-¹H afin d'avoir des informations structurales sur ses différents constituants et leur répartition entre la phase continue et la phase dispersée. Dans un premier temps, nous avons enregistré des spectres RMN-¹H en phase liquide et attribué les différentes résonances des protons de l'huile d'olive et du DMPC séparément. Ensuite, nous avons analysé par RMN HR-MAS ¹H l'émulsion DMPC/huile d'olive homogène obtenue après sa préparation.

II.5.1. Caractérisation par RMN-¹H de l'huile d'olive

L'huile d'olive est composée majoritairement de triglycérides qui constituent 98% de la masse totale de l'huile, les 2% restant sont constitués d'acides gras (AG) libres, de vitamine E et de polyphénols. En moyenne, les triglycérides se composent de 78% d'AG mono-insaturés (majoritairement de l'acide oléique C18:1), 7% d'AG poly-insaturés (majoritairement de l'acide linoléique C18:2, ω6) et 15% d'AG saturés (Chapitre I, partie I.1). La **figure 10** montre le spectre RMN-¹H des triglycérides constituant l'huile d'olive, pour une température de 25°C. Conformément à la littérature (Sacchi *et al.*, 1997), les signaux compris entre 0.8 et 3 ppm, sont attribués respectivement aux protons des chaînes carbonées des chaînes grasses, par ordre de déplacement chimique croissant (**Tableau 1**) : aux protons des groupements méthyles terminaux (CH₃), aux protons des groupes méthylènes (CH₂), aux protons en position β des fonctions ester (CH₂-CH₂-C=O), aux protons allyliques (CH₂-CH=CH-CH₂), aux protons en position α des fonctions esters (CH₂-C=O) et aux protons bis-allyliques (=CH-CH₂-CH=). Les signaux à 4.2 et 5.2 ppm correspondent respectivement aux protons des positions a et c des groupes méthylènes (CH₂-O-C=O) du squelette glycérol, et le proton en position b du groupe méthine (CH-O-C=O). Finalement, le signal à 5.3 ppm correspond aux protons éthyléniques des chaînes grasses insaturées.

II.5.2. Caractérisation par RMN-¹H du DMPC

Après l'huile d'olive, nous avons caractérisé le DMPC par RMN-¹H, après l'avoir solubilisé dans du chloroforme. La figure 11 montre les résonances du DMPC et leur attribution selon Carlotti *et al.*, 2002. Conformément et par ordre de déplacement chimique croissant

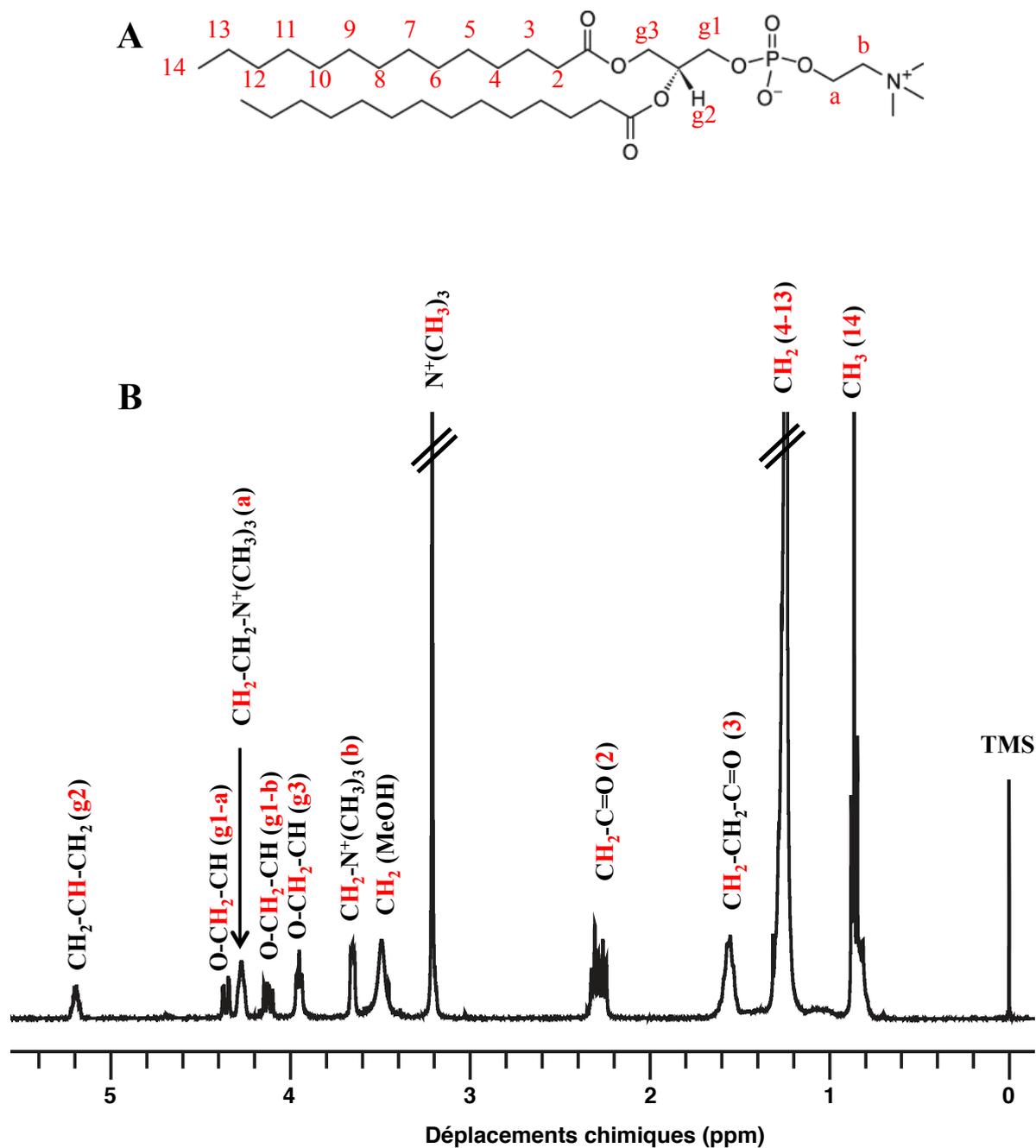


Figure 11 : Structure chimique du DMPC (A). Spectre RMN du proton du DMPC dans du chloroforme deutéré $\text{CDCl}_3/\text{MeOH}$ (B). Les déplacements chimiques sont référencés par rapport au signal du TMS fixé à 0 ppm. $[\text{DMPC}] = 5 \text{ mg/mL}$, $T = 25^\circ\text{C}$, CM 400 MHz, NA = 32 sc.

(**Tableau 2**), les signaux compris entre 0.8 et 2.5 ppm sont attribués respectivement aux protons des chaînes d'acide myristique du DMPC. Les signaux entre 3 et 6 ppm sont ceux des protons du squelette glycérol : protons des méthyles de l'ammonium quaternaire de la tête choline ($N^+(CH_3)_3$), protons en β du groupement phosphate ($PO_4^-CH_2-CH_2- N^+(CH_3)_3$), protons en position sn-3 du glycérol ($O-CH_2-CH$ (g3)), protons en α du groupement phosphate ($PO_4^-CH_2$), protons en position sn-1 ($PO_4^-CH_2-CH$ (g1)) et sn-2 ($CH_2-CH-CH_2$ (g2)) du glycérol.

Groupements chimiques	δ (ppm)
$CH_2-CH-CH_2$ (g2)	5.20
$O-CH_2-CH$ (g1-a)	4.35
$CH_2-CH_2-N^+(CH_3)_3$ (a)	4.27
$O-CH_2-CH$ (g1-b)	4.12
$O-CH_2-CH$ (g3)	3.95
$CH_2-N^+(CH_3)_3$ (b)	3.65
$N^+(CH_3)_3$	3.21
$CH_2-C=O$ (2)	2.28
$CH_2-CH_2-C=O$ (3)	1.58
CH_2 (4-13)	1.25
CH_3 (14)	0.87

Tableau 2 : Déplacements chimiques des protons des groupements chimiques du DMPC (en ppm) obtenus à partir de la **figure 11**.

II.5.3. Caractérisation de l'émulsion par RMN- 1H

Après avoir caractérisé et attribué les résonances des protons des triglycérides de l'huile d'olive et du DMPC séparément, nous avons étudié l'émulsion lipidique DMPC/huile d'olive par RMN- 1H en phase liquide, juste après sa préparation et avant le crémage. La **figure 12** présente le spectre RMN- 1H de l'émulsion homogène obtenue avec un rapport molaire émulsifiant/huile de 1/14 (voir le calcul des concentrations en **Annexe 4**), à 25°C.

L'analyse du spectre a été réalisée par superposition avec les spectres des composants seuls (**Fig.10 et 11**) et l'aide des **tableaux 1 et 2**. On remarque tout d'abord que le spectre est bien résolu et que les signaux sont ceux de l'huile d'olive hormis la résonance à 3.26 ppm, seul signal visible du DMPC correspondant à la résonance des protons de l'ammonium quaternaire de la tête choline. Les autres signaux du DMPC sont masqués par ceux de l'huile d'olive en

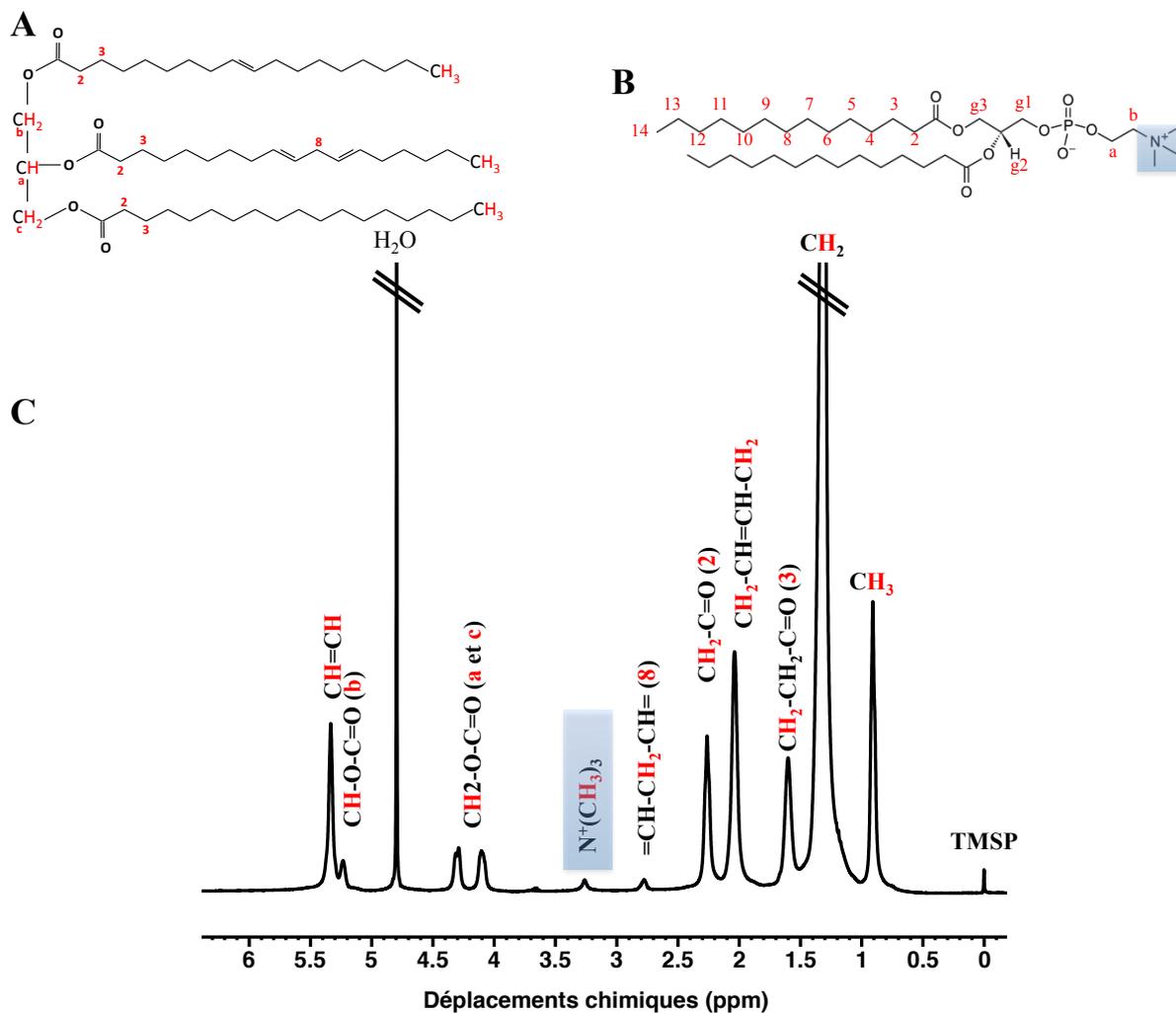


Figure 12 : Structures chimiques du triglycéride constitué de 3 acides gras majoritaires (C18:1, C18:2, C16:0) de l'huile d'olive (A) et du DMPC (B). Spectre RMN du proton de l'émulsion DMPC/huile d'olive homogène après sa préparation dans de l'eau deutérée (C). Le rectangle bleu montre le signal des protons des méthyles de l'ammonium quaternaire du DMPC. Les déplacements chimiques sont référencés par rapport au signal du TMS fixé à 0 ppm. Rapport volumique huile/eau 1/10. [DMPC] = 5 mg/mL, T = 25°C, CM 400 MHz, NA = 64 sc.

raison de sa faible concentration comparée à celle de l'huile (3.52 vs 49.5 mM). Par ailleurs, la résonance à 2.07 ppm est un signal spécifique de l'huile d'olive qui correspond aux protons allyliques des chaînes grasses insaturées présentes dans l'huile, le DMPC ne contenant que des chaînes grasses saturées.

Bien que les gouttelettes identifiées dans l'émulsion aient une taille moyenne de l'ordre du micron, ce spectre proton obtenu en statique indique que l'huile contenue dans les gouttelettes est à l'état liquide puisque la largeur des raies de résonance de l'huile est de l'ordre d'une dizaine de Hz malgré sa viscosité. La contribution du DMPC, présent sous forme d'une monocouche à la surface des gouttelettes ou de vésicules uni ou multilamellaires comme l'ont montré les clichés de microscopie électronique, est celle d'objets isotropes de petite taille. On peut donc suggérer qu'elle est due aux vésicules unilamellaires de la phase continue de l'émulsion.

Pour conclure sur cette partie, nous avons réussi à formuler une émulsion alimentaire huile dans eau stable composée d'huile d'olive pour la phase grasseuse et de DMPC comme émulsifiant, deux composants représentatifs des émulsions alimentaires. Cette émulsion crème quelques jours après sa préparation mais reste stable pendant plus d'un mois. L'émulsion formée par sonication est constituée de gouttelettes d'huile stabilisées par une monocouche d'émulsifiant à sa surface. Elle est polydisperse avec des tailles de gouttelettes d'huile variant de 0,1 à 1 μm , les gouttelettes de plus grosses tailles étant présentes dans la partie crémée de l'émulsion. Quelques vésicules sont également retrouvées dans la phase dispersée non crémée, générées vraisemblablement par la sonication. L'ensemble des constituants de l'émulsion ont pu être mis en évidence sur le spectre RMN- ^1H de l'émulsion. Par conséquent, cette émulsion répond aux critères de stabilité et de composition que nous nous étions fixés au début de cette étude : à savoir suffisamment stable pour permettre une étude par RMN et constituée de composants alimentaires avec une signature RMN bien identifiée. Cette émulsion nous a donc servi de modèle d'étude pour analyser l'influence des lipides exogènes apportés par l'alimentation sur le goût du vin. La partie qui va suivre s'intéresse à l'interaction entre un modèle de résidu de tannins du vin représenté par la catéchine et l'émulsion DMPC/huile d'olive en question.

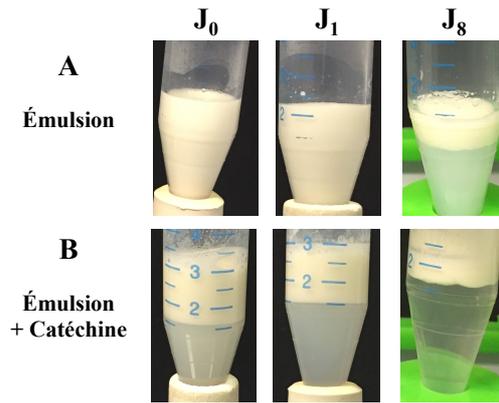


Figure 13 : Photos représentant l'aspect visuel de l'émulsion DMPC/huile d'olive en absence (A) et en présence de catéchine (B) à : J₀, le jour de préparation de l'émulsion ; J₁, après un jour ; J₈, après huit jours. Rapport volumique huile/eau 1/10, [DMPC] = 5 mg/mL, [Catéchine] = 7mM.

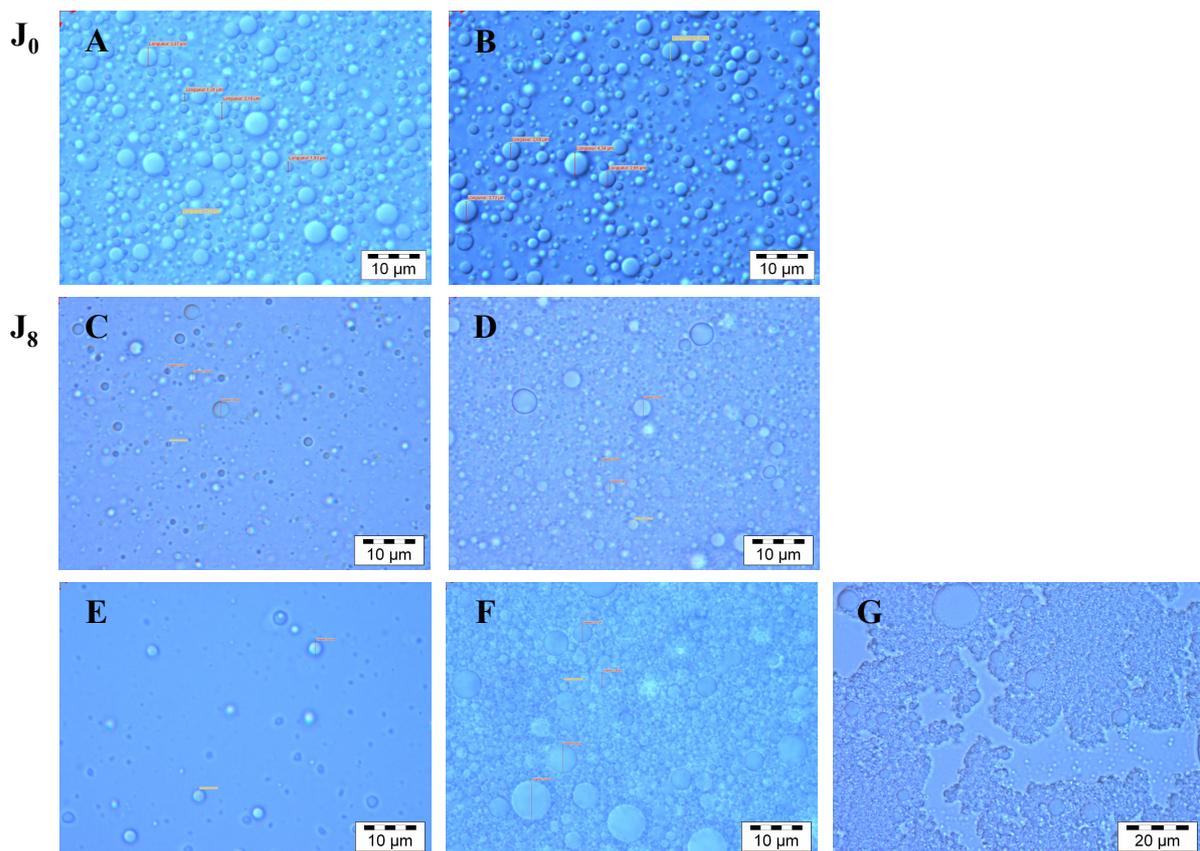


Figure 14 : Images de microscopie optique de l'émulsion DMPC/huile d'olive en absence (A) et en présence de catéchine (B) après sa préparation (J₀) et après 8 jours de préparation (J₈). Image de la phase dispersée et la phase crémée respectivement en absence (C et D) et en présence de catéchine (E, F, G) à J₈. Images A à F : grossissement x100, Image G : grossissement x60.

III. Interaction entre la catéchine et les gouttelettes lipidiques

Pour étudier l'impact de la catéchine sur l'émulsion DMPC/huile d'olive, juste après sa préparation, nous avons mélangé un volume d'émulsion homogène (3 mL) avec de la poudre de catéchine telle que sa concentration finale dans le mélange soit de 7 mM. Cette valeur est en dessous de sa concentration micellaire critique ($CMC = 9 \pm 2$ mM) comme c'est le cas dans le vin rouge. Des analyses similaires à celles réalisées sur l'émulsion seule ont été réalisées sur le mélange émulsion/tannin.

III.1. Analyse macroscopique

Comparativement à l'émulsion sans tannin, en présence de la catéchine, nous avons observé un crémage instantané de l'émulsion, avec l'apparition d'une phase supérieure crémée de couleur blanche et une phase inférieure dispersée d'aspect laiteux (**Fig.13**). De plus, nous avons remarqué un éclaircissement de la phase dispersée inférieure plus rapide au cours du temps, jusqu'à devenir transparente après 8 jours, ce qui n'était pas le cas de l'émulsion seule (**Fig.13.B**). Cette émulsion est également restée stable sur plus de 8 jours pendant lesquels aucune démixtion n'a été observée.

III.2. Analyse microscopique

Ensuite, nous avons observé la morphologie et l'aspect des gouttelettes lipidiques en présence et en absence de la catéchine à J_0 et à J_8 par microscopie optique. Comme précédemment, nous avons homogénéisé l'émulsion avant de faire l'analyse. A J_0 , les images de microscopie optique montrent une dispersion de gouttelettes lipidiques de forme sphérique, avec des tailles qui varient entre 1 et 4 μm en présence et en absence de la catéchine (**Fig.14.A et B**). A J_8 , nous avons analysé et comparé la phase crémée et la phase dispersée de chaque émulsion. Dans les deux cas, on remarque que les gouttelettes lipidiques présentes dans la phase crémée sont très nombreuses et très compactes (**Fig.14.D et F**) par rapport à la phase inférieure où elles sont moins nombreuses (**Fig.14.C et E**). De plus, on remarque que les gouttelettes dans la phase crémée sont plus compactes et ont une taille plus grande en présence de la catéchine qu'en son absence (**Fig.14.D et F**). Contrairement à l'émulsion seule, nous avons observé la présence de grands domaines de phase grasseuse et de gouttelettes agrégées (**Fig.14.G**).

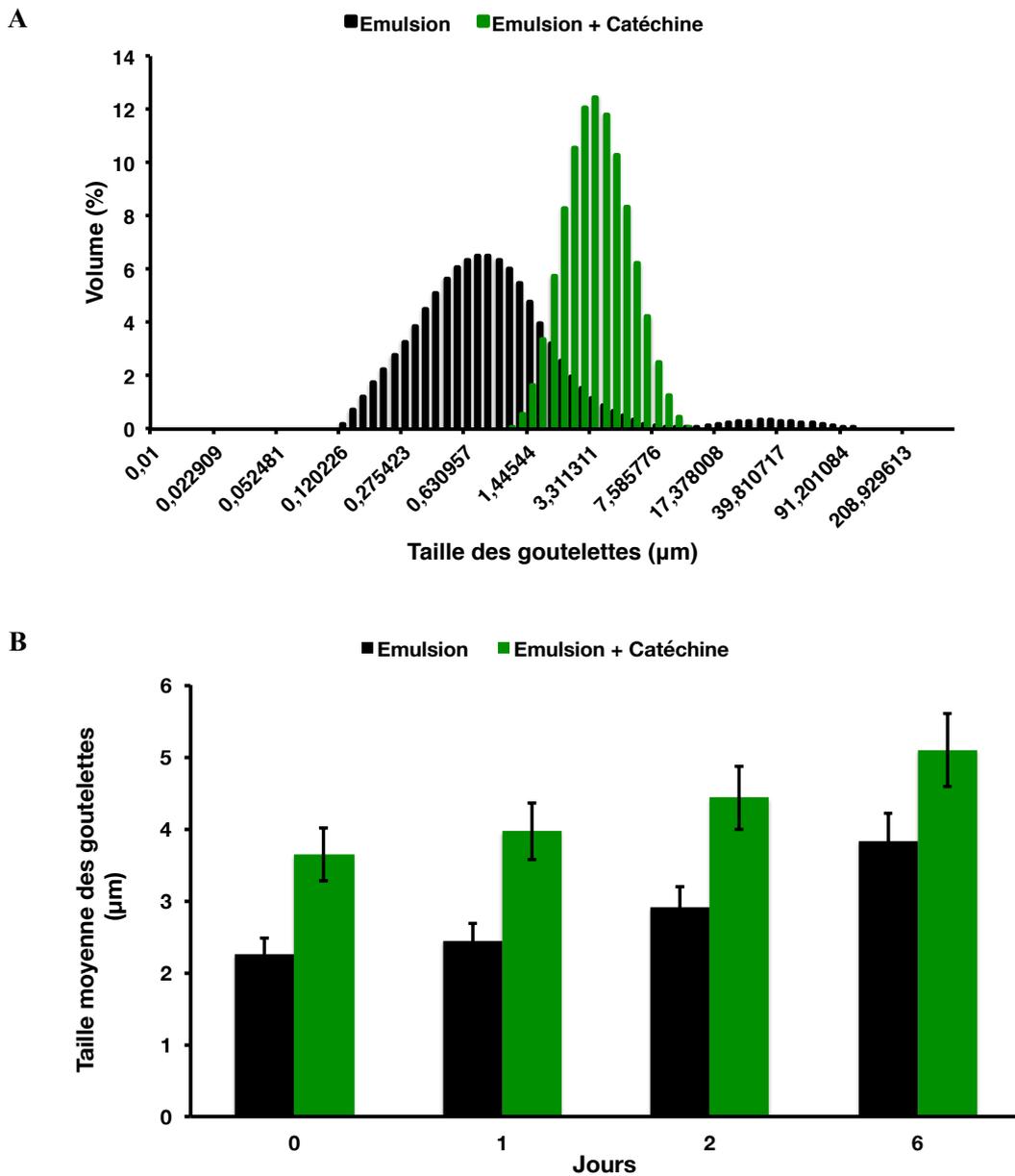


Figure 15 : Comparaison de la distribution de tailles des gouttelettes lipidiques de l'émulsion homogène DMPC/huile d'olive en absence (noir) et en présence (vert) de catéchine mesurée par granulométrie à J_0 , après préparation (A). Evolution de la taille moyenne des gouttelettes lipidiques en fonction du temps pour les deux systèmes (B).

III.3. Analyse granulométrique

Nous avons également comparé la distribution de tailles des gouttelettes lipidiques de l'émulsion DMPC/huile d'olive en présence et en absence de la catéchine juste après sa préparation. On remarque que la distribution de tailles des gouttelettes en présence de la catéchine est moins dispersée (tailles comprises entre 1.4 et 8 μm vs 0.12 et 10 μm en absence de tannin) et qu'elle se décale vers des tailles plus élevées avec une population majoritaire centrée autour de 3 μm contre 0.8 μm pour l'émulsion seule (**Fig.15.A**). La taille moyenne des gouttelettes augmente également en présence du tannin, passant de 2 à 3.6 μm . De plus, nous avons suivi la variation des tailles moyennes des gouttelettes en fonction du temps (**Fig.15.B**). On remarque que l'augmentation de la taille des gouttelettes n'apparaît que deux jours après la préparation de l'émulsion. En absence de catéchine, la taille varie de $2.2 \pm 0.22 \mu\text{m}$ à J_0 à $3.8 \pm 0.38 \mu\text{m}$ après 6 jours (augmentation relative de 73%), alors qu'en présence de catéchine, la taille des gouttelettes varie de $3.6 \pm 0.36 \mu\text{m}$ à J_0 à $5 \pm 0.5 \mu\text{m}$ après 6 jours (augmentation relative de 39%). Ces résultats montrent que la taille moyenne des gouttelettes augmente avec le temps et que cette augmentation est moins importante en présence de la catéchine. Toutefois, la taille des gouttelettes est plus grande en présence du tannin.

En se basant sur les résultats de l'analyse macroscopique, microscopique et granulométrique, on remarque que la présence de catéchine favorise le crémage de l'émulsion DMPC/huile d'olive donc le rapprochement des gouttelettes entre elles, et aboutit à des gouttelettes lipidiques de plus grandes tailles ; ce qui met en évidence une interaction entre la catéchine et les gouttelettes lipidiques. Pour avoir plus d'informations sur les interactions entre la catéchine et l'émulsion lipidique, nous avons étudié l'effet de la catéchine sur la dynamique des lipides en émulsion par RMN du deutérium.

III.4. Effet de la catéchine sur la dynamique des lipides en émulsion

En utilisant un phospholipide deutéré sur sa chaîne acyle, il est possible grâce à la RMN- ^2H , de sonder l'effet de la catéchine sur l'ordre et la dynamique des chaînes de l'émulsifiant organisé en monocouche à la surface des gouttelettes de l'émulsion. Pour cela, nous avons préparé une émulsion huile dans l'eau déplétée, en utilisant le DMPC d_{54} comme émulsifiant, dans les mêmes conditions expérimentales que précédemment avec une concentration en émulsifiant de 5 mg/mL et un rapport volumique huile/eau de 1/10. L'analyse par RMN- ^2H a été effectuée sur la phase crémée de l'émulsion une semaine après sa préparation.

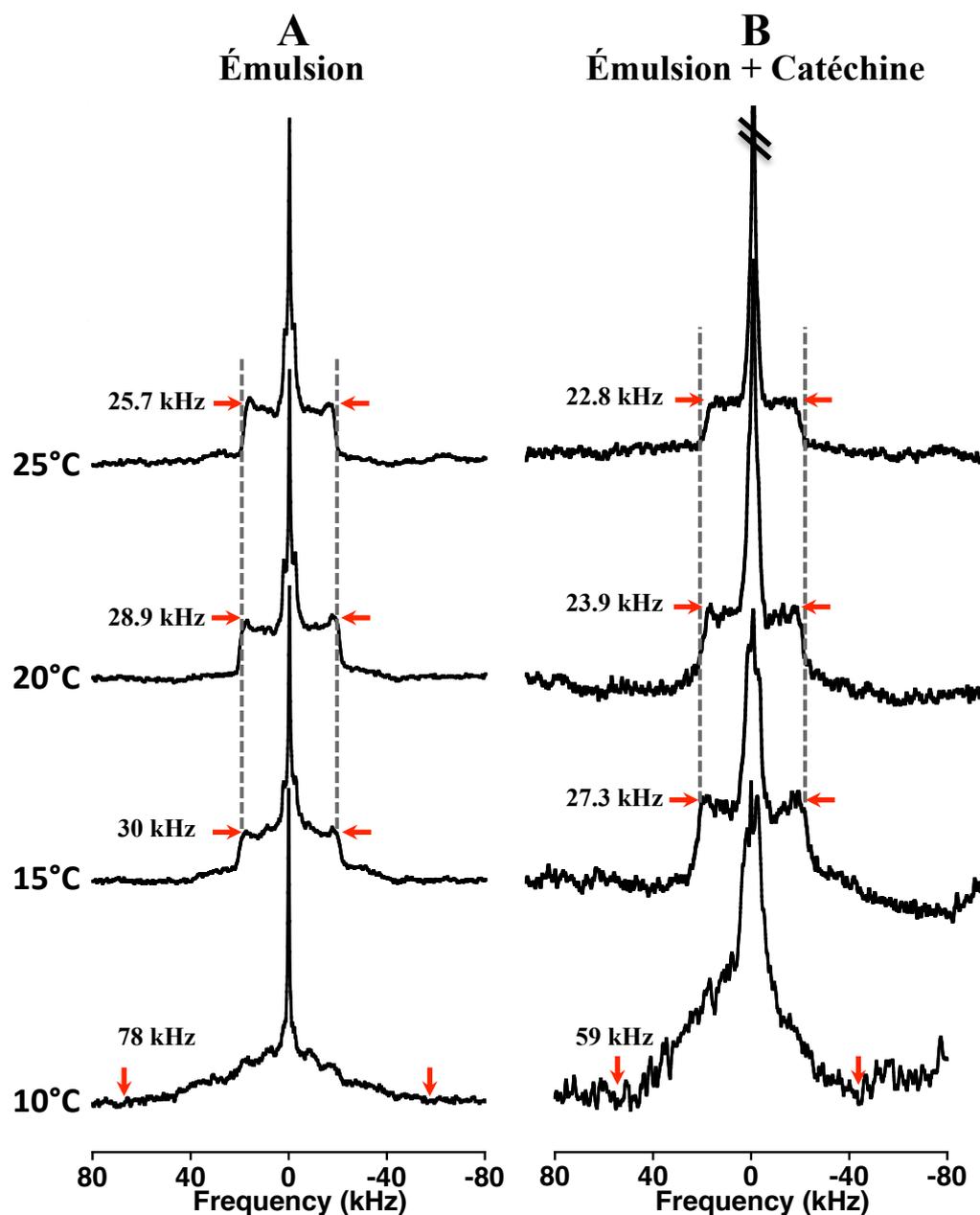


Figure 16 : Spectres RMN du deutérium de la phase crémée de l’émulsion $DMPCd_{54}$ /huile d’olive dans de l’eau dépletée en absence (A) et en présence (B) de catéchine, à différentes températures. Les traits pointillés présentent la variation de la largeur des spectres en fonction de la température. Les flèches rouges indiquent l’éclatement quadripolaire du doublet le plus large. Rapport volumique huile/eau 1/10. $[DMPCd_{54}] = 5 \text{ mg/mL}$, $[Catéchine] = 7 \text{ mM}$, CM 500 MHz, NA = 8K sc, LB = 300 Hz.

La **figure 16** présente les spectres deutérium de la phase crémée de l'émulsion seule et en présence de catéchine, obtenus à différentes températures : 10, 15, 20 et 25°C. Pour le système sans catéchine, le spectre à 10°C présente une asymétrie axiale ; il est large, peu résolu et aucun doublet de Pake n'est visible. Son allure est caractéristique d'une phase gel, où les chaînes sont alignées les unes par rapport aux autres, en contact étroit et soumises à peu de mouvement (Davis 1979, Furlan *et al.*, 2014, Rowat et Davis 2004). A 15, 20 et 25°C, les spectres présentent une allure caractéristique d'une phase fluide. Ils montrent une symétrie axiale, avec superposition des différents doublets de Pake relatifs aux liaisons C-D sur les chaînes acyles du DMPC. A 15°C, on remarque que le spectre présente des caractéristiques différentes de celles des deux spectres à 20 et 25°C. Il est moins bien résolu et l'intensité des épaulements aux extrémités est plus faible. Ceci montre la coexistence de deux phases, une phase gel et une phase fluide, la proportion de la phase fluide étant la plus importante au regard de l'allure du spectre. De plus, nous observons sur tous les spectres un signal RMN isotrope (à la fréquence de 0 kHz) dont la contribution augmente avec la température ($13 \pm 1\%$ à 15°C, $7.5 \pm 3.5\%$ à 20°C et $15 \pm 4.2\%$ à 25°C). Celui-ci correspond aux gouttelettes lipidiques de petites tailles (< 100 nm) dont la mobilité dans l'eau est importante. On remarque également que les spectres deviennent plus étroits avec l'augmentation de la température (trait pointillé). Cet effet est dû à l'augmentation de la dynamique des chaînes acyles du lipide donnant lieu à un système de plus en plus fluide. En présence de la catéchine, le spectre à 10°C présente l'allure d'une phase gel, avec une largeur spectrale moins importante que celle du spectre à 10°C en absence de la catéchine (59 vs 78 kHz). A 15°C, le spectre en présence de la catéchine est relatif à une phase fluide pure, contrairement au spectre de l'émulsion en absence de la catéchine présentant une coexistence de phases gel et fluide. Les spectres à 20 et 25°C présentent également l'allure d'une phase fluide. De la même façon que pour l'émulsion sans tannin, la largeur des spectres diminue avec la température. En revanche, la largeur des spectres en présence de la catéchine est inférieure à celle de l'émulsion seule. En effet, en comparant les éclatements quadripolaires du doublet le plus large (flèche rouge) à une température donnée, on remarque qu'ils sont plus faibles en présence de la catéchine et ce, quel que soit la température considérée (ex. 22.8 vs 25.7 kHz à 25°C). Comme pour les spectres de l'émulsion sans catéchine, nous observons un signal RMN isotrope qui augmente avec la température ($8.5 \pm 0.5\%$ à 15°C, $19 \pm 1\%$ à 20°C et 29 ± 1 à 25°C). La différence dans la contribution du signal isotrope en absence et en présence de la catéchine est liée à la préparation de l'échantillon ; nous avons sans doute prélevé un peu plus de phase dispersée avec la phase crémée en présence de la catéchine, ce qui explique

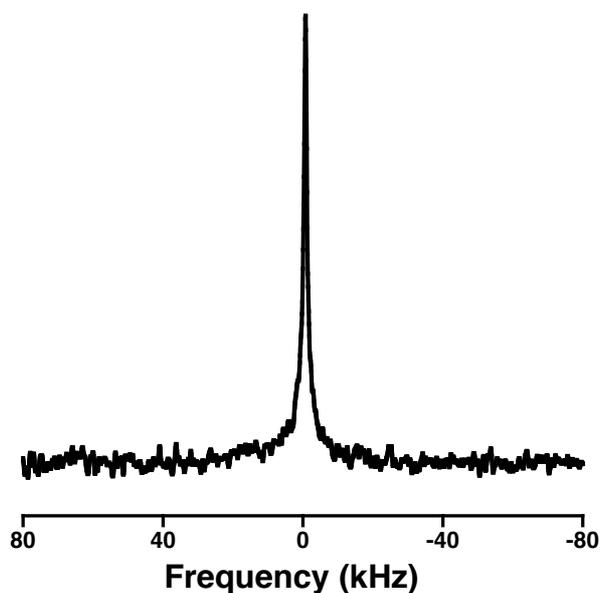


Figure 17 : Spectre RMN- ^2H de la phase dispersée de l'émulsion DMPC/huile d'olive. Rapport volumique huile/eau 1/10. $T = 25^\circ\text{C}$ [DMPCd_{54}] = 5 mg/mL, CM 500 MHz, NA = 8k sc, LB = 300 Hz.

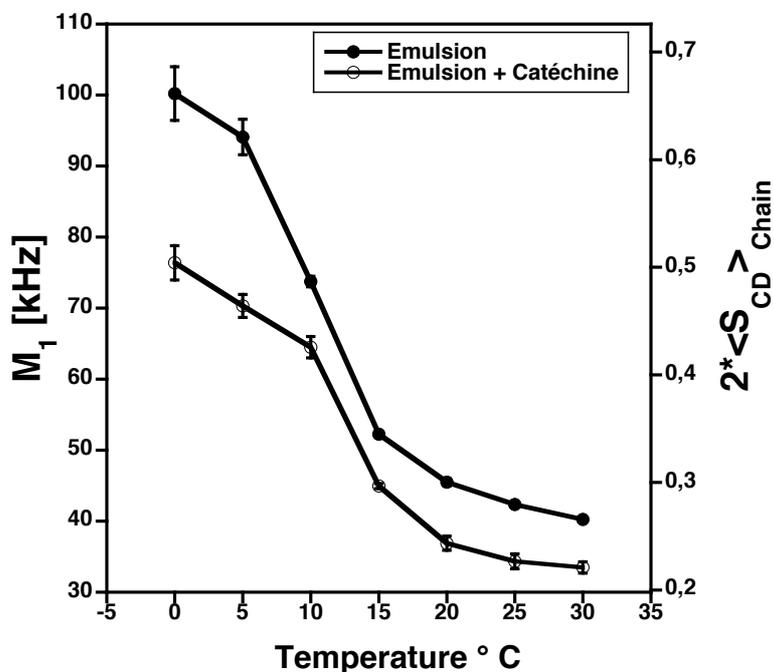


Figure 18 : Variation en fonction de la température des moments spectraux d'ordre 1, M_1 , et du paramètre d'ordre moyen des chaînes acyles deutérées, $2^* \langle S_{\text{CD}} \rangle_{\text{Chain}}$, calculés à partir des spectres de la **figure 16** en absence et en présence de catéchine.

l'augmentation de l'intensité du signal isotrope. De plus, l'augmentation de l'intensité du signal isotrope avec la température pourrait être expliquée par une augmentation de la mobilité et de la dynamique de certaines gouttelettes sous l'effet de la température, gouttelettes qui présentaient initialement une dépendance angulaire et qui contribuent désormais au signal isotrope.

Le spectre RMN-²H de la phase dispersée a été également enregistré (**Fig.17**). Celui-ci montre un signal isotrope indiquant que le DMPC entre dans la constitution d'objets isotropes de petites tailles très mobiles, à savoir les petites vésicules et les très petites gouttelettes vues en cryo-EM. Il faut signaler que la largeur du spectre à sa base est de l'ordre de 5 kHz, qui est plus large que celle d'un signal isotrope de l'ordre de 1 kHz. Ce qui pourrait correspondre aux plus grosses vésicules ou gouttelettes présentes dans la phase dispersée vues sur les clichés de cryo-EM, et qui expliquerait son aspect laiteux.

Pour préciser ces résultats, le thermotropisme des deux systèmes a été étudié avec le calcul du premier moment spectral M_1 . La **figure 18** représente la variation des M_1 obtenus à partir des spectres RMN-²H en fonction de la température. Les résultats montrent qu'en ajoutant la catéchine, il y a diminution de la valeur des M_1 et que cette diminution décroît avec la température. En effet, la diminution est de $23 \text{ kHz} \pm 3 \text{ kHz}$ à 5°C contre $8 \pm 0.5 \text{ kHz}$ à 25°C . Ces résultats indiquent que la catéchine a un effet fluidifiant sur l'organisation de l'émulsifiant à la surface des gouttelettes lipidiques et que celui-ci est plus significatif lorsque le système lipidique est en phase gel, comme ce qui a été déjà observé pour les membranes modèles (Furlan *et al.*, 2016).

Ainsi, nous avons montré que la catéchine interagit avec les gouttelettes lipidiques d'une émulsion alimentaire modèle et qu'elle a une action fluidifiante sur l'organisation de leur interface. Ensuite, nous avons cherché à savoir où et comment la catéchine se positionnait dans l'émulsion. De même que pour l'étude avec le modèle de membranes buccales, nous avons étudié la localisation de la catéchine dans l'émulsion DMPC/huile d'olive par RMN-¹H en phase liquide. Dans ce cas, nous avons utilisé du DMPC non deutéré.

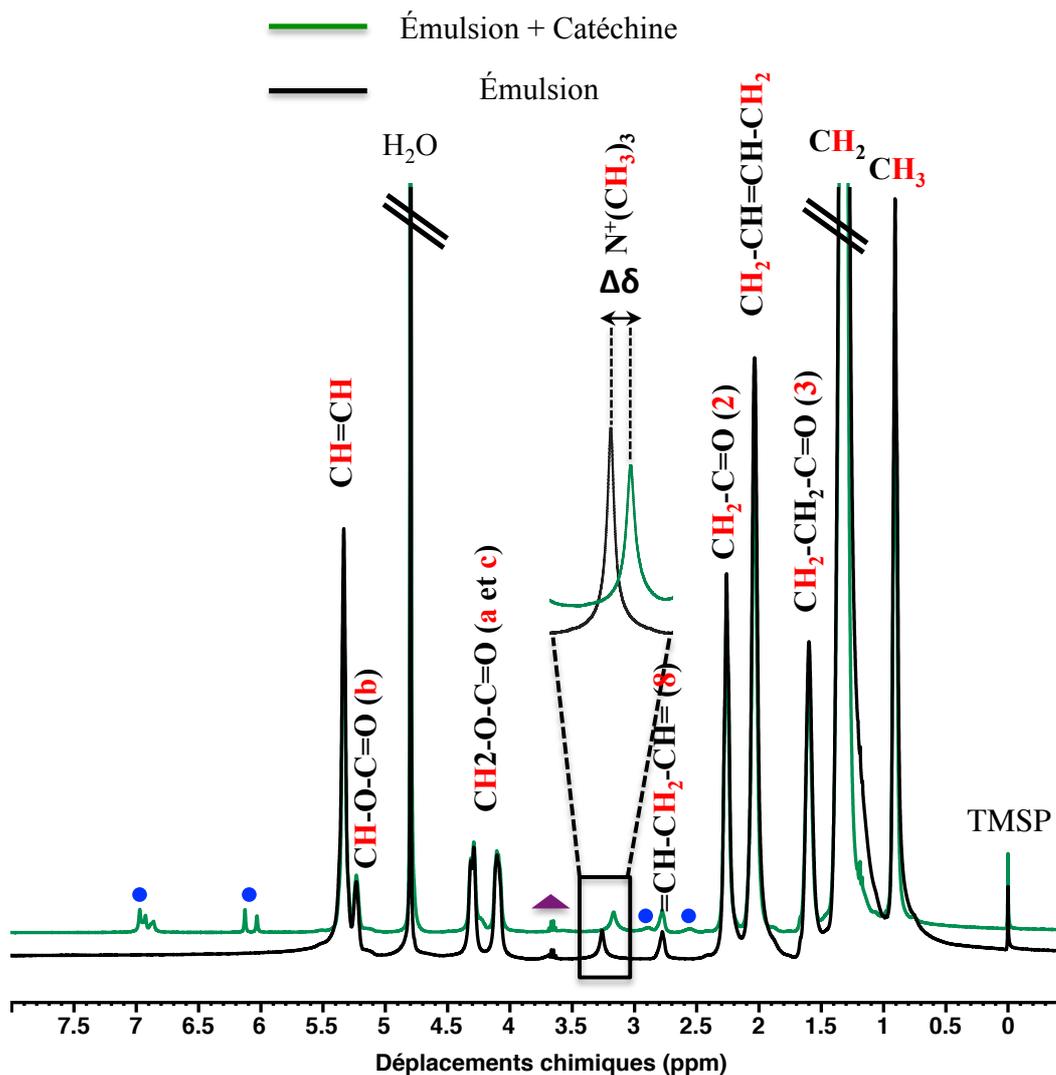


Figure 19 : Spectres RMN liquide du proton de l'émulsion DMPC/huile d'olive homogène après sa préparation dans de l'eau deutérée en absence (noir) et en présence de catéchine (vert). Le zoom présente le décalage du déplacement chimique ($\Delta\delta$) du signal de l'ammonium quaternaire du DMPC. Les points bleus présentent des résonances de la catéchine. Le triangle violet présente le signal d'une impureté présente dans l'échantillon. Les déplacements chimiques sont référencés par rapport au signal du TMSP fixé à 0 ppm. Rapport volumique huile/eau 1/10. [DMPC] = 5 mg/mL, [Catéchine] = 7 mM, T = 25°C, CM 400 MHz, NA = 128 sc.

III.5. Localisation de la catéchine dans l'émulsion

En étudiant l'effet de la catéchine sur les déplacements chimiques des protons de l'émulsion DMPC/huile d'olive, nous sommes capables d'avoir une information sur sa localisation au niveau des gouttelettes lipidiques. Des spectres RMN liquide du proton de l'émulsion ont été enregistrés après sa préparation, en absence et en présence de 7 mM de catéchine, pour une température de 25°C (**Fig.19**). En premier lieu, on remarque qu'en présence de la catéchine (spectre vert), il y a apparition de nouvelles résonances sur le spectre de l'émulsion. Les signaux entre 6 et 7 ppm correspondent aux protons aromatiques des cycles A et B de la catéchine. De plus, on observe deux signaux de très faible intensité entre 2.5 et 3 ppm qui correspondent aux deux doublets des protons en position 4 sur le cycle pyranne de la catéchine (voir l'attribution du spectre proton de la catéchine dans le Annexe 6 chapitre II). La superposition des spectres de l'émulsion seule et de la catéchine n'a montré aucun recouvrement de leurs résonances (**Annexe 5**). Après avoir attribué les différentes résonances (huile, DMPC et catéchine), nous avons pu constater que les résonances de l'huile d'olive sont restées intactes en présence du tannin alors que le signal relatif aux protons des méthyles de l'ammonium quaternaire du DMPC a subi un effet de blindage, qui se traduit par une variation de son déplacement chimique vers les basses valeurs de 3.26 ppm à 3.16 ppm (**zoom Fig.19**). Ce résultat montre que la catéchine interagit avec le DMPC localisé à la surface des gouttelettes lipidiques mais pas avec l'huile constituant leur cœur.

III.6. Répartition de la catéchine entre les deux phases de l'émulsion

Lorsque nous avons mélangé l'émulsion lipidique avec la catéchine, nous avons observé un crémage rapide de l'émulsion, avec une phase supérieure crémée et une phase inférieure dispersée. Nous avons remarqué, que la phase dispersée évolue vers une phase transparente après 8 jours de préparation de l'émulsion (**Fig.13.B**) et que la majorité des gouttelettes sont présentes dans la phase crémée. Nous avons donc cherché à déterminer la répartition de la catéchine entre la phase crémée et la phase dispersée, pour connaître la quantité de

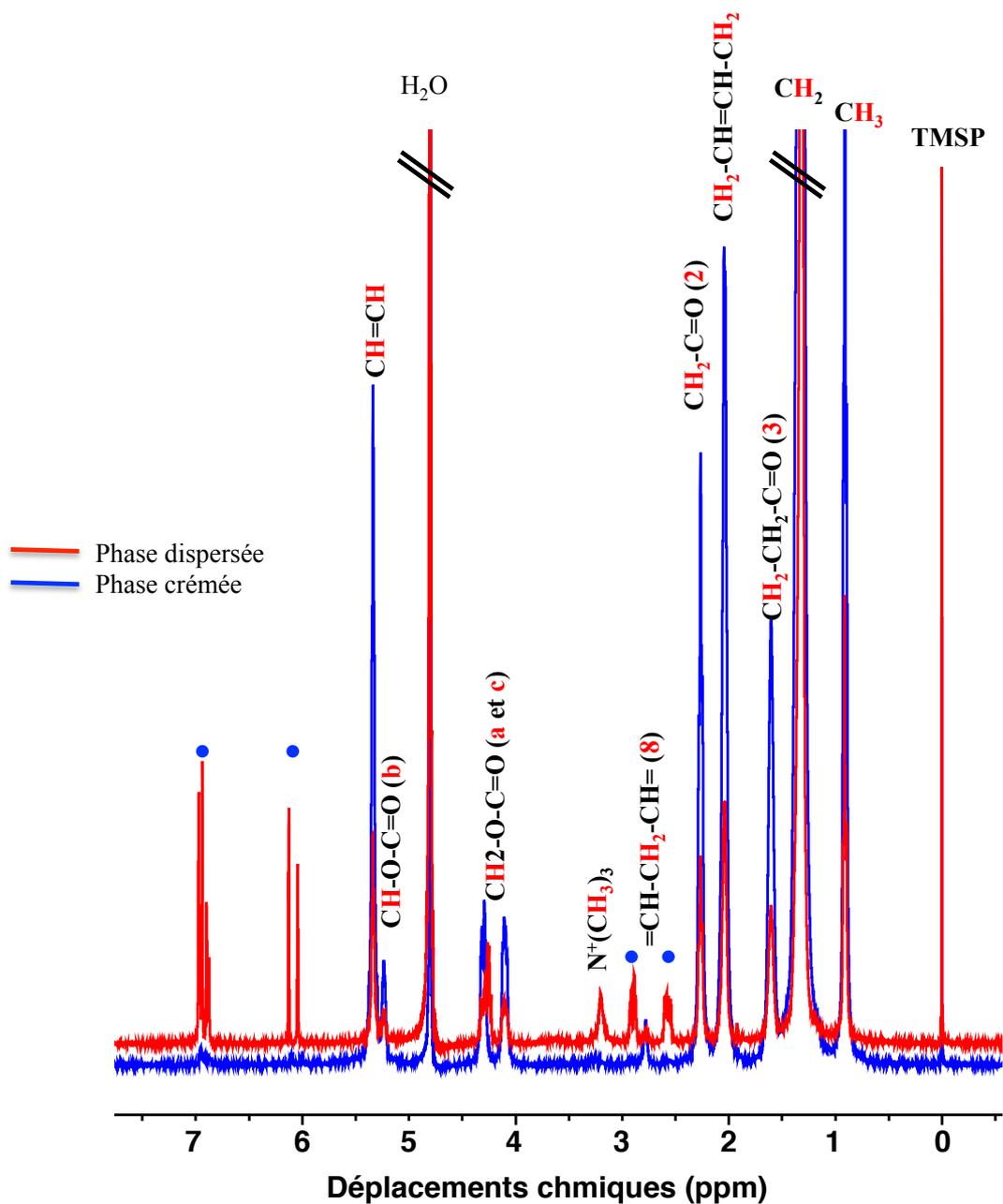


Figure 20 : Spectres RMN du proton de la phase dispersée (rouge) et la phase crémée (bleu) de l'émulsion DMPC/huile d'olive en présence de catéchine. Les points bleus présentent des résonances de la catéchine. Les déplacements chimiques sont référencés par rapport au signal du TMS fixé à 0 ppm. Rapport volumique huile/eau deutéré 1/10. [DMPC] = 5 mg/mL, [Catéchine] = 7 mM, T = 25°C, CM 400 MHz, NA = 128 sc.

catéchine qui interagit avec les gouttelettes lipidiques. Pour cela, nous avons étudié séparément la phase crémée et la phase dispersée par RMN-¹H en phase liquide. Les résultats montrent des différences entre les deux spectres des différentes phases (**Fig.20**). Nous pouvons remarquer que les signaux de l'huile d'olive sont identifiables dans les deux phases, bien qu'ils soient plus larges et plus intenses dans la phase crémée que dans la phase dispersée. En revanche, les résonances de la choline du DMPC sont plus intenses dans la phase dispersée que dans la phase crémée (des résultats similaires sont obtenus avec les deux phases de l'émulsion sans catéchine, voir **Annexe 6**). Il en est de même pour les résonances de la catéchine bien plus visibles dans la phase dispersée. Ceci donne une information préliminaire quant à la répartition des différents constituants de l'émulsion entre les deux phases. L'huile d'olive est présente en concentration plus importante dans la phase crémée, tandis que le DMPC et la catéchine sont majoritairement présents dans la phase dispersée. A l'issue de ce résultat, nous avons déterminé la concentration en catéchine dans la phase dispersée, phase où l'intensité de ses signaux est la plus importante, à partir de la courbe d'intégration. Celle-ci permet d'avoir accès à l'aire d'un signal RMN et donc au nombre de protons qui résonnent à la fréquence considérée, la surface d'un pic étant proportionnelle aux nombres de protons qui résonnent à la fréquence du pic (Pauli *et al.*, 2005). Nous avons ainsi mesuré l'intégration du signal des protons aromatiques de la catéchine vers 7 ppm, relativement au signal de la référence externe, le TMSP dont on connaît la concentration (0.45 mM) (voir **Annexe 7**). A partir des valeurs d'intégration, nous avons estimé la concentration de la catéchine dans la phase inférieure à 5.22 mM (concentration totale de 7 mM), signifiant qu'environ 75% de la catéchine sont présents dans cette phase. Ceci indique que seulement un quart de la catéchine est en interaction avec les gouttelettes lipidiques majoritairement présentes dans cette phase, et que le reste se solubilise dans la phase aqueuse de la phase transparente inférieure.

IV. Discussion

IV.1. Modèle de gouttelettes lipidiques alimentaires

L'objectif de notre étude est de regarder l'impact des lipides sur les propriétés organoleptiques du vin rouge, l'astringence et l'amertume, que ce soit les lipides endogènes situés dans les membranes buccales, ou les lipides exogènes issus de l'alimentation. Dans cette partie, nous nous sommes intéressés à l'effet des lipides provenant des aliments sur le goût du vin. Les aliments sont des matrices complexes pouvant contenir différents composés comme des lipides, des protéines, des sels... Les lipides sont organisés sous différentes formes dans les aliments : phase continue, homogène (huiles) ou dans laquelle peuvent être dispersée des gouttelettes dans le cas des émulsions eau dans huile E/H (beurre, margarine) ; gouttelettes, dispersées dans une phase aqueuse dans le cas des émulsions huile dans eau H/E (vinaigrette, mayonnaise, lait) ou enchâssées dans des matrices protéiques et/ou glucidiques (viandes, fromages, gâteaux...) dont les tailles varient entre 100 nm et 100 µm. Pour mimer ces gouttelettes lipidiques nous avons utilisé un modèle d'émulsion directe huile dans l'eau (H/E). Il s'agit d'un modèle adéquat pour représenter les gouttelettes lipidiques dans les aliments. En effet, beaucoup d'aliments naturels ou synthétiques existent sous forme d'émulsion comme la crème, le lait, la mayonnaise ou la vinaigrette (McClements 2010, Szterk *et al.*, 2013, Komaiko *et al.*, 2015, Lopez *et al.*, 2017).

Pour stabiliser nos émulsions modèles, nous avons testé deux émulsifiants phospholipidiques représentés par la lécithine d'œuf et le DMPC. La lécithine d'œuf est un mélange de phospholipides composé majoritairement de la phosphatidylcholine et de chaînes grasses palmitique (C16:0) et oléique (C18:1) (Pichot *et al.*, 2013), alors que le DMPC est une phosphocholine composée de deux chaînes grasses myristiques (C14:0). Bien que les phospholipides soient utilisés comme émulsifiant dans les émulsions alimentaires, et notamment la lécithine (Komaiko *et al.*, 2015, Pichot *et al.*, 2013), ils sont généralement utilisés en mélange avec d'autres types d'émulsifiants connus pour être plus efficaces tels que les protéines (caséine, β -lactoglobuline) ou les polysaccharides (chitosane) (Fang et Dalgleish 1996, Ogawa *et al.*, 2003). Notre objectif étant de mettre en évidence une interaction entre les tannins et les lipides alimentaires, nous avons choisi d'utiliser un émulsifiant lipidique, le DMPC qui présente l'avantage d'avoir une forme deutérée (DMPC d_{54}), pour analyser la dynamique et l'organisation des lipides en émulsion par RMN- 2 H. Pareillement, nous avons travaillé avec des huiles alimentaires, l'huile d'olive et l'huile de tournesol, qui présentent une

différence au niveau de leur composition en acides gras. L'huile d'olive est riche en AG mono-insaturé (70%), alors que l'huile de tournesol est riche en acide gras polyinsaturé de type ω_6 (60%). Nous avons également utilisé le trioléate de glycérol à 97%, un triglycéride naturel présent dans toutes les huiles pur, à la différence des huiles alimentaires qui contiennent d'autres composés tels que des vitamines, des sels... Avec les systèmes Egg-PC/huile de tournesol, Egg-PC/huile d'olive et DMPC/huile de tournesol, nous avons obtenu des émulsions instables où une séparation de phase a été observée après la préparation des émulsions, due au phénomène de coalescence des gouttelettes lipidiques. En effet, les gouttelettes lipidiques fusionnent en de globules de plus en plus gros pour conduire finalement à la formation d'une couche d'huile à la surface de l'eau. Avec les systèmes Egg-PC/GT, DMPC/GT et DMPC/huile d'olive, nous avons obtenu des émulsions stables, avec un crémage de l'émulsion composée d'une couche supérieure de crème riche en gouttelettes et d'une couche inférieure appauvrie en gouttelettes. Ce crémage peut s'expliquer par la différence de densité entre l'huile et la phase aqueuse représentée par l'eau, celle des huiles de l'ordre de 0.9 g/cm^3 étant inférieure à celle de l'eau de 1 g/cm^3 . Ainsi, les plus grosses gouttelettes d'huiles ont tendance à remonter à la surface sous l'effet de la gravité. Par ailleurs, avec le GT, nous avons obtenu des émulsions stables quel que soit l'émulsifiant utilisé. Un résultat similaire avait été obtenu avec l'hexadécane, un hydrocarbure synthétique pur pour mimer la phase grasseuse de l'émulsion. Ces différences d'évolution des émulsions observées suggèrent que la pureté de la phase grasse est déterminante dans la stabilité d'une émulsion. Ainsi, les émulsions constituées de phases grasses pures (GT ou hexadécane) ont pu être stabilisées quel que soit l'émulsifiant utilisé. En revanche, parmi les phases grasses impures, seules l'huile d'olive a pu être stabilisée par le DMPC. Cette différence de comportement en comparaison avec l'huile de tournesol est peut-être à rechercher dans la teneur en impuretés des huiles puisque les deux huiles sont toutes deux des huiles non raffinées. On peut donc imaginer que l'huile de tournesol contienne une impureté qui déstabilise l'émulsion. L'huile de tournesol riche en acides gras polyinsaturés ω_6 est plus sensible à l'oxydation par le dioxygène de l'air que l'huile d'olive très riche en acide gras monoinsaturés. Un des produits de dégradation de l'huile de tournesol pourrait éventuellement constituer une impureté. Finalement, l'émulsion modèle choisie est l'émulsion réalisée avec de l'huile d'olive et du DMPC.

Deux méthodes ont été envisagées pour la fabrication de l'émulsion afin notamment de limiter le crémage. La méthode 2 (dissolution de l'émulsifiant dans la phase grasse, rapport

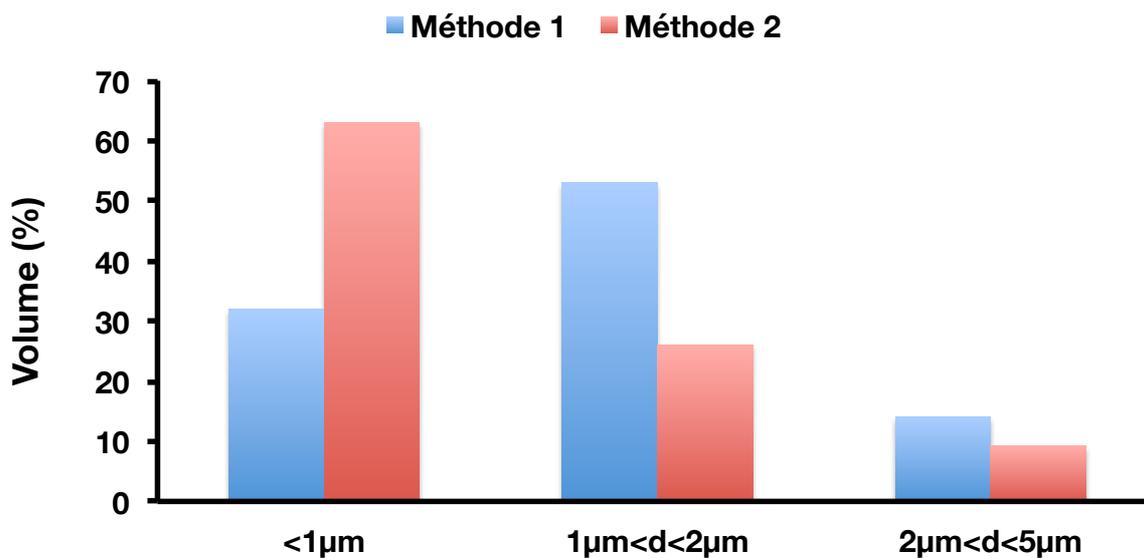


Figure 21 : Comparaison de la distribution de tailles des gouttelettes lipidiques entre deux méthodes de préparation d'émulsion mesurée par granulométrie. La méthode 1 correspond à la dispersion de l'émulsifiant dans la phase aqueuse pour un rapport volumique H/E = 1/5. La méthode 2 correspond à la solubilisation de l'émulsifiant dans la phase grasse pour un rapport H/E = 1/10. [DMPC] = 5 mg/mL, d = diamètre des gouttelettes.

volumique huile/eau de 1/10) n'a pas empêché le crémage mais a montré une cinétique de crémage plus lente qu'avec la méthode 1 (dispersion de l'émulsifiant dans la phase aqueuse, rapport volumique huile/eau de 1/5). Or le crémage étant d'autant plus favorisé que les gouttelettes sont grosses, ce résultat n'est pas cohérent avec la taille moyenne des gouttelettes donnée par la granulométrie : 1.5 μm pour la méthode 1 vs. 2.2 μm pour la méthode 2. Pour expliquer ce résultat, nous avons comparé les différentes populations de gouttelettes entre les deux méthodes (**Fig.21**).

Nous avons remarqué qu'avec la méthode 2, il y a une population de gouttelettes avec des tailles supérieures à 5 μm qui représente seulement 2% du volume total et qui n'est pas présente avec la méthode 1 (**Fig.6 et 8**). Par contre, la population des gouttelettes de taille inférieure à 1 μm est plus importante avec la méthode 2 (63%) qu'avec la méthode 1 (32%) (**Fig.20**). De même, la proportion de gouttelettes de plus grande taille (entre 1 μm et 5 μm), est plus importante dans la méthode 1, ce qui indique que la méthode 2 a bien favorisé la formation de gouttelettes de très petites tailles (<1 μm), ce qui est conforme à une vitesse de crémage plus lente. D'autres moyens pourraient être envisagés pour empêcher le crémage, comme l'utilisation de réactifs qui peuvent changer la densité et la viscosité de la phase huileuse ou la phase aqueuse (weighting agent). Des produits comme des gommes traditionnelles (gomme arabique, dammar), ou des sucres (pectine) ont la faculté de compenser la différence de densité entre les deux phases et par suite, d'éliminer le crémage (Chanamai et McClements 2000, Eric Dickinson 1992). Le crémage n'est toutefois pas un frein à l'étude des émulsions. Contrairement à la coalescence, ce phénomène est réversible : il est en effet possible par simple agitation mécanique de redisperser les gouttelettes dans la totalité de la phase aqueuse.

IV.2. Emulsion DMPC/huile d'olive

Pour l'émulsion DMPC/huile d'olive obtenue par la méthode 2, la granulométrie a montré que l'émulsion est polydisperse avec des tailles des gouttelettes comprises entre 0.12 et 10 μm . Cette méthode a donc l'avantage de générer des tailles de gouttelettes représentatives de celles des gouttelettes lipidiques alimentaires qu'on va retrouver en bouche. Effectivement, lorsque les aliments sont ingérés, ils vont subir une destruction sous l'effet de la mastication, ce qui va générer des gouttelettes lipidiques de tailles très variables à l'intérieur de la bouche. Par ailleurs, la cryo-ME a montré la présence de vésicules uni ou multi lamellaires de quelques dizaines de nanomètres dans l'émulsion (**Fig.9.A**). Il s'agit de liposomes de DMPC

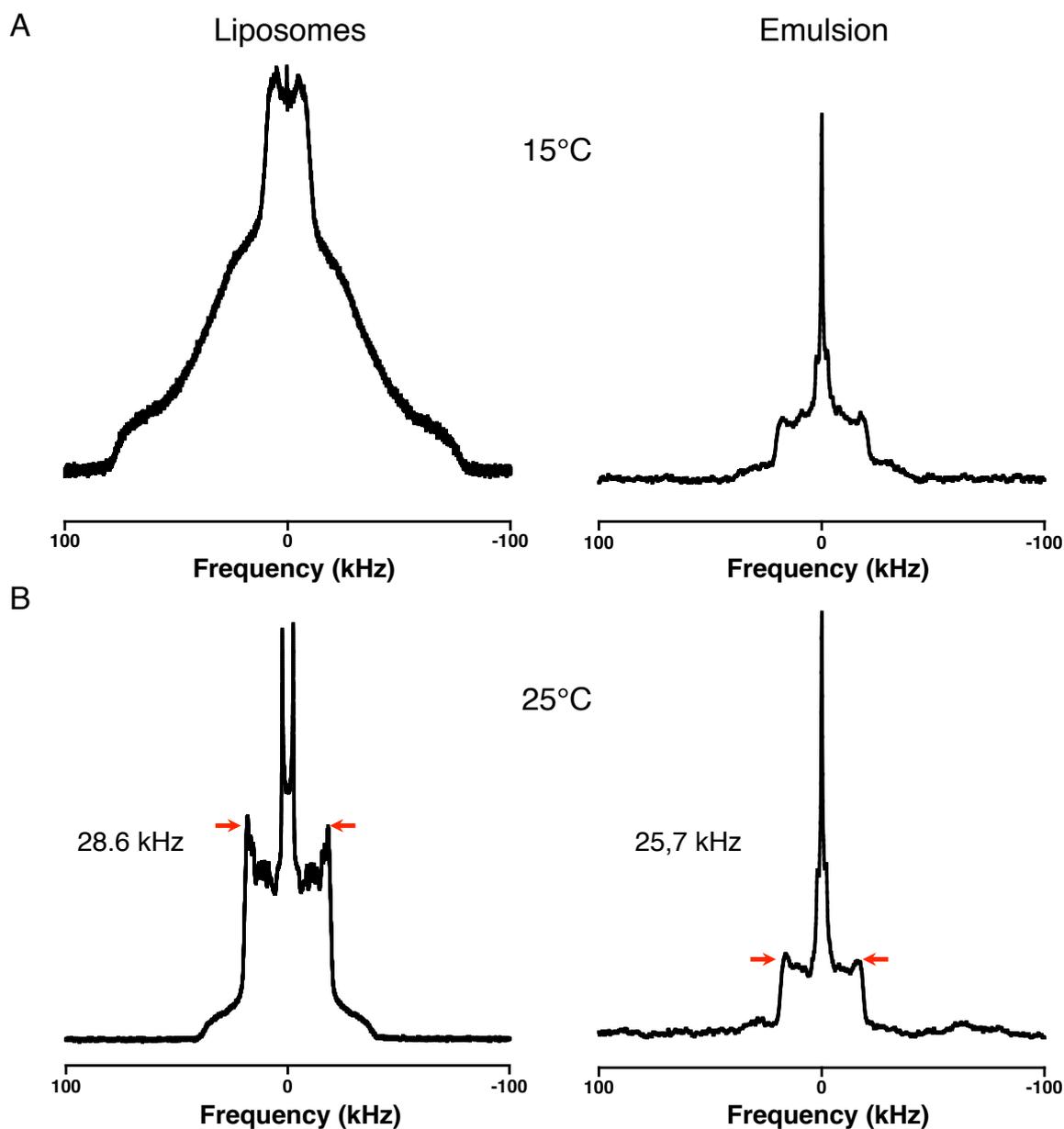


Figure 22 : Comparaison entre les spectres RMN- ^2H d'une dispersion de vésicules multilamellaires de DMPCd_{54} et d'une émulsion DMPCd_{54} /huile d'olive. Les flèches rouges présentes les éclatements quadripolaires du doublet le plus large. Liposomes : $[\text{DMPCd}_{54}] = 250 \text{ mg/mL}$, CM 500 MHz, NA = 2k sc, LB = 300 Hz. Emulsion : Rapport volumique huile/eau 1/10, $[\text{DMPCd}_{54}] = 5 \text{ mg/mL}$, CM 500 MHz, NA = 8K sc, LB = 300 Hz.

d'une ou plusieurs bicouches qui se forment spontanément après contact avec l'eau, ceci montre qu'une partie de l'émulsifiant reste dispersée dans l'eau et ne participe pas à la formation de l'émulsion. La cryo-ME a également permis de montrer que l'émulsifiant phospholipidique est organisé en monocouche à la surface des gouttelettes d'huile où les chaînes acyles du DMPC sont en contact avec le cœur hydrophobe de l'émulsion constitué de l'huile d'olive, et les têtes polaires sont en contact avec l'eau. Ceci est en accord avec d'autres résultats de la littérature qui ont montré que la phosphatidylcholine forme une monocouche condensée à l'interface des gouttelettes du trioléate (Handa *et al.*, 1990).

Les résultats de la microscopie optique, la microscopie électronique, la granulométrie et la RMN montrent que la majorité des gouttelettes lipidiques sont présentes dans la phase crémée et que la taille des gouttelettes d'huile dans cette phase est plus importante que celle restées dans la phase dispersée. Le diamètre des gouttelettes varie de centaines de nanomètres à quelques micromètres dans la phase crémée, alors qu'il est de l'ordre de quelques dizaines de nanomètres dans la phase dispersée (**Fig.9**). Ce résultat est conforme aux résultats de RMN. La RMN-¹H a montré que les signaux des triglycérides sont plus larges et plus intenses dans la phase crémée que dans la phase dispersée (**Fig.20**). De même, l'analyse par RMN-²H de la phase crémée a montré des spectres solides, larges qui rendent compte de la présence d'objets anisotropes de grande taille, alors que l'analyse de la phase dispersée a donné un signal isotrope (**Fig.17**), relatif aux petites vésicules qui s'y trouvent.

IV.3. Organisation des lipides en émulsion

En utilisant un phospholipide deutéré, nous avons pu étudier l'ordre et la dynamique des chaînes du DMPC_{d₅₄} organisées en émulsion, grâce à la RMN-²H. Dans la littérature, il n'existe pas, à notre connaissance, de données sur l'organisation et la dynamique des phospholipides en émulsion. Nos résultats ont montré que la température de transition de phase du DMPC_{d₅₄} en émulsion est comprise entre 10 et 15°C, alors qu'elle est de 20°C ± 1°C en membrane (Aussenac *et al.*, 2003, Martinez *et al.*, 2017). Pour vérifier cette différence d'organisation, nous avons comparé les spectres deutérium du DMPC en liposomes et en émulsion à 15 et 25°C (**Fig.22**). On constate que le DMPC dans le système membranaire est en phase gel à 15°C, alors qu'il est en phase fluide en émulsion. A 25°C, les deux systèmes présentent un spectre typique d'une phase fluide mais le spectre du DMPC en émulsion est plus étroit (-10%) que celui en membrane. Cette comparaison montre que le système

phospholipidique est plus fluide en émulsion qu'en membrane. Cette dynamique accrue en émulsion pourrait être reliée au fait que les chaînes acyles du DMPC solubilisées dans l'huile au sein des gouttelettes sont beaucoup plus mobiles que lorsqu'elles se font face à face dans le cœur hydrophobe d'une bicouche soumises aux interactions faibles de type de Van der Waals et interactions hydrophobes. De fait, la température de fusion du DMPC en émulsion correspondrait plutôt au mélange homogène chaînes grasses/huile, ce qui pourrait expliquer que la température de fusion du DMPC en émulsion trouvée (entre 10-15°C) soit comprise entre celle du DMPC_{d54} seul (21°C) et de celle de l'huile seule (-3°C).

IV.4. La catéchine interagit avec les gouttelettes lipidiques

Après le mélange de l'émulsion DMPC/huile d'olive avec la catéchine, on a remarqué un crémage instantané, et une phase inférieure qui a évolué vers une phase transparente après huit jours. Ce résultat montre que la catéchine favorise le crémage des gouttelettes lipidiques. L'observation de la phase crémée par microscopie optique a montré une agrégation des gouttelettes entre elles. Ce fait pourrait être expliqué par la floculation de l'émulsion en présence du tannin. Sous l'influence du mouvement brownien des gouttelettes et des forces de van der Waals, il y a une association réversible des gouttelettes entre elles pour former des floccs¹ (Eric Dickinson 1992), ce qui indique que la présence de catéchine favorise les forces attractives entre les gouttelettes, ce qui aboutit à la formation de gros agrégats dans le mélange par assemblage des gouttelettes entre elles. Ceci est cohérent avec la granulométrie qui a montré une distribution de taille des gouttelettes lipidiques plus importante en présence de la catéchine. Le rapprochement des gouttelettes induit par la floculation pourrait favoriser leur fusion et conduire à la formation de gouttelettes de plus grande taille.

Nous avons également étudié la localisation de la catéchine au niveau des émulsions DMPC/huile d'olive en se basant sur les variations des déplacements chimiques des signaux des lipides par RMN-¹H. Il s'agit d'une méthode pertinente, où les variations les plus significatives peuvent donner une image sur la position de catéchine par rapport aux gouttelettes lipidiques. Les résultats ont montré qu'il n'y a pas de modification des déplacements chimiques des triglycérides de l'huile d'olive mais que le signal du méthyle de l'ammonium quaternaire du DMPC a subi une variation de 0.1 ± 0.01 ppm. Ceci indique que la catéchine est localisée à l'interface huile-eau et qu'elle ne pénètre pas dans le cœur

¹ Ensemble de particules d'un milieu dispersé qui adhèrent faiblement les unes aux autres.

hydrophobe des gouttelettes. Ce résultat est à rapprocher des résultats trouvés pour l'étude des interactions entre les tannins et les membranes buccales, dans laquelle nous avons démontré que la catéchine est positionnée à l'interface de la membrane en restant localisée entre la tête polaire et le squelette glycérol. On peut ainsi supposer que, dans le cas de l'émulsion, il s'établit une interaction favorable entre le DMPC et la catéchine qui induit son positionnement à la surface des gouttelettes. On peut aussi supposer que cette interaction mutuelle renforce le rôle émulsificateur du phospholipide (Kabalnov *et al.*, 1996, Pichot *et al.*, 2013, Komaiko *et al.*, 2015, Ozturk et McClements, 2016, McClements et Gumus, 2016), ce qui favoriserait la stabilité de l'émulsion.

En ce qui concerne la répartition de la catéchine entre la phase crémée et la phase transparente, nous avons montré que seulement 25% de la catéchine participe à l'émulsion, le reste se solubilisant dans la phase aqueuse de la phase transparente. Le coefficient de partage octanol/eau de la catéchine est de 2.4, correspondant à une fraction molaire dans l'octanol de 71% (Mueller-Harvey *et al.*, 2007). On aurait pu s'attendre à une meilleure représentativité de la catéchine dans les gouttelettes et donc dans la phase crémée. Or ce n'est pas le cas. Son interaction avec le DMPC empêche certainement sa pénétration dans le cœur hydrophobe des gouttelettes, c'est pourquoi elle reste à l'interface. Toutefois, son affinité plus grande pour la phase dispersée laisse penser qu'elle préfère interagir avec le DMPC sous forme membranaire qu'en monocouche. Ce résultat montre que la catéchine dont le rôle d'émulsifiant a été démontré n'est pas forcément un bon émulsifiant dans notre cas (Figuroa-Espinoza *et al.*, 2015).

Les résultats de RMN du solide ont montré qu'en présence de la catéchine il y a une diminution de la largeur des spectres RMN-²H de l'émulsifiant DMPC, qui se traduit par une diminution des valeurs du moment spectral M_1 . Le M_1 est un indicateur de la dynamique globale des systèmes lipidiques ; une diminution du M_1 est interprétée par une augmentation de la fluidité de ces systèmes, ce qui montre que la catéchine a un effet fluidifiant sur l'organisation de la couche superficielle des gouttelettes de l'émulsion. De plus, le M_1 est proportionnel au paramètre d'ordre global des chaînes acyles des lipides. Or, en présence de la catéchine, ce paramètre diminue, ce qui indique que la catéchine induit un désordre dans l'organisation des lipides de la couche superficielle des gouttelettes. Un résultat similaire a été trouvé pour des lipides organisés en membranes. Furlan *et al.* (2014 et 2016) ont en effet démontré que les tannins ont un effet fluidifiant sur des membranes de DMPC ou DMPC/CH.

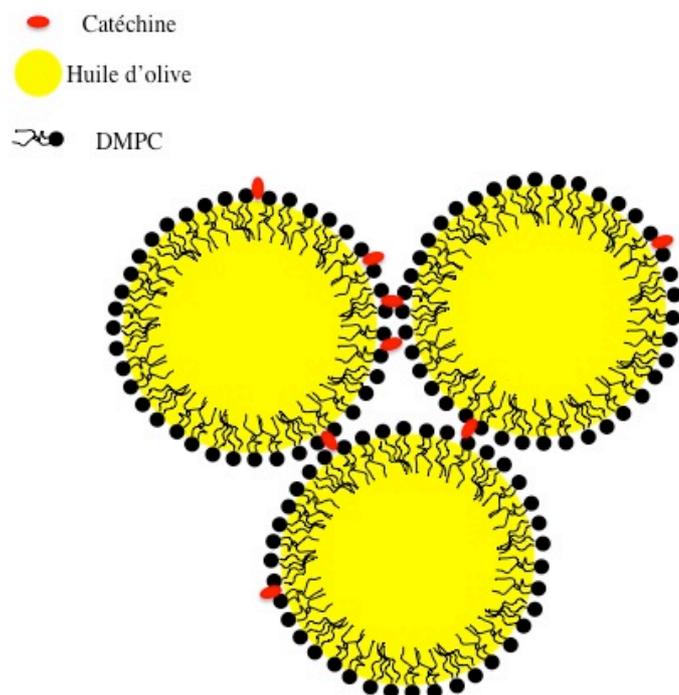


Figure 23 : Schéma hypothétique du positionnement de la catéchine à l'interface des gouttelettes lipidiques d'une émulsion alimentaire modèle huile dans eau stabilisée par du DMPC. Par interaction avec la tête polaire du DMPC, elle favorise le rapprochement des gouttelettes et donc leur floculation. Ce modèle explique notamment le crémage instantané de l'émulsion après contact avec le tannin.

De plus, nos résultats du chapitre II montrent que la catéchine fluidifie les membranes de POPC/CH et augmentent le désordre des chaînes acyles, ce qui montre que les tannins ont un effet fluidifiant sur les lipides qu'ils soient en membrane ou en émulsion. L'ensemble de nos résultats nous amène à proposer le modèle présenté sur la **figure 23** pour expliquer l'effet de la catéchine sur une émulsion alimentaire modèle. Dans le contexte de la dégustation, ils suggèrent que les tannins du vin sont susceptibles d'interagir avec les lécithines utilisées comme stabilisant alimentaire dans de nombreux aliments ou préparations lipidiques. On peut également extrapoler cette interaction avec d'autres types d'émulsifiants polaires qui pourraient développer des interactions favorables avec les tannins et ainsi, les mobiliser à la surface des globules gras des aliments ingérés. Par conséquent, l'étude présentée dans ce chapitre est en faveur d'une modification du goût du vin induite par une interaction potentielle entre les tannins et les lipides alimentaires. Afin d'asseoir ce résultat issu d'une étude au niveau moléculaire, nous avons réalisé des tests d'analyse sensorielle pour savoir si l'interaction tannins-lipides alimentaires est une réalité au niveau gustatif. C'est que nous nous proposons de présenter dans la partie qui va suivre.

V. Analyse sensorielle des interactions tannin-lipide

Bien qu'une interaction à l'échelle moléculaire ait été mise en évidence entre la catéchine et un modèle de lipides alimentaires par des outils de la physico-chimie, l'analyse sensorielle représente la seule approche qui permet véritablement de déterminer l'effet de ces interactions sur les caractéristiques organoleptiques des tannins, et *in extenso* le goût du vin. Elle consiste à analyser les propriétés organoleptiques de différents types de produits (agro-alimentaires, cosmétiques, matière première des textiles) par les organes des sens (vue, toucher, odorat, ouïe, goût). L'objectif de cette étude était donc de savoir si un lien pouvait être établi entre la perception gustative ressentie lors d'une dégustation associant tannins et lipides, et les effets moléculaires résultant des associations tannins-lipides.

Les tests d'analyse sensorielle mis en œuvre ont consisté à étudier l'effet d'huiles alimentaires, des aliments 100% lipidiques, sur des solutions de tannins comme modèle simplifié du vin. Les analyses ont été réalisées avec trois huiles végétales : de l'huile de colza, de l'huile de pépins de raisin et de l'huile d'olive, notées respectivement R, G, O, ainsi que deux solutions de tannins alimentaires : tannins d'acacia et tannin de pépins de raisin à des

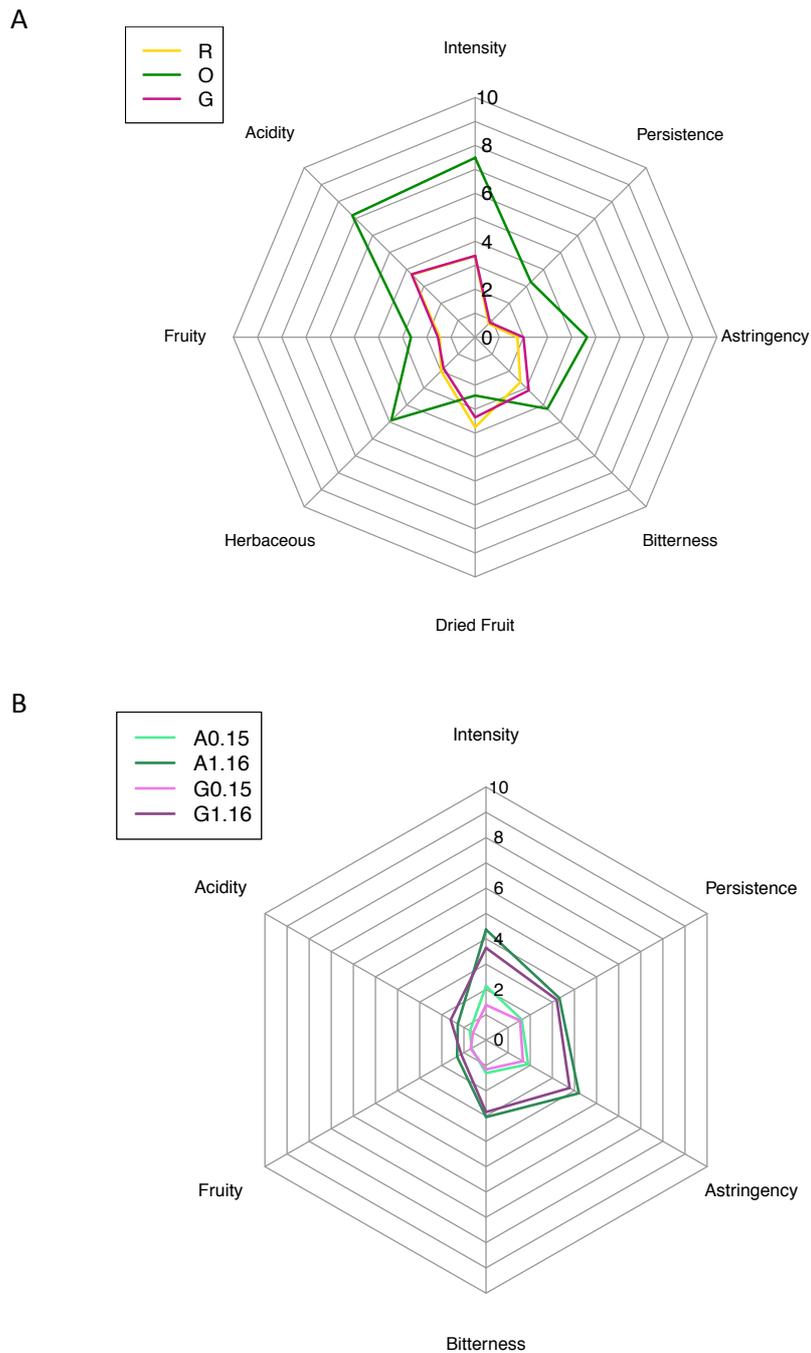


Figure 24 : Diagramme radar des résultats de l'analyse sensorielle pour : (A) les huiles de colza (R), d'olive (O) et de pépins de raisin (G) ; (B) les solutions de tannins d'acacia à 0.15 g/L (A0.15) et 1.16 g/L (A1.16) et les solutions de tannin de pépins de raisin à 0.15 g/L (G0.15) et 1.16 g/L (G1.16).

concentrations de 0.15 et 1.16 g/L, notés respectivement A0.15, G0.15, A1.16 et G1.16. Ces concentrations sont représentatives des proportions de tannins trouvées dans le vin (entre 1 et 5 g/L, Quideau *et al.*, 2011) et sont du même ordre de grandeur que la concentration en catéchine utilisée dans l'étude ci-dessus (2.03 g/L). L'utilisation de ces deux concentrations permet également d'examiner l'effet dose des tannins sur leurs propriétés gustatives. Les tests de dégustation ont eu lieu sur deux séances. Au cours de la première séance, les solutions d'huiles ont été goûtées seules et évaluées selon 8 descripteurs : astringence, amertume, acidité, fruité, herbacé, fruit sec, intensité du goût, persistance du goût. Lors de la deuxième séance, les solutions de tannins ont été goûtées seules et après ingestion d'une cuillère à soupe d'huile. Elles ont été évaluées et notées sur une échelle de 0 à 10 par les panelistes selon 6 descripteurs : astringence, amertume, acidité, fruité, intensité du goût, persistance du goût (voir chapitre 1 partie IV.1.3). Cette étude a été développée par Dr. J. Géan en collaboration avec Dr. N. Fernandez Castro (enseignant-chercheur) et J. Bousquet (professeur agrégé de Mathématiques) à l'IUT de Périgueux.

V.1. Profils sensoriels des huiles et des tannins

Les profils sensoriels des huiles et des tannins seuls sont représentés sur les diagrammes en radar de la **figure 24**. Chaque axe correspond à un descripteur, où la note moyenne est donnée sur une échelle de 0 à 10.

Pour les huiles (**Fig.24.A**), on remarque que les profils sensoriels des huiles de colza et de pépins de raisin sont quasiment identiques. On n'observe pas de différences significatives pour l'ensemble des descripteurs (p -value > 0.05 , **Annexe 14, tableau 1**). Ces huiles présentent un goût modérément marqué, avec un caractère acide, amer et fruit sec modéré. Le profil sensoriel de l'huile d'olive, quant à lui, est très différent de celui des autres huiles pour la quasi-majorité des descripteurs (p -value < 0.001). Elle présente un goût très marqué et persistant, avec un caractère acide, amer, astringent et herbacé dominant.

Pour les tannins (**Fig.24.B**), on remarque que leur profil sensoriel est moins étendu que celui des huiles, avec des notes moyennes inférieures à 5. De plus, on observe que le profil sensoriel des tannins pour une même concentration (A0.15/G0.15 ou A1.16/G1.16) est presque identique, la seule différence significative remarquée est au niveau de l'intensité du goût (**Annexe 14, tableau 2**). Cependant, le profil sensoriel pour une solution du même

	VP 1	VP 2	VP 3	VP 4	VP 5	VP 6
% inertie	86.78	10.47	1.38	0.83	0.31	0.23
% cumulés	86.78	97.25	98.63	99.46	99.77	100

Tableau 3 : Pourcentage d'inertie et pourcentage cumulé pour chacun des 6 vecteurs propres (VP).

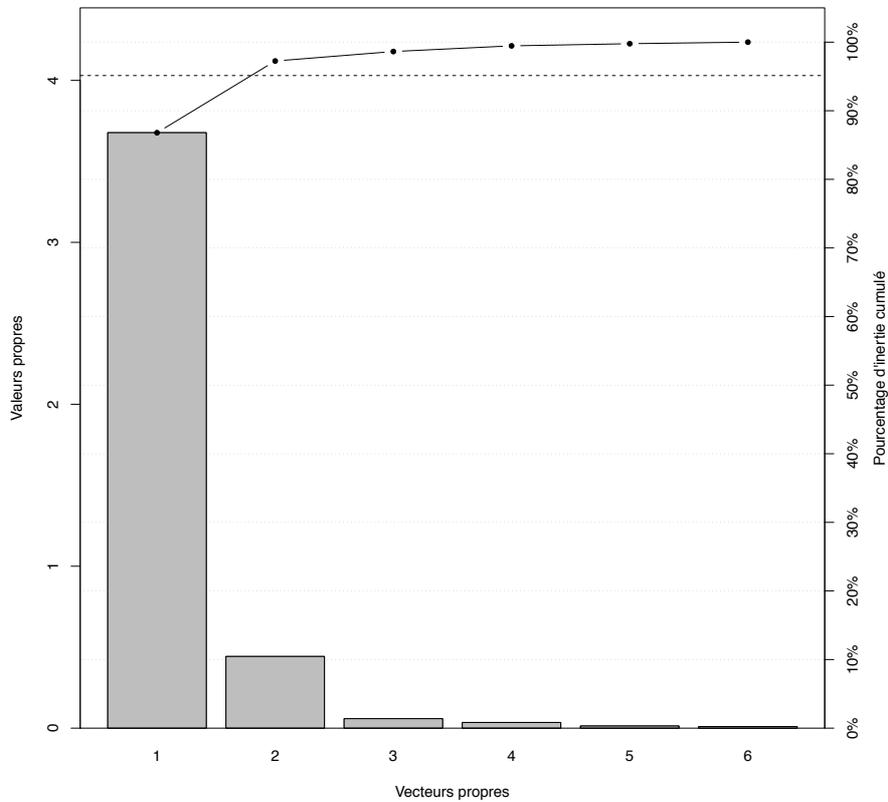


Figure 25 : Diagramme représentant le pourcentage d'inertie pour les vecteurs propres de l'ACP.

tannin, à différentes concentrations montre des différences significatives pour tous les descripteurs, à l'exception du caractère fruité. On observe en effet une augmentation de la note moyenne associée à chaque goût avec la concentration du tannin. Ces résultats semblent montrer que le profil sensoriel des solutions de tannins dépend non pas de la nature du tannin, mais de sa concentration.

V.2. Analyse en composantes principales

L'interprétation des résultats issus des tests d'analyse sensorielle sur les expériences tannins seuls (4) ou croisées tannins-huiles (12) a été effectuée par la méthode d'analyse en composantes principales (ACP). Il s'agit d'une analyse géométrique et statistique qui permet de traiter un ensemble de variables quantitatives (les 16 expériences dans notre cas) dont le but est de trouver une représentation bidimensionnelle du nuage des points représentant les résultats des 16 expériences selon les 6 descripteurs des solutions de tannins (espace à 6 dimensions) qui conserve le mieux possible sa dispersion initiale (représentée par l'inertie en mathématiques). L'ACP consiste donc à trouver le plan de projection qui offre le meilleur point de vue du nuage initial sur la base de calculs matriciels (voir Partie IV du Chapitre I).

On cherche dans un premier temps les deux vecteurs (les deux composantes) qui vont servir à définir le meilleur plan de projection. Ceux-ci sont déterminés à partir du calcul des pourcentages d'inertie du nuage initial projeté sur chacun des 6 vecteurs propres (VP), les composantes dans le nouvel espace issues de la combinaison linéaire des 6 descripteurs des solutions de tannins (composantes dans l'espace initial) (**Tableau 3**). On remarque sur le diagramme de la **figure 25** que la majeure partie de l'inertie est portée par les vecteurs propres VP1 (86.78%) et VP2 (10.47%). L'inertie du nuage projeté sur le plan de projection P défini par VP1 (composante 1) et VP2 (composante 2) représente 97.25% de l'inertie du nuage initial, ce qui signifie que selon cette représentation, moins de 3% de l'information a été perdue. C'est ce plan de projection qui a été retenu pour l'ACP.

La projection des variables (descripteurs sensoriels des tannins) sur le plan P est présentée sur la **figure 26.A**. La composante 1 est représentée sur l'axe horizontal et la composante 2 sur l'axe vertical. On remarque que la composante 1 est négativement corrélée à tous les descripteurs avec une forte contribution respectivement par ordre décroissant pour l'intensité du goût (IG), l'astringence (As), l'amertume (Am) et la persistance du goût (PG). L'acidité a

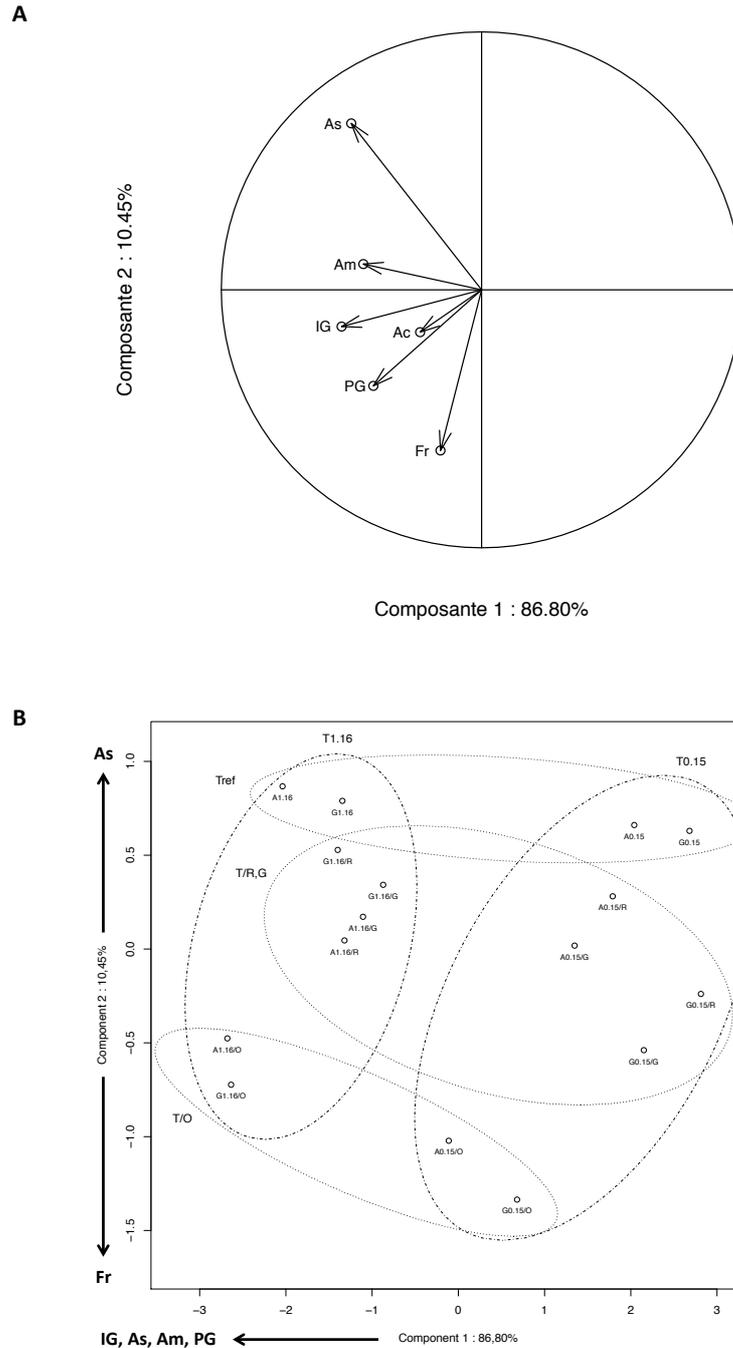


Figure 26 : (A) Représentation de l'analyse en composante principale (ACP) des descripteurs des solutions de tannins dans le plan P défini par les composantes 1 et 2, correspondant aux deux valeurs propres VP1 et VP2 les plus élevées. (B) Représentation de l'ACP des expériences tannins-huiles associées à l'analyse sensorielle des solutions de tannin goûtées seules et après ingestion d'huiles végétales : huile de colza (R), huile de pépins de raisin (G), huile d'olive (O). Les solutions de tannins correspondent à : des solutions de tannin d'acacia à 0.15 g/L (A0.15) et 1.16 g/L (A1.16), et des solutions de tannin de pépins de raisin à 0.15 g/L (G0.15) et 1.16 g/L (G1.16). Les descripteurs des tannins sont : intensité du goût (IG), astringence (As), acidité (Ac), amertume (Am), fruité (Fr), persistance du goût (PG).

une faible contribution à cette composante. Pour la composante 2, on observe qu'elle est positivement fortement corrélée à l'astringence, et négativement fortement corrélée au goût fruité et d'une moindre manière à la persistance du goût. La contribution des autres descripteurs à cette composante est très faible. A partir de cette ACP des variables, on peut voir que la composante 1 est caractérisée par 4 descripteurs : l'intensité du goût, l'astringence, l'amertume et la persistance du goût ; alors que la composante 2 est représentée par l'astringence qui s'oppose au fruité et à la persistance du goût.

La représentation graphique de l'ACP des expériences selon la composante principale est donnée sur la **figure 26.B**. Selon la composante 1, on distingue deux groupes : le premier groupe avec des coordonnées négatives qui rassemble les expériences menées avec les solutions de tannins à la plus faible concentration, seules ou associées aux huiles (groupe T0.15), le second groupe avec des coordonnées positives qui rassemble les expériences effectuées avec les tannins à la plus forte concentration, seules ou associées aux huiles (groupe T1.16). Selon la composante 2, on distingue trois groupes : le premier avec les ordonnées les plus importantes définissant les solutions de tannins goûtées seules (groupe Tref), le second groupe vers le centre regroupant les solutions de tannins goûtées après la consommation des huiles de colza et de pépins de raisin (groupe T/C,PR) et le troisième groupe avec des ordonnées négatives rassemblant les solutions de tannins goûtées après la consommation de l'huile d'olive (groupe T/O).

V.3. Discussion et conclusion

En analysant les résultats de l'ACP, on voit que les solutions de tannins à forte concentration, qu'elles soient goûtées seules ou après l'ingestion d'une huile végétale, sont associées à une plus forte persistance et intensité du goût, amertume et astringence (descripteurs relatifs à la composante 1) que les solutions de tannins à faible concentration. De plus, on observe que les solutions de tannins goûtées seules sont associées à une forte astringence, quelle que soit la nature et la concentration des tannins (descripteur corrélé à la composante 2). On remarque également que le caractère astringent des solutions de tannins diminue après l'ingestion de l'huile, avec un degré d'atténuation qui dépend de la nature de l'huile ingérée. L'huile de colza et de pépins de raisin semblent atténuer, voir même gommer l'astringence des solutions de tannins alors que l'huile d'olive semble imposer son goût aux solutions de tannins en induisant une perception de fruité non ressentie initialement. Par conséquent, cette étude

montre qu'il existe un effet dose des tannins sur les deux perceptions gustatives qu'ils engendrent, l'amertume et l'astringence. L'intensité de la perception d'amertume et d'astringence est d'autant plus forte que la concentration en tannins est élevée. Ce résultat est en accord avec d'autres études qui ont montré que la perception d'amertume et d'astringence augmente avec la concentration des tannins telle que la catéchine pour des solutions de tannins (Robichaud et Noble, 1990), ou de la même façon qu'elle est plus perceptible pour des vins riches en tannins (Landon *et al.*, 2008, Frost *et al.*, 2017). Par ailleurs, elle montre qu'une huile végétale atténue la perception d'astringence d'une solution de tannins jusqu'à la modifier dans le cas d'une huile au goût prononcé comme l'huile d'olive. Ce résultat peut être lié à la fois au profil sensoriel des huiles et des tannins. L'huile d'olive a un caractère fruité plus prononcé que les huiles de colza et de pépins de raisin, alors que ce caractère est peu perceptible dans le cas des solutions de tannins.

Les résultats obtenus par analyse sensorielle mettent pour la première fois en évidence une interaction tannin-lipide au niveau sensoriel. Ils montrent notamment que les lipides entrant dans la constitution des aliments gras diminuent la perception d'astringence induite par les tannins du vin. Ces résultats corroborent avec nos études biophysiques effectuées à l'échelle moléculaire. Dans ce chapitre, nous avons montré une forte interaction entre un modèle de tannin représenté par la catéchine et un modèle de globule gras représenté par une émulsion huile dans l'eau. De plus, nous avons démontré que l'affinité des tannins pour les lipides est plus importante que celle de l'affinité pour les protéines salivaires impliquées dans la sensation d'astringence (chapitre III). Bien que cette étude ait été faite sur des systèmes lipidiques membranaires, on peut s'attendre à une affinité tannins-gouttelettes lipidiques du même ordre de grandeur, vu que l'effet des tannins sur les deux modèles est similaire, à savoir un effet fluidifiant sur l'organisation des lipides avec une localisation interfaciale des tannins. Par conséquent, durant la dégustation d'un vin, une compétition pourrait se créer entre les gouttelettes lipidiques résiduelles dans la bouche provenant des aliments et les protéines salivaires pour interagir avec les tannins, ce qui pourrait moduler la perception d'astringence des tannins, qui résulte de leur interaction avec les protéines salivaires. Donc, un lien semble se dessiner entre la perception ressentie lors d'une dégustation associant tannins et lipides, et les effets moléculaires susceptibles d'y être associés. De plus, ces résultats coïncident avec les études concernant les accords mets-vin qui ont affirmé que les composants alimentaires ont généralement un impact sur le profil sensoriel des vins (King et Cliff, 2005, Madrigal-Galan et Heymann, 2006, Koone *et al.*, 2014). Ils pourraient apporter un début d'explication pour

certaines résultats de ces études. Par exemple, la diminution de la perception d'astringence de certains vins suite à l'ingestion de fromage (Madrigal-Galan et Heymann, 2006, Glamardini *et al.*, 2017), aliment riche en lipides, pourrait être due selon notre étude à une interaction à l'échelle moléculaire entre les tannins des vins et les lipides composant les fromages.

Chapitre V

Conclusion et perspectives

I. Conclusion générale

Durant la dégustation d'un vin, les tannins sont responsables de l'astringence et de l'amertume dans la bouche suite à leur interaction respectivement avec les protéines salivaires impliquées dans la lubrification de la cavité buccale et les récepteurs du goût situés dans les papilles linguales. Les tannins sont capables également d'interagir avec les lipides. Bien qu'ils soient absents dans le vin, les lipides sont néanmoins présents au cours de la dégustation en tant que composants des membranes buccales ou du bol alimentaire lors d'un repas. Leur implication dans les perceptions sensorielles d'un vin est à ce jour un sujet très peu exploré et n'est pas encore cernée tant du point de vue moléculaire que sensoriel. La problématique de cette thèse était donc de comprendre le rôle des interactions tannins-lipides dans les propriétés sensorielles du vin.

En partant des deux hypothèses suivantes qui considèrent que : l'interaction tannins-lipides membranaires et l'effet sur l'organisation des lipides qui en découle pourrait induire une perturbation des récepteurs du goût enchâssés dans les membranes buccales qui modifierait la sensation d'amertume d'un vin ; et que la compétition entre l'interaction tannins-protéines de la salive et tannins-lipides des membranes buccales ou des aliments pourrait moduler l'astringence, les objectifs de notre étude étaient :

- i. Etudier l'effet des interactions tannins-lipides sur l'organisation et la dynamique des membranes buccales.
- ii. Déterminer les constantes d'affinité tannins-lipides.
- iii. Montrer une interaction entre les tannins et les lipides du bol alimentaire.
- iv. Explorer l'influence des aliments gras sur les propriétés sensorielles des tannins *via* une approche d'analyse sensorielle.

Dans cette conclusion générale, nous rappellerons les différents résultats obtenus qui répondent à la problématique du sujet et à nos objectifs. D'abord, nous présenterons les résultats du chapitre II qui concernent l'étude des interactions entre les tannins et les membranes buccales, ensuite ceux du chapitre III qui présentent l'affinité des tannins pour les lipides membranaires, puis les résultats de l'interaction entre la catéchine et les gouttelettes lipidiques donnés dans le chapitre IV. Enfin, nous replacerons les différents résultats dans le contexte du sujet : le goût du vin.

L'objectif du chapitre II a été d'étudier le rôle des interactions tannins-lipides membranaires dans les propriétés organoleptiques du vin. Afin de comprendre à l'échelle moléculaire ce qui

se passe à l'intérieur de la bouche durant la dégustation d'un vin, nous avons utilisé des MLV de POPC/CH (70/30) pour représenter les membranes buccales, et nous avons étudié l'effet de deux modèles de tannins majoritairement présents dans le vin rouge, un monomère la catéchine et un dimère le B₁, sur l'organisation et la dynamique de ces membranes. Nous avons confirmé que les tannins fluidifient les membranes buccales, augmentent le désordre des chaînes acyles du lipide et diminuent l'épaisseur membranaire. En présence de l'éthanol, un constituant principal du vin connu par son effet régulateur de la fluidité membranaire, l'effet de désordre des tannins sur les membranes buccales persiste et s'ajoute à celui-ci. Nous avons montré que l'effet fluidifiant du dimère B₁ sur les membranes lipidiques est plus important que celui du monomère la catéchine. Cette différence a pu être reliée à sa capacité à former plus de liaisons hydrogène avec les lipides et à sa taille plus volumineuse que la catéchine. Nous avons également mis en évidence une interaction entre les tannins et le cholestérol présent dans les membranes biologiques, et notamment dans les membranes buccales où il est retrouvé à des teneurs élevées (de 30 à 40% en fonction de l'épithélium considéré). Enfin, nous avons montré que les tannins se positionnent préférentiellement à l'interface des membranes et que leur localisation dépend de la nature du tannin : un tannin de nature plus hydrophile se positionnera plus en surface qu'un tannin plus hydrophobe. Il pourra ainsi développer des interactions favorables de type liaisons hydrogène avec les têtes polaires des lipides. En revanche, un tannin plus hydrophobe aura tendance à s'ancrer un peu plus dans la membrane afin de développer non seulement des interactions avec la tête polaire des lipides mais également des interactions de nature hydrophobe avec les chaînes acyles.

Dans le chapitre III, l'objectif était de déterminer les constantes d'association entre les tannins et les membranes buccales, dans le but de comprendre le rôle de ces interactions sur la sensation d'astringence du vin. A partir de nos résultats de RMN et de PWR, des constantes d'affinité tannins-lipides ont pu être estimées pour la première fois. Nous avons en effet réussi à évaluer les constantes d'affinité de la catéchine et du B₁ pour des membranes modèles de POPC/CH (70/30). Nos résultats ont confirmé l'existence d'une interaction entre les tannins et les lipides et montré que celle-ci est significative (K_d compris entre 0.7 et 6.8 mM). De plus, nous avons montré que l'affinité d'un dimère de tannin pour les membranes lipidiques est plus importante que celle d'un monomère. Il semblerait donc que l'affinité tannin/lipide membranaire soit fonction de la nature chimique du tannin, et notamment de sa capacité à former des liaisons avec les lipides (liaisons faibles de type hydrogène ou cation- π) qui stabilisent ces interactions. La présence du cholestérol augmente également l'affinité des

tannins pour les lipides, ce qui est en accord avec nos résultats du chapitre II qui ont mis en évidence une interaction entre le cholestérol et les tannins. De plus, nous avons montré que l'affinité des tannins pour les membranes lipidiques est plus importante que leur affinité pour les protéines salivaires. Ce résultat inattendu est en faveur d'une compétition entre ces deux interactions durant la dégustation du vin, ce qui pourrait favorablement moduler la sensation d'astringence.

Dans le chapitre IV, notre objectif était de montrer dans une première partie l'existence d'une interaction entre les tannins et les lipides apportés par l'alimentation dans le but de déterminer si les aliments gras ont une influence sur l'amertume et l'astringence du vin. Nous avons utilisé une émulsion de type huile dans l'eau composée d'une huile végétale, l'huile d'olive, et stabilisé par un émulsifiant phospholipidique, le DMPC, pour représenter les gouttelettes lipidiques alimentaires. Nous avons étudié l'effet de la catéchine sur l'organisation et la dynamique des lipides en émulsion. Nous avons montré que la catéchine interagit avec les gouttelettes lipidiques et augmentent leur taille. Elle induit également la floculation des émulsions par la formation de gros agrégats de tannins dans le mélange. Ce phénomène a été relié à la capacité de la catéchine à favoriser le rapprochement entre les gouttelettes et leur fusion, ce qui expliquait l'augmentation de leur taille. Nous avons également montré que la catéchine est localisée à l'interface huile-eau et qu'elle ne pénètre pas dans le cœur hydrophobe des émulsions. Cette localisation est à rapprocher de celle des tannins dans les membranes buccales et peut être reliée à une interaction avec la tête polaire du DMPC à la surface des gouttelettes. En outre, nous avons démontré que la catéchine a un effet de désordre sur l'organisation des lipides de la couche superficielle des gouttelettes, similaire à celui des tannins sur les membranes buccales. Ce résultat montre que les tannins ont un effet fluidifiant sur les lipides qu'ils soient en membrane ou en émulsion. Par ailleurs, nous avons montré que les phospholipides s'organisent en monocouche à la surface des gouttelettes d'huiles avec leurs chaînes acyles en contact avec le cœur hydrophobe de l'émulsion constitué d'huile, et les têtes polaires en contact avec la phase aqueuse. Nous avons également mis en évidence que la fluidité des phospholipides est plus importante dans la monocouche superficielle des gouttelettes de l'émulsion que dans la bicouche membranaire. Cet effet a été relié à une mobilité plus importante des chaînes acyles du lipide dans l'huile émulsionnée que dans le cœur hydrophobe des membranes. Dans la deuxième partie de ce chapitre, nous avons étudié l'interaction tannin-lipide du point de vue organoleptique par des tests d'analyse sensorielle afin de savoir si un lien pouvait être établi entre la perception gustative ressentie

lors d'une dégustation associant tannins et lipides, et les effets moléculaires résultant des interactions tannins-lipides. Nous avons mené des tests de dégustation croisée entre des solutions de tannins alimentaires et des huiles végétales. Dans cette étude, nous avons montré un effet dose des tannins sur les perceptions d'amertume et d'astringence. L'intensité de la perception d'amertume et d'astringence est d'autant plus forte que la concentration en tannins est élevée. De plus, nous avons prouvé qu'une huile végétale diminue la perception d'astringence d'une solution de tannins jusqu'à la modifier dans le cas d'une huile au goût prononcé comme l'huile d'olive. Les résultats obtenus par analyse sensorielle mettent pour la première fois en évidence une interaction tannin-lipide au niveau sensoriel. Ils montrent que les lipides entrant dans la constitution des aliments gras diminuent la perception d'astringence induite par les tannins du vin. Ces résultats corroborent avec ceux que nous avons obtenus par l'étude biophysique à l'échelle moléculaire et suggèrent qu'une interaction entre les tannins et les gouttelettes de lipides provenant des aliments est à l'origine de la diminution de la sensation d'astringence. Cela laisse supposer que les tannins ont une affinité plus importante pour les lipides alimentaires que pour les protéines salivaires en se référant aux résultats obtenus sur l'affinité tannins-lipides membranaires. Par conséquent, durant la dégustation d'un vin, une compétition pourrait se créer dans la bouche entre les gouttelettes lipidiques résiduelles provenant des aliments et les protéines salivaires pour interagir avec les tannins.

Les résultats obtenus à l'issue de ces différents travaux soulignent pour la première fois le rôle des lipides dans le goût du vin. D'une part, les interactions tannins-lipides, en perturbant l'environnement lipidique des récepteurs du goût enchâssés dans les membranes buccales, pourraient affecter la fonctionnalité du récepteur et son interaction avec les tannins, et donc l'amertume. D'autre part, vu l'affinité importante des tannins pour les lipides, une compétition entre les interactions tannins-lipides et tannins-protéines de la salive dans la bouche agirait sur l'astringence durant la dégustation d'un vin. Dans le domaine de l'œnologie, cette thèse vient étayer le ressenti des dégustateurs, à savoir la modification du goût du vin due aux aliments et ouvre de nouvelles perspectives dans le cadre de l'association mets-vins. Les résultats qui en découlent sous-tendent une nouvelle façon de déguster un vin, moins empirique. On peut en effet imaginer guider le consommateur vers un type d'alimentation en fonction de la composition en tannins d'un vin. Un vin très astringent pourrait ainsi être accompagné d'une alimentation riche en gras pour rendre son goût plus agréable. Dans le cadre des interactions polyphénols-membranes, notre étude soutient les résultats en faveur d'un effet de désordre des tannins sur les membranes. De plus, elle montre

que les tannins sont capables d'interagir avec d'autres constituants des membranes biologiques tels que le cholestérol et affirme leur localisation à l'interface des bicouches lipidiques.

II. Perspectives

Dans l'étude menée pendant cette thèse, il faut être conscient qu'on a travaillé avec des modèles constitués uniquement des deux lipides majoritairement présents dans les membranes buccales. Or, dans la réalité, les membranes buccales ont une composition lipidique très complexe qui dépend de l'endroit où elles se trouvent dans la bouche. Ainsi, outre le cholestérol et les phospholipides zwitterioniques, on peut aussi trouver des zones où les céramides et la sphingomyéline sont présents à des teneurs relativement importantes. Il serait donc intéressant d'étudier l'effet des tannins sur des membranes artificielles plus représentatives des membranes buccales avec une composition lipidique plus complexe. On peut également imaginer travailler avec des extraits de membranes buccales humaines dopées avec des lipides marqués au deutérium, ce qui permettrait d'étudier l'effet des tannins sur l'organisation et la dynamique de vraies membranes. Pour les tannins, on a travaillé avec des modèles simples. Cependant, dans le vin rouge, les tannins sont présents à l'état oligomérique avec des degrés de polymérisation variés. Puisque les techniques analytiques actuelles, bien que performantes, ne permettent pas d'isoler des tannins de degré de polymérisation supérieur à trois, il serait intéressant de tester l'effet de mélanges de tannins extraits directement du vin sur la dynamique des membranes buccales. Enfin, pour étudier l'effet concomitant des tannins et de l'éthanol, on pourrait imaginer tester l'application directe de vin rouge sur des membranes lipidiques modèles afin de se rapprocher encore plus des conditions de dégustation.

En outre, il serait intéressant de poursuivre l'étude de l'affinité tannin/lipide par la technique d'ITC. Cette technique permettrait une analyse thermodynamique complète de ces interactions avec la détermination des constantes de dissociation et de la stœchiométrie du système. Par ailleurs, il serait intéressant de déterminer les constantes d'affinité dans des conditions qui miment le milieu du vin (pH 3.5, T = 25°C, et 12% d'éthanol), et ainsi voir l'effet du pH et de l'éthanol sur l'affinité des tannins pour les lipides. De plus, il serait important de déterminer les constantes d'affinité des tannins pour les gouttelettes lipidiques dans le but de les comparer avec celles pour les protéines salivaires et de montrer qu'une

compétition à l'origine de la modulation de l'astringence lors de dégustations du vin en présence d'aliments gras est bien réelle.

Dans le cadre des interactions entre les tannins et les lipides alimentaires, il serait intéressant de poursuivre les études en utilisant des modèles tanniques plus complexes tels que le dimère B₁ ou des tannins galloylés dans le but de déterminer l'effet de la nature chimique des tannins sur leur interaction avec les gouttelettes lipidiques. Pour se rapprocher plus des conditions de dégustation, on pourrait également étudier l'effet concomitant des tannins et de l'éthanol sur la morphologie des gouttelettes lipidiques ainsi que sur la dynamique des lipides en émulsion, pareillement à ce qui a été fait avec les modèles membranaires. La composition en acides gras est différente d'un aliment à un autre, il serait donc important d'étudier l'impact de la nature des chaînes grasses sur les interactions tannins-gouttelettes lipidiques. On pourrait envisager la préparation d'émulsions avec une composition différente en acide gras en changeant la nature de l'huile, ou en utilisant des émulsifiants phospholipidiques avec des chaînes d'acide gras différentes comme le POPC, et voir leur impact sur l'interaction ou l'affinité des tannins pour les émulsions.

Pour aller plus loin dans l'étude de l'impact des interactions tannins-lipides alimentaires sur le goût du vin, des analyses sensorielles complémentaires pourraient être établies en faisant goûter des vins en teneurs différentes en tannins avec des huiles végétales puis avec des aliments gras plus complexes, tels que le fromage ou le foie gras. Ainsi, en combinant l'approche moléculaire et sensorielle de l'impact des lipides sur le goût du vin, on peut imaginer réussir à termes à trouver les meilleures associations mets-vins sur la base de preuves scientifiques et ainsi guider non seulement les dégustateurs et restaurateurs mais également les professionnels de la filière viticole en leur donnant des pistes d'amélioration d'un vin aux qualités gustatives non satisfaisantes.

Bibliographie

-A-

Abdiche, Y. N.; Myszka, D. G. Probing the Mechanism of Drug/Lipid Membrane Interactions Using Biacore. *Anal. Biochem.* **2004**, *328*, 233–243.

Abedi, E.; Sahari, M. A. Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acid Sources and Evaluation of Their Nutritional and Functional Properties. *Food Sci Nutr* **2014**, *2*, 443–463.

Abraham, A. The Principles of Nuclear Magnetism. *American Journal of Physics* **1961**, *29*, 860–861.

Abram, V.; Berlec, B.; Ota, A.; Šentjurc, M.; Blatnik, P.; Ulrih, N. P. Effect of Flavonoid Structure on the Fluidity of Model Lipid Membranes. *Food Chem* **2013**, *139*, 804–813.

Adler, E.; Hoon, M. A.; Mueller, K. L.; Chandrashekar, J.; Ryba, N. J.; Zuker, C. S. A Novel Family of Mammalian Taste Receptors. *Cell* **2000**, *100*, 693–702.

Almeida, P. F. F.; Vaz, W. L. C.; Thompson, T. E. Lateral Diffusion in the Liquid Phases of Dimyristoylphosphatidylcholine/Cholesterol Lipid Bilayers: A Free Volume Analysis. *Biochemistry* **1992**, *31*, 6739–6747.

de Almeida, R. F. M.; Fedorov, A.; Prieto, M. Sphingomyelin/Phosphatidylcholine/Cholesterol Phase Diagram: Boundaries and Composition of Lipid Rafts. *Biophys J* **2003**, *85*, 2406–2416.

Alves, I. D.; Correia, I.; Jiao, C. Y.; Sachon, E.; Sagan, S.; Lavielle, S.; Tollin, G.; Chassaing, G. The Interaction of Cell-Penetrating Peptides with Lipid Model Systems and Subsequent Lipid Reorganization: Thermodynamic and Structural Characterization. *J. Pept. Sci.* **2009**, *15*, 200–209.

Armbrecht, H. J.; Wood, W. G.; Wise, R. W.; Walsh, J. B.; Thomas, B. N.; Strong, R. Ethanol-Induced Disordering of Membranes from Different Age Groups of C57BL/6NNIA Mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1983**, *226*, 387–391.

Aron, P. M.; Kennedy, J. A. Flavan-3-Ols: Nature, Occurrence and Biological Activity. *Mol. Nutr. Food Res.* **2008**, *52*, 79–104.

Aussenac, F.; Laguerre, M.; Schmitter, J.-M.; Dufourc, E. J. Detailed Structure and Dynamics of Bicelle Phospholipids Using Selectively Deuterated and Perdeuterated Labels. ²H NMR and Molecular Mechanics Study. *Langmuir* **2003**, *19*, 10468–10479.

-B-

Bangham, A. D. Liposomes: The Babraham Connection. *Chemistry and Physics of Lipids* **1993**, *64*, 275–285.

Bate-Smith, E. C. Flavonoid Compounds in Foods. *Adv Food Res* **1954**, *5*, 261–300.

Baxter, N. J.; Lilley, T. H.; Haslam, E.; Williamson, M. P. Multiple Interactions between Polyphenols and a Salivary Proline-Rich Protein Repeat Result in Complexation and Precipitation. *Biochemistry* **1997**, *36*, 5566–5577.

Beck, J. G.; Mathieu, D.; Loudet, C.; Buchoux, S.; Dufourc, E. J. Plant Sterols in “Rafts”: A Better Way to Regulate Membrane Thermal Shocks. *FASEB J* **2007**, *21*, 1714–1723.

Bibette, J.; Leal-Calderon, F. Surfactant-Stabilized Emulsions. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* **1996**, *1*, 746–751.

Bloom, M.; Davis, J. H.; Mackay, A. L. Direct Determination of the Oriented Sample Nmr Spectrum from the Powder Spectrum for Systems with Local Axial Symmetry. *Chemical Physics Letters* **1981**, *80*, 198–202.

Buchoux, S. *Vers Un Nouveau Modèle de Déstabilisation Des Membranes Biologiques Par Les Lipopeptides : Apport de La RMN à Travers l'exemple de La Surfactine*; Bordeaux 1, 2008.

Buczek, P.; Horvath, M. P. Structural Reorganization and the Cooperative Binding of Single-Stranded Telomere DNA in *Sterkiella Nova*. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 40124–40134.

Burnett, L. J.; Muller, B. H. Deuteron Quadrupole Coupling Constants in Three Solid Deuterated Paraffin Hydrocarbons: C2D6, C4D10, C6D14. *The Journal of Chemical Physics* **1971**, *55*, 5829–5831.

-C-

Cala, O.; Pinaud, N.; Simon, C.; Fouquet, E.; Laguerre, M.; Dufourc, E. J.; Pianet, I. NMR and Molecular Modeling of Wine Tannins Binding to Saliva Proteins: Revisiting Astringency from Molecular and Colloidal Prospects. *FASEB J.* **2010**, *24*, 4281–4290.

Calmet, P.; Maria, M. D.; Harté, E.; Lamb, D.; Serrano-Vega, M.; Jazayeri, A.; Tschammer, N.; Alves, I. D. Real Time Monitoring of Membrane GPCR Reconstitution by Plasmon Waveguide Resonance: On the Role of Lipids. *Scientific Reports* **2016**, *6*, srep36181.

Carando, S.; Teissedre, P.-L.; Pascual-Martinez, L.; Cabanis, J.-C. Levels of Flavan-3-Ols in French Wines. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 4161–4166.

Carlotti, C.; Aussenac, F.; Dufourc, E. J. Towards High-Resolution 1H-NMR in Biological Membranes: Magic Angle Spinning of Bicelles. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2002**, *1564*, 156–164.

Carvalho, E.; Mateus, N.; Plet, B.; Pianet, I.; Dufourc, E.; De Freitas, V. Influence of Wine Pectic Polysaccharides on the Interactions between Condensed Tannins and Salivary Proteins. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 8936–8944.

Castellana, E. T.; Cremer, P. S. Solid Supported Lipid Bilayers: From Biophysical Studies to Sensor Design. *Surface Science Reports* **2006**, *61*, 429–444.

Caturla, N.; Vera-Samper, E.; Villalaín, J.; Mateo, C. R.; Micol, V. The Relationship between the Antioxidant and the Antibacterial Properties of Galloylated Catechins and the Structure of Phospholipid Model Membranes. *Free Radical Biology and Medicine* **2003**, *34*, 648–662.

Cevc, G. *Phospholipids Handbook*; CRC Press, 1993.

Chanamai, R.; McClements, D. J. Impact of Weighting Agents and Sucrose on Gravitational Separation of Beverage Emulsions. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 5561–5565.

Chandrashekar, J.; Hoon, M. A.; Ryba, N. J. P.; Zuker, C. S. The Receptors and Cells for Mammalian Taste. *Nature* **2006**, *444*, 288–294.

Charlton, A. J.; Baxter, N. J.; Khan, M. L.; Moir, A. J. G.; Haslam, E.; Davies, A. P.; Williamson, M. P. Polyphenol/Peptide Binding and Precipitation. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 1593–1601.

Chatterjee, S. N.; Agarwal, S. Liposomes as Membrane Model for Study of Lipid Peroxidation. *Free Radic. Biol. Med.* **1988**, *4*, 51–72.

Chaudhari, N.; Roper, S. D. The Cell Biology of Taste. *J. Cell Biol.* **2010**, *190*, 285–296.

Chira, K.; Schmauch, G.; Saucier, C.; Fabre, S.; Teissedre, P.-L. Grape Variety Effect on Proanthocyanidin Composition and Sensory Perception of Skin and Seed Tannin Extracts from Bordeaux Wine Grapes (Cabernet Sauvignon and Merlot) for Two Consecutive Vintages (2006 and 2007). *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 545–553.

Chung, C.; Sher, A.; Rousset, P.; Decker, E. A.; McClements, D. J. Formulation of Food Emulsions Using Natural Emulsifiers: Utilization of Quillaja Saponin and Soy Lecithin to Fabricate Liquid Coffee Whitener. *Journal of Food Engineering* **2017**, *209*, 1–11.

Chung, J. Y.; Huang, C.; Meng, X.; Dong, Z.; Yang, C. S. Inhibition of Activator Protein 1 Activity and Cell Growth by Purified Green Tea and Black Tea Polyphenols in H-Ras-Transformed Cells: Structure-Activity Relationship and Mechanisms Involved. *Cancer Res.* **1999**, *59*, 4610–4617.

Cliff, M. A.; King, M. C.; Schlosser, J. Anthocyanin, Phenolic Composition, Colour Measurement and Sensory Analysis of BC Commercial Red Wines. *Food Research International* **2007**, *40*, 92–100.

Coujard, R.; Poirier, J. *Précis d'histologie humaine*; Presses Université Laval, 1980.

Cui, L.; Decker, E. A. Phospholipids in Foods: Prooxidants or Antioxidants? *J. Sci. Food Agric.* **2016**, *96*, 18–31.

-D-

Davis, J. H. Deuterium Magnetic Resonance Study of the Gel and Liquid Crystalline Phases of Dipalmitoyl Phosphatidylcholine. *Biophys. J.* **1979**, *27*, 339–358.

Davis, J. H. The Description of Membrane Lipid Conformation, Order and Dynamics by ²H-NMR. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes* **1983**, *737*, 117–171.

Davis, J. H.; Jeffrey, K. R.; Bloom, M.; Valic, M. I.; Higgs, T. P. Quadrupolar Echo Deuteron Magnetic Resonance Spectroscopy in Ordered Hydrocarbon Chains. *Chemical Physics Letters* **1976**, *42*, 390–394.

Day, Y. S. N.; Baird, C. L.; Rich, R. L.; Myszka, D. G. Direct Comparison of Binding Equilibrium, Thermodynamic, and Rate Constants Determined by Surface- and Solution-Based Biophysical Methods. *Protein Sci* **2002**, *11*, 1017–1025.

Deleu, M.; Crowet, J.-M.; Nasir, M. N.; Lins, L. Complementary Biophysical Tools to Investigate Lipid Specificity in the Interaction between Bioactive Molecules and the Plasma Membrane: A Review. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2014**, *1838*, 3171–3190.

Diaz-del Consuelo, I.; Jacques, Y.; Pizzolato, G.-P.; Guy, R. H.; Falson, F. Comparison of the Lipid Composition of Porcine Buccal and Esophageal Permeability Barriers. *Archives of Oral Biology* **2005**, *50*, 981–987.

Dickinson, E. *Les colloïdes alimentaires*; Masson, 1996.

Douliez, J. P.; Léonard, A.; Dufourc, E. J. Restatement of Order Parameters in Biomembranes: Calculation of C-C Bond Order Parameters from C-D Quadrupolar Splittings. *Biophysical Journal* **1995**, *68*, 1727–1739.

Douliez, J.-P.; Léonard, A.; Dufourc, E. J. Conformational Order of DMPC Sn-1 versus Sn-2 Chains and Membrane Thickness: An Approach to Molecular Protrusion by Solid State ²H-NMR and Neutron Diffraction. *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 18450–18457.

Dufourc, E. J. Sterols and Membrane Dynamics. *J Chem Biol* **2008**, *1*, 63–77.

Dufourc, E. J.; Smith, I. C. A Detailed Analysis of the Motions of Cholesterol in Biological Membranes by ²H-NMR Relaxation. *Chem. Phys. Lipids* **1986**, *41*, 123–135.

Düzgüneş, N.; Faneca, H.; Lima, M. C. Methods to Monitor Liposome Fusion, Permeability, and Interaction with Cells. *Methods Mol. Biol.* **2010**, *606*, 209–232.

-E-

Eeman, M.; Olofsson, G.; Sparr, E.; Nasir, M. N.; Nylander, T.; Deleu, M. Interaction of Fengycin with Stratum Corneum Mimicking Model Membranes: A Calorimetry Study. *Colloids Surf B Biointerfaces* **2014**, *121*, 27–35.

Escot, S.; Feuillat, M.; Dulau, L.; Charpentier, C. Release of Polysaccharides by Yeasts and the Influence of Released Polysaccharides on Colour Stability and Wine Astringency. *Australian Journal of Grape and Wine Research* **2001**, *7*, 153–159.

-F-

Fang, Y.; Dalglish, D. G. Comparison of the Effects of Three Different Phosphatidylcholines on Casein-Stabilized Oil-in-Water Emulsions. *J Amer Oil Chem Soc* **1996**, *73*, 437–442.

Faurie, B.; Dufourc, E. J.; Laguerre, M.; Pianet, I. Monitoring the Interactions of a Ternary Complex Using NMR Spectroscopy: The Case of Sugars, Polyphenols, and Proteins. *Anal. Chem.* **2016**, *88*, 12470–12478.

Ferreira, T. M.; Coreta-Gomes, F.; Ollila, O. H. S.; Moreno, M. J.; Vaz, W. L. C.; Topgaard, D. Cholesterol and POPC Segmental Order Parameters in Lipid Membranes: Solid State ^1H – ^{13}C NMR and MD Simulation Studies. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2013**, *15*, 1976–1989.

Figueroa-Espinoza, M. C.; Zafimahova, A.; Alvarado, P. G. M.; Dubreucq, E.; Poncet-Legrand, C. Grape Seed and Apple Tannins: Emulsifying and Antioxidant Properties. *Food Chemistry* **2015**, *178*, 38–44.

Floury, J.; Desrumaux, A.; Lardières, J. Effect of High-Pressure Homogenization on Droplet Size Distributions and Rheological Properties of Model Oil-in-Water Emulsions. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* **2000**, *1*, 127–134.

Fontoin, H.; Saucier, C.; Teissedre, P.-L.; Glories, Y. Effect of PH, Ethanol and Acidity on Astringency and Bitterness of Grape Seed Tannin Oligomers in Model Wine Solution. *Food Quality and Preference* **2008**, *19*, 286–291.

Freyer, M. W.; Lewis, E. A. Isothermal Titration Calorimetry: Experimental Design, Data Analysis, and Probing Macromolecule/Ligand Binding and Kinetic Interactions. *Methods Cell Biol.* **2008**, *84*, 79–113.

Frost, S. C.; Harbertson, J. F.; Heymann, H. A Full Factorial Study on the Effect of Tannins, Acidity, and Ethanol on the Temporal Perception of Taste and Mouthfeel in Red Wine. *Food Quality and Preference* **2017**, *62*, 1–7.

Furlan, A. L.; Jobin, M.-L.; Buchoux, S.; Grélard, A.; Dufourc, E. J.; Géan, J. Membrane Lipids Protected from Oxidation by Red Wine Tannins: A Proton NMR Study. *Biochimie* **2014**, *107*, 82–90.

Furlan, A. L.; Castets, A.; Nallet, F.; Pianet, I.; Grélard, A.; Dufourc, E. J.; Géan, J. Red Wine Tannins Fluidify and Precipitate Lipid Liposomes and Bicelles. A Role for Lipids in Wine Tasting? *Langmuir* **2014**, *30*, 5518–5526.

Furlan, A. L.; Saad, A.; Dufourc, E. J.; Géan, J. Grape Tannin Catechin and Ethanol Fluidify Oral Membrane Mimics Containing Moderate Amounts of Cholesterol: Implications on Wine Tasting? *Biochimie* **2016**, *130*, 41–48.

-G-

Galmarini, M. V.; Loiseau, A.-L.; Debreyer, D.; Visalli, M.; Schlich, P. Use of Multi-Intake Temporal Dominance of Sensations (TDS) to Evaluate the Influence of Wine on Cheese Perception. *J. Food Sci.* **2017**.

Genot, M.; Michalski, M. C. Impact métabolique des structures et de l'oxydation des lipides dans les aliments. *Innovations agronomiques* **2010**, *10*, 43–67.

Gómez-Alonso, S.; García-Romero, E.; Hermosín-Gutiérrez, I. HPLC Analysis of Diverse Grape and Wine Phenolics Using Direct Injection and Multidetector by DAD and Fluorescence. *Journal of Food Composition and Analysis* **2007**, *20*, 618–626.

Goutelle, S.; Maurin, M.; Rougier, F.; Barbaut, X.; Bourguignon, L.; Ducher, M.; Maire, P. The Hill Equation: A Review of Its Capabilities in Pharmacological Modelling. *Fundam Clin Pharmacol* **2008**, *22*, 633–648

Green, B. G. Oral Astringency: A Tactile Component of Flavor. *Acta Psychol (Amst)* **1993**, *84*, 119–125.

Greenspan, P.; Mayer, E. P.; Fowler, S. D. Nile Red: A Selective Fluorescent Stain for Intracellular Lipid Droplets. *J. Cell Biol.* **1985**, *100*, 965–973.

Grélard, A.; Loudet, C.; Diller, A.; Dufourc, E. J. NMR Spectroscopy of Lipid Bilayers. *Methods Mol. Biol.* **2010**, *654*, 341–359.

Grélard, A.; Guichard, P.; Bonnafous, P.; Marco, S.; Lambert, O.; Manin, C.; Ronzon, F.; Dufourc, E. J. Hepatitis B Subvirus Particles Display Both a Fluid Bilayer Membrane and a Strong Resistance to Freeze Drying: A Study by Solid-State NMR, Light Scattering, and Cryo-Electron Microscopy/Tomography. *FASEB J* **2013**, *27*, 4316–4326.

Gross, J. D.; Costa, P. R.; Dubacq, J. P.; Warschawski, D. E.; Lirsac, P. N.; Devaux, P. F.; Griffin, R. G. Multidimensional NMR in Lipid Systems. Coherence Transfer through J Couplings under MAS. *Journal of Magnetic Resonance, Series B* **1995**, *106*, 187–190.

-H-

Hahn, E. L. Spin Echoes. *Phys. Rev.* **1950**, *80*, 580–594.

Halsam, E.; Lilley, T. H. Natural Astringency in Foodstuffs--a Molecular Interpretation. *Crit Rev Food Sci Nutr* **1988**, *27*, 1–40.

Handa, T.; Saito, H.; Miyajima, K. Phospholipid Monolayers at the Triolein-Saline Interface: Production of Microemulsion Particles and Conversion of Monolayers to Bilayers. *Biochemistry* **1990**, *29*, 2884–2890.

Hanlin, R. I.; Hrmova, M.; Harbertson, J. f.; Downey, M. o. Review: Condensed Tannin and Grape Cell Wall Interactions and Their Impact on Tannin Extractability into Wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research* **2010**, *16*, 173–188.

Hardy, G. J.; Nayak, R.; Zauscher, S. Model Cell Membranes: Techniques to Form Complex Biomimetic Supported Lipid Bilayers via Vesicle Fusion. *Curr Opin Colloid Interface Sci* **2013**, *18*, 448–458.

Harris, D.; Robinson, J. R. Drug Delivery via the Mucous Membranes of the Oral Cavity. *J Pharm Sci* **1992**, *81*, 1–10.

Hashimoto, T.; Kumazawa, S.; Nanjo, F.; Hara, Y.; Nakayama, T. Interaction of Tea Catechins with Lipid Bilayers Investigated with Liposome Systems. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1999**, *63*, 2252–2255.

Haslam, E. Plant Polyphenols (Syn. Vegetable Tannins) and Chemical Defense-A Reappraisal. *J. Chem. Ecol.* **1988**, *14*, 1789–1805.

Heerklotz, H. The Microcalorimetry of Lipid Membranes. *J. Phys.: Condens. Matter* **2004**, *16*, R441.

Hruby, V. J.; Tollin, G. Plasmon-Waveguide Resonance (PWR) Spectroscopy for Directly Viewing Rates of GPCR/G-Protein Interactions and Quantifying Affinities. *Curr Opin Pharmacol* **2007**, *7*, 507–514.

Hsueh, Y.-W.; Chen, M.-T.; Patty, P. J.; Code, C.; Cheng, J.; Frisken, B. J.; Zuckermann, M.; Thewalt, J. Ergosterol in POPC Membranes: Physical Properties and Comparison with Structurally Similar Sterols. *Biophys J* **2007**, *92*, 1606–1615.

Hull, M. C.; Cambrea, L. R.; Hovis, J. S. Infrared Spectroscopy of Fluid Lipid Bilayers. *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 6096–6099.

Hulme, E. C.; Trevethick, M. A. Ligand Binding Assays at Equilibrium: Validation and Interpretation. *Br J Pharmacol* **2010**, *161*, 1219–1237.

Hung, W.-C.; Lee, M.-T.; Chen, F.-Y.; Huang, H. W. The Condensing Effect of Cholesterol in Lipid Bilayers. *Biophys J* **2007**, *92*, 3960–3967.

Hussain, H.; Truong, T.; Bansal, N.; Bhandari, B. The Effect of Manipulating Fat Globule Size on the Stability and Rheological Properties of Dairy Creams. *Food Biophysics* **2017**, *12*, 1–10.

-I-

Israelachvili, J. N.; Mitchell, D. J.; Ninham, B. W. Theory of Self-Assembly of Hydrocarbon Amphiphiles into Micelles and Bilayers. *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 2* **1976**, *72*, 1525–1568.

Israelachvili, J. N.; Marcelja, S.; Horn, R. G. Physical Principles of Membrane Organization. *Q. Rev. Biophys.* **1980**, *13*, 121–200.

-J-

Jodko-Piorecka, K.; Litwinienko, G. First Experimental Evidence of Dopamine Interactions with Negatively Charged Model Biomembranes. *ACS Chem Neurosci* **2013**, *4*, 1114–1122.

Jourdes, M.; Michel, J.; Saucier, C.; Quideau, S.; Teissedre, P.-L. Identification, Amounts, and Kinetics of Extraction of C-Glucosidic Ellagitannins during Wine Aging in Oak Barrels or in Stainless Steel Tanks with Oak Chips. *Anal Bioanal Chem* **2011**, *40*, 1531–1539.

-K-

Kabalnov, A.; Tarara, T.; Arlauskas, R.; Weers, J. Phospholipids as Emulsion Stabilizers: 2. Phase Behavior versus Emulsion Stability. *Journal of Colloid and Interface Science* **1996**, *184*, 227–235.

Kajiya, K.; Kumazawa, S.; Nakayama, T. Steric Effects on Interaction of Tea Catechins with Lipid Bilayers. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2001**, *65*, 2638–2643.

Kajiya, K.; Kumazawa, S.; Naito, A.; Nakayama, T. Solid-State NMR Analysis of the Orientation and Dynamics of Epigallocatechin Gallate, a Green Tea Polyphenol, Incorporated into Lipid Bilayers. *Magn Reson Chem* **2008**, *46*, 174–177.

Kale, S. N.; Deore, S. L. Emulsion Micro Emulsion and Nano Emulsion: A Review. *Systematic Reviews in Pharmacy* **2017**, *8*.

Kallithraka, S.; Kim, D.; Tsakiris, A.; Paraskevopoulos, I.; Soleas, G. Sensory Assessment and Chemical Measurement of Astringency of Greek Wines: Correlations with Analytical Polyphenolic Composition. *Food Chemistry* **2011**, *126*, 1953–1958.

Kamihira, M.; Nakazawa, H.; Kira, A.; Mizutani, Y.; Nakamura, M.; Nakayama, T. Interaction of Tea Catechins with Lipid Bilayers Investigated by a Quartz-Crystal Microbalance Analysis. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2008**, *72*, 1372–1375.

Kennedy, J. A.; Ferrier, J.; Harbertson, J. F.; Gachons, C. P. des. Analysis of Tannins in Red Wine Using Multiple Methods: Correlation with Perceived Astringency. *Am J Enol Vitic.* **2006**, *57*, 481–485.

Kentish, S.; Wooster, T. J.; Ashokkumar, M.; Balachandran, S.; Mawson, R.; Simons, L. The Use of Ultrasonics for Nanoemulsion Preparation. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* **2008**, *9*, 170–175.

King, M.; Cliff, M. Evaluation of Ideal Wine and Cheese Pairs Using a Deviation-from-Ideal Scale with Food and Wine Experts. *Journal of Food Quality* **2005**, *28*, 245–256.

Kinnamon, S. C. Taste Transduction: Linkage between Molecular Mechanisms and Psychophysics. *Food Quality and Preference* **1996**, *7*, 153–159.

Kitano, K.; Nam, K. Y.; Kimura, S.; Fujiki, H.; Imanishi, Y. Sealing Effects of (-)-Epigallocatechin Gallate on Protein Kinase C and Protein Phosphatase 2A. *Biophys. Chem.* **1997**, *65*, 157–164.

Komaiko, J.; Sastrosubroto, A.; McClements, D. J. Formation of Oil-in-Water Emulsions from Natural Emulsifiers Using Spontaneous Emulsification: Sunflower Phospholipids. *J. Agric. Food Chem.* **2015**, *63*, 10078–10088.

Koone, R.; Harrington, R. J.; Gozzi, M.; McCarthy, M. The Role of Acidity, Sweetness, Tannin and Consumer Knowledge on Wine and Food Match Perceptions. *Journal of Wine Research* **2014**, *25*, 158–174.

Kralova, I.; Sjöblom, J. Surfactants Used in Food Industry: A Review. *Journal of Dispersion Science and Technology* **2009**, *30*, 1363–1383.

Kumazawa, S.; Kajiya, K.; Naito, A.; Saito, H.; Tuzi, S.; Tanio, M.; Suzuki, M.; Nanjo, F.; Suzuki, E.; Nakayama, T. Direct Evidence of Interaction of a Green Tea Polyphenol, Epigallocatechin Gallate, with Lipid Bilayers by Solid-State Nuclear Magnetic Resonance. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2004**, *68*, 1743–1747.

-L-

Landon, J. L.; Weller, K.; Harbertson, J. F.; Ross, C. F. Chemical and Sensory Evaluation of Astringency in Washington State Red Wines. *Am J Enol Vitic.* **2008**, *59*, 153–158.

Law, S.; Wertz, P. W.; Swartzendruber, D. C.; Squier, C. A. 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* **1995**, *40*, 1085–1091.

Lee, B. W.; Faller, R.; Sum, A. K.; Vattulainen, I.; Patra, M.; Karttunen, M. Structural Effects of Small Molecules on Phospholipid Bilayers Investigated by Molecular Simulations. *Fluid Phase Equilibria* **2004**, *225*, 63–68.

Lee, C. A.; Ismail, B.; Vickers, Z. M. The Role of Salivary Proteins in the Mechanism of Astringency. *J. Food Sci.* **2012**, *77*, C381-387.

Lee, C. B.; Lawless, H. T. Time-Course of Astringent Sensations. *Chem Senses* **1991**, *16*, 225–238.

Léonard, A.; Escribe, C.; Laguerre, M.; Pebay-Peyroula, E.; Néri, W.; Pott, T.; Katsaras, J.; Dufourc, E. J. Location of Cholesterol in DMPC Membranes. A Comparative Study by Neutron Diffraction and Molecular Mechanics Simulation. *Langmuir* **2001**, *17*, 2019–2030.

Leong, T. S. H.; Wooster, T. J.; Kentish, S. E.; Ashokkumar, M. Minimising Oil Droplet Size Using Ultrasonic Emulsification. *Ultrason Sonochem* **2009**, *16*, 721–727.

Li, A.-N.; Li, S.; Zhang, Y.-J.; Xu, X.-R.; Chen, Y.-M.; Li, H.-B. Resources and Biological Activities of Natural Polyphenols. *Nutrients* **2014**, *6*, 6020–6047.

Lopez, C.; Cauty, C.; Rousseau, F.; Blot, M.; Margolis, A.; Famelart, M.-H. Lipid Droplets Coated with Milk Fat Globule Membrane Fragments: Microstructure and Functional Properties as a Function of PH. *Food Research International* **2017**, *91*, 26–37.

-M-

Ma, W.; Guo, A.; Zhang, Y.; Wang, H.; Liu, Y.; Li, H. A Review on Astringency and Bitterness Perception of Tannins in Wine. *Trends in Food Science & Technology* **2014**, *40*, 6–19.

Madrigal-Galan, B.; Heymann, H. Sensory Effects of Consuming Cheese Prior to Evaluating Red Wine Flavor. *Am J Enol Vitic.* **2006**, *57*, 12–22.

Martinez, D.; Decossas, M.; Kowal, J.; Frey, L.; Stahlberg, H.; Dufourc, E. J.; Riek, R.; Habenstein, B.; Bibow, S.; Loquet, A. Lipid Internal Dynamics Probed in Nanodiscs. *ChemPhysChem*.

McClements, D. J. Emulsion Design to Improve the Delivery of Functional Lipophilic Components. *Annu Rev Food Sci Technol* **2010**, *1*, 241–269.

McClements, D. J. *Food Emulsions: Principles, Practices, and Techniques, Third Edition*; CRC Press, 2015.

McClements, D. J.; Gumus, C. E. Natural Emulsifiers - Biosurfactants, Phospholipids, Biopolymers, and Colloidal Particles: Molecular and Physicochemical Basis of Functional Performance. *Adv Colloid Interface Sci* **2016**, *234*, 3–26.

McPherson, G. A.; Molenaar, P.; Raper, C.; Malta, E. Analysis of Dose-Response Curves and Calculation of Agonist Dissociation Constants Using a Weighted Nonlinear Curve Fitting Program. *J Pharmacol Methods* **1983**, *10*, 231–241.

Mercurio, M. D.; Damberg, R. G.; Cozzolino, D.; Herderich, M. J.; Smith, P. A. Relationship between Red Wine Grades and Phenolics. 1. Tannin and Total Phenolics Concentrations. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 12313–12319.

Meyer, F. de; Smit, B. Effect of Cholesterol on the Structure of a Phospholipid Bilayer. *PNAS* **2009**, *106*, 3654–3658.

Mingeot-Leclercq, M.-P.; Deleu, M.; Brasseur, R.; Dufrêne, Y. F. Atomic Force Microscopy of Supported Lipid Bilayers. *Nat Protoc* **2008**, *3*, 1654–1659.

Monagas, M.; Gómez-Cordovés, C.; Bartolomé, B.; Laureano, O.; Ricardo da Silva, J. M. Monomeric, Oligomeric, and Polymeric Flavan-3-Ol Composition of Wines and Grapes from *Vitis Vinifera* L. Cv. Graciano, Tempranillo, and Cabernet Sauvignon. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 6475–6481.

Mueller-Harvey, I.; Mlambo, V.; Sikosana, J. L. N.; Smith, T.; Owen, E.; Brown, R. H. Octanol-Water Partition Coefficients for Predicting the Effects of Tannins in Ruminant Nutrition. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 5436–5444.

-N-

Nasir, M. N.; Crowet, J.-M.; Lins, L.; Obounou Akong, F.; Haudrechy, A.; Bouquillon, S.; Deleu, M. Interactions of Sugar-Based Bolaamphiphiles with Biomimetic Systems of Plasma Membranes. *Biochimie* **2016**, *130*, 23–32.

Nayak, A.; Carpenter, G. H. A Physiological Model of Tea-Induced Astringency. *Physiol. Behav.* **2008**, *95*, 290–294.

Nezil, F. A.; Bloom, M. Combined Influence of Cholesterol and Synthetic Amphiphilic Peptides upon Bilayer Thickness in Model Membranes. *Biophys J* **1992**, *61*, 1176–1183.

Niu, S.-L.; Mitchell, D. C.; Litman, B. J. Manipulation of Cholesterol Levels in Rod Disk Membranes by Methyl-Beta-Cyclodextrin: Effects on Receptor Activation. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 20139–20145.

Noble, A. C. Bitterness in Wine. *Physiology & Behavior* **1994**, *56*, 1251–1255.

Nygren, I. t.; Gustafsson, I.-B.; Haglund, Å.; Johansson, L.; Noble, A. c. Flavor Changes Produced by Wine and Food Interactions: Chardonnay Wine and Hollandaise Sauce. *Journal of Sensory Studies* **2001**, *16*, 461–470.

Nygren, I. T.; Gustafsson, I.-B.; Johansson, L. Perceived Flavour Changes in White Wine after Tasting Blue Mould Cheese. *Food Service Technology* **2002**, *2*, 163–171.

-O-

Obreque-Slier, E.; López-Solís, R.; Peña-Neira, Á.; Zamora-Marín, F. Tannin–protein Interaction Is More Closely Associated with Astringency than Tannin–protein Precipitation: Experience with Two Oenological Tannins and a Gelatin. *International Journal of Food Science & Technology* **2010**, *45*, 2629–2636.

Ogawa, S.; Decker, E. A.; McClements, D. J. Production and Characterization of O/W Emulsions Containing Cationic Droplets Stabilized by Lecithin–Chitosan Membranes. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 2806–2812.

Okuda, T.; Yoshida, T.; Hatano, T. Classification of Oligomeric Hydrolysable Tannins and Specificity of Their Occurrence in Plants. *Phytochemistry* **1993**, *32*, 507–521.

Ollila, F.; Halling, K.; Vuorela, P.; Vuorela, H.; Slotte, J. P. Characterization of Flavonoid–Biomembrane Interactions. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **2002**, *399*, 103–108.

Orlova, E. V.; Saibil, H. R. Structural Analysis of Macromolecular Assemblies by Electron Microscopy. *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 7710–7748.

Ozturk, B.; McClements, D. J. Progress in Natural Emulsifiers for Utilization in Food Emulsions. *Current Opinion in Food Science* **2016**, *7*, 1–6.

-P-

Pandey, K. B.; Rizvi, S. I. Plant Polyphenols as Dietary Antioxidants in Human Health and Disease. *Oxid Med Cell Longev* **2009**, *2*, 270–278.

Patra, M.; Salonen, E.; Terama, E.; Vattulainen, I.; Faller, R.; Lee, B. W.; Holopainen, J.; Karttunen, M. Under the Influence of Alcohol: The Effect of Ethanol and Methanol on Lipid Bilayers. *Biophys J* **2006**, *90*, 1121–1135.

Pauli, G. F.; Jaki, B. U.; Lankin, D. C. Quantitative ¹H NMR: Development and Potential of a Method for Natural Products Analysis. *J. Nat. Prod.* **2005**, *68*, 133–149.

Peetla, C.; Stine, A.; Labhasetwar, V. Biophysical Interactions with Model Lipid Membranes: Applications in Drug Discovery and Drug Delivery. *Mol Pharm* **2009**, *6*, 1264–1276.

- Peleg, H.; Gacon, K.; Schlich, P.; Noble, A. C. Bitterness and Astringency of Flavan-3-Ol Monomers, Dimers and Trimers. *J. Sci. Food Agric.* **1999**, *79*, 1123–1128.
- Pencer, J.; Nieh, M.-P.; Harroun, T. A.; Krueger, S.; Adams, C.; Katsaras, J. Bilayer Thickness and Thermal Response of Dimyristoylphosphatidylcholine Unilamellar Vesicles Containing Cholesterol, Ergosterol and Lanosterol: A Small-Angle Neutron Scattering Study. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2005**, *1720*, 84–91.
- Periole, X.; Marrink, S.-J. The Martini Coarse-Grained Force Field. *Methods Mol. Biol.* **2013**, *924*, 533–565.
- Peynaud, E.; Blouin, J. *The Taste of Wine: The Art Science of Wine Appreciation*; John Wiley & Sons, 1996.
- Phan, H. T. T.; Yoda, T.; Chahal, B.; Morita, M.; Takagi, M.; Vestergaard, M. C. Structure-Dependent Interactions of Polyphenols with a Biomimetic Membrane System. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2014**, *1838*, 2670–2677.
- Pianet, I.; André, Y.; Ducasse, M.-A.; Tarascou, I.; Lartigue, J.-C.; Pinaud, N.; Fouquet, E.; Dufourc, E. J.; Laguerre, M. Modeling Procyanidin Self-Association Processes and Understanding Their Micellar Organization: A Study by Diffusion NMR and Molecular Mechanics. *Langmuir* **2008**, *24*, 11027–11035.
- Pichot, R.; Watson, R. L.; Norton, I. T. Phospholipids at the Interface: Current Trends and Challenges. *Int J Mol Sci* **2013**, *14*, 11767–11794.
- Pietta, P.; Simonetti, P. Dietary Flavonoids and Interaction with Endogenous Antioxidants. *IUBMB Life* **1998**, *44*, 1069–1074.
- Pocock, K. F.; Sefton, M. A.; Williams, P. J. Taste Thresholds of Phenolic Extracts of French and American Oakwood: The Influence of Oak Phenols on Wine Flavor. *Am J Enol Vitic.* **1994**, *45*, 429–434.
- Poklar Ulrih, N.; Ota, A.; Šentjerc, M.; Kure, S.; Abram, V. Flavonoids and Cell Membrane Fluidity. *Food Chemistry* **2010**, *121*, 78–84.
- Poncet-Legrand, C.; Cartalade, D.; Putaux, J.-L.; Cheynier, V.; Vernhet, A. Flavan-3-Ol Aggregation in Model Ethanol Solutions: Incidence of Polyphenol Structure, Concentration, Ethanol Content, and Ionic Strength. *Langmuir* **2003**, *19*, 10563–10572.
- Pourcel, L.; Routaboul, J.-M.; Cheynier, V.; Lepiniec, L.; Debeaujon, I. Flavonoid Oxidation in Plants: From Biochemical Properties to Physiological Functions. *Trends Plant Sci.* **2007**, *12*, 29–36.

-Q-

Quideau, S.; Deffieux, D.; Douat-Casassus, C.; Pouységu, L. Plant Polyphenols: Chemical Properties, Biological Activities, and Synthesis. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2011**, *50*, 586–621.

-R-

Rahmati, K.; Mazaheri Tehrani, M.; Daneshvar, K. Soy Milk as an Emulsifier in Mayonnaise: Physico-Chemical, Stability and Sensory Evaluation. *J Food Sci Technol* **2014**, *51*, 3341–3347.

Rao, J.; McClements, D. J. Formation of Flavor Oil Microemulsions, Nanoemulsions and Emulsions: Influence of Composition and Preparation Method. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 5026–5035.

Raynal-Ljutovac, K.; Bouvier, J.; Gayet, C.; Simon, N.; Joffre, F.; Fine, F.; Vendevre, J.-L.; Lopez, C.; Chardigny, J.-M.; Michalski, M.-C.; et al. Organisation structurale et moléculaire des lipides dans les aliments : impacts possibles sur leur digestion et leur assimilation par l'Homme. *OCL.* **2011**, *18*, 324–351.

Reyes Mateo, C.; Ulises Acuña, A.; Brochon, J. C. Liquid-Crystalline Phases of Cholesterol/Lipid Bilayers as Revealed by the Fluorescence of Trans-Parinaric Acid. *Biophys J* **1995**, *68*, 978–987.

Ribéreau-Gayon, P.; Glories, Y.; Maujean, A.; Dubourdieu, D. *Handbook of Enology, The Chemistry of Wine: Stabilization and Treatments*; John Wiley & Sons, 2006.

Richter, R. P.; Bérat, R.; Brisson, A. R. Formation of Solid-Supported Lipid Bilayers: An Integrated View. *Langmuir* **2006**, *22*, 3497–3505.

Rinaldi, A.; Gambuti, A.; Moio, L. Precipitation of Salivary Proteins after the Interaction with Wine: The Effect of Ethanol, PH, Fructose, and Mannoproteins. *J. Food Sci.* **2012**, *77*, C485-490.

Riou, V.; Vernhet, A.; Doco, T.; Moutounet, M. Aggregation of Grape Seed Tannins in Model Wine—effect of Wine Polysaccharides. *Food Hydrocolloids* **2002**, *16*, 17–23.

Robichaud, J. L.; Noble, A. C. Astringency and Bitterness of Selected Phenolics in Wine. *J. Sci. Food Agric.* **1990**, *53*, 343–353.

Rongen, H. A. H.; Bult, A.; van Bennekom, W. P. Liposomes and Immunoassays. *Journal of Immunological Methods* **1997**, *204*, 105–133.

Rossetti, D.; Bongaerts, J. H. H.; Wantling, E.; Stokes, J. R.; Williamson, A.-M. Astringency of Tea Catechins: More than an Oral Lubrication Tactile Percept. *Food Hydrocolloids* **2009**, *23*, 1984–1992.

Rouser, G.; Fkeischer, S.; Yamamoto, A. Two Dimensional Thin Layer Chromatographic Separation of Polar Lipids and Determination of Phospholipids by Phosphorus Analysis of Spots. *Lipids* **1970**, *5*, 494–496.

Rowat, A. C.; Davis, J. H. Farnesol-DMPC Phase Behaviour: A 2H-NMR Study. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2004**, *1661*, 178–187.

Sacchi, R.; Addeo, F.; Paolillo, L. 1H and 13C NMR of Virgin Olive Oil. An Overview. *Magn. Reson. Chem.* **1997**, *35*, S133–S145.

-S-

Sacchi, Raffaele, Francesco Addeo, et Livio Paolillo. 1H and 13C NMR of Virgin Olive Oil. An Overview. *Magnetic Resonance in Chemistry* **1997**, *35*, 133-145.

Salamon, Z.; Tollin, G. Optical Anisotropy in Lipid Bilayer Membranes: Coupled Plasmon-Waveguide Resonance Measurements of Molecular Orientation, Polarizability, and Shape. *Biophys J* **2001**, *80*, 1557–1567.

Salamon, Z.; Cowell, S.; Varga, E.; Yamamura, H. I.; Hraby, V. J.; Tollin, G. Plasmon Resonance Studies of Agonist/Antagonist Binding to the Human Delta-Opioid Receptor: New Structural Insights into Receptor-Ligand Interactions. *Biophys J* **2000**, *79*, 2463–2474.

Sarni-Manchado, P. ; Cheynier, V. Les polyphénols en agroalimentaire. *Lavoisier* **2006**.

Scheidt, H. A.; Pampel, A.; Nissler, L.; Gebhardt, R.; Huster, D. Investigation of the Membrane Localization and Distribution of Flavonoids by High-Resolution Magic Angle Spinning NMR Spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2004**, *1663*, 97–107.

Schmid, N.; Eichenberger, A. P.; Choutko, A.; Riniker, S.; Winger, M.; Mark, A. E.; van Gunsteren, W. F. Definition and Testing of the GROMOS Force-Field Versions 54A7 and 54B7. *Eur. Biophys. J.* **2011**, *40*, 843–856.

Seelig, J. Deuterium Magnetic Resonance: Theory and Application to Lipid Membranes. *Q. Rev. Biophys.* **1977**, *10*, 353–418.

Shojaei, A. H. Buccal Mucosa as a Route for Systemic Drug Delivery: A Review. *J Pharm Pharm Sci* **1998**, *1*, 15–30.

Silva, M. A.; Ky, I.; Jourdes, M.; Teissedre, P.-L. Rapid and Simple Method for the Quantification of Flavan-3-Ols in Wine. *Eur Food Res Technol* **2012**, *234*, 361–365.

Sirk, T. W.; Brown, E. F.; Sum, A. K.; Friedman, M. Molecular Dynamics Study on the Biophysical Interactions of Seven Green Tea Catechins with Lipid Bilayers of Cell Membranes. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 7750–7758.

Sklar, L. A.; Finney, D. A.; Oades, Z. G.; Jesaitis, A. J.; Painter, R. G.; Cochrane, C. G. The Dynamics of Ligand-Receptor Interactions. Real-Time Analyses of Association, Dissociation, and Internalization of an N-Formyl Peptide and Its Receptors on the Human Neutrophil. *J. Biol. Chem.* **1984**, *259*, 5661–5669.

Small, D. M. Flavor Is in the Brain. *Physiol. Behav.* **2012**, *107*, 540–552.

Solans, C.; Kunieda, H. *Industrial Applications of Microemulsions*; CRC Press, 1996.

Solans, C.; Izquierdo, P.; Nolla, J.; Azemar, N.; Garcia-Celma, M. J. Nano-Emulsions. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* **2005**, *10*, 102–110.

Soleas, G. J.; Diamandis, E. P.; Goldberg, D. M. Wine as a Biological Fluid: History, Production, and Role in Disease Prevention. *J. Clin. Lab. Anal.* **1997**, *11*, 287–313.

Soubias, O.; Réat, V.; Saurel, O.; Milon, A. High Resolution 2D ¹H–¹³C Correlation of Cholesterol in Model Membrane. *Journal of Magnetic Resonance* **2002**, *158*, 143–148.

Soubias, O.; Jolibois, F.; Réat, V.; Milon, A. Understanding Sterol-Membrane Interactions, Part II: Complete ¹H and ¹³C Assignments by Solid-State NMR Spectroscopy and Determination of the Hydrogen-Bonding Partners of Cholesterol in a Lipid Bilayer. *Chem. Eur. J.* **2004**, *10*, 6005–6014.

Spencer, J. P.; Schroeter, H.; Kuhnle, G.; Srail, S. K.; Tyrrell, R. M.; Hahn, U.; Rice-Evans, C. Epicatechin and Its in Vivo Metabolite, 3'-O-Methyl Epicatechin, Protect Human Fibroblasts from Oxidative-Stress-Induced Cell Death Involving Caspase-3 Activation. *Biochem J* **2001**, *354*, 493–500.

Squier, C. A.; Cox, P.; Wertz, P. W. Lipid Content and Water Permeability of Skin and Oral Mucosa. *J. Invest. Dermatol.* **1991**, *96*, 123–126.

Sun, Y.; Hung, W.-C.; Chen, F.-Y.; Lee, C.-C.; Huang, H. W. Interaction of Tea Catechin (-)-Epigallocatechin Gallate with Lipid Bilayers. *Biophys. J.* **2009**, *96*, 1026–1035.

Szterk, A.; Roszko, M.; Górnicka, E. Chemical Stability of the Lipid Phase in Concentrated Beverage Emulsions Colored with Natural β -Carotene. *J Am Oil Chem Soc* **2013**, *90*, 483–491.

Szunerits, S.; Boukherroub, R. *Introduction to Plasmonics: Advances and Applications*; CRC Press, **2015**.

-T-

Tadros, T.; Izquierdo, P.; Esquena, J.; Solans, C. Formation and Stability of Nano-Emulsions. *Advances in Colloid and Interface Science* **2004**, *108–109*, 303–318.

Taillandier, P. *Le vin : composition et transformations chimiques*; Tec & Doc Lavoisier: Paris, **2005**.

Tamba, Y.; Ohba, S.; Kubota, M.; Yoshioka, H.; Yoshioka, H.; Yamazaki, M. Single GUV Method Reveals Interaction of Tea Catechin (-)-Epigallocatechin Gallate with Lipid Membranes. *Biophys J* **2007**, *92*, 3178–3194.

Tarascou, I.; Barathieu, K.; Simon, C.; Ducasse, M.-A.; André, Y.; Fouquet, E.; Dufourc, E. J.; de Freitas, V.; Laguerre, M.; Pianet, I. A 3D Structural and Conformational Study of Procyanidin Dimers in Water and Hydro-Alcoholic Media as Viewed by NMR and Molecular Modeling. *Magn Reson Chem* **2006**, *44*, 868–880.

Terashi, H.; Izumi, K.; Rhodes, L. M.; Marcelo, C. L. Human Stratified Squamous Epithelia Differ in Cellular Fatty Acid Composition. *J. Dermatol. Sci.* **2000**, *24*, 14–24.

Thewalt, J. L.; Bloom, M. Phosphatidylcholine: Cholesterol Phase Diagrams. *Biophys. J.* **1992**, *63*, 1176–1181.

Thompson, I. O.; van der Bijl, P.; van Wyk, C. W.; van Eyk, A. D. A Comparative Light-Microscopic, Electron-Microscopic and Chemical Study of Human Vaginal and Buccal Epithelium. *Arch. Oral Biol.* **2001**, *46*, 1091–1098.

Thorngate, J. H.; Noble, A. C. Sensory Evaluation of Bitterness and Astringency of 3R(-)-Epicatechin and 3S(+)-Catechin. *J. Sci. Food Agric.* **1995**, *67*, 531–535.

Tillman, T. S.; Cascio, M. Effects of Membrane Lipids on Ion Channel Structure and Function. *Cell Biochem. Biophys.* **2003**, *38*, 161–190.

Tsuchiya, H. Effects of Green Tea Catechins on Membrane Fluidity. *Pharmacology* **1999**, *59*, 34–44.

Tsuchiya, H.; Tanaka, T.; Nagayama, M. Antiproliferative Effects Associated with Membrane Lipid Interaction of Green Tea Catechins. *Journal of Health Science* **2008**, *54*, 576–580.

Tu, K.; Tobias, D. J.; Klein, M. L. Constant Pressure and Temperature Molecular Dynamics Simulation of a Fully Hydrated Liquid Crystal Phase Dipalmitoylphosphatidylcholine Bilayer. *Biophys. J.* **1995**, *69*, 2558–2562.

Turgeon, S. L.; Rioux, L.-E. Food Matrix Impact on Macronutrients Nutritional Properties. *Food Hydrocolloids* **2011**, *25*, 1915–1924.

-U-

Uekusa, Y.; Kamihira, M.; Nakayama, T. Dynamic Behavior of Tea Catechins Interacting with Lipid Membranes As Determined by NMR Spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 9986–9992. Uekusa, Y.; Kamihira-Ishijima, M.; Sugimoto, O.; Ishii, T.; Kumazawa, S.; Nakamura, K.; Tanji, K.; Naito, A.; Nakayama, T. Interaction of Epicatechin Gallate with Phospholipid Membranes as Revealed by Solid-State NMR Spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta* **2011**, *1808*, 1654–1660.

-V-

Vidal, S.; Francis, L.; Guyot, S.; Marnet, N.; Kwiatkowski, M.; Gawel, R.; Cheynier, V.; Waters, E. J. The Mouth-Feel Properties of Grape and Apple Proanthocyanidins in a Wine-like Medium. *J. Sci. Food Agric.* **2003**, *83*, 564–573.

Vist, M. R.; Davis, J. H. Phase Equilibria of Cholesterol/Dipalmitoylphosphatidylcholine Mixtures: Deuterium Nuclear Magnetic Resonance and Differential Scanning Calorimetry. *Biochemistry* **1990**, *29*, 451–464.

-W-

Warschawski, D. E.; Devaux, P. F. Polarization Transfer in Lipid Membranes. *J. Magn. Reson.* **2000**, *145*, 367–372.

Weiss, J. N. The Hill Equation Revisited: Uses and Misuses. *FASEB J* **1997**, *11*, 835–841.

Weizenmann, N.; Huster, D.; Scheidt, H. A. Interaction of Local Anesthetics with Lipid Bilayers Investigated by ¹H MAS NMR Spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2012**, *1818*, 3010–3018.

Wertz, P. W.; Cox, P. S.; Squier, C. A.; Downing, D. T. Lipids of Epidermis and Keratinized and Non-Keratinized Oral Epithelia. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry* **1986**, *83*, 529–531.

Williamson, M. P. Using Chemical Shift Perturbation to Characterise Ligand Binding. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* **2013**, *73*, 1–16.

Wright, E.; Serpersu, E. H. Enzyme–Substrate Interactions with an Antibiotic Resistance Enzyme: Aminoglycoside Nucleotidyltransferase(2′ ‘)-Ia Characterized by Kinetic and Thermodynamic Methods. *Biochemistry* **2005**, *44*, 11581–11591.

-Y-

Yu, X.; Chu, S.; Hagerman, A. E.; Lorigan, G. A. Probing the Interaction of Polyphenols with Lipid Bilayers by Solid-State NMR Spectroscopy. *J Agric Food Chem* **2011**, *59*, 6783–6789.

-Z-

Zhang, Z.; Wang, G.; Nie, Y.; Ji, J. Hydrodynamic Cavitation as an Efficient Method for the Formation of Sub-100nm O/W Emulsions with High Stability. *Chinese Journal of Chemical Engineering* **2016**, *24*, 1477–1480.

Zhu, W.; Xiong, L.; Peng, J.; Deng, X.; Gao, J.; Li, C. Molecular Insight into Affinities of Gallated and Nongallated Proanthocyanidins Dimers to Lipid Bilayers. *Sci Rep* **2016**, *6*.

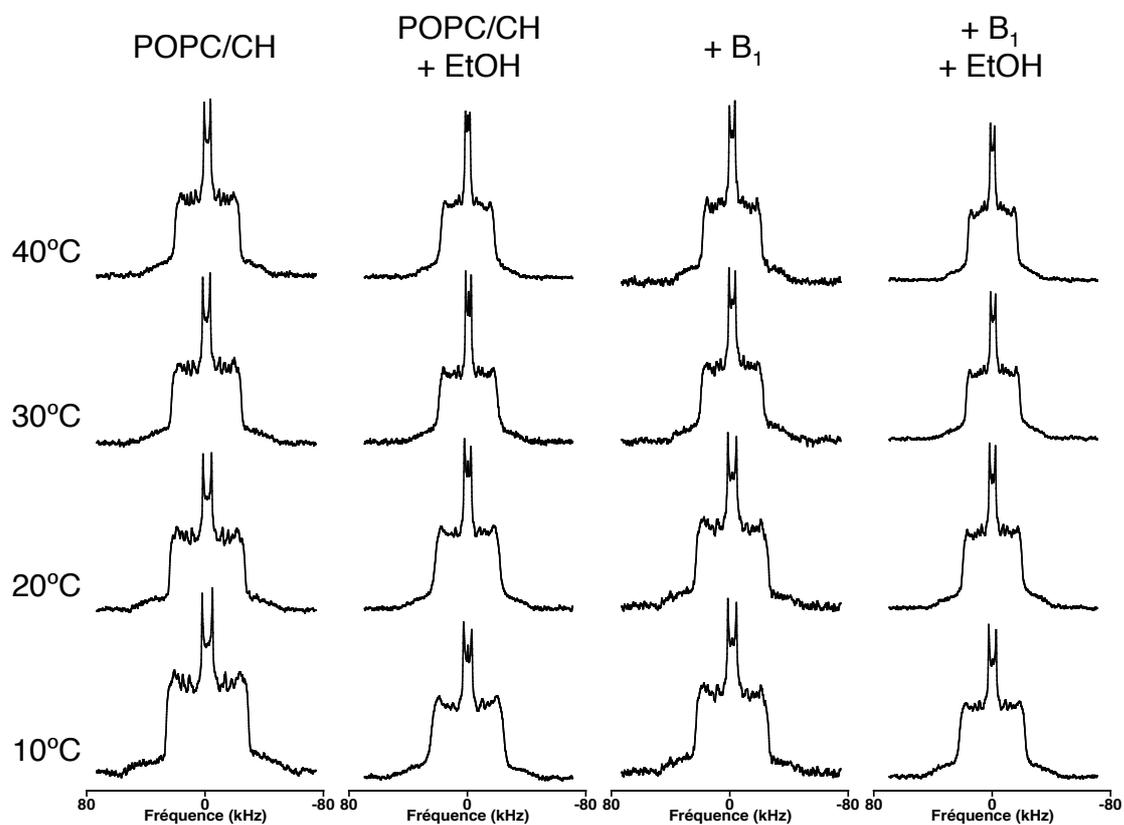
Annexes

Annexes chapitre II

Annexe 1 : Tableau représentant les variations des premiers moments spectraux M_1 en fonction de la température en absence et en présence des tannins.

Température (°C)	M_1 (kHz)		
	POPC _{d31} /CH	POPC _{d31} /CH/CAT	POPC _{d31} /CH/B ₁
0	92.0 ± 2.3	83.3 ± 2.1	76.7 ± 1.9
10	82.5 ± 2.1	77.1 ± 1.9	69.6 ± 1.7
20	74.1 ± 1.8	70.6 ± 1.7	64.4 ± 1.6
30	68.5 ± 1.7	66.4 ± 1.6	60.1 ± 1.5
40	63.0 ± 1.5	62.3 ± 1.6	57.7 ± 1.4
50	59.3 ± 1.5	57.7 ± 1.4	53.5 ± 1.3

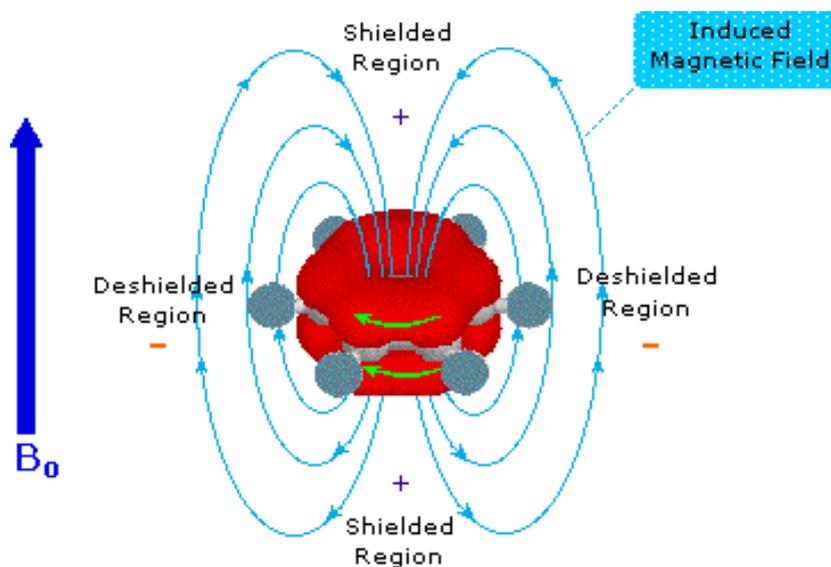
Annexe 2 : Spectres RMN du deutérium des vésicules multilamellaires de POPC_{d₃₁}/Cholestérol (70/30) en absence et en présence d'éthanol et/ou de B₁ à différentes températures. Rapport molaire B₁/Lipide 1/30. [Lipide] = 60 mM, [POPC] = 42 mM, [Cholestérol] = 18 mM, Ethanol = 12% v/v. CM = 500 MHz, NA = 8k sc, LB = 300 Hz.



Annexe 3 : Valeurs des variations des déplacements chimiques ($\Delta\delta$) des groupements du POPC en absence et en présence des tannins.

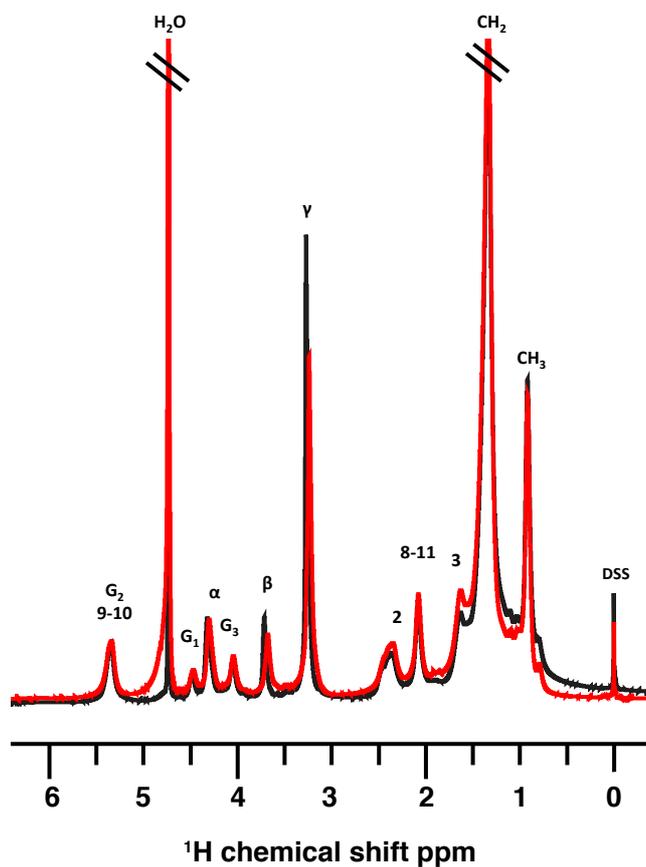
Groupement chimique	Catéchine (6 mM)	Ecart type moyen	Catéchine (2 mM)	Ecart type moyen	B1 (2 mM)	Ecart type moyen
	$\Delta\delta$ (ppm)		$\Delta\delta$ (ppm)		$\Delta\delta$ (ppm)	
β	0,048	0,003	0,019	0,005	0,034	0,001
γ	0,031	0,002	0,012	0,004	0,032	0,002
α	0,016	0,002	0,010	0,003	0,017	0,000
G1	0,010	0,001	0,007	0,003	0,008	0,002
2	0,005	0,004	0,007	0,002	0,006	0,002
CH3	0,004	0,002	0,005	0,000	0,001	0,001
CH2	0,004	0,003	0,003	0,000	0,001	0,001
9-10 ; G2	0,003	0,001	0,004	0,003	0,002	0,002
3	0,003	0,002	0,001	0,000	0,004	0,000
8_11	0,002	0,001	0,002	0,001	0,002	0,000
G3	0,001	0,001	0,003	0,001	0,002	0,002

Annexe 4 : Schéma représentant l'effet de blindage (+) lié au courant de cycle d'un noyau benzène.

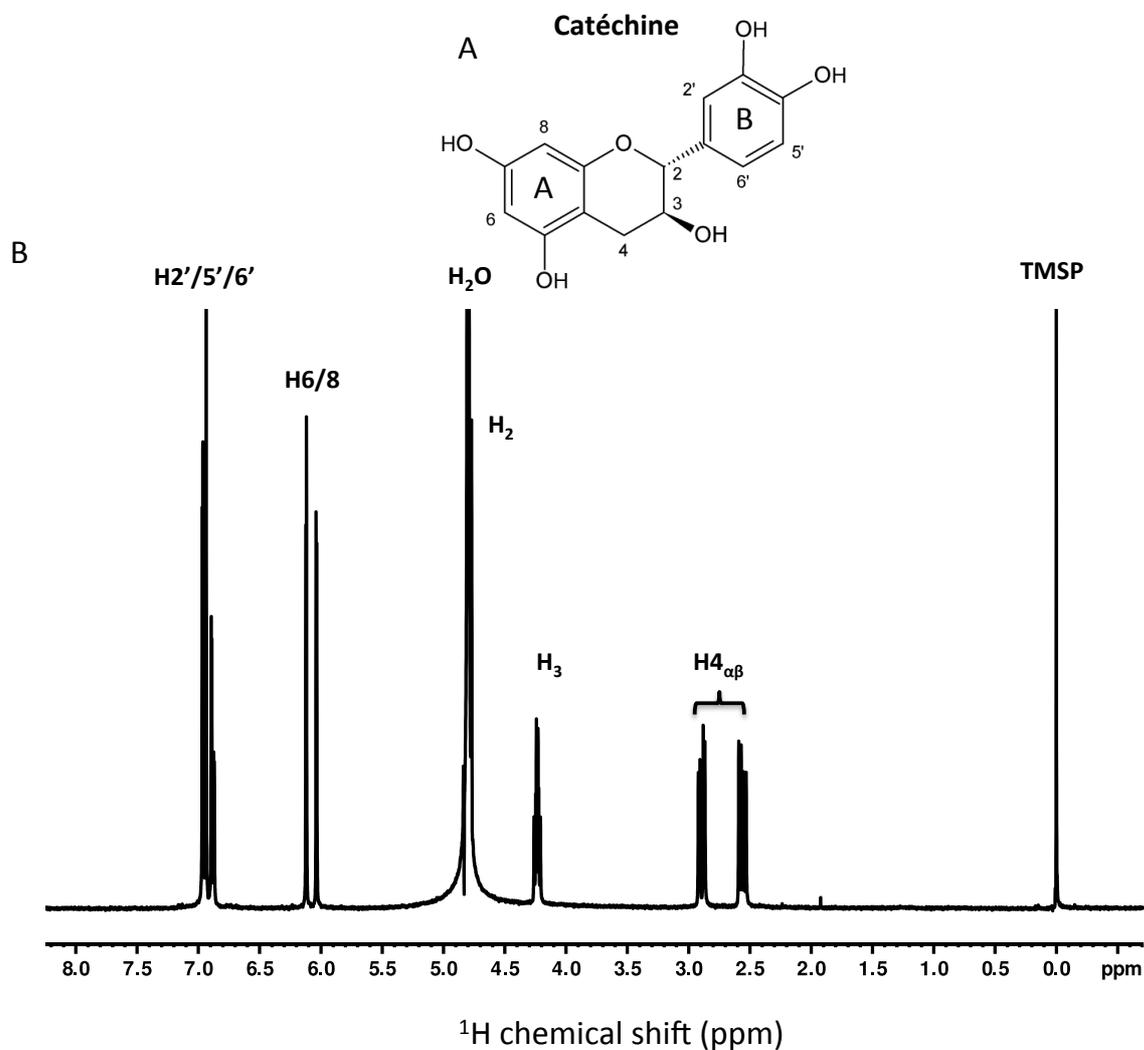


La délocalisation des électrons π du noyau aromatique par l'effet du champ magnétique B_0 va créer un champ magnétique induit opposé à B_0 au centre du cycle qui s'ajoute à celui-ci sur les extrémités. Il en résulte la création de zones de blindage (+) et de déblindage (-). Les protons situés de part et d'autre du cycle aromatique sont déblindés alors que ceux situés au-dessous et au-dessus du cycle sont blindés par l'effet du champ induit.

Annexe 5 : Spectres RMN- ^1H HR-MAS des vésicules multilamellaires de POPC/Cholestérol en absence (noir) et en présence de B_1 (rouge). Les déplacements chimiques sont référencés par rapport au signal du DSS à 0 ppm. Rapport molaire $\text{B}_1/\text{Lipide} = 1/30$. $[\text{Lipide}] = 60 \text{ mM}$, $[\text{POPC}] = 42 \text{ mM}$, $[\text{Cholestérol}] = 18 \text{ mM}$, $[\text{B}_1] = 2 \text{ mM}$. $T = 30^\circ\text{C}$, $\text{CM} = 500 \text{ MHz}$, $\text{NA} = 64 \text{ sc}$, $\text{VR} = 10 \text{ kHz}$.

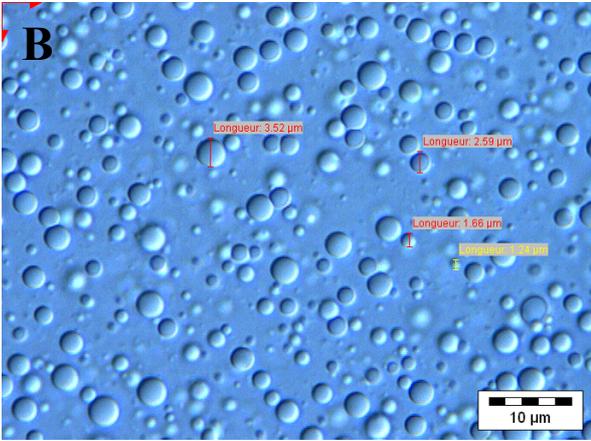
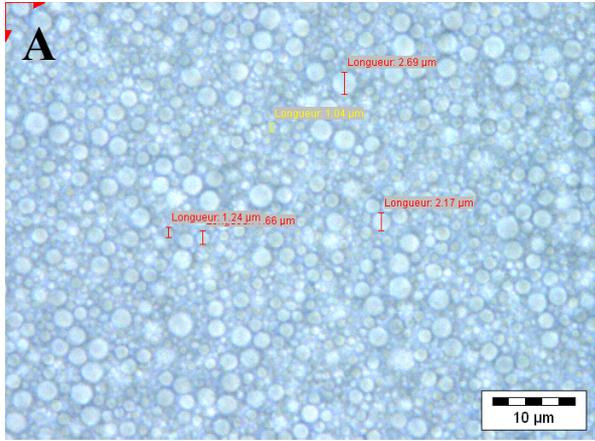


Annexe 6 : (A) Structure chimique de la catéchine. (B) Spectre RMN- ^1H liquide de la catéchine dans du D_2O . Les déplacements chimiques sont référencés par rapport au signal du TMS à 0 ppm. L'attribution du spectre a été faite en se référant à Davis *et al.*, 1996. [Catéchine] = 7 mM, T = 25 °C, CM = 400 MHz, NA = 32 sc.



Annexes chapitre IV

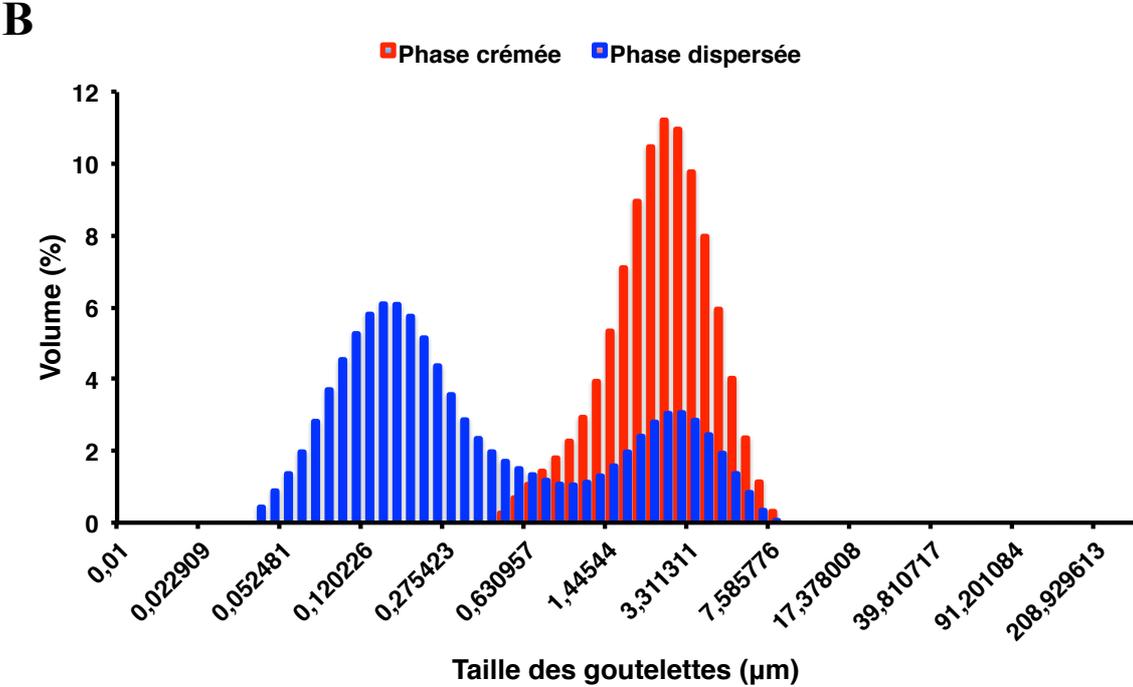
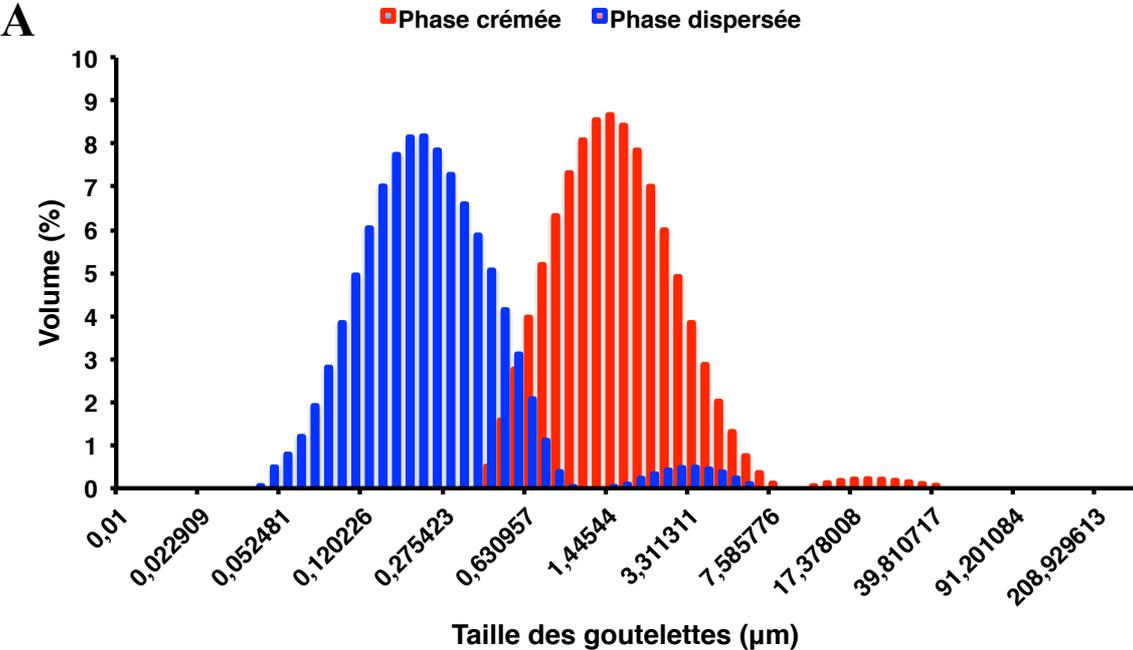
Annexe 7 : Images de microscopie optique des émulsions formées avec les couples émulsifiant/huile suivants : DMPC/huile de tournesol (A), DMPC/GT (B), Grossissement microscope x100.



Annexe 8 : Tableau représentant le vieillissement des émulsions huile dans l'eau, formées avec les émulsifiants Egg-PC et DMPC.

Emulsions	Vieillessement de l'émulsion			
	Démixtion	Vitesse de démixtion	crémage	Vitesse de crémage
Egg-PC/GT			×	Après 1h
EGG-PC/huile d'olive	×	Après 5 min		
Egg-PC/huile de tournesol	×	Après 5 min		
DMPC/GT			×	Après 1h
DMPC/huile d'olive			×	Après 10 min
DMPC/huile de tournesol	×			Après 2j

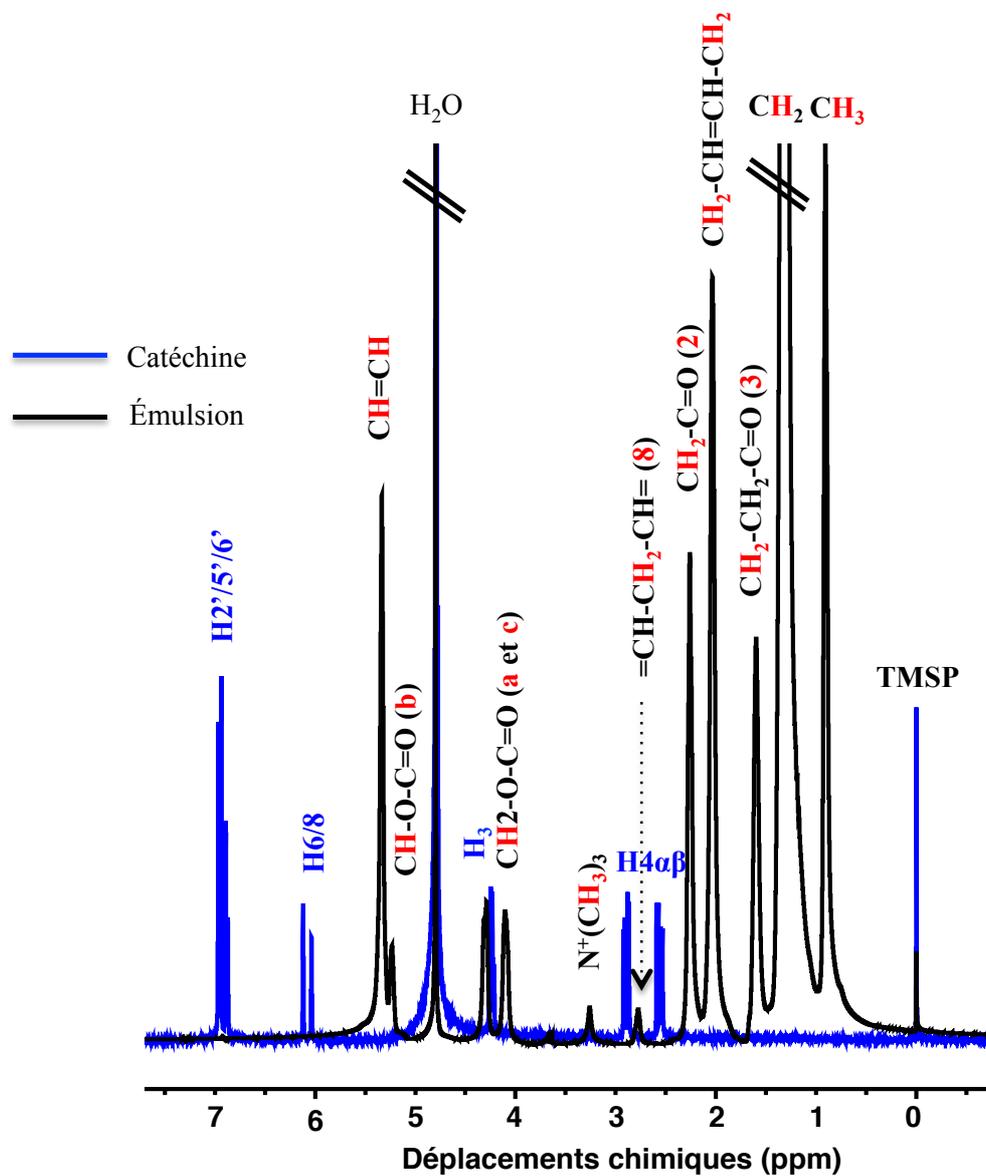
Annexe 9 : Comparaison de la distribution volumique de tailles des gouttelettes lipidiques de la phase crémée (courbe rouge) et de la phase dispersée (courbe bleue) pour l'émulsion DMPC/GT (A) et Egg-PC/GT (B) mesurée par granulométrie. Rapport volumique huile/eau de 1/5. [DMPC] = 5 mg/mL, [Egg-PC] = 5 mg/mL.



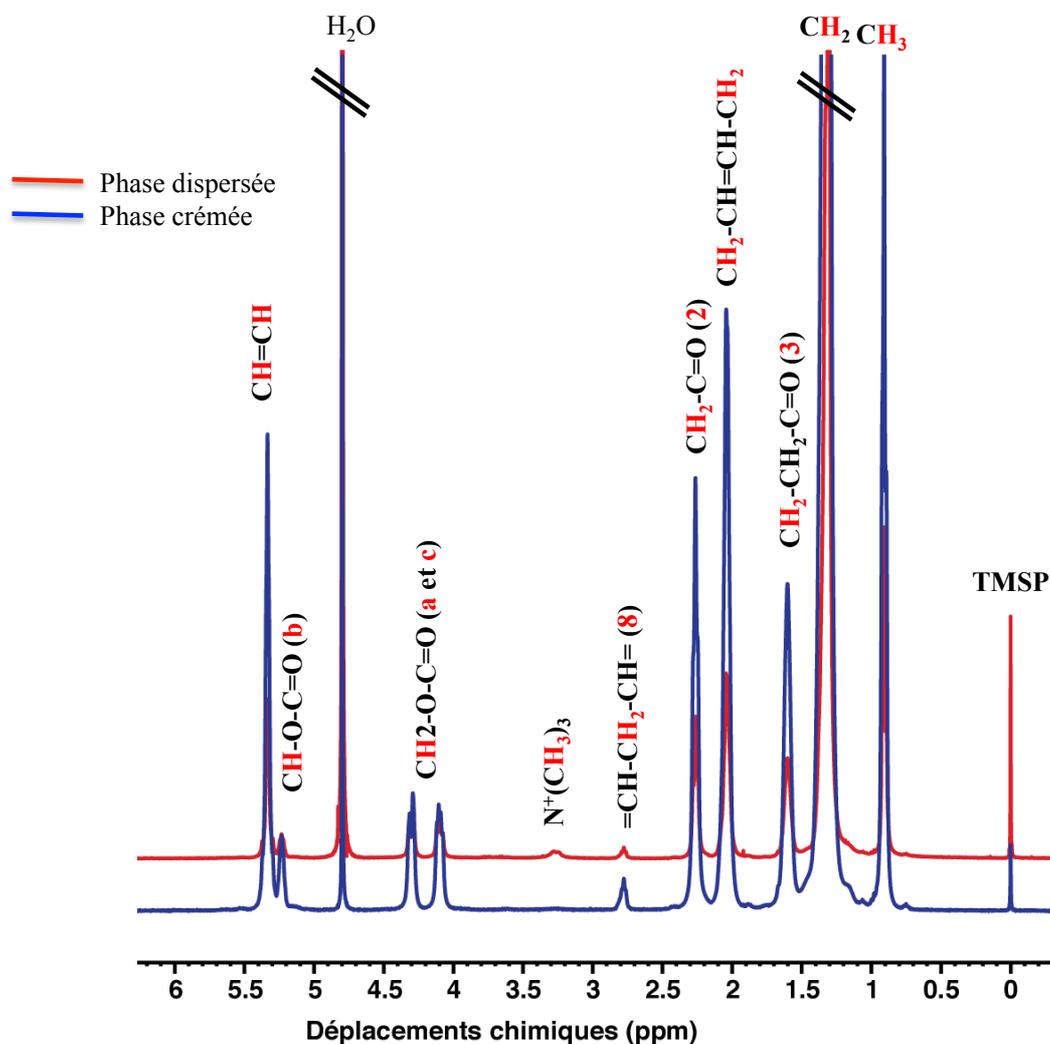
Annexe 10 : Calcul de la concentration de l'huile d'olive dans l'émulsion huile/eau 1/10

La masse volumique de l'huile d'olive $\rho = 920 \text{ g/L}$. L'huile d'olive est composée principalement de trioléine qui a une masse molaire de 885.4 g/mol . Le volume de l'huile d'olive dans l'émulsion est de 0.5 mL et le volume d'eau est de 5 mL . La concentration de l'huile d'olive dans l'émulsion est donc de 94.5 mM Et celle du DMPC de 6.70 mM .

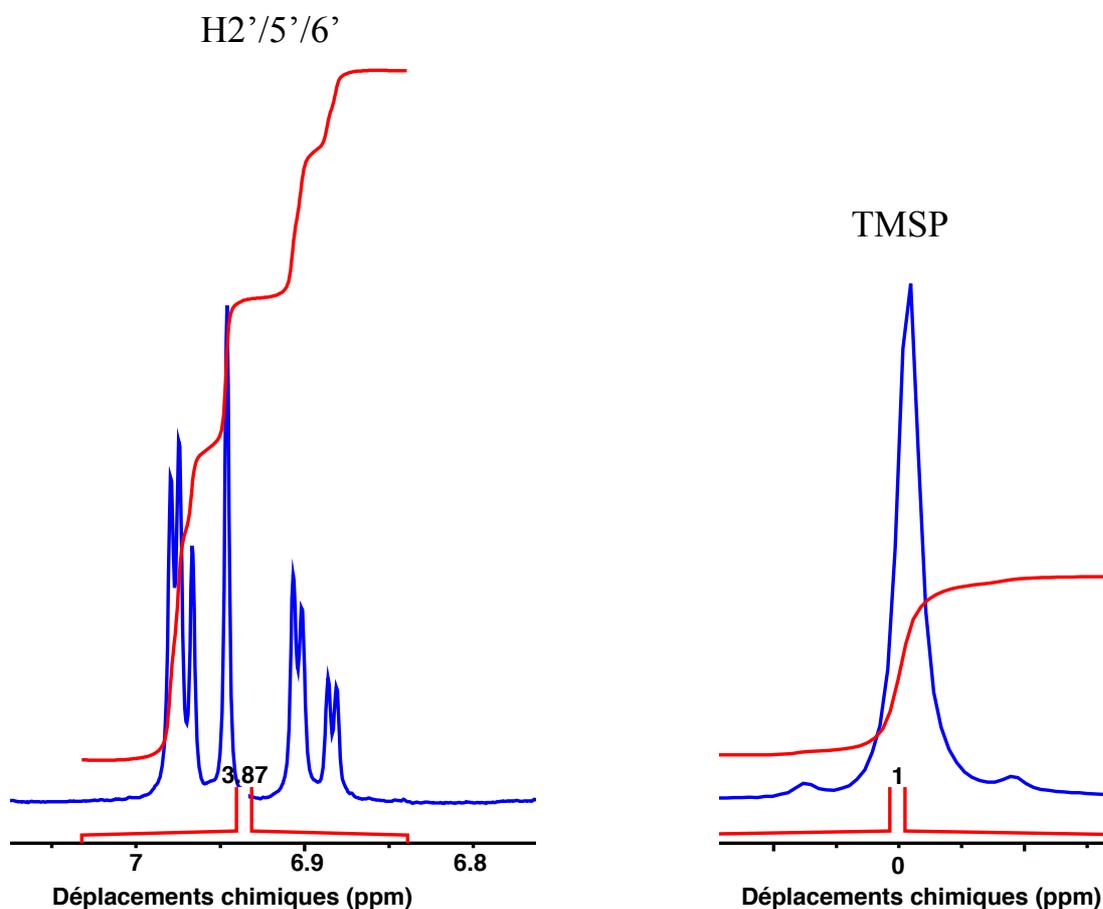
Annexe 11 : Spectre RMN du proton de l'émulsion DMPC/huile d'olive (noir) et de la catéchine (bleu) dans l'eau deutérée. Les déplacements chimiques sont référencés par rapport au signal du TMS fixé à 0 ppm. Rapport volumique huile/eau 1/10. [DMPC] = 5 mg/mL, [Catéchine] = 7 mM, T = 25°C, CM 400 MHz, NA = 128 sc.



Annexe 12 : Spectres RMN du proton de la phase dispersée (rouge) et la phase crémée (bleu) de l'émulsion DMPC/huile d'olive. Les déplacements chimiques sont référencés par rapport au signal du TMSP fixé à 0 ppm. Rapport volumique huile/eau deutérée 1/10. [DMPC] = 5 mg/mL, T = 25°C, CM 400 MHz, NA = 128 sc.



Annexe 13 : Courbe d'intégration des signaux des protons aromatiques de la catéchine ($H_{2'}/5'/6'$) et du TMSP.



D'abord, nous avons fixé la valeur d'intégration du signal du TMSP à 1. Ensuite, nous avons intégré le signal de la catéchine par rapport à celui du TMSP. Nous avons obtenu une valeur de 3.87. La concentration du TMSP dans le mélange est de 0.45 mM et l'intégration de son signal correspond à 9 protons (1/9). L'intégration du signal de la catéchine correspondant à 3 protons ($3.87/3$), sa concentration dans le mélange est donc de 5.22 mM. Le temps de relaxation T_1 a été calculé au préalable pour s'assurer que tous les spins ont bien relaxé et éviter ainsi une perte d'information. Nous avons obtenu un T_1 de 8 s et l'expérience RMN- ^1H a été effectuée avec un temps de mélange D_1 de 40 s.

Annexe 14 : Résultats du test de Student pour les expériences d'analyse sensorielle tannins-lipides.

	Intensity	Acidity	Fruity	Herbaceous	Dried fruit	Bitterness	Astringency	Persistence
Rapeseed vs Grapeseed	0,96 4,11% NS	0,74 26,14% NS	0,45 54,51% NS	0,26 73,73% NS	0,38 62,00% NS	0,69 31,04% NS	0,81 18,73% NS	0,94 5,59% NS
Rapeseed vs Olive	5,25E-27 100,00% ***	3,32E-09 100,00% ***	7,10E-10 100,00% ***	3,85E-04 99,96% ***	6,24E-03 99,38% **	1,81E-11 100,00% ***	2,22E-03 99,78% **	6,30E-20 100,00% ***
Olive vs Grapeseed	1,47E-28 100,00% ***	4,24E-09 100,00% ***	2,24E-08 100,00% ***	1,84E-02 98,16% *	0,07 93,26% NS	3,09E-12 100,00% ***	3,57E-03 99,64% **	8,94E-20 100,00% ***

Tableau 1 : Résultats des tests Student sur les solutions d'huiles goûtées seules. Les valeurs correspondent à la p-value (en haut), la différence (au milieu) et la significativité statistique de la différence (en bas).

	Intensity	Acidity	Fruity	Bitterness	Astringency	Persistence
A0.15 vs A1.16	1,82E-06 100,00% ***	0,08 92,50% NS	0,07 92,70% NS	3,55E-05 100,00% ***	2,60E-06 100,00% ***	5,10E-04 99,95% ***
GS0.15 vs GS1.16	7,14E-12 100,00% ***	5,85E-04 99,94% ***	0,10 90,02% NS	4,35E-05 100,00% ***	2,43E-08 100,00% ***	2,71E-06 100,00% ***
A0.15 vs GS0.15	8,93E-03 99,11% **	0,56 44,50% NS	0,86 14,10% NS	0,65 35,20% NS	0,48 52,40% NS	0,79 21,50% NS
A1.16 vs GS1.16	1,80E-02 98,20% *	0,69 31,50% NS	0,56 44,10% NS	0,13 86,70% NS	0,07 92,70% NS	0,52 48,10% NS

Tableau 2 : Résultats des tests Student sur les solutions de tannins goûtées seules. Les valeurs correspondent à la p-value (en haut), la différence (au milieu) et la significativité statistique de la différence (en bas).

NS (non significatif) : p-value ≥ 0.05 , pas de différence significative entre 2 échantillons ; * : $0.01 \leq p\text{-value} < 0.05$, différence significative avec une probabilité de 95% ; ** : $0.001 \leq p\text{-value} < 0.01$, différence significative avec une probabilité de 99% ; ***, p-value < 0.001 , différence significative avec une probabilité de 99%.

