



Interactions non-covalentes entre les polyphénols et les pectines : Etude sur un substrat modèle : la pomme

Aude Watrelot

► To cite this version:

Aude Watrelot. Interactions non-covalentes entre les polyphénols et les pectines : Etude sur un substrat modèle : la pomme. Agricultural sciences. Université d'Avignon, 2013. French. <NNT : 2013AVIG0656>. <tel-01086186>

HAL Id: tel-01086186

<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01086186>

Submitted on 23 Nov 2014

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



THESE

Présentée devant

L'UNIVERSITE D'AVIGNON ET DES PAYS DU VAUCLUSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR de L'UNIVERSITE D'AVIGNON ET DES PAYS DU VAUCLUSE

Mention : BIOCHIMIE

Par Aude WATRELOT

Interactions non-covalentes entre les polyphénols et les pectines.

Etude sur un substrat modèle : la pomme

Soutenue le 22 Novembre 2013 devant la comission d'Examen

M. Craig FAULDS	Professeur de l'Université Aix-Marseille	Président
M. Victor DE FREITAS	Professeur de l'Université Porto	Rapporteur
Mme Céline PONCET-LEGRAND	Chargé de Recherche, INRA-Montpellier	Rapporteur
M. Denis DEFFIEUX	Maître de Conférences de l'Université Bordeaux 1	Examineur
Mme Catherine RENARD	Directeur de Recherche, INRA-Avignon	Directrice de thèse
Mme Carine LE BOURVELLEC	Chargé de Recherche, INRA-Avignon	Co-encadrante

Remerciements

Ce travail de thèse a été réalisé dans le cadre du projet européen DREAM. Cette thèse a été effectuée à l'INRA d'Avignon, au sein du laboratoire de l'Unité Mixte de Recherche - Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale, dirigé par Catherine Renard, Directrice de Recherche, au Centre de Recherches sur les Macromolécules Végétales (CERMAV) de Grenoble au sein de l'équipe Glycobiologie moléculaire, dirigée par Anne Imberty, Directrice de Recherche, et à l'Institut Européen de Chimie et de Biologie (IECB) de Bordeaux, au sein de l'équipe Synthèse et Activité des Substances Naturelles, dirigée par Stéphane Quideau, Professeur de l'université de Bordeaux 1.

Je remercie sincèrement Madame Catherine Renard de m'avoir accueillie au sein de son unité et de m'avoir suivie tout au long de ce travail. Je la remercie d'avoir encadré ce travail, de m'avoir soutenue et de m'avoir apportée ses connaissances scientifiques et ses judicieux conseils.

Madame Carine Le Bourvellec a encadré ce travail de thèse. Je la remercie pour ses compétences, ses conseils, son suivi, ses corrections, son soutien, sa patience et pour tout le reste.

Je remercie sincèrement Monsieur Victor De Freitas, Professeur à l'université de Porto (Portugal) et Madame Céline Poncet-Legrand, Chargé de Recherche à l'INRA de Montpellier d'avoir accepté d'examiner ce travail de thèse en tant que rapporteurs.

Je remercie vivement Monsieur Craig Faulds, Professeur à l'université d'Aix-Marseille pour m'avoir fait l'honneur de présider ce jury de thèse.

Je remercie également Monsieur Denis Deffieux, Maître de conférences à l'université de Bordeaux 1 et je remercie à nouveau Madame Catherine Renard et Madame Carine Le Bourvellec d'avoir accepté d'examiner ce travail de thèse en tant qu'examinateurs.

Je remercie l'ensemble des membres du jury des comités de thèse, Monsieur Alain Baron et Monsieur Olivier Dangles qui m'ont aidé dans l'avancement et les démarches expérimentales de ce travail de thèse.

Je tiens à remercier Monsieur Stéphane Quideau et Monsieur Denis Deffieux pour leur rigueur, leurs conseils, leur soutien, leur aide et leur disponibilité tout au long des travaux de thèse effectués au sein de leur équipe, ainsi que pendant la période de rédaction.

Je tiens également à remercier Madame Anne Imberty pour ses précieux conseils, son aide, sa disponibilité et ses encouragements tout au long de ce travail de thèse.

Je remercie vivement Monsieur Carmelo Di Primo pour ses conseils et son aide précieuse lors des expériences de résonance plasmonique de surface.

Je remercie également Madame Emilie Gillon et Monsieur Aymeric Audfray pour leurs conseils, leurs disponibilités et leurs sympathies lors des expériences de microcalorimétrie.

Je tiens à remercier le projet DREAM d'avoir financé une partie de cette thèse et toutes les personnes impliquées. Merci Madame Caro Sautot d'avoir géré l'organisation de ce projet d'une main de maître, et merci pour les bons moments passés ensemble à chaque réunion de projet.

Mes remerciements vont également à tous les membres de l'équipe Glycobiologie moléculaire du CERMAV de Grenoble qui m'ont fait passé de bons moments tant d'un point de vue scientifique que d'un point de vue humain.

Mes remerciements sont également destinés à Mélanie Delannoy pour son aide en synthèse chimique et en résonance plasmonique de surface, ainsi qu'à Monsieur Laurent Pouységu et Rémi Jaquet. Un grand merci aux thésards et post-soc bordelais : Hélène, Cyril, Romain, Emilie, Tien, Mourad et Gloria avec qui j'ai passé de super bons moments et sans qui mes séjours à Bordeaux auraient été beaucoup moins beaux ! Merci à vous également pour l'aide précieuse que vous avez fourni à une biochimiste pour comprendre la partie de synthèse chimique ! Merci pour la mise à disposition du nouveau testament le midi et merci pour le foulard qui décore mon bureau (merci p'tit bigorneau !!)

Je souhaite également remercier toute l'unité SQPOV. Merci à toute l'équipe Microbiologie, à Juju pour son amitié, son soutien et sa gentillesse, à Stef pour sa gentillesse et pour avoir fait la nounou de titou, à Véro, Béné et tous les autres. Merci à l'équipe Chimie et MERCI à l'équipe Fruits ! Un énorme merci à Catherine et Carine de m'avoir accompagnée dans ce travail de thèse, ainsi qu'aux taties Sylvie, Sylvaine et Barbara pour leurs supers corrections d'orthographe de ce manuscrit : merci Sylvaine pour la règle de la virgule !! Merci à nouveau aux taties pour leur soutien et leur gentillesse à toute épreuve !! Merci à tonton David mon super collègue de congrès et de projet DREAM pour sa super bonne humeur et sa ténacité et

de m'avoir accompagné au risque de sa vie en Europe et surtout en Turquie !! Merci à papy Jean-François de m'avoir écrit des mots dans le cahier de labo, pour toutes ses blagues, pour sa bonne humeur, pour sa voix qui porte et pour ses petits yeux cruels!! Un énorme merci également à Patrice, mon super collègue de bureau avec qui le monde a été refait plus d'une fois le mercredi, pour son soutien psychologique, pour sa force d'esprit, pour sa bonne humeur, pour ses conseils et pour tout le reste...merci Pat !! Merci à ma ptite chouchou Aurélie d'être revenue au labo, pour tous les bons moments passés, pour ses expressions inventées, pour ses blagues pas toujours drôles, pour ses supers conseils de rédaction de thèse, pour son organisation à couper le souffle, pour avoir été la Centrale ainsi que pour les sessions d'escalade, et pour la méthode scout lors de la montée du Ventoux avec lapinou : merci à vous deux !! Je tiens à remercier Béatrice Barou de m'avoir prêté main forte pour quelques manips, Line pour sa disponibilité et pour son aide tout au long de la thèse, Christian pour sa connaissance et son aide sur les GC Marielle pour les sessions de lyoph, Caro pour l'organisation des réservations du spectro, Romain pour les bons moments passés et aux informaticiens Eric et Domi pour les problèmes de serveur ou de sessions.

Je tiens à remercier le meilleur, Nico, de m'avoir suivie, soutenue et supportée durant ces trois ans de thèse. Merci de m'avoir encouragée de près et de loin, de m'avoir remotivée aux moments où le moral n'était plus au beau fixe. Merci d'être passé au-delà de ma mauvaise humeur, merci de m'avoir recadré quand c'était nécessaire et merci de m'aimer. Je remercie également mes parents de m'avoir soutenue même si « la pharma aurait été différente » et d'être tout simplement mes parents.

Je tiens à avoir une pensée toute particulière pour ma super Granie qui m'a transmis son optimisme, sa joie de vivre et qui aurait été fière de moi.

Table des matières

Introduction	33
Travaux antérieurs	39
1. Paroi végétale	41
1.1. Définition	41
1.2. Composants de la paroi végétale	41
1.2.1. Extensine	42
1.2.2. Cellulose	42
1.2.3. Hémicelluloses.....	43
1.3. Pectines.....	44
1.3.1. Homogalacturonanes	45
1.3.2. Xylogalacturonanes	46
1.3.3. Rhamnogalacturonanes.....	47
1.3.3.1. Rhamnogalacturonane I (RG-I).....	47
1.3.3.2. Rhamnogalacturonane II (RG-II)	49
1.3.4. Propriétés gélifiantes	51
1.3.4.1. Gélification des pectines hautement méthylées.....	51
1.3.4.2. Gélification des pectines faiblement méthylées	52
1.4. Organisation structurale de la paroi végétale	52
1.5. Devenir et impact des fibres alimentaires dans l'organisme.....	55
2. Polyphénols	57
2.1. Classes de polyphénols.....	57
2.1.1. Composés non flavonoïdes	58
2.1.2. Composés flavonoïdes	58
2.1.2.1. Monomères de flavan-3-ols	59
2.1.2.2. Flavonols	60
2.1.2.3. Dihydrochalcones	61

2.2.	Anthocyanes	62
2.2.1.	Propriétés physiques	62
2.2.1.1.	Structure.....	62
2.2.1.2.	pH	64
2.2.1.3.	Réactivité chimique	65
2.2.1.3.1.	Copigmentation intermoléculaire	66
2.2.1.3.2.	Copigmentation intramoléculaire	66
2.2.1.3.3.	Pyranoanthocyanes	66
2.3.	Proanthocyanidines	67
2.3.1.	Structure.....	67
2.3.1.1.	Unités constitutives.....	69
2.3.1.2.	Liaisons interflavaniques	69
2.3.1.3.	Degré de polymérisation.....	71
2.3.2.	Propriétés chimiques.....	72
2.3.2.1.	Activité antioxydante.....	72
2.3.2.2.	Chélation des métaux.....	73
2.3.2.3.	Réactivité	73
2.4.	Devenir et impact dans l'organisme des tannins condensés	73
2.4.1.	Biodisponibilité	74
2.4.2.	Métabolisme	74
2.4.3.	Effets physiologiques	75
2.4.3.1.	Maladies cardiovasculaires	75
2.4.3.2.	Cancer	76
3.	Interactions entre macromolécules	77
3.1.	Méthodes d'analyse des interactions.....	77
3.2.	Interactions polyphénols-protéines	85
3.2.1.	Interactions non-covalentes	85

3.2.1.1.	Rappel sur les protéines	85
3.2.1.2.	Mécanismes d'interactions	86
3.2.1.3.	Influence de la structure et de la conformation des polyphénols	89
3.2.1.4.	Influence de la structure des protéines	92
3.2.1.5.	Influence des conditions externes.....	93
3.2.2.	Interactions covalentes	95
3.2.2.1.	Formation et réactivité des <i>ortho</i> -quinones	96
3.2.2.2.	Formation et réactivité des carbocations	98
3.3.	Interactions polyphénols-polysaccharides.....	98
3.3.1.	Interaction polyphénols-cyclodextrines.....	99
3.3.2.	Interactions polyphénols-polysaccharides de parois cellulaires.....	103
3.3.2.1.	Influence des polyphénols	103
3.3.2.2.	Influence des polysaccharides	105
3.3.2.3.	Mécanismes d'interactions	106
3.4.	Interactions polyphénols-protéines-polysaccharides.....	107
3.5.	Conséquences des interactions	109
3.5.1.	Conséquences technologiques	110
3.5.1.1.	Jus de pomme	110
3.5.1.2.	Vin	110
3.5.2.	Conséquences analytiques	111
3.5.3.	Conséquences nutritionnelles	111
3.5.3.1.	Effet des interactions polyphénols - protéines.....	111
3.5.3.2.	Effet des interactions polyphénols - polysaccharides.....	113
	Objectifs et démarche expérimentale	115
	Matériel et Méthodes.....	119
1.	Matériel	121
1.1.	Matériel végétal.....	121

1.2.	Réactifs et standards analytiques.....	121
2.	Préparation du matériel	123
2.1.	Polysaccharides	123
2.1.1.	Préparation des homogalacturonanes et des rhamnogalacturonanes	123
2.1.2.	Méthylation des homogalacturonanes (HG).....	125
2.1.3.	Extraction de rhamnogalacturonanes riches en arabinanes (AHR)	126
2.1.4.	Extraction des zones hérissées traitées à l'acide (HR-H)	126
2.2.	Polyphénols	127
2.2.1.	Extraction et purification des procyanidines	127
2.2.2.	Extraction et purification du dimère DP2.....	129
2.2.3.	Modification chimique des flavan-3-ols.....	131
2.2.3.1.	Groupement carboxylique sur noyau B	131
2.2.3.2.	Groupe thiol sur noyau B.....	134
3.	Méthodes analytiques	136
3.1.	Caractérisation des composés.....	136
3.1.1.	Dosage de l'acide galacturonique par colorimétrie	136
3.1.2.	Dosage de méthanol par GC-MS.....	137
3.1.3.	Dosage des oses neutres par GC-FID	138
3.1.4.	Détermination de la taille des fractions pectiques par HPSEC	140
3.1.5.	Dosage et quantification des composés phénoliques par HPLC-DAD	141
3.1.5.1.	Procyanidines.....	141
3.1.5.2.	Anthocyanes	143
3.1.6.	Caractérisation des molécules par résonance magnétique nucléaire (RMN)	144
3.2.	Caractérisation des interactions.....	144
3.2.1.	Absorbance UV-visible	144
3.2.2.	Fluorescence	148
3.2.3.	Calorimétrie de titration isotherme (ITC).....	149

3.2.4.	Résonance plasmonique de surface (RPS)	152
3.2.4.1.	Immobilisation de pectines ou de polyphénols-POH sur surface d'or ...	154
3.2.4.2.	Immobilisation de polyphénols-SH sur surface d'or	155
3.2.4.3.	Immobilisation de polyphénols -SH sur sensorchip CM5	156
3.2.5.	Vérification de la fixation des polyphénols sur une surface d'or par PM-IRRAS	157
4.	Méthodes statistiques	158
4.1.	Calcul de la précision des mesures.....	158
4.2.	ANOVA multifacteur	159
	Résultats et Discussion.....	161
1.	Caractérisation des molécules d'intérêt.....	163
1.1.	Pectines et fractions pectiques.....	163
1.2.	Anthocyanes de l'extrait de cassis	170
1.3.	Procyanidines	172
1.3.1.	Procyanidines extraites de parenchyme de pomme	172
1.3.2.	Procyanidines modifiées chimiquement	175
1.3.2.1.	Procyanidines avec un groupement carboxylique libre	176
1.3.2.2.	Procyanidines avec un thiol libre.....	178
1.4.	Conclusion.....	183
2.	Interactions entre anthocyanes et pectines	184
2.1.	Cinétiques d'absorbance	184
2.1.1.	Influence de la structure des anthocyanes	189
2.1.2.	Influence de la structure des fractions pectiques	189
2.2.	Spectres d'absorbance	190
2.2.1.	Influence de la structure des anthocyanes	195
2.2.2.	Influence de la structure des fractions pectiques	195
2.3.	Caractérisation des molécules restant en solution	197

2.3.1.	Anthocyanes	197
2.3.2.	Fractions pectiques	199
2.4.	Discussion	200
2.5.	Conclusion.....	202
3.	Interactions entre procyanidines et pectines en solution	204
3.1.	Suivi des interactions par spectroscopie de fluorescence.....	204
3.1.1.	Résultats.....	204
3.1.2.	Discussion.....	207
3.2.	Mise en évidence des interactions par spectrophotométrie	207
3.2.1.	Monomères de flavan-3-ols	208
3.2.2.	Procyanidines de DP9.....	209
3.2.2.1.	Pectines commerciales et homogalacturonanes.....	209
3.2.2.2.	Fractions pectiques de zones hérissées	212
3.2.3.	Procyanidines de DP30.....	213
3.2.3.1.	Pectines commerciales et homogalacturonanes.....	214
3.2.3.2.	Fractions pectiques de zones hérissées	216
3.2.4.	Analyse des surnageants par HPSEC et HPLC-DAD	217
3.2.4.1.	Coefficient de partition (ΔK_{av})	218
3.2.4.2.	Degré de polymérisation (ΔDP_n)	219
3.3.	Etude des interactions par calorimétrie de titration isotherme (ITC).....	220
3.3.1.	Monomères de flavan-3-ols et dimère B2	220
3.3.2.	Procyanidines DP9	222
3.3.2.1.	Pectines commerciales et homogalacturonanes.....	222
3.3.2.2.	Fractions pectiques de zones hérissées	223
3.3.3.	Procyanidines DP30	226
3.3.3.1.	Pectines commerciales et homogalacturonanes.....	226
3.3.3.2.	Fractions pectiques de zones hérissées	228

3.4.	Discussion : apports de la spectrophotométrie et de l'ITC	230
3.5.	Conclusion.....	233
4.	Interactions entre pectines-procyanidines-anthocyanes	234
4.1.	Interactions entre pectines commerciales de pomme - procyanidines DP30 - anthocyanes	235
4.1.1.	Pectines de pomme-procyanidines DP30- delphinidine glucoside à 520 nm.....	235
4.1.2.	Pectines de pomme - procyanidines DP30 - cyanidine glucoside à 520 nm	236
4.1.3.	Pectines de pomme - procyanidines DP30 - anthocyanes à 650 nm	237
4.1.4.	Discussion pectines-procyanidines-anthocyanes.....	238
4.2.	Interactions entre HG 30% - procyanidines DP30 - anthocyanes	240
4.2.1.	HG 30% - procyanidines DP30 - delphinidine glucoside à 520 nm.....	240
4.2.2.	HG 30% - procyanidines DP30 - cyanidine glucoside à 520 nm	241
4.2.3.	HG 30%-procyanidines DP30-anthocyanes à 650 nm	242
4.2.4.	Discussion HG 30% - procyanidines DP30 - anthocyanes.....	243
4.3.	Conclusion.....	244
5.	Interactions entre procyanidines et pectines sur support solide	246
5.1.	Immobilisation via un acide carboxylique sur une surface d'or	247
5.1.1.	Immobilisation des pectines	247
5.1.2.	Immobilisation des procyanidines par l'intermédiaire d'un groupement carboxylique	249
5.2.	Immobilisation via un groupement thiol sur une surface d'or	252
5.3.	Immobilisation via un groupement thiol sur une surface de carboxylméthyl-dextrane	258
5.4.	Comparaison des interactions obtenues avec les pectines et les protéines.....	259
5.5.	Discussion	263
5.6.	Conclusion.....	266
6.	Discussion générale.....	267
6.1.	Comparaison des méthodes d'analyse d'interactions.....	267

6.2. Mécanismes d'interactions	269
Conclusions et perspectives	271
Références bibliographiques	277
Annexes	331

Liste des abréviations

A

AcéA : Acide acérique

ACN : Acétonitrile

AFSSA : Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments

AG-I et AG-II : Arabinogalactanes de type I et de type II

AgNO₃ : Nitrate d'argent

AGPs : Arabinogalactane-protéines

AHR : Rhamnogalacturonanes riches en arabinanes

Ara : Arabinose

C

C3G : Cyanidine-3-O-glucoside et Cyanidine-3-O-rutinoside

CAT : (+)-catéchine

CD : Cyclodextrine

CERMAV : Centre de Recherche sur les Macromolécules Végétales

CH₂Cl₂ : Dichlorométhane

CQA : Acide caféoylquinique

CTCPA : Centre Technique de Conservation des Produits Agricoles

CTPC : Centre Technique des Productions Cidricoles

D

D₂O : Oxyde de deutérium

D3G et D3R : Delphinidine-3-O-glucoside et Delphinidine-3-O-rutinoside

DA : Degré d'acétylation

DC : Dichroïsme circulaire

Dha : Acide 3-déoxy-D-lyxo-2-heptulosarique

DIC : N, N'-diisopropylcarbodiimide

DLS : Diffusion dynamique de la lumière

DM : Degré de méthylation

DMAP : 4-diméthylaminopyridine

DMF : Diméthylfurane

DMSO : Diméthylsulfoxyde

DP : Degré de polymérisation

DPn : Degré de polymérisation moyen en nombre

E

EC : Ecartype

ECG : Epicatéchine gallate

ECp : Ecartype pondéré

EDC : 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide

EDTA : Acide éthylène diamine tétraacétique

EGC : Epigallocatechine

EGCG : Epigallocatechine gallate

EPI : (-)-épicatéchine

Et₃SH : Triéthylsilane

EtOH : Ethanol

F

FB : Formule brute

FI : Force ionique

Fuc : Fucose

G

Gal : Galactose

GalA : Acide galacturonique

GC-FID : Chromatographie gazeuse avec un détecteur à ionisation de flamme

GCG : Gallocatéchine gallate

GC-MS : Chromatographie gazeuse couplée à un spectromètre de masse

Glc : Glucose

H

H₂SO₄ : Acide sulfurique

HCl : Acide chlorhydrique

HEPES : Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique

HG : Homogalacturonanes

HM : Hautement méthylé

HPLC-DAD : Chromatographie liquide haute performance avec un détecteur à barrettes de diodes

HPSEC : Chromatographie d'exclusion stérique haute pression

HR : Zones hérissées

HR-H : Zones hérissées traitées à l'acide

Hyp : Hydroxyproline

I

IECB : Institut Européen de Chimie et de Biologie

INRA : Institut National de la Recherche Agronomique

ITC : Calorimétrie de titration isotherme

K

K_2CO_3 : Carbonate de potassium

K_a : Constante d'association

K_{av} : Coefficient de partition

K_{av} : Coefficient de partition

K_d : Constante de dissociation

K_{do} : Acide 2-béta-3-déoxy-D-mannose-octulosonique

L

LM : Faiblement méthylé

M

Man : Mannose

MCT : Tellerure de mercure-cadmium

MeI : Iodure de méthyle

MeOH : Methanol

MF : Matière fraîche

$MgSO_4$: Sulfate de magnésium

MHDP : m-hydroxydiphényle

MHR : Zones hérissées modifiées

MHz : Méga Hertz

MM : Masse molaire

MS : Matière sèche

N

n : Stoechiométrie

Na₂SO₄ : Sulfate de sodium

NaBH₄ : Borohydrure de sodium

NaCl : Chlorure de sodium

NaI : Iodure de sodium

NH₄OH : Ammoniaque

NHS : N-hydroxysuccimide

P

PCA : Procyanidines

PCQ : *Para*-coumaroylquinique

Pd/C : Palladium sur charbon actif

PDEA : chlorhydrate de 2-(2-pyridinyldithio) éthaneamine

PEM : Modulateur photoélastique

pH : potentiel hydrogène

PLZ : Phloridzine

PM-IRRAS : Polarization Modulation-Infrared Reflexion Absorption Spectroscopy

Ppm : Partie par million

PPO : Polyphénol oxydase

PRP : Protéine riche en proline

Q

QCM : Microbalance à cristale de quartz

R

R_f : Rapports frontaux

RG-I et RG-II : Rhanmogalacturonanes de type I et de type II

Rha : Rhamnose

RMN : Résonance magnétique nucléaire

ROS : Substances réactives à l'oxygène

Rpm : Rotations par minute

RPS : Résonance plasmonique de surface

RU : Unité de résonance

S

SAB : Sérum albumine bovine

SAH : Sérum albumine humaine

SAMs : Monocouches autoassemblées

SAXS : Small Angle X-ray Scattering

SDS : Dodécylsulfate de sodium

Ser : Sérine

SPE : Extraction en phase solide

T

TBA-OH : Hydroxyde n-tétraabutylammonium

tBuOH : tert-butanol

TFA : Acide trifluoroacétique

THF : Tétrahydrofurane

X

XPL : Xyloglucoside de phlorétine

Xyl : Xylose

ΔDP_n : Différence de degrés de polymérisation avant et après association

ΔG : Enthalpie libre

ΔH : Enthalpie

ΔK_{av} : Différence de coefficient de partition avant et après association

ΔS : Entropie

Liste des tableaux

Tableau I : Concentrations moyennes en monomères de flavan-3-ols dans la pomme à cidre (C) et de table (T).....	60
Tableau II : Exemple de concentrations en dihydrochalcones (mg/kg MF) dans la pomme...	62
Tableau III : Structure et longueur d'onde d'absorption maximale des anthocyanines.....	63
Tableau IV : Les différents types de proanthocyanidines. D'après Aron et Kennedy, 2008. ..	68
Tableau V : Techniques utilisées et données obtenues sur les analyses d'interactions entre les polyphénols et les protéines ou les polysaccharides (composés soulignés).....	80
Tableau VI : Combinaison d'analyses entre trois partenaires en fonction de leur concentration.	148
Tableau VII : Composition osidique en mg/g et coefficients de partition déterminés par HPSEC des pectines commerciales et des homogalacturonanes (HG).....	164
Tableau VIII : Composition osidique en mg/g et coefficients de partition déterminés par HPSEC des fractions de zones hérissées de pectines.....	168
Tableau IX : Composition en oses neutres (% moles) des fractions de RG-II monomère (mRG-II) et dimère (dRG-II) d'après Pellerin <i>et al.</i> (1996).....	170
Tableau X : Composition polyphénolique (mg/g de matière sèche (MS)) de la fraction DP2 extraite du parenchyme de la variété <i>Kermerrien</i> aux différentes étapes de purification.....	173
Tableau XI : Composition (mg/g de matière sèche (MS)) en polyphénols des fractions DP8, DP9 et DP30.....	174
Tableau XII : Attribution des déplacements chimiques des protons et des carbones par RMN de la (+)-catéchine couplé à un propiolate de benzyle (CAT-BnP).....	177
Tableau XIII : Attributions des déplacements chimiques des protons et des carbones par RMN de la (+)-catéchine comportant un groupement carboxylique libre.....	178
Tableau XIV: Attribution des déplacements chimiques des protons et des carbones par RMN de la (+)-catéchine couplée à un groupement trityle.....	180
Tableau XV : Attributions des déplacements chimiques des protons et des carbones par RMN de la (+)-catéchine comportant un groupement thiol libre.....	182
Tableau XVI : Constantes de vitesse k des diminutions d'absorbance à 520 nm obtenues pour les anthocyanes en présence des fractions pectiques à des concentrations de 3 et 30 mmol/L.	188

Tableau XVII : Différences de coefficients de partition (ΔK_{av}) des fractions pectiques et de degré de polymérisation (ΔDP_n) des procyanidines calculées dans les surnageants avant et après association entre les fractions pectiques et les procyanidines à 30 mmol/L d'acide galacturonique et de (-)-épicatéchine, respectivement, dans un tampon citrate/phosphate pH 3,8 et FI 0,1 mol/L.....	218
Tableau XVIII : Paramètres thermodynamiques de liaisons entre les pectines commerciales à 30 mmol/L (en équivalent acide galacturonique) et les procyanidines DP9 à 30 mmol/L (en équivalent (-)-épicatéchine) dans un tampon citrate/phosphate à pH 3,8 et FI 0,1 mol/L à 25°C.....	223
Tableau XIX : Paramètres thermodynamiques de liaisons entre les fractions pectiques de zones hérissées à 3,75 mmol/L (en équivalent acide galacturonique) et les procyanidines DP9 à 7,5 mmol/L (en équivalent (-)-épicatéchine), dans un tampon citrate/phosphate à pH 3,8 et FI 0,1 mol/L à 25°C.....	225
Tableau XX : Paramètres thermodynamiques de liaisons entre les pectines commerciales et les homogalacturonanes HG 30% à 30 mmol/L (en équivalent acide galacturonique) et les procyanidines DP30 à 30 mmol/L (en équivalent (-)-épicatéchine). HG 70%* : HG 70% à 3 mmol/L en équivalent acide galacturonique et les procyanidines DP30 à 60 mmol/L (en équivalent (-)-épicatéchine) dans un tampon citrate/phosphate à pH 3,8 et FI 0,1 mol/L à 25°C.....	227
Tableau XXI : Paramètres thermodynamiques de liaisons entre les fractions pectiques de zones hérissées et les procyanidines DP30 dans un tampon citrate/phosphate à pH 3,8 et FI 0,1 mol/L à 25°C.	229
Tableau XXII : Réponse RPS en unités de résonance observée entre les pectines commerciales de pomme de 3 nmol/L à 30 μ mol/L et les polyphénols immobilisés.	257
Tableau XXIII : Tableau récapitulatif des unités de résonance obtenues après interaction entre les ligands EPI ((-)-épicatéchine), DP2 (dimère DP2) et DP8 (procyanidine DP8) et les analytes à des concentrations de 3, 30 et 300 nmol/L.	263
Tableau XXIV : Avantages et inconvénients des méthodes utilisées pour l'étude des interactions entre les pectines et les procyanidines.	269

Liste des figures

Figure 1 : Monosaccharides retrouvés dans les parois végétales.	42
Figure 2 : Structure de la cellulose (http://www.papiergeschiedenis.nl/images/techniek/tech_stof_cellulose_01.gif).	43
Figure 3 : Structure schématique d'une molécule de pectine (Voragen <i>et al.</i> , 1995).	45
Figure 4 : Structure primaire de l'homogalacturonane (Combo <i>et al.</i> , 2011).	46
Figure 5 : Structure de la "egg-box" (Vincken <i>et al.</i> , 2003).	46
Figure 6 : Structure chimique de xylogalacturonane (Wong, 2008).	47
Figure 7 : Structure chimique du rhamnogalacturonane I (d'après O'Neill <i>et al.</i> , 1990).	48
Figure 8 : Structure chimique du rhamnogalacturonane II (http://www.uea.ac.uk/menu/acad_depts/cap/carbohydrate/projects/RGII.htm).	50
Figure 9 : Structure de dimère de rhamnogalacturonane II via la liaison borate diol	51
Figure 10 : Organisation structurale de la paroi végétale.	53
Figure 11 : Organisation structurale des composants de la paroi végétale.	54
Figure 12 : Schéma des connexions entre les composés polysaccharidiques de la paroi végétale (Zykwinska <i>et al.</i> , 2005). 1 et 3 : liaison d'une molécule de pectine avec une microfibrille de cellulose ; 2 : liaisons entre HG et Ca ²⁺	55
Figure 13 : Répartition des polyphénols dans les différentes zones tissulaires de la pomme. Adapté de Guyot <i>et al.</i> , 1998. Les pourcentages représentent la proportion de chaque classe présente dans cette zone tissulaire de la pomme, les données ayant été obtenues pour la variété <i>Kermerrien</i>	57
Figure 14 : Structure des acides hydroxycinnamiques.	58
Figure 15 : Structure des flavonoïdes.	59
Figure 16 : Structure des monomères de flavan-3-ols.	59
Figure 17 : Structure des flavonols.	60
Figure 18 : Structure des dihydrochalcones.	61
Figure 19 : Structure des anthocyanidines.	63
Figure 20 : Principales formes d'anthocyanes selon le pH. D'après De Villiers <i>et al.</i> , 2009. ...	64
Figure 21 : Equilibre de la malvidine-3-glucoside en milieu acide (Brouillard et Dubois, 1977).	65
Figure 22 : Réactivité chimique des anthocyanes.	65
Figure 23 : Exemple de tannin condensé.	67

Figure 24: Exemple de tannin hydrolysable.....	67
Figure 25 : Structure de base des procyanidines. D'après Guyot <i>et al.</i> , 1997.....	69
Figure 26 : Structure chimique des procyanidines B1 (1), B2 (4), B3 (5), B4 (6), B5 (8) et B6 (9), C1 (3) et d'un tétramère (2) (D'après Köhler <i>et al.</i> , 2008).....	71
Figure 27 : Mécanismes d'action des polyphénols contre les maladies cardiovasculaires. D'après Martin et Andriantsitohaina, 2002.	76
Figure 28 : Les différents mécanismes potentiels d'interactions entre polyphénols et protéines (D'après Le Bourvellec et Renard, 2012a).	87
Figure 29 : Structure chimique de la (-)-épicatéchine, de la (-)-épicatéchine gallate (ECG), de la épigallocatechine (EGC) et de la épigallocatechine gallate (EGCG) (D'après Coyle <i>et al.</i> , 2008).....	90
Figure 30 : Structure chimique d'ellagitannin par association de gallotannins (D'après Haslam, 2007).....	92
Figure 31 : Mécanismes d'interactions entre EGCG et IB5 en fonction du ratio polyphenol/protéine (Pascal <i>et al.</i> , 2007). Les cercles gris représentent les molécules d'EGCG, les lignes noires sont les protéines IB5 et les cercles blancs correspondent aux agrégats.....	94
Figure 32 : Réaction d'oxydation de composés phénoliques par des polyphénoloxydases.	96
Figure 33 : Réaction de dépolymérisation des procyanidines en milieu acide.	98
Figure 34 : Structure chimique des trois principales cyclodextrines.	99
Figure 35 : Structure possible d'un complexe d'inclusion entre l'EGCG et la β -cyclodextrine.	102
Figure 36 : Liaisons hydrogènes possibles entre un dimère de catéchine et un homogalacturonane (D'après Hanlin <i>et al.</i> , 2009).....	106
Figure 37 : Mécanismes possibles d'action des polysaccharides sur les complexes protéines-tannins. D'après Mateus <i>et al.</i> , 2004a. P=protéine, T=tannin et C=carbohydre. i) formation d'un complexe ternaire et ii) compétition entre les carbohydrates et les protéines.	109
Figure 38 : Schéma de la réaction de thioacidolyse, adaptée de Guyot <i>et al.</i> , 1998.....	142
Figure 39 : Schéma de dosage d'absorbance par microplaque.	147
Figure 40 : Microcalorimètre VP-ITC (Microcal) et le schéma de fonctionnement.....	150
Figure 41 : Thermogramme et courbe ajustée d'interaction entre pectines et procyanidines.	151
Figure 42 : Principe de fonctionnement de la résonance plasmonique de surface (RPS).....	153
Figure 43 : Sensorgramme RPS (Biacore, GE Healthcare).	153

Figure 44 : Spectres RMN ^1H 400MHz à 353 K de pectine commerciale de pomme et d'homogalacturonanes méthylés à 0, 30 et 70% solubilisés dans D_2O parès neutralisation à pH 6.....	166
Figure 45 : Chromatogrammes par HPSEC des pectines et des homogalacturonanes élués avec un tampon acide acétique/acétate de sodium pH 3,5 sur des colonnes OH-pack SB-802 HQ et TSK-gel GMPWxl à 35°C.....	167
Figure 46 : Chromatogramme à 520 nm de l'extrait de cassis élué par un gradient eau/acide acétique (97,5/2,5 v/v) et acétonitrile sur une colonne Lichrospher C18 à 30°C.	171
Figure 47 : Spectres RMN ^1H des fractions DP8, DP9 et DP30 dans MeOD- d_4 à 300MHz, 298K.....	175
Figure 48 : Modification chimique de la (-)-épicatechine par benzylolation et hydrogénéolyse pour l'obtention d'un groupement carboxylique libre.	176
Figure 49 : Spectres RMN ^1H 300MHz à 298K de la (+)-catéchine liée à un linker benzyle (CAT-BnP) et de la (+)-catéchine présentant un groupement carboxylique libre (CAT-POH).	177
Figure 50 : Modification chimique de la (+)-catéchine par un linker tritylé puis par détritylation pour l'otention d'un groupement thiol libre.....	178
Figure 51 : Spectre RMN ^1H 300MHz à 298K de la (+)-catéchine avec le linker trityle (CAT-STrt).	179
Figure 52 : Spectre RMN ^{13}C 300MHz à 298K de la (+)-catéchine avec le linker trityle (CAT-STrt).	180
Figure 53 : Spectre RMN ^1H 300MHz à 298K de la (+)-catéchine avec le groupement thiol libre (CAT-SH).	181
Figure 54 : Spectre RMN ^{13}C 300MHz à 298K de la (+)-catéchine avec le groupement thiol libre (CAT-SH).	182
Figure 55 : Cinétiques d'absorbance à 520 nm de la cyanidine glucoside et de la delphinidine glucoside en présence des fractions pectiques (pectines commerciales, homogalacturonanes et rhamnogalacturonanes) à 3 et 30 mmol/L pendant 300 ou 600 secondes.....	185
Figure 56 : Cinétiques d'absorbance à 520 nm de la cyanidine rutinoside et de la delphinidine rutinoside en présence des fractions pectiques (pectines commerciales, homogalacturonanes et rhamnogalacturonanes) à 3 et 30 mmol/L pendant 300 ou 600 secondes.....	186
Figure 57 : Cinétiques d'absorbance à 520nm de l'extrait de cassis en présence des fractions pectiques (pectines commerciales, homogalacturonanes et rhamnogalacturonanes) à 3 et 30 mmol/L pendant 300 ou 600 secondes.	187

Figure 58 : Spectres d'absorbance observés pour la cyanidine glucoside et la delphinidine glucoside en présence des fractions pectiques dans un tampon citrate/phosphate pH 3,8 FI 0,1 mol/L après 1 h.....	191
Figure 59 : Spectres d'absorbance observés pour la cyanidine rutinoside et la delphinidine rutinoside en présence des fractions pectiques dans un tampon citrate/phosphate pH 3,8 FI 0,1 mol/L après 1 h.....	192
Figure 60 : Spectres d'absorbance observés pour l'extrait de cassis en présence des fractions pectiques dans un tampon citrate/phosphate pH 3,8 FI 0,1 mol/L après 1 heure.....	193
Figure 61 : Effets hyperchrome et hypochrome à 520 nm du mélange anthocyane-fraction pectique préparé dans le tampon citrate/phosphate pH 3,8 FI 0,1 mol/L à 25°C.....	194
Figure 62 : Effets bathochrome et hypsochrome du mélange entre les anthocyanes et les fractions pectiques préparé dans un tampon citrate/phosphate pH 3,8 FI 0,1 mol/L à 25 °C.	194
Figure 63 : Concentrations résiduelles en anthocyanes après interactions avec les fractions pectiques retrouvées dans les surnageants, après analyse HPLC-DAD.....	197
Figure 64 : Concentrations résiduelles en anthocyanes de l'extrait de cassis après interactions avec les fractions pectiques retrouvées dans les surnageants, après analyse HPLC-DAD. ...	198
Figure 65 : Différence de coefficient de partition (ΔK_{av}) des surnageants issus des mélanges entre les anthocyanes et les fractions pectiques.	199
Figure 66 : Intensité maximale de fluorescence à 316 nm des monomères de flavan-3-ols (300 $\mu\text{mol/L}$) en présence des fractions pectiques (300 $\mu\text{mol/L}$ en équivalent acide galacturonique) mis en solution dans un tampon citrate/phosphate pH 3,8 FI 0,1 mol/L à 25°C; longueur d'onde d'excitation : 282 nm et un photomultiplicateur de 500 V.	205
Figure 67 : Intensité maximale de fluorescence à 316 nm des procyanidines DP9 et DP30 (300 $\mu\text{mol/L}$ en équivalent (-)-épicatéchine) en présence des fractions pectiques (30 $\mu\text{mol/L}$ en équivalent acide galacturonique) mises en solution dans un tampon citrate/phosphate pH 3,8 et FI 0,1 mol/L à 25°C ; longueur d'onde d'excitation : 282 nm et un photomultiplicateur de 500 V.	206
Figure 68 : Intensité maximale de fluorescence à 316 nm des procyanidines de DP9 et DP30 (300 $\mu\text{mol/L}$ en équivalent (-)-épicatéchine) en présence des zones hérissées de pectines (30 $\mu\text{mol/L}$ en équivalent acide galacturonique) mises en solution dans un tampon citrate/phosphate pH 3,8 et FI 0,1 mol/L à 25°C; longueur d'onde d'excitation : 282 nm et un photomultiplicateur de 500 V.....	206

Figure 69 : Spectres d'absorbance de 250 à 400 nm des fractions pectiques à différentes concentrations en présence de la (-)-épicatéchine à 30 mmol/L (a, b et c) ou en absence de la (-)-épicatéchine (d) mises en solution dans un tampon citrate/phosphate pH 3,8 et FI 0,1 mol/L à 25°C.	208
Figure 70 : Absorbance à 650 nm des mélanges entre les fractions pectiques et les procyanidines de DP9 à différentes concentrations préparées dans un tampon citrate/phosphate pH3,8 et FI 0,1 mol/L à 25°C.	210
Figure 71 : Photo d'un puits de microplaque contenant 30 mmol/L de HG 70% (en équivalent acide galacturonique) et 30 mmol/L de procyanidine DP9 (en équivalent (-)-épicatéchine) dans un tampon citrate/phosphate à pH 3,8 et FI 0,1 mol/L.	211
Figure 72 : Absorbance à 650 nm des mélanges entre les zones hérissées de pectines et les procyanidines DP9 préparées dans un tampon citrate/phosphate pH 3,8 et FI 0,1 mol/L à 25°C.....	212
Figure 73 : Absorbance à 650 nm des mélanges entre les fractions pectiques et les procyanidines de DP30 préparées dans un tampon citrate/phosphate pH 3,8 et FI 0,1 mol/L à 25°C.....	214
Figure 74 : Photo d'un puit de microplaque contenant 30 mmol/L de procyanidine DP30 (en équivalent (-)-épicatéchine) et 30 mmol/L de HG 70% (en équivalent acide galacturonique).	215
Figure 75 : Absorbance à 650 nm des mélanges entre les zones hérissées de pectines et les procyanidines DP30 préparées dans un tampon citrate/phosphate pH 3,8 et FI 0,1 mol/L à 25°C.....	216
Figure 76 : Thermogrammes de titration des pectines de pomme à 30 mmol/L (en équivalent acide galacturonique) par (a) la (-)-épicatéchine et (b) le dimère B2 à 30 mmol/L (en équivalent (-)-épicatéchine), dans un tampon citrate/phosphate à pH 3,8 et FI 0,1 mol/L à 25°C.....	221
Figure 77 : Thermogrammes de titration de (a) pectines de pomme et de (b) homogalacturonanes hautement méthylés (HG 70%) à 30 mmol/L (en équivalent acide galacturonique) par les procyanidines DP9 à 30 mmol/L (en équivalent (-)-épicatéchine), dans un tampon citrate/phosphate à pH 3,8 et FI 0,1 mol/L à 25°C.....	222
Figure 78 : Thermogrammes de titration des fractions (a) RG; (b) AHR; (c) MHR4 et (d) mRG-II à 3,75 mmol/L (en équivalent acide galacturonique) par les procyanidines DP9 à 7,5 mmol/L (en équivalent (-)-épicatéchine), dans un tampon citrate/phosphate à pH 3,8 et FI 0,1 mol/L à 25°C.	224

Figure 79 : Thermogrammes de titration de (a) pectines de pomme et de (b) HG 70% à 30 mmol/L (en équivalent acide galacturonique) par les procyanidines DP30 à 30 mmol/L (en équivalent (-)-épicatéchine) et (c) HG 70% à 3 mmol/L (en équivalent acide galacturonique) par les procyanidines DP30 à 60 mmol/L (en équivalent (-)-épicatéchine) dans un tampon citrate/phosphate à pH 3,8 et FI 0,1 mol/L à 25°C.....	226
Figure 80 : Thermogrammes de titration de (a) RG; (b) AHR; (c) MHR4 et (d) mRG-II à 3,75 mmol/L (en équivalent acide galacturonique) par les procyanidines DP30 à 7,5 mmol/L (en équivalent (-)-épicatéchine), dans un tampon citrate/phosphate à pH 3,8 et FI 0,1 mol/L à 25°C.....	228
Figure 81 : Absorbance à 520 nm du mélange ternaire entre les pectines commerciales de pomme à différentes concentrations, les procyanidines DP30 à différentes concentrations et la delphinidine-3-O-glucoside (D3G) à 3 mmol/L, après soustraction de l'absorbance du mélange binaire pectines-procyanidines correspondant.....	236
Figure 82 : Absorbance à 520 nm du mélange ternaire entre les pectines commerciales de pomme à différentes concentrations, les procyanidines DP30 à différentes concentrations et la cyanidine-3-O-glucoside (C3G) à 3 mmol/L après soustraction de l'absorbance du mélange binaire pectines-procyanidines correspondant.	237
Figure 83 : Absorbance à 650 nm du mélange ternaire entre les pectines commerciales de pomme à différentes concentrations, les procyanidines DP30 à différentes concentrations et la cyanidine ou la delphinidine glucosides (C3G et D3G) à 3 mmol/L corrigée des absorbances du mélange binaire procyanidines-pectines.	238
Figure 84 : Absorbance à 520 nm du mélange ternaire entre les homogalacturonanes faiblement méthylés (HG 30%) à différentes concentrations, les procyanidines DP30 à différentes concentrations et la delphinidine-3-glucoside (D3G) à 3 mmol/L, après correction de l'absorbance du mélange binaire HG 30% - procyanidines DP30 correspondant.	241
Figure 85 : Absorbance à 520 nm du mélange ternaire entre les homogalacturonanes faiblement méthylés (HG 30%) à différentes concentrations, les procyanidines DP30 à différentes concentrations et la cyanidine-3-glucoside (D3G) à 3 mmol/L, après correction de l'absorbance du mélange binaire HG 30% - procyanidines DP30 correspondant.	242
Figure 86 : Absorbance à 650 nm du mélange ternaire entre les homogalacturonanes faiblement méthylés (HG 30%) à différentes concentrations en présence de différentes concentrations de procyanidines DP30 et de cyanidine et de delphinidine glucosides (C3G et D3G) à 3 mmol/L corrigée de l'absorbance du mélange binaire HG 30%-procyanidines DP30.	243

Figure 87 : Schéma hypothétique des mécanismes d'associations entre les procyanidines DP30 et les pectines de pomme et la delphinidine glucoside ou les homogalacturonanes faiblement méthylés et la cyanidine glucoside.....	245
Figure 88 : Schéma hypothétique des mécanismes d'associations entre les procyanidines DP30 et les pectines de pomme et la cyanidine glucoside ou les homogalacturonanes faiblement méthylés et la delphinidine glucoside.	245
Figure 89 : Schéma d'immobilisation de la pectine commerciale de pomme sur une surface d'or par l'intermédiaire d'un acide thioglycolique et d'une diamine.	247
Figure 90 : Sensorgramme d'interactions entre les procyanidines DP9 à 15 nmol/L (en équivalent (-)-épicatéchine) et les pectines (pistes 2 rouge (208 RU), 3 bleu (604 RU) et 4 vert (610 RU)) et la diamine (piste 1 gris) réalisé dans un tampon citrate/phosphate pH 3,8 FI 0,1M à 25°C.	248
Figure 91 : Schéma d'immobilisation de la (+)-catéchine présentant un groupement carboxylique libre (CAT-POH) sur une surface d'or par l'intermédiaire d'un acide thioglycolique et d'une diamine.....	250
Figure 92 : Structure chimique de a) l'acide thioglycolique, b) la diamine et c) la procyanidine DP9 immobilisés sur trois surfaces d'or.	252
Figure 93 : Spectres ATR et PM-IRRAS des polyphénols seuls ou immobilisés sur une surface d'or respectivement.....	253
Figure 94 : Structure chimique de la (+)-catéchine modifiée par le linker -SH sur le catéchol, pour l'immobilisation sur une surface d'or (rectangle).....	254
Figure 95 : Immobilisation de la catéchine-SH sur une surface d'or par RPS via un tampon HEPES à 25°C.....	255
Figure 96 : Sensorgramme d'interaction entre la sérum albumine bovine (SAB) à 10 µmol/L et la (-)-épicatéchine (89 RU piste 2-1 rouge), le dimère DP2 (72 RU piste 3-1 vert) et la procyanidine DP8 (81 RU piste 4-1 bleu), dans un tampon HEPES à 25°C.	256
Figure 97 : Sensorgramme d'interaction entre les pectines de pomme à 3, 30, 300 nmol/L, 3 et 30 µmol/L et la (-)-épicatéchine (piste 2-1), le dimère DP2 (piste 3-1) et la procyanidine DP8 (piste 4-1), dans un tampon HEPES à 25°C.....	257
Figure 98 : Sensorgramme d'interaction entre la PRP IB5 à 3, 30 et 300 nmol/L avec la (-)-épicatéchine (piste 2-1 rouge), le dimère DP2 (piste 3-1 vert) et la procyanidine DP8 (piste 4-1 bleu), dans un tampon HEPES à 25°C.	259

Figure 99 : Sensorgramme d'interactions entre la pectine commerciale de pomme à 3, 30 et 300 nmol/L et la (-)-épicatéchine (piste 2-1 rouge), le dimère DP2 (piste 3-1 vert) et la procyanidine DP8 (piste 4-1 bleu) dans un tampon HEPES à 25°C.....	260
Figure 100 : Sensorgramme d'interactions entre la pectine d'agrume à 30 nmol/L et la (-)-épicatéchine (piste 2-1 rouge), le dimère DP2 (piste 3-1 vert) et la procyanidine DP8 (piste 4-1 bleu), dans un tampon HEPES à 25°C.	260
Figure 101 : Sensorgramme d'interactions entre la SAB à 3 nmol/L et la (-)-épicatéchine (piste 2-1 rouge), le dimère DP2 (piste 3-1 vert) et la procyanidine DP8 (piste 4-1 bleu), dans un tampon HEPES à 25°C.....	261
Figure 102 : Sensorgramme d'interactions entre la SAB à 30 nmol/L et la (-)-épicatéchine (piste 2-1 rouge), le dimère DP2 (piste 3-1 vert) et la procyanidine DP8 (piste 4-1 bleu), dans un tampon HEPES à 25°C.....	261
Figure 103 : Sensorgramme d'interactions entre la poly-L-proline à 30 nmol/L et la (-)-épicatéchine (piste 2-1 rouge), le dimère DP2 (piste 3-1 vert) et la procyanidine DP8 (piste 4-1 bleu), dans un tampon HEPES à 25°C.	262

Liste des schémas

Schéma 1 : Préparation du propiolate de benzyle.	132
Schéma 2 : Protection du catéchol de la (+)-catéchine.	132
Schéma 3 : Réaction d'hydrogénolyse de la catéchine benzylée.....	133
Schéma 4 : Réaction de modification du catéchol de la catéchine par le linker -STrt.....	134
Schéma 5 : Réaction de détritulation.....	135

Introduction

Les aliments sont des objets très complexes. Leur composition est bien connue, en revanche leur structure l'est moins. Pour comprendre les bienfaits des aliments sur le corps humain, les relations entre les nutriments et la structure sont essentielles, particulièrement au cours des procédés de transformation. Dans ce cadre, le projet européen Design and Development of REAListic food Models (DREAM) a pour objectifs d'améliorer les connaissances sur les relations procédés-fonctionnalités, en étudiant d'une part les aliments modèles de l'échelle moléculaire à l'échelle macroscopique, et d'autre part en développant des modèles d'aliments permettant de mimer les résultats obtenus précédemment et pouvant être utilisés par des industriels. Le projet DREAM est organisé en différents groupes de travail correspondants aux modèles d'aliments majeurs : les modèles de type réseau de fibres protéiques (les viandes), les modèles combinés de type gels/émulsions/mousses (les produits laitiers), les modèles de type mousse solide (produits céréaliers) et les modèles de type solides cellulaires remplis (les fruits et légumes).

Ma thèse s'inscrit dans ce projet européen par l'étude des relations entre la composition en nutriments et la structure des fruits et légumes afin de comprendre ce qui contrôle la bioaccessibilité et la biodisponibilité des micronutriments antioxydants tels que les polyphénols. L'objectif de ma thèse est donc de comprendre quels sont les mécanismes qui régissent la diffusibilité des polyphénols, préalable à la biodisponibilité, à partir des tissus végétaux.

Comme il sera expliqué dans la partie « travaux antérieurs », la diffusibilité des polyphénols est limitée par leurs interactions avec les parois végétales, et en particulier du fait d'interactions entre les procyanidines et les pectines. En revanche, les mécanismes d'interactions de ces deux composés demeurent inconnus.

Afin de définir quelles structures et conformations des deux composés interviennent sur la limitation de la diffusibilité des polyphénols, deux types de polyphénols ont été utilisés du fait de leur importance dans les fruits et légumes : les procyanidines (tannins condensés) et les anthocyanes (responsables de la couleur des fruits et légumes).

Ma thèse s'articule en deux grandes parties : la préparation et la caractérisation des molécules d'intérêt par des méthodes biochimiques, et l'analyse des interactions entre ces composés par diverses méthodes physico-chimiques en solution ou sur support solide.

Les étapes de ma thèse ont été réalisées dans trois laboratoires :

- Les molécules d'intérêt ont été préparées et les analyses d'interactions en solution entre les polyphénols et les pectines ont été réalisées par spectrophotométrie UV-visible, fluorescence, chromatographie liquide à haute performance avec un détecteur à barrette de diode (HPLC-DAD) et chromatographie d'exclusion stérique (HPSEC), à l'INRA d'Avignon dans l'équipe « Qualité et Procédés » de l'UMR408 SQPOV dirigée par le Dr. Catherine Renard.
- Les analyses d'interactions en solution par calorimétrie de titration isotherme ont été réalisées au Centre de Recherches sur les Macromolécules Végétales (CERMAV) de Grenoble dans l'équipe « Glycobiologie moléculaire » dirigée par le Dr. Anne Imberty, et ont fait l'objet d'un séjour de 2 mois.
- Les modifications chimiques des procyanidines et les analyses d'interactions sur support solide ont été réalisées à l'Institut Européen de Chimie et de Biologie (IECB) de Bordeaux dans l'équipe « Synthèse et activité de substances naturelles » dirigée par le Pr. Stéphane Quideau. Cette dernière partie de ma thèse a fait l'objet d'un séjour de 6 mois et demi.

Mon travail de thèse a donc consisté en l'étude des mécanismes d'interactions entre les pectines et les polyphénols provenant d'un fruit modèle, la pomme. Dans une première partie, une synthèse bibliographique présente les travaux antérieurs concernant les composés d'intérêt : les pectines et les polyphénols, ainsi que les analyses d'interactions entre les polyphénols et les macromolécules. Dans une deuxième partie, la démarche expérimentale qui comporte le matériel et les méthodes d'analyses adoptées pour cette étude est exposée. Dans une troisième partie, les résultats expérimentaux sont détaillés en plusieurs sections selon les molécules et les techniques d'analyses utilisées. Enfin, une dernière partie est consacrée à la conclusion générale et aux perspectives.

Valorisation des travaux

Le travail réalisé durant cette thèse a fait l'objet de publications, de communications orales et par affiche.

Publications :

WatreLOT A.A., Le Bourvellec C., Imberty A., Renard C.M.G.C. Neutral sugars side chains of pectins limit interactions with procyanidins. *Carbohydrate Polymers* (2014) 99, 527-536.

WatreLOT A.A., Le Bourvellec C., Imberty A., Renard C.M.G.C. Interactions between pectic compounds and procyanidins are influenced by methylation degree and chain length. *Biomacromolecules* (2013) 14 (3), 709-718.

Le Bourvellec C., **WatreLOT A.A.**, Ginies C., Imberty A., Renard C.M.G.C. Impact of processing on the noncovalent interactions between procyanidin and apple cell wall. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (2012) 60 (37), 9484-9494.

Communications orales à des congrès internationaux:

WatreLOT A.A., Le Bourvellec C., Imberty A., Renard C.M.G.C. Impact of procyanidins and pectins structures on their interactions. International Congress on Polyphenols, 23-27 Juillet 2012, Florence, Italie.

Réunion de projet DREAM, 15-16 Octobre 2013, Bari, Italie

Réunion de projet DREAM, 24-26 Avril 2012, Budapest, Hongrie

Réunion de projet DREAM, 17-19 Mai 2011, Ljubljana, Slovénie

Communications orales à des congrès nationaux:

WatreLOT A.A., Le Bourvellec C., Imberty A., Renard C.M.G.C. Mécanismes d'interactions entre pectines et procyanidines. Journée INRA projet DREAM, 13 Décembre 2012, Nantes, France.

WatreLOT A.A., Le Bourvellec C., Imberty A., Renard C.M.G.C. Interactions pectines-procyanidines par microcalorimétrie. Journée Microcalorimétrie Sud-France, 14 Juin 2012, Lyon, France.

Communications par posters à des congrès internationaux:

WatreLOT A.A., Kebe M., Le Bourvellec C., Imberty A., Maingonnat J.-F., Renard C.M.G.C. Retention of procyanidins by apple cell walls limits their diffusion ? The DREAM project international conference, 24-26 Juin 2013 Nantes, France.

WatreLOT A.A., Le Bourvellec C., Imberty A., Renard C.M.G.C. Analysis of interactions between procyanidins and pectins by microcalorimetry. EuroFood Chem, 7-10 Mai 2013, Istanbul, Turquie.

WatreLOT A.A., Le Bourvellec C., Dangles O., Renard C.M.G.C. Stabilisation of anthocyanin colour by pectins. EFFoST, 20-23 Novembre 2012, Montpellier, France.

WatreLOT A.A., Le Bourvellec C., Renard C.M.G.C. Interactions between pectins and procyanidins: consequences of heat treatment. 1st Euro-Mediterranean Symposium on Fruit and Vegetable Processing, 18-21 Avril 2011, Avignon, France.

Communications par posters à des congrès nationaux :

Tran D.T., Delannoy D.M., **WatreLOT A.A.**, Deffieux D., Quideau S. Synthèse de dérivés polyphénoliques pour étudier les interactions Polyphénol-Protéine par la technique de Résonance Plasmonique de Surface (RPS). Journée scientifique de l'ISM, 5 Juillet 2013, Talence, France.

Travaux antérieurs

Dans cette partie, je vais décrire les différents composés de la paroi cellulaire végétale, plus particulièrement les pectines puis les polyphénols en détaillant les anthocyanes et les procyanidines de la pomme, qui sont les deux composés polyphénoliques utilisés lors de cette thèse. Je terminerai cette analyse des travaux antérieurs par la présentation des interactions entre les polyphénols et les protéines, entre les polyphénols et les polysaccharides et par quelques publications réalisées sur les interactions entre les polyphénols, les protéines et les polysaccharides.

1. Paroi végétale

Cette partie comporte la description des constituants de la paroi végétale avec une focalisation particulière sur les pectines. L'organisation structurale de la paroi végétale est ensuite expliquée, pour terminer sur le métabolisme des fibres alimentaires en relation avec leurs effets sur la santé.

1.1. Définition

Les cellules végétales sont caractérisées par les métabolites contenus dans leur cytoplasme mais aussi par la matrice extracellulaire qui entoure ces éléments. La paroi végétale est responsable de la rigidité des cellules, de la protection de leurs organites et du maintien de la cellule et de la plante.

1.2. Composants de la paroi végétale

La paroi végétale est une structure dynamique formée de divers composés non polysaccharidiques comme des protéines (notamment l'extensine et les enzymes) et des composés mineurs (acides phénoliques et minéraux), mais surtout par des polysaccharides, polymères de sucres (Figure 1), regroupant la cellulose, les hémicelluloses et les pectines.

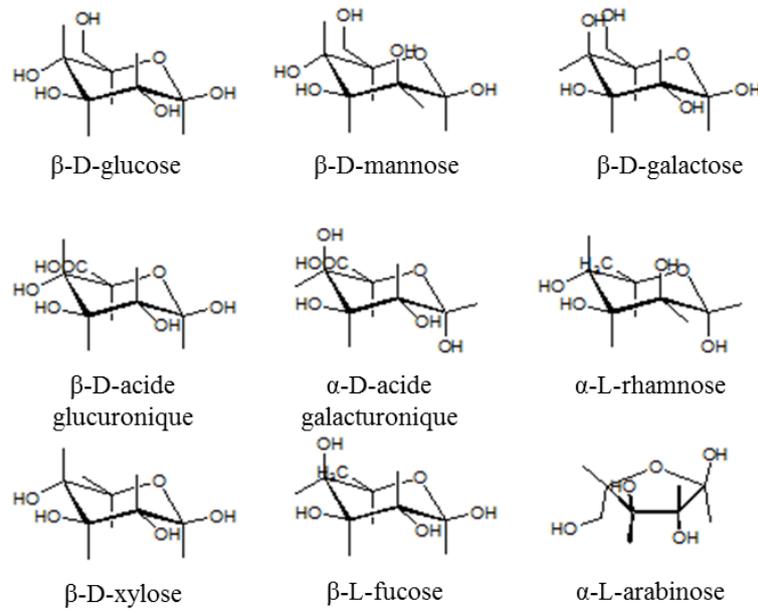


Figure 1 : Monosaccharides retrouvés dans les parois végétales.

1.2.1. Extensine

L'extensine est une glycoprotéine fortement basique, intervenant dans la structure des parois primaires. Elle est caractérisée par une séquence répétée de Ser-Hyp-Hyp-Hyp-Hyp portant de 50 à 60% de carbohydrates en chaîne latérale. Les hydroxyprolines sont glycosylées par des résidus d'arabinose liés par des liaisons β (1 \rightarrow 2), excepté l'arabinose terminal qui est lié en β (1 \rightarrow 3), tandis que la sérine porte un résidu de galactose (Holst *et al.*, 1984 ; Lamport *et al.*, 1971 ; Lamport *et al.*, 2011).

Ces protéines structurales interagissent via des forces électrostatiques avec les homogalacturonanes (zone lisse des pectines), entraînant la gélification des pectines (Mac Dougall *et al.*, 2001) et présentant un rôle dans l'expansion cellulaire (Mc Neil *et al.*, 1984).

1.2.2. Cellulose

La cellulose est un biopolymère insoluble, le plus impliqué dans le réseau de la paroi primaire et secondaire. Elle est constituée d'un enchaînement linéaire de résidus de β -D-glucose liés en β (1 \rightarrow 4), s'associant spontanément avec d'autres molécules de cellulose par des liaisons hydrogènes ou des forces de Van der Waals (Kroon-Batenburg et Kroon, 1997 ; Nishiyama *et al.*, 2002).

Dans la cellule, les deux molécules de glucose consécutives s'orientent l'une par rapport à l'autre selon une rotation de 180°, formant l'unité constitutive de base, le cellobiose. L'enchaînement des unités de cellobiose forme de longs polymères de cellulose, qui s'associent par des liaisons non covalentes pour former les microfibrilles de cellulose (Figure 2) (Malcom Brown *et al.*, 1996).

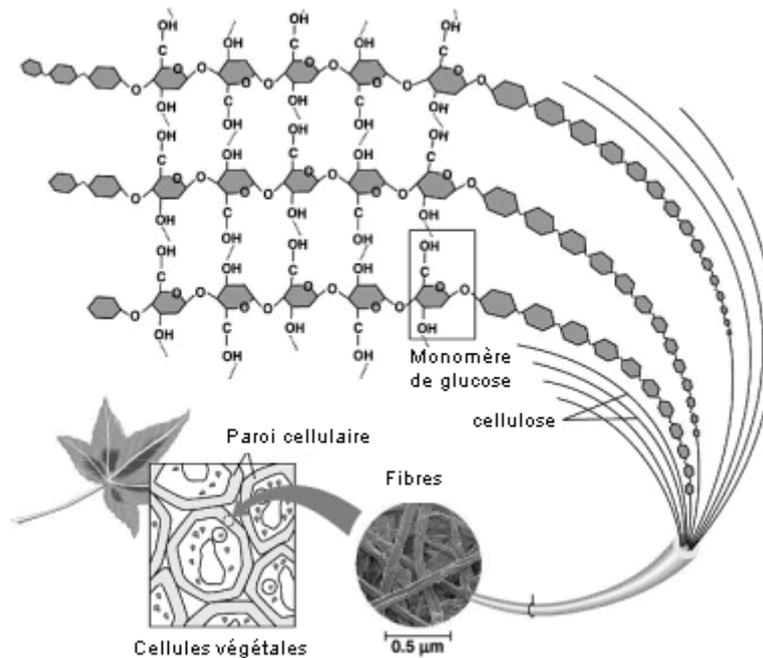


Figure 2 : Structure de la cellulose

(http://www.papiergeschiedenis.nl/images/techniek/tech_stof_cellulose_01.gif).

Les chaînes de cellulose peuvent être orientées de manière parallèle (de type I) ou antiparallèle (de type II) les unes par rapport aux autres. Dans le matériel végétal, les microfibrilles de cellulose sont de type I et comportent des chaînes de cellulose dans deux conformations, de type Ia ou Ib. Ces microfibrilles ont des diamètres variant de 2 à 15 nm (Ha *et al.*, 1998) et sont séparées les unes des autres de 20 à 40 nm (McCann *et al.*, 1990).

1.2.3. Hémicelluloses

Les hémicelluloses sont des polymères extractibles par des solvants alcalins et caractérisés par un squelette de résidus pyranosyls liés en (1→4). La structure des hémicelluloses est en « écouvillon » avec un squelette étendu, capable de se lier à la cellulose via des liaisons

hydrogènes (Keegstra *et al.*, 1973) et des chaînes latérales courtes. Les xylanes, mannanes et xyloglucanes sont les principales hémicelluloses.

- Les xylanes sont des chaînes linéaires de β -D-xylose portant des groupements acétyles sur les positions O-2 ou O-3 (Darvill *et al.*, 1980). Cette catégorie d'hémicellulose regroupe les arabinoxylanes (des résidus arabinose sont portés sur la position O-3 ou O-2 du xylose), les glucuronoarabinoxylanes et les glucuronoxylanes.
- Les mannanes peuvent avoir un squelette de D-mannose en β (1 \rightarrow 4) ou un squelette de D-mannose et de D-glucose également liés en β (1 \rightarrow 4). Ils sont alors appelés glucomannanes. Ces deux types de mannanes peuvent être substitués en α (1 \rightarrow 6) par des résidus de D-galactose et on parle alors de galactomannanes. Un troisième type de mannane appelé galactoglucomannane (copolymère ramifié présentant des résidus de β -D-glucose liés en (1 \rightarrow 4) et des galactomannanes) peut également être présent dans la nature (Dey et Brinson, 1984).
- Les xyloglucanes sont les hémicelluloses les plus abondantes dans la paroi primaire des dicotylédones. Leur structure de base est la même que la cellulose, c'est-à-dire qu'ils sont constitués de chaînes de β -D-glucose liées en (1 \rightarrow 4), mais ils possèdent en plus des résidus de α -D-xylose liés en (1 \rightarrow 6) aux résidus de glucose (Fry, 1988).

L'hémicellulose majoritaire de la paroi de pomme est un fucogalactoxyloglucane (Renard *et al.*, 1991).

1.3. Pectines

Les pectines sont des polysaccharides complexes qui peuvent être extraits de la paroi par de l'eau chaude, des acides dilués ou des chélateurs de calcium. Elles sont présentes dans la lamelle moyenne et la paroi primaire des cellules végétales. Ce sont des polysaccharides caractérisés par un squelette d'acide α -D-galacturonique et de faibles quantités de α -L-rhamnose plus ou moins ramifiés (Ridley *et al.*, 2001). Le modèle généralement accepté décrit les pectines comme un enchaînement de deux structures majoritaires, présentant une chaîne principale homogalacturonique (zone lisse nommée HG) et une chaîne rhamnogalacturonique (zone hérissée nommée RG) présentant des ramifications (Figure 3) (De Vries *et al.*, 1982).

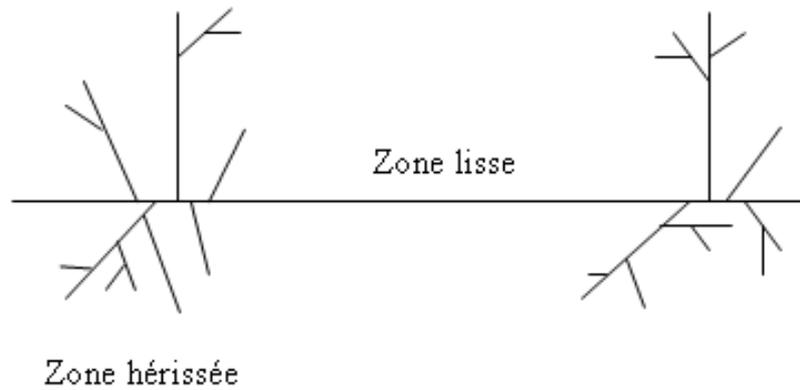


Figure 3 : Structure schématique d'une molécule de pectine (Voragen *et al.*, 1995).

1.3.1. Homogalacturonanes

Les homogalacturonanes sont la principale chaîne qui compose les pectines (représentant plus de 60% des pectines) (O'Neill *et al.*, 1990) et sont également appelés « zone lisse ». Ce sont des polymères d'acide α -D-galacturonique liés en (1→4). La longueur de ces chaînes peut aller de 70 à 100 résidus d'acide galacturonique dans le citron, la betterave sucrière ou dans la pomme (Thibault *et al.*, 1993), c'est-à-dire présentant des masses molaires de l'ordre 12 à 20 kDa.

Les acides α -D-galacturonique peuvent être sous forme acide ou être estérifiés par du méthanol en C6 et/ou par de l'acide acétique en O-2 et /ou O-3 (Voragen *et al.*, 2009). En fonction de ces estérifications, les pectines sont caractérisées par un degré de méthylation (DM) et un degré d'acétylation (DA) qui correspond au rapport des acides galacturoniques estérifiés (méthylés ou acétylés) sur les acides galacturoniques totaux (Figure 4). D'un point de vue fonctionnel, on distingue trois catégories de pectines :

- Les acides pectiques possèdent un degré de méthylation inférieur à 5% (DM<5)
- Les pectines faiblement méthylées (LM) présentent un degré de méthylation inférieur à 50% (DM<50).
- Les pectines hautement méthylées (HM) présentent un degré de méthylation supérieur à 50% (DM>50).

Le degré d'estérification des pectines a un impact sur la flexibilité de la molécule : plus le degré d'estérification est faible, plus la pectine est rigide (Morris *et al.*, 2000). Dans les parois végétales, les pectines sont généralement hautement méthylées. Ainsi, dans la betterave

sucrière et la pomme, des DM de 70 à 80% sont rapportés (Morris *et al.*, 2010 ; Renard et Jarvis 1999a ; Krall et McFeeters, 1998).

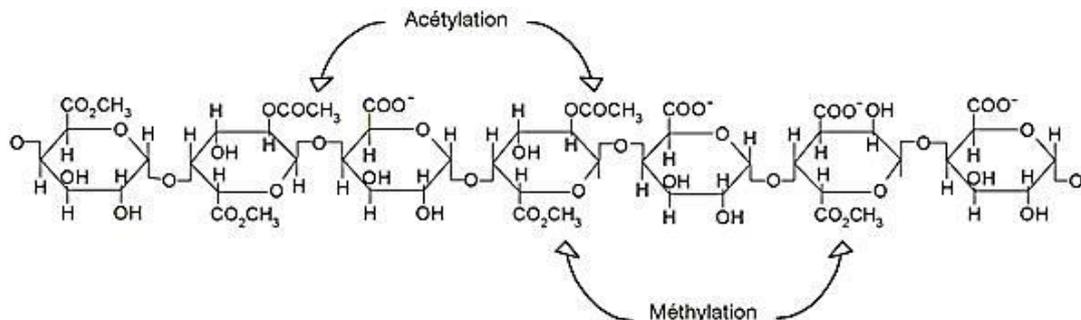


Figure 4 : Structure primaire de l'homogalacturonane (Combo *et al.*, 2011).

Selon le pH, les fonctions carboxyliques en C6 des acides galacturoniques non méthylés peuvent être protonées (en milieu acide) ou chargées négativement. Dans ce cas, elles sont neutralisées par des cations tels que K^+ , Na^+ ou Ca^{2+} . Le calcium est capable d'interagir par des forces ioniques avec les chaînes d'acides galacturoniques déméthylées de deux molécules de pectines (Garnier *et al.*, 1993 ; Braccini *et al.*, 2001 ; Cybulska *et al.*, 2011) formant ainsi un gel stable selon le mécanisme appelé « egg-box » (Liners *et al.*, 1989).

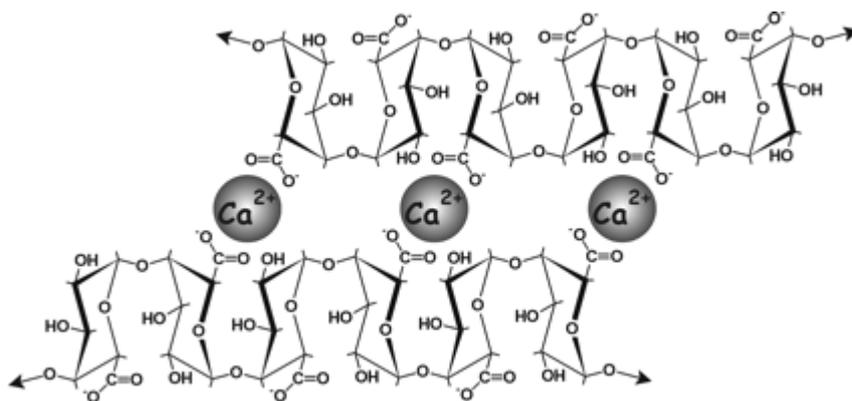


Figure 5 : Structure de la "egg-box" (Vincken *et al.*, 2003).

1.3.2. Xylogalacturonanes

Les homogalacturonanes peuvent également être substitués par des unités simples de β -D-xylose lié sur le C3 des acides galacturoniques. Ces zones sont appelées xylogalacturonanes

(Figure 6). Dans la pomme, ces liaisons sont regroupées dans des zones spécifiques des homogalacturonanes qui présentent des degrés de substitution de l'ordre de 75% (Schols *et al.*, 1995a).

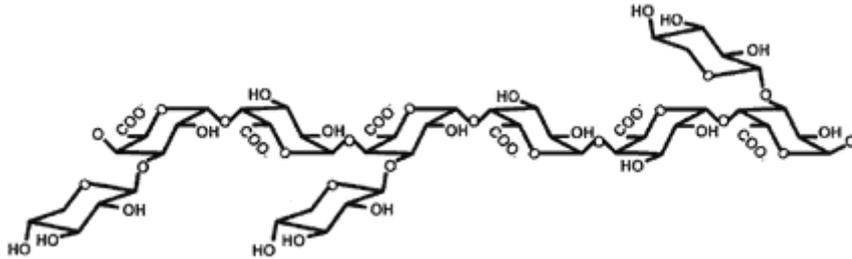


Figure 6 : Structure chimique de xylogalacturonane (Wong, 2008).

1.3.3. Rhamnogalacturonanes

1.3.3.1. Rhamnogalacturonane I (RG-I)

Les rhamnogalacturonanes de type I représentent de 20 à 30% des pectines de la paroi. Leur squelette consiste en un enchaînement de résidus d'acide α -D-galacturonique liés en (1→4) et de résidus de α -L-rhamnose liés en (1→2) (Lau *et al.*, 1985). Généralement, seuls les résidus de rhamnose sont substitués par des chaînes latérales d'oses neutres de différentes tailles (de monomère à polymère) et de différents types (Figure 7) (Yapo, 2011). Cependant, les galacturonyles peuvent être acétylés en O-2 ou O-3 (Komalavilas et Mort, 1989) ou substitués par de l'acide glucuronique en O-3 (Renard *et al.*, 1999b). Les chaînes majoritaires sont des α -L-arabinanes, β -D-galactanes et des arabinogalactanes de type I ou de type II (O'Neill *et al.*, 1990, De Vries *et al.*, 1982, Thibault *et al.*, 1993). Ces chaînes sont liées sur le squelette rhamnogalacturonique par le C4 de façon majoritaire ou par le C3 du résidu de rhamnose (Lau *et al.*, 1985). De plus, dans quelques familles botaniques (Chenopodiacees), des acides phénoliques (principalement l'acide férulique) estérifient certains résidus α -L-arabinose ou β -D-galactose des chaînes latérales (Oosterveld *et al.*, 2000).

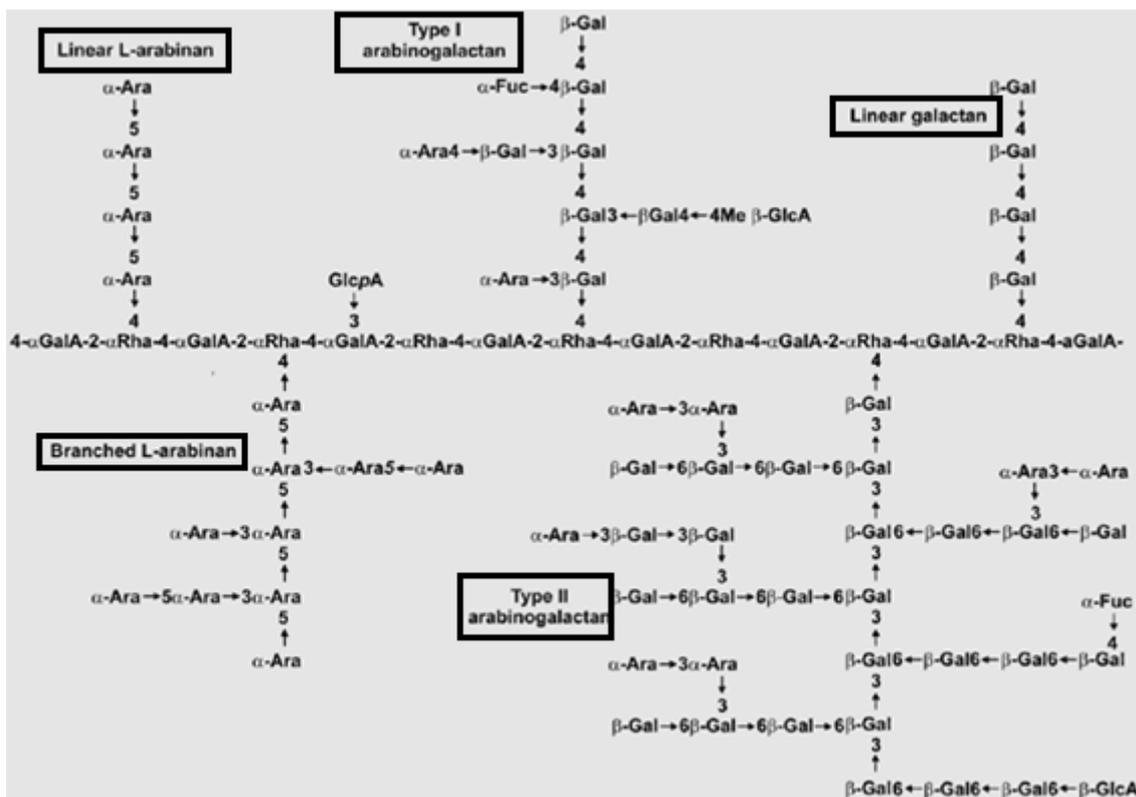


Figure 7 : Structure chimique du rhamnogalacturonane I (d'après O'Neill *et al.*, 1990).

- Arabinanes

Le squelette des chaînes d'arabinanes est un enchaînement de α -L-arabinoses liés en (1→5). Ces arabinoses peuvent être substitués par d'autres molécules d'arabinoses en C2 et/ou en C3 et/ou en C5 (Figure 7) (Carpita et Gibeault, 1993). Les arabinanes sont présents dans un grand nombre de fruits et légumes tels que la pomme (Renard *et al.*, 1993 ; Schols *et al.*, 1994), où ils représentent plus de 10 % en moles des sucres des parois végétales dans la peau (Arnous *et al.*, 2009), la betterave sucrière (Sakamoto *et al.*, 1995) et le soja (Huisman *et al.*, 2001).

Les chaînes d'arabinanes sont généralement hautement mobiles, et sont capables d'adopter une conformation en hélice (Zykwinska *et al.*, 2006 ; Ha *et al.*, 2005) avec une chiralité droite et gauche (Cros *et al.*, 1994).

- Arabinogalactanes

Les arabinogalactanes sont constitués d'un squelette de β -D-galactoses liés soit en (1 \rightarrow 4), correspondant aux arabinogalactanes de type I (AG-I), soit liés en β (1 \rightarrow 3) et β (1 \rightarrow 6) pour les arabinogalactanes de type II (AG-II) (Figure 7).

Les chaînes de galactanes des arabinogalactanes de type I sont généralement ramifiées, portant des résidus α -L-arabinoses sur le O-3 ou de courtes chaînes de α -L-arabinoses liés en (1 \rightarrow 5) (Voragen *et al.*, 2009).

En revanche, sur les galactanes des arabinogalactanes de type II, de courtes chaînes de β -D-galactoses liés en (1 \rightarrow 6) sont portés par le O-6, et certains résidus galactoses de la chaîne principale ou secondaire peuvent être substitués par des unités d'arabinose ou de courtes chaînes de α -L-arabinose (Brillouet *et al.*, 1996 ; Voragen *et al.*, 2009).

Les arabinogalactanes de type II sont très répandus chez les végétaux et sont majoritairement associés à des protéines. Ils sont ainsi nommés arabinogalactanes-protéines (AGPs). Ces protéines sont riches en hydroxyproline, sérine et thréonine (Oosterveld *et al.*, 2002). Les AGPs sont soit libres et solubles, soit associés de façon covalente aux pectines et impliqués dans des liaisons avec les rhamnogalacturonanes I. Ces liaisons seraient à l'origine de leur co-élution avec les pectines (Tan *et al.*, 2013). Lors de la maturation du raisin, une augmentation de la part des AGPs solubles ainsi que de l'hydroxyproline a été observée dans la paroi (Nunan *et al.*, 1998).

1.3.3.2. Rhamnogalacturonane II (RG-II)

Les rhamnogalacturonanes de type II ont été identifiés dans des hydrolysats enzymatiques de parois (Darvill *et al.*, 1978) et ainsi nommés à partir de leur composition ; cependant cette dénomination est trompeuse, car ils sont caractérisés par un squelette homogalacturonique. Ils sont constitués d'un enchaînement de huit résidus d'acide galacturoniques liés en β (1 \rightarrow 4), substitués par quatre chaînes latérales d'oligosaccharides (A, B, C et D) (Figure 8) (O'Neill *et al.*, 1990 ; Albersheim *et al.*, 1994). La chaîne latérale B est liée au cinquième résidu d'acide galacturonique par le carbone 2, en partant de l'extrémité réductrice du squelette, tandis que la chaîne D est principalement liée par le carbone 3 du sixième résidu d'acide galacturonique (Vidal *et al.*, 2000).

Ces rhamnogalacturonanes comportent 12 oses différents dont certains sont rares tels que l'apiose, le 2-O-méthyl- L-fucose, le 2-O-méthyl-D-xylose, l'acide acérique (3-C-carboxy-5-

deoxy-L-xylose), le Kdo (acide 3-deoxy-D-manno-octolosonique) et le Dha (acide 3-deoxy-D-lyxo-heptulosarique) (Darvill *et al.*, 1978 ; Spellman *et al.*, 1983 ; Glushka *et al.*, 2003).

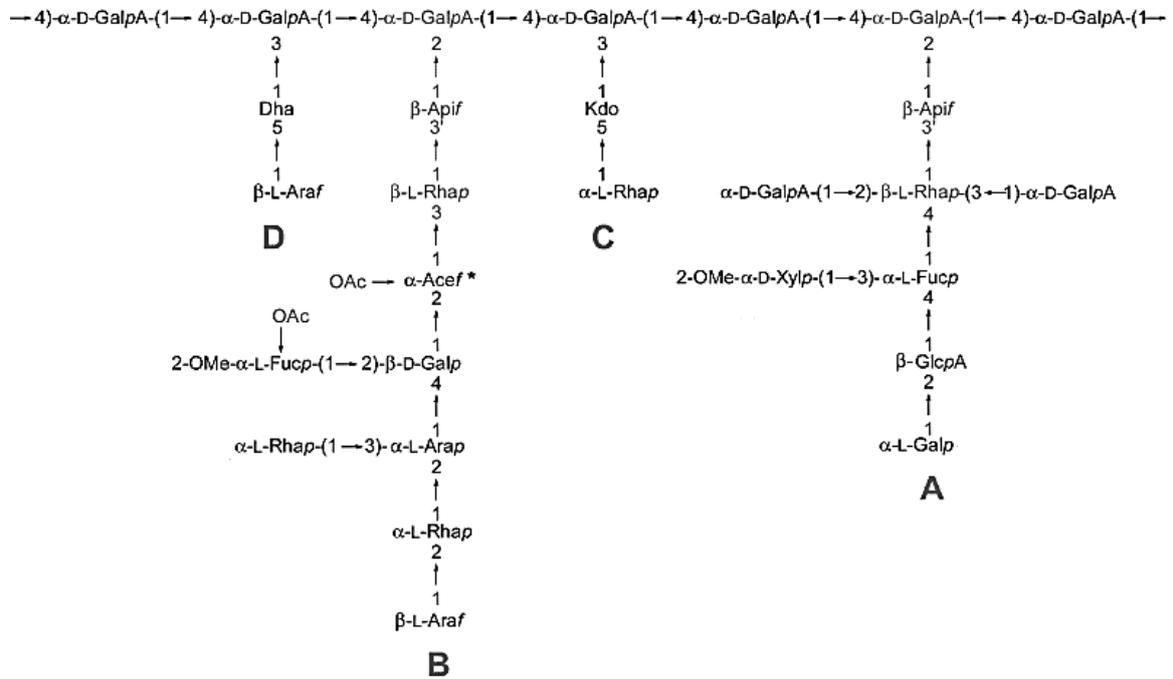


Figure 8 : Structure chimique du rhamnogalacturonane II

(http://www.uea.ac.uk/menu/acad_depts/cap/carbohydrate/projects/RGII.htm).

Les rhamnogalacturonanes II sont présents sous forme de monomère ou de dimère. Les dimères résultent de l'auto-association de monomère de RG-II via des liaisons covalentes impliquant un diester de borate (Figure 9) (Ishii *et al.*, 1996, Ridley *et al.*, 2001). La formation du dimère (dRG-II) est une réaction réversible, c'est-à-dire que le dimère peut être converti en monomère (mRG-II) par un traitement à pH acide pendant 30 min (Ishii *et al.*, 1999 ; O'Neill *et al.*, 1996).

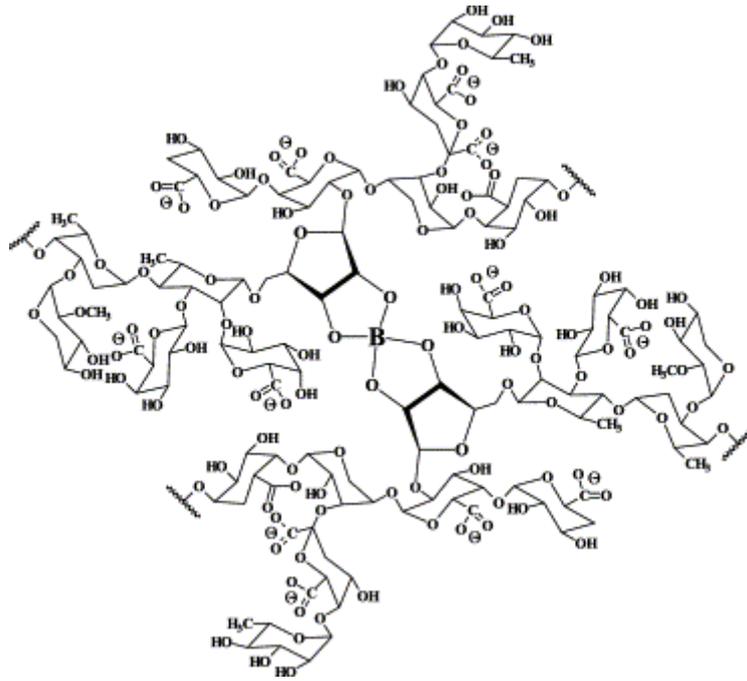


Figure 9 : Structure de dimère de rhamnogalacturonane II via la liaison borate diol

(Dembitsky *et al.*, 2002).

Le rhamnogalacturonane II est libéré des structures complexes de pectines grâce à des enzymes tels que les pectinases. Il a été isolé à partir de marc de pomme par liquéfaction enzymatique (Doco *et al.*, 1997) et il a été montré que les RG-II sont liés de façon covalente avec les homogalacturonanes de pectines (Ishii et Matsunaga, 2001), ce qui peut expliquer pourquoi cette fraction est extraite dans le vin ou les jus plutôt que dans les fruits et légumes non transformés.

1.3.4. Propriétés gélifiantes

Les pectines sont capables de former des gels par différents mécanismes quel que soit leur degré de méthylation.

1.3.4.1. Gélification des pectines hautement méthylées

Dans les conditions de faible activité de l'eau, typiquement obtenues par de fortes concentrations de sucre (par exemple le saccharose) et à pH acide (entre 2,2 et 2,8), les pectines HM sont capables de former un gel. Le mécanisme de gélification dans ce cas

correspond à la formation d'interactions hydrophobes entre les groupements méthyles et de liaisons hydrogènes entre les groupements carboxyliques des résidus d'acide galacturonique non estérifiés et les alcools secondaires (Oakenfull et Scott, 1984). Les sucres limitent l'activité de l'eau ce qui favorise les interactions pectines-pectines par rapport aux interactions pectines-eau (Sato *et al.*, 2008).

1.3.4.2. Gélification des pectines faiblement méthylées

Les pectines LM sont capables de former un gel en présence de cations multivalents et plus particulièrement avec le calcium (Ca^{2+}). Ce mécanisme de gélification est basé sur les interactions entre les cations et les groupements carboxyliques déprotonés des acides galacturoniques. Cette association forme un gel de type « boîte à oeuf » (cf. Figure 5 p 46) via des liaisons de Van der Waals, des liaisons hydrogènes et des liaisons électrostatiques (Grant *et al.*, 1973). La capacité des pectines LM à s'associer avec le calcium dépend du degré de méthylation mais aussi de la distribution des acides galacturoniques non-estérifiés. Après dé-estérification des pectines de façon enzymatique (formation de blocs), la formation de liaisons avec le calcium est plus élevée qu'après dé-estérification chimique (aléatoire) (Daas *et al.*, 1999, Fraeye *et al.*, 2010).

1.4. Organisation structurale de la paroi végétale

Les polysaccharides décrits dans les sections précédentes s'organisent et interagissent entre eux pour former la paroi. La paroi est composée d'une lamelle moyenne, d'une paroi primaire et d'une paroi secondaire (Figure 10).

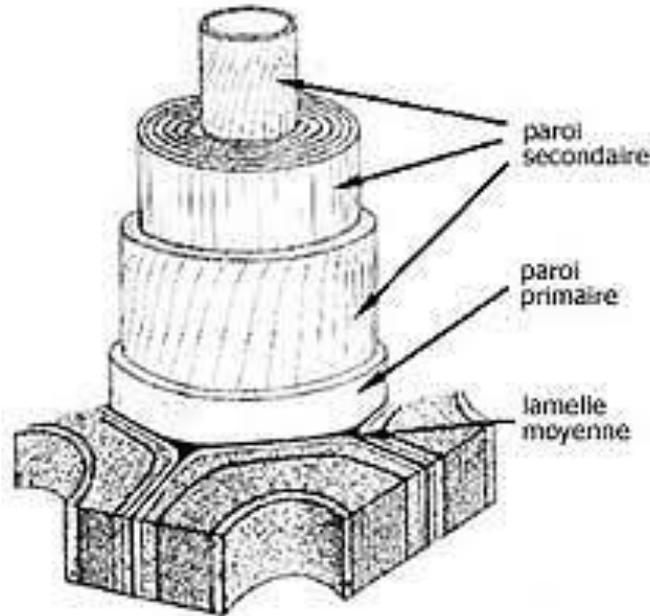


Figure 10 : Organisation structurale de la paroi végétale.

La lamelle moyenne représente la structure la plus externe de la cellule et permet la cohésion entre les cellules. Elle est essentiellement constituée de pectines et se forme lors de la séparation des cellules.

La paroi primaire est caractéristique des cellules en croissance. Elle est constituée de microfibrilles de cellulose qui sont enchâssées dans une matrice constituée d'hémicelluloses et de composés pectiques. Ces pectines également présentes dans la lamelle moyenne permettent de renforcer la cohésion entre ces deux parois. Hormis les composés polysaccharidiques, la paroi primaire peut contenir jusqu'à 10% de glycoprotéines très riches en hydroxyproline. Ces protéines sont appelées extensines car elles sont impliquées, entre autre, dans le contrôle de l'extension cellulaire végétale (McNeil *et al.*, 1984 ; Hopkins, 2003).

La paroi secondaire est plus épaisse et rigide que la paroi primaire et se forme en fin de croissance de la plante quand les cellules ne se développent plus. Elles contiennent plus de 45% de cellulose et jusqu'à 35% de lignine, ce qui les rigidifie d'autant plus.

Selon le modèle généralement admis (Carpita et Gibeault, 1993), les constituants des parois végétales forment un réseau de biopolymères constitué de 3 domaines liés par des liaisons chimiques de forces différentes. Les trois domaines de cellulose/hémicellulose (Pauly *et al.*, 1999), de protéines (Cosgrove, 2000) et de pectines sont reliés soit par des forces ioniques,

soit par des liaisons hydrogènes ou des interactions hydrophobes (Figure 12). Le premier domaine qui est aussi le squelette de la paroi est constitué d'un réseau de cellulose interconnecté aux et par les xyloglucanes (Valent et Albersheim, 1974). Le réseau de cellulose/hémicellulose est intégré avec les polymères de pectines et stabilisé par les protéines (Figure 11) ; les hémicelluloses se lient à la surface des microfibrilles de cellulose, et aux pectines (Ochoa-Villareal *et al.*, 2012).

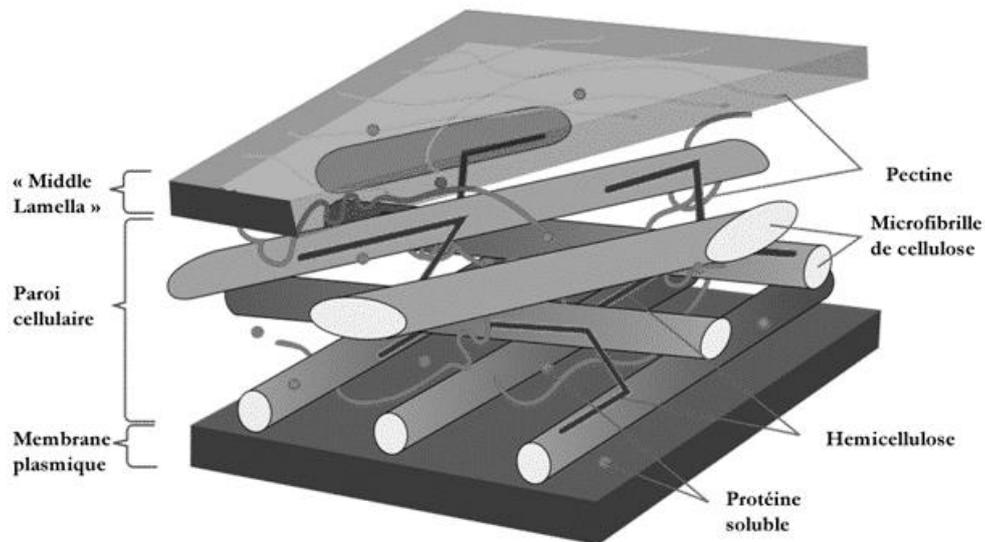


Figure 11 : Organisation structurale des composants de la paroi végétale.

Les pectines forment un réseau indépendant en parallèle à la réticulation des glucanes (Cybulska *et al.*, 2010). Les pectines se lient aux microfibrilles de cellulose mais sont en compétition avec les glucanes. Les interactions pectines-cellulose sont plus faibles que les interactions xyloglucanes-cellulose, donc plus la concentration en xyloglucane est élevée, moins les pectines se lient à la cellulose (Zykwinska *et al.*, 2008). Dans le cas de paroi primaire végétale pauvre en xyloglucane (dans la betterave sucrière par exemple (Renard et Jarvis 1999b)), les pectines s'associent avec les microfibrilles de cellulose via leur chaînes d'arabinanes et de galactanes (Zykwinska *et al.*, 2007) (Figure 12).

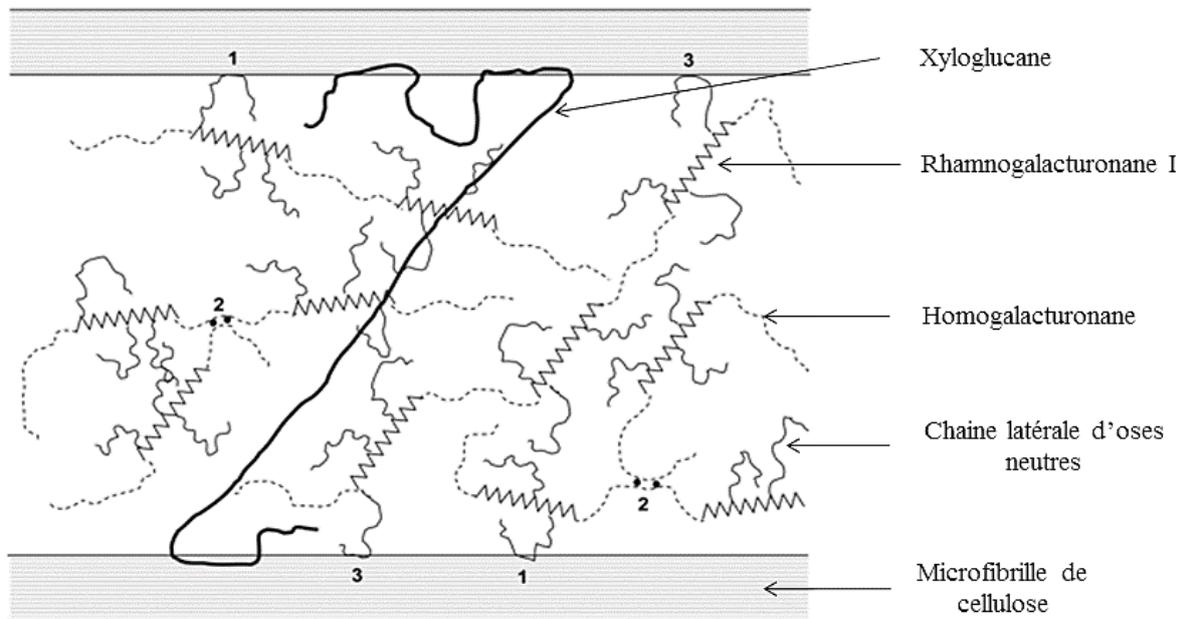


Figure 12 : Schéma des connexions entre les composés polysaccharidiques de la paroi végétale (Zykwinska *et al.*, 2005). 1 et 3 : liaison d'une molécule de pectine avec une microfibrille de cellulose ; 2 : liaisons entre HG et Ca^{2+} .

Les différents constituants de la paroi végétale décrits dans les sections précédentes appartiennent au grand groupe des fibres alimentaires. Les fibres sont définies fonctionnellement comme étant les composants de la ration alimentaire non digestibles par les enzymes endogènes du corps humain (Trowell, 1973). L'AFSSA (2002) a précisé cette définition en la reliant à la composition : « les fibres sont définies comme étant des polymères glucidiques d'origine végétale qui sont associés ou non à de la lignine ou à d'autres constituants non glucidiques (cires, polyphénols, cutine...) ». Selon le type de polysaccharide pariétal, les mécanismes et les effets de ces fibres sur la santé sont différents.

1.5. Devenir et impact des fibres alimentaires dans l'organisme

Le mode d'action des fibres est différent en fonction de leurs propriétés, en particulier de leur solubilité. Il a été montré que les fibres insolubles régulent la fonction intestinale, en augmentant la masse fécale et ainsi réduisent le temps de transit intestinal (McDougall *et al.*, 1996). La cellulose (fibre insoluble) a une forte capacité de rétention d'eau, tandis que les pectines (fibres solubles) forment des gels. Elles ralentissent ainsi la vidange gastrique et diminuent l'absorption de glucose. Ces fibres permettent de réguler la glycémie et

l'insulinémie après leur ingestion et ont donc un effet positif sur le diabète (Jang *et al.*, 2001 ; Anderson *et al.*, 2009).

De plus, par l'augmentation de la viscosité du bol digestif, les fibres solubles ont une capacité de rétention intestinale des acides biliaires. Cette rétention entraîne une augmentation de l'excrétion des acides biliaires issus de la dégradation du cholestérol par le foie, ce qui est suivi par une diminution du cholestérol circulant. Grâce à ce mécanisme, les fibres solubles ont tendance à diminuer le taux de LDL-cholestérol, qui est connu comme un des facteurs de risque des maladies cardiovasculaires. Il semble que la consommation de 2 à 10 g de fibres solubles par jour diminue de 13% le taux de LDL-cholestérol (Brown *et al.*, 1999).

Les fibres ne sont pas digérées par l'organisme mais sont fermentées au niveau du colon par les bactéries du microbiote colique. Par l'intermédiaire de cette fermentation, les fibres ont également un effet positif sur le cancer du côlon (Gamet *et al.*, 1992). La fermentescibilité des pectines n'est pas influencée par leur viscosité mais par leur structure chimique, c'est-à-dire par leur niveau de méthylation ainsi que par les chaînes d'oses neutres des zones hérissées. Les pectines faiblement méthylées sont fermentées plus rapidement que les pectines hautement méthylées (Olano-Martin *et al.*, 2002). De plus, Gulfi *et al.* (2007) ont montré que les arabinogalactanes restent non dégradés après 24 h contrairement à des pectines riches en chaînes d'arabinanes qui sont métabolisées au bout de 6 h. Cette fermentation entraîne la production de métabolites : les acides gras à courtes chaînes tels que le propionate, le butyrate, etc.... qui sont rapidement absorbés au niveau du côlon. Le butyrate est capable d'inhiber la prolifération de cellules cancéreuses et limite l'adhésion d'entéro-pathogènes (Siavoshian *et al.*, 2000).

2. Polyphénols

Les polyphénols sont des métabolites secondaires retrouvés dans la plupart des espèces végétales. Ils sont de structure diverse regroupant des composés simples tels que les monomères et des composés complexes polymérisés. Les composés polyphénoliques contribuent à diverses propriétés biologiques : pour la plante, une protection contre les stress biotiques et abiotiques, un rôle organoleptique et visuel (pigmentation). Ils ont aussi un rôle protecteur sur la santé humaine.

Dans cette partie, je présenterai les polyphénols de la pomme, en accentuant sur les procyanidines et les anthocyanes qui sont les deux types de polyphénols utilisés lors de ma thèse.

2.1. Classes de polyphénols

Les composés phénoliques sont caractérisés par un ou plusieurs noyaux benzéniques portant un ou plusieurs groupements hydroxyles. Les composés phénoliques présents dans les plantes sont regroupés en deux classes : les composés non flavonoïdes et les composés flavonoïdes. Ces différentes classes de polyphénols sont présentes à des concentrations variables (Figure 13) selon les zones tissulaires de la pomme.

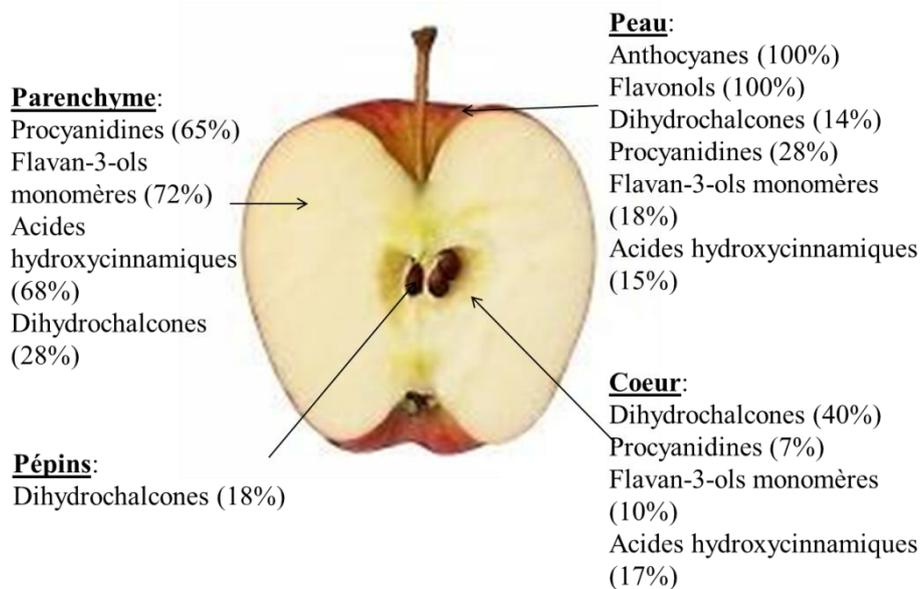


Figure 13 : Répartition des polyphénols dans les différentes zones tissulaires de la pomme. Adapté de Guyot *et al.*, 1998. Les pourcentages représentent la proportion de chaque classe présente dans cette zone tissulaire de la pomme, les données ayant été obtenues pour la variété *Kermerrien*.

2.1.1. Composés non flavonoïdes

Les acides phénoliques font partie des composés non flavonoïdes. Ils sont caractérisés par un noyau phénolique substitué en C3 par une chaîne latérale propénoïque. Ils regroupent les acides hydroxycinnamiques et les acides hydroxybenzoïques. Dans la pomme, les acides hydroxycinnamiques sont plus abondants que les acides hydroxybenzoïques. Les acides hydroxycinnamiques (avec un squelette C6-C3) principalement présents dans la pomme sont l'acide caféique et l'acide *para*-coumarique (Clifford, 1999). Ces deux acides se distinguent par le niveau et le type de substitution du noyau aromatique. Dans la plupart des cas, ils se présentent sous la forme d'ester de l'acide quinique (Figure 14).

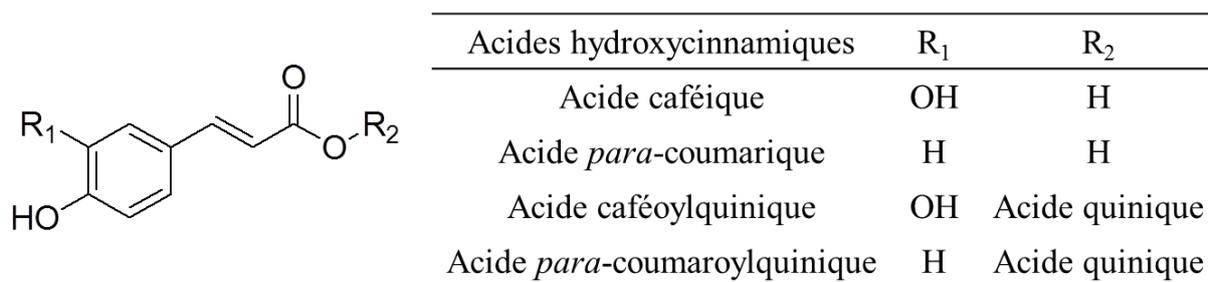


Figure 14 : Structure des acides hydroxycinnamiques.

Dans la pomme, la concentration en acide caféoylquinique varie de 62 à 385 mg/kg de matière fraîche (Clifford, 1999 ; Sanoner *et al.*, 1999). Le plus abondant dans la pomme est l'acide 5'-caféoylquinique communément appelé acide chlorogénique (ester quinique de l'acide caféique) (Guyot *et al.*, 1998 ; Collin et Crozet 2011) à la différence de l'acide 3'-caféoylquinique (Clifford, 1999). L'acide chlorogénique est le substrat préférentiel de la polyphénol oxydase ce qui l'implique dans le phénomène de brunissement oxydatif. Des acides *para*-coumaroylquinique sont également présents dans la pomme et sont représentés majoritairement par l'acide 4-*O*-*para*-coumaroylquinique, dont les concentrations peuvent atteindre jusqu'à 40 mg/kg de matière fraîche (Oszmianski *et al.*, 1986 ; Clifford, 1999). L'acide 5'-*para*-coumaroylquinique n'étant présent qu'à l'état de traces (Amiot *et al.*, 1992).

2.1.2. Composés flavonoïdes

Les flavonoïdes sont la classe de métabolites secondaires la plus représentée chez les végétaux. Ils possèdent un squelette carboné en C6-C3-C6 et sont constitués de deux noyaux

aromatiques (cycles A et B) et d'un noyau pyrane (hétérocycle C) (Aron et Kennedy, 2008) (Figure 15). Les différentes classes de flavonoïdes se distinguent par le niveau d'oxydation du noyau C. Les flavonoïdes présents dans la pomme sont des flavan-3-ols (monomères et polymères), des flavonols, des dihydrochalcones et des anthocyanes.

Les procyanidines (polymères de flavan-3-ol) et les anthocyanes seront abordés ultérieurement.

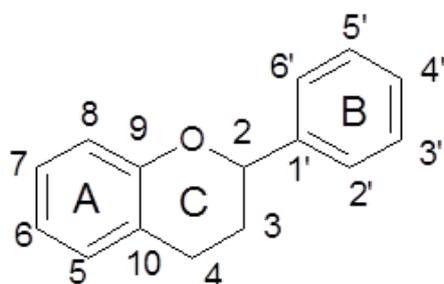
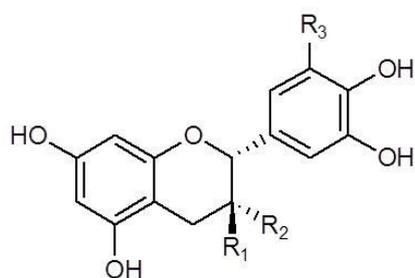


Figure 15 : Structure des flavonoïdes.

2.1.2.1. Monomères de flavan-3-ols

Les flavan-3-ols représentent la plus grande classe de flavonoïdes monomériques et sont désignés sous le nom de catéchines. Ce sont les seuls flavonoïdes (avec les procyanidines) présents majoritairement sous leur forme aglycone. Les monomères se différencient par la stéréochimie de deux carbones asymétriques C2 et C3, la présence de groupements galloyles, ainsi que par le niveau d'hydroxylation du noyau B. Les formes dihydroxylées en C3' et C4' (type catéchol du noyau B) correspondent à la (+)-catéchine et à la (-)-épicatéchine ; les formes trihydroxylées regroupent la (+)-gallocatéchine et la (-)-épigallocatéchine (Figure 16). La configuration 2R est la plus retrouvée, tandis que la configuration 2S est plus rare (Haslam, 1989).



Flavan-3-ols	R ₁	R ₂	R ₃	configuration
(+)-catéchine	OH	H	H	2R 3S
(-)-épicatéchine	H	OH	H	2R 3R
(+)-gallocatéchine	OH	H	OH	2R 3S
(-)-épigallocatéchine	H	OH	OH	2R 3R

Figure 16 : Structure des monomères de flavan-3-ols.

Les monomères de flavan-3-ols sont présents en plus forte concentration dans la peau que dans le parenchyme de pomme (Alonso-Salces *et al.*, 2001 ; Guyot *et al.*, 2002). En règle générale, la (-)-épicatéchine domine largement avec des concentrations de l'ordre de 40 à 200 mg/kg de matière fraîche et de l'ordre de 30 mg/kg de matière fraîche pour la (+)-catéchine dans le parenchyme (Wodjylo *et al.*, 2008 ; Le Bourvellec *et al.*, 2011) (Tableau I).

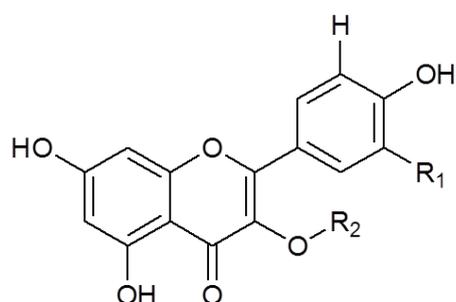
Tableau I : Concentrations moyennes en monomères de flavan-3-ols dans la pomme à cidre (C) et de table (T).

Zone de pomme	(+)-catéchine	(-)-épicatéchine	Unité	Références
Peau (C)	295	1983	mg/kg MS	Alonso-Sanchez <i>et al.</i> , 2001
Peau (T)	19	142	mg/kg MF	Guyot <i>et al.</i> , 2002
Parenchyme (C)	219	989	mg/kg MS	Alonso-Sanchez <i>et al.</i> , 2001
Parenchyme (T)	12	93	mg/kg MF	Guyot <i>et al.</i> , 2002

MS : Matière sèche et MF : Matière fraîche.

2.1.2.2. Flavonols

Les flavonols sont caractérisés par un groupement hydroxyle en C3 et une fonction carbonyle en C4 sur l'hétérocycle C. L'oxygène en 3 peut porter un atome d'hydrogène comme dans le cas des aglycones tels que le kaempférol et la quercétine mais également avec un glycoside pour former l'hyperoside, l'isoquercitrine, la quercitrine et la rutine par exemple (Figure 17). Les flavonols existent principalement sous forme glycosylée (glucose, xylose, arabinose, galactose et rhamnose).



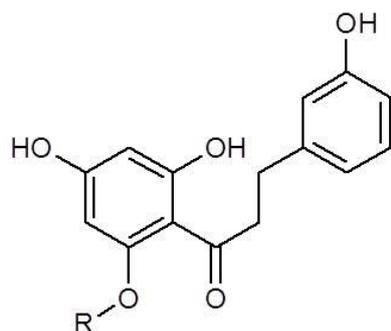
Flavonols	R ₁	R ₂
Kaempférol	H	H
Quercétine	OH	H
Hyperoside	OH	Gal
Isoquercitrine	OH	Glc
Quercitrine	OH	Rha
Rutine	OH	Glc-Rha
Avicularine	OH	Ara

Figure 17 : Structure des flavonols.

Les flavonols sont majoritairement présents dans la peau et peuvent être également retrouvés dans les pépins de pomme. Les flavonols présentent des concentrations de 0,9 à 5,1 mg/g de matière sèche dans la peau des cultivars *Elstar* et *Kermerrien* respectivement (Renard *et al.*, 2007) et varient de 0,8 à 2,2 mg/kg de matière sèche dans la peau du cultivar *Golden delicious*, en fonction du système de culture (Jakopic *et al.*, 2012).

2.1.2.3. Dihydrochalcones

Les dihydrochalcones sont des flavanoïdes à deux cycles dont la structure est ouverte, ne possédant donc pas d'hétérocycle central. Ces deux noyaux benzène sont reliés par une chaîne carbonée et le noyau A porte un groupement hydroxyle en C5. L'aglycone des dihydrochalcones est la phlorétine que l'on retrouve uniquement sous forme d'hétéroside dans la pomme, formant ainsi la phloridzine (glucose) ou le xyloglucoside de phlorétine (glucose-xylose) (Figure 18).



Dihydrochalcones	R
Phlorétine	H
Phloridzine	Glc
Xyloglucoside de phlorétine	Glc-Xyl

Figure 18 : Structure des dihydrochalcones.

Les dihydrochalcones correspondent à une classe mineure des polyphénols (de 1 à 5% des polyphénols totaux) (Sanoner *et al.*, 1999) présents en plus faible quantité dans le parenchyme que dans le cœur et les pépins. Ainsi, la concentration en dihydrochalcones est de 74 mg/kg de matière fraîche (MF) dans le parenchyme du cultivar *Kermerrien* de dihydrochalcones contre 3416 mg/kg MF dans les pépins et le cœur du même cultivar (Guyot *et al.*, 1998). La phloridzine est la dihydrochalcone la plus abondante et représente entre 79 et 92% de cette classe en fonction des variétés de pomme (Guyot *et al.*, 1998 ; Tomas-Barberan et Clifford 2000 ; Fromm *et al.*, 2012) (Tableau II).

Tableau II : Exemple de concentrations en dihydrochalcones (mg/kg MF) dans la pomme.

Localisation	Cultivar	Phloridzine	Phlorétine	Xyloglucoside de phlorétine	Références
Pépin	<i>Royal Gala</i>	9354,4	5,7	887,3	Fromm <i>et al.</i> , 2012
Pépin	<i>Champagner reinette</i>	4133,5	4,8	314,1	Fromm <i>et al.</i> , 2012
Parenchyme	<i>Golden delicious</i>	15	-	11	Sanoner <i>et al.</i> , 1999
Parenchyme	<i>Avrolles</i>	25	-	55	Sanoner <i>et al.</i> , 1999

2.2. Anthocyanes

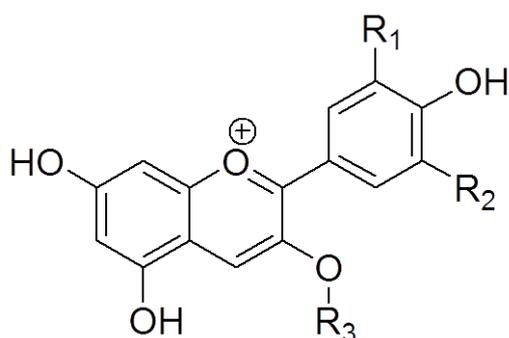
Les anthocyanes appartiennent à la classe des flavonoïdes. Ce sont des pigments présents dans les vacuoles des cellules végétales pouvant donner des colorations allant du rouge au bleu en fonction de la structure chimique, du pH et de la présence de copigments (Ignat *et al.*, 2011). Ces composés ne sont présents que dans les pommes rouges et plus fréquemment dans la peau. Aucune anthocyane n'est présente dans la peau du cultivar *Golden delicious*, en revanche de 585 à 1037 mg/kg MF d'anthocyanes totales sont trouvées dans la peau de pomme du cultivar *Red delicious* par exemple (Escarpa et Gonzalez, 1998).

2.2.1. Propriétés physiques

2.2.1.1. Structure

Les anthocyanes possèdent la structure de base des « flavonoïdes » (C6-C3-C6), c'est-à-dire qu'elles sont constituées de deux noyaux aromatiques (A et B) et d'un hétérocycle oxygéné (C), mais elles sont chargées positivement. Cette structure est appelée anthocyanidine. Les plus répandues sont la cyanidine, la delphinidine, la malvidine, la pélargonidine et la péonidine. Dès lors que cette structure est liée à un sucre c'est-à-dire retrouvée sous forme glycosylée, elle est appelée anthocyanine.

Les anthocyanes (terme générique féminin français) se distinguent par leur niveau d'hydroxylation, de méthylation ainsi que par la nature, le nombre et la position (en C3 ou C5) des sucres tels que le glucose, le rhamnose, le xylose, le galactose ou l'arabinose sur la molécule (Mazza et Miniati, 1993 ; Slimestad et Solheim 2002) (Figure 19).



R3 :
 H = anthocyanidine
 Gly = anthocyane

Figure 19 : Structure des anthocyanidines et des anthocyanes.

Le niveau de glycosylation des anthocyanes a un impact sur leur stabilité; plus la molécule est glycosylée plus la couleur est stable. Les disaccharides sont plus stables à la lumière et à haute température que les monosaccharides (Markakès, 1982). De même, le niveau d'hydroxylation et de méthylation du noyau B a un impact sur l'intensité et la stabilité de la couleur. Plus le nombre de groupements hydroxyles du noyau B augmente, plus le maximum d'absorption est décalé vers les hautes longueurs d'onde (effet bathochrome). En revanche plus l'anthocyane porte des groupements méthoxyles, plus les longueurs d'onde du maximum d'absorption diminuent ; c'est un effet hypsochrome (Tableau III) (Mazza et Miniati, 1993 ; Heredia *et al.*, 1998 ; Mazzaracchio *et al.*, 2004 ; Castaneda-Ovando *et al.*, 2009).

Tableau III : Structure et longueur d'onde d'absorption maximale des anthocyanines.

	R ₁	R ₂	λ _{max}
Pelargonidine-3-glucoside	H	H	498
Cyanidine-3-glucoside	OH	H	511
Delphinidine-3-glucoside	OH	OH	517
Petunidine-3-glucoside	OCH ₃	OH	519
Malvidine-3-glucoside	OCH ₃	OCH ₃	521

Dans la peau des pommes rouges, la cyanidine-3-galactoside est l'anthocyane la plus représentée (49,3 mg/kg de matière sèche) dans la peau du cultivar *Starking delicious*. D'autres cyanidines sont présentes, mais en de plus faibles concentrations comme la cyanidine-3-arabinoside (2,7 mg/kg de matière sèche) ou la cyanidine-3-glucoside (0,5 mg/kg de matière sèche) (Gomez-Cordovés *et al.*, 1996).

2.2.1.2. pH

La couleur des anthocyanes varie en fonction du pH du milieu pouvant aller du rouge à pH bas à bleu à pH élevé en passant par de l'incolore à pH intermédiaire. Différentes formes chimiques existent selon le pH comme le cation flavylum (AH^+) à pH 1, la base quinonoïdale (A) à pH entre 2 et 4, la pseudobase carbinol ou hémiacétal (B) et la chalcone (C) à un pH entre 5 et 6 (Figure 20). A pH égal à 7 ou élevé les anthocyanes sont généralement rapidement dégradés (Mazza et Miniati, 1993 ; Heredia *et al.*, 1998 ; Fleschhut *et al.*, 2006 ; Castaneda-Ovando *et al.*, 2009).

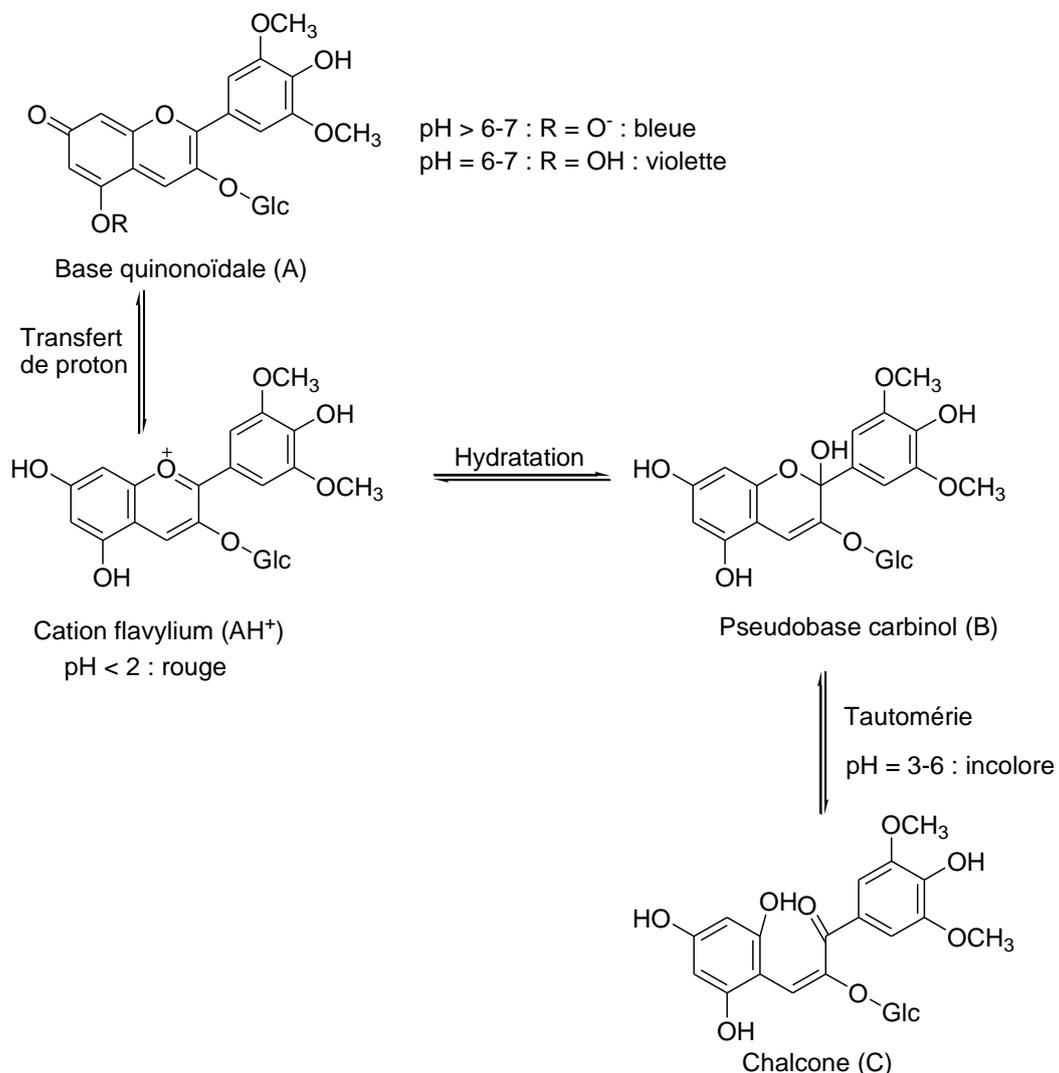


Figure 20 : Principales formes d'anthocyanes selon le pH. D'après De Villiers *et al.*, 2009.

La couleur des anthocyanes glycosylées sous forme de cation flavylum reste stable au cours du temps (jusqu'à 60 jours à 10°C) à des pH compris entre 1 et 3. En revanche, leur stabilité

diminue à des pH plus élevés à cause des réactions de protonation et d'hydratation (Figure 21) (Brouillard *et al.*, 1977). Cette diminution du cation flavylum AH^+ est observée par un effet bathochrome (décalage de la longueur d'onde d'absorbance vers le visible) et est interprétée par l'apparition des autres formes chimiques (Cabrita *et al.*, 2000 ; Dangles *et al.*, 1992b).

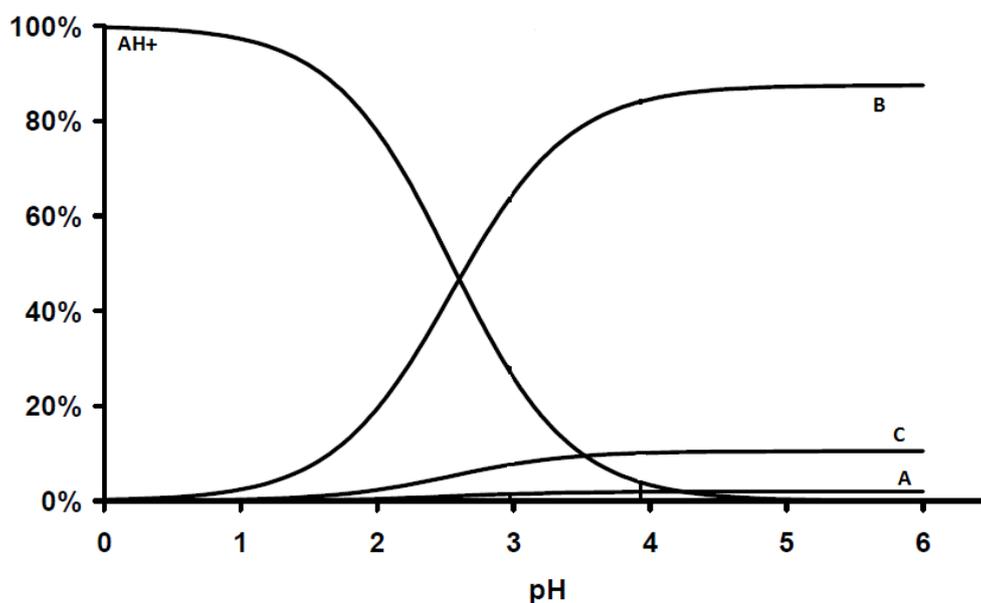


Figure 21 : Equilibre de la malvidine-3-glucoside en milieu acide (Brouillard et Dubois, 1977).

2.2.1.3. Réactivité chimique

Le noyau A des anthocyanes est nucléophile, le noyau B est en général facilement oxydable et le noyau C est électrophile (lorsqu'il est sous forme cationique) (Figure 22). Du fait de cette réactivité, les anthocyanes peuvent s'associer de façon non covalente à d'autres composés via des réactions de copigmentation, mais également réagir avec d'autres composés pour former de nouvelles molécules comme les pyranoanthocyanes.

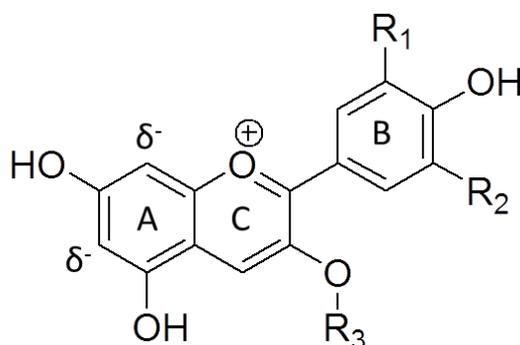


Figure 22 : Réactivité chimique des anthocyanes.

Le phénomène de copigmentation est dû à l'interaction par « π -stacking » des anthocyanes avec d'autres composés qui peuvent être des anthocyanes (auto-association), des métaux ou des composés organiques divers (copigmentation inter ou intramoléculaire). Ces propriétés physico-chimiques stabilisent la structure des anthocyanes et la couleur ce qui se traduit par un effet hyperchrome (augmentation de l'intensité d'absorption) et un effet bathochrome (Markakès, 1982 ; Escribano-Bailon et Santos-Buelga 2012).

2.2.1.3.1. Copigmentation intermoléculaire

La copigmentation intermoléculaire correspond à un empilement des électrons π des structures planes du copigment et de la forme colorée de l'anthocyane. La forte délocalisation des électrons π de la structure plane des anthocyanes permet le stacking de type π - π (Dangles et Brouillard, 1992b ; Escribano-Bailon et Santos-Buelga 2012).

L'auto-association est une forme de copigmentation intramoléculaire qui correspond à l'empilement des fonctions hydrophobes des formes colorées d'anthocyanes. L'auto-association des anthocyanes entraîne la formation de dimères non-covalents. Ce phénomène conduit à une intensification de la couleur (Asen *et al.*, 1972). Certaines auto-associations sont capables de former des dimères covalents (Salas *et al.*, 2005).

2.2.1.3.2. Copigmentation intramoléculaire

La copigmentation intramoléculaire est l'association entre deux parties de la même anthocyane. Une partie joue le rôle de copigment et l'autre de chromophore. Elle se produit en particulier quand le sucre est acylé par un acide phénolique (Markakès, 1982 ; Dangles *et al.*, 1993 ; Escribano-Bailon et Santos-Buelga 2012).

2.2.1.3.3. Pyranoanthocyanes

Les pyranoanthocyanes résultent de l'addition d'un anthocyane avec un composé présentant des doubles liaisons polarisables comme l'acétaldéhyde ou le vinyl-phénol. Ces composés sont présents dans le vin et sont formés par les métabolites de levures (Fulcrand *et al.*, 1998). Les pigments pyranoflavylum sont dus soit à la condensation directe d'un cation 5-hydroxyflavylium avec une unité acyle, soit à la condensation du cation 5-hydroxy-4-méthylflavylium avec un aldéhyde (Chassaing *et al.*, 2008).

Les pyranoanthocyanes ont été les premières identifiées, mais il existe de nombreuses molécules résultant de la réactivité covalente des anthocyanes.

2.3. Proanthocyanidines

2.3.1. Structure

Les proanthocyanidines appartiennent à la classe des flavonoïdes et sont plus précisément des oligo- et polymères de flavan-3-ols, qui peuvent atteindre des degrés de polymérisation élevés et donc des masses molaires élevées. Les proanthocyanidines sont aussi connues sous le nom de tannins condensés (Figure 23), pour les différencier des tannins hydrolysables qui consistent en une estérification d'un polyol (généralement un glucose) par un acide gallique (Figure 24) (Bravo, 1998). Ces deux séries de molécules, chimiquement distinctes, possèdent des propriétés physico-chimiques proches, d'où leur identification historique comme « tannins ». Les tannins condensés sont présents dans les vacuoles des cellules végétales.

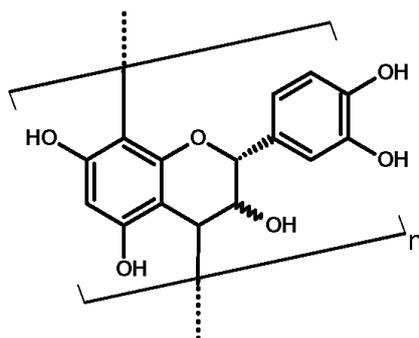


Figure 23 : Exemple de tannin condensé.

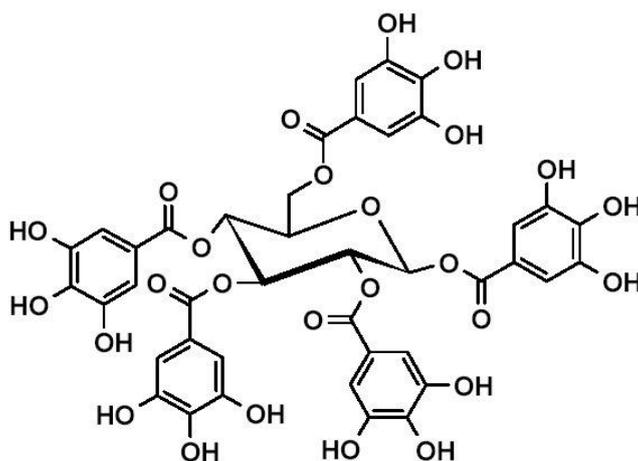
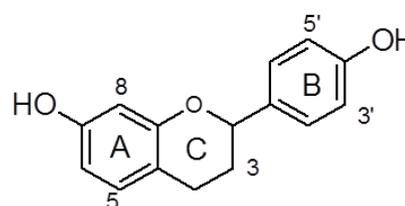


Figure 24: Exemple de tannin hydrolysable.

Les proanthocyanidines doivent leur nom à leur capacité à libérer des anthocyanidines par rupture de la liaison interflavanique en milieu acide à chaud et en condition d'oxydation (Bate-Smith, 1954 ; Porter, 1986 ; Bravo, 1998 ; Aron et Kennedy 2008). On distingue treize catégories de proanthocyanidines en fonction du niveau d'hydroxylation du noyau B (Tableau IV), dont les procyanidines présentes dans la pomme.

Tableau IV : Les différents types de proanthocyanidines. D'après Aron et Kennedy, 2008.

Type proanthocyanidine	3	5	8	3'	5'
Procassinidine	H	H	H	H	H
Probutinidine	H	H	H	OH	H
Proapigéninidine	H	OH	H	H	H
Prolutéolinidine	H	OH	H	OH	H
Protricétinidine	H	OH	H	OH	OH
Propelargonidine	OH	OH	H	H	H
Procyanidine	OH	OH	H	OH	H
Prodelphinidine	OH	OH	H	OH	OH
Proguibourtinidine	OH	H	H	H	H
Profisetinidine	OH	H	H	OH	H
Prorobinetinidine	OH	H	H	OH	OH
Proteracacinidine	OH	H	OH	H	H
Promelacacinidine	OH	H	OH	OH	H



Les procyanidines sont caractérisées par : 1) la nature des unités constitutives (monomères de flavan-3-ols) ; 2) la nature des liaisons liant les monomères appelées liaisons interflavaniques ; 3) le nombre d'unités qu'elles peuvent comporter c'est-à-dire le degré de polymérisation.

Les procyanidines (polymères de catéchines) sont les polyphénols les plus abondants dans le parenchyme de pomme (représentant en moyenne plus de 75% des polyphénols totaux) tant dans les pommes à cidre que les pommes de tables, et présentent des degrés de polymérisation variables en fonction de la variété (Guyot *et al.*, 1998 ; Sanoner *et al.*, 1999).

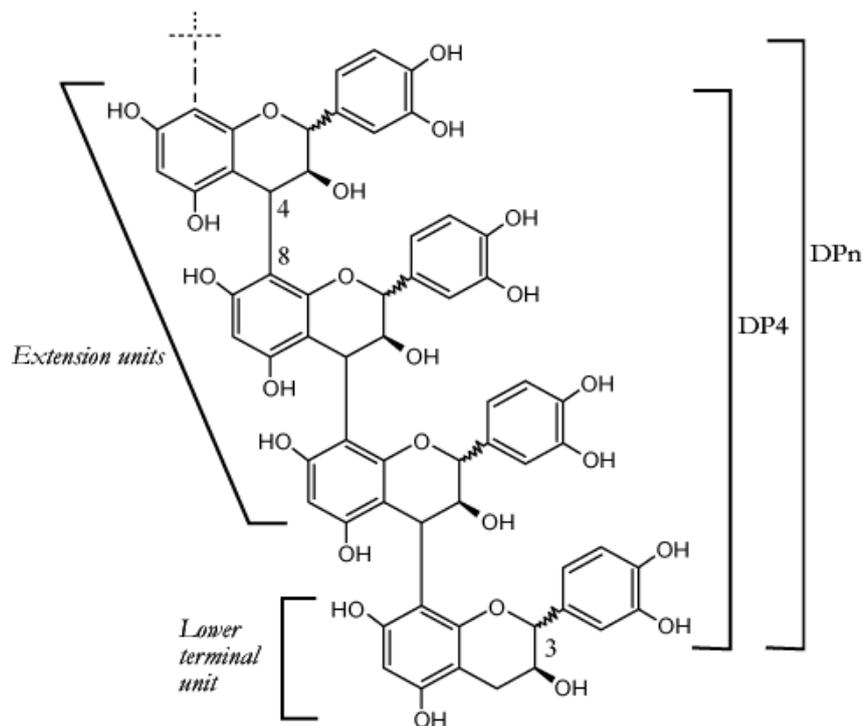


Figure 25 : Structure de base des procyanidines. D'après Guyot *et al.*, 1997.

2.3.1.1. Unités constitutives

Les procyanidines sont des oligo- et polymères constitués de flavan-3-ols tels que la (+)-catéchine et la (-)-épicatéchine et sont abondants dans les fruits et légumes (Figure 25), à la différence par exemple des prodelphinidines qui présentent des unités de gallocatéchine et/ou épigallocatéchine et qui sont présentes surtout dans les feuilles (Hemingway, 1989 ; Bruyne *et al.*, 1999) et dans les pépins et pellicules de raisin (Prieur *et al.*, 1994).

Les unités constitutives de procyanidines regroupent les unités d'extension et les unités terminales. Dans la pomme, la (+)-catéchine est présente uniquement en unité terminale tandis que la (-)-épicatéchine peut être présente en unité d'extension et/ou en unité terminale. En fonction des variétés de pomme, la proportion de procyanidines varie de 44 à 89% des polyphénols totaux par exemple pour les cultivars *Douce Coët Ligné* et *Avrolles* respectivement. Quant à la (-)-épicatéchine, elle représente plus de 90% des unités constitutives (Guyot *et al.*, 1997 ; Guyot *et al.*, 1998 ; Sanoner *et al.*, 1999).

2.3.1.2. Liaisons interflavaniques

La nature des liaisons entre les monomères de flavan-3-ols permet de distinguer les proanthocyanidines de type A et B. Les procyanidines de type B comportent uniquement des

liaisons C-C reliant le plus souvent les carbones C4 et C8 (liaison C4-C8) ou moins fréquemment les carbones C4 et C6 (liaison C4-C6). En revanche, les procyanidines de type A, à priori non présentes dans la pomme, possèdent une liaison C-C comme celles des procyanidines de type B et se caractérisent par une liaison éther additionnelle reliant les carbones C2 et C7 (liaison C2-O-C7) ou les carbones C2 et C5 (liaison C2-O-C5) (Hemingway, 1989).

La nomenclature des procyanidines a été construite historiquement à partir de l'identification de ces molécules. Ainsi les procyanidines A sont des dimères liés par des liaisons de type A, les procyanidines B sont des dimères reliés par des liaisons de type B et les procyanidines C sont des trimères reliés par des liaisons de type B (Figure 26).

On distingue les procyanidines B1 ((-)-épicatéchine-(4 β →8)-(+)-catéchine), B2 ((-)-épicatéchine-(4 β →8)-(-)-épicatéchine, B3 ((+)-catéchine-(4 α →8)-(+)-catéchine, B4 ((+)-catéchine-(4 α →8)-(-)-épicatéchine et B5 qui est un isomère de position (régioisomère) de la procyanidine B2 qui possède une liaison C4-C6 (Figure 26) (Hemingway, 1989 ; Aron et Kennedy, 2008). Seules les procyanidines de type B majoritairement sous forme C4-C8 sont retrouvées dans la pomme (Yeap Foo et Lu, 1999). Les dimères B1, B2 et B5 ont été identifiés dans la pomme, où le dimère B2 est majoritaire (Lea et Timberlake, 1974 ; Perez-Illarbe *et al.*, 1992). Le trimère C1 ((-)-épicatéchine liés en C4-C8) a également été identifié dans la pomme (Shoji *et al.*, 2003).

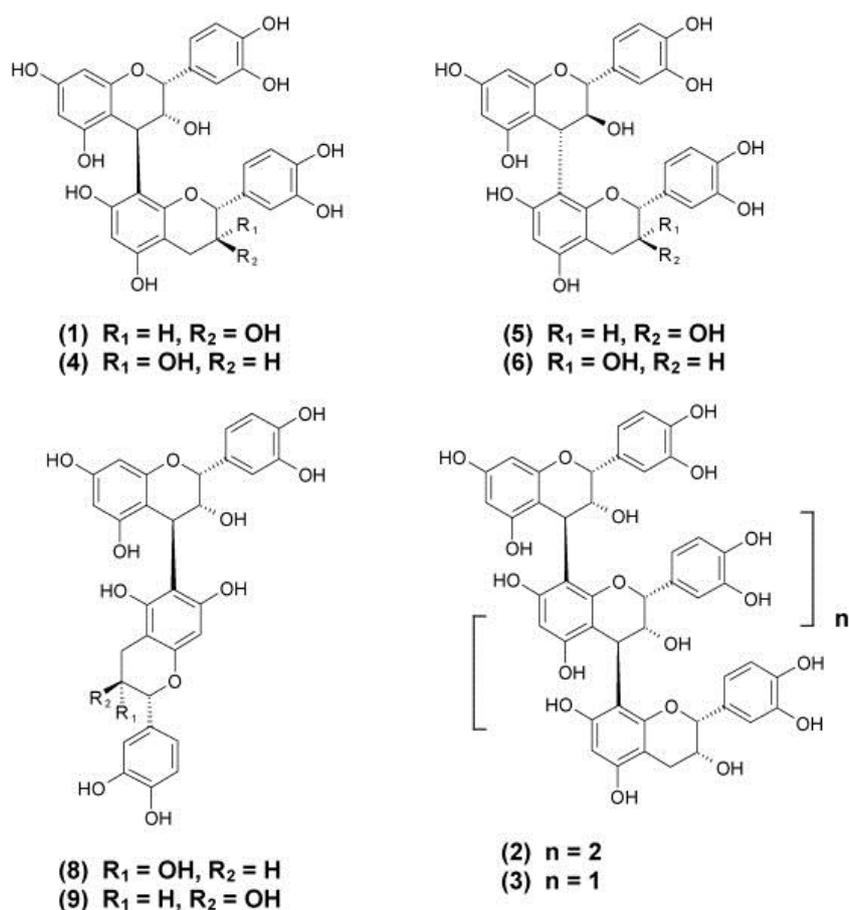


Figure 26 : Structure chimique des procyanidines B1 (1), B2 (4), B3 (5), B4 (6), B5 (8) et B6 (9), C1 (3) et d'un tétramère (2) (D'après Köhler *et al.*, 2008).

2.3.1.3. Degré de polymérisation

Le degré de polymérisation moyen (DP_n) correspond au nombre moyen d'unités monomériques qui constituent la procyanidine (Figure 25). La masse molaire de la procyanidine peut être calculée à partir de la masse molaire d'une unité de flavan-3-ols et du degré de polymérisation.

Le degré de polymérisation moyen en nombre peut être calculé en utilisant une réaction de solvolysse en milieu acide organique, sous certaines conditions de température, permettant ainsi de rompre les liaisons interflavoniques, en présence d'un excès de réactif nucléophile. Suite à la rupture des liaisons, un carbocation en position 4 se forme au niveau des unités d'extension et l'unité terminale est libérée dans le milieu réactionnel sous forme de flavan-3-ols libre. Le carbocation réagit avec un composé nucléophile (le benzylthioéther pour les réactions de thiolysse) pour former des dérivés benzylthioéthers issus des unités d'extension

(cf. Matériel et Méthodes § 3.1.5.1). Les unités d'extension modifiées sont ensuite quantifiées par HPLC (Guyot *et al.*, 1998 ; Sanoner *et al.*, 1999).

Les degrés de polymérisation varient en fonction du cultivar de pomme, de la localisation tissulaire et du stade de maturité. Ils peuvent être très faibles (de 4,2 à 7,5 dans le parenchyme des cultivars *Douce Coët Ligné* et *Juliana* respectivement) à très élevés (jusqu'à 50 dans le parenchyme du cultivar *Avrolles*) (Sanoner *et al.*, 1999). Dans le cultivar *Kermerrien*, le DPn varie de 4,5 dans le parenchyme, 6 dans l'épiderme, à 11,2 dans les pépins (Guyot *et al.*, 1998). Le degré de polymérisation semble diminuer avec la maturation du fruit (passant de 7 à 4,7 dans le parenchyme de pomme et de 9 à 5,8 dans la peau) (Alonso-Salces *et al.*, 2005). Renard *et al.*, 2007 ont observé une augmentation du degré de polymérisation de la variété *Avrolles* de 50 à 80 et une diminution du DPn pour la variété *Kermerrien* de 11 à 5 au cours de la croissance du fruit. Plus le degré de polymérisation est important, plus l'amertume diminue et plus le phénomène d'astringence augmente (Peleg *et al.*, 1999 ; Brossaud *et al.*, 2001). Noble (2000) a montré que les monomères de flavan-3-ols sont plus amers qu'astringents alors que les dimères et trimères de procyanidines sont plus astringents qu'amers. En revanche, ces particularités sont dépendantes de la concentration et de la taille des polyphénols (Lea et Arnold, 1978).

La conformation des procyanidines est modulée par ces trois caractéristiques que sont la nature des unités constitutives, le type de liaison et le degré de polymérisation. Une procyanidine riche en (+)-catéchine aura tendance à former une hélice tournant vers la droite, à l'inverse d'une procyanidine riche en (-)-épicatéchine (Fletcher *et al.*, 1977). De plus, les liaisons interflavaniques de type C4-C8 sont plus flexibles que les liaisons de type C4-C6 (De Freitas et Mateus, 2001). Et en milieu alcoolique, plus le degré de polymérisation est élevé plus la structure est rigide (Zanchi *et al.*, 2009).

2.3.2. Propriétés chimiques

2.3.2.1. Activité antioxydante

La capacité anti-oxydante des tannins condensés est attribuée à leur capacité à retarder ou inhiber la génération de radicaux libres responsables de la dégradation oxydative de macromolécules tels que les lipides, l'ADN ou encore les protéines et les polysaccharides

(Halliwell, 1995). Le rôle antioxydant des polyphénols met aussi en jeu d'autres mécanismes, soit par chélation de métaux soit par inhibition enzymatique.

La structure des procyanidines a un impact sur leur capacité anti-oxydante. La présence de groupements hydroxyles et leur position (en C3' et C4' par exemple) accroît l'activité tandis que la présence de groupements méthoxyles et de glycosyles en C3 l'inhibe (Yokozawa *et al.*, 1998). De plus, le type de liaison interflavanique et le type de monomère ont une influence sur leur stabilité à l'oxydation. La (-)-épicatéchine est plus stable que l'ester gallique d'épicatéchine tandis que les dimères B2 et B4 sont plus instables que leurs esters galliques (De Freitas *et al.*, 1998a).

2.3.2.2. Chélation des métaux

Les procyanidines sont capables de se lier aux différents cations de métaux comme le fer et le cuivre (Cu^{2+} par exemple) et ainsi de réduire la concentration de ces cations et de limiter leur activité oxydante (Janisch *et al.*, 2006). Cette forte capacité de chélation de métaux est liée à leurs groupements hydroxyles du noyau B. Enfin, plus le degré de polymérisation augmente, plus la stabilité des complexes procyanidines-métaux est élevée (Yoneda et Nakatsubo, 1998).

2.3.2.3. Réactivité

Comme vu précédemment les procyanidines appartiennent à la famille des tannins. Ce terme est défini comme la capacité des polyphénols à précipiter des protéines solubles. Dans la dernière partie bibliographique (§ 3.2), nous aborderons la réactivité des procyanidines et l'influence de cette réactivité sur les interactions entre les polyphénols et les protéines.

2.4. Devenir et impact dans l'organisme des tannins condensés

L'absorption et le métabolisme des polyphénols présents dans les aliments dépendent de plusieurs facteurs tels que la structure chimique, la conjugaison entre eux ou avec d'autres composés et la solubilité. Les polyphénols présentent des effets positifs sur la santé qui se manifestent par des effets préventifs sur des maladies cardiovasculaires ou des cancers (Guo *et al.*, 2009). En ce qui concerne les procyanidines, des effets sont montrés dès l'ingestion des fruits et légumes. Les tannins présents dans ces aliments entrent en contact avec les protéines riches en proline de la salive. Cette association est à la base du phénomène d'astringence (Vidal *et al.*, 2004). Les procyanidines traversent ensuite le tractus digestif. Il semble qu'elles soient insensibles aux variations de pH de l'estomac et que la plupart ne soient pas dégradées,

probablement aussi à cause de leurs associations préalables avec des protéines ou d'autres composés tels que les parois (Rios *et al.*, 2002 ; Serra *et al.*, 2009). Une faible proportion est absorbée dans l'intestin grêle et une part plus importante passe par le colon où les composés sont dégradés par le microbiote colique avant d'être absorbés (Serra *et al.*, 2011).

2.4.1. Biodisponibilité

De nombreuses études ont été réalisées sur la biodisponibilité des monomères de flavan-3-ols et des procyanidines par analyses *in vitro* et *in vivo*. Il semble que la (+)-catéchine et la (-)-épicatéchine présentes dans les aliments soient retrouvées dans le plasma directement après ingestion, mais elles sont également rapidement éliminées de l'organisme (Donovan *et al.*, 2002 ; Manach *et al.*, 2005). De plus, la (-)-épicatéchine est absorbée plus rapidement que la (+)-catéchine, ce qui suggère que la structure chimique des molécules joue un rôle dans l'absorption (Baba *et al.*, 2002).

Lors de l'administration de procyanidines B3, à des rats, aucun monomère de catéchine n'est retrouvé dans le plasma (Donovan *et al.*, 2002). Après administration orale de dimère de procyanidine B2 à des rats, Baba *et al.* (2002) n'ont détecté qu'une faible proportion (0,34%) sous forme de procyanidine B2 intacte dans l'urine. Cependant, Shoji *et al.* (2006) ont retrouvé différentes « tailles » de procyanidine de pomme allant du dimère aux pentamères dans le plasma de rat. Il semble donc que les polymères de procyanidines facilitent l'absorption des oligomères. De plus, Appeldoorn *et al.* (2009) ont montré que l'absorption des dimères A1 et A2 est plus élevée que celle du dimère B2. Ainsi, l'absorption des procyanidines est hautement dépendante du degré de polymérisation ainsi que du type de liaison interflavanique.

2.4.2. Métabolisme

Le principal site d'absorption des procyanidines est le colon où elles sont métabolisées en d'autres composés par le microbiote. Une étude *in vitro* en condition d'anoxie a montré que des dimères B3 et trimères C2 sont dégradés en métabolites de faible poids moléculaire au bout de 48 h (Déprez *et al.*, 2000). L'administration orale de crème de cacao contenant des monomères, dimères, trimères et tétramères de procyanidines a montré que de nombreux métabolites tels que la (-)-épicatéchine-glucuronide et le méthyl-catéchine-glucuronide sont retrouvés dans le plasma (Serra *et al.*, 2013).

Les monomères ou polymères de procyanidines sont métabolisés par les bactéries et forment des acides phénylpropioniques ou des acides para-hydroxyphénylacétiques (Déprez *et al.*, 2000 ; Tzounis *et al.*, 2008 ; Cueva *et al.*, 2013). La formation de diphényl-propane-diols serait due à un clivage du noyau C entre C1-C2 et C4-C10 ou entre C1-C2 et C3-C4 tout comme pour les flavonols (Selma *et al.*, 2009). Cette rupture serait suivie par le clivage du noyau A par lactonisation, qui libérerait des dérivés phényles valérolactones (Stoupi *et al.*, 2010). Ces dérivés proviendraient essentiellement du catabolisme des unités terminales de procyanidines dimériques (Appeldoorn *et al.*, 2009).

2.4.3. Effets physiologiques

2.4.3.1. Maladies cardiovasculaires

De nombreuses études épidémiologiques ont montré que la consommation de fruits et de légumes riches en polyphénols a un effet positif sur les maladies cardiovasculaires. Après la consommation de thé, d'oignons et de pommes, apportant plus de 29 mg de flavonoïdes par jour, 268 hommes sur 805 de l'étude de Hertog *et al.* (1993) ont montré une diminution de 68% du risque cardiovasculaire. En revanche, d'autres études n'ont montré aucun effet des flavonoïdes sur ces maladies (Knekt *et al.*, 1996).

Les flavan-3-ols agiraient contre les maladies cardiovasculaires par l'intermédiaire de leurs propriétés antioxydante, anti-inflammatoire et anti-thrombogénique. Les proanthocyanidines diminuent le niveau de cholestérol dans le plasma, inhibent l'oxydation des LDL (lipoprotéines de faible densité) et activent le monoxyde d'azote synthase (NOS) ce qui prévient l'agrégation des plaquettes et limite ainsi la formation de caillot sanguin (Figure 27) (Havsteen, 2002 ; Bagchi *et al.*, 2003).

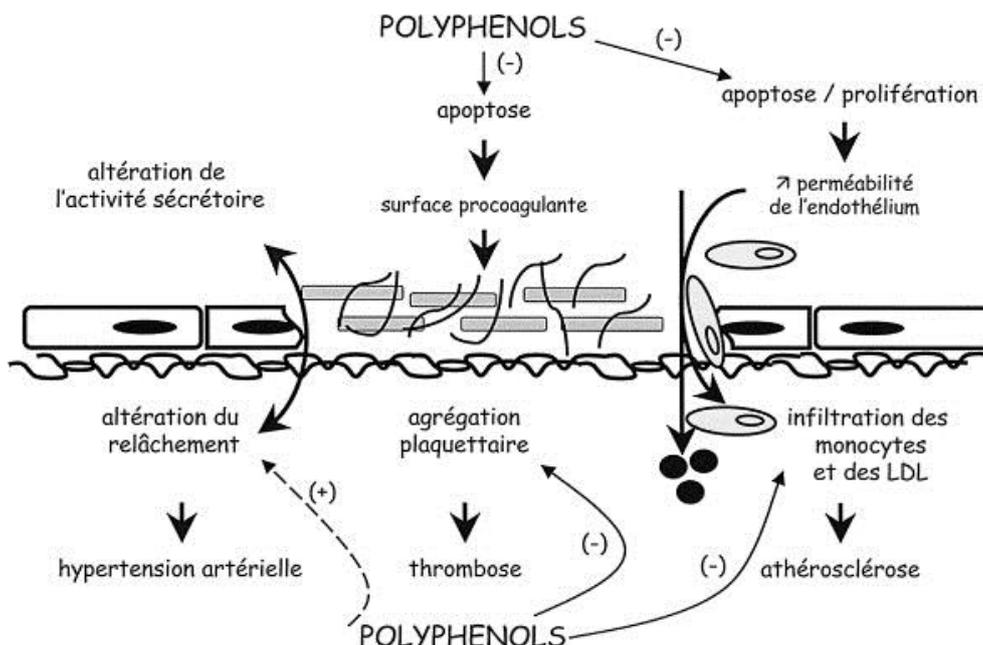


Figure 27 : Mécanismes d'action des polyphénols contre les maladies cardiovasculaires. D'après Martin et Andriantsitohaina, 2002.

2.4.3.2. Cancer

Les flavonoïdes semblent être des anticarcinogènes grâce à leurs actions sur les étapes d'initiation, de développement et de prolifération. Il semble que les flavonoïdes agissent sur les radicaux libres, qu'ils régulent les signaux de transduction de la croissance et de la prolifération cellulaire, et qu'ils induisent l'apoptose (Scalbert *et al.*, 2005 ; Lin, 2002). Les substances réactives à l'oxygène (ROS) sont capables d'endommager l'ADN et de provoquer des mutations. Si ces mutations touchent des gènes suppresseurs de tumeurs, alors il y aura l'initiation et la progression de cancer. L'inhibition de la carcinogénèse par les flavonoïdes serait liée à une diminution des concentrations de ROS (De Stefani *et al.*, 1999).

3. Interactions entre macromolécules

Les cellules végétales sont organisées, par les différentes membranes inter et intracellulaires en compartiments distincts tels que la paroi, composée principalement de polysaccharides, les plastes, et la vacuole, contenant les polyphénols. Dès lors que les membranes sont dégradées ou cassées par mastication ou traitement destructurant (thermique, mécanique), les compartiments sont rompus et libèrent leurs composants. Ainsi, les polyphénols se trouvent en contact avec les protéines (notamment de la salive lors de la mastication), mais également avec les polysaccharides des parois végétales.

De nombreuses études ont été réalisées sur les mécanismes d'interactions entre les polyphénols et les protéines, responsables notamment de la perception d'astringence dans le vin, mais beaucoup moins sur les analyses d'interactions entre les polyphénols et les polysaccharides de la paroi végétale.

Dans cette partie je vais tout d'abord présenter les différentes méthodes d'analyse d'interactions entre biomacromolécules, puis les interactions entre les polyphénols et les protéines, les interactions entre les polyphénols et les polysaccharides pour terminer par la présentation des interactions connues entre les polyphénols, les protéines et les polysaccharides. Je finirai par les conséquences de ces associations sur les propriétés physiques/biologiques des polyphénols.

3.1. Méthodes d'analyse des interactions

De nombreuses méthodes permettent d'analyser les interactions entre deux ou trois molécules. Elles diffèrent par les principes physiques et chimiques mis en jeu et par les résultats obtenus. Le Tableau V montre les techniques utilisées, les molécules étudiées et le type d'informations obtenues.

Un certain nombre de méthodes permettent de mesurer les forces d'interactions et la structure des complexes formés.

La **calorimétrie de titration isotherme** permet de mesurer les changements d'énergie provoqués par des interactions réversibles. Cette technique a été utilisée durant ma thèse et le principe est expliqué dans la partie Matériel et Méthodes (cf. § 3.2.3). La **diffusion dynamique de la lumière** permet l'étude de la distribution de la taille de molécules ou de particules et donc des complexes polyphénol-protéine ou polyphénol-polysaccharide. La

néphélométrie mesure la turbidité du milieu, c'est-à-dire la teneur des particules en suspension. La **spectroscopie UV-visible** permet d'une part de contrôler la formation d'un trouble à une longueur d'onde où aucun des composés n'absorbe, mais aussi d'observer les phénomènes d'adsorption entre molécules. Cette technique a également été utilisée au cours de ma thèse, tout comme la **fluorescence** qui est basée sur la capacité « d'extinction » de la fluorescence du chromophore d'une molécule par une autre. Le **dichroïsme circulaire** analyse les changements de structure secondaire et tertiaire des protéines causés par leurs associations avec les polyphénols.

La **spectrométrie de masse** permet de caractériser les modifications chimiques des composés avant et après association.

D'autres techniques permettent de comprendre quelle structure du ligand interagit avec quelle structure de la protéine ou du polysaccharide. La **résonance magnétique nucléaire** utilise des mesures à une ou deux dimensions permettant de définir la proximité entre les molécules et la zone de la protéine, du peptide ou du polysaccharide qui est affectée par le ligand. En revanche, cette technique est limitée par la taille des molécules. De même, la **diffraction des rayons X** donne une information sur la structure des complexes par l'intermédiaire des sites de liaisons.

D'autres techniques permettent de mesurer les forces d'interactions mais nécessitent la fixation d'un des deux composés, avec un risque d'altération des conformations. La **chromatographie d'affinité** permet de sélectionner les molécules qui se fixent à un ligand immobilisé sur une résine et d'identifier le type de liaisons impliquées, tout comme la **résonance plasmonique de surface** (technique utilisée pendant ma thèse et dont le principe est détaillé dans la partie Matériel et Méthodes (cf. § 3.2.4). La **microbalance à cristal de quartz** peut également être utilisée pour quantifier l'adsorption de molécules à la surface du ligand.

Le tableau (Tableau V) suivant présente les techniques expliquées précédemment et les résultats obtenus lors des études d'interactions entre les polyphénols et les protéines ou les polysaccharides. Quelle que soit la technique utilisée, les polyphénols cibles sont très couramment des monomères de flavan-3-ols ainsi que des polymères de faible degré de polymérisation. C'est d'autant plus vrai pour les études par RMN, qui nécessitent des composés purs et de petite taille afin de faciliter le retraitement des spectres. Les protéines étudiées sont également soit de petite taille (des peptides) soit des protéines modèles comme la sérum albumine bovine (SAB) qui présente une structure « globulaire » ou la gélatine qui

présente une structure plutôt « linéaire ». De même, les polysaccharides étudiés (molécules soulignées dans le tableau) sont des polysaccharides modèles comme la cyclodextrine ou des dextrans.

Les méthodes les plus utilisées sont la calorimétrie généralement couplée avec l'analyse par diffusion dynamique de la lumière, permettant de définir des paramètres thermodynamiques d'interactions ainsi que la caractérisation d'agrégats ou de précipitats. Une autre méthode commune est la spectrophotométrie UV-Visible, qui permet à la fois de comprendre les capacités d'absorption des composés et de mettre en évidence la formation de troubles en travaillant à des longueurs d'ondes différentes.

Tableau V : Techniques utilisées et données obtenues sur les analyses d'interactions entre les polyphénols et les protéines ou les polysaccharides (composés soulignés).

Technique utilisée	Polyphénols	Protéines ou <u>Polysaccharides</u>	Résultats obtenus	Références
Calorimétrie de titration isotherme (ITC)	Tannins hydrolysables	SAB et gélatine	$K_a=0,15 \text{ et } 33 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$	Frazier <i>et al.</i> , 2010
	Epicatechine	SAB	$K_a=0,02 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$	Frazier <i>et al.</i> , 2006
	Epigallocatechine gallate (EGCG)	Protéine salivaire humaine (PRP IB5)	?	Pascal <i>et al.</i> , 2007
	Procyanidines galloylées	Poly(L-proline)	$K_a=70 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$	McRae <i>et al.</i> , 2010
	Procyanidines galloylées (DPn 4)	Poly(L-proline)	$K_a=34 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$	Poncet-Legrand <i>et al.</i> , 2007
	Procyanidines	Lysozyme et α -lactalbumine	$K_a=50 \text{ et } 15 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$	Prigent <i>et al.</i> , 2009
	EGCG	Peptide béta-42 amyloïde	$K_a=0,01 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$	Wang <i>et al.</i> , 2010
	Catéchine	<u>β-cyclodextrine</u>	$K_a=0,89 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$	Kriz <i>et al.</i> , 2003
	Procyanidines (DPn 9)	<u>Pectines extraites de paroi végétale chauffée et lyophilisée</u>	$K_a=1,4 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$	Le Bourvellec <i>et al.</i> , 2012b
Diffusion dynamique de la lumière (DLS)	EGCG et ECG	Peptides riches en proline	Informations sur la taille de particules et sur l'agrégation (non chiffrées)	Charlton <i>et al.</i> , 2002a
	Catéchine, épicatechine, EGC, ECG et EGCG	Poly(L-proline)		Poncet-Legrand <i>et al.</i> , 2006
	EGCG	Protéine salivaire humaine		Pascal <i>et al.</i> , 2007

		(PRP IB5)		
	Procyanidines	α -amylase		Soares <i>et al.</i> , 2009
	Tannins de pépins de raisin	<u>Rhamnogalacturonane II, arabinogalactane-protéine et mannoprotéines</u>		Riou <i>et al.</i> , 2002
Néphélométrie	Acide tannique et catéchine	Gélatine, gliadine, lysozyme et polyproline	Formation d'un trouble mesuré en unité néphélométrique (non chiffré)	Siebert <i>et al.</i> , 1996
	Oligomères de procyanidines de pépins de raisin	SAB		De Freitas <i>et al.</i> , 2003
	Catéchine, épicatechine, ECG, procyanidines B1, B2, B3, B4...	SAB, α -amylase et protéine salivaire riche en proline		De Freitas et Mateus, 2001 et 2002
	Procyanidine de pépins de raisin	SAB, α -amylase et protéine salivaire riche en proline		Mateus <i>et al.</i> , 2004b
	Oligomères de procyanidines	SAB		Carvalho <i>et al.</i> , 2006b
Dichroïsme circulaire (DC)	Acides phénoliques, quercétine et rutine	SAH, SAB et lysozyme	Spectres obtenus mais pas de données chiffrées	Rawel <i>et al.</i> , 2005
	EGCG	Protéine salivaire humaine (IB5)		Pascal <i>et al.</i> , 2007

Spectroscopie UV-visible	Catéchine, épicatechine, EGC, ECG et EGCG	Poly(L-proline)	Pas de changement de l'absorbance à 600 nm pour l'épicatechine et EGC	Poncet-Legrand <i>et al.</i> , 2006
	Anthocyanes de jus de cassis	<u>Pectine de betterave sucrière</u>	Effet bathochrome de 50 nm	Buchweitz <i>et al.</i> , 2012b
Fluorescence	quercétine	SAH et SAB	Constantes de dissociation : $K_d=2$ et 9×10^{-5} M	Rawel <i>et al.</i> , 2006
	Catéchine, procyanidine B2, B4 et oligomères et malvidine-3-glucoside	SAB et α -amylase	Constantes de quenching : Varie de 0,14 à $0,21 \times 10^5$ M ⁻¹ pour la catéchine et la procyanidine B2 respectivement avec l' α -amylase et de $0,09 \times 10^5$ M ⁻¹ entre la catéchine et la SAB	Soares <i>et al.</i> , 2007
	Quercétine, kampférol, quercitrine et myricétine	SAB	Constantes de liaisons : myricétine $4,9 \times 10^8$ M ⁻¹ ; quercétine $3,6 \times 10^7$ M ⁻¹ ; kampférol $2,6 \times 10^6$ M ⁻¹ ; quercitrine $6,7 \times 10^3$ M ⁻¹	Xiao <i>et al.</i> , 2008
	Quercétine	SAH	Constante de liaison de $1,9 \times 10^5$ M ⁻¹	Sengupta <i>et al.</i> , 2002
	Quercétine, acide chlorogénique et rutine	<u>β-cyclodextrine</u>	Constantes de stabilité : Quercétine 1138 M ⁻¹ ; acide chlorogénique 465 M ⁻¹ ; rutine 224 M ⁻¹	Alvarez-Parrilla <i>et al.</i> , 2005

Spectrométrie de masse	EGC, ECG, EGCG, procyanidine B2	Protéine salivaire humaine (PRP IB5)	E_{com} (énergie du centre de masse du complexe)=0,26 ; 0,40 ; 0,45 ; 0,55	Canon <i>et al.</i> , 2009
Résonance magnétique nucléaire (RMN)	Phénols de thé	Extrait de protéine salivaire humaine	Informations sur les déplacements chimiques induits par les interactions	Luck <i>et al.</i> , 1994
	Procyanidine B2 et épicatechine	Fragment de protéine riche en proline		Baxter <i>et al.</i> , 1997
	Resvératrol	Neurotensine		Richard <i>et al.</i> , 2005
	EGCG	Protéine salivaire humaine (PRP IB5)		Pascal <i>et al.</i> , 2009
	EGCG	Protéine salivaire humaine (PRP IB5)		Cala <i>et al.</i> , 2010
	EGCG, EGC, ECG et épicatechine	<u>β-cyclodextrine</u>		Hayashi <i>et al.</i> , 2010
	EGCG et gallocatéchine gallate	<u>γ-cyclodextrine</u>		Ishizu <i>et al.</i> , 2009
Rayon X (SAXS)	EGCG et procyanidines de pépins de raisin	Protéine riche en proline glycosylée	?	Pascal <i>et al.</i> , 2008
	EGCG	β -caséine	Rayon de giration diminue par rapport à la caséine seule	Jobstl <i>et al.</i> , 2004
	Procyanidines (DPn 2, 4, 10 et 35)	<u>Hyaluronanes (30, 50, 60 et 100 kDa)</u>	Le DPn entraîne différentes structures de complexes tannins-polysaccharides	Carn <i>et al.</i> , 2012

Chromatographie d'affinité	Épicatéchine, procyanidine B3	<u>Gel de dextrane</u>	Constantes d'affinité : $K_{av}=1,83$ et $2,36$	McManus <i>et al.</i> , 1985
Résonance plasmonique de surface (RPS)	Ellagitannins (vescaline)	Topoisomérase de type II α	Pas de paramètres thermodynamiques définis	Douat-Casassus <i>et al.</i> , 2009
	Vescalagine	F et G-actines et SAB		Quideau <i>et al.</i> , 2011
	EGCG, EGC, ECG et épicatechine	<u>β-cyclodextrine</u>	Nombre d'unités de résonance d'interactions: 323 RU pour EGCG, 326 RU pour ECG, 90 RU pour EGC et 90 RU pour épicatechine	Hayashi <i>et al.</i> , 2010
Microbalance à cristal de quartz (QCM)	EGCG	SAB	Augmentation de ΔF (déplacement de la fréquence de résonance) et diminution de ΔD (déplacement de l'énergie de dissipation)	Wang <i>et al.</i> , 2007

SAB (sérum albumine bovine), SAH (sérum albumine humaine), EGCG (épigallocatechine gallate), ECG (épicatechine gallate), EGC (épigallocatechine), K_a est la constante d'affinité, K_d est la constante de dissociation, RU est l'unité de résonance.

3.2. Interactions polyphénols-protéines

Les polyphénols capables de se lier à des protéines sont appelés « tannins », par référence au processus de tannage qui transforme le collagène des peaux en cuir. Dans le domaine alimentaire, les polyphénols sont responsables de caractères organoleptiques comme la couleur et la flaveur. La couleur des anthocyanes peut être stabilisée par des protéines et les tannins associés aux protéines entraînent une perception d'astringence. Les polyphénols sont également capables d'agir comme inhibiteurs enzymatiques. Tous ces effets sont le résultat d'interactions non-covalentes, c'est-à-dire réversibles. En revanche, dans certaines conditions de pH et de température, les interactions entre les polyphénols et les protéines peuvent également entraîner la formation d'adduits par l'intermédiaire de liaisons covalentes (irréversibles).

3.2.1. Interactions non-covalentes

D'un point de vue physiologique, les premières protéines capables d'interagir avec les polyphénols se situent dans la cavité buccale dès l'étape de mastication du fruit et du légume. Les protéines salivaires impliquées sont principalement les protéines riches en proline (PRPs) (70% des protéines salivaires), l' α -amylase (Baxter *et al.*, 1997 ; De Freitas et Mateus, 2001 ; Pascal *et al.*, 2007 ; Soares *et al.*, 2007 ; McRae *et al.*, 2010) ainsi que les histatines riches en histidine (Yan et Bennick, 1995). De nombreuses études ont été menées sur ces protéines, mais également sur les protéines du plasma comme l'albumine de sérum humain (SAH) ainsi que sur l'albumine modèle de sérum bovin (SAB) (Frazier *et al.*, 2003 ; Frazier *et al.*, 2006 ; Prigent *et al.*, 2009 ; Ferrer-Gallego *et al.*, 2012). D'autres protéines sont capables d'interagir avec les polyphénols comme la trypsine (enzyme synthétisée par le pancréas) (Nyamambi *et al.*, 2000 ; He *et al.*, 2007 ; Gonçalves *et al.*, 2010, 2011b) ou encore la protéine Tau via le peptide β -amyloïde (Wang *et al.*, 2010 ; Cheng *et al.*, 2013). Les interactions de polyphénols avec ces différentes protéines sont en lien avec leurs effets sur la perception d'astringence ou sur la santé comme l'impact sur la maladie d'Alzheimer via la protéine Tau.

3.2.1.1. Rappel sur les protéines

Les protéines sont caractérisées par un enchaînement d'acides aminés reliés par des liaisons peptidiques. Ces acides aminés sont arrangés de façon linéaire, définie par le code génétique et correspondent à la structure primaire des protéines. Selon la séquence de résidus protéiques

qui constituent cette structure primaire, la protéine peut adopter différentes structures secondaires, les principales étant les hélices alpha ou les feuillets bêta. Dans cette structure secondaire, les protéines se replient sur elles-mêmes pour permettre la formation de liaisons hydrogènes entre les acides aminés. Enfin, les structures secondaires s'organisent les unes par rapport aux autres pour former une structure tertiaire, impliquant des ponts disulfures.

Les protéines salivaires les plus présentes sont les protéines riches en proline (PRPs), constituées d'environ 40% de proline, 21% de glycine et de 17% de glutamine (Mehansho *et al.*, 1987). Ces protéines sont classées en trois groupes : les PRPs acides, basiques ou glycosylées. Parmi ces trois familles, les PRPs basiques semblent être les plus impliquées dans les interactions avec les tannins du fait de leur structure fibrillaire. Ces PRPs peuvent être séparées en 2 groupes distincts en fonction de leur poids moléculaire : Ps1 et Ps2 correspondant aux PRPs de haut poids moléculaire et les protéines de faible poids moléculaire avec peu ou pas de carbohydrates nommés de IB1 à IB9 (Kauffman *et al.*, 1991).

3.2.1.2. Mécanismes d'interactions

La précipitation des protéines par les tannins implique la formation de liaisons hydrogènes entre les groupements hydroxyles des composés phénoliques et les groupements carbonyles et amines des protéines, mais aussi des interactions hydrophobes entre les noyaux aromatiques des polyphénols et les acides aminés apolaires des protéines. Des liaisons ioniques peuvent également être impliquées entre les ions phénolates et les cations protéiques (Figure 28).

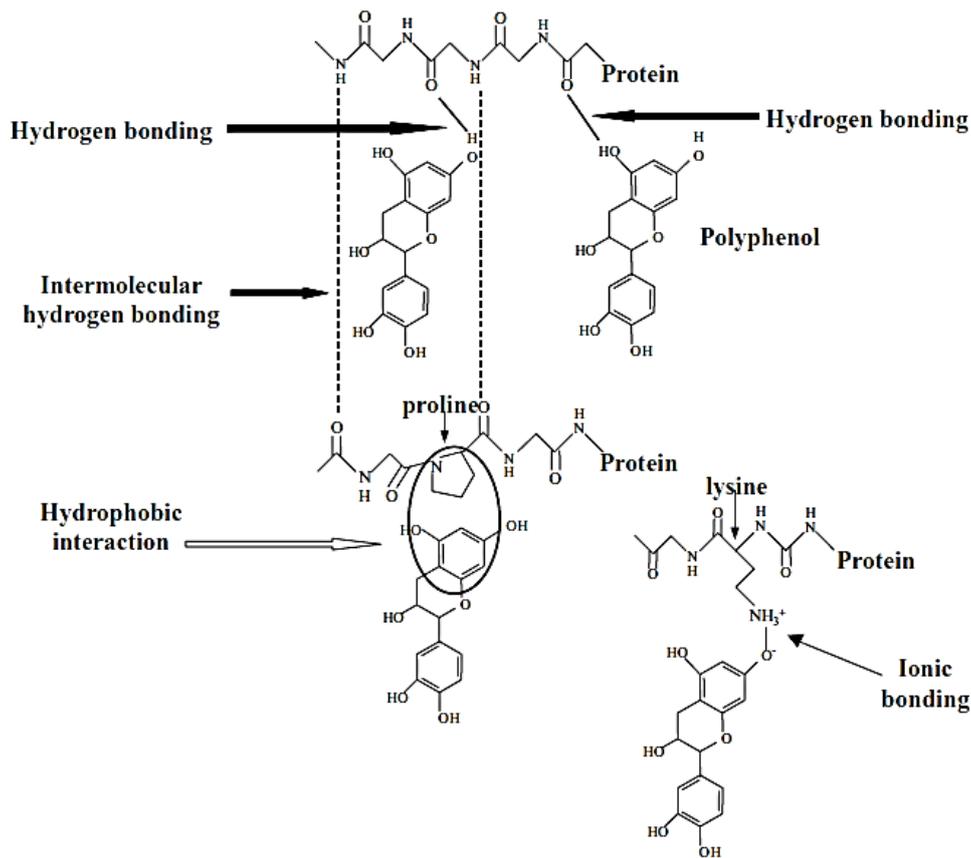


Figure 28 : Les différents mécanismes potentiels d'interactions entre polyphénols et protéines (D'après Le Bourvellec et Renard, 2012a).

Afin de définir l'implication des liaisons hydrogènes dans la formation de complexes polyphénols-protéines, des ajouts de diméthyl formamide (accepteur pour les liaisons hydrogènes) et de dioxane (solvant non polaire) ont été effectués dans des solutions de catéchine et de polypeptide. Ces deux solvants ont montré un effet inhibiteur sur la formation du complexe tannin-protéine prouvant que les liaisons hydrogènes jouent un rôle majeur dans ces interactions (Siebert *et al.*, 1996).

L'analyse d'interactions entre une procyanidine B3 et un fragment de protéine salivaire (IB7) par résonance magnétique nucléaire (RMN), dichroïsme circulaire (DC) et spectrométrie de masse a montré que cette procyanidine se lie avec les sites hydrophiles du peptide salivaire. Les liaisons entre ces deux composés seraient des liaisons hydrogènes entre les groupements carbonyles des protéines et les groupements hydroxyles des noyaux aromatiques et des catéchols de la procyanidine (Simon *et al.*, 2003).

L'implication des liaisons hydrogènes dans ces interactions a également été confirmée par Canon *et al.* (2010) grâce aux analyses d'interactions entre des polyphénols possédant divers

degrés d'hydroxylation (épigallocatechine, épicatechine gallate, épigallocatechine gallate, procyanidine B2 et procyanidine B2 gallate) et des protéines salivaires (PRP et IB5) par spectrométrie de masse. L'énergie « E_{com} » reliée à la stabilité des complexes augmente avec l'augmentation du degré d'hydroxylation des tannins. Le complexe procyanidine B2 – IB5 est plus stable que le complexe épigallocatechine – IB5 (Canon *et al.*, 2010). De même, Frazier *et al.* (2006) ont montré par calorimétrie de titration isotherme (ITC) que l'association entre l'épicatechine et la SAB est exothermique (dégagement de chaleur) et que l'enthalpie est favorable, ce qui implique que le complexe épicatechine-SAB est formé par des liaisons hydrogènes.

En calorimétrie (ITC), les changements d'entropie reflètent les effets hydrophobes et les changements de conformation, tandis que les changements d'enthalpie reflètent les conséquences des liaisons hydrogènes (Poncet-Legrand *et al.*, 2007). Après analyse des interactions entre les tannins condensés et la gélatine ou la SAB par ITC, une entropie positive a été obtenue entre les 5-déoxy proanthocyanidine de mimosa ou les procyanidines de sorgho et la SAB, à la différence de l'association avec la gélatine. Bien que les liaisons hydrogènes soient le facteur dominant des interactions entre procyanidines et gélatine, des interactions hydrophobes sont également impliquées entre les procyanidines et la SAB (Frazier *et al.*, 2010). L'implication des interactions hydrophobes a été analysée et validée par ITC en faisant varier la température d'interaction. L'enthalpie des liaisons entre poly-L-proline et tannins augmente avec l'augmentation de la température, montrant que l'association est due à des interactions hydrophobes (McRae *et al.*, 2010). Oh *et al.* (1980) ont également obtenu une augmentation des interactions par l'augmentation de la température et de la force ionique, démontrant l'implication des interactions hydrophobes et des liaisons hydrogènes.

Un mécanisme majeur dans les interactions est le « stacking π - π » qui est une force attractive entre des noyaux aromatiques et plus précisément l'alignement du potentiel électrostatique positif d'un des noyaux aromatiques sur le potentiel électrostatique négatif d'un autre noyau aromatique. Les tannins ont tendance à s'agréger avant d'interagir avec les protéines par « stacking π - π » entre les noyaux aromatiques. La RMN montre que les interactions entre des tannins C2 et des peptides IB7 sont dues aux interactions hydrophobes par « stacking » entre les noyaux phénoliques et les résidus de proline (Baxter *et al.*, 1997 ; Cala *et al.*, 2010).

Il existe également des interactions électrostatiques entre les protéines et les polyphénols qui varient en fonction du pH.

Afin de montrer l'implication d'interactions électrostatiques dans les interactions entre polyphénols et protéines, des mesures par microbalance à cristal de quartz (QCM) ont été

menées sur la théarubigine et la SAB à des pH de 3, 4,9 et 7. A pH 3, la quantité de théarubigine absorbée est maximale, alors que la quantité minimale est obtenue à pH 7. Ces résultats ont été interprétés par Chitpan et al. (2007) comme le fait qu'à pH acide, de fortes attractions électrostatiques jouent un rôle dans l'association entre la SAB et les molécules de théarubigine, tandis qu'à pH neutre, une répulsion électrostatique apparaît. Cependant ces effets n'ont pas été observés dans les interactions entre l'acide 5'-caféoylquinique et la SAB (Prigent, 2005).

De nombreuses interactions sont possibles en lien avec les structures et la diversité des protéines. Les différents types d'interactions peuvent être retrouvés en même temps, ce qui implique que les interactions ne sont pas régies par un mais par des mécanismes complémentaires. Ainsi, les associations entre flavonoïdes et SAB sont régies par les liaisons hydrogènes, les interactions hydrophobes et les interactions électrostatiques sans dominance particulière pour un type de liaison (Papadopoulou *et al.*, 2005).

3.2.1.3. Influence de la structure et de la conformation des polyphénols

L'association des protéines aux polyphénols peut être influencée par la structure, c'est-à-dire la taille et la composition et par la conformation des polyphénols dans le milieu dans lequel la complexation a lieu.

Structure

Des analyses d'interactions réalisées par néphélométrie et diffusion dynamique de la lumière entre la poly-L-proline et des monomères comme la (-)-épicatéchine ou la (+)-catéchine ont montré une plus forte activité tannique pour la (+)-catéchine que pour la (-)-épicatéchine (De Freitas et Mateus, 2001 ; Poncet-Legrand *et al.*, 2007). La stéréochimie du noyau pyrane (du carbone C3) des flavan-3-ols joue donc un rôle sur la capacité d'interaction avec les protéines ; et la conformation 3S présenterait un meilleur positionnement par rapport à la protéine. Toujours avec la poly-L-proline, une comparaison des monomères (+)-catéchine et (-)-épigallocatechine (qui possède un groupement hydroxyle supplémentaire sur le noyau B) montre la formation de particules uniquement avec la (+)-catéchine, ce qui peut être dû à une plus faible solubilité, qui lui permet de s'associer préférentiellement avec la protéine (Poncet-Legrand *et al.*, 2007). La position et le nombre de groupements hydroxyles et/ou méthoxyles sur les flavonoïdes ont un impact sur la liaison avec les protéines de plasma humain. L'hydroxylation en C4' des flavones et des flavonols, ainsi que l'hydroxylation en C5 des

isoflavones diminuent les affinités pour les protéines de plasma humain. En revanche, l'hydroxylation d'autres carbones n'affecte pas l'affinité de liaison (Xiao *et al.*, 2011).

D'autres études ont confronté des monomères de flavan-3-ols non galloylés (catéchine, épicatechine et épigallocatechine (EGC)) et des monomères galloylés (épicatechine gallate (ECG) et épigallocatechine gallate (EGCG)) (Figure 29) à des protéines comme l' α -amylase et la poly-L-proline. L'extinction de fluorescence montre que la constante de liaison entre la catéchine et l' α -amylase est plus faible (14100 M^{-1}) qu'entre la (-)-épicatechine-gallate et l' α -amylase (19500 M^{-1}) (Soares *et al.*, 2007). Des analyses par diffusion dynamique de la lumière (DLS) ont confirmé qu'il n'y a pas de formation de particules entre les monomères non galloylés de flavan-3-ols en solution éthanolique modèle, à la différence des monomères galloylés qui ont tendance à s'agréger (Poncet-Legendre *et al.*, 2003). L'augmentation du nombre de groupements hydroxyles apportés par l'acide gallique des monomères galloylés favoriserait leur auto-association, ce qui expliquerait les différences observées.

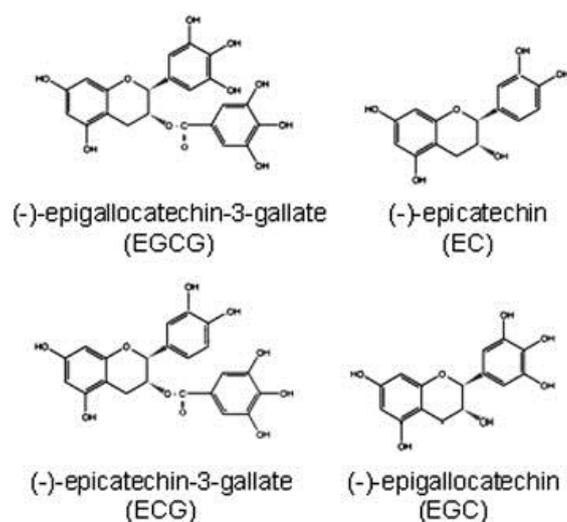


Figure 29 : Structure chimique de la (-)-épicatechine, de la (-)-épicatechine gallate (ECG), de la épigallocatechine (EGC) et de la épigallocatechine gallate (EGCG) (D'après Coyle *et al.*, 2008).

De plus, l'estérification de la (-)-épicatechine par de l'acide gallique conduit à une activité tannique plus élevée avec la poly-L-proline (de 0,65 pour la (-)-épicatechine à 2,25 pour la (-)-épicatechine gallate) (De Freitas et Mateus, 2001). La (-)-épicatechine gallate a un potentiel d'extinction de la fluorescence du tryptophane de la SAB plus élevé que la (-)-épigallocatechine-gallate et que la (-)-épigallocatechine. Les constantes d'extinction de fluorescence sont de $27,2 \times 10^{13}$; de $18,4 \times 10^{13}$ et de $1 \times 10^{13} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Skrut *et al.*, 2012). Ces

données indiquent que les groupements galloyles sont capables de former un complexe avec la surface du tryptophane, mais aussi que plus le degré d'hydroxylation du noyau B est faible, plus l'association est importante. Ce phénomène peut être expliqué par un certain encombrement stérique provoqué par la présence de 3 groupements hydroxyles et l'acide gallique.

La stéréochimie des monomères de flavan-3-ols, le niveau d'hydroxylation du noyau B et l'estérification par un acide gallique augmentent l'affinité du polyphénol pour la protéine. Mais qu'en est-il de la taille du polyphénol et de sa conformation ?

Polymérisation et conformation

L'affinité de liaison à la poly-L-proline est plus élevée pour le dimère de procyanidine B2 que pour la (-)-épicatéchine (Baxter *et al.*, 1997). Plus le degré de polymérisation (DP) des procyanidines augmente, plus les constantes d'affinité (K_a) augmentent. De même, l' α -lactalbumine s'associe plus fortement avec des procyanidines de degré de polymérisation de 7,4 ($K_a = 8,7 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$) qu'avec des procyanidines de degré de polymérisation de 5,5 ($K_a = 1,5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$) (Prigent *et al.*, 2009). Par spectrométrie de masse, les énergies de complexe (E_{com}) entre le peptide IB5 et le monomère EGC ou le dimère de procyanidine B2 augmentent de 0,26 à 0,55 respectivement (Canon *et al.*, 2010). De plus, les procyanidines oligomériques (avec un DP moyen de 7,2) précipitent moins avec les protéines salivaires que les procyanidines polymériques (avec un DP moyen de 25,2), ce qui suggère que les polymères ont une réactivité plus élevée avec les protéines salivaires (Sun *et al.*, 2013). Cette différence de capacité de liaison des procyanidines semble être due au caractère multidenté qu'elles possèdent permettant leurs liaisons à plusieurs sites des protéines (Haslam, 1996). Cependant, l'augmentation du degré de polymérisation des polyphénols entraîne également une diminution de la flexibilité de ces molécules.

De Freitas et Mateus (2002) ont montré que l'affinité des procyanidines pour la poly-L-proline, l' α -amylase et la SAB, diminue quand leur DP est supérieur à 12 et l'expliquent par leur flexibilité. La flexibilité peut être liée à la composition des polyphénols et plus particulièrement aux liaisons entre les phénols. Ainsi, les gallotannins se lient à la SAB et à la gélatine avec le même ordre de grandeur (10^4 à 10^5 M^{-1}), tandis que les ellagitannins (gallotannins reliés par une liaison C-C) (Figure 30) présentent une affinité pour la SAB de l'ordre de 10^6 M^{-1} et de 10^2 M^{-1} pour la gélatine. Ces différences d'affinité seraient dues à la

différence de flexibilité, les gallotannins étant plus flexibles que les ellagitannins (Deaville *et al.*, 2007). Par ailleurs, les liaisons interflavoniques des tannins condensés influencent la flexibilité de la molécule et ainsi l'association avec les protéines. Les dimères B3 et B4 liés en C4-C8 ont une affinité plus élevée pour des protéines riches en proline que leurs analogues liés en C4-C6. Les liaisons C4-C8 semblent être plus flexibles que les liaisons C4-C6 et facilitent la liaison avec les protéines (De Freitas et Mateus, 2001).

De même, l'affinité des protéines riches en proline vis-à-vis du dimère de procyanidine B3 est plus élevée qu'avec le dimère B4 (De Freitas et Mateus, 2001). Les liaisons interflavoniques sont les mêmes mais les unités constitutives diffèrent. La procyanidine B3 est un dimère (+)-catéchine-(4→8)-(+)-catéchine, tandis que la procyanidine B4 est un dimère (+)-catéchine-(4→8)-(-)-épicatéchine et le dimère B3 est plus présent sous une conformation « compacte » que le dimère B4 (98% et 76% respectivement) (Cala *et al.*, 2011).

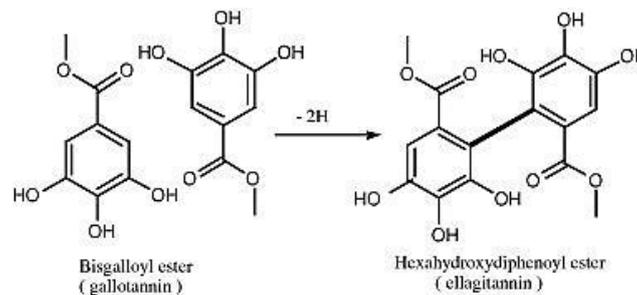


Figure 30 : Structure chimique d'ellagitannin par association de gallotannins (D'après Haslam, 2007).

3.2.1.4. Influence de la structure des protéines

Les protéines varient par leur composition, leur structure et leur conformation.

La composition en acides aminés des protéines a un impact sur leurs associations avec les polyphénols. Les interactions sont plus fortes entre les polyphénols et les prolines ou les hydroxyprolines qu'avec d'autres acides aminés comme la phénylalanine (Siebert, 1999 ; Charlton *et al.*, 2002b). Cependant, les associations entre l'épigallocatechine gallate (EGCG) et la gélatine sont plus faibles qu'entre l'EGCG et la β -caséine alors que la gélatine est plus riche en proline (Bohin *et al.*, 2012). Outre la proline, l'histidine semble être capable de se lier avec les composés phénoliques (Wroblewski *et al.*, 2001).

Les protéines peuvent être structurées de type globulaire c'est-à-dire compactes comme la SAB ou non structurées de type hélicoïdal c'est-à-dire allongées comme la gélatine. Les affinités entre les catéchines ou les proanthocyanidines et la SAB sont plus faibles qu'avec la gélatine (Frazier *et al.*, 2010). Les groupements carbonyles sont plus exposés pour la

formation de liaisons hydrogènes dans la gélatine, tandis que la forme globulaire diminue la possibilité de formation de liaisons hydrogènes (Hagerman et Butler, 1981).

Cependant, les répétitions de proline dans les protéines riches en proline entraînent une conformation en hélice qui diminue la flexibilité des protéines et limite l'association avec un ligand (Richard *et al.*, 2005).

3.2.1.5. Influence des conditions externes

Ratio polyphénols/protéines

Ces interactions polyphénols-protéines sont influencées par le rapport des concentrations des polyphénols et des protéines, ainsi que par les niveaux de concentration (Figure 31). En faisant varier les concentrations en gliadine de 0 à 125 mg/L et en acide tannique de 0 à 250 mg/L, la formation de trouble augmente avec l'augmentation des concentrations de ces deux composés (Siebert *et al.*, 1996). De plus, à une concentration fixe en gliadine, le trouble apparaît avec l'augmentation de la concentration en acide tannique et inversement. Plus récemment, ces comportements ont été validés par Poncet-Legrand *et al.* (2006) en étudiant l'interaction entre EGCG et la poly-L-proline avec une variation des concentrations en EGCG de 0,01 à 1 mM, correspondant à des ratios molaires EGCG/protéines variant de 0,33 à 33. A faible concentration en EGCG (faible ratio EGCG/protéine), le polyphénol se fixe sur la protéine mais aucun phénomène d'agrégation n'apparaît. A des ratios molaires plus élevés, la EGCG forme des ponts sur la protéine déjà couverte par EGCG, ce qui entraîne la formation quasi-immédiate d'agrégats. En augmentant encore plus le ratio molaire, de gros colloïdes se forment et un trouble apparaît (Poncet-Legrand *et al.*, 2006 ; Pascal *et al.*, 2007). Lorsque la concentration en protéine est augmentée, la formation d'agrégats apparaît à des ratios plus faibles (Poncet-Legrand *et al.*, 2006 ; Pascal *et al.*, 2007). Ces études ont ainsi montré que les concentrations en protéines et en polyphénols ainsi que leur ratio ont un fort effet sur la formation de trouble.

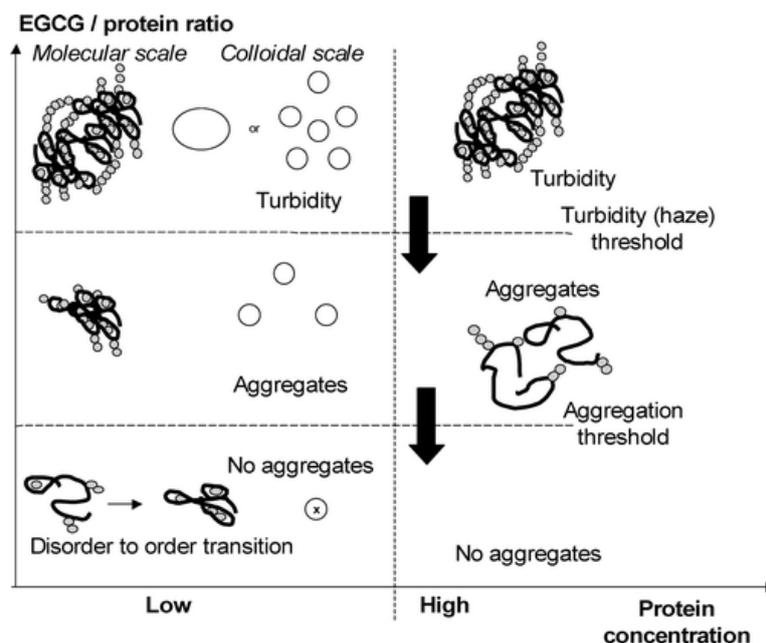


Figure 31 : Mécanismes d'interactions entre EGCG et IB5 en fonction du ratio polyphénol/protéine (Pascal *et al.*, 2007). Les cercles gris représentent les molécules d'EGCG, les lignes noires sont les protéines IB5 et les cercles blancs correspondent aux agrégats.

Température

La température a un impact sur l'enthalpie des liaisons formées entre les polyphénols et les protéines (cf. 3.2.1.1. mécanismes d'interactions).

Force ionique

Les effets de la force ionique sur les interactions entre les polyphénols et les protéines sont complexes et dépendent des partenaires en présence. Plus la force ionique augmente, plus l'interaction entre des tannins hydrolysables et des protéines augmente (Hagerman *et al.*, 1998). De plus, l'ajout de NaCl (0,8 M) dans le jus de pomme semble augmenter la formation de trouble par un phénomène de catalyse plutôt que par un effet sur le trouble en lui-même (Tajchakavit *et al.*, 2001). Plus récemment, Rawel *et al.* (2005) ont validé le fait que plus la force ionique augmente, plus l'interaction entre la SAB et la quercétine est faible (Rawel *et al.*, 2005). Cependant, à une température de 25°C, il semble que des différences de force ionique entre 0,027 et 0,1 M n'aient pas d'effet sur les interactions entre des procyanidines de DP 5,5 et l' α -lactalbumine, même après une longue période d'incubation (Prigent *et al.*, 2009). Il reste difficile de savoir si l'effet de la force ionique est lié à des modifications de conformation des protéines ou des polyphénols, voire à une modification des propriétés du solvant ; tous ces mécanismes ont été mis en cause.

pH

Le pH influence la liaison entre les polyphénols et les protéines. L'affinité et la précipitation des protéines diminuent à pH faible et fort (inférieur à 2 et supérieur à 8), mais sont optimales lorsque le pH est proche du point isoélectrique de la protéine, c'est-à-dire quand les forces de répulsions entre les protéines sont minimales (Hagerman et Butler, 1981). Naczka *et al.* (1996) ont montré que le pH optimal pour former un complexe se situe entre 0,3 à 3 unités en dessous du point isoélectrique de la protéine. Entre une protéine 11S de graine de tournesol et l'acide 5'-caféoylquinique, plus le pH est faible et plus les liaisons sont fortes (Sastry et Rao, 1990). Charlton *et al.* (2002b) ont montré que des variations de pH entre 3,8 et 6 affectent la précipitation des agrégats constitués d'EGCG et d'un fragment de protéine riche en proline mais n'affectent pas l'affinité de liaisons. Ces auteurs ont suggéré que les interactions électrostatiques ne sont pas un facteur majeur dans la formation de complexes (-)-épicatéchine-SAB. De plus, Prigent *et al.* (2003) ont montré que les liaisons entre la SAB et l'acide 5'-caféoylquinique sont plus fortes à pH faible. En revanche, Frazier *et al.* (2006) ont observé que le pH n'influence l'interaction entre la (-)-épicatéchine et la SAB.

Ethanol

L'éthanol influence la solubilité des tannins et joue un rôle dans le phénomène d'astringence. Plus la concentration en éthanol augmente (jusqu'à 20%), plus la solubilité des tannins condensés augmente (plus de 5 g.L⁻¹). Cependant il semble ne pas y avoir de relation directe entre la concentration en éthanol et la solubilité des oligomères de tannins condensés.

A des concentrations inférieures à 5% d'éthanol, la solubilité diminue de 1,8 à 0,8 mM quand le degré de polymérisation augmente de 3 à 8 (Poncet-Légrand *et al.*, 2003). Cependant, l'alcool augmente l'intensité de l'amertume (Fontoin *et al.*, 2008) et la perception d'astringence dans le cas de tannins hautement polymérisés (King *et al.*, 2013).

3.2.2. Interactions covalentes

Des interactions irréversibles sont possibles entre les polyphénols et les protéines et correspondent à des liaisons covalentes qui peuvent altérer la bioactivité et biodisponibilité des composés. Ces associations peuvent être le résultat de liaisons entre des tannins oxydés en *ortho*-quinones et des protéines ou entre des semi-quinones et des radicaux portés par les protéines ou encore être des carbocations formés suite à la rupture des liaisons interflavoniques des tannins (en milieu acide à chaud) et des sites réactifs de protéines.

3.2.2.1. Formation et réactivité des *ortho*-quinones

En présence d'oxygène moléculaire, les polyphénoloxydases (PPO) sont capables de catalyser l'hydroxylation des monophénols en *ortho*-diphénols selon un processus réversible (via l'activité crésolase), puis l'oxydation de ces *ortho*-diphénols en *ortho*-quinones colorées (via l'activité catécholase) (Figure 32). Cette oxydation est le mécanisme de brunissement enzymatique observé lors de la fabrication de jus de pomme par exemple (Rouet-Mayer *et al.*, 1990). Les *ortho*-quinones formées possèdent un fort pouvoir électrophile ce qui facilite l'attaque par des nucléophiles comme d'autres polyphénols, des acides aminés, des protéines, etc... selon la réaction de Michael (addition nucléophile conjuguée). Cette réaction peut entraîner la formation de dimères ou la formation de liaisons covalentes entre des polyphénols et d'autres composés comme les protéines (Rawel et Rohn, 2009 ; Trombley *et al.*, 2011).

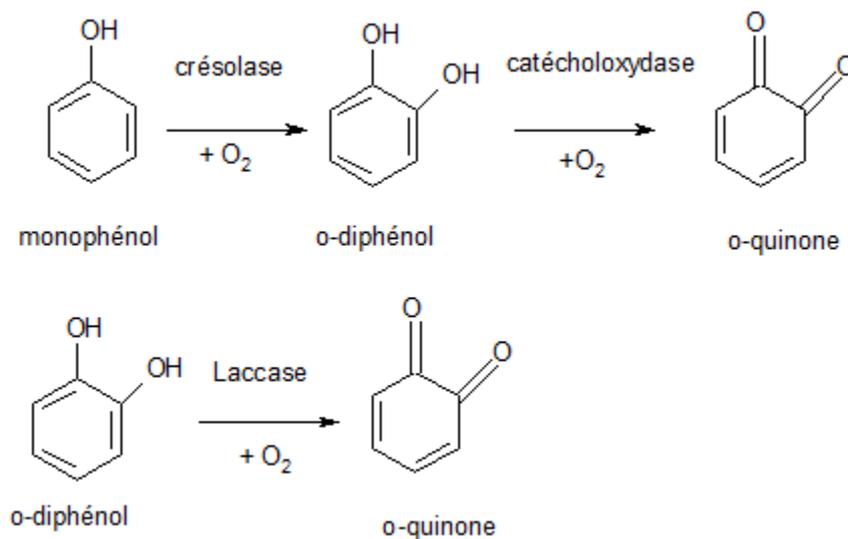


Figure 32 : Réaction d'oxydation de composés phénoliques par des polyphénoloxydases.

La stabilité des *ortho*-quinones dépend du type de polyphénol oxydé et des conditions du milieu externe. Les *ortho*-quinones de la (+)-catéchine et de la (-)-épicatéchine sont moins stables que celles de l'acide 5'-caféoylquinique (Richard-Forget *et al.*, 1992) et une augmentation du pH augmente leur instabilité (Rouet-Mayer *et al.*, 1990). De plus, la longueur d'onde du maximum d'absorption augmente avec l'augmentation du pH, lorsque les spectres d'absorption suite à l'oxydation de la catéchine sont analysés à des pH variant de 3,5 à 8 (Guyot *et al.*, 1995 ; Jiménez-Atienzar *et al.*, 2004). Dans des conditions de faible pH, l'oxydation serait une oxydation à un électron entraînant la formation d'un radical semi-

quinone, tandis qu'à pH plus élevé, le caractère nucléophile de la catéchine augmente ce qui facilite l'addition de Michael et ainsi la formation de dimères de catéchine.

Les *ortho*-quinones sont capables de se lier à des groupements thiols, dont ceux des protéines, pour former des adduits covalents flavonoïdes-thiols (Akagawa *et al.*, 2006). Richard-Forget *et al.* (1992) ont mis en évidence la formation de produits résultants de la conjugaison entre la cystéine libre et des composés phénoliques comme l'acide 5'-caféoylquinique, la (-)-épicatéchine et la (+)-catéchine. Dans la molécule d'acide caféique, la position 2 du noyau benzénique est la plus électrophile entraînant les réactions d'addition nucléophile sur cette position (Cheynier *et al.*, 1986). De même, l'addition nucléophile sur l'*ortho*-quinone d'acide caféoyltartrique du glutathion au niveau du dérivé thiol de la cystéine a abouti à la formation de l'acide 2-S-glutathionyl caféoyltartrique (Singleton *et al.*, 1985). La réactivité des groupements thiols de l'enzyme glycéraldéhyde-3-phosphate deshydrogénase (GAPDH) est plus élevée pour les catéchines de type pyrogalloyles (EGC et EGCG) que pour celles de type catéchols (EC et ECG) (Ishii *et al.*, 2008 ; Mori *et al.*, 2010). Les pyrogalloyles ont une activité pro-oxydante plus élevée que les flavanols de type catéchols (Bandelet *et al.*, 2008). Ces résultats suggèrent que le noyau B des pyrogalloyles est plus facilement oxydé que les catéchols, et que la formation de liaisons covalentes entre les catéchines et les protéines contenant des groupements « thiols » est due à la formation d'une quinone sur le noyau B du motif pyrogalloyle.

L'analyse par spectrométrie de masse des produits de réaction entre EGCG et des peptides modèles contenant un ou plusieurs résidus nucléophiliques (comme l'arginine, la cystéine, la méthionine et des peptides avec un NH₂) a permis d'identifier outre une réaction entre l'EGCG et les groupements thiols des différents peptides, la formation d'adduits de base de Schiff (composé avec une double liaison C-N) entre EGCG et les NH₂ des résidus arginine. De plus, les résidus méthionine peuvent être oxydés par l'eau oxygénée générée pendant l'auto-oxydation de la EGCG ce qui forme des produits de méthionine sulfoxyde (Cao *et al.*, 2009 ; Ishii *et al.*, 2011). Prigent *et al.* (2008) ont mis en évidence le potentiel de formation de liaisons covalentes entre l'acide 5'-caféoylquinique oxydé et différents acides aminés. La lysine, l'histidine, le tryptophane et la tyrosine présentent une forte réactivité avec les quinones d'acide 5'-caféoylquinique, à la différence de l'arginine, l'asparagine et la glutamine. Les différences de réactivité selon le type d'acides aminés peuvent être expliquées par des réarrangements de ces acides après oxydation du polyphénol par la polyphénol oxydase (Prigent *et al.*, 2008).

3.2.2.2. Formation et réactivité des carbocations

Les unités constitutives des procyanidines sont reliées par des liaisons interflavaniques très fragiles à pH acide. La formation de carbocations est due à la dépolymérisation de tannins condensés en milieu acide à chaud. Par rupture de ces liaisons, les unités constitutives se « séparent » en unités terminales libres et en unités d'extension sous forme de carbocation, c'est-à-dire présentant un cation en C4 sur le noyau C (Bate-Smith *et al.*, 1954). En présence d'un compétiteur nucléophile, les carbocations réagissent pour former des adduits éther (Figure 33). Cette réactivité des carbocations est très utilisée pour calculer le degré de polymérisation, le degré de galloylation et déterminer la nature des unités constitutives des procyanidines. Les nucléophiles les plus couramment utilisés pour la quantification sont le phloroglucinol (Kennedy et Jones, 2001) ou les réactifs thiols comme le toluène- α -thiol (Guyot *et al.*, 1997) et la cystéine (Herréro-Martinez *et al.*, 2003). Les carbocations peuvent se lier aux nucléophiles de type aminés et thiols (Beart *et al.*, 1985).

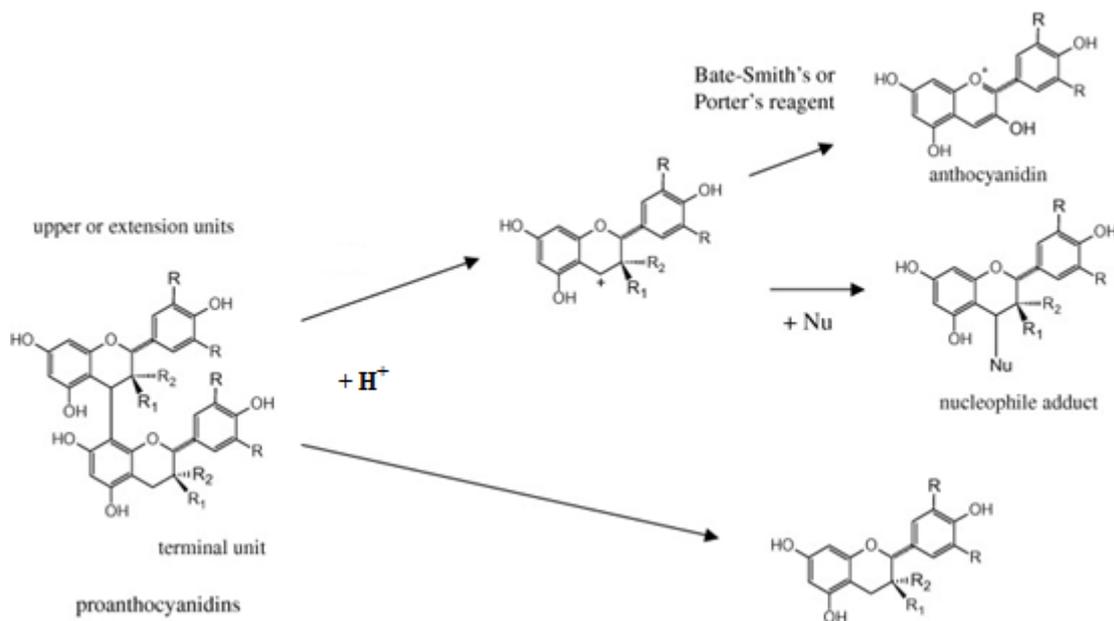


Figure 33 : Réaction de dépolymérisation des procyanidines en milieu acide.

D'après Rigaud *et al.*, 1993.

3.3. Interactions polyphénols-polysaccharides

Les interactions entre les polyphénols et les polysaccharides sont de plus en plus étudiées car elles ont un impact sur l'extraction des polyphénols de la matrice alimentaire (des fruits et

légumes mais aussi du vin et d'autres boissons), mais également sur l'extractabilité des polysaccharides, sur le brunissement enzymatique et sur la bioaccessibilité des polyphénols une fois la matrice déstructurée (Missang *et al.*, 1993 ; Cheynier, 2005). Cette partie est séparée en deux afin de présenter d'une part les interactions entre les polyphénols et les cyclodextrines (oligosaccharide modèle), et d'autre part les interactions entre les polyphénols et les polysaccharides issus de parois cellulaires.

3.3.1. Interaction polyphénols-cyclodextrines

Structure des cyclodextrines

Les cyclodextrines (CD) sont des oligosaccharides cycliques constitués de résidus d' α -D-glucopyranose liés en (1 \rightarrow 4). Les cyclodextrines les plus courantes sont constituées de six, sept ou huit unités de glucose formant une structure conique et appelées α -, β - et γ -CD respectivement (Figure 34). L'arrangement des unités de glucose (conformation chaise) forme un cône tronqué présentant une cavité. Les groupements hydroxyles secondaires portés par les carbones 2 et 3 des unités de glucose sont situés autour de l'entrée la plus grande de la cavité, tandis que les groupes hydroxyles primaires portés par les carbones 6 sont situés autour de l'entrée la plus petite de la cavité (Figure 34). Ces groupements hydroxyles confèrent un caractère hydrophile à l'extérieur de la cyclodextrine (Szetjli, 1998). L'intérieur de la cavité présente des atomes de carbones, d'hydrogènes et des liaisons étheroxydes, lui conférant ainsi une relative apolarité et hydrophobicité.

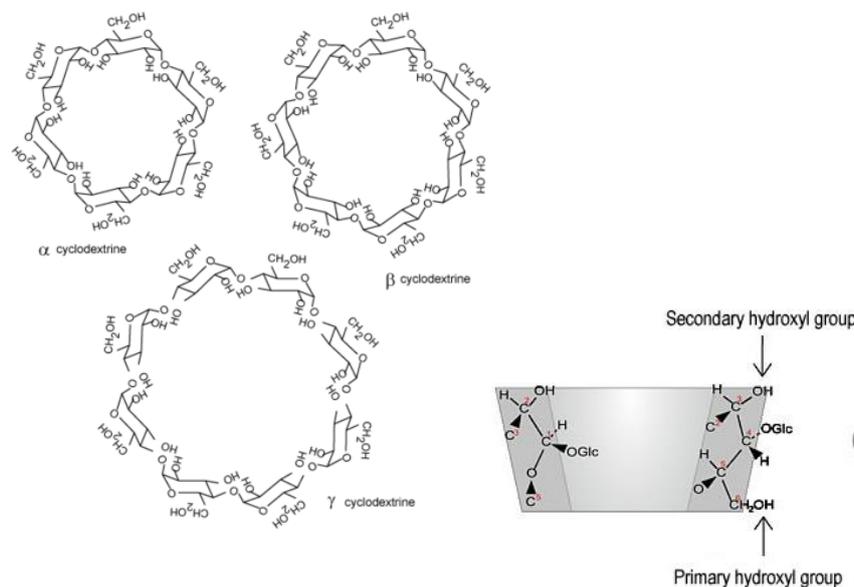


Figure 34 : Structure chimique des trois principales cyclodextrines.

Grâce à leur structure cyclique et la présence d'une cavité, les cyclodextrines peuvent former des complexes d'inclusion avec différentes molécules. Lors de la formation de complexes d'inclusion, un substrat est encapsulé de façon totale ou partielle par la cyclodextrine par l'intermédiaire de liaisons faibles. En revanche, la taille des composés à inclure est un paramètre à prendre en compte. Malgré les forces attractives des cyclodextrines pour un composé, si ce dernier a une taille plus grande que celle de la cavité, l'inclusion ne se fera pas ou que partiellement (Tonnesen *et al.*, 2002).

Influence de la structure de la cyclodextrine

La taille du pore des cyclodextrines est un facteur limitant dans le phénomène d'inclusion de polyphénols. Zhang *et al.* (2012) ont montré que le diamètre de la cavité de la α -, β - et γ -cyclodextrine est de 0,49 ; 0,62 et 0,79 nm respectivement, et par conséquent que la cavité de la α -CD est trop petite pour l'inclusion de la taxifoline et de l'astilbine. De même, l'acide férulique est un polyphénol trop petit pour être inclus par la γ -cyclodextrine qui présente un diamètre de cavité le plus élevé des 3 cyclodextrines (Zhang *et al.*, 2012).

L'affinité d'inclusion de composés phénoliques par les cyclodextrines dépend de la taille de ces dernières. La complexation est régie par la substitution des molécules d'eau dans la cavité qui entraîne une diminution de l'enthalpie. Plus le nombre d'unités de glucose des cyclodextrines augmente, plus l'énergie d'inclusion de composés est faible. Ainsi, les constantes de formation de complexes entre l'acide benzoïque et les α -, β - et γ -cyclodextrines sont de 16, 23 et 3 M^{-1} respectivement (Larsen *et al.*, 1997). Dans le cas de la cyclodextrine δ comportant 9 unités de glucose, la cavité se « plie » et la substitution des molécules d'eau est plus faible que dans le cas des cyclodextrines plus petites (Larsen *et al.*, 1997).

Une autre façon d'étudier l'impact de la taille des cyclodextrines est la quantification des rapports frontaux (Rf) en chromatographie sur couche mince de complexes cyclodextrines-polyphénols, en fonction des types de cyclodextrines. Par exemple le Rf de la rutine en présence d' α -cyclodextrine est de 0,34 et de 0,56 en présence de β -cyclodextrine (Hostettmann *et al.*, 1997). De plus, le Rf de la rutine en présence de la γ -cyclodextrine est de 0,45 (un peu plus faible qu'en présence de la β -cyclodextrine) (Lederer et Leipzig-Pagani, 1996).

Localisation des interactions et influence des polyphénols

Lors de la formation de complexes d'inclusion, si par RMN seul le déplacement chimique des protons H-3 de la cyclodextrine est modifié, alors le complexe se forme à la surface de la cyclodextrine (les protons H-3 des résidus glucose étant sur la surface de la grande ouverture de la cavité). Par contre, le déplacement simultané des signaux des H-3 et H-5 indique que le complexe d'inclusion se forme à l'intérieur de la cavité (Ficarra *et al.*, 2002).

Des études par RMN d'inclusion de la catéchine par la β -cyclodextrine ont montré des modifications des déplacements chimiques mais pas d'apparition de nouveau pic, ce qui indique que la complexation se fait par des échanges rapides. Les signaux des protons H-3 et H-5 de la β -cyclodextrine, ainsi que ceux de tous les protons aromatiques du noyau B (H-2', H-5' et H-6'), le proton H-8 du noyau A et les deux protons H-4 du noyau pyrane de la (+)-catéchine sont modifiés (Ishizu *et al.*, 1999 ; Kritz *et al.*, 2003), impliquant un ajustement complet de la (+)-catéchine dans la cyclodextrine.

La formation du complexe d'inclusion varie selon la conformation du flavonoïde. La (+)-catéchine n'est pas incluse de la même manière que la (-)-épicatéchine dans une β -cyclodextrine. Dans le cas de la (+)-catéchine, le noyau aromatique A se place au niveau des alcools secondaires en position 2 et 3 de la β -cyclodextrine et le noyau aromatique B se place sur l'alcool primaire en position 6 de la cyclodextrine, tandis que le noyau B de la (-)-épicatéchine est inclus profondément dans la cavité de la cyclodextrine via les groupements hydroxyles secondaires. La (+)-catéchine se lie fortement avec la β -CD grâce au plus faible encombrement stérique du groupement 3-OH équatorial par rapport au groupement 3-OH axial de la (-)-épicatéchine (Ishizu *et al.*, 1999). Il en est de même pour les complexes d'inclusion entre la γ -cyclodextrine et la gallocatéchine-gallate (GCG) et l'épigallocatéchine-gallate (EGCG). Les noyaux B et C de la (-)-épicatéchine se positionnent au centre de la cavité, le long de l'axe moléculaire de la β -CD ce qui limite l'encombrement stérique (Ishizu *et al.*, 1999 ; Yan *et al.*, 2007).

L'enthalpie des complexes d'inclusion entre la β -cyclodextrine et la (+)-catéchine ou la (-)-épicatéchine sont de -26,1 et -12,8 kJ.mol⁻¹ respectivement et l'entropie est de l'ordre de -20 J.mol⁻¹.K⁻¹ pour la catéchine et de 17 J.mol⁻¹.K⁻¹ pour la (-)-épicatéchine (Ishizu *et al.*, 1999). Ces paramètres thermodynamiques montrent que la formation d'un complexe d'inclusion est plus favorable entre la β -CD et la catéchine qu'avec la (-)-épicatéchine, ce qui peut être expliqué par la stéréochimie des flavonoïdes. Cai *et al.* (1990) ont montré que la complexation est régie par des liaisons hydrogènes entre le carbone 3 de la (+)-catéchine et les

alcools secondaires portés par les carbones 2 et 3 des résidus de glucose de l'anneau supérieur de la cavité de la β -cyclodextrine.

Les énergies de stabilisation du complexe γ -CD avec la gallocatéchine-gallate sont de -29,9 kcal et de -22,1 kcal pour le complexe γ -CD avec l'épigallocatéchine gallate (Ishizu *et al.*, 2009). Ici encore, ces différences s'expliquent par la formation du complexe d'inclusion. Pour le complexe EGCG-CD, le noyau A et une partie du noyau C sont inclus dans la cavité de la cyclodextrine via les groupements hydroxyles secondaires, et les noyaux B et B' sont à l'extérieur de la cavité. En revanche, pour le complexe GCG-CD, les noyaux A, C et B sont inclus dans la cavité et le noyau B' est à l'extérieur de la cavité de la cyclodextrine (Figure 35). Cette différence d'inclusion est dû à la distance entre les noyaux B et B' en solution aqueuse (Ishizu *et al.*, 2009). Par résonance plasmonique de surface (RPS), il a été montré après immobilisation de la β -cyclodextrine que la réponse (en unités de résonance RU) des catéchines galloylées est plus élevée qu'avec des catéchines non-galloylées. Les valeurs étaient de 323 RU pour EGCG, 326 pour ECG contre 90 RU pour EGC et pour EC (Hayashi *et al.*, 2010). Les affinités des catéchines galloylées pour la β -cyclodextrine sont donc plus élevées que celles des catéchines non-galloylées.

Les interactions entre les cyclodextrines et les flavan-3-ols peuvent donc avoir lieu à la surface ou à l'intérieur de la cavité de la cyclodextrine, et dépendent à la fois de la stéréochimie, de la composition et de la conformation des flavonoïdes.

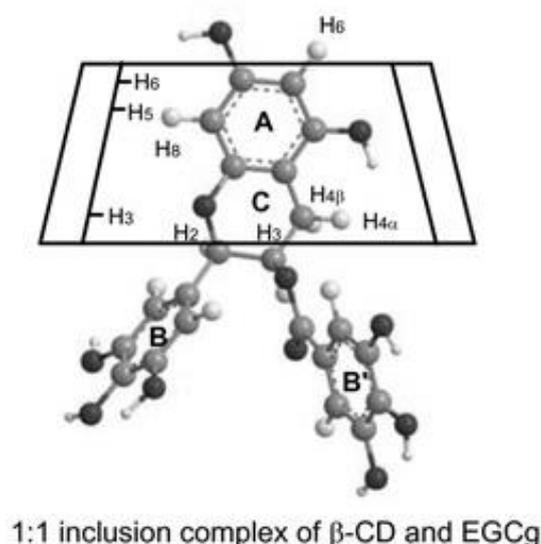


Figure 35 : Structure possible d'un complexe d'inclusion entre l'EGCG et la β -cyclodextrine.

D'après Ishizu *et al.*, 2011.

3.3.2. Interactions polyphénols-polysaccharides de parois cellulaires

Mis à part l'analyse d'interactions entre les polyphénols et les cyclodextrines, quelques études ont été réalisées avec des polysaccharides formant un support solide comme des gels de dextrane (McManus *et al.*, 1985), avec d'autres polysaccharides modèles comme le β -glucane (Wang *et al.*, 2013) ainsi qu'avec des polysaccharides de parois cellulaires (Renard *et al.*, 2001 ; Bindon *et al.*, 2010 ; 2012) ou de levures (Escot *et al.*, 2001 ; Mazauric et Salmon, 2005). Lorsque les cellules végétales sont déstructurées par un process (mastication, broyage, traitement thermique, etc...), les polyphénols contenus dans la vacuole entrent en contact avec les parois végétales ou avec les parois de levures (durant l'étape de fermentation du vin) (Escot *et al.*, 2001 ; Mazauric et Salmon, 2005).

3.3.2.1. Influence des polyphénols

Structure des polyphénols

McManus *et al.* (1985) ont montré que les composés aromatiques tels les tannins ont une forte affinité pour les gels de dextrane et que cette association augmente avec l'augmentation du nombre de groupements hydroxyles de la structure aromatique.

Les degrés d'hydroxylation, de méthylation et de glycosylation des polyphénols de différentes classes (flavonols, flavones, acides hydroxycinnamiques) influencent aussi leurs interactions avec un β -glucane mixte d'avoine (Wang *et al.*, 2013). En ce qui concerne les flavones, l'hydroxylation du noyau C semble être plus favorable que l'hydroxylation en 3' du noyau B pour la capacité d'adsorption au β -glucane. Pour les flavonols, l'hydroxylation en 3' du noyau B est plus favorable qu'en position 2'. La présence de trois groupements hydroxyles sur les flavonoïdes favorise l'adsorption au β -glucane, tandis qu'en présence de plus de trois groupements, l'adsorption est défavorisée (Wang *et al.*, 2013). De même, l'augmentation du nombre de groupements hydroxyles sur le noyau B d'anthocyanes favorise l'association avec des polysaccharides comme la cellulose (Mazzaracchio *et al.*, 2004). La delphinidine-3-glucoside (avec 3 groupements hydroxyles sur le noyau B) montre une absorption plus élevée sur la cellulose que la pélargonidine-3-glucoside (possédant 1 groupement hydroxyle sur le noyau B). Buchweitz *et al.* (2012a) ont également montré un effet favorable de l'hydroxylation des anthocyanes sur la stabilité de la couleur via l'association avec des fractions de polysaccharides pectiques.

La nature des groupements glycosyles influence la capacité d'adsorption des polyphénols sur le β -glucane d'avoine (Wang *et al.* 2013), mais les effets ne sont pas simples à comprendre. La rutine montre une adsorption plus faible que la quercétine (-18%), tandis que la myricétrine montre une adsorption plus élevée que la myricétine (+23%). L'impossibilité de corréler l'effet de la glycosylation des flavonoïdes et la capacité d'adsorption au β -glucane peut être due à l'encombrement stérique des groupements glycosides (Wang *et al.*, 2013). Aucune donnée n'existe sur l'effet de la glycosylation des anthocyanes sur leur interaction avec des polysaccharides de parois cellulaires.

Les dérivés acylés des anthocyanes (dérivés acétyle et *para*-coumaryle) sont plus fortement retenus par la paroi de levure durant la fermentation alcoolique que les dérivés non acylés (Morata *et al.*, 2003) ; par ailleurs, plus le noyau B est méthoxylé (malvidine et péonidine) plus l'absorption est élevée. La malvidine-3-glucoside (présentant 2 groupements méthyles sur le noyau B) est plus adsorbée sur la pectine de pomme que la pétunidine-3-glucoside (présentant 1 groupement méthyle sur le noyau B) (Mazzaracchio *et al.*, 2004).

Les groupements galloyles modifient également l'association entre des polyphénols et des polysaccharides. La galloylation de la (-)-épicatéchine et de la (-)-épigallocatechine entraîne une augmentation de leur capacité d'adsorption au β -glucane (Wang *et al.*, 2013 ; Gao *et al.*, 2012). La présence de groupements galloyles sur les catéchines intensifie leur capacité d'adsorption au glucane, tout comme dans le cas de polysaccharides de parois végétales (Le Bourvellec *et al.*, 2004).

Renard *et al.* (2001) n'ont pas détecté de liaison entre les parois végétales et les acides hydroxycinnamiques ou la (-)-épicatéchine. En revanche, la liaison des procyanidines (polymère de (-)-épicatéchine) aux parois végétales est rapide et peut atteindre 0,6 g par gramme de paroi végétale (en matière sèche). Cette capacité de rétention des procyanidines par les parois peut expliquer la faible perte des procyanidines au cours du traitement thermique (45°C) et du process de déshydratation osmotique de différents cultivars de pomme (Devic *et al.*, 2010).

Degré de polymérisation et conformation des proanthocyanidines

Plus le degré de polymérisation des procyanidines (Renard *et al.*, 2001) ou la masse molaire des proanthocyanidines (Bindon *et al.*, 2010) sont élevés, plus l'affinité de leur liaison aux parois végétales augmente. Le Bourvellec *et al.* (2004) ont montré que le pourcentage de procyanidines liées aux parois végétales est trois fois et demi plus élevée quand ils présentent un degré de polymérisation moyen (DPn) de 65,5 plutôt que de 2,5. L'effet du degré de

polymérisation est dû à l'augmentation de taille moléculaire et au fait que ce sont des ligands multidentés capables de se fixer en plusieurs points aux polysaccharides, via l'augmentation du nombre de groupes phénols capables de former des liaisons hydrogènes, et via les noyaux aryles capables de former des interactions hydrophobes.

En solution hydroalcoolique, les polymères de procyanidines constitués de 24 à 43 unités de (-)-épicatéchine, et d'une longueur inférieure à 13 nm, sont généralement des structures semi-flexibles et linéaires (Zanchi *et al.*, 2009). De plus, il a été montré que les procyanidines contenant de la (+)-catéchine en unité d'extension ont une affinité plus forte vis-à-vis des polysaccharides pariétaux que celles constituées uniquement de (-)-épicatéchine. La présence de (+)-catéchine dans la chaîne de procyanidine induit la formation d'un coude, présentant une conformation plus ouverte et flexible, ce qui favorise l'interaction. De plus, les procyanidines riches en (+)-catéchine forment une hélice qui tourne vers la droite, tandis que celle constituées de (-)-épicatéchine forment une hélice vers la gauche (Fletcher *et al.*, 1977). Ainsi, la conformation des monomères influence l'affinité des procyanidines vis-à-vis des polysaccharides pariétaux (McManus *et al.*, 1985 ; Le Bourvellec *et al.*, 2004).

3.3.2.2. Influence des polysaccharides

Une analyse d'interaction entre anthocyanes et parois cellulaires a été réalisée avec des modèles de parois constitués de cellulose pure ou de cellulose et de pectines, montrant que les anthocyanes se lient plus aux pectines qu'aux celluloses (Padayachee *et al.*, 2012).

L'adsorption des procyanidines a été quantifiée par des isothermes de liaisons sur différents polysaccharides (les pectines, les xyloglucanes, la cellulose et l'amidon) (Le Bourvellec *et al.*, 2005). Avec l'amidon et les pectines, les plus hautes affinités apparentes sont obtenues pour les procyanidines hautement polymérisées et hautement galloylées, tandis qu'avec les xyloglucanes et la cellulose il n'apparaît pas de différence entre les procyanidines. Les affinités de liaisons des procyanidines sont dans l'ordre : pectine > xyloglucane > amidon > cellulose (Le Bourvellec *et al.*, 2005 ; Renard *et al.*, 2001). Les pectines sont capables de former un réseau de type « gel » présentant des « cavités » hydrophobes capables d'encapsuler les procyanidines, tandis que les xyloglucanes et la cellulose tendent à adopter une structure linéaire (Levy *et al.*, 1991), ce qui limite leur association avec les procyanidines. Les polysaccharides pectiques du vin influencent la formation de particules et peuvent prévenir l'agrégation des tannins (Riou *et al.*, 2002). Un type d'arabinogalactanes-protéines (AGP0) et un monomère de rhamnogalacturonane de type II n'ont pas d'impact sur l'agrégation des tannins, tandis que des mannoprotéines inhibent fortement cette

aggrégation. En présence du dimère de rhamnogalacturonane de type II, le diamètre des particules est fortement augmenté, ce qui suggère une co-agrégation entre le polysaccharide et les procyanidines (Riou *et al.*, 2002).

3.3.2.3. Mécanismes d'interactions

Les interactions entre tannins et parois cellulaires sont régies par les mêmes mécanismes d'interactions qu'entre les tannins et les protéines, avec cependant des cinétiques différentes. Des liaisons hydrogènes se forment entre les groupements hydroxyles des noyaux A et B des tannins (ou des acides galliques) et les atomes d'oxygène des liaisons glycosidiques qui relient les résidus monosaccharides entre eux ou les groupements hydroxyles ou acétyles des polysaccharides (Figure 36) (McManus *et al.*, 1985). La présence de liaisons hydrogènes dans ces interactions a été étudiée en utilisant de l'urée ou en modifiant la température. L'urée est un agent chaotropique, capable de former des liaisons hydrogènes fortes entraînant la rupture des liaisons hydrogènes labiles entre les composants et l'augmentation de la température permet quant à elle de rompre les liaisons hydrogènes. L'augmentation de la température (de 5°C à 35°C) entraîne une diminution de l'association entre les procyanidines et les parois cellulaires (Le Bourvellec *et al.*, 2004). De même que l'ajout d'urée libère partiellement les procyanidines liées aux parois, quel que soit le type de procyanidines (Le Bourvellec *et al.*, 2004).

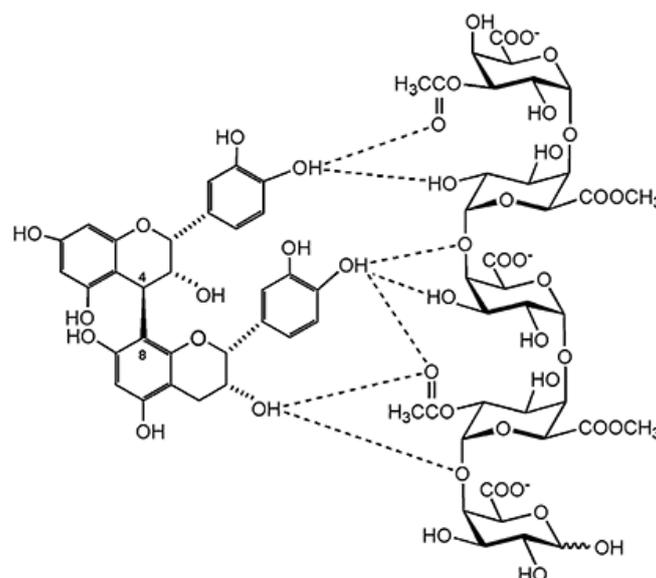


Figure 36 : Liaisons hydrogènes possibles entre un dimère de catéchine et un homogalacturonane (D'après Hanlin *et al.*, 2009).

Les interactions hydrophobes jouent également un rôle aussi bien dans les associations des polyphénols avec les polysaccharides qu'avec les protéines. Plumb *et al.* (1998) ont montré que le caractère hydrophobe des procyanidines augmente avec le degré de polymérisation et de galloylation. La modulation de la force ionique lors des analyses d'interactions est aussi utilisée pour mettre en évidence la présence d'interactions hydrophobes. L'augmentation de la force ionique (de 0,01 mol.L⁻¹ à 1 mol.L⁻¹) est reliée à une augmentation du taux de procyanidines liées aux parois (Le Bourvellec *et al.*, 2004). De même, en présence d'éthanol, la polarité du milieu aqueux diminue ce qui entraîne la rupture des interactions hydrophobes et la libération des procyanidines (Le Bourvellec *et al.*, 2004).

Afin de mettre en évidence la présence ou non d'interactions électrostatique ou ionique entre les polyphénols et les polysaccharides, Le Bourvellec *et al.* (2004) ont fait varier le pH de suspensions de procyanidines et de parois cellulaires de 2 à 7. A ces pH, les procyanidines ne possèdent pas de groupements chargés (pKa de 9-10) (Vernhet *et al.*, 1996), tandis que les parois cellulaires riches en pectines sont chargées négativement (pKa de 2,9) (Ralet *et al.*, 2001). La variation de pH ne cause aucun changement sur les associations entre les procyanidines et les parois végétales, ce qui suggère que les interactions électrostatiques ou ioniques n'y jouent pas de rôle (Le Bourvellec *et al.*, 2004).

En conclusion, l'interaction entre les procyanidines et les parois cellulaires végétales est donc un évènement rapide et direct, impliquant des liaisons hydrogènes et des interactions hydrophobes (Renard *et al.*, 2001 ; Le Bourvellec *et al.*, 2004). Les protéines, quant à elles, interagissent avec les procyanidines en plusieurs étapes. Initialement, les procyanidines se lient aux protéines par des liaisons hydrogènes et des interactions hydrophobes. Ensuite, par auto-association des complexes protéines-procyanidines, des agrégats se forment, entraînant finalement la formation de colloïdes par précipitation (Jöbstl *et al.*, 2004 ; Cala *et al.*, 2010 ; McRae *et al.*, 2010). Les phases de précipitation et de formation de colloïdes peuvent être lentes.

3.4. Interactions polyphénols-protéines-polysaccharides

Comme il a été montré dans les parties précédentes, les polyphénols sont capables de se lier aux protéines ou aux polysaccharides. Ces trois macromolécules peuvent interagir ensemble, ce qui a été étudié soit par l'effet des polysaccharides sur la formation des complexes polyphénols-protéines, soit par l'effet des complexes protéines-polysaccharides sur les

polyphénols (Ozawa *et al.*, 1987 ; Luck *et al.*, 1994 ; De Freitas *et al.*, 2003 ; Mateus *et al.*, 2004a ; Carvalho *et al.*, 2006a et b ; Soares *et al.*, 2009 ; Gonçalves *et al.*, 2011a ; Soares *et al.*, 2012 ; Liang *et al.*, 2013 ; Wang *et al.*, 2007 ; Bindon et Smith, 2013 ; Zhao *et al.*, 2013).

Les polysaccharides sont capables d'entrer en compétition avec les protéines pour se lier aux polyphénols. Luck *et al.* (1994) ont montré que des pectines solubles, des galactomannanes et des carraghénanes inhibent la précipitation du pentagalloyl glucose par la gélatine riche en proline.

Par néphélométrie, une constante de solubilisation des agrégats de tannins-SAB par les polysaccharides a pu être calculée (De Freitas *et al.*, 2003). Les polysaccharides ioniques c'est-à-dire les pectines, les xanthanes et les acides polygalacturoniques sont plus efficaces pour rompre l'agrégation entre les tannins et les protéines que les polysaccharides neutres comme la β -cyclodextrine, les arabinogalactanes ou les dextrans (De Freitas *et al.*, 2003). Les polysaccharides ioniques sont capables de former un réseau de type « gel » pour encapsuler les polyphénols et donc d'entrer en compétition avec les protéines (Gonçalves *et al.*, 2011a). Les xanthanes sont plus efficaces que les autres polysaccharides ioniques pour dissocier les associations tannins-SAB. Cependant, leurs effets sur le complexe protéines-tannins diminuent avec l'augmentation du degré de polymérisation des tannins (Mateus *et al.*, 2004a ; Carvalho *et al.*, 2006a). Mis à part les xanthanes, les pectines sont également très efficaces sur la diminution de l'agrégation protéines salivaires-tannins condensés, mais les mécanismes d'inhibition sont différents. D'après Soares *et al.* (2012), les pectines sont capables de former un complexe ternaire polysaccharide-protéine-polyphénol qui améliore la solubilité en milieu aqueux, diminuant la quantité d'agrégats insolubles (Figure 37 i). L'inhibition de l'agrégation du complexe α -amylase-procyanidine par la β -cyclodextrine serait due à une association de ce polysaccharide avec les polyphénols et une compétition avec les protéines (Figure 37 ii) (Soares *et al.*, 2009).

Par ailleurs, Liang *et al.* (2013) ont confirmé que des gommés arabiques ou du saccharose sont capables d'inhiber des complexes lysozyme-procyanidine B3.

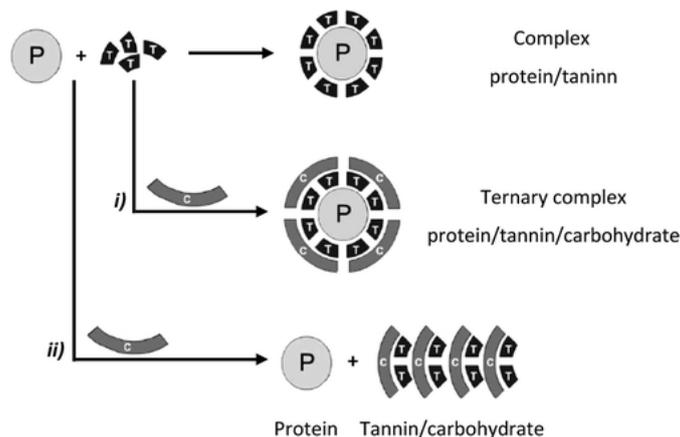


Figure 37 : Mécanismes possibles d'action des polysaccharides sur les complexes protéines-tannins. D'après Mateus *et al.*, 2004a. P=protéine, T=tannin et C=carbohyrate. i) formation d'un complexe ternaire et ii) compétition entre les carbohydrates et les protéines.

Une analyse de comparaison des capacités d'interactions entre des fibres insolubles de pomme et de raisin, des protéines et des proanthocyanidines a montré que la formation d'agrégats est dépendante de la concentration en protéines et que la précipitation est dépendante de la concentration en fibres (Bindon et Smith, 2013). Les fibres sont capables de se lier aux proanthocyanidines de haut poids moléculaire par l'intermédiaire d'interactions de surface, ce qui entraîne une diminution de la concentration des proanthocyanidines et une diminution de la perception d'astringence dans le vin (Bindon et Smith, 2013). Une étude récente a été réalisée sur l'influence de la structure des pectines sur les complexes pectine-gliadine-catéchine (Zhao *et al.*, 2013). Une diminution de la masse molaire des pectines, avec un degré d'estérification de 61% et une augmentation de la concentration en pectines dans un milieu avec gliadine et catéchine, améliorent la stabilité du complexe ternaire (Zhao *et al.*, 2013). Cependant, le dispositif expérimental utilisé n'était pas très robuste (par manque de contrôles et par manque de systèmes à deux composants).

3.5. Conséquences des interactions

Les interactions polyphénols-macromolécules peuvent avoir des conséquences technologiques, comme des limites d'extractabilité des composés durant la fabrication de jus de pomme ou de vin, qui ont été les plus étudiées et que je ne présenterai que brièvement. Elles peuvent aussi affecter la détection même des polyphénols (conséquences analytiques

avec des implications majeures en recherche). Enfin, leur impact sur les propriétés nutritionnelles des polyphénols a été mis en évidence récemment et pourrait être majeur.

Comme il a été décrit dans le paragraphe 2.4, l'adsorption de ces molécules au niveau intestinal est faible et complexe. Pour pouvoir atteindre l'intestin et montrer un effet sur la santé c'est-à-dire être digérés, absorbés et avoir une action sur l'organisme (biodisponibles), les polyphénols doivent avant toute chose être libérés de la matrice alimentaire (bioaccessibles). Or cette bioaccessibilité semble limitée selon les nutriments présents dans l'aliment. Comme je l'ai présenté précédemment, les interactions entre les polyphénols et d'autres nutriments sont connues et pourraient avoir un effet limitant sur cette bioaccessibilité et biodisponibilité.

3.5.1. Conséquences technologiques

3.5.1.1. Jus de pomme

Lors de la fabrication de jus de pomme, deux phénomènes ont lieu en même temps. D'une part, les polyphénols de types monomères de flavan-3-ols et acides hydroxycinnamiques sont sujets à l'oxydation enzymatique du fait de la décompartimentation cellulaire, les mettant en contact avec la polyphénol oxydase et l'oxygène. D'autre part, les procyanidines ont tendance à être retenues par la matrice végétale. Ces deux phénomènes se traduisent d'une part par une diminution de la concentration des catéchines de l'ordre de 80 à 100% dans les jus (Guyot *et al.*, 2003 ; Le Bourvellec *et al.*, 2007) et des acides hydroxycinnamiques. D'autre part, les procyanidines retenues par les parois cellulaires sont les procyanidines hautement polymérisées. Par conséquent les concentrations en procyanidines libérées dans le jus sont plus faibles et présentent des degrés de polymérisation également plus faibles (Guyot *et al.*, 2003 ; Le Bourvellec *et al.*, 2007 ; Renard *et al.*, 2011)

3.5.1.2. Vin

L'utilisation d'enzymes de macération pendant la fabrication du vin modifient la composition des polysaccharides de raisin. Ces enzymes entraînent une diminution des pectines méthylées et des oses neutres, ainsi qu'une augmentation de l'acide galacturonique (Lao *et al.*, 1996) et du RG-II (Doco *et al.*, 2007). En ce qui concerne l'impact de la fabrication du vin sur les polyphénols, une extraction accrue des tannins est observée (Bautista-Ortin *et al.*, 2005 ;

Guadalupe *et al.*, 2007) et est reliée au fait que la dégradation de la paroi au cours de la macération libère les tannins qui y étaient associés.

3.5.2. Conséquences analytiques

Récemment, la littérature scientifique a commencé à prendre en compte le fait que les méthodes communes d'extraction (à l'eau ou au méthanol) ne libèrent pas tous les polyphénols de la matrice alimentaire.

Les polyphénols alimentaires peuvent être séparés en deux catégories : les polyphénols extractibles, c'est-à-dire solubles dans un milieu aqueux ou hydroalcoolique, et les polyphénols non-extractibles, c'est-à-dire les polyphénols restants dans les résidus d'extraction. Il faut cependant être conscient qu'il s'agit de catégories contingentes à la méthode d'extraction appliquée. Les polyphénols non-extractibles regroupant les tannins condensés et hydrolysables sont rarement pris en compte dans les études, or la quantité de polyphénols non-extractibles dans l'alimentation est plus grande que celle des polyphénols extractibles (Arranz *et al.*, 2010 ; Saura-Calixto *et al.*, 2007). Par exemple dans les fruits, les polyphénols non-extractibles sont présents de l'ordre de 880 mg/100 g de matière sèche (Arranz *et al.*, 2010). Les plus fortes quantités de polyphénols non-extractibles retrouvées dans le coing de Chine sont majoritairement des polyphénols hautement polymérisés liés à la lignine, qui présentent une forte activité antioxydante (Hamauzu et Mizuno, 2011).

3.5.3. Conséquences nutritionnelles

3.5.3.1. Effet des interactions polyphénols - protéines

La conséquence la plus immédiate des interactions entre des polyphénols et des protéines est la perception d'astringence. Les mécanismes précis de ce phénomène ne sont pas encore très bien connus, mais il résulte de l'interaction entre les protéines salivaires (surtout les protéines riches en proline et les histatines) et des polyphénols (Soares *et al.*, 2009). Cette interaction provoque la précipitation des protéines et la formation d'agrégats constitués des complexes protéines-tannins et est à l'origine de la sensation d'astringence. L'intensité de ce phénomène est variable selon le type de polyphénols et peut être perçue comme un effet négatif des interactions dans certains produits, mais peut être gage de qualité pour le vin.

Les données sur l'impact des interactions entre les polyphénols et les protéines sur la biodisponibilité des polyphénols sont contradictoires. Dans les boissons comme le thé noir,

l'ajout de 10% de lait écrémé semble diminuer la biodisponibilité des flavan-3-ols suite à leur complexation avec la caséine (Lorenz *et al.*, 2007). Cet effet négatif a également été montré avec des protéines de soja (Lorenz *et al.*, 2009). En revanche, l'addition de 50 % de lait au thé vert semble ne pas avoir d'effet sur la bioaccessibilité des flavan-3-ols (Green *et al.*, 2007), suggérant que la stabilité et la solubilité des flavan-3-ols dans l'intestin ne sont pas influencées par les protéines de lait. La perte d'activité biologique des polyphénols ne semble donc pas être liée aux interactions polyphénols-protéines, mais plutôt à l'instabilité des flavan-3-ols au pH élevé (supérieur à 5) du lait (Neilson *et al.*, 2007). Cependant, Serafini *et al.* (2003) ont montré que la consommation de chocolat noir avec du lait entraîne la diminution de la réponse plasmatique de la (-)-épicatéchine comparé à la consommation de chocolat noir avec de l'eau. La consommation de chocolat au lait diminue la réponse plasmatique de la (-)-épicatéchine comparé au chocolat noir. La plupart des études ont attribué ces effets inhibiteurs du lait sur la biodisponibilité des polyphénols comme résultant de la complexation des polyphénols aux protéines. Ces spéculations se basent sur des données *in vitro*. Cependant, en plus des protéines, d'autres macromolécules comme les carbohydrates ou les lipides sont présents dans le lait. De plus, les effets des interactions entre les protéines et les polyphénols pourraient être dépendants de la forme de la matrice (liquide ou solide). Même si l'effet des interactions sur la biodisponibilité des polyphénols n'est pas encore très clair, leur effet sur le métabolisme des polyphénols a été montré. La consommation de 40 g de poudre de cacao avec du lait ou de l'eau entraîne des différences qualitatives des métabolites présents dans l'urine (Roura *et al.*, 2008). La consommation du cacao avec du lait entraîne une augmentation de la sulfatation de la (-)-épicatéchine dans les 6 h après la consommation. De plus, la consommation de 200 g de fraises contenant 222 μ moles de pélagonidine-3-O-glucoside entraîne une concentration plasmatique maximale du principal métabolite, la pélagonidine-O-glucuronide, de 274 mmol.L^{-1} au bout de 1,1 h, mais à la suite de la même consommation de fraise avec de la crème, cette même concentration est atteinte au bout de 2,4 h (Mullen *et al.*, 2008).

Les interactions entre les protéines et les polyphénols jouent également un rôle sur les fonctions biologiques et plus particulièrement sur l'activité antioxydante des polyphénols. Ainsi la liaison entre l'EGCG et la β -caséine diminuerait l'activité antioxydante du polyphénol de 20 % (Arts *et al.*, 2002). De plus, l'association entre les polyphénols et les protéines en font un inhibiteur enzymatique comme par exemple l'association des polyphénols à la trypsine (Gonçalves *et al.*, 2010). Les polyphénols peuvent s'associer à tous

les types de protéines comme le peptide β -amyloïde impliqué dans la maladie d'Alzheimer (Wang *et al.*, 2010), ou à des protéines impliquées dans les réponses anti-inflammatoires par exemple (Moroney *et al.*, 1988).

3.5.3.2. Effet des interactions polyphénols - polysaccharides

L'ingestion de polyphénols en présence de fibres comme les parois végétales de la matrice alimentaire (de fruits et légumes) modifie la bioaccessibilité des polyphénols et par la suite leur biodisponibilité. Saura-Calixto et Diaz-Rubio (2007) ont montré que 35 à 60% des polyphénols dans le vin rouge sont associés aux fibres contre 10% dans le vin blanc. Une fois ingérés, les polyphénols liés aux parois végétales peuvent être libérés par l'action de l'environnement acide de l'estomac et l'environnement basique de l'intestin (del Rio *et al.*, 2010 ; Tagliazucchi *et al.*, 2010). Une petite part des polyphénols de faible poids moléculaire est capable de passer à travers la paroi de l'intestin pour entrer dans le système sanguin. En revanche, les polyphénols encore associés aux fibres atteignent le colon où ils sont fermentés par le microbiote colique. Il semble que la liaison des polyphénols aux fibres entraîne une augmentation de la dégradation colique des polyphénols, les fibres servant de substrat aux microorganismes responsables de la métabolisation des polyphénols (Bazzocco *et al.*, 2008 ; Saura-Calixto *et al.*, 2010). Les métabolites produits par fermentation colique peuvent également être absorbés au niveau du colon où ils contribuent aux effets biologiques (effet antioxydant par exemple) des polyphénols (Williamson et Clifford, 2010).

Objectifs et démarche expérimentale

De nombreuses recherches ont été menées sur l'étude des mécanismes d'interactions entre les protéines et les polyphénols. En revanche, peu d'études ont été réalisées sur les mécanismes d'interactions entre les polyphénols et les polysaccharides. Comme je l'ai expliqué précédemment, ces interactions interviennent dès la déstructuration des cellules végétales. Elles entraînent une diminution de l'extraction des polyphénols des fruits (raisin, pomme) vers leurs jus et boissons dérivées. Ces interactions entraînent également une diminution de la bioaccessibilité et de la biodisponibilité des procyanidines. Or ces composés ont des effets positifs pour l'organisme. Il a été montré que les procyanidines (tannins condensés) sont les polyphénols qui interagissent le plus avec les parois végétales, et qu'elles s'associent plus fortement avec les pectines qu'avec les hémicelluloses ou la cellulose des parois. Mais par quels mécanismes ces deux composés s'associent-ils ? Quelles sont les structures les plus aptes à interagir ?

L'objectif de cette thèse est de comprendre quels sont les facteurs influençant la rétention, par des liaisons non covalentes, des procyanidines par les pectines, et en particulier d'identifier l'impact de la structure et de la conformation des deux molécules sur leurs interactions, de localiser les points préférentiels de fixation et de quantifier thermodynamiquement les interactions.

Pour répondre à ces questions et objectifs, mes travaux se concentrent sur l'étude des mécanismes physico-chimiques d'interactions entre les polyphénols (les procyanidines et les anthocyanes) et les pectines par différentes techniques d'analyses.

Ma thèse s'articule en cinq parties :

- La préparation des molécules d'intérêt comme des pectines de différentes structures et des procyanidines de divers degrés de polymérisation, afin de comparer et définir les structures et les conformations impliquées dans les associations.
- L'analyse d'interaction entre les différents types de pectines et les anthocyanes par spectrophotométrie, pour identifier l'impact des structures de fractions pectiques et des anthocyanes sur la stabilisation de la couleur et la formation de complexes.

- L'analyse d'interaction entre les différents types de pectines et les procyanidines en solution par fluorescence, calorimétrie et spectrophotométrie, afin d'identifier l'impact des structures et des conformations de chaque partenaire sur leurs associations ainsi que de définir les paramètres thermodynamiques de chaque interaction.

- L'analyse de la compétition entre les procyanidines et les anthocyanes vis-à-vis de leur association avec les pectines, pour déterminer si les trois partenaires interagissent ensemble ou s'il existe une sélectivité des pectines pour l'un des deux polyphénols.

- L'analyse d'interaction entre les différents types de pectines et les procyanidines sur support solide, afin de définir des paramètres thermodynamiques d'interaction ainsi que de comparer avec les interactions en solution.

Matériel et Méthodes

1. Matériel

1.1. Matériel végétal

Les pommes à cidre (*Malus domestica* var. *Marie Ménéard*, *Avrolles* et *Kermerrien*) sont récoltées à maturité sur le domaine expérimental du Centre Technique des Productions Cidricoles (CTPC) à Sées (France) au cours des saisons 2000 et 2011. Les pommes de la variété *Golden delicious* sont récoltées avant maturité pendant la saison 2010 au verger du Centre Technique de la Conservation des Produits Agricoles (CTCPA) à Avignon (France). A réception des fruits, ceux-ci sont placés à 4°C. Ils sont ensuite rapidement pelés, étrognonnés et découpés en douzième. Afin de limiter les phénomènes d'oxydation, un mélange eau/acide formique (95/5 ; v/v) est vaporisé sur les morceaux (Guyot *et al.*, 1998). Les morceaux sont ensuite congelés, lyophilisés puis broyés afin d'obtenir une poudre homogène stockée à -20 °C.

L'extrait de cassis et le marc de pomme ont été fournis par Val de Vire Bioactives de Condé sur Vire en France.

Les granules de betterave sucrière (Fibrex 615) sont fournies par Nordic sugar de Copenhague au Danemark.

Les fractions de zones hérissées extraites de pectines sont données par le Dr. Marie Christine Ralet (INRA BIA, Nantes, France) et le Dr. Henk Schols (Université de Wageningen, Pays Bas). Les rhamnogalacturonanes II et les arabinogalactanes-proteines sont données par le Dr. Claire Dufour (INRA SQPOV, Avignon, France).

1.2. Réactifs et standards analytiques

- **Réactifs :**

Le méthanol, l'acétonitrile et l'acétone de qualité chromatographique (HPLC) sont fournis par Biosolve (Dieuze, France). L'hexane de qualité analytique, l'hydroxyde de n-tétraabutyl ammonium (TBA-OH), l'iodure de méthyle (MeI), l'eau oxygénée, l'acide acétique, le disodium tétraborate décahydrate, l'ammoniaque 33 %, l'acétate de sodium trihydraté et le

nitrate d'argent (AgNO_3) sont fournis par Merck (Darmstadt, Allemagne). L'éthanol et l'acétone technique sont fournis par Fisher Scientific (Illkirch, France). Le diméthylsulfoxyde (DMSO), l'oxyde de deutérium (D_2O), le citrate de trisodium dihydrate, le sodium phosphate dibasique dodécahydrate, l'acide formique, le borohydrure de sodium (NaBH_4), le N-méthylimidazole, l'anhydride acétique, le toluène- α -thiol et les pectines de pomme et d'agrumes sont fournis par Sigma-Aldrich (Steinheim, Allemagne). L'hydroxyde de sodium, l'acide chlorhydrique 37 %, le chlorure de sodium, l'acide sulfurique 96 % et le sulfate de sodium sont fournis par VWR (Fontenay-sous-bois, France). Le m-hydroxydiphényle est fourni par Fluka (Steinheim, Allemagne). L'endozyme polifruit liq⁺ est fournie par Spindal groupe AEB (Gretz-Armainvilliers, France).

Les protéines salivaires (PRP IB5) utilisées pour les analyses d'interactions par résonance plasmonique de surface sont fournies par l'UMR SPO (Montpellier, France).

L'eau désionisée est obtenue à l'aide du désioniseur Milli-Q de Millipore alimenté par de l'eau adoucie et osmosée. La résistivité de l'eau désionisée est égale à $18,2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$.

- **Standards :**

L'acide chlorogénique, la (+)-catéchine, la (-)-épicatéchine et le D-(+)-glucose sont fournis par Sigma-Aldrich (Darmstadt, Allemagne). L'acide 4-*para*-coumarique, la cyanidine-3-O-glucoside, la cyanidine-3-O-rutinoside, la delphinidine-3-O-glucoside et la delphinidine-3-O-rutinoside sont fournis par Extrasynthèse (Lyon, France). La phloridzine ainsi que les standards d'oses neutres (D-(-)-arabinose, D-(+)-galactose, L-(-)-fucose, D-(+)-mannose, D-(+)-xylose et L-(+)-rhamnose monohydrate) et le D-(+)-acide galacturonique sont fournis par Fluka (Steinheim, Allemagne). Les standards de dextrane (T500, T70, T40 et T10) sont fournis par Pharmacia (Uppsala, Suède). Le méthanol deutéré (méthanol-d₃) est fourni par Acros Organics (Geel, Belgique).

Les réactifs et standards utilisés à l'IECB (Bordeaux) pour les modifications chimiques des polyphénols étaient les suivants :

Le bromure de benzyle, le carbonate de potassium (K_2CO_3), l'iodure de sodium (NaI), l'acide thioglycolique, la Célite[®], le palladium sur charbon actif (Pd/C), le palladium black, l'acide thioglycolique, le 2,2'-(éthylènedioxy)bis(éthylamine), le 2-mercaptoéthylamine, l'acide trifluoroacétique (TFA), le tétrahydrofurane (THF), l'acide acétique, le

chlorotriphénylméthane, la 4-diméthylaminopyridine (DMAP), le N,N'-diisopropylcarbodiimide (DIC), le triéthylsilane (Et₃SiH) et les solvants tels que le dichlorométhane, le chloroforme, le cyclohexane, l'acétate d'éthyle, le diméthylformamide (DMF), le méthanol, l'acétone, l'éthyl éther, l'acétonitrile, l'éthanol absolu et l'éther de pétrole étaient de qualité «Laboratory reagent » et sont fournis par Sigma-Aldrich (Steinheim, Allemagne). L'acide propiolique est fourni par Fluka Chemika (Steinheim, Allemagne). Le ter-butanol (tBuOH) est fourni par Acros Organics (Geel, Belgique). L'hydroxyde de sodium, le sulfate de magnésium, le bicarbonate de sodium et l'acide chlorhydrique sont fournis par VWR (Fontenay-sous-bois, France). Le diméthylsulfoxyde deutéré (DMSO-d₆) et l'acétone deutéré (acétone-d₆) sont fournis par Euriso-top (Saint-Aubin, France).

La (+)-catéchine est fournie par Extrasynthèse (Lyon, France). La (-)-épicatéchine et la sérum albumine bovine (SAB) sont fournies par Sigma-Aldrich (Steinheim, Allemagne).

Pour la résonance plasmonique de surface, les surfaces d'or (SCB-Au) et les surfaces CM5 (CMD 200m) sont fournies par Xantec (Duesseldorf, Allemagne). Les tampons borate à pH 8,4 et HBS-EP (HEPES 0,01 mol/L, NaCl 0,15 mol/L, EDTA 3 mmol/L et surfactant P20 0,005 %), ainsi que les solutions de 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl) carbodiimide (EDC) de N-hydroxysuccinimide (NHS), de glycine/HCl (2.0) et le chlorhydrate de 2-(2-pyridinyldithio)éthaneamine (PDEA) sont fournis par GE Healthcare Europe GmbH (Velizy-villacoublay, France). Le tritonTM X100, le dodécylsulfate de sodium (SDS) et la L-cystéine sont fournis par Sigma-Aldrich (Steinheim, Allemagne).

2. Préparation du matériel

2.1. Polysaccharides

2.1.1. Préparation des homogalacturonanes et des rhamnogalacturonanes

Les homogalacturonanes et les rhamnogalacturonanes sont préparés à partir de pectines commerciales par une étape de saponification et d'hydrolyse acide, selon la méthode de Renard et Jarvis (1999a).

Les pectines commerciales de pomme (15 g) sont pesées et mises à solubiliser une nuit à 4 °C dans 1 L d'eau milliQ, sous agitation.

- **Saponification :**

Le pH est mesuré dans la solution de pectine (S1) et est ajusté avec une solution d'hydroxyde de sodium 2 mol/L jusqu'à obtenir un pH stable supérieur à 12. La solution est mise sous agitation à 4 °C pendant une nuit.

La solution de pectine (S1) est précipitée instantanément par 2 L d'un mélange composé d'éthanol à 96 %, d'acide chlorhydrique à 12 N et d'eau milliQ (96/1/3 ; v/v/v). Ce mélange est filtré sur un fritté G0. Le filtrat est éliminé et le résidu est lavé et séché par échange de solvants. Le résidu est lavé trois fois avec 500 mL d'éthanol 70 % puis trois fois avec 500 mL d'éthanol 96 % jusqu'à l'élimination totale des ions Cl^- (contrôle à l'aide d'une solution de nitrate d'argent (AgNO_3)). Un dernier lavage est réalisé trois fois avec 500 mL d'acétone. La poudre résultante est séchée une nuit et une demi-journée à l'étuve à 40 °C. Cette fraction est appelée acide pectique.

- **Hydrolyse acide :**

L'acide pectique est broyé à l'aide d'un broyeur manuel (IKA, Labo services, Staufen, Allemagne). La poudre obtenue est répartie dans 5 flacons de 500 mL (2 g de poudre par flacon). 200 mL d'eau milliQ sont ajoutés dans chaque flacon et l'ensemble est mis sous agitation à température ambiante pendant une nuit, jusqu'à obtenir une dissolution complète.

Une fois les acides pectiques correctement solubilisés, 133 mL de HCl à 0,25 mol/L sont ajoutés dans chaque flacon toujours sous agitation. L'agitation est arrêtée et les flacons sont placés à 80 °C pendant 72 h.

Après refroidissement, les flacons sont mis à centrifuger à 4100g pendant 35 min (centrifugeuse SORVALL RC 5B Plus, Thermo Scientific, Saint Herblin, France). Les culots sont lavés et collectés ; les surnageants sont rassemblés puis concentrés par évaporation sous pression réduite (Rotavapor R110, Büchi, Rungis, France). Les culots et les surnageants sont congelés puis lyophilisés.

Les polymères de rhamnogalacturonanes de type I (RGI) et des oses neutres sous forme de monomères ou de petits oligomères sont présents dans les surnageants et les homogalacturonanes déméthylés (HG 0%) sont présents dans les culots.

2.1.2. Méthylation des homogalacturonanes (HG)

Après l'obtention des homogalacturonanes déméthylés, la neutralisation de leurs acides galacturoniques est réalisée par de l'hydroxyde n-tétraabutyl ammonium (TBA-OH) afin de les rendre solubles dans le diméthylsulfoxyde. Ces derniers sont ensuite méthylés à différents degrés selon la méthode de Renard et Jarvis (1999a) grâce à du iodure de méthyle.

- **Neutralisation :**

Les HG 0% sont mis en suspension dans de l'eau milliQ (20 mg/mL) puis titrés par une solution de TBA-OH à 10% jusqu'à atteindre un pH de 7. Après la neutralisation, les échantillons sont congelés puis lyophilisés.

- **Méthylation :**

Après neutralisation des homogalacturonanes, leur teneur en acide galacturonique est déterminée (cf. § 3.1.1). Un poids d'homogalacturonanes tétraabutylés (HG-TBA) correspondant à environ 100 mg d'acide galacturonique est dissous dans 10 mL de DMSO. Ces solutions sont placées sous agitation. Des quantités de iodure de méthyle (MeI) sont ajoutées de manière à ce que les ratios molaires acide galacturonique/MeI soient de 0 ; 0,2 ; 0,4 ; 0,6 ; 0,8 ; 1 et 10. Les solutions sont laissées sous agitation une nuit à l'abri de la lumière à température ambiante. Après méthylation, les solutions sont dialysées (membrane cellulose 33 mm × 21 mm avec une limite théorique de 14 kDa, fournie par Sigma-Aldrich) contre de l'eau milliQ pendant 5 jours afin d'éliminer le DMSO; puis contre une solution de HCl à 0,1 mol/L et de NaCl à 0,1 mol/L pendant 2 jours, afin de précipiter les homogalacturonanes les moins méthylés, et de faciliter la dialyse des ions tétraabutyl d'ammonium. Enfin, une nouvelle dialyse contre de l'eau milliQ est réalisée pour enlever l'excès de chlorure et de sodium. La fin de la dialyse est contrôlée par la mesure du pH des bains de dialyse. A la fin de ces dialyses, les échantillons obtenus sont congelés puis lyophilisés.

2.1.3. Extraction de rhamnogalacturonanes riches en arabinanes (AHR)

50 g de marc de pomme sont mis en suspension dans 1 L d'eau milliQ, et laissés sous agitation pendant 1 nuit à température ambiante. Une saponification est réalisée par ajout d'hydroxyde de sodium jusqu'à $\text{pH} > 13$. 200 mL d'eau oxygénée sont rajoutés afin d'éliminer les polyphénols (Renard *et al.*, 1997a). Le mélange est laissé pendant 2 h sous agitation à température ambiante. Le pH est ensuite diminué jusqu'à 5 avec de l'acide acétique. 1 mL d'un cocktail enzymatique Liq⁺ est ajouté et la solution est agitée pendant 1 nuit à température ambiante. Le mélange est filtré sur membrane de nylon (250 μm) sous vide. Les résidus sont éliminés et le filtrat est dialysé contre de l'eau milliQ et du NaCl à 0,1 mol/L pendant 4 jours avec des changements de bain de dialyse tous les jours. Le résidu de dialyse est centrifugé à 12000g pendant 15 min (centrifugeuse SORVALL RC 5B Plus, Thermo Scientific, Saint Herblin, France). Le surnageant est éliminé et le culot est lavé plusieurs fois à l'eau milliQ, centrifugé, congelé puis lyophilisé pour obtenir les rhamnogalacturonanes riches en arabinanes, nommés AHR.

2.1.4. Extraction des zones hérissées traitées à l'acide (HR-H)

Cette extraction a été réalisée selon la méthode de Ralet *et al.*, (2010). 50 g de pulpe de betterave sucrière (Fibrex 615) sont mis en suspension dans 1,5 L d'hydroxyde de sodium à 0,1 mol/L. La solution est mise sous agitation pendant 2 h à 90 °C. Le pH est ajusté à 5 avec de l'acide chlorhydrique à 6 mol/L. Le mélange est filtré sur une membrane de nylon (90 μm). Le filtrat est centrifugé pendant 15 min à 11600g (centrifugeuse SORVALL RC 5B Plus, Thermo Scientific, Saint Herblin, France). Le surnageant obtenu est filtré sur un fritté G3, puis mis à précipiter avec 3 volumes d'éthanol et laissé 1 nuit à 4 °C. La suspension est ensuite centrifugée 15 min à 11600g. Le surnageant est jeté et le précipité est re-suspendu dans 400 mL d'un mélange éthanol/eau (72/28 ; v/v). La solution est centrifugée 15 min à 11600g. Le précipité est lavé 4 fois avec un mélange éthanol/eau (72/28 ; v/v) puis solubilisé dans l'eau milliQ et mis à -80 °C avant d'être lyophilisé. On obtient les zones hérissées nommées HR.

Les HR obtenues sont hydrolysées par de l'acide chlorhydrique à 0,5 mol/L à 80 °C pendant 2 h ; puis le pH est ajusté à 4 avec de l'hydroxyde de sodium à 2 mol/L. La solution est dialysée contre de l'eau milliQ. Après dialyse, la solution est centrifugée pendant 20 min à 11600g. Le surnageant est lyophilisé et nommé HR-H.

2.2. Polyphénols

2.2.1. Extraction et purification des procyanidines

- **Extraction :**

Les polyphénols de pommes à cidre ont été extraits selon le protocole décrit par Guyot *et al.*, (1998). Pour chaque variété de pomme, 150 g de parenchyme lyophilisé sont mélangés avec 750 mL d'hexane pendant 15 min puis filtré sur un fritté G3. Le filtrat est éliminé et le résidu est mis en suspension dans 750 mL d'un mélange de méthanol/acide acétique (99/1 ; v/v). Cette suspension est mélangée pendant 15 min avant d'être filtré sur le fritté G3. Cette extraction au méthanol acidifié est répétée 3 fois. Les filtrats « méthanoliques » sont évaporés sous pression réduite. Le résidu est mis en suspension dans 500 mL d'un mélange acétone/eau milliQ/acide acétique (39/60/1 ; v/v/v). Cette suspension est mélangée pendant 15 min avant d'être filtré sur le fritté G3. Cette extraction avec un mélange hydroacétonique acidifié est renouvelée 2 fois. Le résidu est éliminé. Les filtrats « hydroacétoniques » sont regroupés et évaporés sous pression réduite jusqu'à l'élimination de l'acétone. Les filtrats sont congelés à -20 °C avant d'être lyophilisés.

- **Purification des fractions hydroacétoniques des variétés de pomme à cidre**

Avrolles et Marie Ménard

Les extraits hydroacétoniques des variétés *Avrolles* et *Marie Ménard* sont purifiés par chromatographie liquide haute performance en phase inverse sur gel de silice Lichrospher 100 RP 18 12 µm (Merck, Darmstadt, Allemagne) sur une colonne de 200 x 50 mm selon le protocole décrit par Guyot *et al.*, (1998) mais à l'échelle préparative. Le débit est contrôlé par deux pompes à haute pression du modèle Dynamax SD 300 (Rainin, Oakland, CA, USA) avec

des têtes de pompes WT1 100 mL. Le système comprend également : une vanne rhéodyne L.P. (Rhonert Park, CA, USA), une boucle d'injection de 5 mL, un mélangeur de phases mobiles, un détecteur UV/visible du modèle Dynamax UV-1 (Rainin, Oakland, CA, USA) et un système d'acquisition informatique EZ-Chrom (Scientific, Software Inc, CA, USA).

Tous les extraits (4 g) sont préalablement dissous dans 80 mL d'un mélange eau milliQ/acide acétique (97,5/2,5 ; v/v). Ils sont ensuite centrifugés (16800g, 15 min) puis successivement filtrés sur un préfiltre Whatmann et un filtre de 10 µm de type SC Millipore et déposés séparément sur la colonne. La colonne est tout d'abord rincée par un mélange eau milliQ/acide acétique (97,5/2,5 ; v/v) jusqu'à l'absence de glucides dans l'éluat (test au phénol négatif ; Dubois *et al.* (1956)). L'élution des procyanidines se fait avec un mélange acétonitrile/eau milliQ/acide acétique (30/69/1 ; v/v/v). Les fractions polyphénoliques sont récoltées, les solvants sont éliminés par évaporation sous pression réduite et les échantillons sont lyophilisés. Les échantillons sont nommés : DP9 et DP30 (de Marie Ménard et Avrolles respectivement). A noter que ces fractions ont été préparées par M^{lle} Solenn Serrand durant son DESS en 2004, conditionnées sous argon et conservées congelées. Avant l'utilisation, leur bon état de conservation a été validé par analyse (cf. § 3.1.5.1).

- **Purification de la fraction hydroacétonique de la variété de pomme *Golden delicious***

Les fractions hydroacétoniques de la variété de pomme *Golden delicious* sont purifiées sur une colonne SPE C18 (Bond Elut, Agilent, Les Ulis, France) contenant 20 mL de phase solide. La colonne SPE est conditionnée avec 50 mL de solution hydroacétonique acidifiée (acétone/eau/acide acétique, 39/60/1 ; v/v/v) puis avec 2 volumes d'eau milliQ. Les fractions hydroacétoniques lyophilisées sont solubilisées dans de l'eau milliQ à 10 g/L et 10 mL sont injectés sur la colonne. Les molécules non polyphénoliques sont éliminées avec 2 à 3 volumes d'eau. Les polyphénols non polymérisés sont élués avec 2 volumes d'éthanol/eau milliQ (10/90 ; v/v). Enfin les polymères sont élués avec un mélange acétone/eau/acide acétique (39/60/1 ; v/v/v). La colonne est lavée plusieurs fois avec de l'acétone pur et de l'eau milliQ. Les fractions polyphénoliques sont récoltées, évaporées puis congelées avant d'être lyophilisées. La fraction contenant les polymères est nommée DP8.

2.2.2. Extraction et purification du dimère DP2

L'extraction du dimère DP2 est réalisée à partir de parenchyme de pomme de la variété *Kermerrien*. La fraction méthanolique obtenue après extractions successives aux solvants est purifiée deux fois par HPLC semi-préparative avec deux colonnes différentes : une colonne Hibar C18 (en phase inverse, Merck, Darmstadt, Allemagne) qui permet d'éliminer les sucres présents dans la fraction et de concentrer les polyphénols et une colonne Luna HILIC (Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography, phase Diol, Phenomenex, Torrence, CA, USA) qui permet de séparer les oligomères en fonction de leur degré de polymérisation et ainsi de purifier le dimère DP2 de type B2 ((-)-épicatéchine-4→8-(-)-épicatéchine) et B1 ((-)-épicatéchine-4→8-(+)-catéchine).

- **Extraction**

Le parenchyme lyophilisé de la variété *Kermerrien* (150 g) est extrait selon le protocole décrit au paragraphe 2.2.1. La fraction méthanolique obtenue est évaporée sous pression réduite jusqu'à obtenir environ 250 mL. Du fait de la haute teneur en sucres dans cette fraction, celle-ci est diluée au demi avec un mélange d'eau milliQ et d'acide acétique (97,5/2,5 ; v/v). Cette solution est centrifugée à 16000g pendant 15 min ce qui permet de séparer les sucres et une partie des pectines (présents dans le culot) et les composés polyphénoliques (présents dans le surnageant).

- **Purification sur C18 : élimination des sucres et concentration des polyphénols**

Le surnageant de la fraction méthanolique est purifié par chromatographie liquide haute performance en phase inverse sur gel de silice Lichrospher 100 RP 18 12 µm (Merck, Darmstadt, Allemagne) sur une colonne Hibar 205 x 25 mm selon le protocole décrit par Guyot *et al.*, (1998). Le système de chromatographie liquide à haute performance (Jasco, Tokyo, Japon) à l'échelle semi-préparative est constitué de : deux pompes haute pression modèle PU-2077 plus, d'un dégazeur, d'une interface LC-NETII/ADC, d'une vanne d'injection rhéodyne 3752i-038 (Rhonert Park, CA, USA) d'un volume de 10 mL, et d'un détecteur UV-visible UV-2077 plus. L'ensemble est contrôlé par le logiciel ChromNav (Jasco, Tokyo, Japon).

La colonne est conditionnée avec le solvant A (eau milliQ/acide acétique (97,5/2,5 ; v/v)) pendant 30 min à un débit de 25 mL/min. 60 mL de la solution méthanolique sont injectés sur la colonne (6×10 mL) via l'injecteur manuel. Afin de rincer la colonne et d'éliminer les glucides encore présents de la fraction méthanolique, une élution avec le mélange d'eau milliQ/acide acétique (97,5/2,5 ; v/v) est réalisée. L'absence de glucides dans l'éluat est contrôlée par un test au phénol (Dubois *et al.* 1956). Enfin, les procyanidines sont éluées à un débit de 15 mL/min avec le gradient de solvants suivant :

Temps (min)	Solvant B (acétonitrile) %
0	0
5	30
20	30
22	90
27	90
30	50

La détection est réalisée à 280 nm, 320 nm et 520 nm. L'élution de la fraction polyphénolique est suivie à 280 nm. Les polyphénols sont collectés à partir de 8 min après le lancement du gradient. Les solvants sont évaporés sous pression réduite et l'extrait est congelé puis lyophilisé.

- **Purification sur Luna HILIC : isolation du dimère DP2**

La fraction polyphénolique de la variété *Kermerrien* obtenue précédemment est soumise à une nouvelle étape de fractionnement sur une colonne Luna 5 µm HILIC 200A AXIA packée, 250 × 21.2 mm (Phenomenex, Torrence, CA, USA) avec le matériel décrit dans le paragraphe 2.2.2, selon une méthode adaptée de Robbins *et al.*, (2009). L'extrait polyphénolique est dissous à la concentration de 150 mg/mL dans un mélange de solvant A à 5% (méthanol/eau/acide acétique ; 95/ 3/ 2 ; v/v/v) et de solvant B à 95% (acétonitrile).

La colonne est préalablement équilibrée pendant 20 min à un débit de 21 mL/min avec un mélange de solvants A et B (5/95 ; v/v). L'extrait est ensuite injecté sur la colonne et la séparation des différents monomères et oligomères est réalisée selon le gradient de solvants suivant :

Temps (min)	Solvant B (acétonitrile) %
0	95
3	95
57	32,4
60	0
67	0
70	95
75	95

La détection est réalisée à 280 nm, 320 nm et 520 nm. Le chromatogramme à 280 nm permet de suivre la purification en fonction du degré de polymérisation des procyanidines. Le dimère B2 est collecté à partir de 13 min et jusqu'à 17 min d'élution après le lancement du gradient. Les solvants sont éliminés par évaporation sous pression réduite et l'extrait est congelé puis lyophilisé.

2.2.3. Modification chimique des flavan-3-ols

Afin d'étudier les interactions par résonance plasmonique de surface, les polyphénols ont été immobilisés sur une surface. Pour cela, les monomères et oligomères de flavan-3-ols ont été modifiés chimiquement au niveau du noyau B de deux façons différentes : soit par un groupement carboxylique libre, soit par un groupement thiol libre.

2.2.3.1. Groupement carboxylique sur noyau B

Afin de fixer un groupement carboxylique libre sur le catéchol des polyphénols, un propiolate de benzyle est préparé puis fixé sur le noyau catéchol (étape de protection). Une étape d'hydrogénolyse est réalisée afin d'enlever le groupement benzyle et d'obtenir ainsi l'unité carboxylique libre.

- **Préparation du propiolate de benzyle**

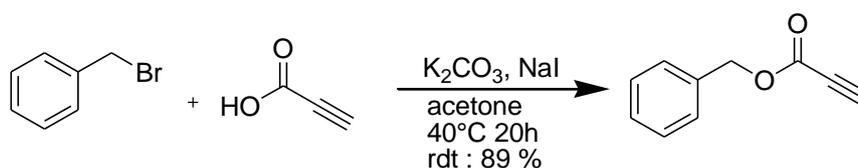


Schéma 1 : Préparation du propiolate de benzyle.

A une solution d'acide propiolique (3,52 mL ; 58 mmol ; 1 éq.) dans l'acétone (180 mL), sont ajoutés le bromure de benzyle (6,88 mL ; 58 mmol ; 1 éq.), le carbonate de potassium (8,10 g ; 59 mmol ; 1,01 éq.) et l'iodure de sodium en quantité catalytique (870 mg ; 5,8 mmol ; 0,1 éq.). Le mélange est chauffé à reflux à 40 °C pendant 20 h et est maintenu sous atmosphère inerte (Schéma 1). Le mélange est évaporé, dissous dans l'éther diéthylique (180 mL), lavé à l'eau (100 mL) puis avec une solution saturée de NaCl, séché sur MgSO₄ anhydre puis filtré. Après évaporation du solvant sous pression réduite, le propiolate de benzyle est obtenu après une étape de purification, avec un rendement de 89%, par chromatographie sur gel de silice en utilisant un mélange de cyclohexane/acétate d'éthyle (95/5 ; v/v).

- **Protection du catéchol**

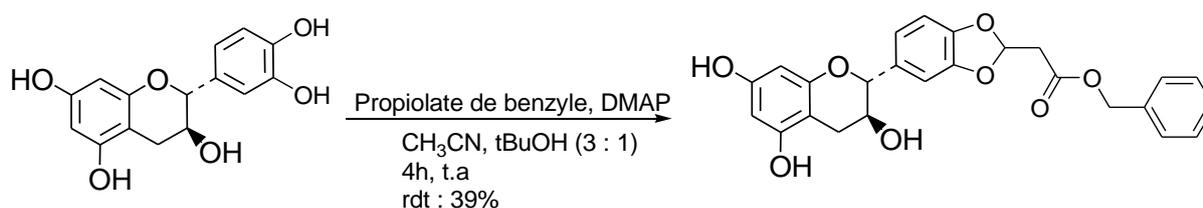


Schéma 2 : Protection du catéchol de la (+)-catéchine.

A une solution de monomères de flavan-3-ols ((+)-catéchine ou (-)-épicatéchine) (100 mg ; 0,345 mmol ; 1 éq.) dans un mélange d'acétonitrile (6,67 mL) et de ter-butanol (2 mL), sont ajoutés le propiolate de benzyle (60,8 mg ; 0,38 mmol ; 1,1 éq.) et la 4-diméthylaminopyridine (63,2 mg ; 0,58 mmol ; 1,5 éq.). Le mélange est ensuite agité sous

atmosphère inerte pendant 4 h à température ambiante (Schéma 2). Les solvants sont évaporés sous pression réduite. Les monomères avec un catéchol benzylé (nommés CAT-Bn et EPI-Bn) sont obtenus après purification, avec un rendement de 39 %, par chromatographie sur gel de silice en utilisant un mélange de dichlorométhane/acétone (80/20 ; v/v) + 0,05 % d'acide trifluoroacétique.

A une solution de polymères de flavan-3-ols (procyanidines DP8) (50 mg ; 0,025 mmol ; 1 équ.) dans un mélange d'acétonitrile (3,2 mL) et de ter-butanol (1 mL) sont ajoutés le propionate de benzyle (4,4 mg ; 0,027 mmol ; 1,1 équ.) et la 4-diméthylaminopyridine (4,6 mg ; 0,037 mmol ; 1,1 équ.). Le mélange est agité sous atmosphère inerte à température ambiante pendant 48 h. Les solvants sont évaporés sous pression réduite. Les procyanidines DP8 avec les catéchols benzylés (nommé DP8-Bn) sont obtenus après purification, avec un rendement de 67 %, par chromatographie sur gel de silice en utilisant le même mélange que précédemment.

A une solution de polymères de flavan-3-ols (procyanidines DP9) (100 mg ; 0,038 mmol ; 1 équ.) dans un mélange d'acétonitrile (6,67 mL) et de ter-butanol (2 mL), sont ajoutés le propionate de benzyle (6,7 mg ; 0,042 mmol ; 1,1 équ.) et la 4-diméthylaminopyridine (6,9 mg ; 0,057 mmol ; 1.5 équ.). Le mélange est ensuite agité sous atmosphère inerte pendant 6 jours à température ambiante puis chauffé pendant 1 h à 30°C, puis 1 h à 40°C, puis 20 h à 50°C. Les solvants sont évaporés sous pression réduite et les procyanidines DP9 avec les catéchols benzylés (nommé DP9-Bn) sont obtenues après purification, avec un rendement de 80 %, par chromatographie sur gel de silice réalisée dans les mêmes conditions que précédemment.

- **Hydrogénolyse**

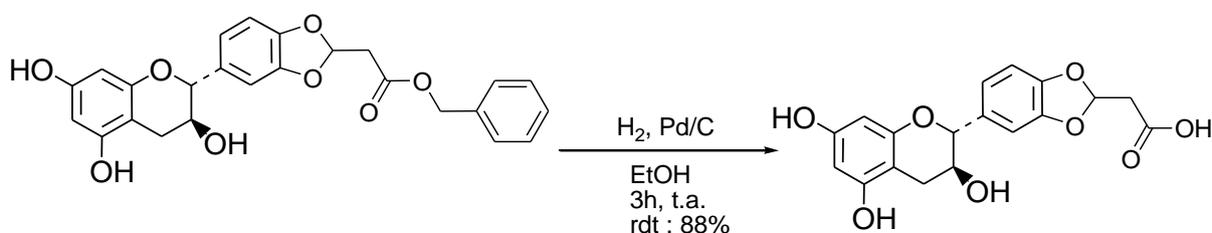


Schéma 3 : Réaction d'hydrogénolyse de la catéchine benzylée.

La CAT-Bn et la EPI-Bn (40 mg ; 0,089 mmol ; 1 éq.) sont solubilisées sous atmosphère d'argon dans 2 mL d'éthanol. Le palladium sur charbon (10% en masse de palladium (16,3 mg ; 0,153 mmol ; 1,72 éq.)) est ajouté au milieu réactionnel. Le tout est placé sous atmosphère d'hydrogène (Schéma 3). Après 3 h sous agitation à température ambiante, l'éthanol est évaporé sous pression réduite. Le résidu est dilué dans de l'acétate d'éthyle (50 mL) et filtré sur Célite® (Sigma-Aldrich, Steinheim, Allemagne). Après évaporation du solvant, les monomères débenzylés sont obtenus avec un rendement de 88 % (nommés CAT-POH et EPI-POH).

Les procyanidines DP8-Bn ou DP9-Bn (45 mg ; 0,014 mmol ; 1 éq.) sont solubilisées sous atmosphère d'argon dans 2 mL de tétrahydrofurane anhydre. Le palladium black (2 mg ; 0,019 mmol ; 1,36 éq.) est ajouté au milieu réactionnel. Le tout est placé sous atmosphère d'hydrogène. Après 48 h sous agitation et à température ambiante, le tétrahydrofurane est évaporé sous pression réduite. Le résidu est dilué dans l'acétate d'éthyle (50 mL) et filtré sur Célite® (Sigma-Aldrich, Steinheim, Allemagne). Après évaporation du solvant, les procyanidines débenzylées sont obtenues avec un rendement de 64 % et 77 % respectivement (nommées DP8-POH et DP9-POH).

2.2.3.2. Groupe thiol sur noyau B

Pour obtenir un groupement thiol libre sur le catéchol des unités de flavan-3-ols, un linker N-(2-(tritylthio)éthyl)propiolamide a été préparé par Dong Tien TRAN (doctorant IECB). Ce linker est fixé sur le catéchol, et les groupements trityles protégeant l'atome de soufre sont ensuite éliminés par détritylation.

- **Fixation du linker N-(2-(tritylthio)éthyl)propiolamide sur le catéchol**

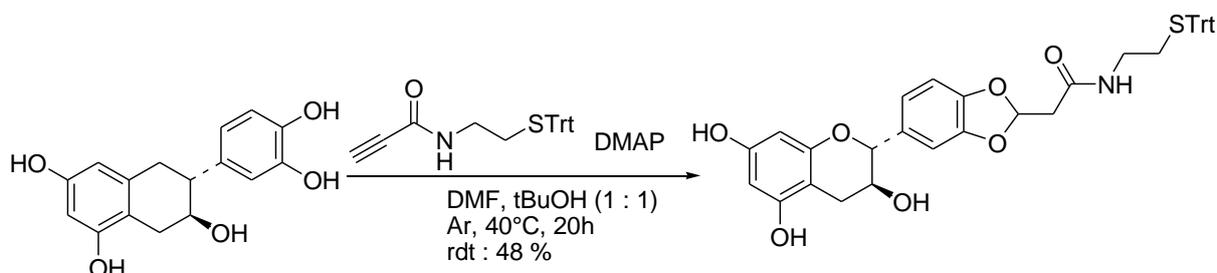


Schéma 4 : Réaction de modification du catéchol de la catéchine par le linker -STrt.

A une solution de monomères de flavan-3-ols ((+)-catéchine ou (-)-épicatéchine) (100 mg ; 0,3445 mmol ; 1 éq.) dans un mélange de diméthylformamide distillé (3 mL) et de ter-butanol (3 mL), sont ajoutés le linker N-(2-(tritylthio)éthyl)propiolamide (140,7 mg ; 0,379 mmol ; 1,1 éq.) et le 4-diméthylaminopyridine (63,1 mg ; 0,517 mmol ; 1,5 éq.). Le mélange est agité sous atmosphère inerte à 40°C pendant 20 h (Schéma 4). Les solvants sont évaporés sous pression réduite. Les produits sont purifiés par dépôt solide par chromatographie sur gel de silice et élution par un mélange de dichlorométhane/acétone (80/20 ; v/v) puis (70/30 ; v/v). Ainsi les monomères nommés CAT-STrt et EPI-STrt sont obtenus avec un rendement de 48 %.

A une solution du dimère DP2 (50 mg ; 0,086 mmol ; 1 éq.) dans un mélange de diméthylformamide distillé (1 mL) et de ter-butanol (1 mL), sont ajoutés le linker N-(2-(tritylthio)éthyl)propiolamide (35,2 mg ; 0,09 mmol ; 1,1 éq.) et le 4-diméthylaminopyridine (15,7 mg ; 0,129 mmol ; 1,5 éq.). Le mélange est agité sous atmosphère inerte à 40°C pendant 48 h puis à 50°C pendant 4 h. Les solvants sont évaporés sous pression réduite et le produit est purifié par trituration avec du dichlorométhane. Le produit obtenu nommé DP2-STrt est obtenu avec un rendement de 95 %.

A une solution de polymères de flavan-3-ols (procyanidines DP8 ou DP9) (50 mg ; 0,019 mmol ; 1 éq.) dans un mélange de diméthylformamide distillé (1 mL) et de ter-butanol (1 mL), sont ajoutés le linker N-(2-(tritylthio)éthyl)propiolamide (21,2 mg ; 0,057 mmol ; 3 éq.) et le 4-diméthylaminopyridine (10,4 mg ; 0,085 mmol ; 4,5 éq.). Le mélange est laissé sous agitation sous atmosphère inerte à 50°C pendant 7 jours. Les solvants sont évaporés sous pression réduite et les produits sont purifiés par trituration avec du dichlorométhane. Les produits obtenus sont nommés DP8-STrt et DP9-STrt.

- **Détritylation**

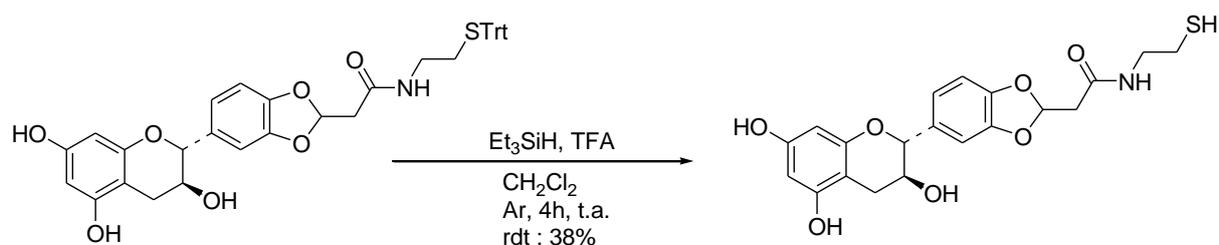


Schéma 5 : Réaction de détritylation.

A une solution de CAT-STrt ou EPI-STrt (83 mg ; 0,125 mmol ; 1 éq.) dans du dichlorométhane anhydre (2,76 mL) sont ajoutés de l'acide trifluoroacétique (48 µL ; 0,627 mmol ; 5 éq.) et du triéthylsilane (100 µL ; 0,627 mmol ; 5 éq.).

A une solution du dimère DP2-STrt (78 mg ; 0,082 mmol ; 1 éq.) dans du dichlorométhane anhydre (1,8 mL) sont ajoutés de l'acide trifluoroacétique (31,4 µL ; 0,409 mmol ; 5 éq.) et du triéthylsilane (65,3 µL ; 0,409 mmol ; 5 éq.).

A une solution de procyanidines DP8-STrt (38 mg ; 0,012 mmol ; 1 éq.) dans du dichlorométhane anhydre (265 µL) sont ajoutés de l'acide trifluoroacétique (4,6 µL ; 0,06 mmol ; 5 éq.) et du triéthylsilane (9,6 µL ; 0,06 mmol ; 5 éq.).

A une solution de procyanidines DP9-STrt (70 mg ; 0,018 mmol ; 1 éq.) dans du dichlorométhane anhydre (400 µL) sont ajoutés de l'acide trifluoroacétique (7,2 µL ; 0,09 mmol ; 5 éq.) et du triéthylsilane (14,4 µL ; 0,09 mmol, 5 éq.).

Les mélanges sont ensuite laissés sous agitation sous atmosphère inerte à température ambiante pendant 4 h (Schéma 5). Après évaporation des solvants sous pression réduite, les produits sont triturés avec du chloroforme (5 fois 2 mL) puis avec de l'éther de pétrole (20 fois 2 mL).

Les produits obtenus sont nommés CAT-SH ; EPI-SH ; DP2-SH ; DP8-SH et DP9-SH. Les monomères CAT-SH et EPI-SH sont obtenus avec un rendement de 38 %. Le DP2-SH, le DP8-SH et le DP9-SH sont obtenus avec un rendement de 78 %, 77 % et 72 % respectivement.

3. Méthodes analytiques

3.1. Caractérisation des composés

3.1.1. Dosage de l'acide galacturonique par colorimétrie

- **Principe :**

L'acide galacturonique est analysé selon la méthode décrite par Blumenkrantz et Asboe-Hansen (1973). Les pectines et les autres composés pectiques sont hydrolysés et transformés

en dérivés furfuriques par l'action de l'acide sulfurique concentré contenant du tétraborate de sodium, à chaud. Les dérivés furfuriques formés réagissent avec du m-hydroxyldiphényle (MHDP) et produisent un complexe rose fushia qui présente un maximum d'absorption à 520 nm.

- **Mode opératoire :**

Les composés pectiques (environ exactement 10 mg) sont mis en solution avec 250 µL d'une solution d'acide sulfurique/eau (72/28 ; v/v). La solution est laissée pendant 1 h à température ambiante. 1 mL d'une solution de myo-inositol (1 mg/mL) et 1,7 mL d'eau milliQ sont rajoutés. Cette solution est laissée pendant 3 h à 100°C au thermobloc (Stuart, Bibby Scientific Limited, Staffordshire, Angleterre). Pendant ce temps, une gamme d'acide galacturonique dans l'eau à 0 ; 25 ; 50 ; 80 et 100 µg/mL est préparée. Dans trois tubes à essais (1 blanc et 2 analyses par échantillon), 0,5 mL d'échantillon sont placés. En parallèle 0,5 mL de solution sont placés dans 2 tubes à essais pour chaque point de gamme. 3 mL d'une solution de tétraborate de sodium à 0,0125 mol/L dans l'acide sulfurique concentré sont ajoutés dans tous les tubes. Les tubes sont agités fortement au vortex et placés à 80°C pendant 10 min. La réaction est arrêtée en plaçant les tubes dans un bain de glace. 50 µL de MHDP (150 mg dans 0,125 mol/L d'hydroxyde de sodium) sont ajoutés dans les 2 tubes d'analyse, et 50 µL d'hydroxyde de sodium (0,125 mol/L) sont ajoutés dans les tubes correspondant aux blancs. Après agitation au vortex, les solutions sont transférées dans des cuves de spectrophotométrie. Après 10 min d'attente, la lecture des densités optiques à 520 nm est réalisée par spectrophotomètre UV-visible (V-530, Jasco, Tokyo, Japon).

3.1.2. Dosage de méthanol par GC-MS

- **Principe :**

Le méthanol est dosé dans les composés pectiques afin de déterminer le degré de méthylation des pectines comme décrit par Renard et Ginies (2009). Le méthanol libéré après saponification des pectines est dosé par GC-MS. La quantification se fait à partir d'une gamme d'étalonnage avec du méthanol et en utilisant du méthanol-d3 comme standard interne.

- **Mode opératoire :**

A environ exactement 10 mg de composés pectiques placés dans des tubes à vis sont rajoutés 0,8 mL d'hydroxyde de potassium 1 mol/L, 3,8 mL d'eau milliQ et 0,4 mL d'une solution de méthanol-d3 à 0,6 mg/mL (étalon interne). La gamme est préparée en parallèle avec les mêmes volumes d'étalon interne et de potasse, mais avec des concentrations variables de méthanol (0,1 - 1 mg/mL). Les tubes sont ensuite agités au vortex avant l'analyse par GC-MS. L'appareil de chromatographie utilisé est un GC-MS QP2010 Shimadzu (Kyoto, Japon) équipé d'un passeur d'échantillons automatique AOC500 et d'une colonne capillaire Cp_wax_52cb 30m x 0,32 mm x 0,5 μm (Varian, Inc, Palo Alto, USA). Le tube scellé est placé à 50 °C pendant 15 min et 0,5 mL d'espace de tête sont injectés (ratio 1/10). Les conditions de chromatographie sont l'hélium à 45 cm.s^{-1} en tant que gaz vecteur et la température du four est à 40 °C. La détection est faite en ionisation par impact électronique (70 eV) avec la source à 200 °C et la détection des ions sélectionnés (m/z 31 ; 32 ; 35) à 5 scans. s^{-1} . La concentration en méthanol est calculée en traçant le ratio de l'aire du pic (normal en fonction des formes deutérées) pour les ions impairs (m/z 31/35) en fonction des ratios de concentration de CH_3OH /méthanol-d3. L'ion à m/z 35 est l'ion moléculaire de méthanol-d3, hautement spécifique de ce composé. L'ion m/z 31 (CD_3O^+) est préféré à l'ion moléculaire m/z 32, pour le CH_3OH , car il donne un meilleur ratio signal sur bruit. Le degré de méthylation (DM) est calculé comme le ratio molaire du méthanol sur l'acide galacturonique.

3.1.3. Dosage des oses neutres par GC-FID

- **Principe :**

Les oses neutres sont dosés dans les pectines suivant la méthode décrite par Englyst et Cummings (1984). Les polysaccharides sont hydrolysés en milieu acide à chaud pour libérer les oses neutres constitutifs. Ceux-ci sont rendus volatils après réduction et acétylation en acétates d'alditols. Ce sont ces acétates d'alditols qui seront dosés par chromatographie en phase gazeuse.

- **Mode opératoire :**

- Hydrolyse : A environ exactement 10 mg de pectine ou composé pectique, placés dans un tube à vis fermant hermétiquement sont rajoutés 250 μL d' H_2SO_4 à 72 %, comme présenté dans la partie 3.1.1. Après cette préhydrolyse de 1 h à température ambiante, 1 mL d'étalon interne (inositol à 1 mg/mL) et 1,7 mL d'eau milliQ sont rajoutés, agités fortement au vortex. L'hydrolyse est réalisée pendant 3 h à 100°C (Seaman *et al.*, 1954).

Les standards (1 mL) ne subissent pas de préhydrolyse mais seulement l'hydrolyse de 3 h à 100°C avec 1 mL d' H_2SO_4 à 2 mol/L.

- Réduction : Après refroidissement, une aliquote est conservée pour le dosage de l'acide galacturonique (cf. § 3.1.1) et 1 mL de solution est transféré dans un tube à hémolyse. L'hydrolysate est neutralisé par 300 μL d'ammoniaque à 33 %. Enfin, 100 μL de NH_4OH à 3 mol/L contenant 100 mg/mL de NaBH_4 sont ajoutés. La réduction est réalisée en 1 h à température ambiante. Les tubes sont ensuite placés dans un bain de glace et le borohydrure en excès est décomposé par l'ajout de 2 fois 50 μL d'acide acétique glacial.

- Acétylation : 300 μL de cette solution sont alors transférés dans un tube à essai et 200 μL de N-méthyl imidazole et 3 mL d'anhydride acétique sont alors rajoutés. L'ensemble est homogénéisé et l'acétylation des alditols est réalisée pendant 30 min à température ambiante. L'excès d'anhydride acétique est décomposé par ajout de 5 mL d'eau milliQ. 3 mL de dichlorométhane sont ajoutés pour extraire les acétates d'alditols. Après décantation, la phase aqueuse supérieure est éliminée et la phase organique est lavée 4 fois par 5 mL d'eau milliQ. Après avoir enlevé toutes traces d'eau par ajout de Na_2SO_4 , les acétates d'alditols présents dans le dichlorométhane sont quantifiés par chromatographie en phase gazeuse.

Les acétates d'alditols sont analysés à l'aide d'un chromatographe en phase gazeuse modèle HP-5890 (Agilent, Inc, Palo Alto, Etats-Unis) équipé d'un passeur d'échantillons automatique, d'un injecteur split thermostaté à 250°C et d'une colonne capillaire en silice greffée DB 225 (30 m x 0,25 mm x 0,5 μm). La colonne est thermostatée à 210°C et l'hélium est utilisé comme gaz vecteur à une pression d'entrée de 100 KPa. La détection se fait à l'aide d'un détecteur à ionisation de flamme à 250 °C ; et l'acquisition des données se fait par le logiciel HPCHEM (Agilent, Inc, Palo Alto, Etats-Unis). 2 μL de solution d'acétate d'alditols sont injectés en mode split 1/15 sur la colonne. La quantification se fait par étalonnage interne avec l'inositol. Les facteurs de réponse des différents oses neutres par rapport à l'inositol sont

calculés à partir d'une solution de standards d'oses neutres. Les résultats sont exprimés en anhydro-oses.

3.1.4. Détermination de la taille des fractions pectiques par HPSEC

- **Principe :**

La chromatographie d'exclusion stérique (HPSEC) est une technique chromatographique qui permet de séparer les molécules en fonction de leur taille et de leur forme. On utilise des granules de gel poreux, le diamètre des pores étant caractéristique de chaque type de gel. Ainsi, pour un mélange de solutés de différentes masses molaires, les molécules les plus grosses (celles dont le diamètre est supérieur à celui des pores) sont éluées les premières, tandis que les molécules plus petites pénétrant dans les pores sont éluées plus tardivement. La séparation est donc le résultat inverse de l'éluion des solutés par rapport à leur volume en solution (volume hydrodynamique).

- **Mode opératoire :**

Les échantillons de pectines et de composés pectiques, les standards de dextrane (T500, T70, T40, T10) et le glucose sont dissous dans un tampon acétate de sodium/ acide acétique (0,2 mol/L pH 3,6) à une concentration de 5 mg/mL. 20 µL de solution sont injectés et analysés. Le système de chromatographie HPSEC (Jasco, Tokyo, Japon) est constitué d'une interface Jasco LC-NET II/ADC, d'une pompe Jasco PU-2080 plus intelligent HPLC, d'un détecteur réfractométrique Jasco RI-2031 plus intelligent et d'un dégazeur. L'appareil est contrôlé par le logiciel ChromNav (Jasco, Tokyo, Japon). La séparation est réalisée à l'aide d'une pré-colonne (40 × 6,0 mm id) TSK-Gel PWXL (Tosohaas, Stuttgart, Germany) et de deux colonnes montées en série : une colonne OH-pack SB-802 HQ (8,0 mm ID × 300 mm) (Showa Denko Europe, Munich, Germany) et une colonne TSK-Gel PWXL (300 × 7,8 mm ID) (Tosohaas, Stuttgart, Germany). Les deux colonnes sont placées dans un four à 35 °C. La phase mobile consiste en un tampon acétate de sodium/acide acétique à pH 3,6 dont le débit est de 0,8 mL/min.

Les coefficients de partition (K_{av}) sont calculés à partir des temps de rétention des standards de dextrane et du glucose ; selon la formule suivante :

$$K_{av} = \frac{(te - t0)}{(tt - t0)} \quad (Eq. 1)$$

Où te est le temps de rétention de l'échantillon, $t0$ le temps de rétention du standard le plus gros (T500) et tt le temps de rétention du standard le plus petit (glucose).

Cette méthode est également utilisée lors des analyses d'interactions entre les procyanidines et les pectines et entre les anthocyanes et les pectines, afin de définir la taille des particules de pectines non associées aux procyanidines ou aux anthocyanes. Pour cela, les surnageants obtenus après centrifugation des microplaques contenant les deux molécules sont prélevés, et dilués au demi dans le tampon acétate de sodium/acide acétique à pH 3,6. 25 μ L de ces solutions sont injectés et analysés dans les mêmes conditions que celles décrites précédemment.

3.1.5. Dosage et quantification des composés phénoliques par HPLC-DAD

3.1.5.1. Procyanidines

- **Principe :**

La quantification des procyanidines est réalisée après thioacidolyse comme décrit par Guyot *et al.* (1998) (Figure 38). La thioacidolyse est réalisée en milieu anhydre, acide, à 40 °C en présence d'un nucléophile le benzyl thioéther. En milieu acide à chaud la liaison interflavanique est rompue entraînant la formation de 4-flavanyl-carbocations à partir des unités d'extension tandis que les unités terminales sont libérés sous la forme de flavan-3-ols libres (+)-catéchine et (-)-épicatéchine. Les 4-flavanyl-carbocations sont des intermédiaires instables qui vont être piégés par le benzyl thioéther afin de former des dérivés 4-benzyl-thioether de flavan-3-ols. Ces différents composés sont ensuite analysés par chromatographie liquide en phase inverse.

Afin de faire la distinction entre les monomères natifs naturellement présents dans les échantillons et les monomères issus de la libération des unités terminales des procyanidines après thioacidolyse, une analyse directe sans thioacidolyse est nécessaire.

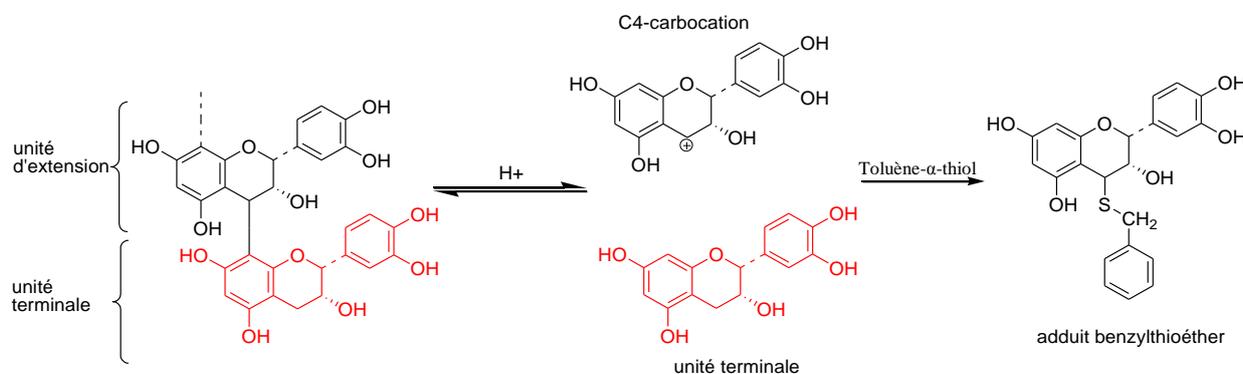


Figure 38 : Schéma de la réaction de thioacidolyse, adaptée de Guyot *et al.*, 1998.

- **Mode opératoire :**

- Analyse directe : environ exactement 25 mg de poudre de parenchyme de pomme sont mis en suspension dans 1,2 mL de méthanol/acide acétique (99/1 ; v/v). Les échantillons sont placés dans un bain à ultrasons pendant 15 min, puis filtrés (filtre 0,45µm, PTFE, Millipore) avant d'être injectés en HPLC.

- Thioacidolyse : environ exactement 25 mg de poudre de parenchyme de pomme sont mis en suspension dans 800 µL de benzyl thioéther à 5 % dans du méthanol anhydre et 400 µL d'acide chlorhydrique 0,4 mol/L dans du méthanol anhydre. Les échantillons sont fermés hermétiquement et agités au vortex avant d'être incubés à 40 °C pendant 30 min avec une agitation toutes les 10 min. La réaction est ensuite arrêtée en plongeant les tubes dans un bain de glace pendant 5 min. Le mélange réactionnel est filtré (filtre 0,45 µm) avant d'être placé dans un vial. 20 µL sont injectés. La chromatographie liquide à haute performance Shimadzu Prominence (Kyoto, Japon) est équipée de deux pompes LC-20AD Prominence UFLC, d'un dégazeur DGU-20A5 Prominence, d'un passeur automatique SIL-20ACHT, d'un four CTO-20AC Prominence, d'un détecteur à barrettes de diodes SPD-M20A Prominence, d'un module de communication CBM-20A Prominence et le tout est contrôlé par le logiciel Lab Solution (Shimadzu, Kyoto, Japon). La séparation est réalisée sur une colonne C18 Lichrospher RP-18 5mm (Merck, Darmstadt, Allemagne), avec une pré-colonne Lichrospher RP-18 5mm à 30°C.

La phase mobile consiste en un mélange eau/acide acétique (97,5/2,5 ; v/v) (solvant A) et acétonitrile (solvant B). Le débit est de 1 mL/min et le gradient d'élution est le suivant :

Temps (min)	Solvant B (%)
0	3
5	9
15	16
45	50
48	90
52	90
55	3
60	3

Les longueurs d'ondes utilisées sont 280 nm pour les flavan-3-ols et les dihydrochalcones, 320 nm pour les acides hydroxycinnamiques, 350 nm pour les flavonols et 520 nm pour les anthocyanes.

Le degré de polymérisation moyen (\overline{DPn}) des procyanidines est défini par la formule suivante :

$$\overline{DPn} = \frac{[CAT] + [EPI] + [EPISR] - [CATb] - [EPIb]}{[EPI] + [CAT] - [EPIb] - [CATb]} \quad (Eq.2)$$

Où [CAT] et [EPI] correspondent aux concentrations en unités terminales de flavan-3-ols obtenues après thioacidolyse ; [EPISR] correspond à la concentration en (-)-épicatéchine des unités d'extension liées au benzylthioéther après thioacidolyse ; [CATb] et [EPIb] correspondent aux concentrations des flavan-3-ols libres natifs présents dans l'échantillon et déterminés par l'analyse directe.

3.1.5.2. Anthocyanes

Afin d'identifier les anthocyanes présentes dans l'extrait de cassis, des mesures qualitatives ont été réalisées par HPLC-DAD.

De très faibles quantités de standards et de poudre de cassis (environ 0,2 mg) sont dissoutes dans 500 µL d'un mélange de méthanol/acide acétique (99/1 ; v/v). Les solutions (20 µL) sont

ensuite analysées par HPLC-DAD dans les mêmes conditions que décrites dans le paragraphe 3.1.5.1. Le gradient est identique mais le solvant A correspond à un mélange d'eau/acide formique (97/3 ; v/v) et le solvant B à de l'acétonitrile.

3.1.6. Caractérisation des molécules par résonance magnétique nucléaire (RMN)

Les spectres RMN ^1H des pectines et des autres fractions pectiques ont été réalisés au Spectropôle de Marseille par le Dr. Rosas. Les échantillons sont préparés dans de l'eau deutérée (D_2O) puis analysés à température ambiante et à 80 °C par une RMN liquide haute résolution (spectromètre Bruker Avance 500 MHz, aimant de 11,2 teslas, ou Bruker Avance I 400 MHz, aimant de 9,04 teslas) (Wissembourg, France).

Afin de contrôler les étapes de modification chimique des monomères, du dimère de flavan-3-ols et des procyanidines, des spectres RMN ^1H et ^{13}C ont été réalisés à 23 °C dans du diméthylsulfoxyde deutéré (DMSO- d_6) ou dans de l'acétone deutéré (acétone- d_6). Les spectres sont enregistrés par un spectromètre Bruker Avance II 300 MHz (Wissembourg, France) ou un spectromètre Bruker DPX 400 MHz (Wissembourg, France). Les déplacements chimiques sont reportés en partie par million (ppm). Les données sont reportées comme suit : déplacement chimique, multiplicité (s=singulet, d=doublet, t=triplet, m=multiplet), constante de couplage (J) en Hertz et intégration.

3.2. Caractérisation des interactions

3.2.1. Absorbance UV-visible

- **Principe :**

La spectroscopie d'absorption dans l'ultraviolet et le visible est basée sur la capacité des molécules à absorber des radiations lumineuses à des longueurs d'ondes données. Un faisceau de lumière monochromatique est dirigé et traverse un échantillon ce qui peut provoquer des modifications de transitions électroniques des molécules, qui par la suite sont susceptibles d'absorber les photons de cette lumière. La mesure de l'absorbance en fonction des longueurs

d'ondes correspond aux spectres d'absorbance. A noter que cette absorbance est proportionnelle à la concentration et à la longueur du trajet optique à travers l'échantillon (loi de Beer Lambert).

- **Mode opératoire :**

- ✓ *Absorbance anthocyanes-pectines (1)*

Les standards d'anthocyanes (cyanidine-3-O-glucoside, delphinidine-3-O-glucoside, cyanidine-3-O-rutinoside, delphinidine-3-O-rutinoside) sont préparés à la concentration de 8×10^{-4} mol/L dans le tampon citrate/phosphate à pH 3,8 et une force ionique (FI) 0,1 mol/L. La poudre de cassis est préparée à la concentration de 1 g/L. Les composés pectiques sont préparés dans le même tampon aux concentrations de 3 mmol/L et 30 mmol/L en équivalent acide galacturonique. Les anthocyanes (100 μ L) et les composés pectiques (100 μ L) sont placés dans deux puits de la microplaque, sont agités pendant 20 sec puis l'absorbance est mesurée par le spectrofluorimètre Xenius XM (SAFAS, Monaco) à 25 °C. Les spectres sont enregistrés de 400 à 600 nm par pas de 5 nm ; et le maximum d'absorption est déterminé à partir des spectres.

- ✓ *Absorbance anthocyanes-pectines (2)*

Les standards d'anthocyanes sont préparés à la concentration de 3 mmol/L dans un tampon de méthanol acidifié avec de l'acide chlorhydrique 0,1 mol/L afin d'obtenir un milieu très acide. Sur une microplaque, des solutions (100 μ L) de pectines et de composés pectiques préparées aux concentrations de 3 mmol/L et 30 mmol/L en équivalent acide galacturonique dans un tampon citrate/phosphate (pH 3,8 et FI 0,1 mol/L) sont placées dans chaque puits. La microplaque est placée dans le spectrofluorimètre Xenius, et 10 μ L de solution d'anthocyanes sont injectés. La microplaque est agitée 1 sec ; et la cinétique est enregistrée à 520 nm pendant 10 min. Les spectres sont enregistrés au bout d'1 h et balayés de 300 à 700 nm par pas de 2 nm, quand les solutions sont complètement stables, à 25 °C. Les spectres obtenus sont mis à zéro au niveau de 700 nm pour supprimer les effets de dilutions des interactions.

Par l'intermédiaire des cinétiques obtenues, la constante de vitesse k est définie selon le modèle cinétique de premier ordre suivant :

$$\frac{A(t) - A_{\infty}}{A_0 - A_{\infty}} = e^{-kt} \quad (Eq. 3)$$

Où $A(t)$ est défini comme l'absorbance au temps t , A_{∞} est l'absorbance à l'infini en présence d'un plateau, A_0 est l'absorbance initiale, k est la constante de vitesse et t est le temps.

Les résultats d'interactions sont définis selon les calculs d'effet hyper- ou hypochrome (absorbance accrue ou diminuée respectivement) et hypso- ou bathochrome (longueurs d'ondes plus faibles ou plus longues respectivement) selon les équations suivantes :

$$\Delta Abs = \frac{(A_{max} - A_{max\ tampon})}{A_{max\ tampon}} \times 100 \quad (Eq. 4)$$

Où ΔAbs est défini comme l'effet hyper- ou hypochrome, A_{max} est l'absorbance maximale à 520nm de l'interaction ; $A_{max\ tampon}$ est l'absorbance maximale des anthocyanes dans le tampon.

$$\Delta \lambda_{max} = \lambda_{max} - \lambda_{max\ tampon} \quad (Eq. 5)$$

Où $\Delta \lambda_{max}$ est défini comme l'effet hypso- ou bathochrome, λ_{max} est la longueur d'onde où le maximum d'absorbance est atteint dans le cas des interactions ; $\lambda_{max\ tampon}$ est la longueur d'onde où le maximum d'absorbance est atteint dans le cas des anthocyanes dans le tampon.

✓ Absorbance procyanidines-pectines

Les analyses d'absorbance sont réalisées sur des microplaques à 25 °C. Les concentrations de procyanidines sont augmentées dans les puits de façon horizontale (0 ; 0,03 ; 0,06 ; 0,117 ; 0,23 ; 0,47 ; 0,94 ; 1,875 ; 3,75 ; 15 et 30 mmol/L en équivalent (-)-épicatéchine) et les concentrations de pectines et composés pectiques sont augmentées dans les puits de façon verticale (0 ; 0,03 ; 0,06 ; 0,117 ; 0,47 ; 1,875 ; 7,5 et 30 mmol/L en équivalent acide

galacturonique (Figure 39). Les solutions sont préparées dans le tampon citrate/phosphate à pH 3,8 et FI 0,1 mol/L. Des volumes équivalents (50 μ L) de procyanidines et de pectines sont mélangés 20 sec avant l'analyse par le spectrophotomètre Xenius XM (SAFAS, Monaco). Les spectres d'absorbance sont enregistrés de 200 à 650 nm et l'absorbance à 650 nm est analysée. Des spectres contrôles sont obtenus avec les puits contenant les procyanidines dans le tampon et les pectines dans le tampon.

Les microplaques sont ensuite centrifugées à 1500g pendant 15 min à 10 °C (centrifugeuse JOUAN thermoCR3i multifonction, Thermo fisher scientifique, Waltham, USA) ; et les surnageants des puits « contrôles » (30 mmol/L procyanidines dans le tampon ou 30 mmol/L pectines dans le tampon), et des puits de mélange entre procyanidines et pectines aux concentrations de 30 mmol/L sont prélevés pour être analysés par HPSEC (cf. § 3.1.4) et par HPLC-DAD (cf. § 3.1.5).

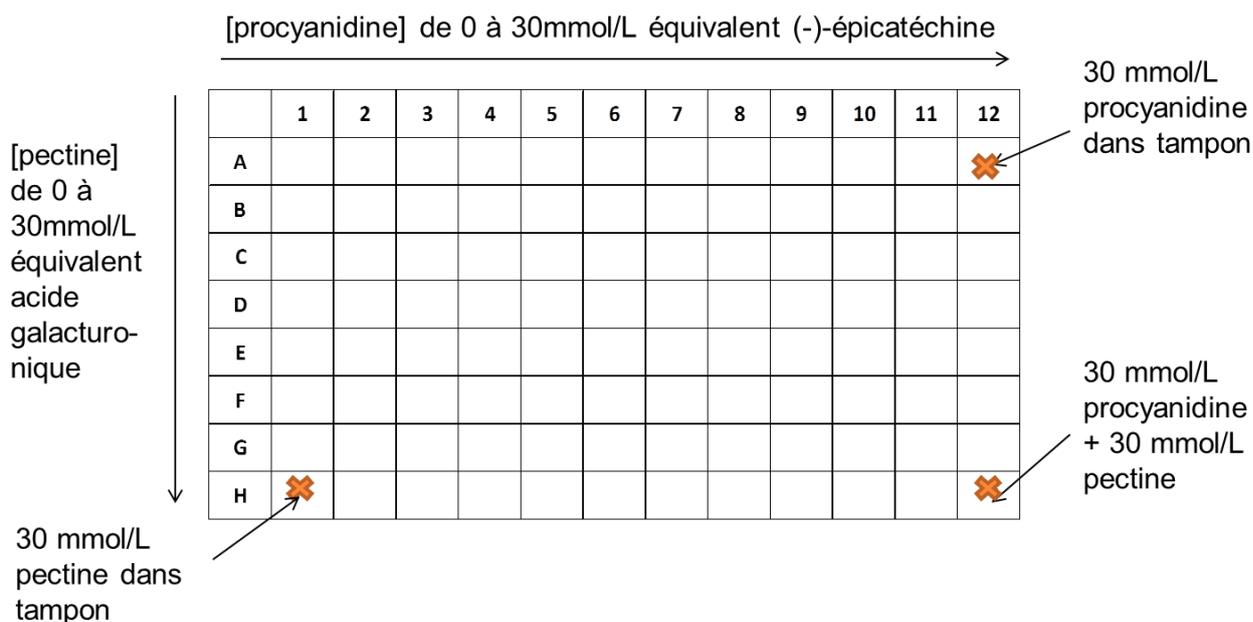


Figure 39 : Schéma de dosage d'absorbance par microplaque.

✓ *Absorbance procyanidine DP30-pectines-anthocyanes*

Les analyses d'interactions entre 3 partenaires sont étudiées par spectrophotométrie à 25°C. Les procyanidines de DP30 sont préparées aux concentrations de 3 et 30 mmol/L en équivalent (-)-épicatéchine dans un tampon citrate phosphate pH 3,8 FI 0,1 mol/L. Les

pectines commerciales de pomme et les homogalacturonanes faiblement méthylés (HG 30%) sont préparés aux concentrations de 3 et 30 mmol/L en équivalent acide galacturonique dans un tampon citrate phosphate pH 3,8 FI 0,1 mol/L. Les solutions standards d'anthocyanes utilisées (la delphinidine-3-O-glucoside (D3G) et la cyanidine-3-O-glucoside (C3G)) sont préparées à la concentration de 3 mmol/L dans une solution de méthanol acidifié par de l'acide chlorhydrique 0,1 mol/L. Les analyses sont réalisées sur une microplaque. Les analyses contrôles réalisées correspondent à un ou deux des composés mis à interagir avec le tampon du troisième. Le tableau suivant (Tableau VI) présente toutes les combinaisons d'analyses réalisées (exemple de la delphinidine-3-O-glucoside) en fonction des concentrations des trois composés. Après 1 min 30 s de réaction les spectres de 300 à 700 nm sont acquis.

Tableau VI : Combinaison d'analyses entre trois partenaires en fonction de leur concentration.

Sans anthocyane (milieu acide)		Avec anthocyane (D3G 3 mmol/L)	
HG 30%	Procyanidine DP30	HG 30%	Procyanidine DP30
0	30	0	30
3	30	3	30
30	30	30	30
0	3	0	3
3	3	3	3
30	3	30	3

3.2.2. Fluorescence

- **Principe :**

La fluorescence est caractérisée par des transitions électroniques entre un état singulet fondamental et l'état singulet excité d'un chromophore. Cette molécule absorbe l'énergie lumineuse (excitation) et la restitue sous la forme d'une lumière fluorescente (émission). Les photons émis par le chromophore sont récupérés par un monochromateur d'émission. Les mesures de fluorescence sont toujours réalisées à l'aide d'un photomultiplicateur (PM) du fait des très faibles niveaux d'énergie des molécules.

- **Mode opératoire :**

Des solutions de monomères de flavan-3-ols, de procyanidines et de composés pectiques sont préparées dans du tampon citrate/phosphate (pH 3,8 FI 0,1 mol/L) à des concentrations de 300 $\mu\text{mol/L}$ et 30 $\mu\text{mol/L}$ en équivalent (-)-épicatechine ou acide galacturonique. Les analyses sont réalisées dans des cuves en quartz à 25 °C. Des volumes équivalents en polyphénols et en composés pectiques (500 μL) sont placés dans ces cuves qui sont agitées avant la mesure de fluorescence. Les molécules sont excitées à 282 nm et les spectres d'émission sont enregistrés de 300 à 450 nm par le spectrofluorimètre Xenius XM (SAFAS, Monaco) avec un photomultiplicateur à 500 V.

3.2.3. Calorimétrie de titration isotherme (ITC)

- **Principe :**

La calorimétrie est une technique qui mesure directement la chaleur dégagée (interaction exothermique) ou absorbée (interaction endothermique) pendant un phénomène d'interaction moléculaire. Le système mesure la chaleur d'interaction par la mesure de la différence de température entre la cellule de référence et la cellule d'échantillon.

L'appareil est équipé d'une cellule de référence contenant de l'eau ou du tampon et une cellule d'échantillon contenant une molécule. Ces deux cellules sont placées à une température donnée. Les injections de ligand dans la cellule d'échantillon correspondent à une titration. Après chaque injection, les interactions formées entraînent un dégagement ou une absorption de chaleur qui elle-même va entraîner une variation de la température dans la cellule d'échantillon. L'appareil mesure ainsi un signal qui correspond à la puissance électrique appliquée pour ré-équilibrer la température avec celle de la cellule de référence. La titration de molécules par un ligand donne lieu à un thermogramme qui correspond, lors de la formation de complexes, à un dégagement de chaleur qui se traduit par des pics exothermiques ou à une absorption de chaleur (pics endothermiques). A la fin de la titration (lorsque les sites de fixation sont saturés), les quantités de chaleur dégagée sont réduites, ce qui conduit à une dilution du ligand dans la solution de molécule.

A partir d'une courbe de titration, on peut donc déterminer les paramètres d'interactions suivants : les constantes d'association (K_a), la stoechiométrie (n), les variations

de l'enthalpie (ΔH); puis par calculs thermodynamiques les variations de l'enthalpie libre (ΔG) et les variations de l'entropie (ΔS).

- **Mode opératoire :**

Les solutions de pectines et de procyanidines (30 mmol/L en équivalent d'acide galacturonique ou de (-)-épicatéchine respectivement) sont préparées dans un tampon citrate/phosphate (pH 3,8 FI 0,1 mol/L), filtrées à 0,45 μm (PTFE, Millipore) et dégazées. Les analyses sont réalisées par un microcalorimètre VP-ITC (Microcal, GE Healthcare, Northampton, MA, USA) comprenant une cellule de référence contenant de l'eau milliQ, une cellule d'échantillon (1,48 mL) contenant les fractions pectiques, toutes deux isolées du milieu externe par une enceinte adiabatique, et une seringue de 300 μL contenant les procyanidines. Les cellules sont placées à 25 °C. La seringue est ensuite placée dans la cellule d'échantillon. 30 injections de 10 μL de procyanidines pendant 20 sec et toutes les 5 min sont réalisées sous agitation à 307 rotations par minute (rpm) dans la cellule d'échantillon (Figure 40). Des analyses contrôles sont réalisées par des injections de procyanidines dans le tampon citrate/phosphate (pH 3,8 FI 0,1 mol/L).

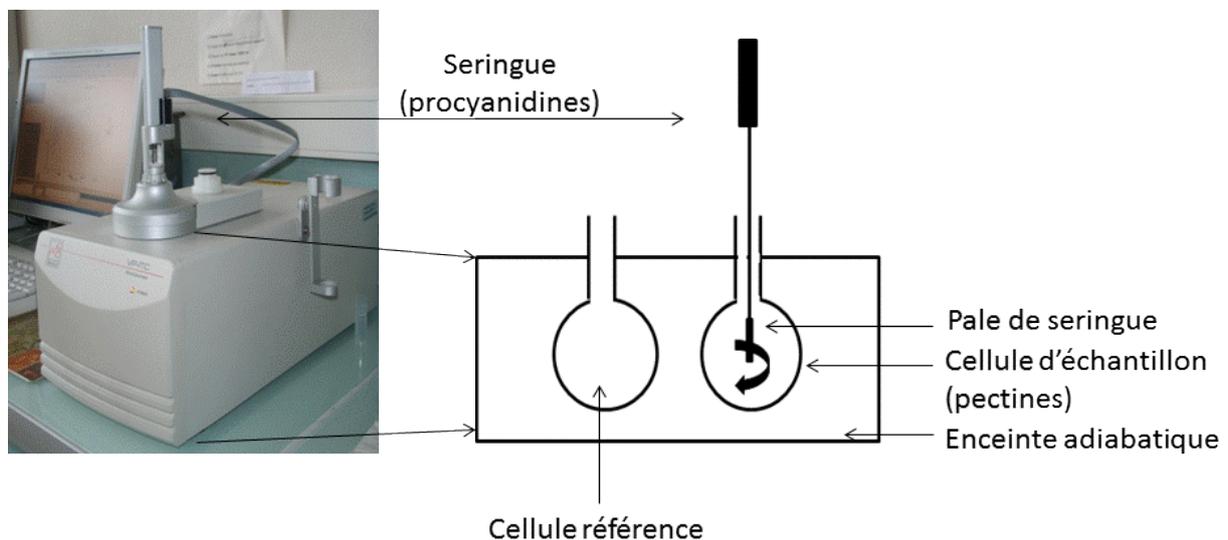


Figure 40 : Microcalorimètre VP-ITC (Microcal) et le schéma de fonctionnement.

Les données brutes enregistrées correspondent à l'énergie mesurée ($\mu\text{cal/sec}$) en fonction du temps (min). Le thermogramme obtenu est ajusté par le logiciel Origin 7 (Microcal, GE Healthcare, Northampton, MA, USA) et les paramètres thermodynamiques tels que la stoechiométrie (n), la constante d'association (K_a), et l'enthalpie de liaison (ΔH) sont définis (Figure 41) par l'équation suivante.

$$Q_i = \frac{nP_t \Delta H V_0}{2} \left[1 + \frac{A_t}{nP_t} + \frac{1}{nK_a P_t} - \sqrt{\left(1 + \frac{A_t}{nP_t} + \frac{1}{nK_a P_t} \right)^2 - 4 \frac{A_t}{nP_t}} \right] \quad (\text{Eq. 6})$$

où P_t est la concentration en molécules dans la cellule, A_t est la concentration du ligand, V_0 est le volume de la cellule, et Q_i est la chaleur dégagée pour l'injection i .

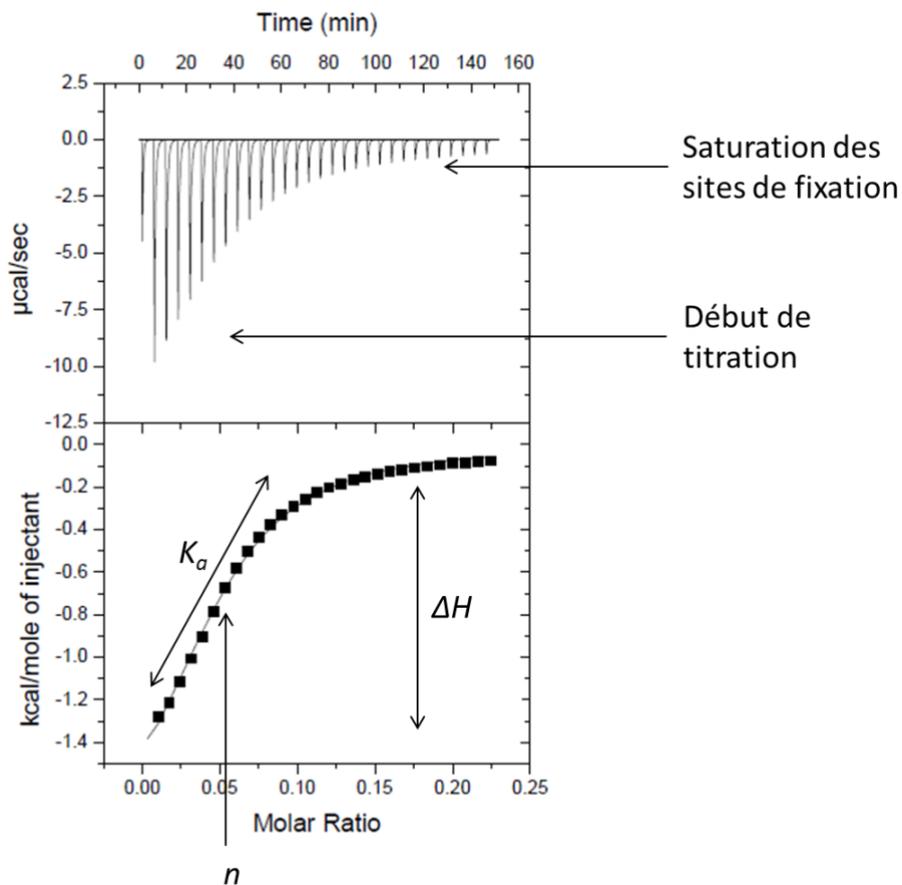


Figure 41 : Thermogramme et courbe ajustée d'interaction entre pectines et procyanidines.

A l'aide du 1er et 2ème principe de la thermodynamique, l'enthalpie libre (ΔG) et l'entropie (ΔS) peuvent être définies par l'équation suivante :

$$\Delta G = -RT \ln Ka = \Delta H - T\Delta S \quad (Eq. 7)$$

Où R est la constante des gaz parfaits ($8,314 \text{ J.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$) et T la température du système en Kelvin.

3.2.4. Résonance plasmonique de surface (RPS)

- **Principe :**

La résonance plasmonique de surface est une méthode permettant de définir des interactions entre deux molécules dans un système dynamique sous flux continu de tampon (le tampon de course). Avec cette technique, une molécule est immobilisée (ligand) et une molécule mobile (analyte) est injectée, permettant ainsi de définir les constantes d'association et de dissociation des interactions entre les deux composés mais également d'identifier les sites de fixation.

Cette technique optique et physique est basée sur l'analyse d'un angle de résonance (Figure 42). Un faisceau de lumière polarisée monochromatique illumine une interface d'indice de réfraction différent et la lumière est réfléchi ou réfractée. Les photons du rayon incident entrent en résonance avec les électrons libres de la surface de métal ce qui crée une onde évanescente qui se propage perpendiculairement dans le milieu où l'indice de réfraction est le plus bas, sur quelques nanomètres (champ évanescent). L'onde évanescente (ou plasmons de surface) induit une diminution de l'intensité de la lumière réfléchi. Ces plasmons changent avec les modifications de la surface d'or (ou sensorchip) et du milieu ce qui entraîne un changement de l'angle de résonance (θ).

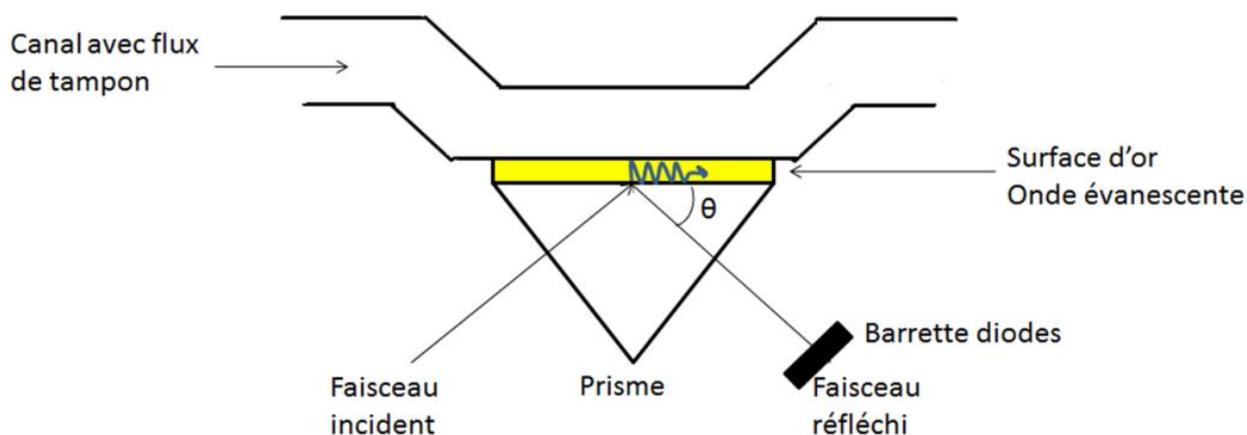


Figure 42 : Principe de fonctionnement de la résonance plasmonique de surface (RPS).

En fonction des modifications de la surface (sensorchip), l'angle de résonance mesuré change et les variations de cet angle en fonction du temps forment un sensorgramme. Le sensorgramme représente plusieurs étapes de modification de surface (Figure 43). Le tampon de course passe sur la sensorchip ce qui donne un angle de résonance stable et ainsi une unité de résonance (RU) stable. L'analyte est injecté et s'associe avec le ligand déjà immobilisé sur la surface ce qui entraîne une augmentation de l'unité de résonance. A la fin de l'injection, le tampon de course décroche l'analyte qui a interagi avec le ligand, ce qui correspond à la phase de dissociation. Pour revenir à la surface initiale contenant le ligand, une phase de régénération est effectuée, entraînant une chute d'unité de résonance.

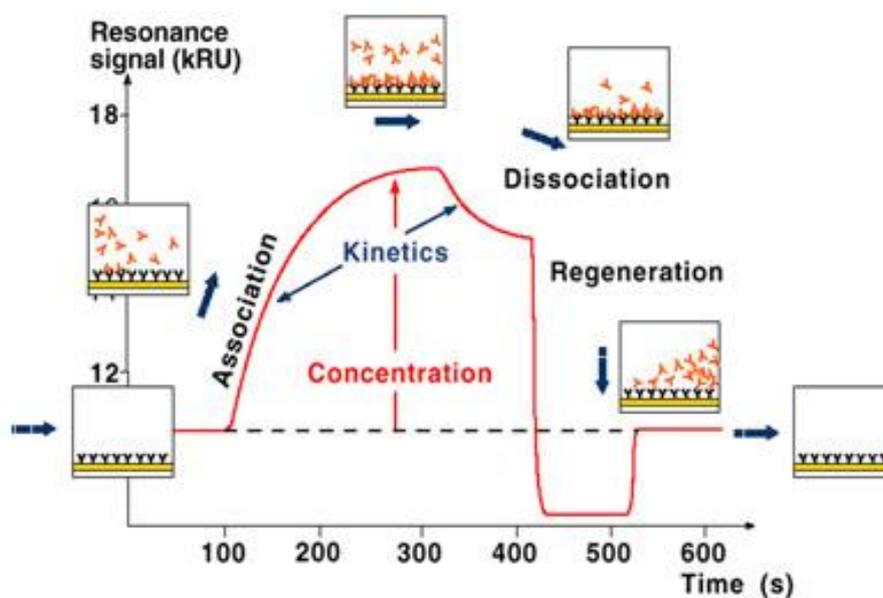


Figure 43 : Sensorgramme RPS (Biacore, GE Healthcare).

Avec l'appareil de RPS (BIAcore 3000, Ge Healthcare Europe GmbH, France), une cartouche microfluidique contenant 4 canaux est utilisée ce qui permet de définir 4 pistes sur la surface qui vient se coller dessus. Cela facilite la comparaison entre différents ligands immobilisés et/ou différents analytes.

- **Mode opératoire :**

- 3.2.4.1. Immobilisation de pectines ou de polyphénols-POH sur surface d'or

Une surface d'or (sensorchip) est lavée avec de l'éthanol absolu puis séchée sous flux d'air comprimé avant d'être utilisée. La sensorchip en or est plongée dans une solution composée d'acide thioglycolique à 1 mmol/L dans de l'éthanol absolu et mise sous agitation sous atmosphère inerte pendant 36h comme décrit par Dutta *et al.* (2011). La sensorchip est récupérée et lavée plusieurs fois avec de l'éthanol absolu et séchée sous air comprimé.

La sensorchip est insérée dans l'appareil (BIAcore 3000, GE Healthcare Northampton, MA, USA) et « collée » à la cartouche microfluidique contenant 4 canaux. Le tampon de course (citrate/phosphate pH 3,8 FI 0,1 mol/L) circule à un débit de 5 $\mu\text{L}/\text{min}$. Après stabilisation de la ligne de base, 50 μL d'une solution de 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)-carbodiimide (EDC) 0,4 mol/L / N-hydroxysuccinimide (NHS) 0,1 mol/L sont injectés afin d'activer les groupements carboxyliques de l'acide thioglycolique présents à la surface de la sensorchip. 50 μL d'une solution de diamine (éthylènedioxybiséthylamine) à 0,1 mol/L préparée dans un tampon d'acide borique pH 8,4 sont injectés. Après fixation de la diamine sur les groupements carboxyliques de l'acide thioglycolique, une solution de pectines ou de polyphénols-POH à 15 $\mu\text{mol}/\text{L}$ préalablement activés par une solution de EDC à 0,1 mol/L et NHS à 0,025 mol/L est injectée avec des volumes croissants.

- ✓ *Interaction avec des polyphénols ou des pectines*

Le tampon de course utilisé (tampon citrate/phosphate (pH 3,8 FI 0,1 mol/L)) préalablement filtré et dégazé est réglé à un débit de 20 $\mu\text{L}/\text{min}$. Les polyphénols sont préparés à 15 mmol/L

de solution mère dans le tampon de course, puis dilués pour obtenir des concentrations de 15 nmol/L ; 150 nmol/L ; 1,5 $\mu\text{mol/L}$ et 15 $\mu\text{mol/L}$. 50 μL de ces solutions sont injectés de la moins concentrée à la plus concentrée. Les pectines sont préparées à 30 $\mu\text{mol/L}$ de solution mère dans le tampon de course puis diluées pour obtenir des concentrations de 30 nmol/L ; 300 nmol/L et 3 $\mu\text{mol/L}$. 50 μL de ces solutions sont injectés dans un ordre croissant de concentrations.

Après analyse d'interaction, la surface est régénérée à l'aide de 20 μL d'une solution de Triton X100 0,5 %.

3.2.4.2. Immobilisation de polyphénols-SH sur surface d'or

Une sensorchip en or est lavée avec de l'eau milliQ puis séchée sous flux d'air comprimé avant l'utilisation. La sensorchip est insérée dans l'appareil puis « collée ». Le tampon de course utilisé a été le HBS-EP (GE Healthcare) contenant 10 mmol/L HEPES (pH 7,4) ; 150 mmol/L de NaCl ; 3 mmol/L de EDTA et 0,005 % de surfactant P20. La stabilisation de la ligne de base se fait en laissant circuler pendant environ 800 sec le tampon de course à un débit de 5 $\mu\text{L/min}$. Puis 5 μL de polyphénols-SH à 1 nmol/L préparé dans le tampon de course contenant 5 % d'acide acétique (HBS-EP acide) (filtré à 0,45 $\mu\text{mol/L}$) sont injectés.

✓ *Interaction avec des pectines*

Les analyses d'interactions avec les pectines sont réalisées en essayant différents tampons de course. Le débit a toujours été de 20 $\mu\text{L/min}$ et le volume d'injection des solutions de pectines de 50 μL . Les tampons utilisés sont : le citrate/phosphate (pH 3,8 FI 0,1 mol/L), l'acétate de sodium/acide acétique (pH 3,6), l'eau milliQ, le HBS-EP et le HBS-EP contenant 5 % d'acide acétique. Les pectines sont préparées dans les mêmes tampons à des concentrations variant de 3 nmol/L à 3 $\mu\text{mol/L}$ par pas de 10 et à 30 mmol/L.

Après les analyses d'interactions, la sensorchip est régénérée avec 20 μL d'une solution de SDS à 0,05 %.

✓ *Interaction avec la sérum albumine bovine (SAB)*

Une solution de SAB à la concentration de 100 $\mu\text{mol/L}$ (6,6 mg/mL) est préparée dans le tampon de course HBS-EP puis diluée pour obtenir une solution à 10 $\mu\text{mol/L}$. Cette dernière est injectée (50 μL) à un débit de 20 $\mu\text{L}/\text{min}$. La surface est ensuite régénérée à l'aide de la solution de SDS à 0,05 %.

3.2.4.3. Immobilisation de polyphénols –SH sur sensorchip CM5

Une sensorchip de carboxyméthyl-dextrane (CMD 200m, Xantec, Duesseldorf, Allemagne) est lavée avec de l'eau milliQ puis séchée sous flux d'air comprimé avant utilisation. La sensorchip est insérée dans l'appareil puis « collée ». Le tampon de course utilisé a été le HBS-EP (GE Healthcare) contenant 10 mmol/L HEPES (pH 7,4), 150 mmol/L de NaCl, 3 mmol/L de EDTA et 0,005 % de surfactant P20. La stabilisation de la ligne de base s'est faite en laissant circuler pendant environ 300 sec le tampon de course à un débit de 5 $\mu\text{L}/\text{min}$. Les polyphénols-thiols sont immobilisés selon le protocole de GE Healthcare. 10 μL d'un mélange EDC 0,2M / NHS 0,05M sont injectés sur la sensorchip. Puis, 20 μL de 2-(2-pyridinyldithio)éthaneamine (PDEA) à 80 mmol/L préparé dans un tampon borate 0,1 mol/L pH 8,5 sont injectés. Les polyphénols –SH sont ensuite injectés sur la sensorchip. Enfin, 20 μL d'un mélange de cystéine 50 mmol/L et de chlorure de sodium à 1 mol/L préparé dans un tampon acétate de sodium 0,1 mol/L à pH 4,3 sont injectés. Sur la piste de référence (piste 1), la surface est immobilisée selon le même protocole sans polyphénols –SH.

✓ *Interaction avec une protéine salivaire (PRP IB5), la poly-L-proline et la pectine commerciale de pomme*

La protéine salivaire, la poly-L-proline ou la pectine commerciale de pomme sont préparées dans le tampon de course acidifié avec 5% d'acide acétique (HBS-EP acide). Le débit est de 20 $\mu\text{L}/\text{min}$. Les analytes sont préparés à des concentrations de 3, 30 et 300 nmol/L. Le SDS 0,05% et une solution fournie par GE Healthcare, 10 mmol/L de glycine/HCl sont utilisés comme solutions de régénération.

3.2.5. Vérification de la fixation des polyphénols sur une surface d'or par PM-IRRAS

Toutes les analyses de surface par PM-IRRAS ont été réalisées par le Dr. Buffeteau (ISM, Bordeaux).

- **Principe :**

La spectroscopie PM-IRRAS (Polarization Modulation Infrared Reflexion-Absorption Spectroscopy) est une technique simple et non destructive qui permet de détecter les différents groupes fonctionnels de monocouches auto-assemblées (SAMs) déposées sur un substrat métallique et d'acquérir des informations moléculaires de ces systèmes bidimensionnels, tels que la conformation des chaînes alkyles et l'orientation des groupes fonctionnels. La technique de modulation de polarisation consiste à appliquer au faisceau infrarouge incident, déjà modulé à basse fréquence par l'interféromètre ($f_i = 400-4000$ Hz), une modulation très rapide ($f_m = 50$ KHz) de la polarisation entre les états linéaires parallèle (//) et perpendiculaire (\perp) au plan d'incidence de l'échantillon, au moyen d'un modulateur photoélastique transparent dans l'infrarouge. Le filtrage, la démodulation et le traitement mathématique de l'intensité détectée permettent d'obtenir un signal différentiel normalisé.

Ainsi, par rapport à une spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier conventionnelle, on obtient par cette méthode : (i) une insensibilité quasi parfaite aux dérives et instabilités expérimentales, liée à la normalisation en temps réel du signal modulé à haute fréquence par rapport à celui modulé à basse fréquence; (ii) une compensation quasi parfaite des absorptions isotropes de l'environnement de l'échantillon, permettant des mesures "in situ" à l'air libre ou dans des fluides même absorbants; (iii) une détectivité amplifiée de plusieurs ordres de grandeur des signaux caractéristiques de l'anisotropie de l'échantillon étudié, du fait de la modulation et du caractère différentiel du signal obtenu.

- **Mode opératoire :**

Les surfaces d'or ont été préparées par un traitement UV-ozone pendant 40 min, puis lavées à l'eau milliQ et séchées sous air comprimé. Deux méthodes de modification de surface sont réalisées :

✓ *En condition classique :*

Les surfaces sont plongées dans une solution d'acide thioglycolique à 1 mmol/L dans de l'éthanol absolu ou de polyphénols-SH 10 mmol/L dans de l'éthanol absolu et laissées sous agitation pendant 24 h, sous atmosphère inerte. Puis les surfaces sont rincées avec de l'éthanol absolu et séchées sous air comprimé.

✓ *En condition RPS :*

Les surfaces sont plongées dans une solution de tampon HBS-EP pendant 15 min ; puis 60 µL de polyphénols-SH à 10 mmol/L sont injectés sur la surface et laissé en contact pendant 12 min. Les surfaces sont rincées par le tampon HBS-EP et séchées sous air comprimé.

✓ *Analyse PM-IRRAS*

Les spectres PM-IRRAS ont été enregistrés avec une résolution de 4 cm⁻¹, par accumulation de plusieurs mesures de 1500 scans (30 min d'acquisition). Généralement, huit mesures (4 h d'acquisition) sont nécessaires pour obtenir des spectres PM-IRRAS de SAMs présentant un bon ratio signal/bruit.

4. Méthodes statistiques

4.1. Calcul de la précision des mesures

La méthode de Box *et al.*, 1978 est utilisée pour calculer l'erreur d'une manipulation à partir d'une série d'analyses avec répétitions. On calcule d'abord la variance pour chaque série de répétitions puis on estime la variance totale de la manipulation S² en calculant la moyenne de nos variances pondérées par les degrés de liberté ; selon les équations suivantes :

$$S^2 = \frac{\sum(S_i^2 \times v_i)}{\sum v_i} \quad (Eq.8)$$

Où v_i correspond au degré de liberté de chaque série de répétitions ; c'est-à-dire : $v_i = n - 1$ et où n correspond au nombre de répétitions, (n constant), le degré de liberté de la variance S^2 est égal à :

$$v = \sum v_i = N \times (n - 1) \quad (Eq. 9)$$

avec N le nombre d'échantillons à analyser.

De plus, l'écart-type σ sur les moyennes des n répétitions est calculé par :

$$\sigma = \frac{\sqrt{S^2}}{\sqrt{n}} \quad (Eq. 10)$$

Les écart-types de chaque analyse réalisée ont été calculés à partir de 3 répétitions.

4.2. ANOVA multifacteur

L'analyse ANOVA multifactorielle est réalisée pour les données d'interactions par absorbance entre les procyanidines et les pectines à l'aide du logiciel Statgraphics® Centurion XVI (Sigma Plus, Levallois-Perret, France). Cette analyse a permis de définir les facteurs les plus impliqués dans les interactions entre ces deux molécules tels que le type et les concentrations de molécule, par la détermination du ratio F ainsi que de la probabilité de ce facteur.

Résultats et Discussion

1. Caractérisation des molécules d'intérêt

Dans cette première partie, je vais détailler la composition des différentes molécules utilisées au cours de ma thèse, à savoir :

- des pectines de pomme et d'agrume,
- des fractions pectiques
- des anthocyanes d'extrait de cassis
- des procyanidines extraites de parenchyme de pomme
- des procyanidines qui ont été modifiées chimiquement pour les analyses d'interaction sur support solide.

1.1. Pectines et fractions pectiques

Les teneurs en oses neutres, en acide galacturonique et en méthanol ont été caractérisées dans les différentes fractions pectiques et les pectines commerciales. Le degré de méthylation a été déterminé à partir des teneurs en acide galacturonique et en méthanol (Tableau VII et Tableau VIII). Le coefficient de partition correspondant au volume hydrodynamique des différentes macromolécules pectiques a été déterminé par HPSEC. De plus, une caractérisation par RMN du proton a également été réalisée sur les homogalacturonanes et les pectines de pomme (Figure 44).

Les homogalacturonanes déméthylés (HG 0%) proviennent des pectines de pomme après saponification, donnant lieu aux pectates, et hydrolyse acide. Ces HG 0% ont été reméthylés de façon à obtenir des degrés de méthylation intermédiaire (HG 30%) et élevé (HG 70%).

Tableau VII : Composition osidique en mg/g et coefficients de partition déterminés par HPSEC des pectines commerciales et des homogalacturonanes (HG).

Fractions pectiques	Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	GalA	MeOH (DM %)	K _{av}
Pectine de pomme	12	-	20	8	1	88	63	564	74 (73)	0,02
Pectine d'agrume	20	1	21	4	-	138	33	535	77 (79)	0,04
Pectate	12	-	11	9	-	93	51	691	-	0,002
HG 0%	-	-	-	3	0,5	2	2	866	-	0,15
HG 30%	-	-	-	-	-	-	-	855	45 (29)	0,15
HG 70%	-	-	-	-	-	-	-	814	100 (68)	0,18
<i>ECp</i>	0,7	0,1	0,3	0,2	0,3	1,7	0,6	10,0	1,6 (0,01)	-

Rha : rhamnose ; Fuc : fucose ; Ara : arabinose ; Xyl : xylose ; Man : mannose ; Gal : galactose ; Glc : glucose ; GalA : acide galacturonique ; MeOH : méthanol ; DM : degré de méthylation ; K_{av} : coefficient de partition ; *ECp* : écart-type pondéré ; - : non détecté.

Les pectines commerciales de pomme et d'agrume sont principalement constituées d'acide galacturonique (représentant environ 75 % en poids de la quantité totale d'oses) (Tableau VII). Les principaux oses neutres des deux types de pectines sont le galactose (11,6 % et 18,3 % des oses pour les pectines de pomme et d'agrume respectivement) et le glucose (8,3 % et 4,4 % pour les pectines de pomme et d'agrume respectivement). Par ailleurs, le rhamnose est plus présent dans la pectine d'agrume que dans la pectine de pomme. Les pectines d'agrume semblent plus riches en zone rhamnogalacturonique que les pectines de pomme. Leur degré de méthylation est compris entre 73 % (pectine de pomme) et 79 % (pectine d'agrume) c'est-à-dire qu'elles appartiennent à la famille des pectines hautement méthylées. La composition est en accord avec les données connues sur les pectines de pomme (Thibault *et al.*, 1993 ; Renard *et al.*, 1995), mais diffère des données sur les pectines d'agrume en terme de quantité de rhamnose et de galactose. La quantité de rhamnose est le double de celle présentée par Dronnet *et al.* (1996). Cette différence pourrait être due à la méthode de dosage des oses

neutres. De plus, la quantité de galactose est trois fois et demi plus élevée que celle présentée par Axelos *et al.* (1991).

Après saponification, les pectates sont plus riches en acide galacturonique que les pectines de pomme dont ils proviennent. Le méthanol est absent de cette fraction, comme attendu suite à une saponification (Tableau VII).

La composition osidique des fractions d'homogalacturonanes (HG 0%, HG 30% et HG 70%) (supérieure à 800 mg/g d'acide galacturonique) confirme qu'elles sont bien constituées d'un enchaînement d'acide galacturonique sans ramification par des chaînes latérales d'oses neutres. Elle est cohérente avec ce qui est attendu d'un clivage par hydrolyse acide (Renard et Jarvis, 1999a ; Morris *et al.*, 2010). Le dosage du méthanol a permis de confirmer l'obtention des degrés de méthylation souhaités après le traitement par l'iodure de méthyle. Les homogalacturonanes déméthylés initiaux sont constitués de 866 mg/g d'acide galacturonique sans méthanol et avec moins de 1 % en poids d'oses neutres. Cette fraction est nommée HG 0%. Les homogalacturonanes faiblement méthylés sont constitués de 855 mg/g d'acide galacturonique et de 45 mg/g de méthanol correspondant à un degré de méthylation d'environ 30 %. Cette fraction est nommée HG 30%. Les homogalacturonanes hautement méthylés sont constitués de 814 mg/g d'acide galacturonique et de 100 mg/g de méthanol correspondant à un degré de méthylation d'environ 70 %. Cette fraction est nommée HG 70%.

L'analyse des spectres RMN ^1H des homogalacturonanes (réalisée par le Spectropôle de Marseille) permet de valider les différences de degrés de méthylation des homogalacturonanes (Figure 44). Les déplacements chimiques des protons sont : H2 entre 3,7 et 3,8 ppm ; H3 entre 3,9 et 4,0 ppm ; H4 entre 4,4 et 4,5 ppm ; H5 non-estérifié entre 4,6 et 4,7 ppm et H5 méthylé entre 4,9 et 5,0 ppm. Le degré de méthylation peut être vérifié par le ratio du signal de H4 non estérifié (à 4,4 ppm) sur le signal de H4 estérifié (à 4,5 ppm) (Renard et Jarvis, 1999c).

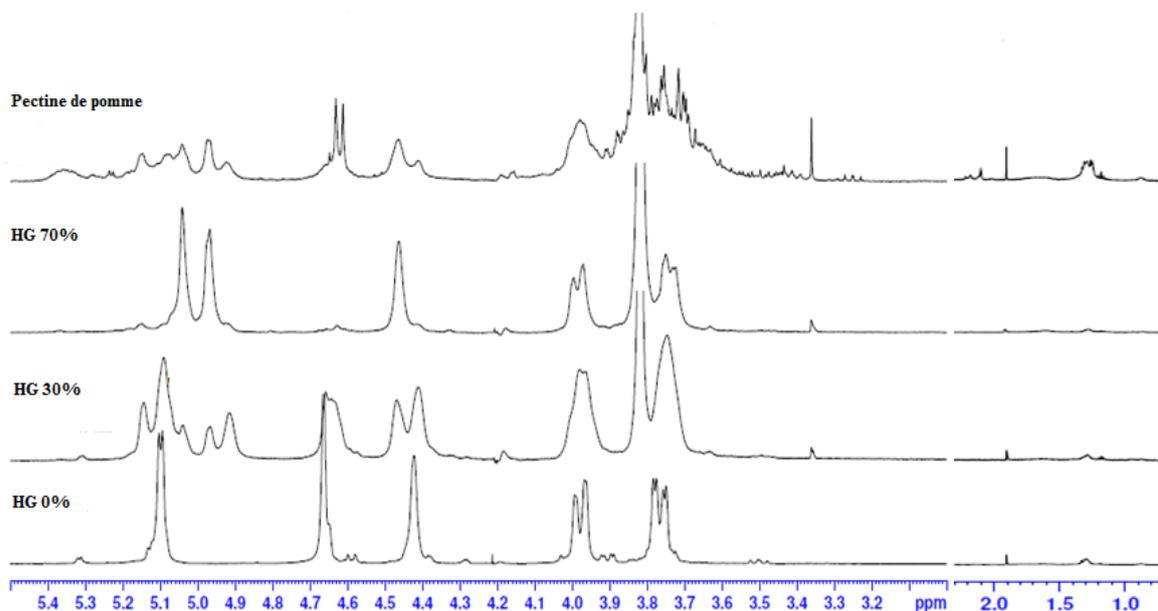


Figure 44 : Spectres RMN ¹H 400MHz à 353 K de pectine commerciale de pomme et d'homogalacturonanes méthylés à 0, 30 et 70% solubilisés dans D₂O parès neutralisation à pH 6.

Les coefficients de partition (Tableau VII et Figure 45) des pectines commerciales et des pectates sont assez proches (aux alentours de 0), et avec des temps de rétention proche de celui du dextrane T500, ce qui est en accord avec leurs volumes hydrodynamiques élevés (Thibault *et al.*, 1993). Les pics obtenus pour ces trois fractions sont relativement larges s'étalant sur plus de 4 minutes d'élution, ce qui indique que ces fractions sont plutôt polydisperses (Corredig et Wicker, 2001). En revanche, dans le cas des homogalacturonanes, les coefficients sont plus élevés que ceux des pectines ce qui signifie que le volume hydrodynamique est plus faible, avec des temps de rétention compris entre ceux des dextranses T500 et T40. Les pics sont beaucoup plus fins que ceux des pectines, avec des durées d'élution de l'ordre de 2 minutes. L'allure de ces pics indique que les homogalacturonanes sont moins polydisperses quel que soit leur degré de méthylation que les pectines commerciales (Renard et Jarvis, 1999a). En revanche, la fraction HG 70% présente un coefficient de partition un peu plus élevé que ceux des autres homogalacturonanes. Cette fraction homogalacturonique est moins chargée que les autres homogalacturonanes, ce qui pourrait entraîner un changement de conformation (plus globulaire) dans le tampon d'analyse.

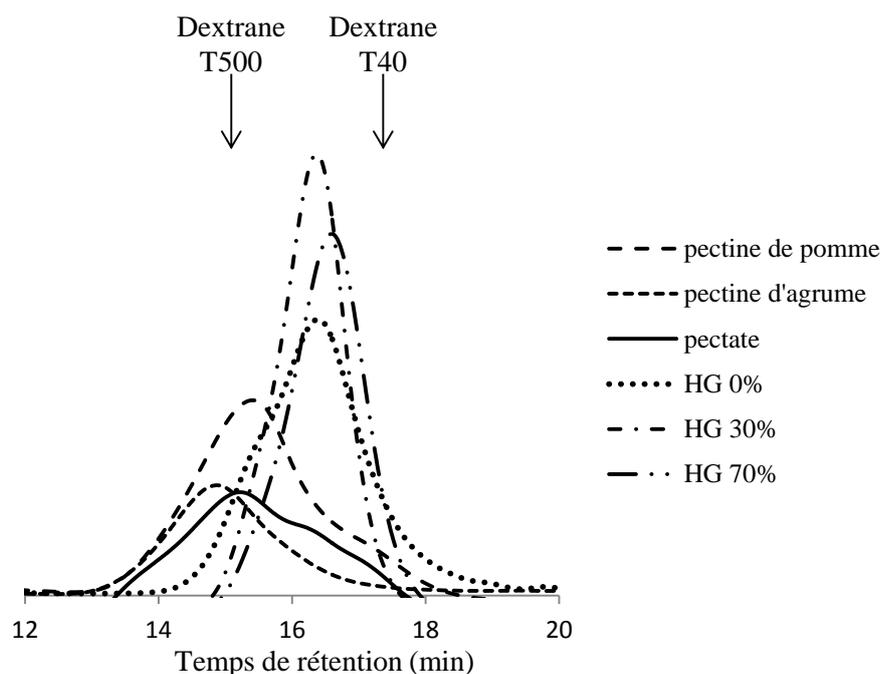


Figure 45 : Chromatogrammes par HPSEC des pectines et des homogalacturonanes élués avec un tampon acide acétique/acétate de sodium pH 3,5 sur des colonnes OH-pack SB-802 HQ et TSK-gel GMPWxl à 35°C.

En ce qui concerne les fractions pectiques de zones hérissées, les compositions osidiques des fractions MHR1 à MHR4, AGP0 et AGP4 sont celles figurant dans les publications respectives où ces polysaccharides sont décrits (Tableau VIII), les quantités obtenues étant tout juste suffisantes pour les essais par ITC. Il en est de même pour les fractions de RG-II décrites ultérieurement. Les fractions MHR1, 2 et 3 ont été caractérisées par Schols *et al.* (1994), la fraction MHR4 a été caractérisée par Coenen (2007), les fractions AGPs et RG-IIs (Tableau IX) ont été caractérisées par le Pellerin *et al.* (1995 et 1996).

En revanche, la composition en oses des fractions RG, AHR et HR-H, ainsi que la détermination des coefficients de partition de toutes les fractions des Tableau VIII et Tableau IX ont été réalisées au laboratoire.

Tableau VIII : Composition osidique en mg/g et coefficients de partition déterminés par HPSEC des fractions de zones hérissées de pectines.

Fractions de pectines	Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	GalA	Références	K _{av}
RG	49	3	45	15	10	236	128	458	-	0,26
AHR	23	2	251	16	-	30	19	167	-	0,28
HR-H	143	-	25	-	-	199	-	437	-	0,13
<i>ECp</i>	1,7	0,1	9,6	0,7	0,9	9,5	5,7	4,5		-
MHR1	89	9	83	113	-	134	-	385	Schols et Voragen, 1994	-0,06
MHR2	79	-	240	42	-	101	-	209	Schols et Voragen, 1994	-0,03
MHR3	132	-	40	17	7	208	-	283	Schols et Voragen, 1994	0,01
MHR4	41	33	188	52	-	351	27	165	Coenen, 2007	nd
AGP0	11	1	358	2	18	583	16	28	Pellerin <i>et al.</i> , 1995	0,08
AGP4	93	2	250	18	23	354	3	180	Pellerin <i>et al.</i> , 1995	0,02

Rha : rhamnose ; Fuc : fucose ; Ara : arabinose ; Xyl : xylose ; Man : mannose ; Gal : galactose ; Glc : glucose ; GalA : acide galacturonique ; K_{av} : coefficient de partition ; *ECp* : écart- type pondéré ; nd : non défini.

La fraction RG contient une forte proportion d'acide galacturonique (458 mg/g de matière sèche), avec un ratio molaire GalA: Rha > 7, indiquant la prédominance d'une chaîne homogalacturonique. Cette fraction est ramifiée majoritairement par du galactose et du glucose. La fraction AHR contient aussi une proportion non négligeable d'homogalacturonanes (GalA: Rha = 6), ainsi qu'une proportion d'arabinose élevée de 49 % massique. Le ratio molaire Ara: Rha est supérieur à 10 ce qui montre la présence de chaînes d'arabinanes relativement longues. La fraction HR-H est la fraction rhamnogalacturonique la plus simple, car elle présente une chaîne rhamnogalacturonique avec un ratio molaire GalA: Rha de 2,5 avec 25 % massique de galactose et 3 % massique d'arabinose. Le ratio molaire (Gal+Ara): Rha est inférieur à 2 ce qui correspond à de courtes chaînes d'arabinogalactanes (Voragen *et al.*, 2009).

Les fractions MHRs et AGPs ont été caractérisées en détail dans les publications de Schols et Voragen (1994) pour les MHR1 à MHR3, de Coenen (2007) pour MHR4 et de Pellerin *et al.* (1995) pour les AGPs. Leurs principales caractéristiques structurales sont reprises ci-dessous. Toutes les fractions MHRs résultent d'une hydrolyse enzymatique drastique et sont donc constituées de polymères de masse molaire élevée avec un squelette rhamnogalacturonique. Cependant, la structure des chaînes latérales dépend de l'origine botanique. Les fractions MHR1 et MHR4 (issues de pomme et de soja respectivement) contiennent une proportion plus élevée de squelette homogalacturonique (GalA: Rha = 3,6 et 3,4 respectivement) que les fractions MHR2 et MHR3 (issues de poire et d'oignon respectivement) qui présentent un ratio molaire GalA: Rha de 2,2 et 1,8 respectivement. La fraction MHR1 est principalement composée de galactanes liés en β -(1 \rightarrow 4) et d'arabinanes (Schols et Voragen, 1994; Renard *et al.*, 1991), ainsi que de xylose. Le ratio molaire Xyl: GalA est de 0,4, ce qui indique la présence de xylogalacturonanes (Schols *et al.*, 1995a et b). La fraction MHR2 est riche en arabinose présent sous forme de chaînes liées en α -(1 \rightarrow 5) majoritairement, ce qui correspond à des chaînes d'arabinanes. Les quantités élevées de galactose montrent que des chaînes de galactanes sont présentes dans cette fraction, et elles ont été identifiées comme étant des galactanes de type II (liaisons β -(1 \rightarrow 3) et β -(1 \rightarrow 6)) plus quelques résidus de galactose en position terminale (Schols et Voragen, 1994). La fraction MHR3 est riche en galactose et présente de courtes chaînes de galactanes de type I (liées en β -(1 \rightarrow 4)), comme le montre l'abondance des résidus de galactose en position terminale (Schols et Voragen, 1994). Tout comme MHR3, la fraction MHR4 présente des chaînes de galactanes, ainsi que des monomères et des courtes chaînes latérales de β -D-Xylose substituant en (1,3) l'acide galacturonique, ce qui correspond à la présence de chaînes de xylogalacturonanes (Coenen *et al.*, 2007; Nakamura *et al.*, 2001).

Les arabinogalactanes-protéines de type II (AGP0 et AGP4) ont des compositions osidiques similaires, mis à part l'arabinose et le galactose plus présents dans AGP0 (35,2 % et 57,3 % respectivement) que dans AGP4 (27,1 % et 38,3 % respectivement), tandis que la quantité d'acide uronique est plus élevée dans AGP4 que dans AGP0 (19,5 % et 2,7 % respectivement). Dans la fraction AGP4, le rhamnose est lié en (2,4) (2,2 % de moles) et le galactose en (3,6) (32,9 % de moles), tandis que dans la fraction AGP0 le galactose est plutôt lié en (3,4,6) (10,8 % de moles) (Pellerin *et al.*, 1995).

Tableau IX : Composition en oses neutres (% moles) des fractions de RG-II monomère (mRG-II) et dimère (dRG-II) d'après Pellerin *et al.* (1996).

% moles	Rha	Fuc	Apiose	Ara	Gal	AcéA	GalA	GlcA	Kdo	Dha	B	K _{av}
mRG-II	16,8	3,0	6,2	11,2	6,6	1,2	38,2	3,3	4,4	2,6	-	0,27
dRG-II	16,9	3,6	7,2	9,7	5,0	2,2	37,2	3,4	5,0	2,5	0,09	0,22

Rha : rhamnose ; Fuc : fucose ; Ara : arabinose ; Gal : galactose ; AcéA : Acide acérique ; GalA : acide galacturonique ; GlcA : acide glucuronique ; Kdo : acide 3-déoxy-D-manno-octulosonique ; Dha : acide 3-déoxy-D-lyxo-heptulosarique ; B : bore ; K_{av} : coefficient de partition.

Les deux RG-IIs présentent des compositions osidiques très proches et caractéristiques avec notamment la présence d'oses rares (Pellerin *et al.*, 1996), mais diffèrent par leur degré de polymérisation (Tableau IX). La fraction mRG-II est majoritairement monomérique (pure à 90 %) et la fraction dRG-II est majoritairement dimérique (pure à 87 %) (Pellerin *et al.*, 1996). Les RG-IIs sont riches en arabinose et composés d'oses neutres, et le dimère se distingue par la présence de bore.

Les coefficients de partition (Tableau VIII) des fractions RG et AHR sont identiques (K_{av} de 0,26 et 0,28 respectivement avec des temps de rétention de 17,2 min et 17,4 min), ce qui correspond à de petits polymères obtenus après hydrolyse acide de pectines commerciales ou après réaction enzymatique de marc de pomme. En revanche, le coefficient de partition de la fraction HR-H est plus faible (K_{av} de 0,13 avec un temps de rétention de 16,3 min) indiquant un volume hydrodynamique plus élevé. En ce qui concerne les fractions d'arabinogalactanes-protéines, les coefficients de partition sont faibles et similaires aux coefficients de partition des pectines commerciales (K_{av} de 0,02 pour AGP4). Les coefficients de partition des RG-IIs (Tableau IX) sont similaires (K_{av} de 0,27 pour mRG-II et 0,22 pour dRG-II) et sont en accord avec les masses molaires calculées par Pellerin *et al.* (1996).

1.2. Anthocyanes de l'extrait de cassis

L'identification et la quantification des anthocyanes contenues dans l'extrait de cassis ont été réalisées par HPLC-DAD grâce aux quatre standards d'anthocyanes utilisés lors de ma thèse (la cyanidine-3-O-glucoside (C3G), la cyanidine-3-O-rutinoside (C3R), la delphinidine-3-O-glucoside (D3G) et la delphinidine-3-O-rutinoside (D3R)). Ces anthocyanes sont connues pour être les 4 anthocyanes majoritaires de jus de cassis (da Costa *et al.*, 1998). Le

chromatogramme de l'extrait de cassis en milieu acide, obtenu à 520 nm (Figure 46), présente 8 pics correspondant aux anthocyanes.

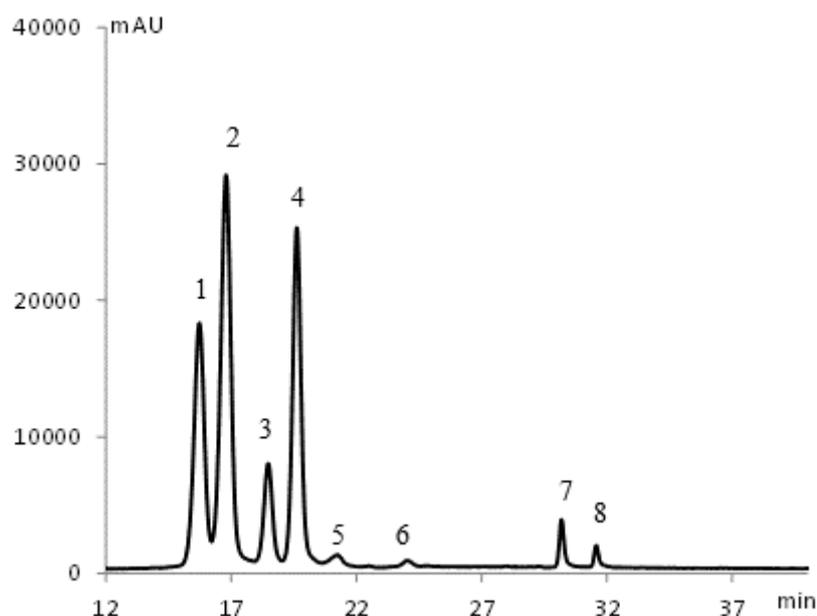


Figure 46 : Chromatogramme à 520 nm de l'extrait de cassis élué par un gradient eau/acide acétique (97,5/2,5 v/v) et acétonitrile sur une colonne Lichrospher C18 à 30°C.

1 : delphinidine-3-O-glucoside ; 2 : delphinidine-3-O-rutinoside ; 3 : cyanidine-3-O-glucoside ; 4 : cyanidine-3-O-rutinoside ; 5 : pétunidine-3-O-rutinoside ; 6 : péonidine-3-O-glucoside ; 7 : péonidine-3-O-rutinoside ; 8 : myricétrine-3-O-rutinoside.

Les 4 pics majoritaires correspondent à la D3G (tr = 15,7 min) (1), la D3R (tr = 16,8 min) (2), la C3G (tr = 18,5 min) (3) et la C3R (tr = 19,6 min) (4). Des pics minoritaires aux temps de rétention de 21,2 min à 31,6 min correspondraient à la pétunidine-3-O-rutinoside (5), la péonidine-3-O-glucoside (6), la péonidine-3-O-rutinoside (7) et à la myricétrine-3-O-rutinoside (8), selon Borges *et al.* (2010). En considérant que 100 % des anthocyanes totales de l'extrait de cassis correspondent aux 4 anthocyanes majoritaires, on peut estimer que la delphinidine-3-O-rutinoside compte pour 38,3%, la cyanidine-3-O-rutinoside pour 29,7%, la delphinidine-3-O-glucoside pour 23,4% et la cyanidine-3-O-glucoside pour 8,6%. Ces pourcentages ont été déterminés à la longueur d'onde de 520 nm pour tout l'extrait de cassis et dans un milieu acide, or les standards montrent un maximum d'absorption différent en fonction de leur structure chimique et du pH utilisé. Dans un milieu acidifié, les longueurs d'onde d'absorption maximale sont de 528 nm pour la C3G, de 530 nm pour la C3R, de 541 nm pour la D3G et de 542 nm pour la D3R d'après le fournisseur (Extrasynthèse). Par

spectrophotométrie, la longueur d'onde d'absorption maximale des 4 standards a été déterminée à pH 3,8 lors des analyses d'interaction avec les fractions pectiques. Dans ces conditions, les cyanidine-3-O-glucoside et rutinoside ont une longueur d'onde d'absorption maximale de 514 et 516 nm respectivement, tandis que les delphinidine-3-O-glucoside et rutinoside montrent une longueur d'onde d'absorption maximale de 520 et 524 nm respectivement.

1.3. Procyanidines

Les trois variétés de pomme (*Golden delicious*, *Marie Ménéard* et *Avrolles*) ont été choisies car leurs procyanidines présentent des degrés de polymérisation (DP8, DP9 et DP30 respectivement) contrastés. La caractérisation des polyphénols extraits et purifiés du parenchyme de ces trois variétés, ainsi que du dimère B2 (DP2) extrait et purifié à partir du parenchyme de la variété *Kermérien* est détaillée ci-après. Enfin, les résultats de modifications chimiques de ces procyanidines nécessaires à leur immobilisation sur un support solide sont présentés.

1.3.1. Procyanidines extraites de parenchyme de pomme

Les fractions de procyanidines DP8, DP9 et DP30 ont été obtenues par une extraction fractionnée puis par une purification sur une colonne C18. La fraction DP2, quant à elle, a subi une purification supplémentaire sur une colonne Luna HILIC afin d'isoler le dimère B2. Dans le protocole d'extraction fractionnée utilisé, l'extraction à l'hexane permet d'éliminer les composés lipophiles. Le traitement au méthanol acidifié, qui extrait près de 80 % de la matière sèche initiale (Guyot *et al.*, 1998), regroupe essentiellement des sucres, des acides et des polyphénols de faible poids moléculaire. La phase hydroacétonique, qui solubilise en moyenne 1 % de la matière sèche initiale (Guyot *et al.*, 1998), se compose en grande partie de procyanidines polymérisées.

La fraction DP2 provient de la fraction méthanolique et a été caractérisée à chaque étape de purification (Tableau X), tandis que les fractions DP8, DP9 et DP30 ont été analysées uniquement à partir de la fraction hydroacétonique (Tableau XI). La composition polyphénolique des fractions DP2, DP8, DP9 et DP30, ainsi que leurs spectres RMN du proton, sont présentés ci-après.

Tableau X : Composition polyphénolique (mg/g de matière sèche (MS)) de la fraction DP2 extraite du parenchyme de la variété *Kermerrien* aux différentes étapes de purification.

mg/g MS	\overline{DPn}	Flavan-3-ols			Dihydrochalcones		Acides hydroxycinnamiques	
		CAT	EPI	PCA	PLZ	XPL	CQA	PCQ
Parenchyme	7	0,6	2,9	18,3	0,4	0,1	6,3	0,3
<i>EC</i>	0,7	0,1	0,2	0,9	0,1	0,0	0,3	0,0
Fraction méthanolique avant C18	2	0,2	0,7	5,9	0,5	0,2	1,1	0,4
<i>EC</i>	0,2	0,2	0,6	0,5	0,0	0,0	0,1	0,0
Fraction méthanolique après C18	7	22,9	91,6	418,1	9,2	3,6	160,1	10,3
<i>EC</i>	2,4	3,4	14,1	80,0	1,7	0,9	31,0	3,3
Fraction purifiée après Luna HILIC (DP2)	2	0	0	876	0	0	8	0

\overline{DPn} : degré de polymérisation moyen des procyanidines ; CAT : (+)-catéchine ; EPI : (-)-épicatéchine ; PCA : procyanidine ; PLZ : phloridzine ; XPL : xyloglucoside de phlorétine ; CQA : acide 5'caféoylquinique ; PCQ : acide *para*-coumaroylquinique ; *EC* : écart-type.

Le parenchyme de la variété *Kermerrien* (Tableau X) contient 29 mg/g MS de polyphénols dont 18 mg/g de procyanidines. La majorité du parenchyme (75%) est extrait dans la fraction méthanolique, qui contient principalement des sucres et des acides. La teneur en polyphénols de cette fraction méthanolique avant purification est plus faible que dans le parenchyme avec 9 mg/g de polyphénols totaux dont 6 mg/g de procyanidines. En revanche, après purification de la fraction méthanolique sur C18, la teneur en polyphénols totaux est de 712 mg/g dont 418 mg/g de procyanidines, avec un rendement de 4,5 %, montrant l'élimination des sucres et des acides organiques contenus dans la fraction. Le degré de polymérisation des procyanidines de cette fraction est de 7, et quelques monomères de flavan-3-ols subsistent. Enfin, après la deuxième purification sur une colonne Luna HILIC, la fraction de DP2 présente une pureté élevée avec près de 90% de dimère regroupant à la fois le dimère B2 ((-)-épicatéchine-(-)-épicatéchine) et le dimère B1 ((-)-épicatéchine-(+)-catéchine)), ce dernier représentant 15 % des procyanidines totales de la fraction et moins de 1 % de contaminant polyphénolique (CQA). Le dimère est constitué majoritairement par de la (-)-épicatéchine en unité

constitutive et terminale, représentant plus de 91% des unités totales de la fraction. Elle contient également 9 % de (+)-catéchine.

Tableau XI : Composition (mg/g de matière sèche (MS)) en polyphénols des fractions DP8, DP9 et DP30.

mg/g MS	\overline{DPn}	Flavan-3-ols			Dihydrochalcones		Acides hydroxycinnamiques	
		CAT	EPI	PCA	PLZ	XPL	CQA	PCQ
<i>Golden delicious</i> (DP8)	8	21	64	562	1	0	25	1
<i>EC</i>	0,5	0,4	1,1	43,4	0,1	nd	7,1	nd
<i>Marie Ménéard</i> (DP9)	9	12	66	602	0	2	40	0
<i>EC</i>	0,03	0,7	3,4	35,3	nd	0,2	2,9	nd
<i>Avrolles</i> (DP30)	30	2	22	697	0	8	11	0
<i>EC</i>	1,5	1,0	0,5	11,7	nd	0,2	0,8	nd

\overline{DPn} : degré de polymérisation moyen des procyanidines ; CAT : (+)-catéchine ; EPI : (-)-épicatéchine ; PCA : procyanidine ; PLZ : phloridzine ; XPL : xyloglucoside de phlorétine ; CQA : acide 5'-caféoylquinique ; PCQ : acide *para*-coumaroylquinique ; *EC* : écart-type ; *nd* : non défini.

Les trois fractions (Tableau XI) contiennent plus de 67 % de polyphénols (67 % pour DP8, 72 % pour DP9, 74 % pour DP30) principalement composés de procyanidines. Les procyanidines représentent 83 % des polyphénols totaux dans DP8 et DP9 et 94 % des polyphénols totaux dans DP30. Les différentes fractions de procyanidines (DP8, DP9 ou DP30) (Tableau XI), présentent des traces d'acides hydroxycinnamiques, en particulier de l'acide 5'-caféoylquinique ainsi que des dihydrochalcones comme le xyloglucoside de phlorétine. La (-)-épicatéchine est l'unité constitutive majoritaire de toutes les fractions (Nicolas *et al.*, 1994), présente à la fois en unité terminale et en unité d'extension, représentant plus de 95 % des unités totales de la fraction DP30, plus de 88 % des unités totales de la fraction DP9 et plus de 86 % des unités totales de la fraction DP8. En revanche, la (-)-catéchine est présente exclusivement en unité terminale des fractions. Les fractions DP9 et DP8 contiennent plus de (+)-catéchine (1,7 % et 3 % des flavan-3-ols respectivement) que la fraction DP30 (0,3 %). Les degrés de polymérisation moyen calculés sont de 8, 9 et 30 dans les fractions DP8, DP9 et DP30 respectivement.

Les trois fractions de procyanidines de DP8, 9 et 30 ont été analysées par RMN ^1H (Figure 47) à 300 MHz, 298K. Les spectres des trois fractions solubilisées dans du méthanol deutéré (méthanol- d_4) sont similaires. Les déplacements chimiques du proton H4 terminal sont entre 2,5 et 3,2 ppm. Les protons du noyau C sont regroupés entre 4 et 4,5 ppm, les protons H6 et H8 sont vers 6 ppm et enfin les protons des noyaux aromatiques sont présents entre 6,5 et 7,5 ppm, selon Guyot *et al.* (2000). Selon Guyot *et al.* (2000), les degrés de polymérisation des procyanidines peuvent être vérifiés par l'intermédiaire d'un ratio des aires de pics des protons H6 et H8 sur les protons H4 terminaux. En revanche, la résolution des spectres suivants ne permettent pas la vérification des degrés de polymérisation des procyanidines DP8, DP9 et DP30.

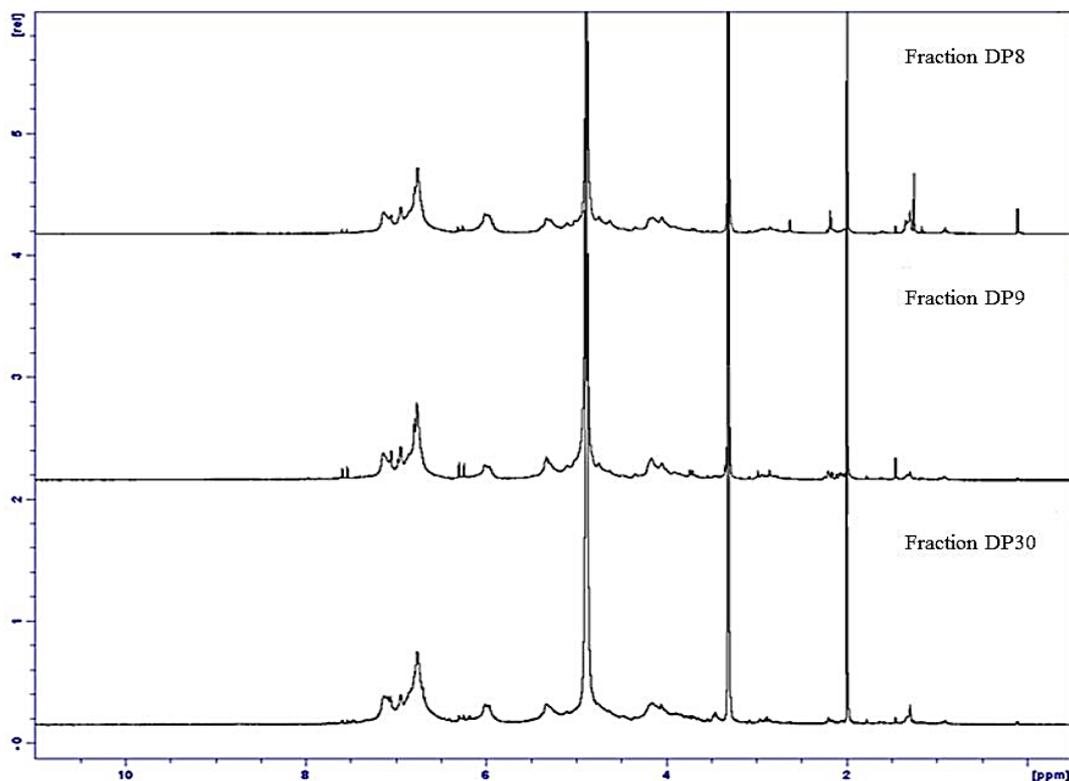


Figure 47 : Spectres RMN ^1H des fractions DP8, DP9 et DP30 dans MeOD- d_4 à 300MHz, 298K.

1.3.2. Procyanidines modifiées chimiquement

Afin d'étudier les interactions sur support solide, il a été nécessaire de modifier les procyanidines pour les immobiliser. Deux modifications ont été réalisées sur les catéchols (cycle B): d'une part par substitution d'un linker-benzyle permettant l'obtention d'un groupement carboxylique libre, et d'autre part par substitution d'un linker-trityle

permettant l'obtention d'un groupement thiol libre. Ainsi, la (+)-catéchine, la (-)-épicatéchine et les procyanidines de DP8 et DP9 ont été modifiées dans les deux cas, et le dimère DP2 a été modifié uniquement par le linker trityle. Les différentes étapes de modification ont été suivies par analyse RMN du proton et du carbone.

1.3.2.1. Procyanidines avec un groupement carboxylique libre

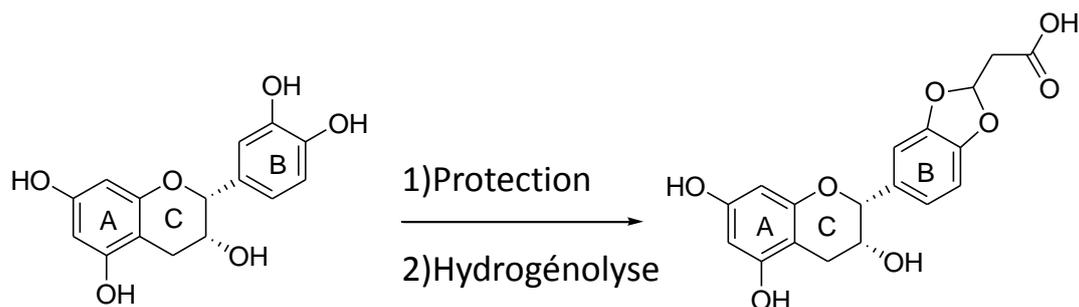


Figure 48 : Modification chimique de la (-)-épicatéchine par benzylation et hydrogénolyse pour l'obtention d'un groupement carboxylique libre.

Les monomères de flavan-3-ols et les procyanidines DP8, DP9 et DP30 ont tout d'abord été modifiés par substitution d'un benzyl propiolate sur les catéchols ((1) Figure 48). Cette étape a été validée par RMN ^1H , hormis pour la fraction DP30 qui est devenue insoluble, et inutilisable par la suite. Puis, les monomères et les procyanidines DP8 et DP9 benzylés ont été hydrogénolysés pour laisser place au groupement carboxylique libre ((2) Figure 48).

Pour simplifier les résultats de caractérisation obtenus, seuls les spectres RMN du proton de la (+)-catéchine modifiée par un groupement benzyle et de la (+)-catéchine présentant un groupement carboxylique libre (Figure 49), ainsi que l'attribution des déplacements chimiques du proton et du carbone sont présentés (Tableau XII et Tableau XIII) Les spectres RMN de la (-)-épicatéchine modifiée et des procyanidines DP8 et DP9 modifiées sont présentés en Annexes.

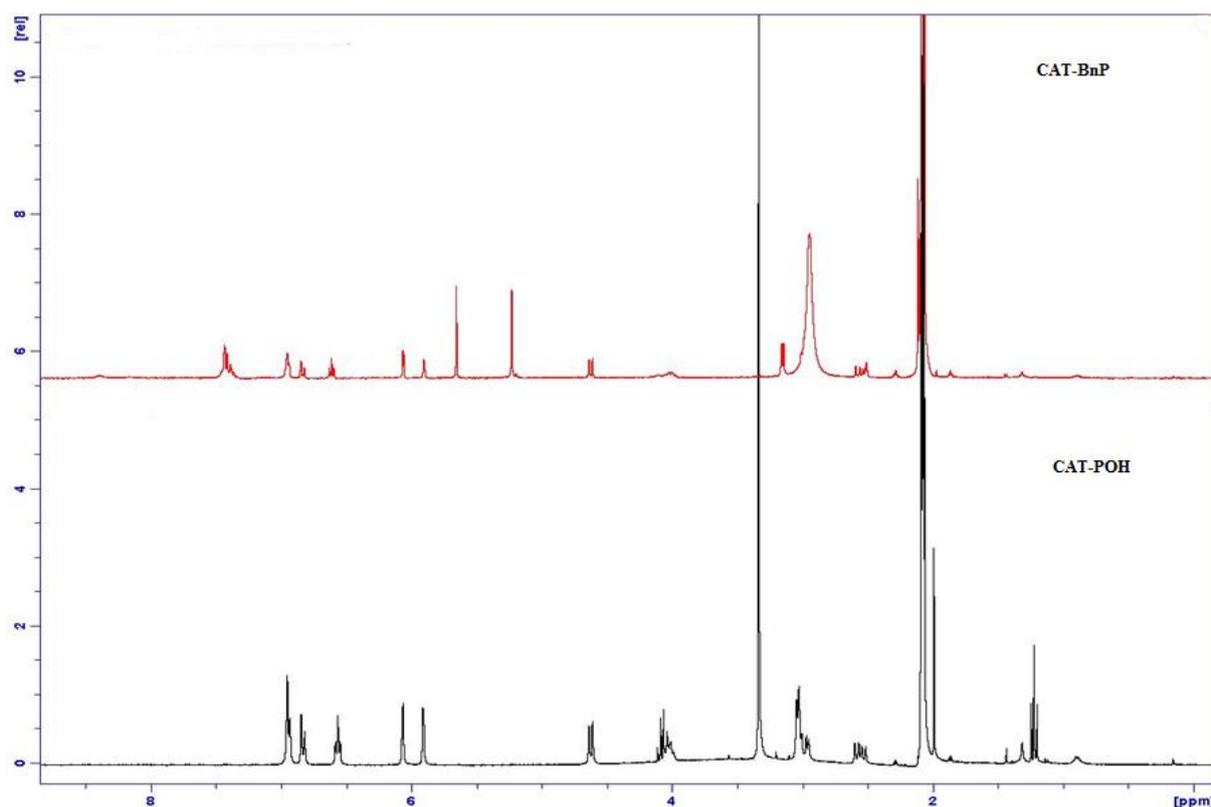


Figure 49 : Spectres RMN ^1H 300MHz à 298K de la (+)-catéchine liée à un linker benzyle (CAT-BnP) et de la (+)-catéchine présentant un groupement carboxylique libre (CAT-POH).

Tableau XII : Attribution des déplacements chimiques des protons et des carbones par RMN de la (+)-catéchine couplé à un propionate de benzyle (CAT-BnP).

	<p>CAT-BnP</p> <ul style="list-style-type: none"> • MM : 450,4 g.mol⁻¹ • FB : C₂₅H₂₂O₈
<p>^1H RMN (acétone-<i>d</i>₆, 300 MHz, d ppm) : d 2,54 (dd, 3J_{4-3trans} = 8,8 Hz, 2J_{4-4trans} = 16,0 Hz, H4-<i>trans</i>), 2,96 (dd, 3J_{4-3cis} = 5,5 Hz, 2J_{4-4trans} = 16,1 Hz, H4-<i>cis</i>), 3,12 (d, 3J_{8'-7'} = 4,5 Hz, 2 H8'), 3,97-4,04 (m, H3), 4,61 (d, 3J_{2-3trans} = 8,1 Hz, H2), 5,20 (s, 2 H10'), 5,90 (d, 4J₆₋₈ = 1,5 Hz, H6), 6,04 (d, 4J₈₋₆ = 2,1 Hz, H8), 6,58 (t, 3J_{7'-8'} = 5,1 Hz, H7'), 6,80 (d, 3J_{2'-3'} = 7,6 Hz, H2'), 6,93 (sl, H3' et H6'), 7,31-7,42 (m, H12', H13' et H14').</p>	
<p>^{13}C RMN (acétone-<i>d</i>₆, 75,5 MHz, d ppm) : d 168,6 (C9'), 157,8 (C7), 157,2 (C9), 156,7 (C5), 148,0 (C5'), 147,7 (C4'), 137,0 (C11'), 134,6 (C1'), 129,3 (C12'), 128,9 (C13'), 128,9 (C14'), 122,3 (C2'), 109,2 (C3'), 108,6 (C7'), 108,4 (C6'), 100,6 (C10), 96,3 (C6), 95,4 (C8), 82,7 (C2), 68,3 (C10'), 67,0 (C3), 40,6 (C8'), 29,2 (C4).</p>	

Tableau XIII : Attributions des déplacements chimiques des protons et des carbones par RMN de la (+)-catéchine comportant un groupement carboxylique libre.

	<p>CAT-POH</p> <ul style="list-style-type: none"> • MM : 360,3 g.mol⁻¹ • FB : C₁₈H₁₆O₈
<p>¹H RMN (acétone-<i>d</i>₆, 300 MHz, d ppm) : d 2,53 (dd, 3<i>J</i>_{4-3trans} = 8,8 Hz, 2<i>J</i>_{4-4trans} = 15,9 Hz, H4-<i>trans</i>), 2,92-2,98 (m, H4-<i>cis</i>), 3,02 (d, 3<i>J</i>_{8'-7'} = 4,7 Hz, 2 H8'), 3,96-4,03 (m, H3), 4,60 (d, 1H, 3<i>J</i>_{2-3trans} = 8,1 Hz, H2), 5,89 (d, 1H, 4<i>J</i>₆₋₈ = 1,9 Hz, H6), 6,04 (d, 4<i>J</i>₈₋₆ = 2,3 Hz, H8), 6,54 (t, 3<i>J</i>_{7'-8'} = 5,3 Hz, H7'), 6,80 (d, 3<i>J</i>_{3'-2'} = 8,3 Hz, H2'), 6,91-6,93 (m, H3' et H6').</p>	
<p>¹³C RMN (acétone-<i>d</i>₆, 75,5 MHz, d ppm) : d 169,6 (C9'), 157,7 (C7), 157,1 (C9), 156,7 (C5), 148,1 (C5'), 147,7 (C4'), 134,5 (C1'), 122,1 (C2'), 109,5 (C3'), 108,5 (C7'), 108,3 (C6'), 100,5 (C10), 96,2 (C6), 95,3 (C8), 82,6 (C2), 68,3 (C3), 40,4 (C8'), 29,0 (C4).</p>	

Les spectres RMN permettent de caractériser les composés modifiés mais aussi de contrôler les modifications. Les protons du groupement benzyle (de H10' à H14') sont bien présents dans le spectre proton de la catéchine-benzyle (CAT-BnP) et ne sont plus retrouvés dans le spectre de la catéchine-carboxylique (CAT-POH) (Figure 49 et Tableau XIII). Le même suivi a été réalisé sur la (-)-épicatéchine et sur les procyanidines DP8 et DP9. Dans ce dernier cas, seule l'apparition des groupes de protons correspondant aux protons des groupements benzyle est contrôlée entre 7 et 8 ppm (Annexe). Suite à l'étape de débenzylation, la diminution des pics de protons de ces groupements benzyle est obtenue, ce qui valide l'étape, et permet d'obtenir des procyanidines DP8 ou DP9 présentant un certain nombre de groupements carboxyliques libres au niveau des catéchols. En revanche ces suivis RMN ne permettent pas de quantifier le nombre de catéchols modifiés.

1.3.2.2. Procyanidines avec un thiol libre

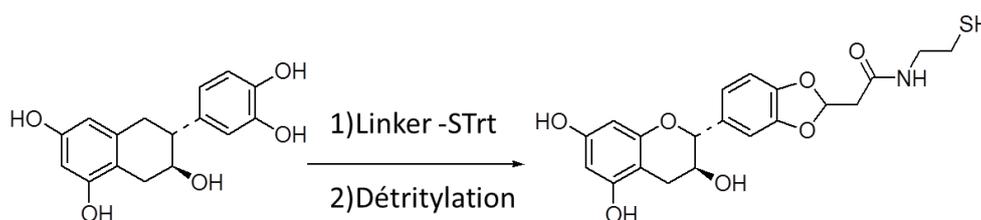


Figure 50 : Modification chimique de la (+)-catéchine par un linker tritylé puis par détritylation pour l'obtention d'un groupement thiol libre.

Les monomères de flavan-3-ols et les procyanidines DP2, DP8 et DP9 ont tout d'abord été modifiés par substitution d'un linker, présentant un groupement trityle, sur les catéchols ((1) Figure 50). Puis, les monomères et les procyanidines DP8 et DP9 tritylés ont été détritylés pour laisser place au groupement thiol libre ((2) Figure 50). Les deux étapes de modification ont été suivies par RMN ^1H et ^{13}C dans le cas des monomères et par RMN ^1H dans le cas des procyanidines.

Les spectres RMN et l'attribution des protons et carbone de la (+)-catéchine avec un groupement trityle (Figure 51 et Figure 52) et de la (+)-catéchine avec un thiol libre (Figure 53 et Figure 54) sont présentés. Les spectres RMN de la (-)-épicatéchine et des procyanidines DP2, DP8 et DP9 modifiées sont présentés en Annexes.

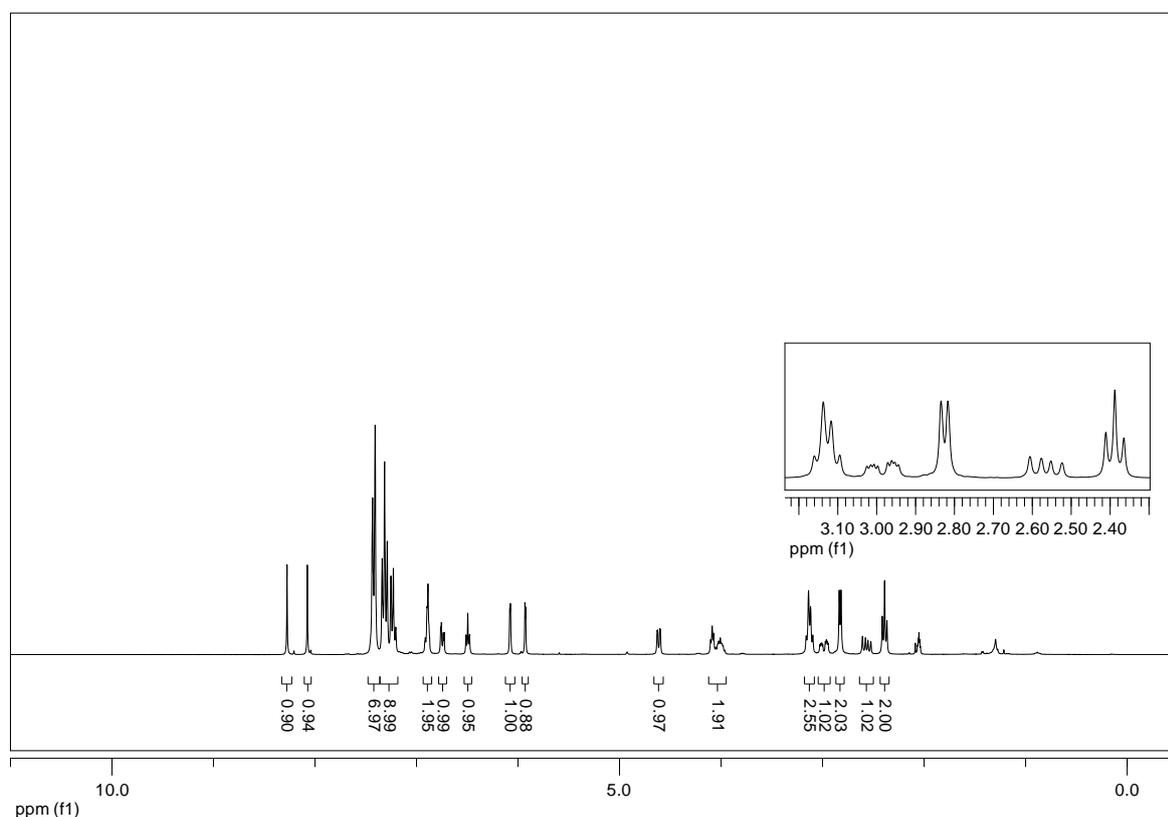


Figure 51 : Spectre RMN ^1H 300MHz à 298K de la (+)-catéchine avec le linker trityle (CAT-STrt).

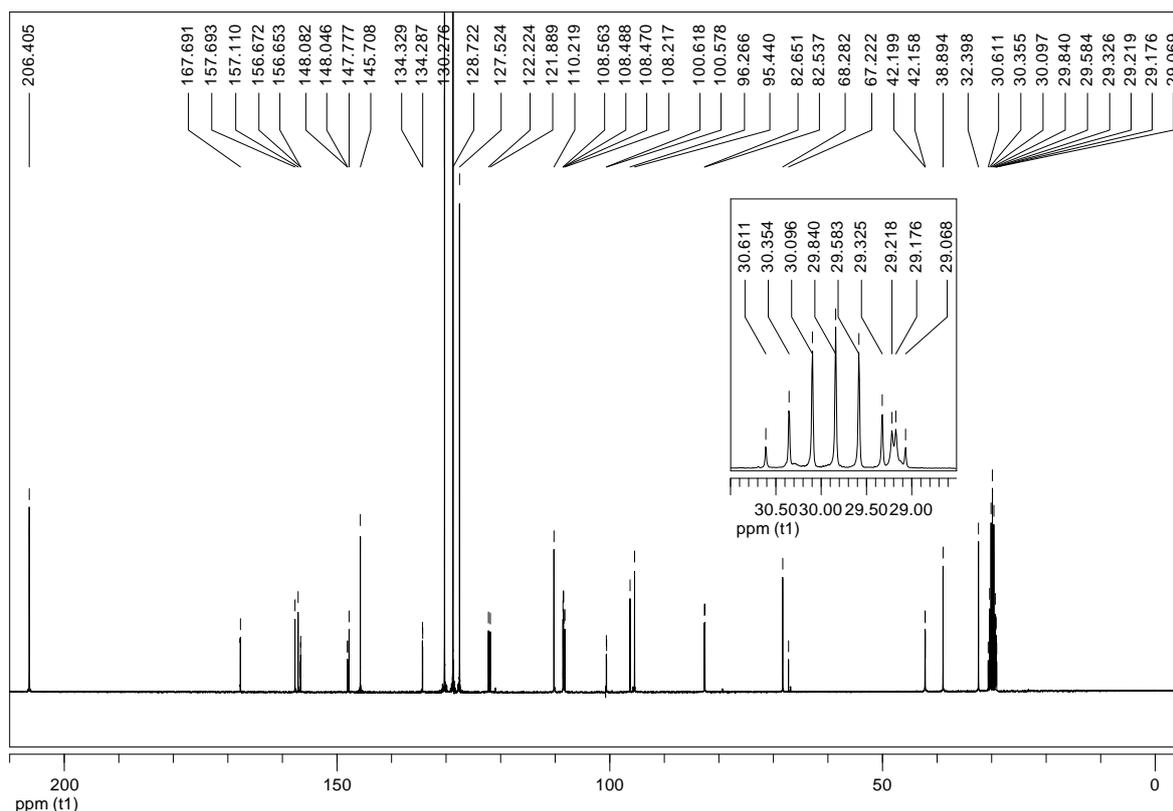


Figure 52 : Spectre RMN ^{13}C 300MHz à 298K de la (+)-catéchine avec le linker trityle (CAT-STrt).

Tableau XIV: Attribution des déplacements chimiques des protons et des carbones par RMN de la (+)-catéchine couplée à un groupement trityle.

	<p>CAT-STrt</p> <ul style="list-style-type: none"> • MM : 661.7627 g.mol⁻¹ • FB : C₃₉H₃₅NO₇S
<p>^1H RMN (Acetone-<i>d</i>₆, 300 MHz, δ ppm): δ 2.39 (t, $^3J_{11'-10'}$ = 6.9 Hz, 2H, H11'), 2.57 (dd, $^3J_{4-3trans}$ = 8.7 Hz, $^2J_{4-4trans}$ = 16.1 Hz, 1H, H4-<i>trans</i>), 2.83 (d, $^3J_{8'-7'}$ = 5.3 Hz, 2H, H8'), 2.99 (dd, $^3J_{4-3cis}$ = 5.3 Hz, $^2J_{4-4trans}$ = 16.0 Hz, H4-<i>cis</i>), 3.13 (q, $^3J_{10'-11'}$ = 6.7 Hz, 2H, H10'), 3.96 - 4.05 (m, 1H, H3), 4.07 - 4.10 (m, 1H, 3-OH), 4.61 (d, $^3J_{2-3trans}$ = 7.9 Hz, 1H, H2), 5.93 (d, $^4J_{8-6}$ = 2.2 Hz, 1H, H8), 6.08 (d, $^4J_{6-8}$ = 1.7 Hz, 1H, H6), 6.49 (t, $^3J_{7'-8'}$ = 5.3 Hz, 1H, H7'), 6.74 (d, $^3J_{3'-2'}$ = 8.0 Hz, 1H, H3'), 6.89 (bs, 1H, H6'), 6.89 - 6.91 (m, 1H, H2'), 7.20 - 7.25 (m, 3H, H16'), 7.29 - 7.34 (m, 6H, H15', H15''), 7.41 - 7.43 (m, 7H, H14', H14''), 8.08 (s, 1H, 7-OH), 8.28 (s, 1H, 5-OH).</p>	
<p>^{13}C RMN (Acetone-<i>d</i>₆, 75.5 MHz, δ ppm): δ 167.7 (C9'), 157.7 (C5), 157.1 (C7), 156.7 (C9), 148.1 (C5'), 147.8 (C4'), 145.7 (C13'), 134.3 (C1'), 130.3 (C14', C14''), 128.7 (C15', C15''), 127.5 (C16'), 122.0 (C2'), 110.2 (C7'), 108.5 (C3'), 108.4 (C6'), 100.6 (C10), 96.3 (C6), 95.4 (C8), 82.6 (C2), 68.3 (C3), 67.2 (C12'), 42.2 (C8'), 38.9 (C10'), 32.4 (C11'), 29.2 (C4).</p>	

Le spectre RMN ^1H (Figure 51) et l'attribution des protons de la (+)-catéchine modifiée par un linker présentant un groupement trityle (**Tableau XIV**) montrent que les protons correspondant au linker, c'est-à-dire les protons de H7' à H11' sont bien présents, ainsi que les protons du groupement trityle (de H12' à H16'). Ces derniers sont retrouvés entre 7,2 et 7,4 ppm. Sur le spectre RMN ^{13}C (Figure 52) la modification chimique est confirmée par la présence des carbones du groupement trityle entre 145,7 et 127,5 ppm, ainsi que par les carbones du linker.

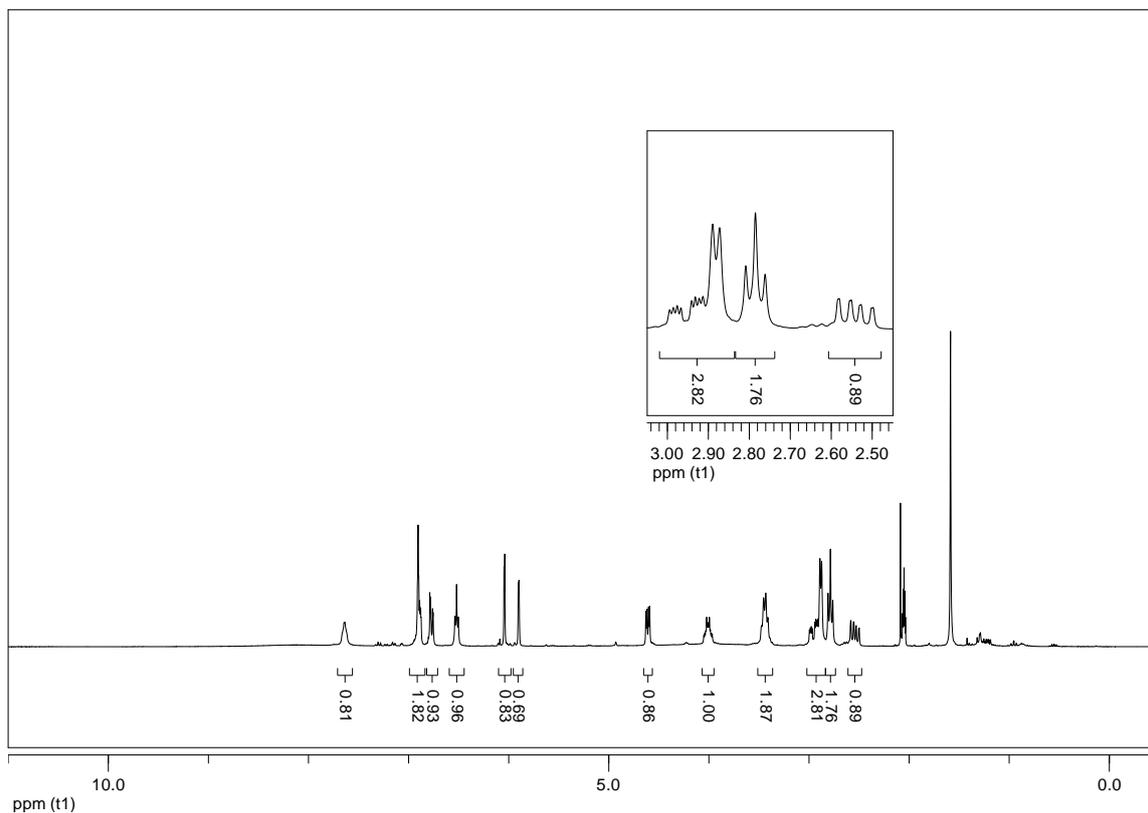


Figure 53 : Spectre RMN ^1H 300MHz à 298K de la (+)-catéchine avec le groupement thiol libre (CAT-SH).

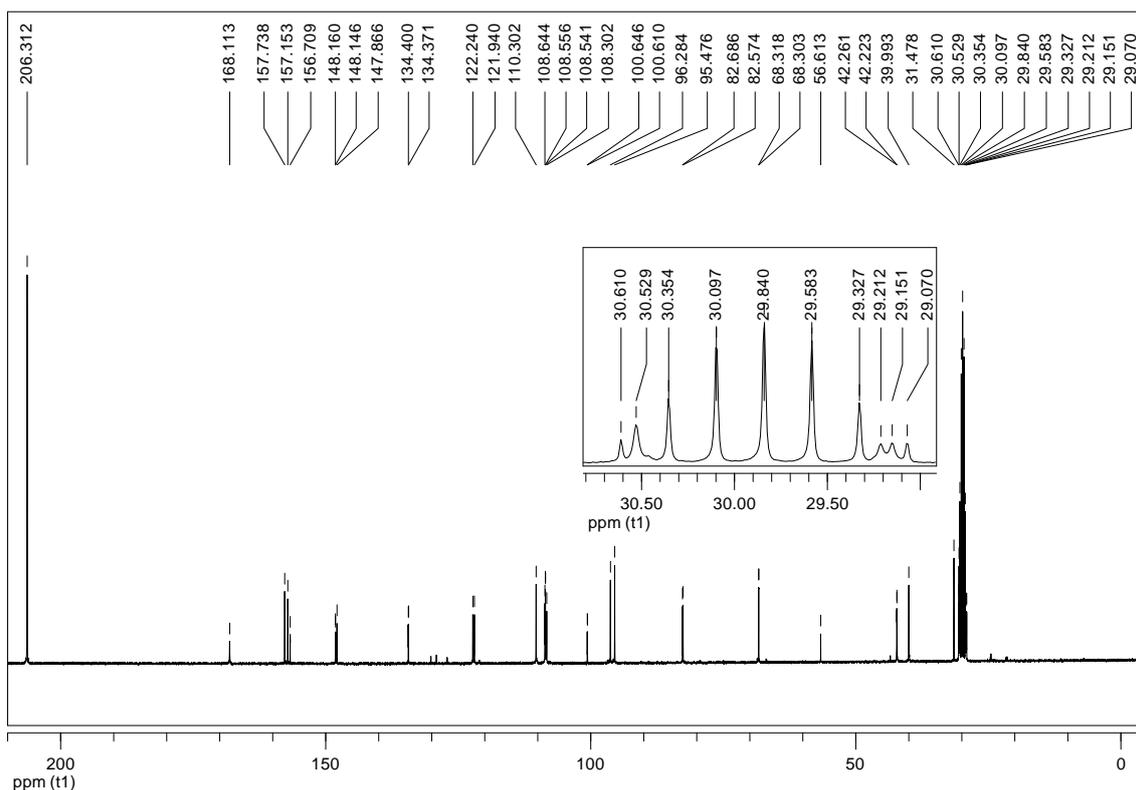


Figure 54 : Spectre RMN ^{13}C 300MHz à 298K de la (+)-catéchine avec le groupement thiol libre (CAT-SH).

Tableau XV : Attributions des déplacements chimiques des protons et des carbones par RMN de la (+)-catéchine comportant un groupement thiol libre.

	<p>CAT-SH</p> <ul style="list-style-type: none"> • MM : 419.4482 g.mol⁻¹ • FB : C₂₀H₂₁NO₇S
<p>^1H RMN (Acetone-<i>d</i>₆, 300 MHz, δ ppm): δ 2.54 (dd, $^3J_{4-3trans} = 8.7$ Hz, $^2J_{4-4} = 16.0$ Hz, 1H, H4_{trans}), 2.79 (t, $^3J_{11'-10'} = 7.1$ Hz, 2H, H11'), 2.88 (d, $^3J_{8'-7'} = 5.1$ Hz, 2H, H8'), 2.95 (dd, $^3J_{4-3cis} = 5.5$ Hz, $^2J_{4-4} = 16.1$ Hz, H4_{cis}), 3.44 (q, $^3J_{10'-11'} = 6.3$ Hz, 2H, H10'), 3.97 - 4.05 (m, 1H, H3), 4.61 (d, $^3J_{2-3trans} = 8.0$ Hz, 1H, H2), 5.90 (bs, 1H, H8), 6.04 (d, $^4J_{6-8} = 2.2$ Hz, 1H, H6), 6.52 (t, $^3J_{7'-8'} = 5.2$ Hz, 1H, H7'), 6.77 (d, $^3J_{3'-2'} = 8.1$ Hz, 1H, H3'), 6.88 - 6.91 (m, 1H, H2'), 6.91 (bs, 1H, H6'), 7.64 (bs, 1H, NH-C9').</p>	
<p>^{13}C RMN (Acetone-<i>d</i>₆, 75.5 MHz, δ ppm): δ 168.1 (C9'), 157.7 (C5), 157.2 (C7), 156.7 (C9), 148.2 (C5'), 147.9 (C4'), 134.4 (C1'), 122.1 (C2'), 110.3 (C7'), 108.6 (C3'), 108.4 (C6'), 100.6 (C10), 96.3 (C6), 95.5 (C8), 82.6 (C2), 68.3 (C3), 42.2 (C8'), 40.0 (C10'), 30.5 (C11'), 29.2 (C4).</p>	

Après l'étape de détritylation, le spectre RMN du proton (Figure 53) de la (+)-catéchine détritylée montre la disparition des protons du groupement trityle (**Tableau XV**). De même, le spectre RMN du carbone (Figure 54) montre la disparition des carbones du groupement trityle. Tout comme la (+)-catéchine, le suivi des modifications chimiques des procyanidines a été montré par l'apparition et la disparition du groupement trityle.

1.4. Conclusion

La caractérisation de tous les composés d'intérêt montre la diversité des structures. Ainsi, les fractions pectiques diffèrent par leur composition osidique, l'enchaînement des sucres et donc la conformation en solution ; les anthocyanes diffèrent par leurs groupements hydroxyles et le type de sucre lié ; et enfin les procyanidines extraites de parenchyme ou modifiées chimiquement, diffèrent par leur degré de polymérisation et leurs unités constitutives.

2. Interactions entre anthocyanes et pectines

Les analyses d'interactions entre des anthocyanes (cyanidine ou delphinidine glucoside ou rutinoside) d'une part ou un extrait de cassis et des pectines commerciales ou des fractions pectiques d'autre part ont été réalisées par mesure des cinétiques d'évolution de l'absorbance à 520 nm et des spectres par spectrophotométrie UV-visible dans deux conditions différentes. Pour rester dans les conditions d'interactions utilisées dans les autres parties de la thèse, des premiers essais ont été réalisés avec les fractions pectiques et les anthocyanes placées à pH 3,8. Afin d'être dans les conditions optimales pour commencer en présence seulement du cation flavylum des anthocyanes, d'autres analyses ont été réalisées avec les fractions pectiques à pH 3,8 et les anthocyanes en milieu acide. Seuls les résultats utilisant des anthocyanes en milieu acide sont présentés. Suite à ces analyses, les surnageants ont été analysés par HPSEC et par HPLC-DAD afin de définir le type de molécules en interaction.

2.1. Cinétiques d'absorbance

L'absorbance à 520 nm est suivie après injection des anthocyanes (dissoutes dans une solution de méthanol acidifié) dans les puits contenant les fractions pectiques. La longueur d'onde de 520 nm est choisie car elle est proche de la longueur d'onde d'absorption maximale des différents standards d'anthocyanes. Les Figure 55, Figure 56 et Figure 57 regroupent :

- L'effet des pectines à différentes concentrations ;
- L'effet des homogalacturonanes déméthylés, faiblement et hautement méthylés (HG 0%, HG 30% et HG 70%) à différentes concentrations ;
- L'effet des zones hérissées de pectines à différentes concentrations.

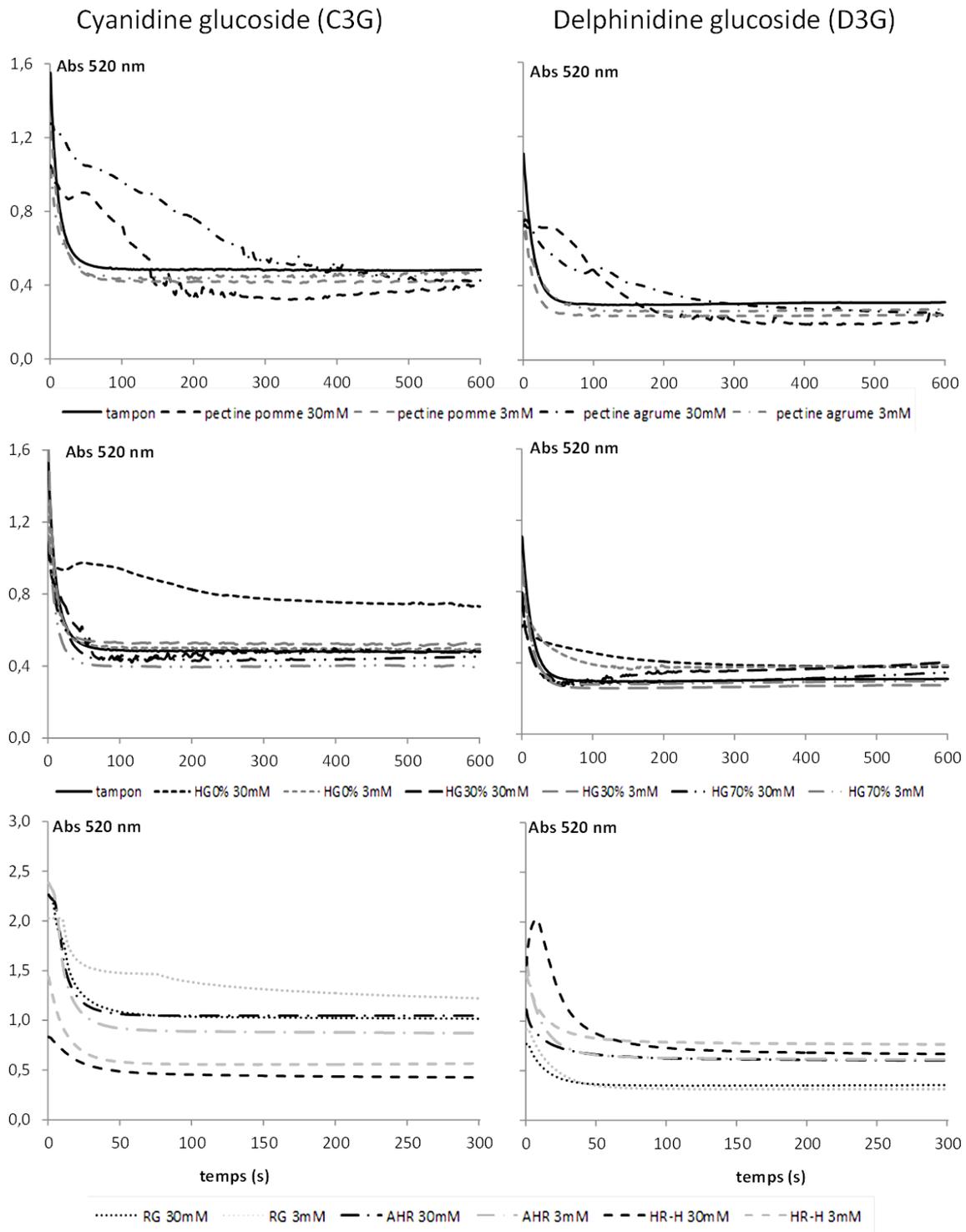


Figure 55 : Cinétiques d'absorbance à 520 nm de la cyanidine glucoside et de la delphinidine glucoside en présence des fractions pectiques (pectines commerciales, homogalacturonanes et rhamnagalacturonanes) à 3 et 30 mmol/L pendant 300 ou 600 secondes.

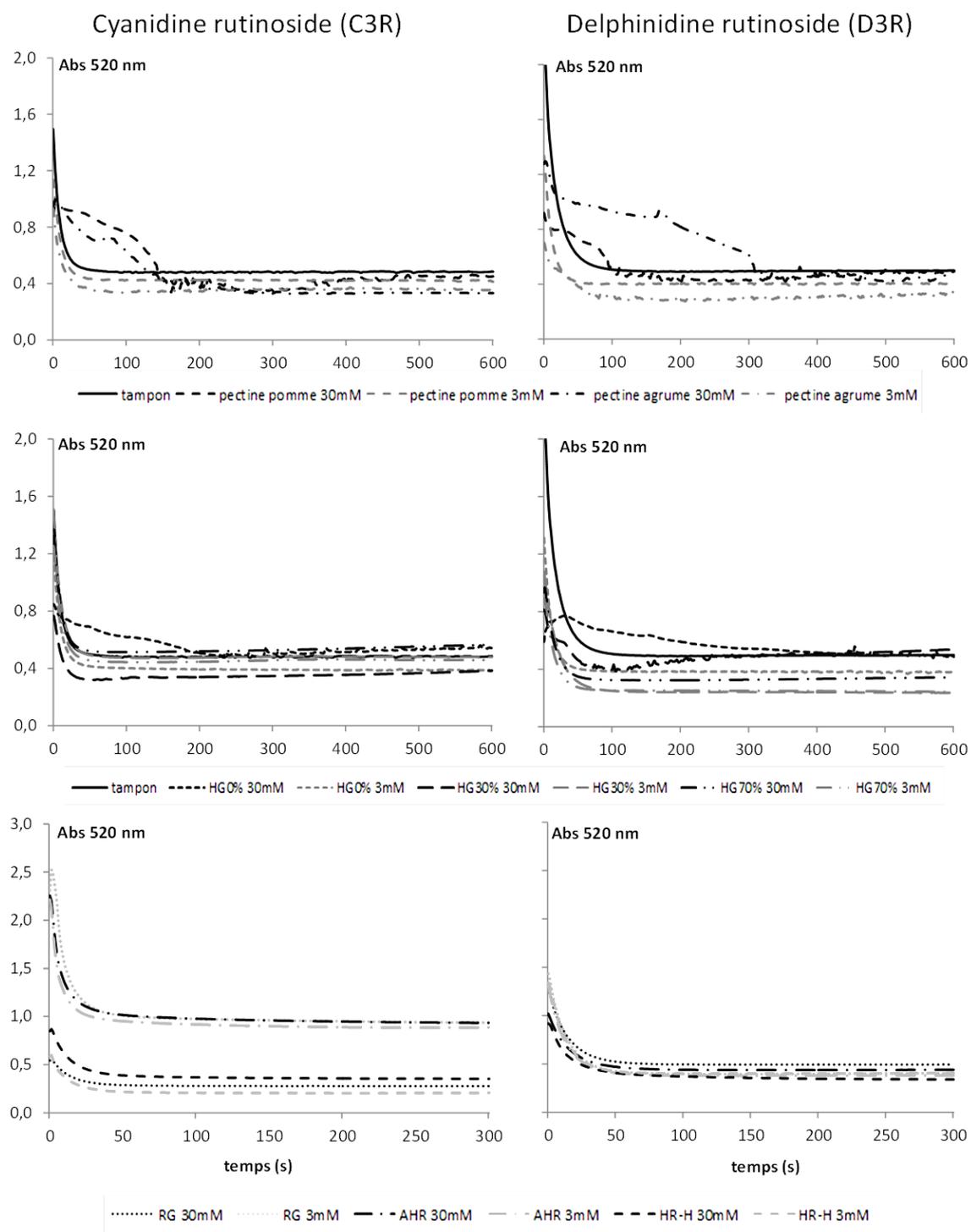


Figure 56 : Cinétiques d'absorbance à 520 nm de la cyanidine rutinoside et de la delphinidine rutinoside en présence des fractions pectiques (pectines commerciales, homogalacturonanes et rhamnogalacturonanes) à 3 et 30 mmol/L pendant 300 ou 600 secondes.

Extrait de cassis

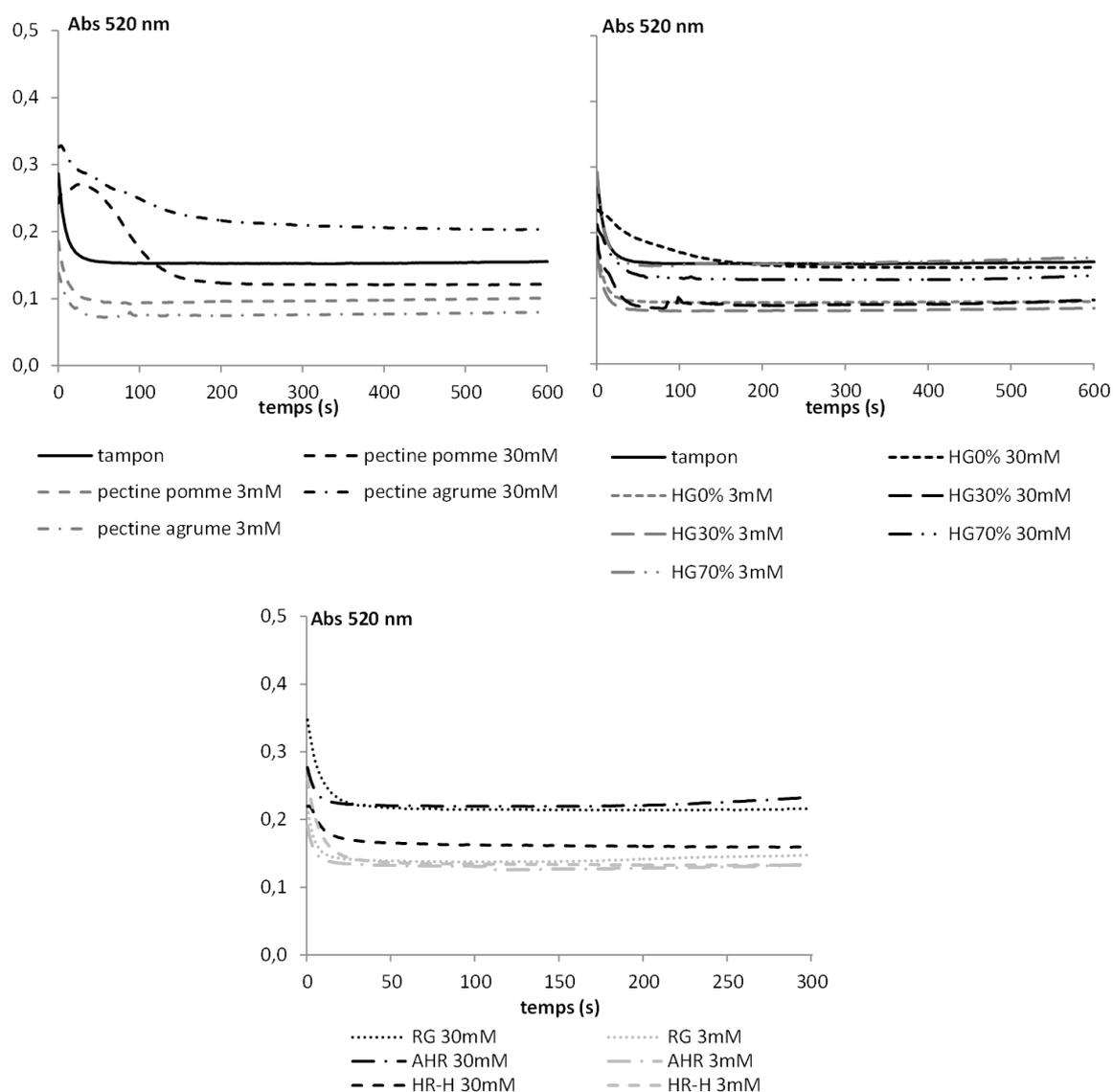


Figure 57 : Cinétiques d'absorbance à 520nm de l'extrait de cassis en présence des fractions pectiques (pectines commerciales, homogalacturonanes et rhamnogalacturonanes) à 3 et 30 mmol/L pendant 300 ou 600 secondes.

A partir des courbes de cinétiques de stabilisation des absorbances des anthocyanes en fonction des fractions pectiques, un modèle de cinétique du premier ordre a été utilisé pour définir les constantes de vitesse k . En revanche, les données suivantes (Tableau XVI) présentent uniquement les valeurs de k des fractions qui suivent le modèle. Les fractions d'anthocyanes avec pectines commerciales fortement concentrées (30 mmol/L) et avec les homogalacturonanes déméthylés fortement concentrés (30 mmol/L) ne suivent pas la cinétique d'ordre 1, par conséquent ces constantes n'ont pas été calculées.

Tableau XVI : Constantes de vitesse k des diminutions d'absorbance à 520 nm obtenues pour les anthocyanes en présence des fractions pectiques à des concentrations de 3 et 30 mmol/L.

k (s ⁻¹)	tampon (mmol/L)	pectine pomme (3)	pectine agrume (3)	HG0% (3)	HG30% (3)	HG30% (30)	HG70% (3)	HG70% (30)	RG (3)	RG (30)	AHR (3)	AHR (30)	HR-H (3)	HR-H (30)
D3G	0,075	0,074	0,037	0,041	0,071	0,093	0,070	0,084	0,049	0,071	0,096	0,078	0,072	0,000
C3G	0,094	0,066	0,072	0,087	0,116	0,046	0,085	0,067	0,022	0,056	0,072	0,068	0,086	0,041
D3R	0,083	0,088	0,047	0,094	0,053	0,051	0,059	0,054	0,077	0,074	0,079	0,066	0,075	0,060
C3R	0,113	0,092	0,090	0,106	0,100	0,095	0,093	0,097	0,069	0,062	0,133	0,112	0,082	0,062
cassis	0,110	0,097	0,087	0,119	0,108	0,074	0,109	0,048	0,287	0,126	0,227	0,350	0,123	0,079

En gras : valeur de k supérieure à la valeur de k de l'anthocyane dans le tampon. D3G : delphinidine-3-glucoside ; C3G : cyanidine-3-glucoside ; D3R : delphinidine-3-rutinoside ; C3R : cyanidine-3-rutinoside ; HG : homogalacturonanes, RG : rhamnogalacturonanes ; AHR : rhamnogalacturonanes riches en arabinanes ; HR-H : zones hérissées traitées à l'acide.

2.1.1. Influence de la structure des anthocyanes

L'absorbance initiale des anthocyanes dans le milieu acide varie en fonction de l'anthocyane étudiée. Les cyanidines (C3G et C3R) présentent une absorbance initiale de 1,5. En revanche, la delphinidine glucoside a une absorbance initiale de 1,1 alors que la delphinidine rutinoside a une absorbance de 2. En ce qui concerne l'extrait de cassis, l'absorbance initiale est beaucoup plus faible (0,3). L'absorbance diminue fortement (d'un tiers) durant les 50 premières secondes de cinétique pour les cyanidines et la delphinidine glucoside, tandis que l'absorbance de la delphinidine rutinoside diminue d'un quart pendant les 100 premières secondes de cinétique, et celle de l'extrait de cassis diminue de moitié durant les 50 premières secondes (Figure 55, Figure 56, Figure 57). Après cette durée, toutes les anthocyanes présentent une absorbance stable. En milieu tamponné, les constantes de vitesse déterminées à partir des cinétiques de diminution de l'absorbance (Tableau XVI) sont dans le même ordre de grandeur avec cependant des constantes de vitesse plus rapides pour la cyanidine rutinoside ($0,113 \text{ s}^{-1}$) et l'extrait de cassis ($0,110 \text{ s}^{-1}$). Les constantes de vitesse des anthocyanes monoglycosylées sont inférieures, quel que soit l'aglycone, à celles des anthocyanes diglycosylées.

2.1.2. Influence de la structure des fractions pectiques

En règle générale, les constantes sont plus faibles en présence de fractions pectiques que celles des anthocyanes seules, c'est-à-dire que les fractions pectiques ont tendance à diminuer la vitesse de diminution de l'absorbance.

Quelle que soit l'anthocyane étudiée, en présence de pectines de pomme ou d'agrumes fortement concentrées (30 mmol/L), les cinétiques obtenues ne montrent pas une diminution brutale suivie d'une stabilisation de l'absorbance, mais plutôt une diminution très lente pendant 300 secondes de l'absorbance puis une instabilité. Le même phénomène est observé en présence d'homogalacturonanes déméthylés fortement concentrés (à 30 mmol/L) et est le résultat de la formation d'un précipité. Par ailleurs, en présence d'homogalacturonanes faiblement méthylés (HG 30%) à 30 mmol/L, les cinétiques obtenues avec la cyanidine glucoside, la delphinidine glucoside et rutinoside, présentent une diminution rapide de l'absorbance, puis une augmentation lente jusqu'à la fin de l'analyse, de l'ordre de 0,1. Les constantes de vitesse déterminées à partir des cinétiques sont différentes selon les fractions pectiques ainsi que selon les concentrations. De façon générale, en présence de pectines de pomme et d'agrumes à la concentration de 3 mmol/L, les constantes de vitesse sont plus faibles

que celles des anthocyanes seules dans le tampon, excepté dans le cas de la delphinidine rutinoside. Dans le cas des homogalacturonanes déméthylés à 3 mmol/L seules les constantes k de la delphinidine rutinoside et de l'extrait de cassis augmentent. De plus, la constante de vitesse de la cyanidine glucoside augmente en présence de HG 30% à 3 mmol/L alors que celles de la delphinidine glucoside augmentent en présence de HG 30% et HG 70% à la concentration de 30 mmol/L.

En ce qui concerne les fractions pectiques de zones hérissées, les cinétiques obtenues varient à la fois en fonction du type d'anthocyanes, mais aussi en fonction du type de fractions pectiques. Les cyanidines glucoside et rutinoside et de delphinidine glucoside en présence des fractions RG et AHR présentent une absorbance initiale plus élevée (de l'ordre de 2) qu'avec les anthocyanes seules dans le milieu acide. Seule la fraction AHR induit une augmentation de la constante de vitesse de la delphinidine glucoside quelle que soit la concentration et de la cyanidine rutinoside à la concentration de 3 mmol/L. De plus, en présence des différentes zones hérissées, excepté HR-H à 30 mmol/L, la constante de vitesse de l'extrait de cassis augmente.

2.2. Spectres d'absorbance

Après stabilisation de l'absorbance de chaque anthocyane avec les fractions pectiques, les spectres d'absorbance ont été mesurés entre 300 et 700 nm. Tous les spectres ont été normalisés à 700 nm (Figure 58, Figure 59 et Figure 60). Les niveaux des maxima d'absorption ont permis de définir les effets hypo ou hyperchrome (cf. Matériel et Méthodes §3.2.1), ainsi que leurs longueurs d'onde pour définir les effets hypso ou bathochrome (cf. Matériel et Méthodes §3.2.1).

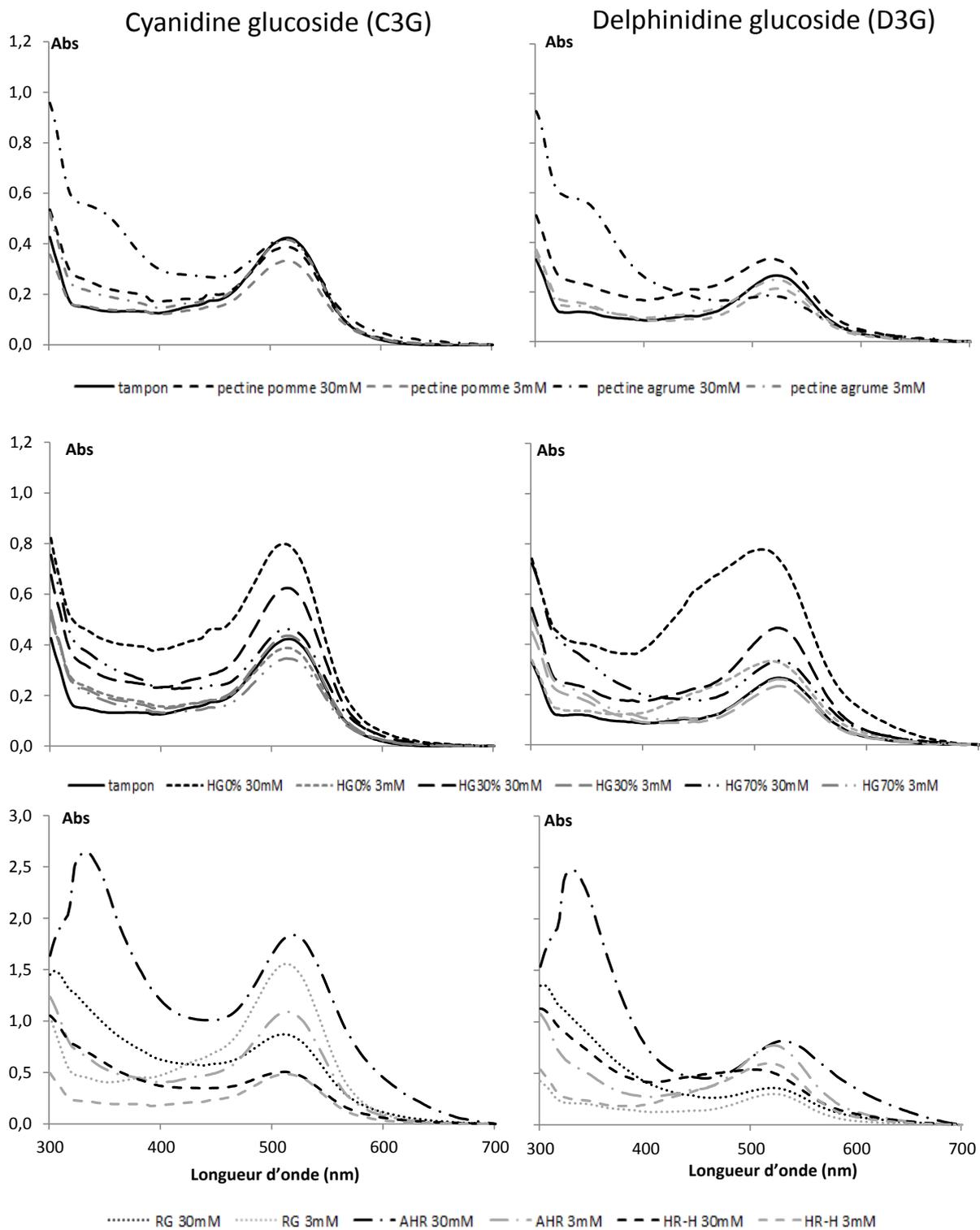


Figure 58 : Spectres d'absorbance observés pour la cyanidine glucoside et la delphinidine glucoside en présence des fractions pectiques dans un tampon citrate/phosphate pH 3,8 FI 0,1 mol/L après 1 h.

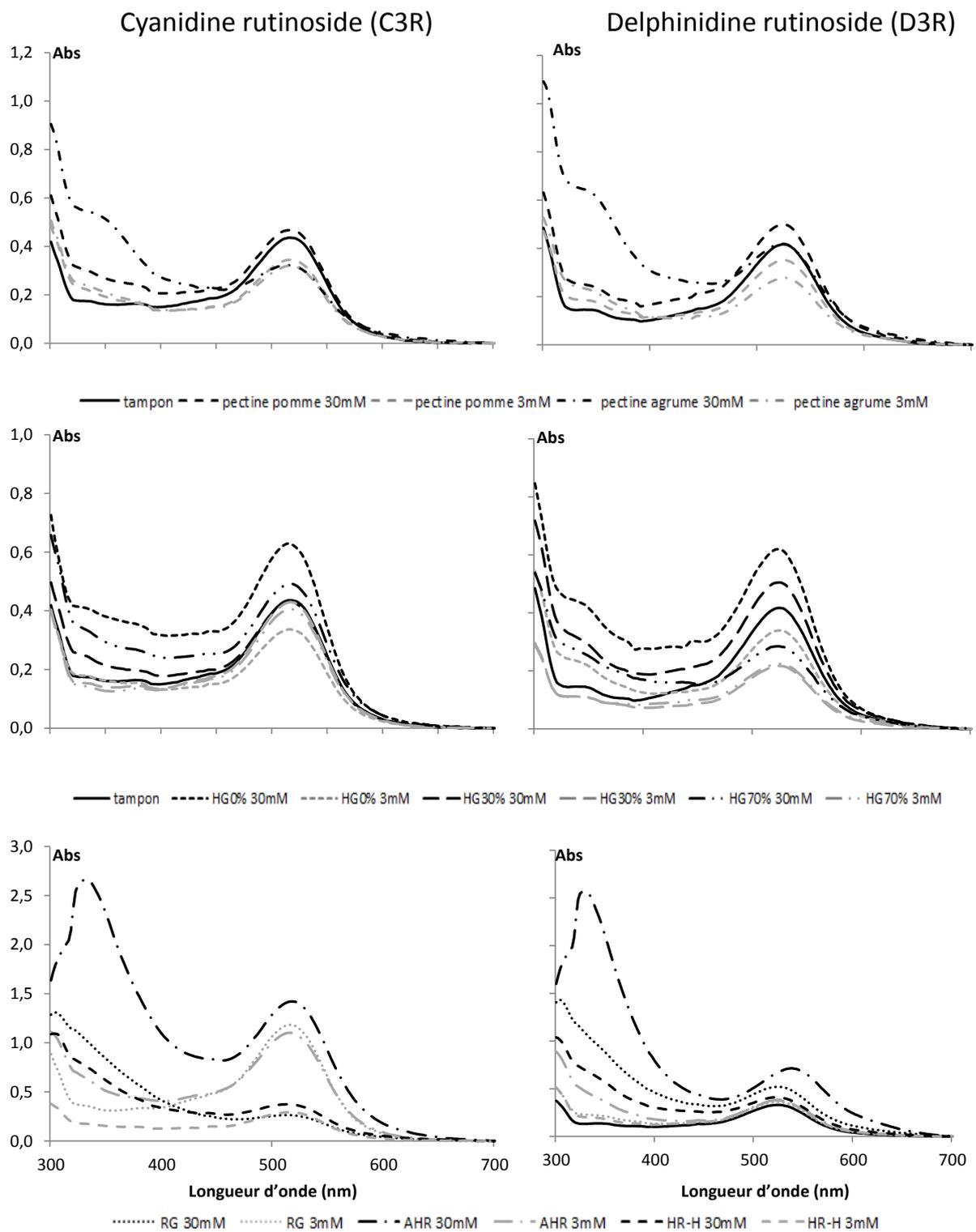


Figure 59 : Spectres d'absorbance observés pour la cyanidine rutinoside et la delphinidine rutinoside en présence des fractions pectiques dans un tampon citrate/phosphate pH 3,8 FI 0,1 mol/L après 1 h.

Extrait de cassis

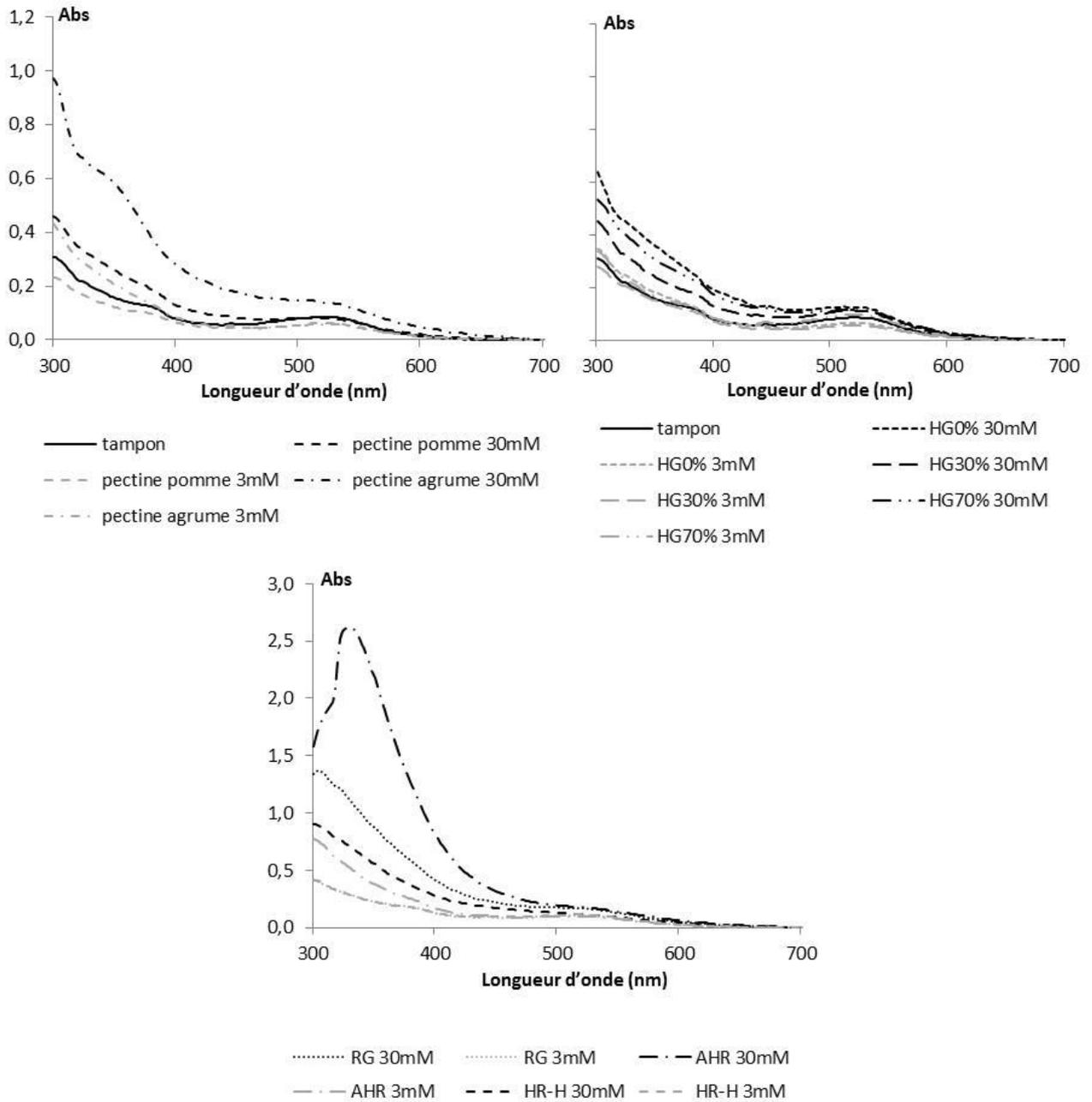


Figure 60 : Spectres d'absorbance observés pour l'extrait de cassis en présence des fractions pectiques dans un tampon citrate/phosphate pH 3,8 FI 0,1 mol/L après 1 heure.

Les figures suivantes (Figure 61 et Figure 62) présentent les différences de maximum d'absorption et de longueur d'onde en fonction des anthocyanes et des fractions pectiques.

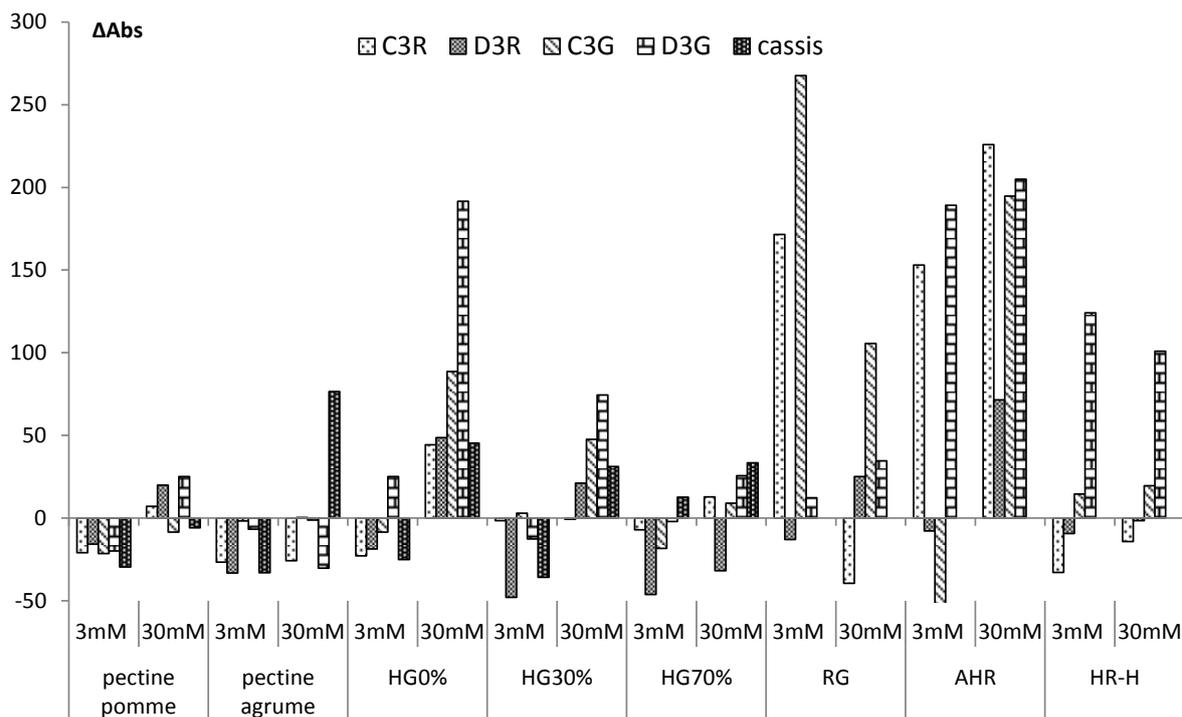


Figure 61 : Effets hyperchrome et hypochrome à 520 nm du mélange anthocyane-fraction pectique préparé dans le tampon citrate/phosphate pH 3,8 FI 0,1 mol/L à 25°C.

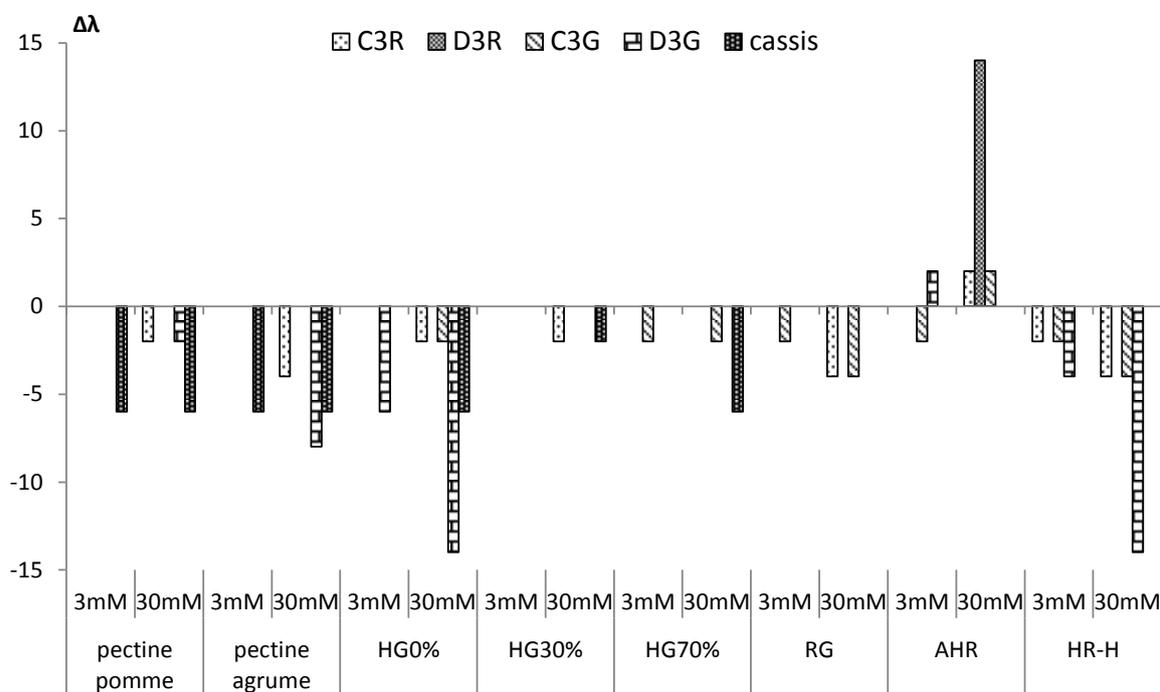


Figure 62 : Effets bathochrome et hypsochrome du mélange entre les anthocyanes et les fractions pectiques préparé dans un tampon citrate/phosphate pH 3,8 FI 0,1 mol/L à 25 °C.

2.2.1. Influence de la structure des anthocyanes

Les spectres de standards d'anthocyanes dans le tampon (Figure 58, Figure 59 et Figure 60) montrent deux maxima d'absorption : avant 300 nm et aux environs de 520 nm. En revanche, l'extrait de cassis présente un spectre où le maximum d'absorption se situe avant 300 nm avec une légère augmentation de l'absorbance vers 520 nm. Dans la zone de 520 nm, les niveaux des maxima d'absorption des anthocyanes dans le tampon sont similaires entre la C3R, D3R et la C3G à une absorbance de 0,4, alors que la D3G présente une absorbance maximale plus faible à 0,3, de même que l'extrait de cassis dont l'absorbance est située autour de 0,09. Les variations des maxima d'absorbance (Figure 61), soit en positif soit en négatif, sont plus marquées dans le cas des delphinidines (D3G et D3R) que pour d'autres anthocyanes. Les effets majeurs sont observés dans le cas des fractions HG 0% (30 mmol/L), RG (3 mmol/L) et AHR (3 et 30 mmol/L).

La delphinidine rutinoside ne présente un effet bathochrome qu'avec la fraction AHR (3 mmol/L), les autres fractions étant sans effet sur le déplacement de la longueur d'onde. Les cyanidines (C3G et C3R) présentent des effets bathochromes avec la fraction AHR à la concentration de 30 mmol/L alors que seule la delphinidine glucoside montre un effet bathochrome avec la fraction AHR à la concentration de 3 mmol/L. Par ailleurs, les cyanidines, la delphinidine glucoside et l'extrait de cassis présentent des effets hypsochromes selon la fraction pectique et la concentration.

2.2.2. Influence de la structure des fractions pectiques

En présence de pectine d'agrumes à 30 mmol/L, l'absorbance maximale est plus élevée à 300 nm qu'à 520 nm et un décrochement du spectre apparaît à 350 nm (Figure 58, Figure 59 et Figure 60). De plus, en présence de pectines de pomme, les delphinidines montrent un maximum d'absorption plus élevé que celui de la D3G ou de la D3R seules. Dans le cas des pectines commerciales à 3 mmol/L, le maximum d'absorption est toujours plus faible que pour les anthocyanes seules (Figure 61). Cependant avec la pectine d'agrumes à 30 mmol/L et l'extrait de cassis, le maximum d'absorption est beaucoup plus élevé que pour l'extrait de cassis seul. Un déplacement vers la gauche de la longueur d'onde lié au maximum d'absorption, c'est-à-dire un effet hypsochrome, entre les pectines commerciales et l'extrait de cassis est observé (Figure 62). Il en est de même entre les pectines commerciales à 30 mmol/L et C3R et D3G.

Le spectre d'absorbance de la D3G en présence d'homogalacturonanes déméthylés a un aspect différent des autres spectres (Figure 58). L'absorbance augmente à partir de 400 nm pour atteindre son maximum vers 520 nm, tandis que dans les autres cas l'absorbance augmente à partir de 470 nm. Les maxima d'absorption en présence des homogalacturonanes à 30 mmol/L sont supérieurs à ceux des anthocyanes seuls, sauf entre les homogalacturonanes hautement méthylés (HG 70%) et la D3R (Figure 61). L'aspect du spectre du mélange homogalacturonanes déméthylés et D3G est validé par le déplacement de la longueur d'onde de 14 nm vers les faibles longueurs d'ondes (Figure 62). Avec les autres homogalacturonanes, les longueurs d'onde du maximum d'absorbance sont peu ou pas décalées vers les faibles longueurs d'onde. Pour contrôler les résultats obtenus avec les homogalacturonanes déméthylés et la delphinidine glucoside, des analyses d'absorbance ont été réalisées avec la delphinidine et la cyanidine glucoside mélangées avec des homogalacturonanes à des concentrations variables (de 30 mmol/L, 15 mmol/L et 7,5 mmol/L) et à différents pHs (pH 3,5 ; pH 3,8 et pH 4,5). Les spectres obtenus dans toutes ces conditions sont présentés en Annexes, mais aucune différence marquante n'apparaît. L'aspect général des spectres est similaire et les valeurs des maxima d'absorption varient uniquement en fonction de la concentration des homogalacturonanes.

En ce qui concerne les fractions pectiques de zone hérissée (Figure 58), les spectres des mélanges avec la fraction AHR à 30 mmol/L montrent deux maxima d'absorption bien distincts à 320 nm et 520 nm. Quelle que soit l'anthocyane, la fraction AHR à 320 nm présente une absorbance de 2,6, tandis qu'à 520 nm l'absorbance varie selon l'anthocyane. Dans le cas de la fraction RG à 30 mmol/L, un maximum d'absorption de 1,5 à 300 nm, ainsi que le maximum d'absorption à 520 nm sont présents. Les fractions de zones hérissées seules (AHR et RG) présentent une absorbance élevée à 320 et 300 nm respectivement, comme présenté en Annexes. De plus, les niveaux des maxima d'absorption à 520 nm de ces fractions pectiques avec les anthocyanes sont quasiment tous supérieurs aux niveaux des maxima d'absorption des anthocyanes seules (Figure 61). La longueur d'onde des maxima d'absorption de la fraction AHR avec D3R est décalée de 14 nm vers les longueurs d'ondes élevées (effet bathochrome), tandis qu'entre la fraction HR-H et D3G la longueur d'onde est décalée de 14 nm vers les longueurs d'ondes faibles (effet hypsochrome) (Figure 62).

2.3. Caractérisation des molécules restant en solution

Après détermination des cinétiques et des spectres d'absorbance, les échantillons ont été centrifugés. Les surnageants prélevés ont été analysés à la fois par HPLC-DAD pour définir les différences de concentrations des anthocyanes avant et après association, ainsi que par HPSEC afin d'observer les différences de volume hydrodynamique des fractions pectiques avant et après association.

2.3.1. Anthocyanes

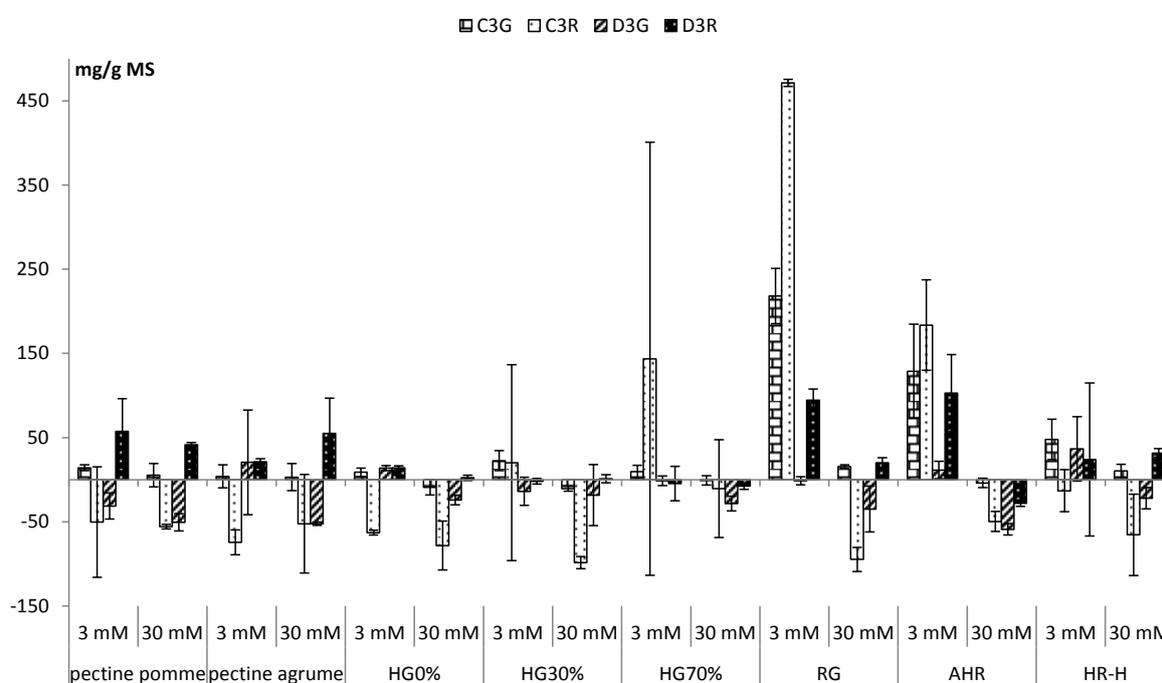


Figure 63 : Concentrations résiduelles en anthocyanes après interactions avec les fractions pectiques retrouvées dans les surnageants, après analyse HPLC-DAD.

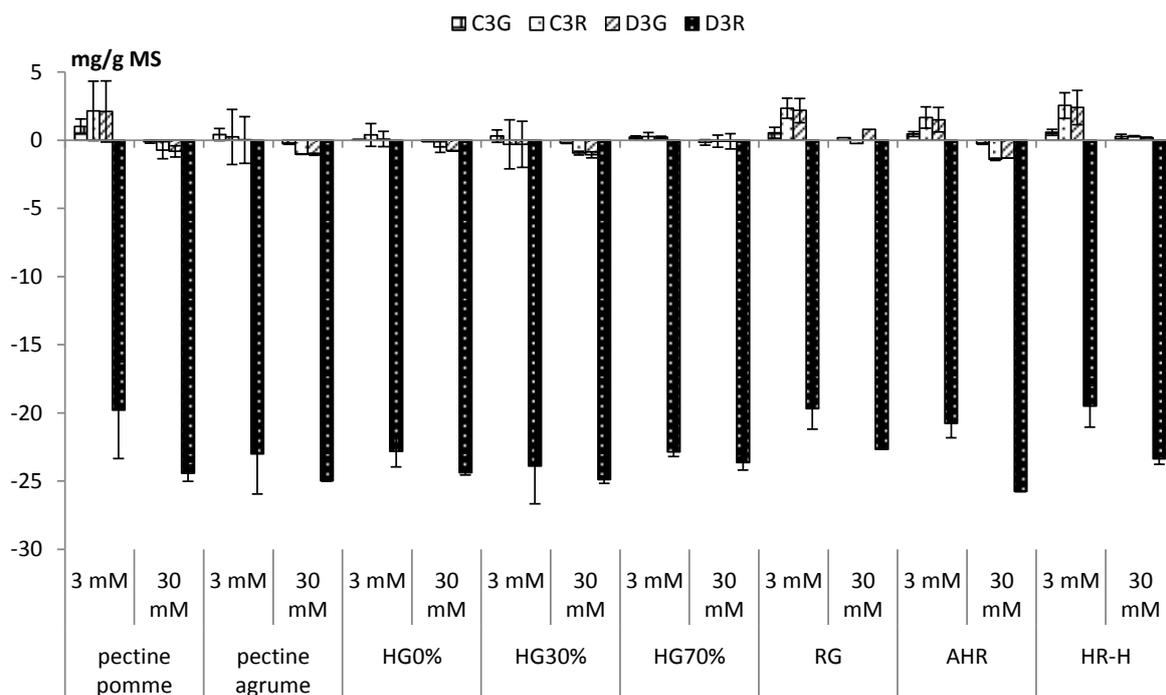


Figure 64 : Concentrations résiduelles en anthocyanes de l'extrait de cassis après interactions avec les fractions pectiques retrouvées dans les surnageants, après analyse HPLC-DAD.

Avec les pectines de pomme et d'agrumes (Figure 63), les concentrations de C3R et D3G sont plus faibles de moitié qu'avant l'association, et la concentration de C3R est encore plus faible (75 mg/g MS de moins) en présence de pectine d'agrumes à 3 mmol/L. À l'inverse, les concentrations de D3R sont plus élevées en présence de pectines de pomme (50 mg/g MS de plus) à 3 mmol/L qu'en présence de pectines d'agrumes.

La concentration libre de la cyanidine rutinoside est plus diminuée que celle des autres anthocyanes en présence de HG 0% à 3 et 30 mmol/L et de HG 30% à 30 mmol/L, où il n'y a plus de cyanidine rutinoside libre résiduelle. Avec HG 70% les concentrations résiduelles de toutes les anthocyanes diminuent légèrement, à l'exception de la cyanidine rutinoside pour laquelle une augmentation de la concentration est notée.

De façon surprenante, avec les différentes fractions pectiques de zones hérissées à 3 mmol/L, les concentrations d'anthocyanes libres semblent toutes plus élevées qu'avant l'association. Aux concentrations de 30 mmol/L, la C3R présente une quantité plus faible que dans le tampon et cette quantité est d'autant plus faible avec la fraction RG. De plus, la D3G, la C3G et la D3R sont en quantité plus faible en présence de AHR que de RG ou HR-H après

association. Cependant, les écarts types sont particulièrement élevés pour la plupart des concentrations résiduelles, il faut donc faire attention à l'interprétation de ces résultats.

Après associations entre les fractions pectiques et l'extrait de cassis, les 4 anthocyanes majoritaires de cet extrait ont été analysées (Figure 64). Quelles que soient les fractions pectiques seule la concentration de delphinidine rutinoside diminue, de l'ordre de 25 %. En revanche, suite à l'association de C3R et D3G avec les pectines de pomme, RG, AHR et HR-H à 3 mmol/L, les concentrations d'anthocyanes ont tendance à augmenter légèrement par rapport aux anthocyanes seules. Cette augmentation pourrait être due à un effet d'exclusion des anthocyanes par les fractions pectiques, ou à un artefact lors des injections dans le tampon et dans l'eau, ou encore à une erreur de manipulation.

2.3.2. Fractions pectiques

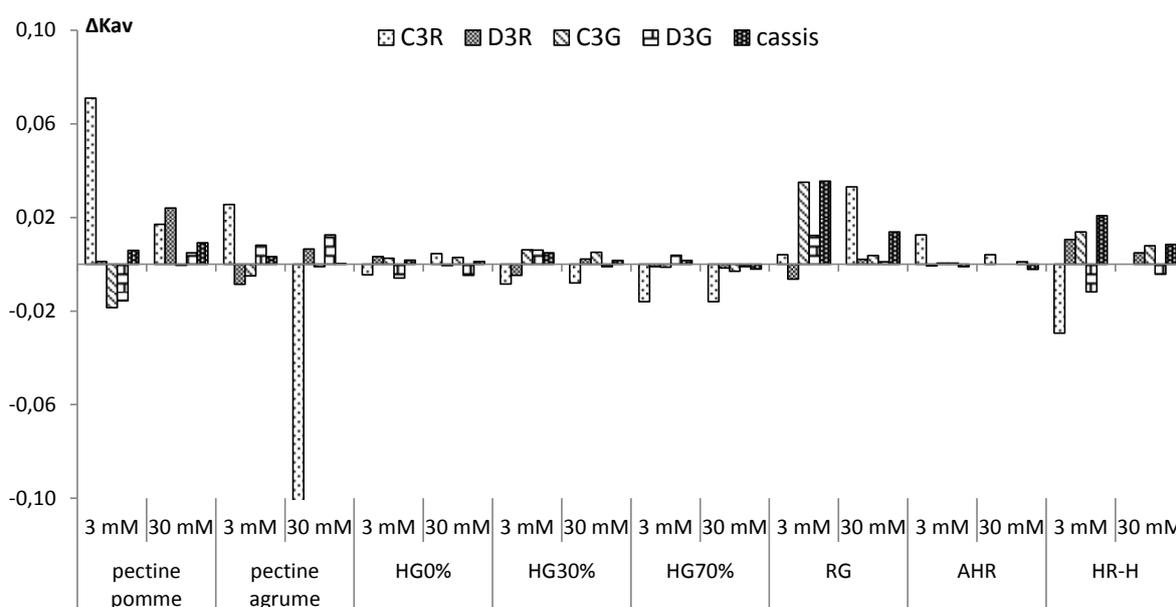


Figure 65 : Différence de coefficient de partition (ΔK_{av}) des surnageants issus des mélanges entre les anthocyanes et les fractions pectiques.

Les différences de coefficient de partition (ΔK_{av}) avant et après association présentent des différences marquées pour les mélanges des pectines commerciales avec la C3R (Figure 65). En présence de C3R, la différence de coefficient de partition de pectine de pomme à 3

mmol/L est élevée avec une valeur de plus de 0,06. A l'inverse, la différence de coefficient de partition de pectines d'agrumes à 30 mmol/L est négative à -0,1, et est positive à 0,02 pour les pectines d'agrumes à 3 mmol/L. En revanche, les ΔK_{av} des différentes fractions d'homogalacturonanes en fonction des anthocyanes sont très faibles, par conséquent aucune distinction ne peut être faite. En ce qui concerne les fractions pectiques de zones hérissées, RG présente un ΔK_{av} positif (0,03) quelles que soient la concentration et l'anthocyane. En revanche, la fraction AHR ne présente pas de différence marquante quelle que soit l'anthocyane, et la fraction HR-H à 3 mmol/L présente des différences de coefficient de partition positives faibles avec les anthocyanes D3R, C3G et l'extrait de cassis, et des valeurs négatives avec C3R et D3G.

2.4. Discussion

Dans la littérature, un effet stabilisant de la couleur des anthocyanes sur des temps longs (plusieurs jours) (Lewis *et al.*, 1995 ; Buchweitz *et al.*, 2012a, b) a été démontré par les pectines. Cependant, l'effet des pectines sur l'absorbance des anthocyanes sur des temps courts de l'ordre de la minute, ainsi que sur la formation de complexes n'a pas été identifié. Pour ce faire, trois expériences ont été réalisées. La cinétique de formation des hémiacétales à partir du cation flavylium a été suivie par la diminution de l'absorbance à 520 nm, caractéristique du cation flavylium. Les spectres obtenus après association entre les pectines et les anthocyanes ont été mesurés pour définir les phénomènes de copigmentation. Et enfin, une étape de centrifugation et l'analyse des surnageants a permis, par différence avant et après association, de savoir quelles structures sont impliquées dans une éventuelle formation de complexes particuliers.

La cyanidine et la delphinidine se différencient par le nombre de groupements hydroxyle présents sur le noyau B. La delphinidine en possède 3, tandis que la cyanidine n'en possède que 2. Les différences d'absorbance initiale entre les delphinidines et les cyanidines peuvent être dues au fait que la longueur d'onde de 520 nm ne correspond pas exactement au maximum d'absorption de chaque anthocyane, ou aux différences intrinsèques d'absorbance des différentes anthocyanes. La stabilisation de l'absorbance et donc de la concentration du cation flavylium est plus rapide pour la cyanidine rutinoside et l'extrait de cassis que pour les autres anthocyanes. De même, les anthocyanes rutinosides présentent une vitesse de stabilisation de l'absorbance plus élevée que celle des anthocyanes glucosides. De façon générale, dès l'ajout de fractions pectiques aux anthocyanes, la décroissance de l'absorbance

des cyanidines est plus lente que celle des cyanidines seules. Après stabilisation de l'absorbance, les anthocyanes glucosides présentent un effet hyperchrome marqué, contrairement aux rutinosides qui montrent un effet hypochrome quelles que soient les fractions pectiques. D'autre part, un effet hypochrome est montré en présence de fractions pectiques pour l'extrait de cassis et les anthocyanes glucosides. Ces effets sont reliés à la formation de précipités ou d'agrégats, qui ont été définis après centrifugation par l'analyse des concentrations résiduelles en anthocyanes dans les surnageants. Les concentrations résiduelles en delphinidine rutinoside sont plus élevées dans les surnageants après association avec les différentes fractions pectiques que les concentrations en cyanidine rutinoside et en delphinidine glucoside, ce qui indique que les fractions pectiques s'associent de façon sélective plutôt avec la cyanidine rutinoside et la delphinidine glucoside qu'avec la delphinidine rutinoside. Cependant, après association entre l'extrait de cassis et les fractions pectiques, les concentrations résiduelles en delphinidine rutinoside sont plus faibles, impliquant une sélectivité des fractions pectiques pour la delphinidine rutinoside lorsqu'elle est en présence d'autres anthocyanes. Cette contradiction peut être due à une concentration initiale en delphinidine rutinoside dans l'extrait de cassis plus élevée que les autres anthocyanes. Il semble que la présence de seulement 2 groupements hydroxyles et d'une molécule de rutinose facilite la stabilisation des anthocyanes. Selon Leydet *et al.* (2012), plus l'anthocyane possède de groupements hydroxyle, plus l'anthocyane est capable de s'auto-assembler et ainsi empêcher la stabilisation. Cependant, cette hypothèse va à l'encontre des résultats obtenus par Yao *et al.* (2011) montrant que l'augmentation du nombre de groupements hydroxyles des anthocyanes facilite la liaison avec des protéines salivaires. De même que Buchweitz *et al.* (2013a) ont montré que les glucosides sont plus stables que les rutinosides à pH 3.

Après interaction des anthocyanes avec les différentes fractions pectiques, la stabilisation est plus rapide pour D3R avec les pectines de pomme et les homogalacturonanes déméthylés à 3 mmol/L, ainsi que pour D3G en présence d'homogalacturonanes faiblement et hautement méthylés et la fraction riche en arabinane (AHR) à 30 mmol/L que la stabilisation de l'absorbance des anthocyanes seules. Comme observé par Buchweitz *et al.* (2013a), une meilleure stabilisation est obtenue avec ces niveaux de méthylation de pectines. Un effet hyperchrome, c'est-à-dire une augmentation de l'absorbance avec l'ajout des fractions pectiques, est montré avec toutes les fractions pectiques à 30 mmol/L et quasiment tous les anthocyanes, hormis avec la pectine d'agrumes. Cet effet hyperchrome est plus marqué avec

les homogalacturonanes déméthylés et les fractions pectiques de zones hérissées. Cependant, il semblerait plutôt lié à la formation de trouble qu'à un phénomène de co-pigmentation, comme observé par l'instabilité des cinétiques. Cet effet pourrait être dû à une complexation entre les charges négatives des homogalacturonanes et le cation flavylum des anthocyanes par le biais d'interactions ioniques (Padayachee *et al.*, 2012 ; Buchweitz *et al.*, 2013b). De plus, un faible effet hypochrome est observé entre les anthocyanes et les fractions pectiques à 3 mmol/L, comme l'ont observé Lewis et Walker (1995) entre la delphinidine-3,5-diglucoside et une pectine. Cet effet peut être à l'origine non pas d'un système de copigmentation comme l'ont rapporté Asen *et al.* (1972), mais plutôt d'un phénomène d'inclusion (Dangles *et al.*, 1992a). Cependant un effet hypochrome (décalage vers les petites longueurs d'onde) est observé pour quasiment toutes les fractions pectiques avec C3R, D3G et l'extrait de cassis. Seule la fraction AHR présente un effet bathochrome avec C3R, D3R et D3G. Ces résultats sont contraires à ceux obtenus par Mazzaracchio *et al.* (2004) qui n'ont montré aucun effet batho ou hypochrome entre les pectines de pomme et les anthocyanes glucosides. Les concentrations résiduelles en anthocyanes après l'interaction avec des fractions pectiques sont plus faibles pour la cyanidine rutinoside avec les pectines commerciales, les homogalacturonanes déméthylés et faiblement méthylés, ce qui signifie que la cyanidine rutinoside « libre » est moins présente dans les surnageants que les autres anthocyanes et que ces fractions pectiques forment un complexe particulière avec cette anthocyane. De plus, après quantification du volume hydrodynamique des fractions pectiques présentes dans les surnageants, c'est-à-dire non liées avec les anthocyanes, une différence de coefficient de partition est obtenue. Ce paramètre (ΔK_{av}) correspond à la différence de coefficient de partition entre les fractions pectiques après association avec les anthocyanes et le coefficient de partition des fractions pectiques dans le tampon. Plus le coefficient de partition est élevé, plus la molécule a un volume hydrodynamique faible. Ainsi, la cyanidine rutinoside présente une affinité plus marquée pour les « petites » molécules de pectines de pomme, et pour les « larges » molécules de pectine d'agrume.

2.5. Conclusion

Les associations entre les anthocyanes et les fractions pectiques engendrent une stabilisation de la couleur et/ou la formation d'un complexe en fonction à la fois de l'anthocyane et de la fraction pectique. La stabilisation de l'absorbance est plus rapide dans le cas des anthocyanes rutinosides et en présence des homogalacturonanes quel que soit le degré de méthylation. La

transformation du cation flavylium en hémiacétale est également plus marquée dans le cas des anthocyanes rutinosides que glucosides. En revanche, des complexes sont formés entre les anthocyanes glucosides et les homogalacturonanes déméthylés et une sélectivité est marquée entre la delphinidine glucoside ou la cyanidine rutinoside et les homogalacturonanes déméthylés ou faiblement méthylés.

Ces résultats d'interactions semblent indiquer que les associations sont facilitées par un équilibre entre le nombre de groupements hydroxyles et le type de sucre des anthocyanes, ainsi que par la composition osidique et la taille des fractions pectiques.

3. Interactions entre procyanidines et pectines en solution

Les analyses d'interactions en solution entre les pectines ou les fractions pectiques d'une part et les procyanidines ou les monomères de flavan-3-ols d'autre part ont été réalisées par différentes méthodes. Des essais ont été faits par mesure de fluorescence, puis par spectrophotométrie UV-visible et enfin par calorimétrie de titration isotherme. Ces résultats ont déjà fait l'objet de deux publications (Watrelet A.A., Le Bourvellec C., Imberty A. & Renard C.M.G.C. : Interactions between pectic compounds and procyanidins are influenced by methylation degree and chain length. *Biomacromolecules* (2013) 14, 709-718, et Watrelet A.A., Le Bourvellec C., Imberty A. & Renard C.M.G.C. : Neutral sugar side chains of pectins limit interactions with procyanidins. *Carbohydrate Polymers* (2013) 99, 527-536).

3.1. Suivi des interactions par spectroscopie de fluorescence

3.1.1. Résultats

Les mesures d'interactions par fluorescence ont été réalisées entre les pectines commerciales de pomme, les homogalacturonanes déméthylés, faiblement et hautement méthylés et les monomères de flavan-3-ols (la (-)-épicatéchine et la (+)-catéchine) ainsi que les procyanidines DP9 et DP30. La longueur d'onde d'excitation appliquée est de 282 nm et le spectre d'émission est enregistré entre 300 et 450 nm (Helfer *et al.*, 1995). Les analyses ont été faites d'une part avec les monomères de flavan-3-ols à 300 µmol/L et les pectines et les homogalacturonanes à 300 µmol/L, et d'autre part avec les procyanidines à 300 µmol/L et les fractions pectiques à 30 µmol/L. Les résultats suivants (Figure 66, Figure 67 et Figure 68) correspondent au maximum de l'intensité d'émission à 316 nm.

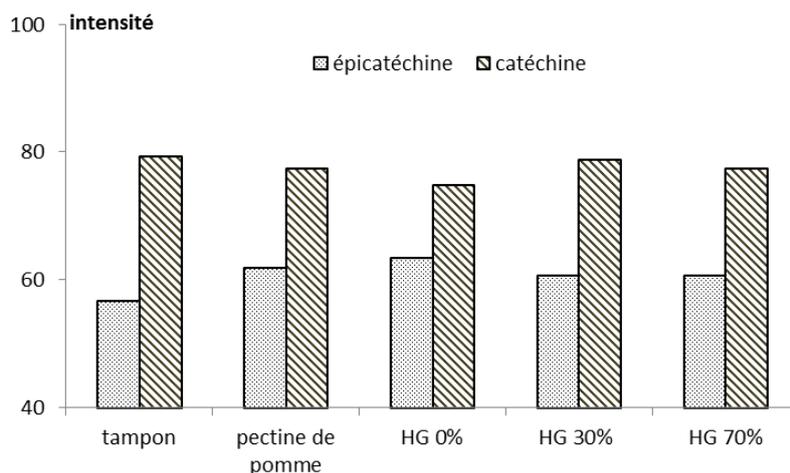


Figure 66 : Intensité maximale de fluorescence à 316 nm des monomères de flavan-3-ols (300 $\mu\text{mol/L}$) en présence des fractions pectiques (300 $\mu\text{mol/L}$ en équivalent acide galacturonique) mis en solution dans un tampon citrate/phosphate pH 3,8 FI 0,1 mol/L à 25°C; longueur d'onde d'excitation : 282 nm et un photomultiplicateur de 500 V.

L'intensité de fluorescence de la (+)-catéchine est plus élevée que celle de la (-)-épicatéchine (Figure 66), avec des valeurs d'intensité de 79 et 57 respectivement. L'ajout de fractions pectiques ne modifie pas cette tendance. L'ajout de pectine de pomme et d'homogalacturonanes déméthylés entraîne une très faible augmentation de l'intensité de fluorescence de la (-)-épicatéchine, allant jusqu'à 62, et une très légère diminution de l'intensité de fluorescence de la (+)-catéchine allant jusqu'à 74 en présence d'homogalacturonanes déméthylés. L'ajout d'homogalacturonanes faiblement et hautement méthylés ne modifie pas l'intensité de fluorescence de la (+)-catéchine, et entraîne une très faible augmentation de celle de la (-)-épicatéchine à 60. Les effets observés paraissant très faibles par rapport à ceux communément rapportés avec des protéines (Skrut *et al.*, 2012), cette étude n'a pas été poursuivie. L'absence de répétition ne permet pas l'obtention d'écart-types, par conséquent les comparaisons effectuées ne permettent pas de savoir si les différences sont significatives ou pas.

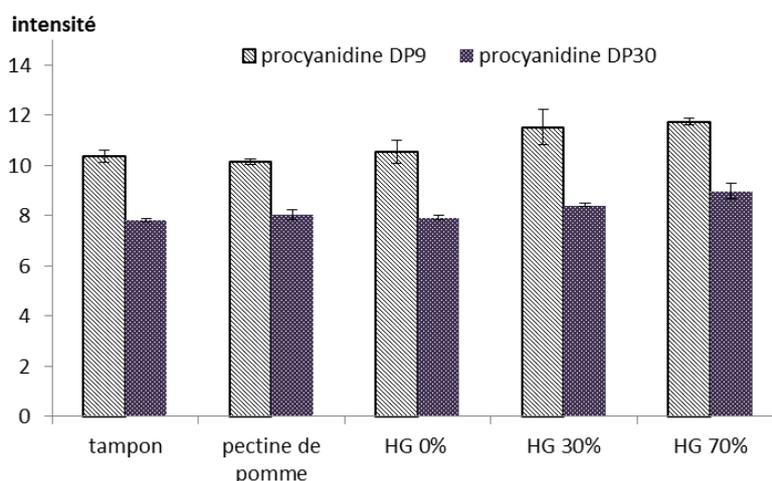


Figure 67 : Intensité maximale de fluorescence à 316 nm des procyanidines DP9 et DP30 (300 $\mu\text{mol/L}$ en équivalent (-)-épicatéchine) en présence des fractions pectiques (30 $\mu\text{mol/L}$ en équivalent acide galacturonique) mises en solution dans un tampon citrate/phosphate pH 3,8 et FI 0,1 mol/L à 25°C ; longueur d'onde d'excitation : 282 nm et un photomultiplicateur de 500 V.

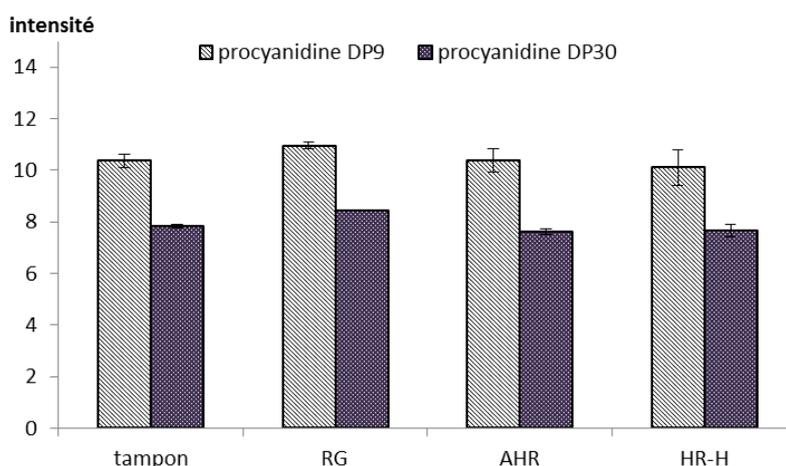


Figure 68 : Intensité maximale de fluorescence à 316 nm des procyanidines de DP9 et DP30 (300 $\mu\text{mol/L}$ en équivalent (-)-épicatéchine) en présence des zones hérissées de pectines (30 $\mu\text{mol/L}$ en équivalent acide galacturonique) mises en solution dans un tampon citrate/phosphate pH 3,8 et FI 0,1 mol/L à 25°C ; longueur d'onde d'excitation : 282 nm et un photomultiplicateur de 500 V.

L'intensité de fluorescence des procyanidines DP9 est plus élevée que celle des procyanidines DP30 (Figure 67). En revanche, l'intensité de fluorescence des procyanidines est de 6 à 10 fois plus faible que celle des monomères de flavan-3-ols (Figure 66). L'ajout des fractions pectiques ne produit aucune différence significative de l'intensité de fluorescence quelles que soient les procyanidines utilisées (Figure 67 et Figure 68).

3.1.2. Discussion

La fluorescence des polyphénols est due à la transition électronique des noyaux A et B. Dans le cas de la (+)-catéchine et de la (-)-épicatéchine, ces deux noyaux ont une conformation identique et sont photophysiquement identiques (Helfer *et al.*, 1995). L'intensité de fluorescence obtenue pour ces deux monomères est différente, ce qui pourrait être dû à la conformation du groupement hydroxyle en C5. Cependant, Helfer *et al.* (1995) n'ont montré aucune différence de fluorescence entre ces monomères dissous dans du 1,4-dioxane. La différence observée ici pourrait être due au solvant de solubilisation, qui est un tampon citrate/phosphate pH 3,8. Les procyanidines montrent une intensité de fluorescence plus faible que les monomères, avec l'échelle suivante d'intensité de fluorescence : monomères > procyanidine DP9 > procyanidine DP30. Cette intensité de fluorescence peut être reliée à la masse molaire de ces polyphénols, c'est-à-dire que plus la masse molaire augmente, plus l'atténuation de fluorescence augmente (Bras *et al.*, 2010).

L'ajout de pectine de pomme ou d'homogalacturonanes déméthylés aux solutions de monomères de flavan-3-ols présente un effet contraire entre la (-)-épicatéchine et la (+)-catéchine, mais aucun effet sur l'intensité de fluorescence des procyanidines. Soares *et al.* (2009) ont montré que les pectines n'affectent pas l'intensité de fluorescence des complexes α -amylase/procyanidines. Soares *et al.* (2007) n'ont pas non plus obtenu de différence de fluorescence entre la (+)-catéchine et le dimère B4 en présence ou non d' α -amylase.

Cette méthode n'a donc pas été utilisée de façon plus approfondie.

3.2. Mise en évidence des interactions par spectrophotométrie

Les interactions entre les monomères ou les polymères de flavan-3-ols et les différentes fractions pectiques ont été analysées par mesure des spectres d'absorbance. Dans le cas des procyanidines, des diagrammes de phase ont été réalisés en faisant varier, de façon systématique, les concentrations à la fois des polysaccharides et des polyphénols, dans une microplaque. Suite à cette mesure, les microplaques ont été centrifugées et les surnageants avant (puit contrôle) et après interaction ont été prélevés et analysés par HPSEC, pour définir les différences de volumes hydrodynamiques des pectines et fractions pectiques avant et après association, ainsi que par HPLC-DAD pour définir l'évolution des degrés de polymérisation des procyanidines. L'objectif de ces analyses a été de définir les concentrations optimales des

deux composés pour la formation de complexes, ainsi que de déterminer la sélectivité des deux partenaires tant d'un point de vue de taille que d'un point de vue de composition.

3.2.1. Monomères de flavan-3-ols

Les spectres d'absorbance présentés (Figure 69) sont ceux relatifs aux interactions entre la (-)-épicatéchine et les fractions pectiques. Les résultats en présence de (+)-catéchine ne sont pas présentés car ils sont similaires.

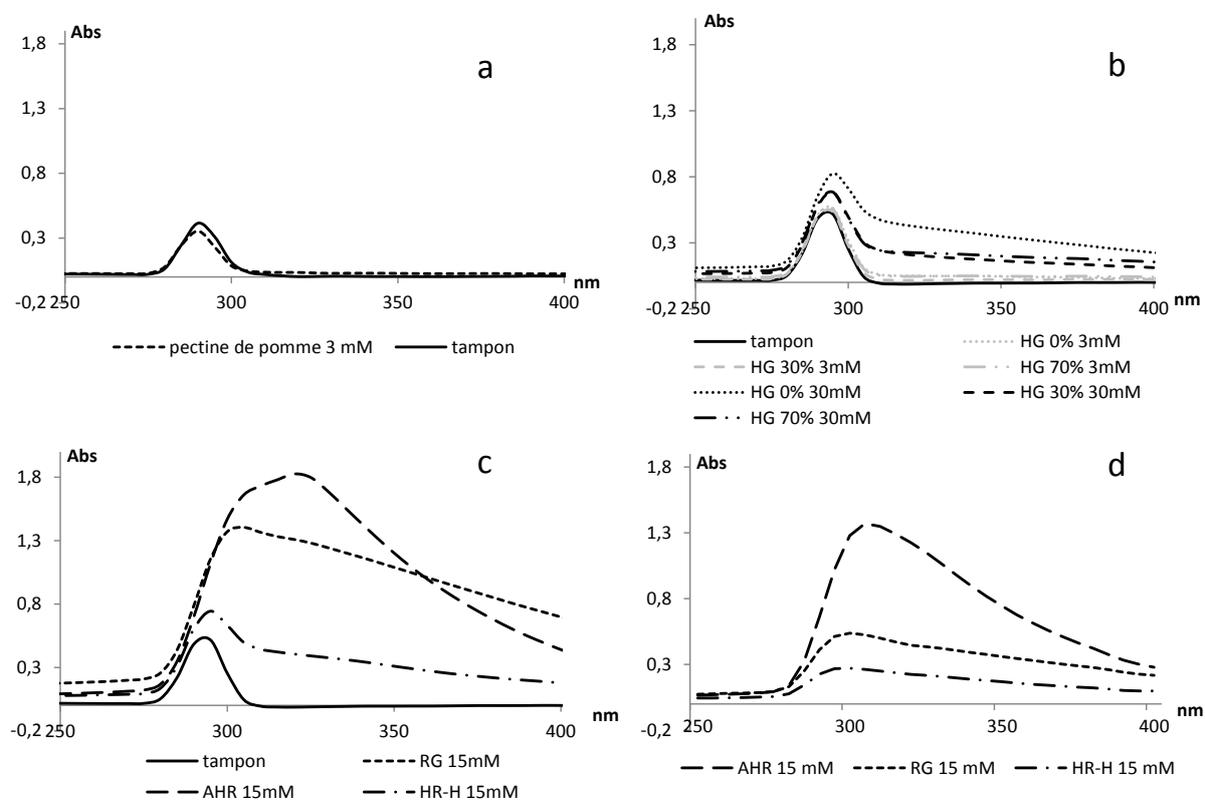


Figure 69 : Spectres d'absorbance de 250 à 400 nm des fractions pectiques à différentes concentrations en présence de la (-)-épicatéchine à 30 mmol/L (a, b et c) ou en absence de la (-)-épicatéchine (d) mises en solution dans un tampon citrate/phosphate pH 3,8 et FI 0,1 mol/L à 25°C.

a : pectine de pomme, b : homogalacturonanes à divers degrés de méthylation, c : fractions de zones hérissées et d : fractions de zones hérissées sans (-)-épicatéchine.

Le maximum d'absorbance de la (-)-épicatéchine dans le tampon à pH 3,8 à 280 nm est de 0,5 unités d'absorbance (Figure 69). En présence de pectine de pomme à 3 mmol/L, le maximum

d'absorbance est diminué de 30% (0,35 unités d'absorbance) par rapport au monomère seul (Figure 69a).

Les spectres d'absorbance obtenus en présence des différents homogalacturonanes à 3 mmol/L sont superposables à celui du monomère (Figure 69b). En revanche, les spectres d'absorbance de la (-)-épicatéchine en présence d'homogalacturonanes à 30 mmol/L sont modifiés. Un déplacement du maximum d'absorbance vers les fortes longueurs d'onde (effet bathochrome) est observé et est le plus marqué pour les homogalacturonanes déméthylés. De plus, le maximum d'absorbance est augmenté et le retour à la ligne de base n'est pas obtenu en présence d'homogalacturonanes.

En ce qui concerne les fractions pectiques de zones hérissées (Figure 69c), les spectres d'absorbance sont complètement modifiés ; cette modification est plus marquée en présence des fractions RG et AHR. Le maximum d'absorbance est plus élevé qu'avec la (-)-épicatéchine seule ou qu'avec les zones hérissées seules (Figure 69d) et la longueur d'onde liée à ce maximum d'absorbance est décalée de 40 nm vers le visible. Ce décalage résulte de l'association entre la (-)-épicatéchine et les zones hérissées, car le maximum d'absorbance des zones hérissées seules (Figure 69d) se situe à 300 nm et 310 nm pour la fraction AHR. Ainsi, les effets hyperchrome et bathochrome sont observés entre les fractions de zones hérissées de pectines et les monomères de flavan-3-ols.

3.2.2. Procyanidines de DP9

3.2.2.1. Pectines commerciales et homogalacturonanes

Les analyses d'interactions entre les procyanidines et les fractions pectiques ont été réalisées par un diagramme de phase afin d'identifier les concentrations limites de procyanidines et de pectines engendrant une précipitation. Les graphes de la Figure 70) représentent l'évolution de l'absorbance à 650 nm à une concentration donnée (en (-)-épicatéchine ou en acide galacturonique) en fonction soit de la concentration en (-)-épicatéchine, soit en acide galacturonique.

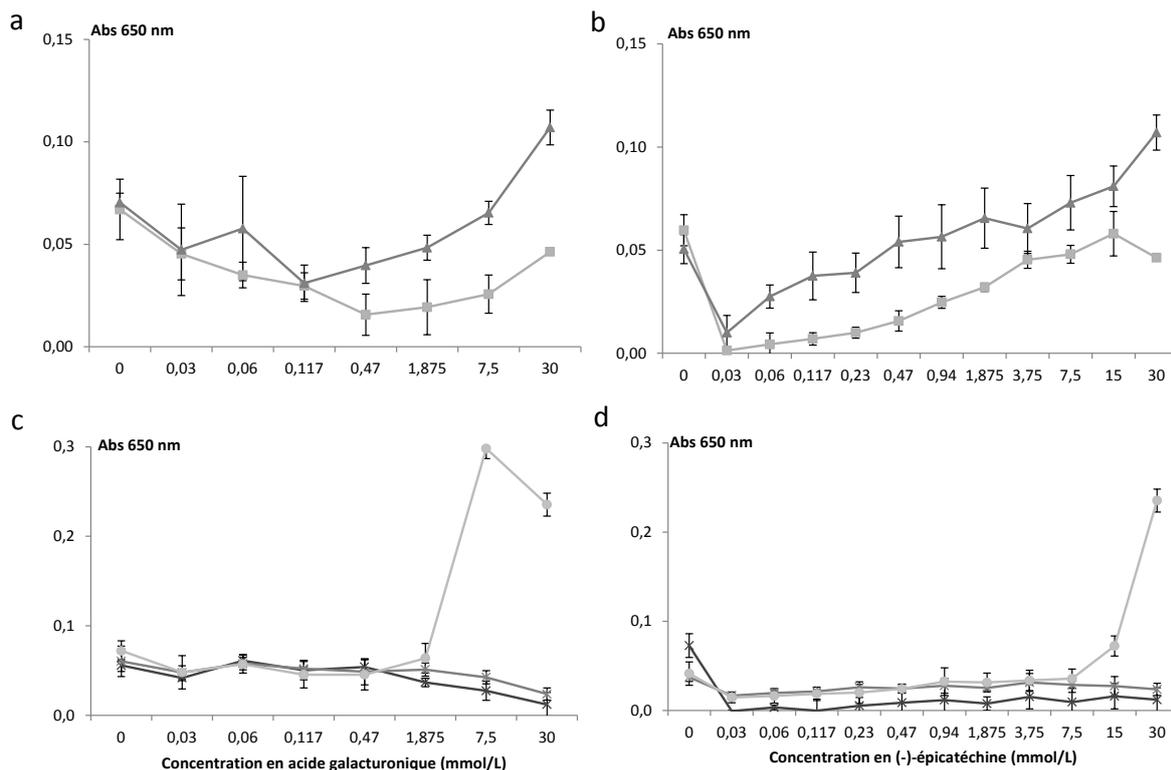


Figure 70 : Absorbance à 650 nm des mélanges entre les fractions pectiques et les procyanidines de DP9 à différentes concentrations préparées dans un tampon citrate/phosphate pH3,8 et FI 0,1 mol/L à 25°C.

a) Variation de l'absorbance en fonction de la concentration en pectines commerciales et c) homogalacturonanes (en équivalent d'acide galacturonique) avec les procyanidines DP9 à 30 mmol/L (en équivalent de (-)-épicatéchine). b) Variation de l'absorbance en fonction de la concentration en procyanidine DP9 (en équivalent (-)-épicatéchine) avec les pectines commerciales à 30 mmol/L et d) avec les homogalacturonanes à 30 mmol/L (en équivalent d'acide galacturonique). carré : pectine de pomme, triangle : pectine d'agrumes, croix : HG 0%, double croix : HG 30% et rond : HG 70%.

L'absorbance à 650 nm est choisie comme indicateur de la formation de trouble ou d'agrégats, dans la mesure où aucun des composés mis en interaction n'absorbe à cette longueur d'onde. L'absorbance des pectines commerciales avec les procyanidines DP9 à 30 mmol/L (en équivalent (-)-épicatéchine) (Figure 70a) augmente avec l'augmentation de la concentration de pectines et est plus élevée avec les pectines d'agrumes (jusqu'à 0,1 contre 0,05 pour les pectines de pomme à 30 mmol/L en équivalent acide galacturonique).

L'addition de procyanidines DP9 à 0,03 mmol/L (en équivalent (-)-épicatéchine) aux pectines commerciales conduit à une diminution de l'absorbance (Figure 70b). La turbidité initiale des

pectines commerciales (0,05 unités d'absorbance) est annulée par l'addition des procyanidines DP9. L'augmentation de la concentration en procyanidine conduit à une augmentation de l'absorbance des pectines commerciales similaire à celle de la Figure 70a. A partir de 0,06 mmol/L de procyanidine DP9 et en présence de 30 mmol/L de pectines d'agrume, un trouble se forme et est détecté à 650 nm. En revanche, entre des pectines de pomme à la concentration de 30 mmol/L et des procyanidines DP9 à la concentration de 30 mmol/L, aucun trouble n'est détecté à l'œil nu, même si l'absorbance à 650 nm est plus élevée qu'avec 0,03 mmol/L de procyanidine DP9.

Tout comme dans le cas des pectines de pomme et d'agrume, l'addition de faibles concentrations de procyanidines DP9 aux différentes fractions d'homogalacturonanes conduit à une diminution de l'absorbance initiale. Les homogalacturonanes déméthylés et faiblement méthylés montrent une absorbance stable à 650 nm entre 0,015 et 0,03 respectivement, quelle que soit la concentration en procyanidines DP9 (Figure 70c, d). En revanche, dans le cas des homogalacturonanes hautement méthylés (HG 70%), l'absorbance est multipliée par quatre à partir de 1,875 mmol/L d'homogalacturonanes (en équivalent acide galacturonique) et de 7,5 mmol/L de procyanidine (en équivalent (-)-épicatéchine) jusqu'à 30 mmol/L. Cette augmentation est reliée à la formation d'agrégats détectables à l'œil nu (Figure 71).

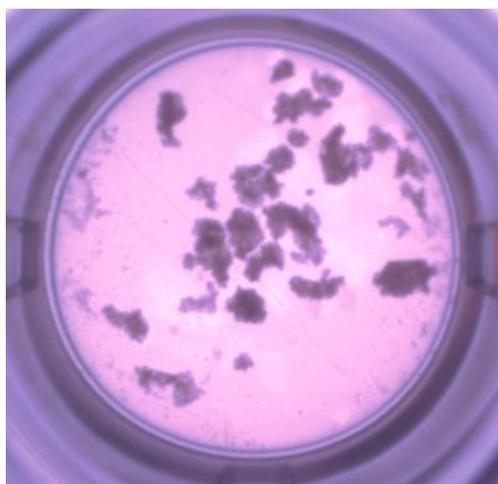


Figure 71 : Photo d'un puits de microplaque contenant 30 mmol/L de HG 70% (en équivalent acide galacturonique) et 30 mmol/L de procyanidine DP9 (en équivalent (-)-épicatéchine) dans un tampon citrate/phosphate à pH 3,8 et FI 0,1 mol/L.

3.2.2.2. Fractions pectiques de zones hérissées

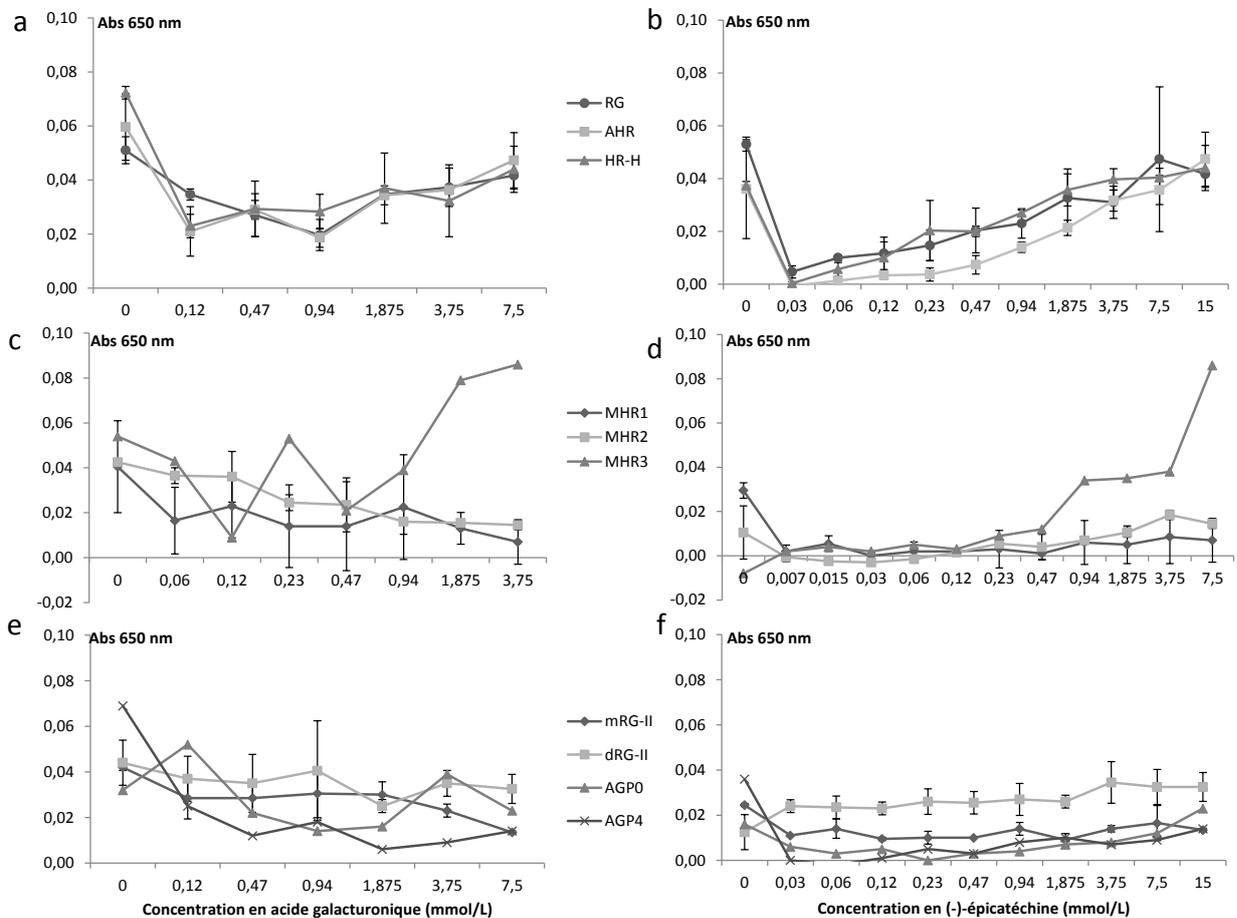


Figure 72 : Absorbance à 650 nm des mélanges entre les zones hérissées de pectines et les procyanidines DP9 préparées dans un tampon citrate/phosphate pH 3,8 et FI 0,1 mol/L à 25°C.

a) Variation de l'absorbance de RG, AHR et HR-H; c) de MHR1, MHR2 et MHR3; e) de mRG-II, dRG-II, AGP0 et AGP4 à différentes concentrations (en équivalent acide galacturonique) avec les procyanidines DP9 à 15 (a et e) ou 7,5 (c) mmol/L (en équivalent (-)-épicatéchine). b) Variation de l'absorbance de RG, AHR et HR-H; d) de MHR1, MHR2 et MHR3; f) de mRG-II, dRG-II, AGP0 et AGP4 à 7,5 (b et f) ou 3,75 (d) mmol/L (en équivalent acide galacturonique) à différentes concentrations de procyanidines DP9 (en équivalent (-)-épicatéchine).

Les absorbances à 650 nm de toutes les fractions pectiques de zones hérissées en présence de procyanidines DP9 sont faibles (0,04), stables et similaires (Figure 72). Les graphes 78b, d et f montrent la variation de l'absorbance des puits contenant les fractions de zones hérissées à 7,5 mmol/L (b et f) et à 3,75 mmol/L (d) en équivalent acide galacturonique en fonction de la

concentration en procyanidines DP9. Initialement, toutes les fractions de zones hérissées présentent une légère turbidité qui disparaît avec l'ajout de faibles concentrations de procyanidines comme le montre la diminution de l'absorbance entre 0 et 0,03 mmol/L de (-)-épicatéchine. L'absorbance des fractions RG, AHR et HR-H augmente légèrement jusqu'à 0,04 avec l'augmentation de la concentration en procyanidines DP9 (Figure 72a, b). Parmi les fractions MHRs, seule la fraction MHR3 (Figure 72c, d) montre une augmentation de l'absorbance à plus de 0,08 à partir de 1,875 mmol/L en équivalent acide galacturonique et à partir de 0,94 mmol/L en équivalent (-)-épicatéchine alors que les fractions MHR1 et 2 donnent une absorbance stable de 0,01. La variation d'absorbance entre les RG-IIs et les AGPs à 7,5 mmol/L en équivalent acide galacturonique en fonction de la concentration en procyanidines DP9 (Figure 72e, f) est faible (0,01) et stable entre les fractions, même si le dimère RG-II (dRG-II) montre une absorbance de 0,03.

3.2.3. Procyanidines de DP30

Tout comme les analyses réalisées avec les procyanidines DP9, les mesures d'absorbance à 650 nm ont été réalisées par diagramme de phase avec des variations de la concentration à la fois des procyanidines et des fractions pectiques.

3.2.3.1. Pectines commerciales et homogalacturonanes

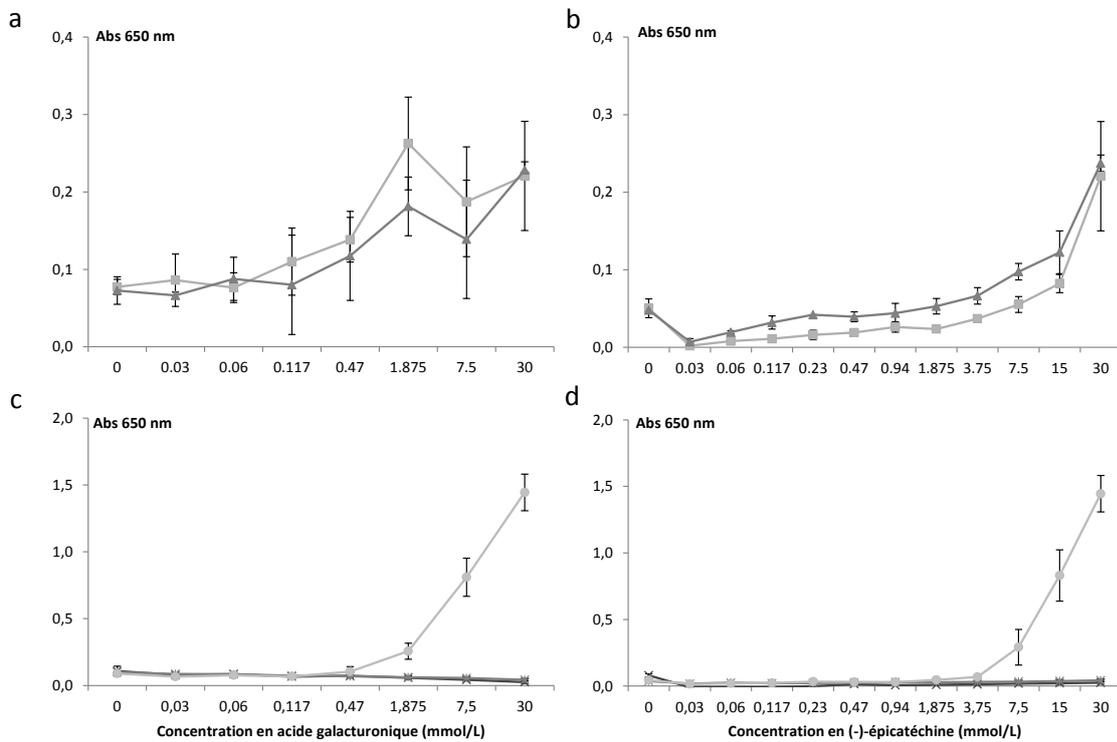


Figure 73 : Absorbance à 650 nm des mélanges entre les fractions pectiques et les procyanidines de DP30 préparées dans un tampon citrate/phosphate pH 3,8 et FI 0,1 mol/L à 25°C.

a) Variation de l'absorbance en fonction de la concentration en pectines commerciales et c) en homogalacturonanes (en équivalent d'acide galacturonique) avec les procyanidines DP30 à 30 mmol/L (en équivalent de (-)-épicatéchine). b) Variation de l'absorbance en fonction de la concentration en procyanidine DP30 (en équivalent (-)-épicatéchine) avec les pectines commerciales à 30 mmol/L et d) avec les homogalacturonanes à 30 mmol/L (en équivalent d'acide galacturonique). carré : pectine de pomme, triangle : pectine d'agrumes, croix : HG 0%, double croix : HG 30% et rond : HG 70%.

En présence d'une concentration élevée de procyanidine DP30 (30 mmol/L en équivalent (-)-épicatéchine), l'absorbance augmente avec l'augmentation de la concentration en pectines commerciales (elle atteint 0,22 à 30 mmol/L en équivalent acide galacturonique) (Figure 73a). De même, en présence d'une concentration élevée de pectines (30 mmol/L en équivalent acide galacturonique) (Figure 73b), l'absorbance à 650 nm augmente avec l'augmentation de la concentration en procyanidine DP30, à partir de 1,875 mmol/L en équivalent (-)-épicatéchine. Cette augmentation est plus marquée avec la pectine d'agrumes. Ces résultats sont reliés à la formation d'un trouble visible à l'œil nu.

L'absorbance des homogalacturonanes déméthylés et faiblement méthylés diminue légèrement avec l'augmentation de la concentration en acide galacturonique quelle que soit la concentration en procyanidine DP30 (en équivalent (-)-épicatéchine) (Figure 73c, d). En revanche, avec les homogalacturonanes hautement méthylés, l'absorbance augmente à partir de 1,875 mmol/L d'acide galacturonique et de 7,5 mmol/L de (-)-épicatéchine et est remarquablement élevée (jusqu'à 1,44 à 30 mmol/L des deux composés). Cette augmentation de l'absorbance à 650 nm est reliée à l'analyse visuelle, qui met en évidence la présence de gros agrégats (Figure 74).

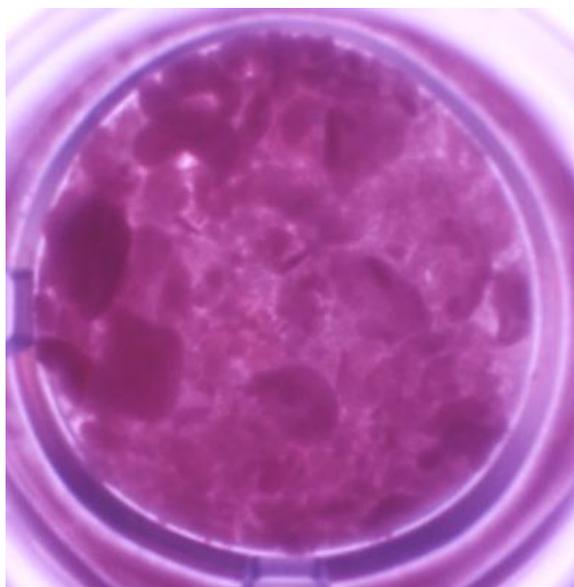


Figure 74 : Photo d'un puit de microplaque contenant 30 mmol/L de procyanidine DP30 (en équivalent (-)-épicatéchine) et 30 mmol/L de HG 70% (en équivalent acide galacturonique).

3.2.3.2. Fractions pectiques de zones hérissées

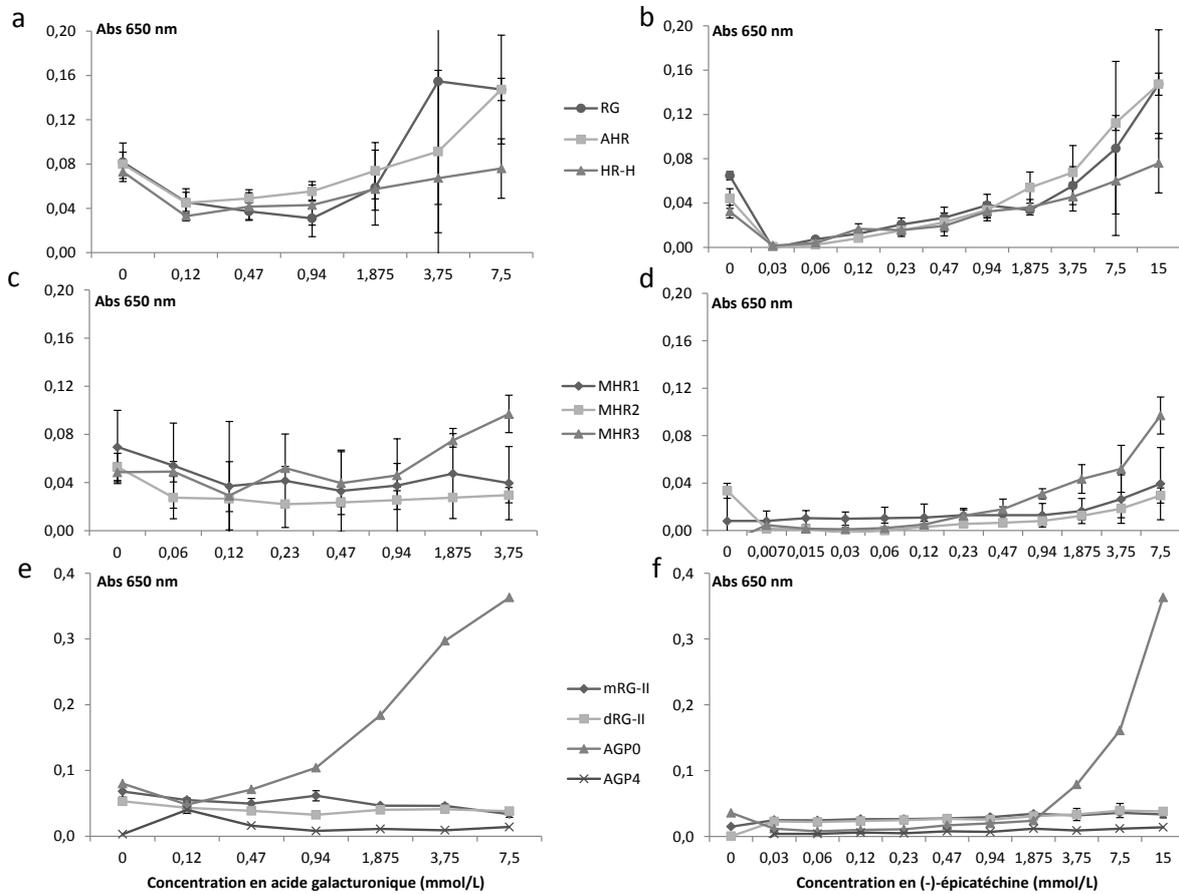


Figure 75 : Absorbance à 650 nm des mélanges entre les zones hérissées de pectines et les procyanidines DP30 préparées dans un tampon citrate/phosphate pH 3,8 et FI 0,1 mol/L à 25°C.

a) Variation de l'absorbance de RG, AHR et HR-H; c) de MHR1, MHR2 et MHR3; e) de mRG-II, dRG-II, AGP0 et AGP4 à différentes concentrations (en équivalent acide galacturonique) avec les procyanidines DP30 à 15 (a et e) ou 7,5 (c) mmol/L (en équivalent (-)-épicatéchine). b) Variation de l'absorbance de RG, AHR et HR-H; d) de MHR1, MHR2 et MHR3; f) de mRG-II, dRG-II, AGP0 et AGP4 à 7,5 (b et f) ou 3,75 (d) mmol/L (en équivalent acide galacturonique) à différentes concentrations de procyanidines DP30 (en équivalent (-)-épicatéchine).

Tout comme dans le cas des procyanidines DP9, l'addition des procyanidines DP30 aux fractions RG, AHR et HR-H provoque d'abord une diminution de l'absorbance à 650 nm.

L'absorbance à 650 nm obtenue pour le mélange entre les fractions RG et AHR et les procyanidines DP30 à 15 mmol/L en équivalent (-)-épicatéchine (Figure 75a) augmente de

0,04 à 0,14 à partir de 0,12 mmol/L en équivalent acide galacturonique. Cette augmentation est moins forte pour la fraction HR-H montrant une absorbance maximale à 0,08. A ces concentrations élevées, les écarts-types sont très élevés à cause de la formation d'agrégats. La même augmentation en fonction de la concentration en procyanidines DP30 avec les mêmes écarts-types est obtenue pour ces fractions à 7,5 mmol/L en équivalent acide galacturonique (Figure 75b). Pour les fractions MHRs (Figure 75c, d), l'absorbance est quasiment stable en fonction de la concentration en acide galacturonique, sauf pour la fraction MHR3 qui montre une augmentation de l'absorbance jusqu'à 0,09 à partir de 0,94 mmol/L en équivalent acide galacturonique. Aucune variation de l'absorbance à 650 nm n'est observée entre les RG-IIs et AGP4 et les procyanidines DP30 quelles que soient les concentrations en (-)-épicatéchine ou en acide galacturonique (Figure 75e, f). En revanche, pour la fraction AGP0 et les procyanidines DP30, l'absorbance à 650 nm augmente fortement à partir de 0,47 mmol/L en équivalent acide galacturonique et à partir de 3,75 mmol/L en équivalent (-)-épicatéchine, jusqu'à 0,35 unités d'absorbance.

3.2.4. Analyse des surnageants par HPSEC et HPLC-DAD

Après mesure de l'absorbance et centrifugation des microplaques, les surnageants prélevés ont été analysés par HPSEC et par HPLC-DAD. Une différence de coefficient de partition (ΔK_{av}) correspondant à la différence des volumes hydrodynamiques des surnageants avant et après association est mesurée par HPSEC. Un $\overline{\Delta DPn}$, correspondant à la différence de degré de polymérisation des procyanidines avant et après association, est calculé à partir de l'analyse des surnageants par HPLC-DAD après thioacidolyse (Tableau XVII). Les surnageants des mélanges entre les procyanidines et les homogalacturonanes déméthylés et faiblement méthylés n'ont pas été analysés car les absorbances à 650 nm n'ont pas montré de formation de trouble ou d'agrégats.

Tableau XVII : Différences de coefficients de partition (ΔK_{av}) des fractions pectiques et de degré de polymérisation (ΔDPn) des procyanidines calculées dans les surnageants avant et après association entre les fractions pectiques et les procyanidines à 30 mmol/L d'acide galacturonique et de (-)-épicatéchine, respectivement, dans un tampon citrate/phosphate pH 3,8 et FI 0,1 mol/L.

Fractions pectiques	Procyanidines DP9		Procyanidines DP30	
	ΔK_{av}	ΔDPn	ΔK_{av}	ΔDPn
Pectine de pomme	0,01	-5,1	-0,04	-13,5
Pectine d'agrumes	-0,02	-3,8	-0,02	-12,9
HG 70%	0,11	-1,4	0,03	-14,4
RG	0,00	-1,61	0,00	-11,82
AHR	0,00	-1,06	0,00	-10,17
HR-H	0,00	-1,07	0,01	-9,49
MHR1	0,00	0,17	0,01	-4,89
MHR2	0,00	0,00	0,00	-5,01
MHR3	0,00	-0,55	-0,01	-8,44
mRG-II	0,00	0,15	0,00	0,28
dRG-II	0,00	-0,16	0,00	0,27
AGP0	0,00	-0,22	0,01	-3,62
AGP4	0,00	0,15	0,01	0,53

3.2.4.1. Coefficient de partition (ΔK_{av})

De faibles valeurs de ΔK_{av} sont obtenues pour les pectines commerciales que ce soit de pomme (0,01) ou d'agrumes (-0,02) (Tableau XVII) avec les procyanidines DP9. Le ΔK_{av} étant la différence entre le coefficient de partition du surnageant après association et le coefficient de partition du surnageant avant association, les valeurs négatives signifient que le coefficient de partition après association est plus petit que celui avant association. Par conséquent, le volume hydrodynamique des pectines restant en solution après association est plus élevé que celui avant association. Les procyanidines DP9 ont donc une légère sélectivité pour les plus petites molécules de pectines d'agrumes. Les associations entre les pectines commerciales et les procyanidines DP30 montrent des valeurs de ΔK_{av} plus négatives en présence de pectines de pomme qu'avec les pectines d'agrumes. Les procyanidines DP30 interagissent donc aussi sélectivement avec les plus petites molécules de pectines mais cet effet est moins marqué pour les pectines d'agrumes.

En ce qui concerne les homogalacturonanes, seuls les HG 70% montrent des différences de coefficient de partition. La valeur de ΔK_{av} est positive, signifiant que les plus petites molécules de HG 70% restent dans le surnageant alors que les molécules plus grosses s'agrègent préférentiellement avec les procyanidines DP9. Pour les procyanidines DP30 et les homogalacturonanes hautement méthylés, le ΔK_{av} est positif ce qui indique une légère sélectivité des procyanidines DP30 pour la formation d'agrégats avec les plus grosses molécules de HG 70%.

Les différences de coefficient de partition obtenues entre les fractions pectiques de zones hérissées et les procyanidines DP9 et DP30 sont très proches ou égales à zéro. Il n'y a donc pas de sélectivité des procyanidines en fonction du volume hydrodynamique de ces fractions pectiques. Il n'y avait d'ailleurs pas ou très peu de formation d'agrégats (Figure 72 et Figure 75) sauf avec AGP0.

3.2.4.2. Degré de polymérisation ($\overline{\Delta DPn}$)

Le $\overline{\Delta DPn}$ correspond à la différence de degré de polymérisation entre les procyanidines qui n'ont pas formées d'agrégats avec les pectines et les procyanidines initiales (Tableau XVII). Un $\overline{\Delta DPn}$ négatif est obtenu avec les pectines commerciales, ce qui signifie que le degré de polymérisation des procyanidines restant en solution est plus faible que celui des procyanidines initiales, et donc que les pectines commerciales interagissent préférentiellement avec les procyanidines hautement polymérisées. Il est plus marqué dans le cas des pectines de pomme que dans le cas des pectines d'agrumes avec les procyanidines DP9. Les différences de degré de polymérisation obtenues avec les procyanidines DP30 et les deux pectines sont très proches (-12,9 et -13,5 pour les pectines d'agrumes et de pomme respectivement). Les pectines de pomme semblent avoir un effet légèrement plus marqué que les pectines d'agrumes en ce qui concerne leur sélectivité pour les procyanidines hautement polymérisées. Ceci peut être relié avec les augmentations de l'absorbance à 650 nm (donc la précipitation) observées sur les Figure 70 et Figure 73.

Entre les procyanidines DP9 et les homogalacturonanes hautement méthylées, la valeur de $\overline{\Delta DPn}$ est de -1,4, ce qui signifie que le degré de polymérisation des procyanidines restant en solution après association est un peu plus faible que le degré de polymérisation des procyanidines initiales. Il semblerait que les HG 70% interagissent avec les molécules de procyanidines les plus grosses, mais cet effet est moins prononcé qu'avec les pectines

commerciales. Par contre, entre les procyanidines DP30 et les HG 70%, la différence de degré de polymérisation est de -24,4. Cette valeur fortement négative indique que les procyanidines hautement polymérisées de la fraction DP30 interagissent préférentiellement avec les HG 70%. Ici encore, la différence marquée du degré de polymérisation entre les procyanidines initiales et libres, peut être relié à une formation prononcée d'agrégats (Figure 74).

Le $\overline{\Delta DP_n}$ est de -1,61 pour RG et de -1,06 pour AHR et HR-H avec les procyanidines DP9 (Tableau XVII), ce qui signifie que le degré de polymérisation des procyanidines non liées est légèrement plus faible que celui des procyanidines initiales. Les fractions pectiques de zones hérissées précipitent aussi préférentiellement avec les procyanidines hautement polymérisées. En revanche, les $\overline{\Delta DP_n}$ des fractions MHRs, RG-IIs et AGPs avec les procyanidines DP9 sont proches de 0, ce qui signifie que ces fractions s'associent aux procyanidines sans sélectivité vis-à-vis du degré de polymérisation. Pour les procyanidines DP30, les $\overline{\Delta DP_n}$ des surnageants obtenus avec les fractions pectiques de zones hérissées RG, AHR, HR-H et MHRs sont négatifs allant de -4,89 pour la fraction MHR1 à -11,82 pour la fraction RG, ce qui indique une interaction préférentielle de ces fractions avec les procyanidines hautement polymérisées. Pour les fractions RG-IIs et les procyanidines DP30, les valeurs de $\overline{\Delta DP_n}$ sont très proches de zéro. Pour les AGPs, le comportement est contrasté, puisqu'après interaction avec AGP0 le $\overline{\Delta DP_n}$ est de -3,62, mais proche de zéro avec AGP4. Ainsi, seule la fraction AGP0 présente une interaction préférentielle avec les procyanidines hautement polymérisées et entraîne la formation d'un précipité.

3.3. Etude des interactions par calorimétrie de titration isotherme (ITC)

Les analyses d'interactions par ITC ont été réalisées par titration des fractions pectiques par les monomères ou les polymères de flavan-3-ols, toujours à pH 3,8 et à 25°C. Les contrôles (blancs) sont le résultat de la titration du tampon à pH 3,8 par les polyphénols. Ces contrôles ont été soustraits aux données. Les thermogrammes montrés par la suite comportent trois parties : en haut, les données sont celles du contrôle, au milieu ce sont les données corrigées par le contrôle et en bas, ce sont les données après ajustement à partir desquelles les paramètres thermodynamiques ont été définis.

3.3.1. Monomères de flavan-3-ols et dimère B2

La titration des pectines de pomme à 30 mmol/L en équivalent acide galacturonique par les monomères de flavan-3-ols et par le dimère B2 à 30 mmol/L en équivalent (-)-épicatéchine entraîne l'apparition de pics endothermiques (Figure 76).

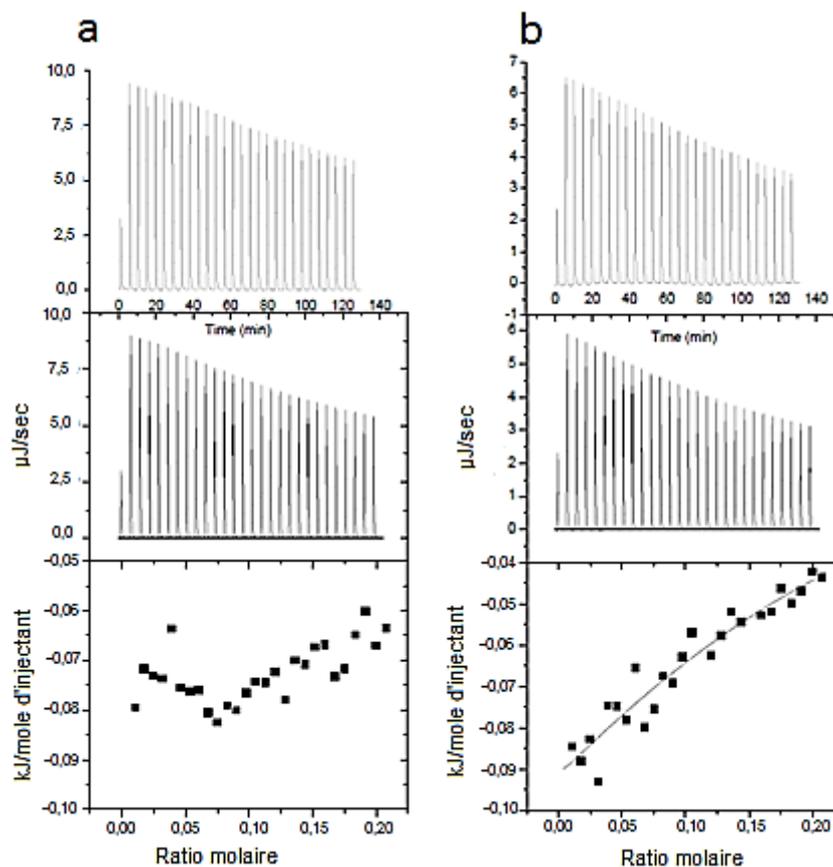


Figure 76 : Thermogrammes de titration des pectines de pomme à 30 mmol/L (en équivalent acide galacturonique) par (a) la (-)-épicatéchine et (b) le dimère B2 à 30 mmol/L (en équivalent (-)-épicatéchine), dans un tampon citrate/phosphate à pH 3,8 et FI 0,1 mol/L à 25°C.

Le thermogramme de la titration de la pectine de pomme par la (+)-catéchine est similaire à celui de la (-)-épicatéchine et n'est donc pas présenté. Après soustraction des contrôles (-)-épicatéchine ou dimère B2, les données ne s'ajustent pas ou mal, indiquant qu'aucune titration n'est obtenue avec ces polyphénols, même si les données obtenues avec le dimère B2 et les pectines de pomme semblent meilleures que dans le cas de la (-)-épicatéchine. La calorimétrie de titration isotherme n'est donc pas la méthode adéquate pour étudier les interactions entre des monomères ou un dimère de flavan-3-ols et des pectines de pomme.

3.3.2. Procyanidines DP9

3.3.2.1. Pectines commerciales et homogalacturonanes

La titration des pectines de pomme à 30 mmol/L en équivalent acide galacturonique par les procyanidines DP9 à 30 mmol/L en équivalent (-)-épicatechine montre des pics exothermiques forts, jusqu'à $-30 \mu\text{J}/\text{sec}$ (Figure 77a).

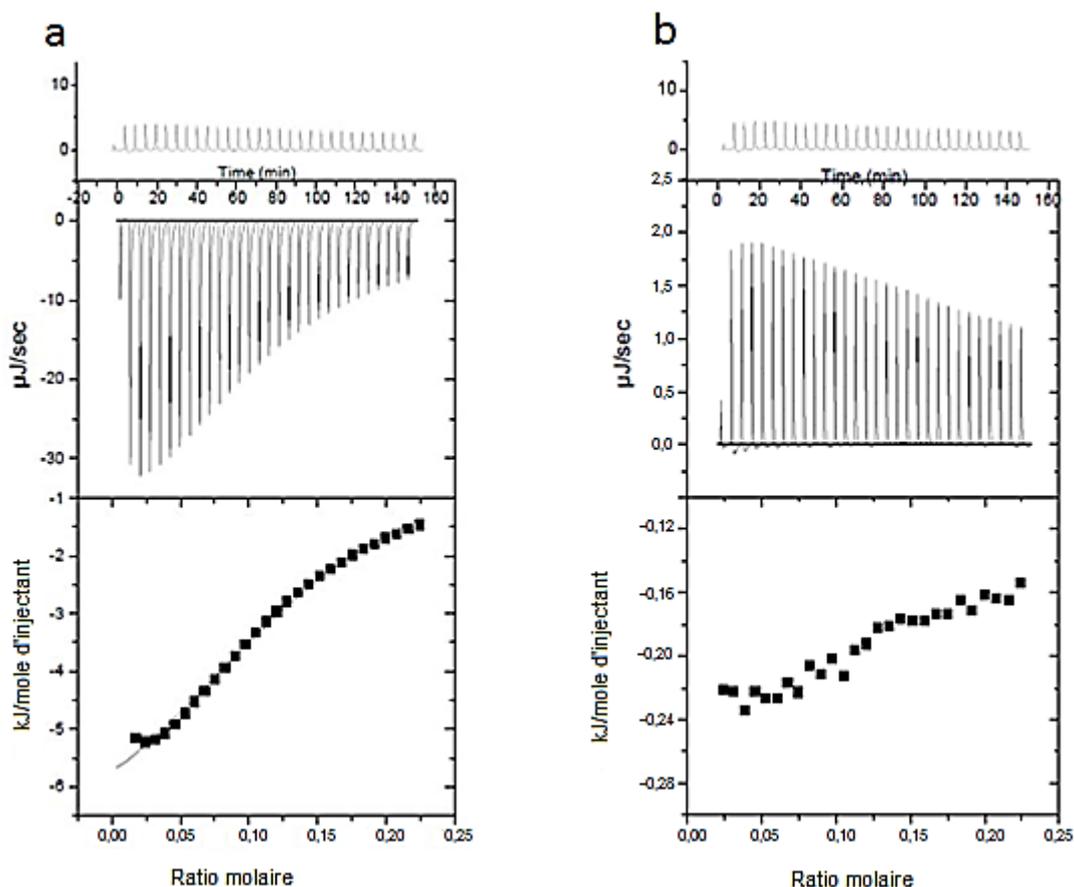


Figure 77 : Thermogrammes de titration de (a) pectines de pomme et de (b) homogalacturonanes hautement méthylés (HG 70%) à 30 mmol/L (en équivalent acide galacturonique) par les procyanidines DP9 à 30 mmol/L (en équivalent (-)-épicatechine), dans un tampon citrate/phosphate à pH 3,8 et FI 0,1 mol/L à 25°C.

La titration du tampon par les procyanidines DP9 présente des pics endothermiques de l'ordre de $4 \mu\text{J}/\text{sec}$. Après soustraction de ce contrôle aux données brutes, la courbe d'ajustement permet d'obtenir les paramètres thermodynamiques présentés dans le Tableau XVIII. La titration des pectines d'agrumes par les procyanidines DP9 forme un thermogramme similaire à celui des pectines de pomme et il n'est donc pas présenté. La stoechiométrie calculée ici

correspond au ratio des équivalent en monomères (-)-épicatéchine/acide galacturonique. Elle diffère entre les deux pectines (8,5 pour les pectines d'agrumes et 19,2 pour les pectines de pomme). En revanche, les constantes d'association sont du même ordre de grandeur, de l'ordre de 10^3 M^{-1} . Les analyses de contributions thermodynamiques pour les deux pectines montrent une contribution de l'enthalpie liée à l'interaction exothermique ($\Delta H = -5,4 \text{ kJ/mol}$), et une contribution de l'entropie plus élevée ($-T\Delta S = -11,9 \text{ kJ/mol}$).

Tableau XVIII : Paramètres thermodynamiques de liaisons entre les pectines commerciales à 30 mmol/L (en équivalent acide galacturonique) et les procyanidines DP9 à 30 mmol/L (en équivalent (-)-épicatéchine) dans un tampon citrate/phosphate à pH 3,8 et FI 0,1 mol/L à 25°C.

Procyanidines DP9	Pectines d'agrumes	Pectines de pomme
<i>n</i>	8,5	19,2
$K_a (\text{M}^{-1})$	1085 ± 137	1240 ± 179
$\Delta H (\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1})$	-5,4	-5,4
$\Delta G (\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1})$	-17,3	-17,7
$\Delta S (\text{J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1})$	39,9	41,1

n : stoechiométrie ; K_a : constante d'association ; ΔH : enthalpie ; ΔG : enthalpie libre et ΔS : entropie.

La titration des homogalacturonanes de différents degrés de méthylation par les procyanidines DP9 montre des pics endothermiques de l'ordre de 1 à 2 $\mu\text{J}/\text{sec}$ (Figure 77b). Après soustraction du blanc des procyanidines seules, les points ne sont pas ajustables ; par conséquent, aucun paramètre thermodynamique n'est identifié. Les interactions entre les procyanidines DP9 et les homogalacturonanes méthylés ou non semblent ne pas être suffisamment exothermiques pour être détectées par calorimétrie de titration isotherme.

3.3.2.2. Fractions pectiques de zones hérissées

Des comportements très variables ont été obtenus lors de la titration des différentes fractions de zones hérissées par les procyanidines DP9 (Figure 78).

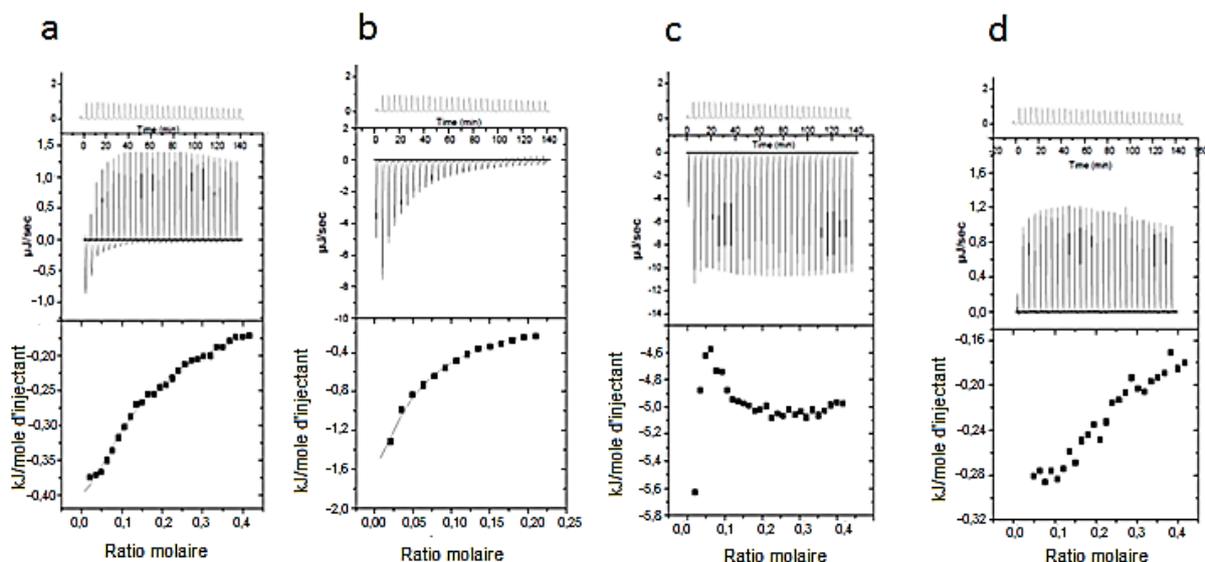


Figure 78 : Thermogrammes de titration des fractions (a) RG; (b) AHR; (c) MHR4 et (d) mRG-II à 3,75 mmol/L (en équivalent acide galacturonique) par les procyanidines DP9 à 7,5 mmol/L (en équivalent (-)-épicatéchine), dans un tampon citrate/phosphate à pH 3,8 et FI 0,1 mol/L à 25°C.

Le thermogramme de titration de la fraction RG par les procyanidines DP9 (Figure 78a) montre des pics exothermiques pendant les premières injections, avec des valeurs de l'ordre de $-1 \mu\text{J}/\text{sec}$, puis des pics endothermiques du même ordre de grandeur apparaissent correspondant à la saturation des sites de liaisons. Le thermogramme de titration de AHR (tout comme celui de HR-H) (Figure 78b) montre de forts pics exothermiques ($-8 \mu\text{J}/\text{sec}$) puis une titration arrivant jusqu'à la saturation des sites de liaisons. En revanche, le thermogramme de la fraction MHR4 (Figure 78c) présente des pics exothermiques forts ($-10 \mu\text{J}/\text{sec}$) et stables au cours des injections de procyanidines. Aucune titration n'est donc obtenue dans ces conditions, ni même après modification des concentrations (en augmentant la concentration en procyanidines et en diminuant la concentration de la fraction MHR4). De plus, le thermogramme obtenu avec la fraction mRG-II (Figure 78d) montre des pics endothermiques de l'ordre de $1 \mu\text{J}/\text{sec}$, ce qui indique que la fraction mRG-II n'est pas titrée par les procyanidines DP9. Suite à la titration des différentes fractions et aux ajustements possibles, les paramètres thermodynamiques ont été définis et présentés dans le Tableau XIX.

Tableau XIX : Paramètres thermodynamiques de liaisons entre les fractions pectiques de zones hérissées à 3,75 mmol/L (en équivalent acide galacturonique) et les procyanidines DP9 à 7,5 mmol/L (en équivalent (-)-épicatéchine), dans un tampon citrate/phosphate à pH 3,8 et FI 0,1 mol/L à 25°C.

Procyanidines DP 9	RG	AHR	HR-H	MHR1	MHR2	MHR3	AGP0	AGP4
n	0,01	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
K_a (M^{-1})	2530	1955	1850	2105	872	2225	44	57
\pm	89	111	273	150	56	255	1	2
ΔH ($kJ.mol^{-1}$)	-6	-3	-18	-5	-16	-26	-67	-38
ΔG ($kJ.mol^{-1}$)	-19	-19	-19	-19	-17	-19	-9	-10
ΔS ($J.mol^{-1}.K^{-1}$)	45	51	1	47	2	-25	-193	-95

n : stoechiométrie ; K_a : constante d'association ; ΔH : enthalpie ; ΔG : enthalpie libre et ΔS : entropie.

La stoechiométrie (toujours calculée comme le ratio des équivalents (-)-épicatéchine/acide galacturonique) est fixée à 0,01 pour la titration de la fraction RG par les procyanidines DP9, (c'est-à-dire que 1 molécule de (-)-épicatéchine se lierait à 100 molécules d'acide galacturonique) et à 0,02 pour les autres fractions (c'est-à-dire que 1 molécule de (-)-épicatéchine se lierait à 50 molécules d'acide galacturonique) en utilisant l'ajustement par un modèle à 1 site (Tableau XIX). La constante d'association observée entre la fraction RG et les procyanidines DP9 ($2,5 \times 10^3 M^{-1}$) est du même ordre de grandeur que celles mesurées avec les fractions AHR, HR-H, MHR1 et MHR3. En revanche, la constante d'association obtenue entre la fraction MHR2 et les procyanidines DP9 est plus faible (K_a inférieure à $10^3 M^{-1}$). De plus, celles obtenues dans le cas des AGPs correspondent à des interactions très faibles (Turnbull et Daranas, 2003). L'analyse des contributions thermodynamiques indique une contribution de l'enthalpie entre les fractions HR-H, MHR2 et MHR3 et les procyanidines DP9, liée aux associations exothermiques ($\Delta H = -18, -16$ et -26 kJ/mol respectivement). De plus, la fraction MHR3 présente une entropie positive ($-T\Delta S = 7$ kJ/mol), ce qui signifie que la réaction est conduite par l'enthalpie, ce qui pourrait être le résultat de l'implication des liaisons hydrogènes. En revanche, entre les fractions RG, AHR et MHR1 et les procyanidines DP9, la contribution thermodynamique est plutôt entropique, avec des valeurs de $-T\Delta S$ de l'ordre de -13 kJ/mol. Cette contribution pourrait résulter des interactions hydrophobes (Poncet-Legrand *et al.*, 2007 ; Frazier *et al.*, 2010). Les contributions thermodynamiques des fractions AGPs semblent plutôt impliquer une contribution de l'enthalpie avec des enthalpies

négatives et des entropies positives ($-T\Delta S = 57$ et 28 kJ/mol pour AGP0 et AGP4 respectivement), ce qui impliquerait des liaisons hydrogènes.

3.3.3. Procyanidines DP30

3.3.3.1. Pectines commerciales et homogalacturonanes

Le thermogramme de titration des pectines de pomme par les procyanidines DP30 (Figure 79a) montre de forts pics exothermiques de l'ordre de -40 kJ/sec suivis par une saturation des sites de liaisons.

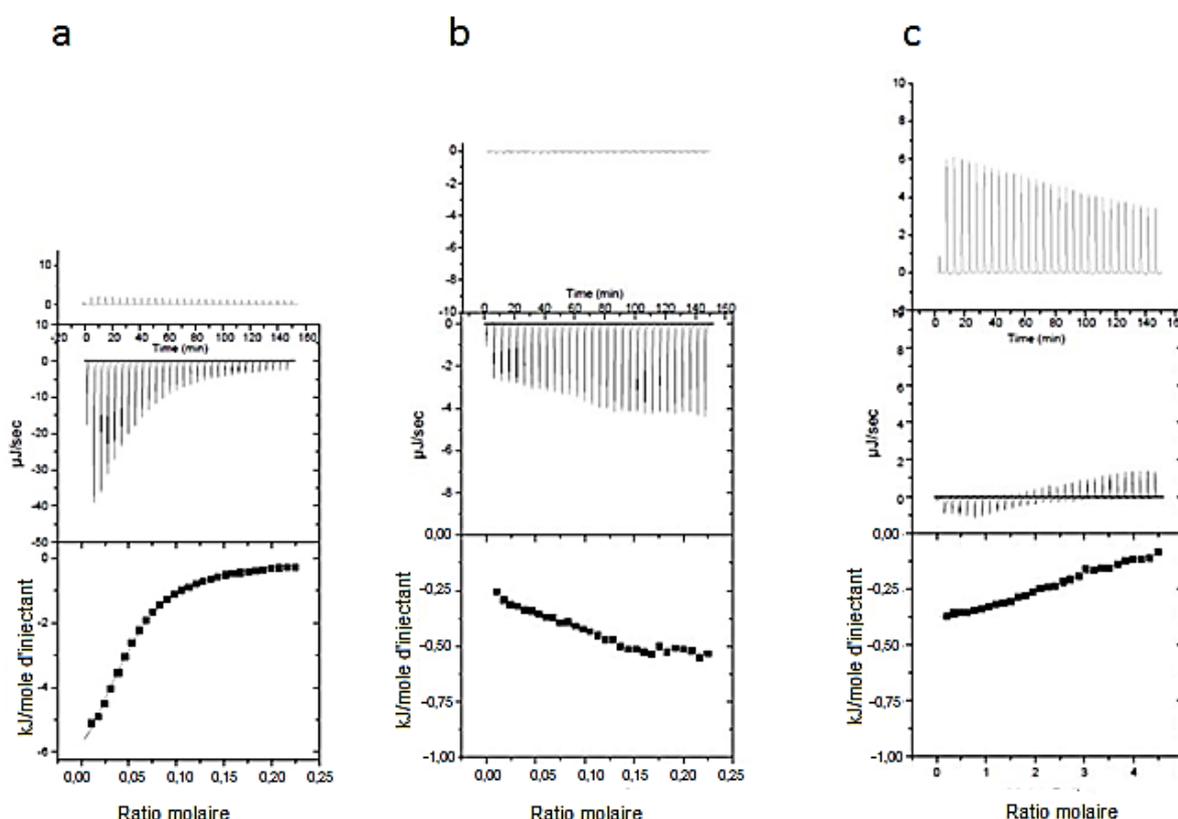


Figure 79 : Thermogrammes de titration de (a) pectines de pomme et de (b) HG 70% à 30 mmol/L (en équivalent acide galacturonique) par les procyanidines DP30 à 30 mmol/L (en équivalent (-)-épicatechine) et (c) HG 70% à 3 mmol/L (en équivalent acide galacturonique) par les procyanidines DP30 à 60 mmol/L (en équivalent (-)-épicatechine) dans un tampon citrate/phosphate à pH 3,8 et FI 0,1 mol/L à 25°C.

L'interaction entre les homogalacturonanes déméthylés et les procyanidines DP30 entraîne la formation de pics endothermiques (données non présentées), ce qui signifie qu'aucune titration n'est observée dans ces conditions. En revanche, l'interaction entre les homogalacturonanes faiblement méthylés (HG 30%) et les procyanidines DP30 entraîne la

formation de pics exothermiques de l'ordre de $-1,5 \mu\text{J}/\text{sec}$ avec une saturation des sites de liaisons (thermogramme non présenté). L'interaction entre les homogalacturonanes hautement méthylés (HG 70%) et les procyanidines DP30 dans les mêmes conditions que les fractions précédentes (Figure 79b) entraîne la formation de pics exothermiques entre -2 et $-3 \text{ kJ}/\text{sec}$, sans saturation des sites de liaisons. Après changement de concentrations des deux partenaires, une titration est obtenue (Figure 79c). Après ajustement de toutes ces titrations, des paramètres thermodynamiques ont été définis et sont présentés dans le Tableau XX.

Tableau XX : Paramètres thermodynamiques de liaisons entre les pectines commerciales et les homogalacturonanes HG 30% à 30 mmol/L (en équivalent acide galacturonique) et les procyanidines DP30 à 30 mmol/L (en équivalent (-)-épicatéchine). HG 70%* : HG 70% à 3 mmol/L en équivalent acide galacturonique et les procyanidines DP30 à 60 mmol/L (en équivalent (-)-épicatéchine) dans un tampon citrate/phosphate à pH 3,8 et FI 0,1 mol/L à 25°C.

Procyanidines DP30	Pectines d'agrumes	Pectines de pomme	HG 30%	HG 70%*
Concentrations (mmol/L)	30	30	30	3
n	10,4	22,7	58,8	0,26
K_a (M^{-1})	1225 ± 61	1460 ± 70	6220 ± 190	421 ± 45
ΔH ($\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$)	-7,2	-7,8	-0,8	-0,4
ΔG ($\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$)	-17,3	-18,1	-21,6	-14,9
ΔS ($\text{J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$)	34,0	34,2	69,9	-48,7

n : stoechiométrie ; K_a : constante d'association ; ΔH : enthalpie ; ΔG : enthalpie libre ; ΔS : entropie.

La stoechiométrie correspondant au ratio (-)-épicatéchine/acide galacturonique des pectines commerciales est de 23 pour les pectines de pomme et de 10 pour les pectines d'agrumes (Tableau XX). En revanche, les constantes d'association sont du même ordre de grandeur pour les deux pectines (10^3 M^{-1}). L'analyse des contributions thermodynamiques indique une contribution de l'enthalpie ($-7 \text{ kJ}/\text{mol}$) ainsi qu'une contribution plus favorable de l'entropie (où $-T\Delta S = -10 \text{ kJ}/\text{mol}$). Ces contributions indiquent que les interactions entre les pectines commerciales et les procyanidines DP30 sont conduites majoritairement par l'entropie, ce qui peut être le résultat d'interactions hydrophobes.

La stoechiométrie de l'interaction entre les homogalacturonanes faiblement méthylés (HG 30%) et les procyanidines DP30 est de 59. En considérant que la longueur moyenne de la

chaîne d'homogalacturonane est de 72 à 100 unités d'acide galacturonique (Thibault *et al.*, 1993), un homogalacturonane interagirait donc avec une ou deux procyanidine(s), tandis que une procyanidine peut se lier avec une quantité élevée d'homogalacturonanes. Dans ces conditions d'interaction, la constante d'association est de $6,2 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$, c'est-à-dire cinq fois plus élevée que la constante d'association entre les pectines commerciales et les procyanidines DP30. En revanche, les paramètres thermodynamiques d'association entre les homogalacturonanes hautement méthylés et les procyanidines DP30 ne peuvent pas être comparés à cause des concentrations différentes utilisées. Malgré tout, les procyanidines DP30 semblent réagir plus fortement (compte tenu des pics exothermiques obtenus aux mêmes concentrations (Figure 79b)) avec HG 70% qu'avec HG 30% ou HG 0% montrant un impact du degré de méthylation des pectines sur leur capacité à interagir avec les procyanidines.

3.3.3.2. Fractions pectiques de zones hérissées

Comme avec les procyanidines de DP9, des comportements très variables sont observés entre les procyanidines DP30 et les zones hérissées de pectines (Figure 80).

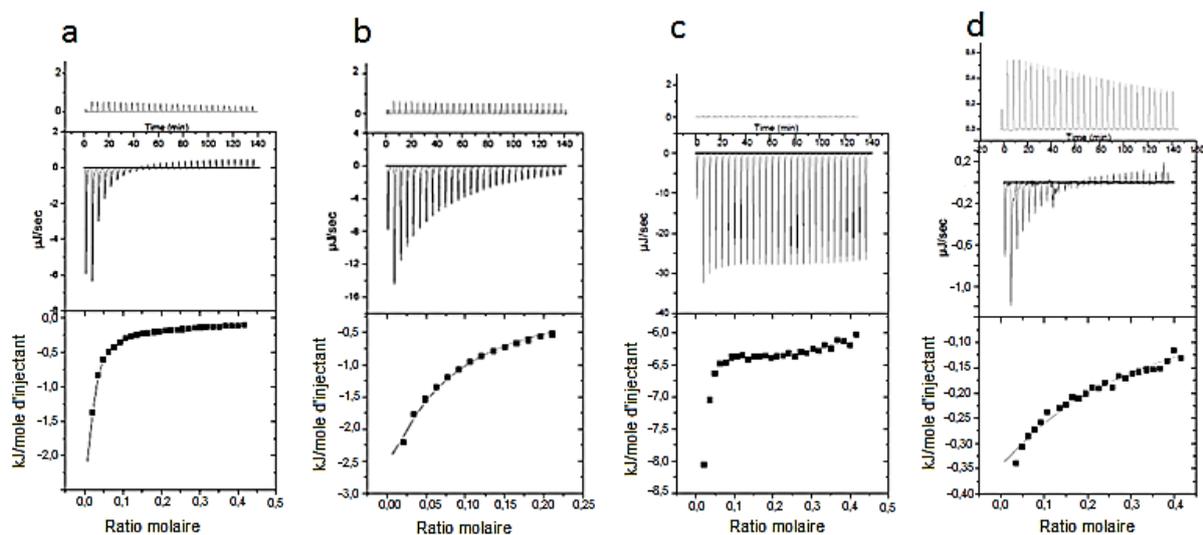


Figure 80 : Thermogrammes de titration de (a) RG; (b) AHR; (c) MHR4 et (d) mRG-II à 3,75 mmol/L (en équivalent acide galacturonique) par les procyanidines DP30 à 7,5 mmol/L (en équivalent (-)-épicatéchine), dans un tampon citrate/phosphate à pH 3,8 et FI 0,1 mol/L à 25°C.

Les titrations de RG (Figure 80a), AHR (Figure 80b), HR-H, MHR1, MHR2 et MHR3 (données non présentées) par les procyanidines DP30 montrent des courbes complexes caractérisées par des pics exothermiques forts entre -6 et -16 $\mu\text{J}/\text{sec}$. De plus, la titration de la fraction MHR4 par les procyanidines DP30 (Figure 80c) montre des pics exothermiques forts (-30 $\mu\text{J}/\text{sec}$) sans titration, même après modification des concentrations. La titration des monomères et dimères de RG-II par les procyanidines DP30 (Figure 80d) montre de faibles pics exothermiques (-1 $\mu\text{J}/\text{sec}$) suivis par la saturation des sites de liaisons. En revanche, cette titration est perturbée par la formation de petites bulles. Suite aux ajustements des données, les paramètres thermodynamiques sont définis et présentés dans le Tableau XXI.

Tableau XXI : Paramètres thermodynamiques de liaisons entre les fractions pectiques de zones hérissées et les procyanidines DP30 dans un tampon citrate/phosphate à pH 3,8 et FI 0,1 mol/L à 25°C.

Procyanidines DP 30	RG	AHR	HR-H	MHR1	MHR2	MHR3	RGII2	RGII3	AGP0	AGP4
<i>n</i>	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
K_a (M^{-1})	2620	574	5390	1835	875	1170	72	62	112	165
\pm	204	46	259	126	54	95	5	4	2	15
ΔH ($\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$)	-3	-17	-4	-7	-24	-41	-16	-14	-54	-31
ΔG ($\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$)	-19	-16	-21	-19	-17	-17	-11	-10	-12	-13
ΔS ($\text{J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$)	56	-4	59	38	-23	-78	-18	-12	-142	-61

n : stoechiométrie ; K_a : constante d'association ; ΔH : enthalpie ; ΔG : enthalpie libre ; ΔS : entropie.

Pour éviter les problèmes d'ajustement, la stoechiométrie est fixée à 0,02 pour toutes les fractions. Pour les fractions pectiques de zones hérissées, les constantes d'association vont de 574 M^{-1} à 5390 M^{-1} dans l'ordre AHR < MHR2 < MHR3 < MHR1 < RG < HR-H. En ce qui concerne les RG-IIs et les AGPs, les constantes d'association sont nettement plus faibles et il semble que la méthode calorimétrique ne soit pas la plus appropriée pour ces faibles associations. Les paramètres thermodynamiques obtenus entre les fractions RG, HR-H et MHR1 et les procyanidines DP30 indiquent une contribution favorable de l'entropie ($-T\Delta S = -16,1, -15,3$ et $-10,4$ kJ/mol respectivement), ce qui impliquerait la formation d'interactions hydrophobes. Cependant, les contributions thermodynamiques des interactions entre AHR, MHR2 et MHR3 et les procyanidines DP30 montrent une très faible entropie, mais une

contribution élevée de l'enthalpie ($\Delta H = -17, -24$ et -41 kJ/mol respectivement), indiquant que les associations impliqueraient des liaisons hydrogènes.

3.4. Discussion : apports de la spectrophotométrie et de l'ITC

Les analyses d'interactions en solution par spectrophotométrie à 650 nm et par calorimétrie de titration isotherme confirment que les procyanidines forment des complexes avec les pectines, les homogalacturonanes et les zones hérissées de pectines. Une contribution favorable de l'entropie suggère que l'interaction est conduite par l'entropie et qu'elle est le résultat d'interactions hydrophobes (Poncet-Legrand *et al.*, 2007 ; Frazier *et al.*, 2010). C'est le cas lors des interactions entre poly-L-proline et une fraction riche en procyanidine (DP4) (Poncet-Legrand *et al.*, 2007). En revanche, la contribution de l'entropie pour les interactions polysaccharides-tannins peut être non seulement liée à l'interaction en elle-même, mais aussi à l'entropie de « solubilisation » des composés, c'est-à-dire à l'expansion des polymères dans le tampon, ou à l'entropie de désolvatation ou de changement de conformations des molécules (Whitesides *et al.*, 2005).

Les interactions détectées par ITC entre les pectines commerciales et les procyanidines de différents degrés de polymérisation sont en accord avec la formation de trouble mesurée par spectrophotométrie. De même, l'absence de titration entre les homogalacturonanes déméthylés et faiblement méthylés et les procyanidines DP9 est en accord avec l'absence de modification de l'absorbance à 650 nm. Cependant, des différences entre les deux méthodes apparaissent pour les homogalacturonanes hautement méthylés et les procyanidines DP9. Dans ce cas, les analyses par ITC ne présentent pas de titration, tandis que l'absorbance à 650 nm augmente avec l'augmentation de la concentration. En revanche, les titrations détectées entre les homogalacturonanes faiblement méthylés et les procyanidines DP30 ne sont pas retrouvées par les mesures d'absorbance. Cela signifie qu'une association apparaît, mais qu'elle n'est pas accompagnée par la formation de trouble ou d'agrégats.

Les procyanidines DP30 présentent une constante d'association similaire ou plus élevée avec les pectines ou les homogalacturonanes respectivement que les procyanidines DP9. Le Bourvellec *et al.* (2012) ont obtenu une constante d'affinité 10 fois plus élevée entre des pectines issues de parois chauffées et des procyanidines de DP 8,7 que celle mesurée ici entre les pectines commerciales et les procyanidines DP9. Les différences observées peuvent provenir de la composition des pectines. Le Bourvellec *et al.* (2012) ont utilisé des pectines

plus riches en oses neutres et principalement en arabinose. Les constantes d'association des pectines commerciales avec les procyanidines DP9 et DP30 sont du même ordre de grandeur qu'entre la sérum albumine bovine (BSA) et les tannins de pépins de raisin ($K_a = 1,5 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$) (Frazier *et al.*, 2010). En revanche, les constantes d'association entre les pectines et les procyanidines DP30 sont légèrement plus faibles que les constantes d'association observées entre des proanthocyanidines de pépins de raisin et la gélatine ou la poly-L-proline ($K_a = 0,2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$) (McRae *et al.*, 2010). Ces interactions pourraient être liées à un effet tannant tout comme dans le cas des interactions entre polyphénols et protéines ou polyphénols et parois cellulaires (Le Bourvellec *et al.*, 2012). Cet effet tannant est fonction à la fois de la présence de groupements fonctionnels capables de former des liaisons hydrogènes ou des interactions hydrophobes avec les macromolécules, mais aussi du poids moléculaire, c'est-à-dire de la taille des polyphénols. Plus les procyanidines sont grandes, plus l'association avec le matériel de paroi cellulaire de pomme (Renard *et al.*, 2001 ; Le Bourvellec *et al.*, 2004 et 2005), de raisin (Bindon *et al.*, 2010) ou avec un peptide riche en proline (Baxter *et al.*, 1997) est forte. Une étude sur les interactions entre des procyanidines et une protéine globulaire (Prigent *et al.*, 2009) a montré que plus le degré de polymérisation des procyanidines est élevé, plus la constante d'association est élevée. Par ailleurs, Poncet-Legrand *et al.* (2006) ont montré que les procyanidines faiblement polymérisées sont plus susceptibles de s'auto-associer que les procyanidines hautement polymérisées, et que cette auto-association limiterait l'association avec d'autres composés comme les pectines. Frazier *et al.* (2010) ont montré que les proanthocyanidines de pépins de raisin en présence de BSA révèlent de faibles associations, qu'ils ont attribuées à un manque de flexibilité des proanthocyanidines. De plus, grâce à la détermination du $\overline{\Delta DPn}$, une sélectivité des pectines et fractions pectiques pour les procyanidines les plus grandes a été démontrée. Cette sélectivité des pectines est plus prononcée pour les procyanidines DP30 du fait de leur polydispersité (Le Bourvellec *et al.*, 2006). Ceci confirme que les complexes formés dépendent de la longueur des procyanidines (Carn *et al.*, 2012). L'efficacité de liaisons des procyanidines vient également du fait que ce sont des ligands multidentés capables de se lier simultanément avec différentes régions de pectines ou de fractions pectiques. Donc, plus le degré de polymérisation est élevé, plus le potentiel de formation de liaisons avec les pectines est élevé.

L'impact du degré de méthylation des homogalacturonanes et des chaînes latérales d'oses neutres des zones hérissées de fractions pectiques sur l'association avec les procyanidines a été montré. Plus le degré de méthylation est élevé, plus l'énergie fournie pendant la titration

est élevée et plus l'association avec les procyanidines est élevée. Ces interactions sont probablement dues à des effets hydrophobes entre les groupements méthyles ou les noyaux pyranes des pectines et les hétérocycles pyranes (noyaux C) des procyanidines. Par ailleurs, Morris *et al.*, (2000) ont montré qu'une augmentation du degré d'estérification entraîne une augmentation de la flexibilité de la chaîne de pectines d'agrume. Ainsi, l'augmentation du degré de méthylation des homogalacturonanes permettrait un meilleur « ajustement » entre les deux molécules. De plus, l'association entre les homogalacturonanes et les procyanidines serait facilitée par la conformation étendue des homogalacturonanes (Perez *et al.*, 2000). Les différences observées entre les pectines de pomme et d'agrume (présentant le même degré de méthylation) pourraient être dues à leur teneur en oses neutres. La pectine d'agrume contient plus de rhamnose que la pectine de pomme, or l'inclusion d'unités de rhamnose dans les chaînes d'acide galacturonique entraîne une légère diminution de la longueur de persistance de la chaîne pectique (dans le cas d'un système modèle de rhamnogalacturonane caractérisé par une séquence strict alternant les résidus de rhamnose et d'acide galacturonique (Cros *et al.*, 1996). Le rhamnose a la capacité de former des « coudes » et une augmentation de la quantité de rhamnose dans les pectines entraîne une augmentation de la flexibilité (Renard *et al.*, 1995). Mis à part le rhamnose, les oses neutres ont tendance à adopter des conformations différentes en solution. La constante d'association entre la fraction HR-H (chaîne de rhamnogalacturonane avec une chaîne latérale de un ou deux oses) et les procyanidines DP30 est élevée et le précipité formé a montré une sélectivité pour les procyanidines hautement polymérisées. La présence de peu de résidus d'oses neutres sur le squelette de rhamnogalacturonane permettrait donc d'expliquer la capacité de cette structure linéaire à « s'empiler » sur les procyanidines. AHR est principalement composée d'une chaîne d'arabinane qui est capable d'adopter une conformation hélicoïdale (Janaswamy et Chandrasekaran, 2005). Ha *et al.* (2005) ont montré que les chaînes d'arabinanes sont généralement plus mobiles que les chaînes de galactanes. Les chaînes de galactanes de type II possèdent des chaînes latérales de β -D-galactane liées en 1,3, qui adoptent une structure hélicoïdale, et des chaînes latérales de β -D-galactane liées en 1,6, qui adoptent une structure linéaire non hélicoïdale (Perez *et al.*, 2000). En ce qui concerne la fraction MHR2, la présence de chaînes d'arabinanes et de galactanes de type II n'entraîne aucune modification de l'association avec les procyanidines par rapport à la fraction AHR. La haute mobilité et la conformation des chaînes d'arabinanes, ainsi que la conformation des zones MHR2 pourraient limiter l'association avec les procyanidines et expliquer les faibles constantes d'association observées entre les fractions AHR et MHR2 et les procyanidines DP30. Les fractions MHR1,

MHR3 et MHR4 caractérisées par des chaînes latérales de galactanes de type I liées en 1,4 s'associent plus fortement avec les procyanidines que les chaînes d'arabinanes (Goubet *et al.*, 1995). De plus, la fraction MHR4, riches en xylogalacturonanes, n'a pas montré de saturation des sites de liaisons, mais un dégagement de chaleur élevé. Malgré l'absence des paramètres thermodynamiques issus de l'association entre cette fraction et les procyanidines DP30, le fort dégagement de chaleur indique que les xylogalacturonanes sont assez flexibles pour s'associer aux procyanidines. Ces structures hautement branchées limitent l'association avec les procyanidines. L'analyse d'interactions entre les RG-II et les procyanidines montre que les RG-II interagissent peu avec les procyanidines. Les résultats obtenus ne sont pas en accord avec le phénomène d'agrégation observé par Riou *et al.* (2002) entre le dimère de RG-II et les tannins. De plus, les résultats obtenus entre AGP0 et les procyanidines DP30 montrent une agrégation par spectrophotométrie, mais rien n'est observé par Riou *et al.* (2002) lors des mesures de diffusion dynamique de la lumière. Le milieu de solubilisation des composés utilisé par Riou *et al.* (2002) a une force ionique différente qui pourrait induire une auto-association plus élevée des procyanidines et limiter l'agrégation avec AGP0 (Poncet-Legendre *et al.*, 2003).

3.5. Conclusion

Les interactions entre fractions pectiques et procyanidines en solution dépendent de facteurs structuraux à la fois des procyanidines tels que la taille et des fractions pectiques tels que la composition en groupements méthyles et en oses neutres, ainsi que de facteurs conformationnels comme la mobilité et la flexibilité des deux types de molécules. En revanche, il semble nécessaire d'approfondir les analyses d'interactions entre les procyanidines et les zones hérissées de pectines avec des fractions de zones hérissées plus homogènes, par exemple avec des chaînes latérales de type arabinanes, galactanes ou des xylogalacturonanes.

4. Interactions entre pectines-procyanidines-anthocyanes

Lors des analyses d'interactions entre les pectines et les anthocyanes et entre les pectines et les procyanidines, il a été montré que certaines associations induisent la formation d'agrégats et de trouble. Cet effet a été observé d'une part entre les homogalacturonanes faiblement méthylés et les anthocyanes de type glucosides et d'autre part entre les homogalacturonanes hautement méthylés ou les pectines commerciales de pomme et les procyanidines DP30. Pour définir quel polyphénol a le plus d'affinité avec les pectines et dans quelles conditions de concentrations ces associations ont lieu, des mesures d'interactions avec les trois composés « en compétition » ont été réalisées par spectrophotométrie UV-visible. Les spectres d'absorbance ont été enregistrés de 300 à 700 nm, afin de comparer les résultats d'absorbance des anthocyanes uniquement à 520 nm, de s'affranchir des variations de l'absorbance à la fois de l'anthocyane et des procyanidines à 280 nm et de suivre la formation d'un précipité ou d'agrégats à 650 nm (car aucun des partenaires n'absorbent à cette longueur d'onde). Afin de simplifier cette étude, les analyses ont été effectuées pour les systèmes suivants :

- Pectines commerciales de pomme/Procyanidines DP30/Delphinidine-3-O-glucoside
- Pectines commerciales de pomme/Procyanidines DP30/Cyanidine-3-O-glucoside
- Homogalacturonanes faiblement méthylés/Procyanidines DP30/Delphinidine-3-O-glucoside
- Homogalacturonanes faiblement méthylés/Procyanidines DP30/Cyanidine-3-O-glucoside

Les pectines ou les homogalacturonanes ont été préparés dans un tampon citrate/phosphate à pH 3,8 et les anthocyanes ont été dissoutes dans un mélange méthanol acidifié par de l'acide chlorhydrique. Toutes les combinaisons possibles ont été réalisées, c'est-à-dire avec ou sans anthocyane, avec ou sans procyanidines et avec ou sans pectines. Ainsi, les mesures d'absorbance obtenues pour les trois composés ont été corrigées en soustrayant les absorbances obtenues avec les pectines et les procyanidines sans anthocyane.

4.1. Interactions entre pectines commerciales de pomme - procyanidines DP30 - anthocyanes

Les données obtenues à 520 nm en fonction à la fois de l'anthocyane utilisée, de la concentration en pectines de pomme et de la concentration en procyanidines sont représentées dans la Figure 81 et la Figure 82. La formation de trouble est montrée à 650 nm dans la Figure 83.

4.1.1. Pectines de pomme-procyanidines DP30- delphinidine glucoside à 520 nm

L'absorbance initiale à 520 nm de la delphinidine-3-O-glucoside (D3G) seule est de 0,7 après soustraction des absorbances du mélange pectines de pomme et procyanidines DP30 à celles obtenues avec les trois composés (Figure 81). L'ajout de pectines de pomme à 3 mmol/L ne modifie pas l'absorbance de la delphinidine, en revanche une concentration en pectines plus élevée à 30 mmol/L entraîne une légère augmentation de l'absorbance, d'environ 0,2, comme observé lors des analyses d'interactions entre les anthocyanes et les pectines (partie Résultats et Discussion Figure 58). Par ailleurs, l'absorbance à 520 nm, en l'absence de pectines, augmente légèrement lorsque la concentration en procyanidine augmente jusqu'à 30 mmol/L. De plus, l'augmentation de l'absorbance de l'anthocyane est plus marquée lorsque les concentrations en procyanidines DP30 et en pectines de pomme augmentent, ce qui pourrait être dû à un effet additionnel ou à une synergie entre les composés. Dans ces différentes conditions, l'absorbance est « maximale » pour le mélange de la delphinidine avec les procyanidines DP30 à 30 mmol/L et avec les pectines de pomme à 3 et 30 mmol/L.

D3G

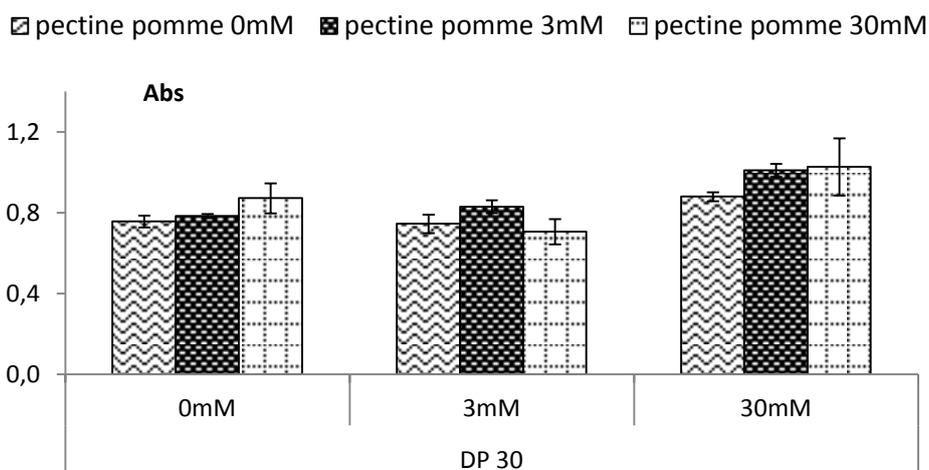


Figure 81 : Absorbance à 520 nm du mélange ternaire entre les pectines commerciales de pomme à différentes concentrations, les procyanidines DP30 à différentes concentrations et la delphinidine-3-O-glucoside (D3G) à 3 mmol/L, après soustraction de l'absorbance du mélange binaire pectines-procyanidines correspondant.

4.1.2. Pectines de pomme - procyanidines DP30 - cyanidine glucoside à 520 nm

L'absorbance à 520 nm de la cyanidine-3-glucoside seule est de 0,5 (Figure 82). Après l'ajout de pectines de pomme, l'absorbance de la cyanidine n'est pas modifiée, ou que très légèrement avec une concentration en pectines de 30 mmol/L. De plus, en absence de pectines, mais avec l'ajout de procyanidines DP30 à la cyanidine, l'absorbance de cette dernière augmente avec l'augmentation de la concentration en procyanidines, jusqu'à un maximum de 0,6 en présence de 30 mmol/L de procyanidines DP30. Dès lors que les trois composés sont ensemble, l'absorbance évolue en fonction des concentrations. Lorsque les pectines, les procyanidines et l'anthocyane sont à une concentration de 3 mmol/L, l'absorbance ne présente pas de différence significative avec l'absorbance de l'anthocyane seule. En revanche, l'augmentation de la concentration en pectines à 30 mmol/L, alors que les concentrations en cyanidine et procyanidines sont de 3 mmol/L, provoque une augmentation de l'absorbance jusqu'à 0,8. A l'inverse, lorsque la concentration en procyanidines est de 30 mmol/L et que les concentrations en pectines et en cyanidine sont de 3 mmol/L, l'absorbance diminue jusqu'à 0,3. Cette diminution de l'absorbance est également observée lorsque les concentrations à la fois des pectines et des procyanidines sont de 30 mmol/L.

C3G

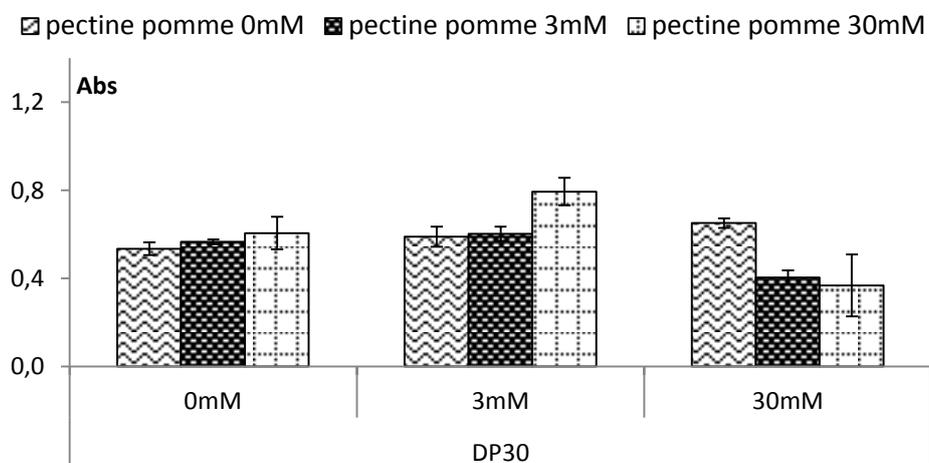


Figure 82 : Absorbance à 520 nm du mélange ternaire entre les pectines commerciales de pomme à différentes concentrations, les procyanidines DP30 à différentes concentrations et la cyanidine-3-O-glucoside (C3G) à 3 mmol/L après soustraction de l'absorbance du mélange binaire pectines-procyanidines correspondant.

4.1.3. Pectines de pomme - procyanidines DP30 - anthocyanes à 650 nm

Les absorbances mesurées à 650 nm des mélanges entre les pectines et les procyanidines DP30 ont été soustraites aux absorbances à 650 nm des mélanges des trois partenaires (Figure 83). Dans le cas des interactions entre les procyanidines DP30 et la delphinidine-3-O-glucoside, l'absorbance à 650 nm n'évolue pas quelle que soit la concentration en procyanidines. Par ailleurs, l'absorbance du mélange ternaire augmente avec l'augmentation de la concentration en pectines de pomme et en présence de 30 mmol/L de procyanidines DP30. Cette augmentation d'absorbance suit la même tendance que l'absorbance à 650 nm du mélange binaire procyanidines DP30 - pectines commerciales mesurée dans la partie 3 (Figure 73). Dans le mélange binaire, un trouble est formé aux concentrations élevées des deux composés et l'ajout de la delphinidine-3-O-glucoside provoque la formation d'agrégats.

Contrairement aux interactions avec la delphinidine-3-O-glucoside, les absorbances à 650 nm en présence de cyanidine-3-O-glucoside sont négatives. Ces valeurs signifient que les absorbances à 650 nm obtenues entre les procyanidines DP30 et les pectines de pomme sont plus élevées que les absorbances en présence de cyanidine. Les absorbances obtenues entre les pectines, les procyanidines et la cyanidine augmentent seulement avec l'augmentation de la concentration en procyanidines DP30 en absence de pectines. En revanche, dans les autres conditions de concentrations, les absorbances n'évoluent pas.

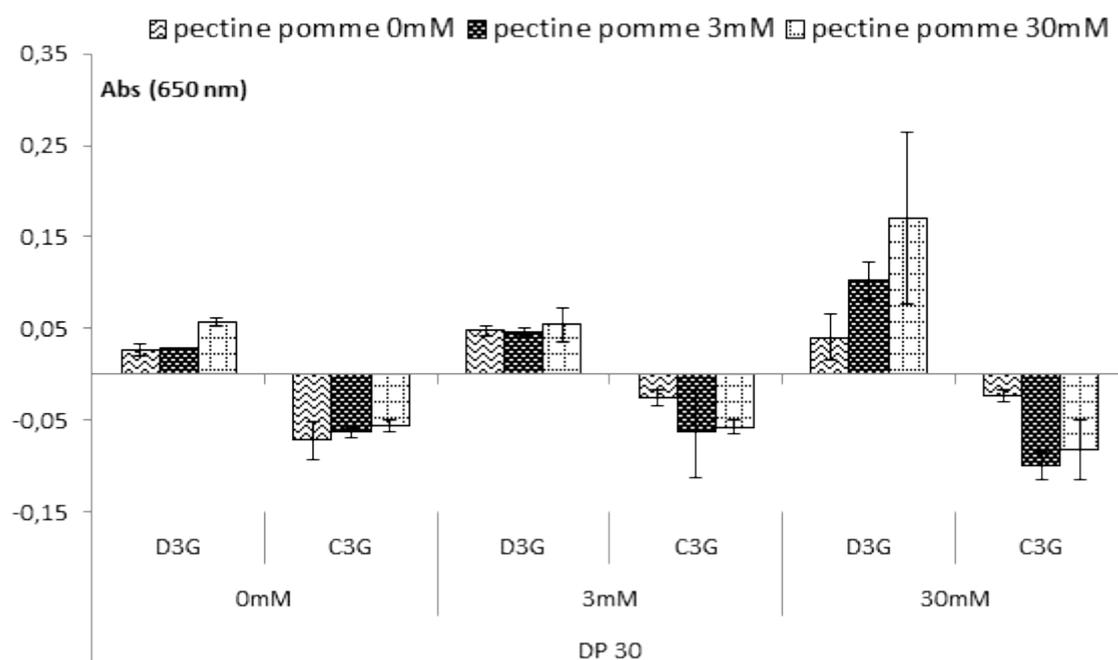


Figure 83 : Absorbance à 650 nm du mélange ternaire entre les pectines commerciales de pomme à différentes concentrations, les procyanidines DP30 à différentes concentrations et la cyanidine ou la delphinidine glucosides (C3G et D3G) à 3 mmol/L corrigée des absorbances du mélange binaire procyanidines-pectines.

4.1.4. Discussion pectines-procyanidines-anthocyanes

Les mesures d'absorbance réalisées à 520 nm, entre les trois composés, sont le reflet de l'intensité de la couleur des anthocyanes. En faisant varier les concentrations en pectines de pomme et en procyanidines DP30, ainsi que le type d'anthocyane, il a été montré que l'intensité de la couleur des anthocyanes est différente entre la delphinidine glucoside et la cyanidine glucoside dans les conditions de concentrations de 30 mmol/L de procyanidines et de 3 et 30 mmol/L de pectines. Lors des essais de compétition avec la delphinidine glucoside,

l'absorbance augmente avec l'augmentation de la concentration en pectines et en procyanidines. En revanche, l'absorbance de la cyanidine glucoside augmente avec l'augmentation de la concentration en pectines jusqu'à la présence de 3 mmol/L de procyanidines, puis diminue à 30 mmol/L de procyanidines. La seule différence est la structure de l'anthocyane : la delphinidine-3-O-glucoside porte trois groupements hydroxyles sur le noyau B, tandis que la cyanidine-3-O-glucoside n'en porte que deux. Tout comme Buchweitz *et al.* (2012a) l'ont montrée, l'intensité de la couleur de la delphinidine-3-O-glucoside est plus forte que celle de la cyanidine-3-O-glucoside en présence de pectines extraites de betterave sucrière. Ainsi, il peut être supposé que l'association entre les procyanidines, les pectines et la delphinidine glucoside soit plutôt due à des liaisons hydrogènes entre les groupements hydroxyles de chaque composé. Dans le cas des associations entre les procyanidines, les pectines et la cyanidine glucoside, les interactions seraient également dues à des liaisons hydrogènes. Par contre, il y aurait une sorte de saturation des sites de liaisons à partir de 30 mmol/L de procyanidines, entraînant du « stacking » et de l'encombrement stérique, à l'origine de la diminution de l'intensité d'absorbance, qui n'est pas inhibée du fait de la présence de seulement deux groupements hydroxyles sur le catéchol de l'anthocyane.

L'augmentation des absorbances à 650 nm du mélange binaire entre les procyanidines DP30 et les pectines commerciales a été reliée à l'apparition d'un trouble (partie 3 Figure 73). Lors des interactions entre les trois partenaires (en présence de delphinidine-3-O-glucoside), des agrégats se sont formés. L'augmentation de l'absorbance à 650 nm est observée uniquement lors des associations entre les pectines de pomme et la delphinidine-3-O-glucoside et en présence des trois partenaires. Cependant, l'absorbance n'évolue pas entre les procyanidines et l'anthocyane, indiquant l'absence de trouble. Cette variation de l'absorbance et donc de la formation d'un trouble, pourrait être expliqué par l'ordre de formation des complexes. Etant donné que l'absorbance à 650 nm augmente avec l'augmentation de la concentration en pectines et après l'ajout de la delphinidine-3-O-glucoside, une hypothèse serait que les complexes entre les procyanidines et les pectines de pomme sont les premiers formés et suite aux ajouts d'anthocyanes un phénomène d'agrégation apparaît.

En revanche, dans le cas des interactions entre les pectines, les procyanidines et la cyanidine-3-O-glucoside, les absorbances à 650 nm étant négatives, il semblerait que les pectines de pomme et les procyanidines forment un trouble qui est inhibé par l'ajout de la cyanidine-3-O-glucoside. Grâce à ce dernier résultat, l'ordre de formation des complexes entre les trois

partenaires semblerait être : tout d'abord la formation d'un complexe entre les pectines et les procyanidines, suivi d'un réarrangement en fonction de l'anthocyane mis à interagir. Ainsi, les mécanismes d'associations entre les trois partenaires pourraient être similaires à ceux proposés par Soares *et al.* (2009) lors de leur analyse entre les protéines, les tannins et les polysaccharides.

4.2. Interactions entre HG 30% - procyanidines DP30 - anthocyanes

La compétition entre les procyanidines et les anthocyanes pour l'association avec les homogalacturonanes faiblement méthylés a été étudiée de la même manière que précédemment. Les données obtenues à 520 nm en fonction à la fois de l'anthocyane utilisée, de la concentration en homogalacturonanes et de la concentration en procyanidines sont représentées dans les Figure 84 et Figure 85. Par ailleurs, l'évolution de l'absorbance à 650 nm est montrée dans la Figure 86.

4.2.1. HG 30% - procyanidines DP30 - delphinidine glucoside à 520 nm

L'absorbance de la delphinidine-3-O-glucoside seule est de 0,7 (Figure 84). L'ajout de procyanidines DP30 à 3 mmol/L et à 30 mmol/L provoque une augmentation de l'absorbance de la delphinidine. En revanche, l'ajout d'homogalacturonanes faiblement méthylés (HG 30%) à 3 et 30 mmol/L ne modifie pas l'absorbance de l'anthocyane. L'absorbance de la delphinidine augmente de façon croissante en fonction de l'augmentation de la concentration en HG 30% et en présence de procyanidines DP30 à 3 mmol/L. Cependant, lorsque la concentration en procyanidines est de 30 mmol/L et que la concentration en HG 30% augmente, l'absorbance à 520 nm décroît. Ainsi, l'absorbance obtenue pour le mélange entre procyanidines DP30 à 30 mmol/L et la delphinidine est de 1, tandis que celle avec les HG 30% à 30 mmol/L est de 0,6.

D3G

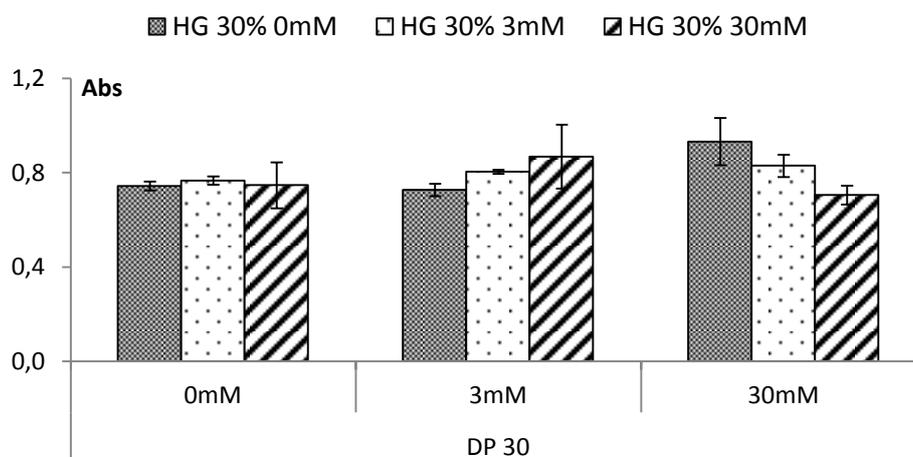


Figure 84 : Absorbance à 520 nm du mélange ternaire entre les homogalacturonanes faiblement méthylés (HG 30%) à différentes concentrations, les procyanidines DP30 à différentes concentrations et la delphinidine-3-glucoside (D3G) à 3 mmol/L, après correction de l'absorbance du mélange binaire HG 30% - procyanidines DP30 correspondant.

4.2.2. HG 30% - procyanidines DP30 - cyanidine glucoside à 520 nm

L'absorbance de la cyanidine-3-glucoside seule est de 0,5 (Figure 85). L'absorbance de l'anthocyane en présence de procyanidines DP30 à 3 mmol/L augmente légèrement par rapport à l'absorbance initiale jusqu'à 0,8 puis diminue à 0,7 en présence de procyanidines DP30 à 30 mmol/L. En revanche, l'absorbance obtenue entre la cyanidine et les homogalacturonanes faiblement méthylés (HG 30%) à 30 mmol/L est de 1 et est plus élevée que l'absorbance initiale. Dès lors que les procyanidines et les homogalacturonanes sont présents à 30 mmol/L avec la cyanidine, l'absorbance est plus élevée que l'absorbance initiale, à 0,9.

C3G

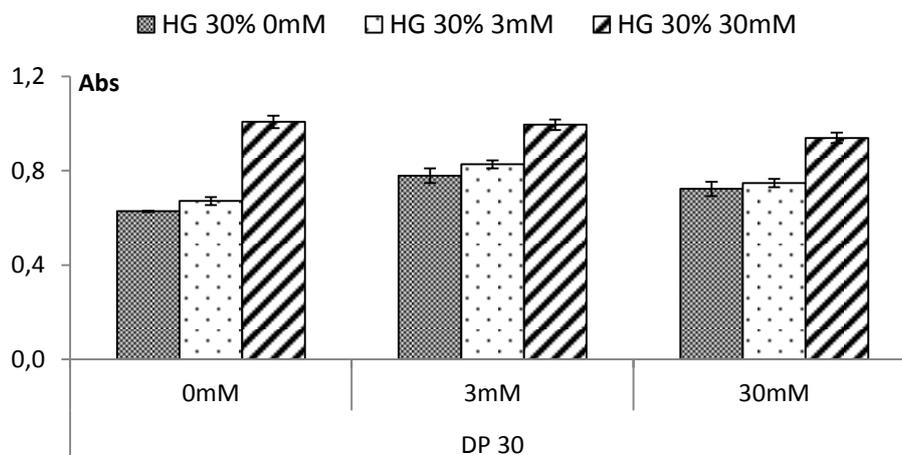


Figure 85 : Absorbance à 520 nm du mélange ternaire entre les homogalacturonanes faiblement méthylés (HG 30%) à différentes concentrations, les procyanidines DP30 à différentes concentrations et la cyanidine-3-glucoside (D3G) à 3 mmol/L, après correction de l'absorbance du mélange binaire HG 30% - procyanidines DP30 correspondant.

4.2.3. HG 30%-procyanidines DP30-anthocyanes à 650 nm

Lors des interactions entre les homogalacturonanes faiblement méthylés (HG 30%) et la delphinidine-3-O-glucoside (Figure 86) et des interactions entre HG 30% et les procyanidines DP30 mesurées dans la partie 3 (Figure 73), l'absorbance à 650 nm n'évolue pratiquement pas quelle que soit la concentration en HG 30%. Par ailleurs, l'absorbance à 650 nm augmente avec l'augmentation de la concentration en procyanidines DP30. Lorsque les trois partenaires sont placés ensemble, l'absorbance à 650 nm devient négative, ce qui indique que l'absorbance entre les HG 30% et les procyanidines DP30 est plus élevée avant l'ajout de delphinidine, même si aucun trouble ni agrégat n'est observé.

Dans le cas des interactions entre les homogalacturonanes HG 30% et la cyanidine-3-O-glucoside (Figure 86), l'absorbance à 650 nm augmente avec l'augmentation de la concentration en HG 30%. Cette évolution de l'absorbance n'est pas observée lors des interactions entre les procyanidines et la cyanidine. L'absorbance augmente après l'ajout des procyanidines DP30 et est plus élevée avec une concentration en HG 30% plus élevée. Cependant, les écarts-types obtenus pour ces absorbances sont élevés, peut-être à cause de la formation d'un trouble, ce qui signifie que les différences observées ne sont pas significatives.

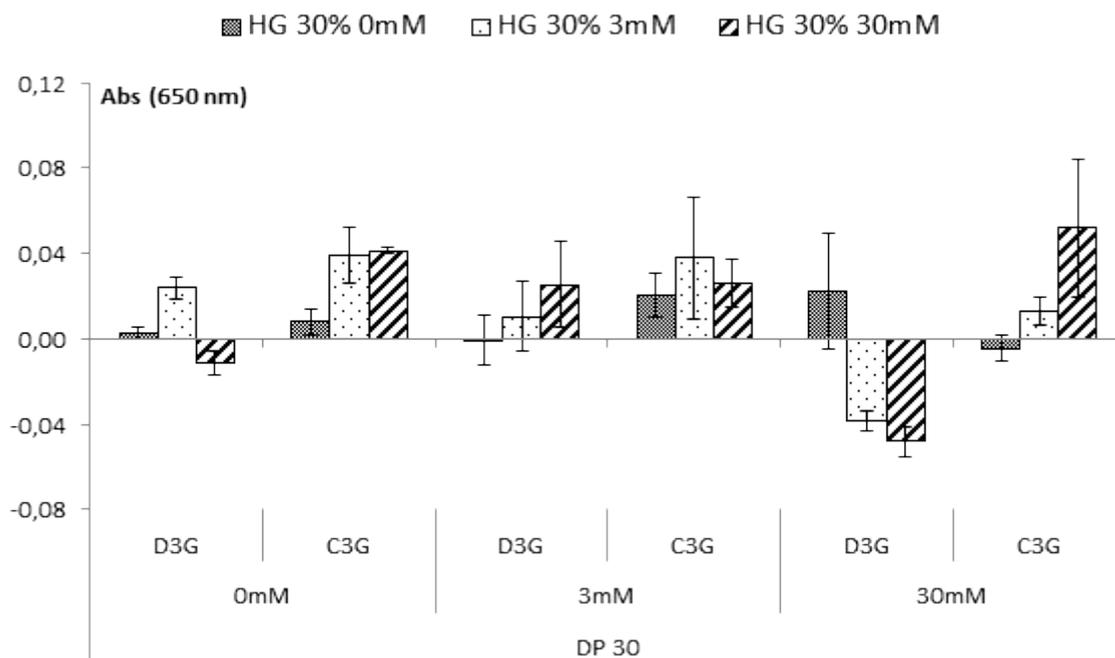


Figure 86 : Absorbance à 650 nm du mélange ternaire entre les homogalacturonanes faiblement méthylés (HG 30%) à différentes concentrations en présence de différentes concentrations de procyanidines DP30 et de cyanidine et de delphinidine glucosides (C3G et D3G) à 3 mmol/L corrigée de l'absorbance du mélange binaire HG 30%-procyanidines DP30.

4.2.4. Discussion HG 30% - procyanidines DP30 - anthocyanes

Comme dit précédemment, l'absorbance mesurée à 520 nm est liée à l'intensité de la couleur de l'anthocyane. Il a été montré que l'absorbance de la delphinidine-3-O-glucoside n'évolue pas en présence uniquement de HG 30%, mais qu'elle augmente avec une augmentation de la concentration en homogalacturonanes faiblement méthylés lorsque la concentration en procyanidines DP30 est de 3 mmol/L. Dès lors que cette concentration est de 30 mmol/L, l'absorbance diminue avec l'augmentation de la concentration en homogalacturonanes. Dans le cas de la cyanidine-3-O-glucoside, l'absorbance à 520 nm augmente avec l'augmentation de la concentration à la fois en procyanidines et en homogalacturonanes. Il semblerait que dans le cas de la delphinidine, la concentration de 3 mmol/L pour chacun des partenaires soit la concentration limite d'interaction « simple », car lorsque les concentrations de procyanidines et d'homogalacturonanes dépassent cette limite, l'intensité diminue, ce qui pourrait être dû à de l'auto-association de la delphinidine (Leydet *et al.*, 2012) ou bien du « stacking » entre les trois composés. En revanche, dans le cas de la cyanidine, il semblerait que les associations soient plutôt « simples » entre les groupements hydroxyles de chaque partenaire.

L'absorbance à 650 nm, utilisée comme une indication de la formation de trouble ou d'agrégats, n'augmente pas en présence uniquement des HG 30% et de la delphinidine-3-O-glucoside contrairement à ce qui se passe en présence des procyanidines DP30 et de la delphinidine. Cependant, l'absorbance diminue après l'association entre ces trois partenaires. Cette diminution pourrait être le résultat d'une inhibition de la formation des complexes entre les procyanidines DP30 et la delphinidine par l'ajout des homogalacturonanes faiblement méthylés ou d'une inhibition de la formation des complexes entre les homogalacturonanes et les procyanidines par l'ajout de delphinidine-3-O-glucoside. Contrairement aux associations avec la delphinidine, les absorbances à 650 nm entre les homogalacturonanes faiblement méthylés et la cyanidine-3-O-glucoside augmentent, ce qui est assimilé à une augmentation de la formation d'un trouble avec l'augmentation de la concentration en HG 30%. En revanche, entre les procyanidines DP30 et la cyanidine, aucun trouble n'apparaît. Lors de l'interaction entre les trois partenaires, la formation de trouble apparaît avec un effet plus marqué avec l'augmentation de la concentration en HG 30%. Ainsi, les mécanismes d'association entre les HG 30%, les procyanidines DP30 et la cyanidine-3-O-glucoside pourrait être une complexation entre les HG 30% et la cyanidine suffisamment forte pour ne pas être modifiée par l'ajout de procyanidines DP30.

4.3. Conclusion

Les interactions entre les pectines commerciales ou les homogalacturonanes faiblement méthylés, les procyanidines DP30 et la delphinidine ou la cyanidine glucosides ont été étudiées. Après avoir fait varier les concentrations et le type de pectines et d'anthocyanes, les résultats diffèrent. Il semble donc que les interactions entre les procyanidines DP30 et la delphinidine glucoside soient favorisées par une augmentation de la concentration en pectines de pomme, mais qu'elles soient « défavorisées » par une augmentation de la concentration en homogalacturonanes faiblement méthylés. A l'inverse, les pectines de pomme semblent limiter les interactions entre les procyanidines DP30 et la cyanidine glucoside, tandis que les homogalacturonanes faiblement méthylés semblerait contribuer aux interactions entre ces 2 partenaires. Deux schémas récapitulatifs et hypothétiques (Figure 87 et Figure 88) des mécanismes d'association entre les pectines de pomme ou les homogalacturonanes avec les procyanidines DP30 et la cyanidine ou la delphinidine glucoside sont présentés.

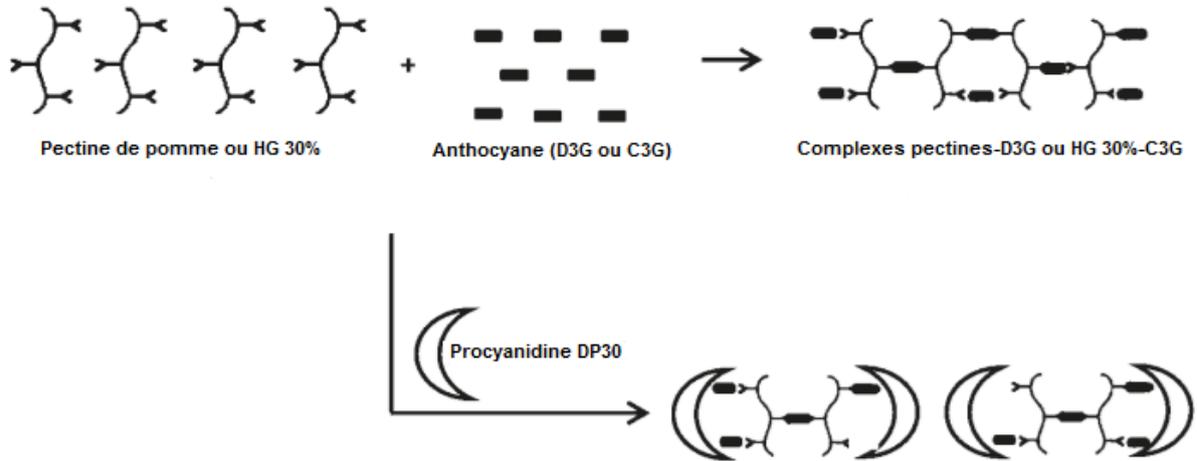


Figure 87 : Schéma hypothétique des mécanismes d'associations entre les procyanidines DP30 et les pectines de pomme et la delphinidine glucoside ou les homogalacturonanes faiblement méthylés et la cyanidine glucoside.

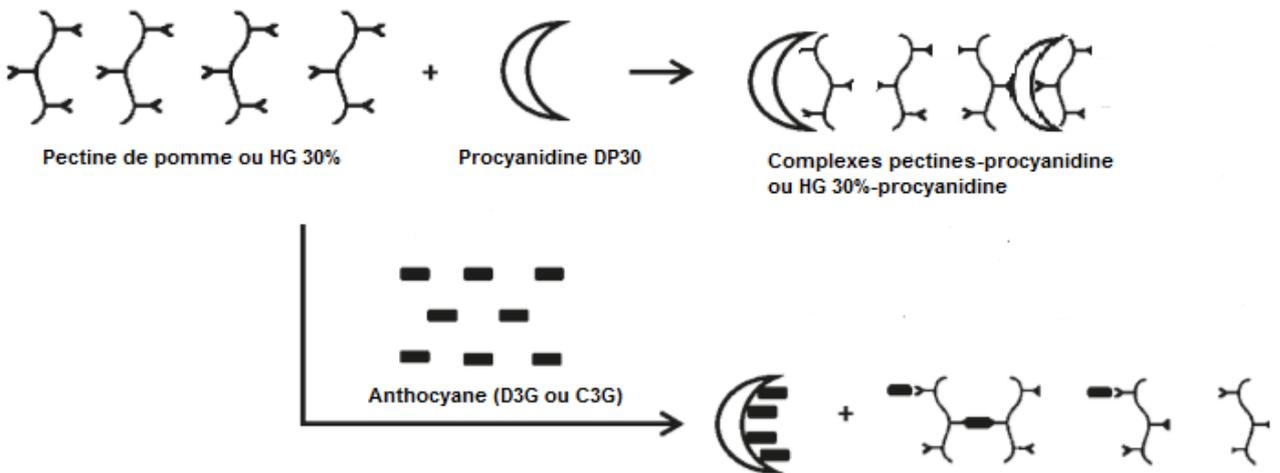


Figure 88 : Schéma hypothétique des mécanismes d'associations entre les procyanidines DP30 et les pectines de pomme et la cyanidine glucoside ou les homogalacturonanes faiblement méthylés et la delphinidine glucoside.

5. Interactions entre procyanidines et pectines sur support solide

Les interactions entre les procyanidines et les pectines commerciales ont été préalablement étudiées selon trois méthodes différentes en solution. Ces analyses ont permis de montrer que les interactions entre ces deux types de composés existent. La technique de résonance plasmonique de surface (RPS) a été choisie préférentiellement à une technique de chromatographie d'affinité car elle permet de définir des paramètres thermodynamiques qui peuvent être utilisés pour la comparaison avec les résultats des essais en solution. Cependant, la résonance plasmonique de surface oblige à immobiliser un des deux composés sur un support solide, or très peu de travaux sont publiés sur l'immobilisation des deux composés étudiés. Seo *et al.* (2007) ont immobilisé des carbohydrates sur une surface d'or nu pour l'étude d'interaction avec une lectine. Douat-Cassassus *et al.*, (2009) ont immobilisé des polyphénols sur une surface pour analyser les interactions avec des protéines. A l'inverse, Gyemant *et al.* (2009) et Guerreiro *et al.* (2012) ont immobilisé une protéine pour l'étude de l'association avec un type de polyphénol. Selon les quelques publications, la fixation d'un des deux composés nécessite une modification chimique préalable, à définir en fonction de la surface utilisée. Pour s'affranchir des possibles interactions entre le dextrane des surfaces de RPS classiques et les polyphénols (McManus *et al.*, 1985), la méthode a été mise en place tout d'abord par l'intermédiaire d'une surface d'or nu. Ainsi, les analyses d'interactions entre les procyanidines et les pectines commerciales de pomme et d'agrumes ont été réalisées sur support solide. Deux types d'approches sont possibles en immobilisant soit la macromolécule de type protéine ou polysaccharide soit la molécule de type polyphénol. Dans cette étude, les deux approches ont été testées :

- par immobilisation des pectines via leur groupement carboxylique libre,
- par immobilisation des procyanidines par leur catéchol modifié présentant un groupement carboxylique libre,
- par immobilisation des procyanidines par leur catéchol modifié présentant un groupement thiol libre.

Cependant, l'existence d'interactions non-spécifiques avec les surfaces nous a conduit à tester différents prétraitements de ces surfaces. De plus, le peu d'antécédents a nécessité l'étude de très nombreux autres paramètres du système de résonance plasmonique de surface tels que la

composition du tampon de course, les niveaux de fixation et de concentration des composés et le choix du régénérant.

5.1. Immobilisation via un acide carboxylique sur une surface d'or

5.1.1. Immobilisation des pectines

Les pectines sont constituées d'un grand nombre d'unités d'acide galacturonique présentant des groupements carboxyliques libres. Guillaumie *et al.* (2002) ont montré diverses méthodes de couplages, comme la formation d'oxime (liaison entre un azote d'une chaîne aminée et un oxygène de l'acide galacturonique) pour immobiliser des fragments de pectines sur une résine PEGA. Par ailleurs, l'immobilisation de composés, autres que des pectines, sur une surface d'or est généralement réalisée par l'intermédiaire de monocouches auto-assemblées c'est-à-dire des longues chaînes alkyles comportant un groupement thiol à une extrémité et une amine à l'autre extrémité (Seo *et al.*, 2007 ; Dutta *et al.*, 2011). Cependant, pour pouvoir contrôler les étapes d'immobilisation par des tests en résonance plasmonique de surface, il a été choisi d'utiliser trois éléments (acide thioglycolique, diamine et pectine). Ainsi, une première étape d'immobilisation d'une courte chaîne alkyle (via l'acide thioglycolique) sur la surface d'or est la seule étape non contrôlée par l'appareil (Ron *et al.*, 1998 ; Briand *et al.*, 2010). En revanche les deux autres étapes, l'ajout d'un linker (la diamine) et de la pectine, ont été suivies par RPS.

Les groupements carboxyliques des pectines de pomme ont été préalablement activés par un mélange EDC/NHS pour pouvoir réagir avec la diamine présente sur la surface d'or comme le montre la figure ci-dessous (Figure 89). L'immobilisation des pectines ainsi que les analyses d'interactions avec les procyanidines DP9 ont été réalisées avec un tampon citrate/phosphate à pH 3,8 et une force ionique (FI) de 0,1 mol/L comme tampon de course.

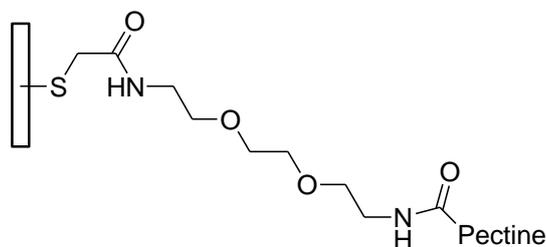


Figure 89 : Schéma d'immobilisation de la pectine commerciale de pomme sur une surface d'or par l'intermédiaire d'un acide thioglycolique et d'une diamine.

Cette immobilisation est contrôlée par les niveaux d'unités de résonance (RU) obtenus après les injections de diamine et de pectine. Sur une même sensorchip d'or, les pectines commerciales de pomme sont immobilisées sur trois pistes à des niveaux de 208 RU (piste 2), 604 RU (piste 3) et 610 RU (piste 4). La piste de référence contient de l'acide thioglycolique (piste 1).

Les mesures d'interactions avec les procyanidines DP9 à 15 nmol/L, 150 nmol/L, 1,5 μ mol/L et 15 μ mol/L montrent une réponse plus élevée avec la piste de référence plutôt qu'avec les pectines de pomme. Ceci pourrait être dû à une interaction entre les procyanidines et les groupements carboxyliques libres de l'acide thioglycolique. Pour vérifier cette hypothèse, une injection de diamine sur la piste de référence est réalisée, ce qui permet l'obtention d'une amine libre sur cette piste de référence, ce qui pourrait limiter l'association des procyanidines. Les mêmes concentrations en procyanidines DP9 ont été injectées sur les 4 pistes. Les procyanidines DP9 montrent une réponse de résonance plus élevée sur la piste de référence (avec amine libre) que sur les pistes contenant les pectines de pomme (Figure 90). La réponse obtenue n'est pas propre aux pectines puisque l'ordre suivant est observé : acide thioglycolique > amine > pectine.

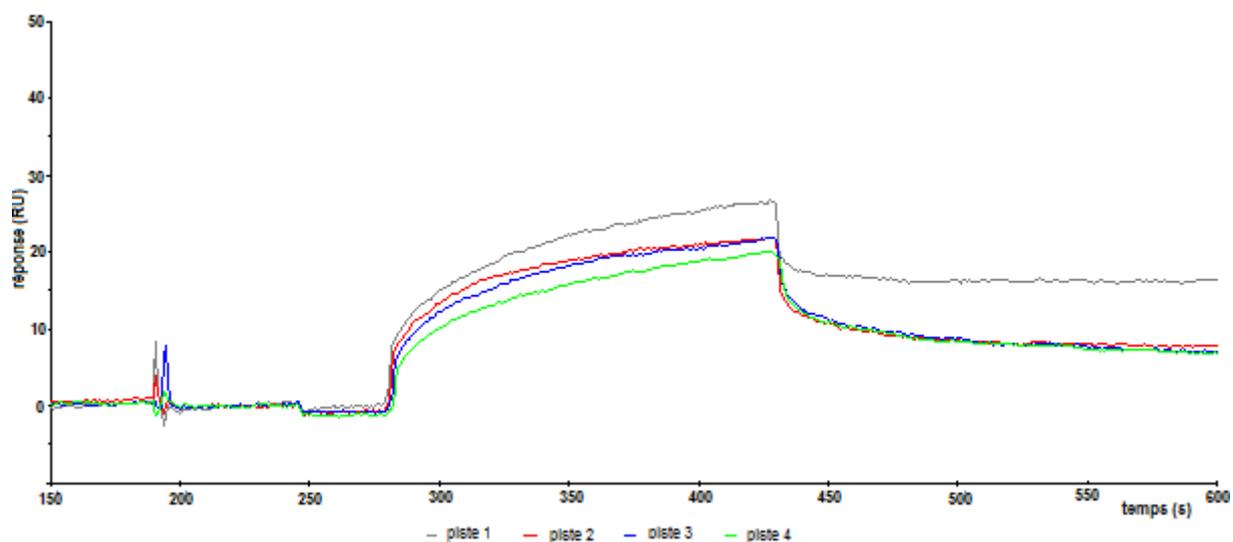


Figure 90 : Sensorgramme d'interactions entre les procyanidines DP9 à 15 nmol/L (en équivalent (-)-épicatéchine) et les pectines (pistes 2 rouge (208 RU), 3 bleu (604 RU) et 4 vert (610 RU)) et la diamine (piste 1 gris) réalisé dans un tampon citrate/phosphate pH 3,8 FI 0,1M à 25°C.

Pour définir les raisons de l'association des procyanidines avec les surfaces d'or recouvertes d'acide thioglycolique ou d'amine, deux types d'essais ont été réalisés. D'une part, la pectine a été remplacée par une molécule pectique plus petite et présentant un plus grand nombre de

groupements carboxyliques : les homogalacturonanes déméthylés (HG 0%), avec un système de capage des groupements amines libres de la piste de référence ; et d'autre part, en mesurant l'intensité de l'association des procyanidines avec des surfaces de différentes natures.

La fraction HG 0% est immobilisée à un niveau de 140 RU sur une piste dans les mêmes conditions que précédemment avec les pectines de pomme ; la piste de référence contient la diamine. Une étape de capage par de l'anhydride acétique sur les amines libres restantes est réalisée sur les deux pistes. Cette étape permet la protection de la fonction amine sous forme d'amide. Enfin, l'analyse d'interaction avec les procyanidines DP9 est réalisée, mais aucune réponse n'apparaît. Ainsi, l'étape de capage a empêché les procyanidines de se fixer, que ce soit sur les homogalacturonanes ou sur les amines.

Pour définir avec quelles surfaces les procyanidines DP9 sont capables d'interagir, des essais d'interactions de ces procyanidines avec des surfaces d'or nu, avec des surfaces avec l'acide thioglycolique et avec des surfaces avec diamine ont été réalisés. Il apparaît que les procyanidines DP9 présentent des réponses élevées quelle que soit la surface. Lorsque 1,5 $\mu\text{mol/L}$ de procyanidines sont injectés, les réponses obtenues sont de 720 RU avec la surface d'or nu, 517 RU avec la surface aminée et 1264 RU avec la surface avec l'acide thioglycolique. Ainsi, il semblerait que dans ce dernier cas, les procyanidines s'associent plus fortement avec les groupements carboxyliques libres qu'avec les amines libres des molécules de petites tailles.

Dans les conditions retenues, les procyanidines montrent de fortes interactions avec les surfaces sans pectines. Cette option n'est donc pas utilisable pour la recherche d'interactions plus ou moins spécifiques entre les deux partenaires. Une autre option est donc d'immobiliser les procyanidines, en espérant que les pectines ne montrent pas à leur tour d'associations avec la piste de référence.

5.1.2. Immobilisation des procyanidines par l'intermédiaire d'un groupement carboxylique

L'immobilisation des polyphénols, préalablement modifiés pour présenter un groupement carboxylique libre, est identique à celle des pectines (Figure 91).

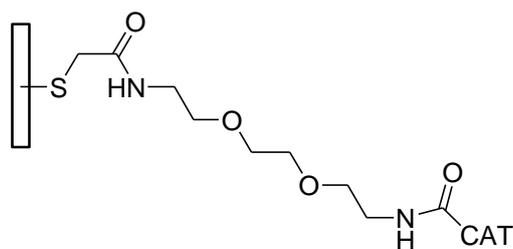


Figure 91 : Schéma d'immobilisation de la (+)-catéchine présentant un groupement carboxylique libre (CAT-POH) sur une surface d'or par l'intermédiaire d'un acide thioglycolique et d'une diamine.

Sur les trois pistes libres, la (+)-catéchine est immobilisée à 70 RU, la (-)-épicatéchine est immobilisée à 250 RU et la procyanidine DP9 est immobilisée à 130 RU. La piste de référence ne contient que de l'acide thioglycolique.

L'analyse d'interactions entre les pectines de pomme à des concentrations variant de 30 nmol/L à 3 µmol/L (en équivalent acide galacturonique) montre une réponse plus élevée entre les pectines de pomme et la piste de référence (l'acide thioglycolique) qu'avec les polyphénols. Ainsi, tout comme pour les interactions non spécifiques obtenues préalablement avec les pectines immobilisées, trois vérifications ont été réalisées concernant la taille des particules, l'activation des surfaces et l'immobilisation. D'une part, la taille des molécules de pectines est peut-être trop élevée ce qui provoque une fixation de celles-ci sur toutes les surfaces. Un essai a donc été réalisé avec des homogalacturonanes déméthylés. D'autre part, des analyses d'interactions sur des surfaces plus ou moins activées sont réalisées pour définir les meilleures conditions d'associations spécifiques. Et enfin, il serait possible que les procyanidines ne soient pas « correctement » immobilisées sur la surface d'or, ce qui nécessite une autre méthode de vérification que la RPS.

Après une étape de régénération de la surface, une nouvelle analyse d'interactions a été réalisée avec les homogalacturonanes déméthylés (HG 0%). Le même résultat apparaît, c'est-à-dire que la réponse de résonance est plus élevée avec la piste de référence qu'avec les polyphénols. Cela signifie que la taille de la molécule de pectine n'est pas le facteur à l'origine de cette association non spécifique. Par conséquent l'analyse de l'association des pectines avec les différents types de surface est nécessaire pour définir quelle peut être la meilleure piste de référence à utiliser (la piste contrôle).

Comme avec les pectines immobilisées, de nouveaux essais ont été réalisés par immobilisation de la diamine sur la piste de référence et différents niveaux d'immobilisation de la procyanidine DP9 sur les autres pistes. Ainsi, la procyanidine DP9 est immobilisée à 51

RU, 62 RU et 75 RU. Les pectines de pomme présentent encore une « affinité » plus élevée pour la piste de référence que pour les procyanidines DP9. Des analyses contrôles d'associations des pectines de pomme sur les différents types de surface de référence, c'est-à-dire sur une surface d'or nu, sur une surface avec l'acide thioglycolique et sur une surface avec la diamine ont été réalisées. Les pectines de pomme à 3 $\mu\text{mol/L}$ (en équivalent acide galacturonique) s'associent plus fortement avec l'acide thioglycolique (94 RU) qu'avec la diamine (62 RU) et qu'avec l'or nu (7 RU). Ainsi, il semble que la piste de référence (contrôle) la plus adaptée pour limiter les associations non spécifiques soit la surface d'or nu sans modification.

Afin de contrôler les étapes d'immobilisation de polyphénols-POH sur la surface d'or nu, une méthode de spectroscopie infrarouge (la PM-IRRAS) a été utilisée. Des surfaces d'or ont été préparées pour chaque étape d'immobilisation (Figure 92) dans les mêmes conditions que pour la résonance plasmonique de surface, c'est-à-dire avec le tampon citrate/phosphate à pH 3,8. Les analyses ont été réalisées par le Dr. Buffeteau. Les spectres réalisés n'ont présenté aucun pic correspondant aux composés immobilisés, et un fin voile blanc est apparu sur les surfaces d'or. L'acide thioglycolique immobilisé sur la surface d'or (Figure 92a) ne présente pas de spectre infrarouge. En effet, l'acide thioglycolique est une petite molécule immobilisée à la surface par le groupement thiol et présente donc une très faible distance entre la surface et l'extrémité de la molécule, ce qui empêche la vérification de son immobilisation. Après immobilisation de la diamine sur l'acide thioglycolique sur une surface d'or (Figure 92b), aucune absorption en infrarouge n'a été obtenue. Or les groupements amides donnent des bandes spectrales fortes et caractéristiques en infrarouge. Et enfin dans le cas de l'immobilisation des procyanidines DP9 (Figure 92c) aucune absorption n'apparaît non plus. Ces résultats montrent qu'aucun des produits n'a été immobilisé sur les surfaces d'or.

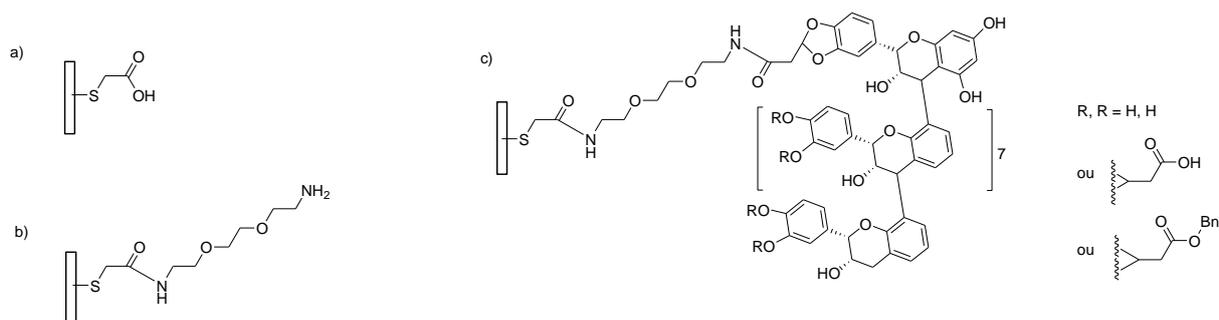


Figure 92 : Structure chimique de a) l'acide thioglycolique, b) la diamine et c) la procyanidine DP9 immobilisés sur trois surfaces d'or.

Seules des suppositions peuvent être formulées : le tampon utilisé (citrate/phosphate) pourrait modifier les étapes d'immobilisation ; la longueur de chaîne serait trop faible entre la surface et l'extrémité des molécules ou un problème de réactivité entre les molécules entraînerait une mauvaise immobilisation.

5.2. Immobilisation via un groupement thiol sur une surface d'or

Afin de limiter les étapes d'immobilisation et aussi de choisir le tampon de course sans engendrer de problèmes pendant cette immobilisation, la modification des polyphénols par un groupement thiol libre à immobiliser en une seule étape sur une surface d'or a semblé le plus adapté.

L'affinité des groupements thiols pour l'or est à l'origine des liaisons thiolates largement utilisées pour la fabrication de monocouches auto-assemblées (SAM) par l'intermédiaire d'alkanethiols ((CH₃)(CH₂)_nSH) par exemple (Lahiri *et al.*, 1999). Les thiols conduisent à la formation de SAM par l'addition oxydante du groupement –SH sur l'or et de l'élimination réductrice de l'hydrogène. L'énergie de la liaison thiolate (RS-Au) est de 40 kcal/mol et l'énergie d'adsorption d'alkanethiols sur l'or serait d'environ -5 kcal/mol, ce qui en fait une réaction spontanée et exothermique (Ulman, 1996). Sur la base de ces informations, l'immobilisation de polyphénols –SH sur des surfaces d'or a été réalisée après la réaction chimique entre des catéchols de procyanidines et un linker thiolé (partie Matériel et Méthodes § 2.2.3.2).

Pour valider l'étape d'immobilisation des polyphénols –SH, la méthode de spectroscopie infrarouge PM-IRRAS a été utilisée. L'immobilisation de la (+)-catéchine –SH (CAT-SH) et celle de la procyanidine DP8 –SH (DP8-SH) ont été réalisées dans les mêmes conditions que par résonance plasmonique de surface, et les surfaces ont été lavées par le tampon HEPES avant les analyses. De plus, les polyphénols avant modification chimique ont été analysés également par infrarouge, pour pouvoir comparer les spectres obtenus (Figure 93).

Les spectres infrarouge des composés natifs ou modifiés permettent la vérification des étapes de modification chimique (Figure 93 colonne de gauche). Les molécules immobilisées étant de taille élevée, il est impossible de définir combien de catéchols ont été modifiés par le linker.

En revanche, ces spectres permettent de vérifier les groupements fonctionnels des polyphénols fixés sur la surface d'or, en particulier les groupements amide (N-H), carboxyle (C=O), carbone-carbone (Figure 94).

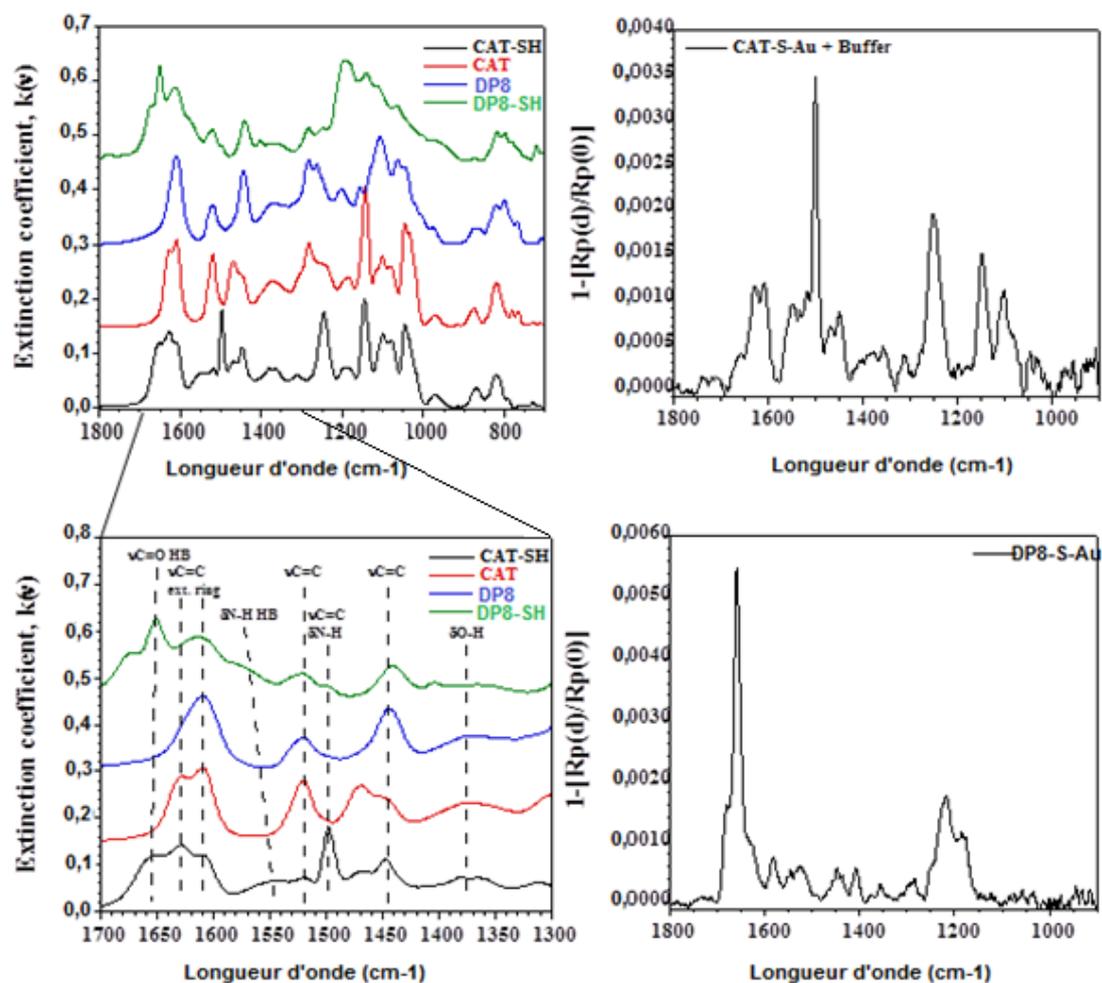


Figure 93 : Spectres ATR et PM-IRRAS des polyphénols seuls ou immobilisés sur une surface d'or respectivement.

A gauche : spectres ATR de la catéchine (CAT), de la catéchine-SH (CAT-SH), de la procyanidine DP8 (DP8) et de la procyanidine DP8-SH (DP8-SH). A droite : spectres PM-IRRAS d'une surface d'or modifiée par CAT-SH et par DP8-SH.

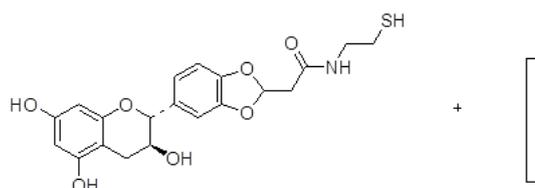


Figure 94 : Structure chimique de la (+)-catéchine modifiée par le linker -SH sur le catéchol, pour l'immobilisation sur une surface d'or (rectangle).

Les spectres de la (+)-catéchine (CAT) et de la procyanidine DP8 (DP8) présentent presque les mêmes bandes, hormis les bandes à 1625 cm^{-1} et à 1470 cm^{-1} absentes pour la procyanidine DP8. Ces bandes correspondant plutôt aux noyaux A semblent ne pas être visibles à cause du degré de polymérisation qui engendre une conformation particulière. Après modification chimique, les bandes correspondant aux groupements amides (N-H à 1500 cm^{-1}) et au groupement C=O (à 1650 cm^{-1}) du linker apparaissent, démontrant une modification chimique correcte.

Après immobilisation de ces deux polyphénols -SH sur une surface d'or, les spectres infrarouge PM-IRRAS obtenus présentent également des bandes correspondant aux composés (Figure 93). Certaines bandes apparaissant dans le cas de la CAT-SH mais n'apparaissent pas dans le cas de la DP8-SH. Ceci s'explique par la taille, la conformation et l'orientation des molécules par rapport à la surface, car seuls les groupements perpendiculaires à la surface sont détectés par PM-IRRAS. Ainsi, l'étape d'immobilisation des deux polyphénols sur une surface d'or est validée par cette méthode infrarouge, ce qui permet de réaliser la même procédure d'immobilisation sur les pistes de la puce de résonance plasmonique de surface pour pouvoir observer les interactions avec les pectines.

Dans un premier temps, les monomères de flavan-3-ols -SH et les procyanidines DP8 -SH sont immobilisés sur une surface d'or à des quantités comprises entre 1300 et 2100 RU (Figure 95). Le tampon de course (tampon HEPES) est différent de celui utilisé pour les essais réalisés précédemment par RPS, pour limiter les problèmes de formation de voile ou de réaction avec les composés.

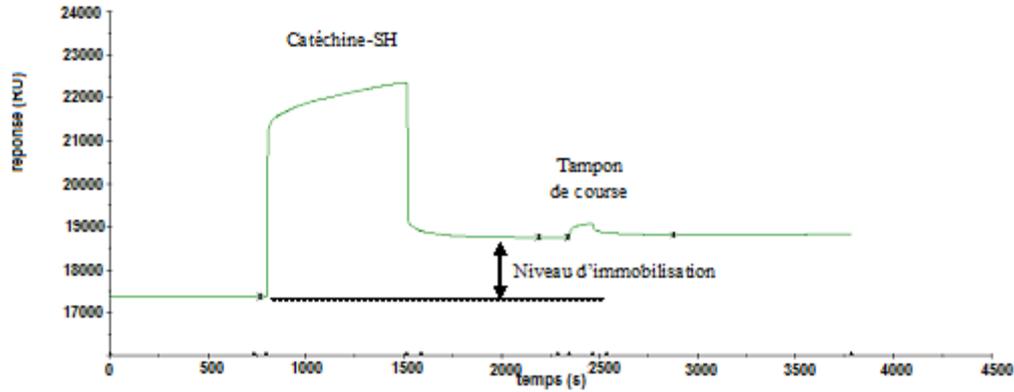


Figure 95 : Immobilisation de la catéchine-SH sur une surface d'or par RPS via un tampon HEPES à 25°C.

Cependant, les essais d'interactions avec les pectines commerciales de pomme et d'homogalacturonanes déméthylés ne donnent toujours pas de résultats positifs. Cette fois après la double correction (après soustraction du tampon du course et de la piste de référence), aucune interaction n'est visible, ni avec la piste de référence ni avec les polyphénols. Le niveau d'immobilisation des polyphénols pourrait donc être trop élevé pour obtenir une interaction ou être à l'origine d'un encombrement de surface.

Dans un deuxième temps, les polyphénols -SH ont été immobilisés à des quantités comprises entre 70 RU et 90 RU et les analyses d'interactions avec les pectines commerciales ont été réalisées en faisant varier le débit de 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ à 20 $\mu\text{L}/\text{min}$. Aucune interaction n'a été obtenue. La piste de l'adaptation du tampon de course a donc été explorée.

De nouvelles analyses d'interactions entre les pectines commerciales de pomme et les polyphénols ((-)-épicatechine, dimère DP2 et procyanidine DP8) -SH par résonance plasmonique de surface ont été réalisées avec différents tampons de course et de solubilisation des pectines, afin d'identifier les conditions d'interactions optimales. L'utilisation d'un tampon citrate/phosphate à pH 3,8 et une force ionique de 0,1 mol/L ou d'un tampon acide acétique/acétate de sodium à pH 3,6 montre une réponse négative avec des unités de résonance négatives après une double correction (c'est-à-dire après la soustraction des données brutes aux données de la piste de référence et aux données de tampon seul), ce qui signifie que le tampon présente une « interaction » avec les polyphénols immobilisés plus élevée que les pectines de pomme. De plus, les sensorgrammes obtenus avec de l'eau milliQ ou du tampon HBS-EP (HEPES) en tampon de solubilisation des pectines et en tampon de

course présentent des résultats non exploitables. En revanche, les sensorgrammes obtenus avec du tampon HBS-EP (HEPES) en tampon de course et du tampon HBS-EP acidifié à 5% d'acide acétique pour le tampon de solubilisation des pectines montrent un résultat d'interactions faible et exploitable. Afin de valider le résultat, un essai avec une protéine, la sérum albumine bovine (SAB), a été réalisé dans les mêmes conditions.

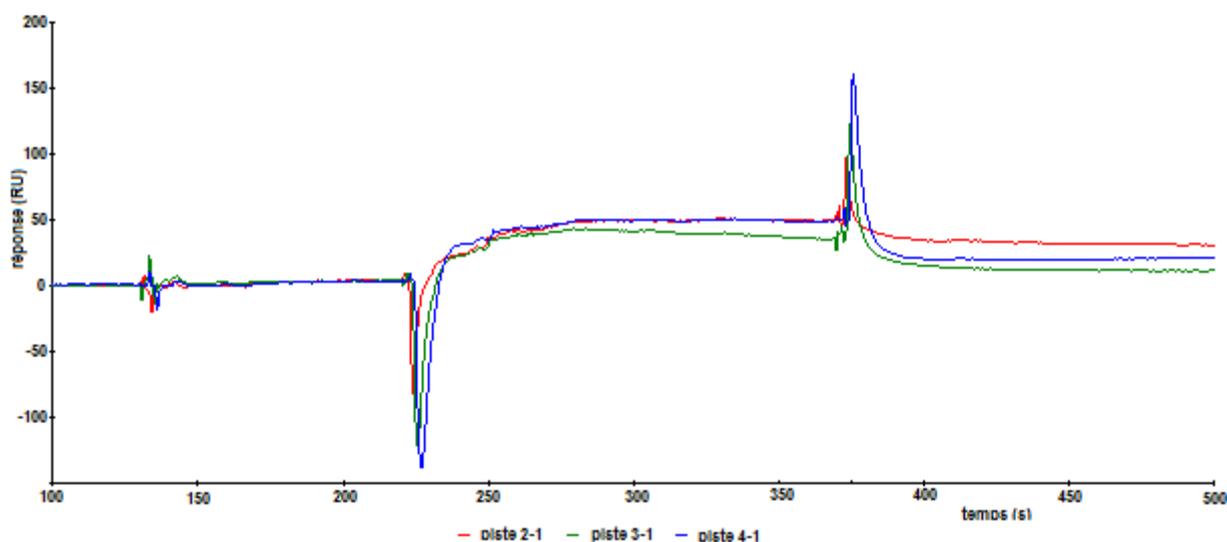


Figure 96 : Sensorgramme d'interaction entre la sérum albumine bovine (SAB) à 10 $\mu\text{mol/L}$ et la (-)-épicatéchine (89 RU piste 2-1 rouge), le dimère DP2 (72 RU piste 3-1 vert) et la procyanidine DP8 (81 RU piste 4-1 bleu), dans un tampon HEPES à 25°C.

La (-)-épicatéchine est immobilisée à 89 RU, le dimère DP2 à 72 RU, la procyanidine DP8 à 81 RU et la piste de référence correspond à la surface d'or nu. Après injection de la SAB, le sensorgramme obtenu après la double correction montre une association entre cette protéine et les trois polyphénols à des niveaux similaires. La SAB semble interagir avec la (-)-épicatéchine et la procyanidine DP8 à 48 RU, tandis qu'avec le dimère, l'association est légèrement plus faible à un niveau de 35 RU. A ce stade, et étant donné les différences de quantités de polyphénols immobilisées, il n'est pas possible de trancher entre les deux hypothèses suivantes : soit la SAB a une affinité différente pour les polyphénols, soit la SAB a une affinité similaire pour tous ces polyphénols mais avec moins de sites disponibles pour le dimère.

Pour clarifier ces suggestions, d'autres niveaux d'immobilisation ont été testés. De nouvelles analyses d'interactions ont été réalisées entre la (-)-épicatéchine immobilisée à 171 RU, le dimère DP2 immobilisé à 121 RU, la procyanidine DP8 immobilisée à 153 RU, et les pectines

de pomme (Figure 97). Les niveaux d'association (en unité de résonance) sont plus faibles avec le dimère B2 qu'avec la (-)-épicatéchine et la procyanidine DP8. Or là encore, la quantité de dimère immobilisée est plus faible que les deux autres polyphénols. En revanche, avec l'augmentation de la concentration en pectine, les niveaux d'interactions sont plus élevés avec la procyanidine DP8 qu'avec la (-)-épicatéchine (Tableau XXII). De plus, la phase de dissociation observée après chaque injection de pectine de pomme est longue et non terminée au bout de 500 secondes.

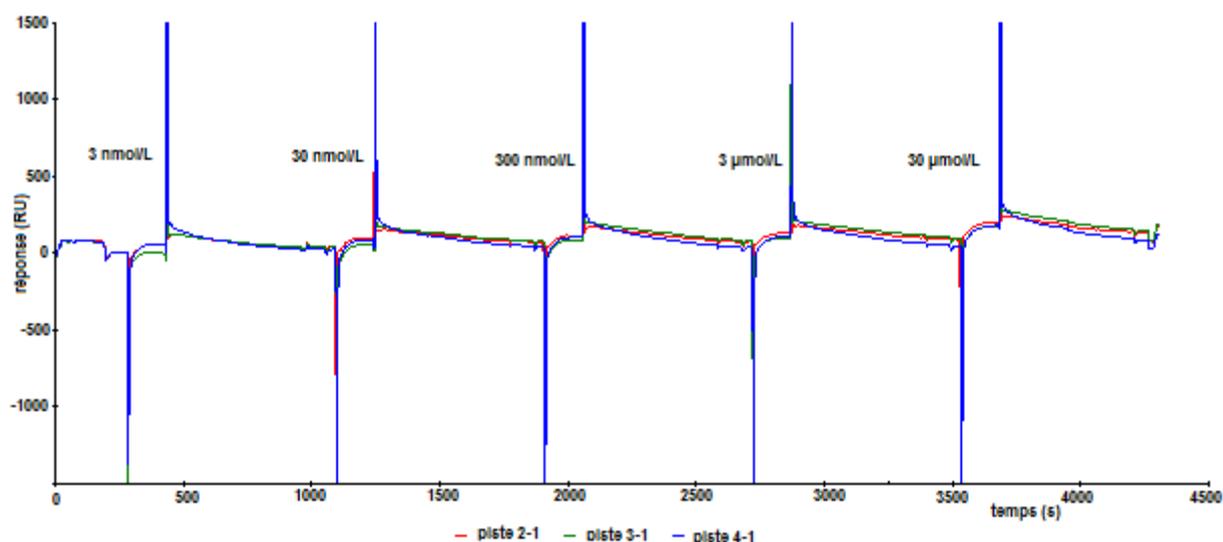


Figure 97 : Sensorgramme d'interaction entre les pectines de pomme à 3, 30, 300 nmol/L, 3 et 30 µmol/L et la (-)-épicatéchine (piste 2-1), le dimère DP2 (piste 3-1) et la procyanidine DP8 (piste 4-1), dans un tampon HEPES à 25°C.

Tableau XXII : Réponse RPS en unités de résonance observée entre les pectines commerciales de pomme de 3 nmol/L à 30 µmol/L et les polyphénols immobilisés.

Pectine de pomme	3 nmol/L	30 nmol/L	300 nmol/L	3 µmol/L	30 µmol/L
EPI-SH (171 RU)	56	55	44	54	110
DP2-SH (121 RU)	0	14	4	17	71
DP8-SH (153 RU)	55	64	67	75	132

Suite à cet essai, de nouvelles analyses d'interactions avec la SAB ont été réalisées. Cependant les résultats obtenus n'ont pas été exploitables, ne présentant aucune interaction. D'autres analytes comme la pectine commerciale d'agrumes et les homogalacturonanes hautement méthylés (HG 70%) ont été utilisés sur la même surface d'or, mais aucune

interaction n'est apparue. Pour vérifier si les problèmes d'interactions sont dus aux analytes eux-mêmes ou à des problèmes d'immobilisation, une analyse d'interactions a été réalisée entre les mêmes polyphénols immobilisés et une protéine salivaire (PRP IB5), connue pour ces interactions élevées avec les polyphénols (Pascal *et al.*, 2007). Aucune interaction n'a été détectée par RPS. La même analyse a été faite sur une surface avec des polyphénols immobilisés en plus faible quantité, mais aucune interaction n'est apparue non plus. Ainsi, deux options ont été envisagées, soit un problème lié à l'immobilisation sur une surface d'or, soit un problème lié au tampon de course utilisé.

5.3. Immobilisation via un groupement thiol sur une surface de carboxyméthyl-dextrane

Afin de choisir entre ces deux hypothèses, les polyphénols –SH ont été immobilisés sur une surface de carboxyméthyl-dextrane (CM5) selon le couplage thiol de GE Healthcare. La piste de référence a subi le même protocole sans polyphénols. Ainsi, la piste de référence contenait du chlorhydrate de 2-(2-pyridinyldithio) éthaneamine (PDEA) saturée par de la cystéine et les autres pistes contenaient de la (-)-épicatéchine à 312 RU, du dimère DP2 à 417 RU et de la procyanidine DP8 à 305 RU. L'analyse d'interactions par la protéine salivaire PRP IB5 a montré une association, mais qui a disparu après la régénération de la surface suivie d'une nouvelle injection de protéine. Cette étape de régénération de la surface a donc également été étudiée.

Après les premiers essais, les surfaces ont été régénérées par une solution de SDS à 0,05%, mais cette solution n'a pas semblé être assez efficace. Une solution de glycine et d'acide chlorhydrique à pH 2 a été utilisée. Les sensorgrammes obtenus après d'autres analyses d'interactions n'ont pas été exploitables. Ainsi une solution de SDS plus concentrée à 0,1% a été utilisée par la suite. De nouvelles analyses d'interactions sur la même surface ont été réalisées avec la PRP IB5 et les sensorgrammes obtenus ont montré une association avec tous les polyphénols mais plus marquée avec le dimère DP2 (Figure 98). Ainsi, il semblerait que les solutions de SDS à 0,05% ou de glycine et d'acide chlorhydrique aient été moins efficaces pour régénérer la surface que le SDS à 0,1%.

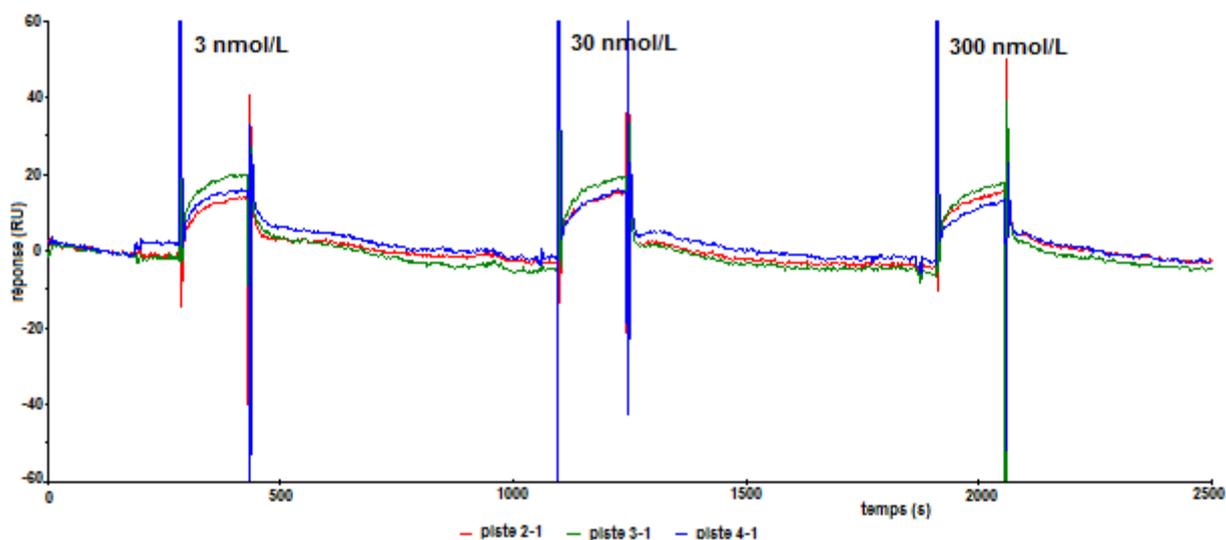


Figure 98 : Sensorgramme d'interaction entre la PRP IB5 à 3, 30 et 300 nmol/L avec la (-)-épicatéchine (piste 2-1 rouge), le dimère DP2 (piste 3-1 vert) et la procyanidine DP8 (piste 4-1 bleu), dans un tampon HEPES à 25°C.

En résumé, les conditions permettant l'étude des associations entre les procyanidines et les pectines sont :

- l'immobilisation des polyphénols via un groupement thiol à de faibles niveaux (aux environs de 60 RU) sur une surface de carboxylméthyl-dextrane,
- l'utilisation du tampon HBS-EP comme tampon de course à 20 $\mu\text{L}/\text{min}$,
- la solubilisation des analytes dans un tampon HBS-EP acidifié à 5% d'acide acétique,
- l'utilisation d'une solution de SDS à 0,1% comme solution régénérante.

5.4. Comparaison des interactions obtenues avec les pectines et les protéines

Suite à cet essai, une analyse d'interactions entre la pectine de pomme et les polyphénols a été réalisée. Le sensorgramme obtenu a été similaire à celui de la protéine salivaire IB5 (Figure 99), avec une association plus marquée avec le dimère DP2, mais une association plus faible lorsque la concentration en pectine était plus élevée.

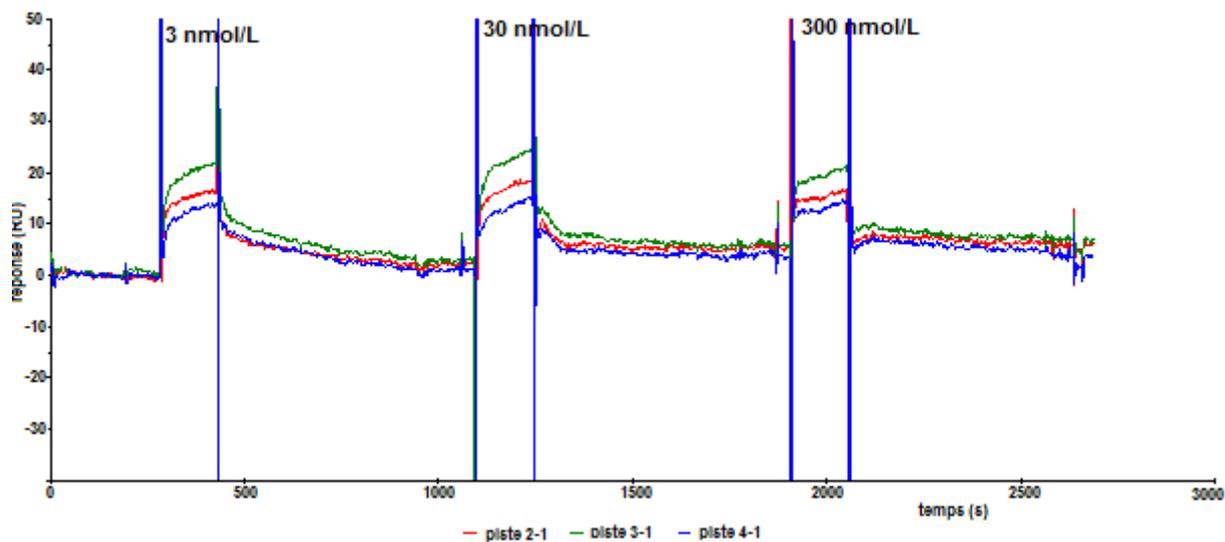


Figure 99 : Sensorgramme d'interactions entre la pectine commerciale de pomme à 3, 30 et 300 nmol/L et la (-)-épicatéchine (piste 2-1 rouge), le dimère DP2 (piste 3-1 vert) et la procyanidine DP8 (piste 4-1 bleu) dans un tampon HEPES à 25°C.

Les analyses d'interactions entre les polyphénols (épicatéchine, dimère et procyanidine), les homogalacturonanes hautement méthylés, les pectines d'agrumes (Figure 100), la sérum albumine bovine (Figure 101 et Figure 102) et la poly-L-proline (Figure 103) ont également été effectuées. Les sensorgrammes obtenus avec la fraction pectique HG 70% n'a pas présenté d'association. En revanche, avec les autres analytes, les associations ont varié.

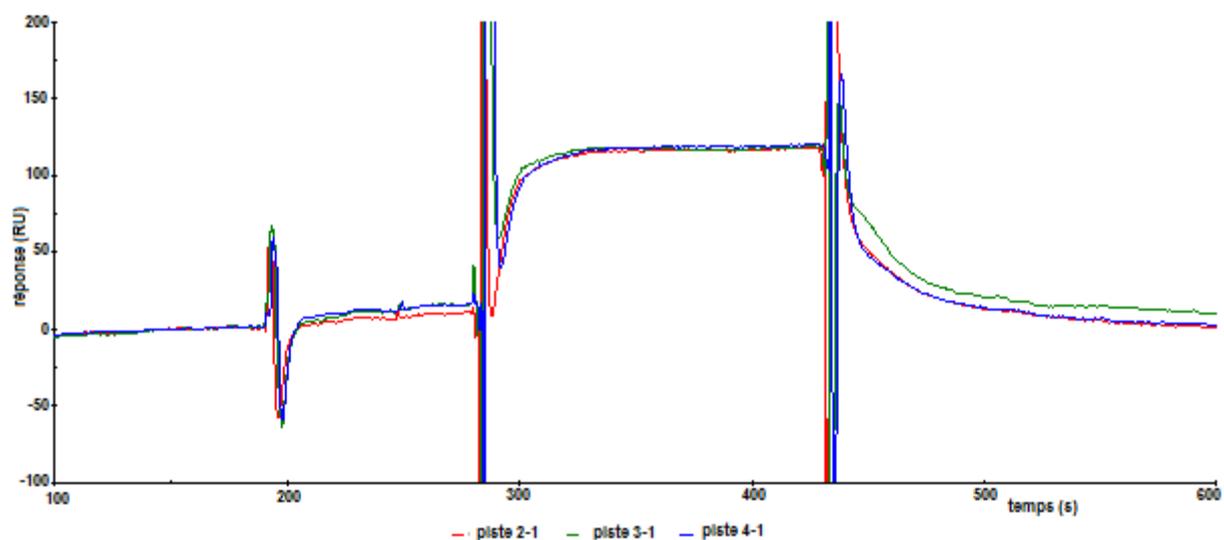


Figure 100 : Sensorgramme d'interactions entre la pectine d'agrumes à 30 nmol/L et la (-)-épicatéchine (piste 2-1 rouge), le dimère DP2 (piste 3-1 vert) et la procyanidine DP8 (piste 4-1 bleu), dans un tampon HEPES à 25°C.

L'interaction entre la pectine d'agrume et les polyphénols (Figure 100) a été plus élevée qu'avec la pectine de pomme. En revanche, aucune différence du niveau d'interaction n'est apparue entre les trois polyphénols (Tableau XXIII).

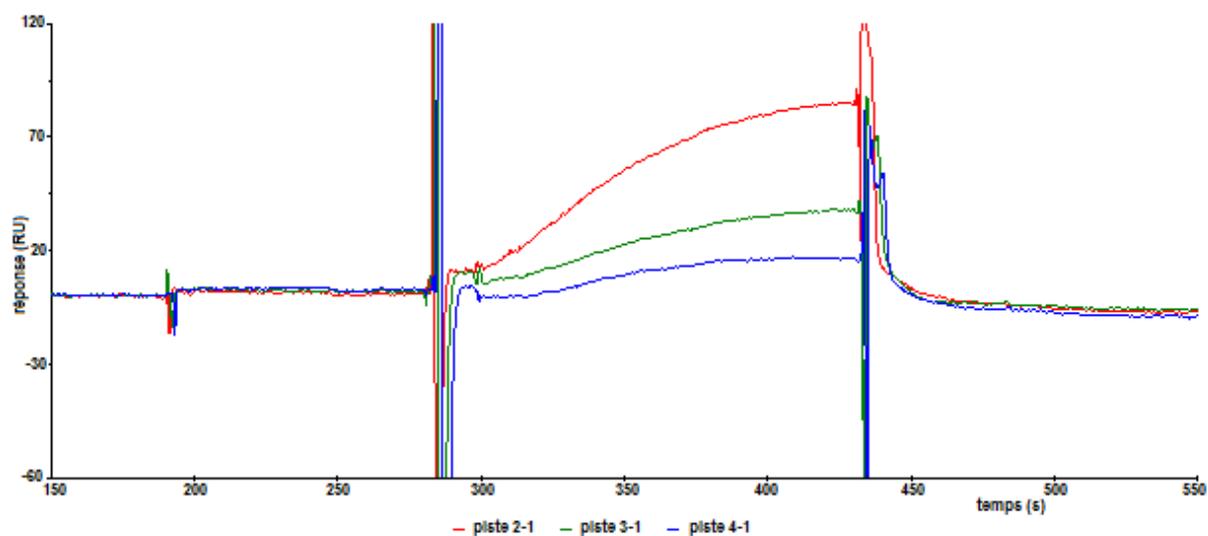


Figure 101 : Sensorgramme d'interactions entre la SAB à 3 nmol/L et la (-)-épicatéchine (piste 2-1 rouge), le dimère DP2 (piste 3-1 vert) et la procyanidine DP8 (piste 4-1 bleu), dans un tampon HEPES à 25°C.

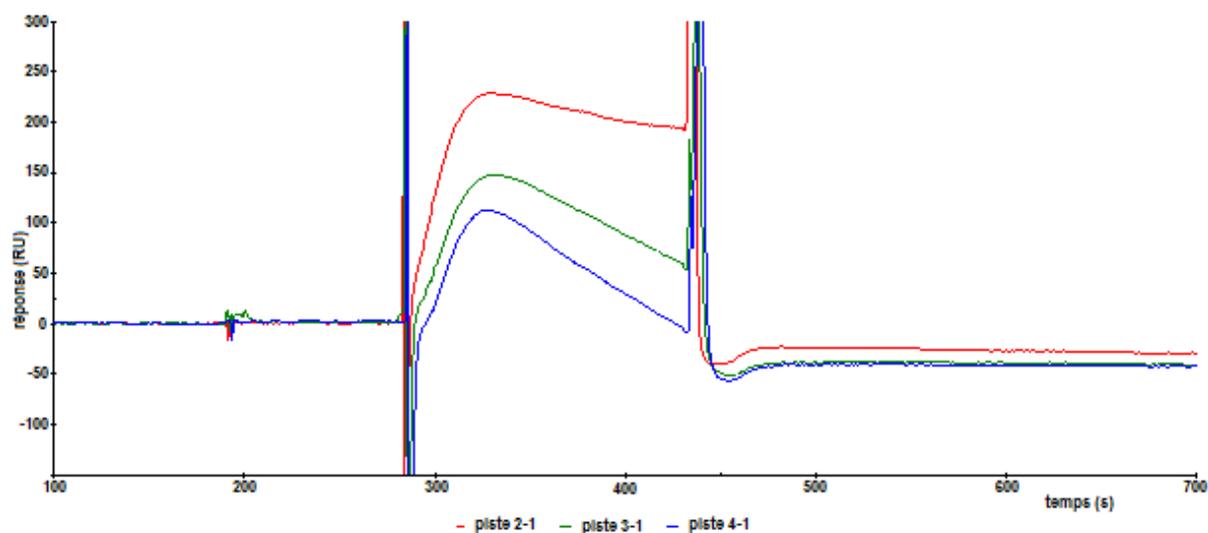


Figure 102 : Sensorgramme d'interactions entre la SAB à 30 nmol/L et la (-)-épicatéchine (piste 2-1 rouge), le dimère DP2 (piste 3-1 vert) et la procyanidine DP8 (piste 4-1 bleu), dans un tampon HEPES à 25°C.

Les sensorgrammes obtenus entre la sérum albumine bovine (SAB) et les polyphénols diffèrent en fonction de la concentration en protéine. A 3 nmol/L de SAB (Figure 101), les sensorgrammes montrent une phase d'association plus élevée avec la (-)-épicatéchine qu'avec le dimère DP2 ou qu'avec la procyanidine DP8. Dès lors que la concentration augmente à 30 nmol/L de SAB (Figure 102), le signal obtenu lors des phases d'associations ne correspond plus à une l'association « simple ». Après l'injection de SAB, le sensorgramme augmente tout d'abord, mais diminue avant la fin de l'injection. C'est pourquoi, dans le tableau récapitulatif (Tableau XXIII), les unités de résonance obtenues entre la SAB à 30 et 300 nmol/L ne sont pas présentées.

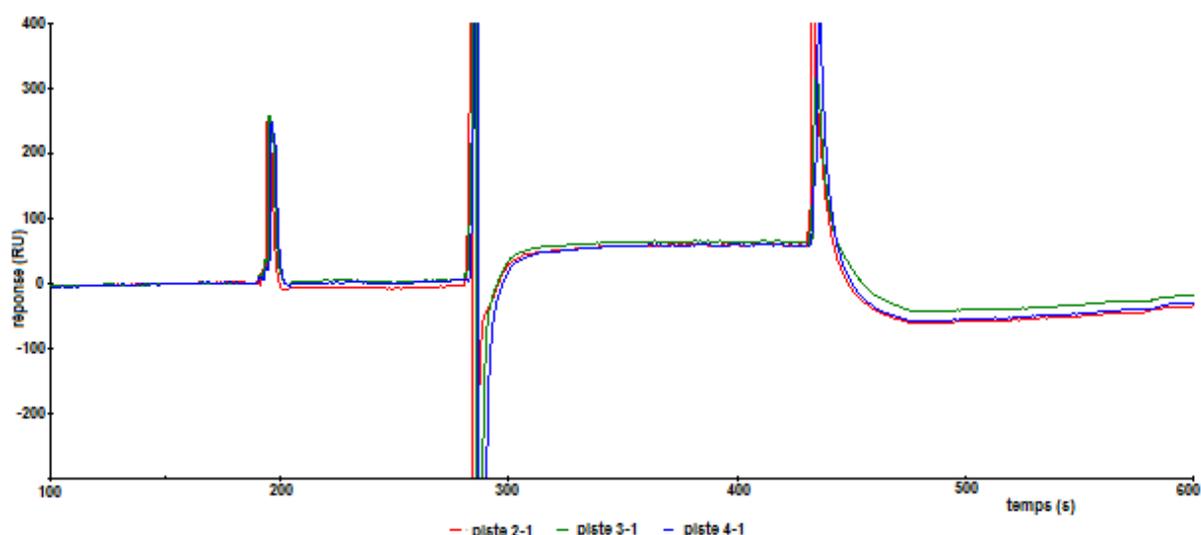


Figure 103 : Sensorgramme d'interactions entre la poly-L-proline à 30 nmol/L et la (-)-épicatéchine (piste 2-1 rouge), le dimère DP2 (piste 3-1 vert) et la procyanidine DP8 (piste 4-1 bleu), dans un tampon HEPES à 25°C.

La détermination des paramètres cinétiques d'association et de dissociation est limitée par les concentrations en analytes utilisés. Les concentrations ont été calculées à partir des unités constitutives, ce qui entraînerait une sur-estimation des valeurs K_a des interactions (Gyemant *et al.*, 2009). Quoi qu'il en soit, les analyses par RPS ont été utilisées pour comparer les capacités de liaisons des différentes molécules.

Un tableau récapitulatif des niveaux d'interactions entre les différents ligands et les analytes en fonction des concentrations injectées est présenté ci-dessous.

Tableau XXIII : Tableau récapitulatif des unités de résonance obtenues après interaction entre les ligands EPI ((-)-épicatéchine), DP2 (dimère DP2) et DP8 (procyanidine DP8) et les analytes à des concentrations de 3, 30 et 300 nmol/L.

Analytes / Ligands	EPI (312 RU)	DP2 (417 RU)	DP8 (305 RU)
Pectine de pomme			
3 nmol/L	16	22	14
30 nmol/L	16	21	14
300 nmol/L	11	15	10
Pectine d'agrumes			
3 nmol/L	61	60	61
30 nmol/L	118	119	120
300 nmol/L	112	121	119
PRP IB5			
3 nmol/L	14	20	16
30 nmol/L	18	24	18
300 nmol/L	19	23	15
Poly-L-proline			
3 nmol/L	-	-	-
30 nmol/L	58	64	58
300 nmol/L	61	58	65
SAB			
3 nmol/L	85	34	17

Les unités de résonance obtenues (Tableau XXIII) après interaction entre les pectines de pomme ou la protéine salivaire IB5 et les trois polyphénols sont similaires, avec une association plus élevée avec le dimère DP2 qu'avec la (-)-épicatéchine ou la procyanidine DP8. En revanche, l'interaction entre les pectines d'agrumes et les polyphénols ne varie pas avec le type de polyphénol. De plus, la poly-L-proline ne s'associe avec les polyphénols qu'à partir d'une concentration de 30 nmol/L. Son affinité (selon les unités de résonance obtenue) semble plus forte pour le dimère DP2 à une concentration de 30 nmol/L et devient plus forte avec la procyanidine DP8 à une concentration de 300 nmol/L.

5.5. Discussion

Les interactions entre des polyphénols et d'autres composés n'ont été que rarement étudiées par résonance plasmonique de surface. La plupart de ces études a été réalisée entre un polyphénol modèle, le pentagalloyl glucose, et des protéines salivaires immobilisées sur une surface de dextrane (Gyemant *et al.*, 2009 ; Guerreiro *et al.*, 2012 ; Kiss *et al.*, 2013 ; Jean-Gilles *et al.*, 2013). Dans un autre cas, les interactions entre les polyphénols et les protéines ont été étudiées par immobilisation d'un polyphénol comme la vescaline sur une surface de dextrane après modification chimique (Douat-Casassus *et al.*, 2009).

L'analyse d'interactions par résonance plasmonique de surface entre des polysaccharides et d'autres composés est encore moins connue. Seule une étude a été réalisée entre des pectines et une protéine immobilisée sur une surface de dextrane (Joergensen *et al.*, 2011) et une autre où les carbohydrates étaient immobilisés sur une surface d'or nu après liaison à un linker pour observer les interactions avec des lectines (Seo *et al.*, 2007). Enfin, une étude a montré les associations entre la β -cyclodextrine (immobilisée sur une surface de dextrane) et des catéchines galloylées et non galloylées (Hayashi *et al.*, 2010).

Pour l'étude des interactions entre les flavan-3-ols ou les procyanidines et les pectines, différents essais ont été réalisés au cours de ce travail. Tout d'abord par immobilisation des pectines sur une surface d'or nu, puis par immobilisation des procyanidines sur le même type de surface, et enfin par immobilisation des procyanidines sur une surface de dextrane. Les étapes d'immobilisation sur une surface d'or nu ont été validées par une méthode de spectroscopie infrarouge (PM-IRRAS). Les analyses d'interactions n'ont pas été probantes dans ces conditions. Par contre, l'immobilisation des procyanidines sur une surface de dextrane a été validée par la résonance plasmonique de surface et par l'utilisation de protéines salivaires présentant des associations fortes avec ces polyphénols. L'association mesurée par microcalorimétrie, entre la sérum albumine bovine (SAB) à 0,05 mmol/L et la (-)-épicatechine présente des constantes d'association de 291 M^{-1} (Frazier *et al.*, 2006). Entre la SAB et des proanthocyanidines de pépins de raisin, la constante est de l'ordre de 10^3 M^{-1} (Frazier *et al.*, 2010). D'autre part, les protéines salivaires riches en proline sont capables de s'associer avec les polyphénols et peuvent former des agrégats (Pascal *et al.*, 2007). La SAB et la protéine PRP IB5 permettent donc de comparer les résultats à ceux obtenus avec des protéines connues pour avoir des affinités faibles ou fortes, respectivement, pour les polyphénols. Dans la partie Discussion générale, les résultats obtenus ont été comparés aux résultats obtenus en solution.

Les associations entre les polyphénols et les protéines de faibles ou de fortes affinités montrent des unités de résonance contradictoires, c'est-à-dire que la réponse en présence de SAB (affinité à priori faible) est plus élevée que celle en présence de la protéine salivaire IB5. Les niveaux de réponse des deux pectines commerciales sont également très différents. Dans le cas de la pectine de pomme, les unités de résonance sont plus élevées en présence de dimère DP2, mais sont assez faibles de l'ordre de 20 RU et n'augmentent pas avec l'augmentation de la concentration en pectine. La réponse en présence de pectine d'agrumes est identique quel que soit le polyphénol et double lorsque la concentration en pectine est

multipliée par 10, entre 3 et 30 nmol/L puis reste similaire à 300 nmol/L. Comme présenté dans le paragraphe 1.1, les pectines commerciales de pomme et d'agrumes diffèrent par leur composition en oses neutres, en particulier par une quantité de rhamnose plus élevée dans la pectine d'agrumes, qui pourrait ainsi adopter une conformation différente et être plus flexible que la pectine de pomme (Renard *et al.*, 1995). Le fait d'obtenir une unité de résonance plus élevée en présence de pectine d'agrumes pourrait être expliqué par un empilement des pectines d'agrumes sur les polyphénols, plutôt que par une interaction proprement dite.

Les unités de résonance sont différentes à la fois en fonction de l'analyte, mais également en fonction du ligand immobilisé. Les unités de résonance sont toujours plus élevées avec le dimère DP2 qu'avec la (-)-épicatéchine ou la procyanidine DP8 (sauf pour la SAB). Ces résultats pourraient être dus au niveau d'immobilisation plus élevé du dimère (à 417 RU) que celui des autres polyphénols (entre 305 et 312 RU), ce qui faciliterait l'association. Cependant, la sérum albumine bovine a une réponse plus élevée avec la (-)-épicatéchine qu'avec le dimère DP2 et la procyanidine DP8. Il ne semble donc pas s'agir d'une relation directe entre le niveau d'immobilisation et l'association. Des problèmes d'encombrement stérique et/ou de mécanisme d'immobilisation pourraient aussi être à l'origine des différences d'affinité observées.

Les polyphénols sont immobilisés par un ou plusieurs catéchols, c'est-à-dire par le noyau B. Pour la (-)-épicatéchine, aucun noyau B n'est disponible pour interagir avec les différents analytes. Ainsi, les associations observées peuvent être dues soit à des liaisons hydrogènes entre les groupements hydroxyles du noyau A ou du carbone 3 et les groupements hydroxyles des pectines ou des protéines, soit à des interactions hydrophobes entre le noyau A ou le cycle pyrane et les groupements méthyles des pectines ou les acides aminés, soit aux deux. Ensuite, le dimère DP2 est immobilisé en plus grande quantité et également par le noyau B d'une unité, le noyau B de l'autre unité restant peut être libre. Ces deux paramètres peuvent être à l'origine d'une association plus élevée avec les pectines dans le cas du dimère que de la (-)-épicatéchine. Enfin, les procyanidines DP8 sont également immobilisées par le noyau B, mais le nombre de noyaux B immobilisés est inconnu. De plus, les procyanidines possédant 7 fois plus d'unités flavan-3-ols que le monomère, leur conformation est différente de celle du monomère ou du dimère, c'est-à-dire qu'elles sont plus rigides (Zanchi *et al.*, 2009) et avec une orientation par rapport à la surface inconnue. Ainsi, la plus faible association des pectines avec les procyanidines DP8 qu'avec les monomères ou dimères pourrait être due à un encombrement stérique au niveau de la surface. Cependant, la protéine PRP IB5, étant

environ 5 fois plus petite que les pectines, pourrait s'associer plus facilement avec les flavan-3-ols des procyanidines DP8 que les pectines. De plus, l'affinité plus faible de PRP IB5 pour le dimère DP2 pourrait être due aux nombres d'unités constitutives plus faibles que les procyanidines DP8. Dans notre étude, il semblerait que les associations ne soient pas corrélées aux nombres de groupements hydroxyles des polyphénols immobilisés, contrairement aux travaux de Jean-Gilles *et al.* (2013), mais plutôt à la forme adoptée par les polyphénols. De plus, parmi les quelques publications sur l'étude des interactions entre polysaccharides et polyphénols par RPS, Hayashi *et al.*, 2010 ont montré que la réponse RPS de catéchines de type gallate pour la β -cyclodextrine est plus élevée que celle des catéchines de type non-gallate.

5.6. Conclusion

L'étude des interactions par résonance plasmonique de surface entre les polyphénols et les pectines a été mise en place et validée. Cependant, cette technique est très délicate à mettre en œuvre, sensible aux conditions expérimentales et requiert de nouveaux essais avec d'autres polyphénols et d'autres fractions pectiques.

6. Discussion générale

6.1. Comparaison des méthodes d'analyse d'interactions

Les interactions entre les procyanidines et les pectines ont été étudiées avec deux systèmes complémentaires : en solution et sur support solide. L'objectif de ces deux systèmes a été de comparer les affinités obtenues entre les procyanidines et les pectines, d'une part, lorsque les deux composés sont en solution, c'est-à-dire sans bloquer les sites préférentiels de fixation et d'autre part, lorsque les procyanidines sont immobilisées sur une surface et les pectines mises à interagir en solution, c'est-à-dire en limitant le nombre et la position des sites de liaisons.

Les interactions entre les monomères, dimères et polymères de flavan-3-ols et les pectines commerciales ou les fractions pectiques ont été déterminées par un système de microcalorimétrie (ITC). Cette méthode a permis de déterminer les paramètres thermodynamiques tels que la stoechiométrie, la constante d'association, l'enthalpie, l'enthalpie libre et l'entropie. Ces derniers paramètres thermodynamiques ont été utilisés pour comprendre le type de liaisons impliquées dans les interactions entre les deux composés. Par ailleurs, les interactions entre un monomère, dimère et un polymère de flavan-3-ols et les pectines commerciales ont également été déterminées par de la résonance plasmonique de surface (RPS). Grâce à cette méthode, les procyanidines ont été immobilisées sur une surface de carboxyméthyl-dextrane suite à une modification chimique d'un ou de plusieurs catéchols. Après interaction avec les pectines commerciales, seules des réponses liées au changement de l'angle de résonance ont été obtenus. Ainsi, seules les affinités, c'est-à-dire les constantes d'association obtenues par ITC et les unités de résonance obtenues par RPS entre les pectines commerciales et la (-)-épicatéchine, le dimère DP2 et la procyanidine DP9 ont pu être comparées.

La microcalorimétrie n'apparaît pas être la méthode appropriée pour des interactions entre le monomère ou le dimère de flavan-3-ols et les pectines commerciales, car ces thermogrammes n'ont pas montré de titration, ce qui peut être dû à de trop faibles énergies d'interactions. Par contre, les associations entre ces deux polyphénols et les pectines commerciales ont été analysées par RPS et les unités de résonance obtenues. De façon générale, en fonction de la concentration en pectines commerciales, les deux types de pectines testées (de pomme et d'agrumes) ont tendance à s'associer plus fortement avec le dimère DP2, qu'avec le monomère

d'(-)-épicatéchine. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que l'ITC se base sur la mesure d'un dégagement ou d'une absorption de chaleur, tandis que la RPS est une technique réfractométrique. Il se peut que durant la titration des pectines par de la (-)-épicatéchine ou le dimère, la chaleur dégagée ou absorbée soit tellement faible qu'elle n'est pas détectée, alors que l'injection de pectines sur une surface d'(-)-épicatéchine ou de dimère engendre la formation d'une couche de pectines et donc un changement élevé de l'angle de la lumière réfractée, qui se traduit par des unités de résonance. Une autre différence majeure entre ces deux méthodes est le fait que dans un cas, les pectines sont titrées par les procyanidines et dans l'autre cas, les pectines sont injectées sur une surface de procyanidines.

Dès lors que la taille de la procyanidine augmente, la titration des pectines commerciales est obtenue et les constantes d'association peuvent être définies par ITC. Dans ce cas la constante d'association est de l'ordre de 10^3 M^{-1} , ce qui est comparable aux associations entre la sérum albumine bovine (SAB) et des proanthocyanidines de pépins de raisin (Frazier *et al.*, 2010). Cependant, les constantes d'affinité n'ont pas été obtenues par RPS car les quantités immobilisées sont contrôlées par des unités de résonance ce qui ne permet pas de définir la concentration impliquée dans les associations, ce qui n'est pas utilisable pour définir des paramètres thermodynamiques et donc pour comparer avec les constantes obtenues par ITC.

Dans le cas des mesures par ITC, les deux composés sont en solution, ce qui entraîne des mesures de dégagement ou d'absorption de chaleur indépendante de la formation d'agrégats ou d'empilement des composés. Par l'intermédiaire de cette technique, tous les types d'interactions peuvent être mesurés y compris des associations non-spécifiques. En revanche, dans le cas de la RPS, le fait qu'un des deux composés soit immobilisé et que le deuxième composé soit injecté sous un flux de tampon implique que les interactions mesurées sont spécifiques.

Ces deux méthodes sont donc à utiliser de manière complémentaire pour définir les interactions entre deux composés de façon spécifique. De plus, la spectrophotométrie permet de définir la formation de trouble ou d'agrégats, ce qui donne une information supplémentaire lors de l'étude des interactions entre des macromolécules. Les avantages et les inconvénients de ces trois méthodes sont présentés dans le Tableau XXIV.

Méthodes utilisées	Avantages	Inconvénients
Spectrophotométrie	Identification de la formation de trouble	Pas de paramètres liés aux interactions (stoechiométrie, association, dissociation)
ITC	Analyse en solution : concentrations connues	Interactions spécifiques et non spécifiques enregistrées
	Analyse d'association	Pas d'analyse de la dissociation
	Stoechiométrie définie	Limite de détection
RPS	Analyse sur support solide en flux de tampon : associations spécifiques	Concentrations immobilisées non connues
	Analyse d'association et de dissociation	Pas de constantes définies
	Pas de limite de détection par rapport à la taille des molécules	Stoechiométrie non définie

Tableau XXIV : Avantages et inconvénients des méthodes utilisées pour l'étude des interactions entre les pectines et les procyanidines.

6.2. Mécanismes d'interactions

Par ailleurs, les résultats obtenus permettent d'avoir une discussion générale sur les mécanismes d'interaction entre les procyanidines et les pectines. Par microcalorimétrie, la détermination de l'enthalpie et de l'entropie a montré que les pectines commerciales interagissent avec les procyanidines à travers des interactions hydrophobes, tout comme les interactions entre des pectines issues de parois chauffées et des procyanidines (Le Bourvellec *et al.*, 2012b). De plus, certaines fractions de zones hérissées issues des pectines s'associent via des liaisons hydrogènes aux procyanidines. Par calorimétrie il a également été montré l'implication à la fois des interactions hydrophobes et des liaisons hydrogènes dans les interactions entre des protéines et des flavan-3-ols (Frazier *et al.*, 2006 ; Poncet-Legrand *et al.*, 2007) Il est à noter que les analyses par ITC sont réalisées en solution et que les interactions peuvent être spécifiques ou non et accompagnées de « stacking ». Par contre, par l'intermédiaire des sensorgrammes d'association et de dissociation obtenus par résonance plasmonique de surface, le type d'interaction entre les pectines et les procyanidines est différent. Les sensorgrammes obtenus entre les pectines et les procyanidines DP8 montrent une phase d'association rapide ainsi qu'une phase de dissociation rapide et complète, signifiant que les liaisons formées sont rompues par le tampon. Il semblerait donc que les liaisons hydrogènes soient majoritairement impliquées dans les associations entre les pectines et les procyanidines. Contrairement à ces observations, Renard *et al.* (2001) ont montré lors

de l'étude des associations entre les procyanidines et les parois végétales par spectrophotométrie UV-visible que la phase d'association est rapide mais que celle de dissociation est d'abord rapide puis lente et finalement incomplète. Ainsi, les interactions entre les procyanidines et les parois végétales seraient dues à des liaisons hydrogènes ainsi qu'à des interactions hydrophobes par encapsulation des procyanidines dans les parois (Le Bourvellec *et al.*, 2005). Ces interactions semblent proches des associations entre les éllagitannins et les protéines (thèse du Dr. Delannoy Lopez), où l'association est rapide mais la phase de dissociation est lente, indiquant l'implication de liaisons hydrogènes et d'interactions hydrophobes.

Conclusions et perspectives

L'association entre les polyphénols et les polysaccharides impacte à la fois la biodisponibilité des polyphénols et l'extractabilité des polysaccharides. Il a été montré que les procyanidines interagissent le plus avec les pectines, or les mécanismes d'interactions ainsi que les effets des pectines sur l'association avec un autre type de polyphénol, les anthocyanes, restent à déterminer.

L'objectif principal de l'étude est de définir le mécanisme d'associations entre les pectines ou les fractions pectiques et les procyanidines par l'intermédiaire de paramètres thermodynamiques, tout en comparant les méthodes d'analyses (en solution et sur support solide). Le deuxième objectif est de définir les interactions possibles entre les pectines ou les fractions pectiques et les anthocyanes et de comprendre comment ces associations ont un impact sur la stabilisation de la couleur des anthocyanes.

✓ La caractérisation des pectines, des anthocyanes et des procyanidines a montré une grande diversité de structures tant au niveau : 1) de la composition osidique et de l'enchaînement des sucres des fractions pectiques, 2) du type de sucre et du nombre de groupements hydroxyles des anthocyanes et 3) des unités constitutives et des degrés de polymérisation des procyanidines.

✓ L'étude des associations entre les fractions pectiques et les anthocyanes a démontré que la stabilisation de la couleur est favorisée par les anthocyanes rutinosides et par les homogalacturonanes quel que soit leur niveau de méthylation. Cette étude a également montré la formation de complexes entre les anthocyanes glucosides et les homogalacturonanes déméthylés. La plupart des études sur les interactions entre les anthocyanes et les polysaccharides ont discuté la présence des groupements hydroxyles ou méthyles du noyau B des anthocyanes (Mazzaracchio *et al.*, 2004 ; Buchweitz *et al.*, 2012a ; Wang *et al.*, 2013), mais peu les groupements glycosyles. Les résultats d'associations obtenus durant cette étude sont contradictoires par rapport à ceux obtenus par Buchweitz *et al.* (2013b), mais leur temps d'analyses est plus long, ce qui peut engendrer des modifications de comportement des composés en solution.

✓ Les interactions entre les procyanidines et les fractions pectiques, en solution, dépendent de la taille des procyanidines et de la composition en oses neutres et en groupements méthyles des fractions pectiques, et donc probablement de la mobilité/flexibilité des deux composés. Ces associations seraient dues à l'implication de liaisons hydrogènes entre les groupements hydroxyles des deux composés et à des interactions hydrophobes entre les groupements méthyles des pectines et les hétérocycles pyranes des procyanidines. Les mécanismes d'associations impliqués entre les pectines et les procyanidines sont les mêmes que ceux des complexes protéines-polyphénols (Poncet-Legrand *et al.*, 2007). Les constantes sont cohérentes avec celles obtenues entre les pectines issues de parois chauffées et les procyanidines (Le Bourvellec *et al.*, 2012b) et du même ordre de grandeur que les associations entre la sérum albumine bovine et les proanthocyanidines de pépins de raisin (Frazier *et al.*, 2010). Ces associations sont non-covalentes et considérées comme faibles (Turnbull et Daranas, 2003).

✓ L'étude de la compétition d'interactions entre les anthocyanes, les procyanidines et les pectines a montré que les pectines favorisent les associations entre les procyanidines hautement polymérisées et la delphinidine-3-O-glucoside, mais limitent celles entre les mêmes procyanidines et la cyanidine-3-O-glucoside, contrairement aux homogalacturonanes faiblement méthylés. Les mécanismes d'interactions entre ces trois composés restent complexes, inconnus et nécessitent un approfondissement.

✓ Les interactions entre les procyanidines et les pectines ont été validées par l'analyse sur support solide, mais les intensités relatives sont différentes de celles obtenues en solution. L'association est plus élevée entre les pectines et le dimère qu'avec les procyanidines et serait due à des liaisons hydrogènes. Cette méthode reste peu utilisée pour les analyses d'interactions entre des macromolécules de type polyphénols-polysaccharides, or elle apporte des informations complémentaires à celles des interactions en solution.

Les conséquences de ces interactions sont technologiques, c'est-à-dire que les procyanidines hautement polymérisées sont retenues par les pectines hautement méthylées présentes dans la paroi de pomme durant la fabrication de jus de pomme, mais également nutritionnelles par une diminution de la bioaccessibilité et de la biodisponibilité des procyanidines. Les pectines

de pomme pourraient être utilisées pour fixer les polyphénols de raisin et être utilisées pour clarifier les vins, avec une sélectivité différente de celle des classiques agents protéiques, comme l'ont montré Guerrero *et al.* (2013) avec des fibres insolubles de pomme. Un des avantages est la vitesse avec laquelle se fait la fixation des procyanidines sur les polysaccharides.

Pour approfondir ces aspects d'interactions entre les polyphénols et les composés pectiques quelques recherches complémentaires pourraient être effectuées :

- ✓ Utiliser des fractions pectiques de zones hérissées plus « simples » c'est-à-dire avec un seul type de chaîne latérale comme des arabinanes, des galactanes, etc... et de faire varier leur structure.

- ✓ Utiliser des anthocyanes diglycosylée et des flavanols avec des groupements galloylés, pour approfondir les relations entre la structure des polyphénols et les interactions.

- ✓ Définir les paramètres thermodynamiques des associations entre les anthocyanes et les fractions pectiques en réalisant la microcalorimétrie pour pouvoir comparer avec les paramètres de liaisons procyanidines-pectines déjà obtenus.

- ✓ Utiliser une méthode de diffusion dynamique de la lumière pour confirmer la formation de complexes colloïdaux observée par spectrophotométrie entre les procyanidines et les pectines.

- ✓ Utiliser la microcalorimétrie en compétition pour mieux définir les associations entre les anthocyanes, les procyanidines et les pectines, ainsi que continuer les analyses par spectrophotométrie en déterminant les changements d'absorbance d'un mélange binaire formé et variable avant et après l'injection d'un troisième composé.

- ✓ Et enfin, utiliser la résonance plasmonique de surface d'une part, avec des unités constitutives de procyanidines et de pectines pour pouvoir définir des paramètres d'association et de dissociation comparables à ceux de la microcalorimétrie, d'autre part, avec des anthocyanes immobilisées pour comparer les associations avec les pectines avec celles des procyanidines.

Références bibliographiques

- Akagawa, M., Ishii, Y., Ishii, T., Shibata, T., Yotsu-Yamashita, M., Suyama, K., & Uchida, K. (2006). Metal-Catalyzed Oxidation of Protein-Bound Dopamine†. *Biochemistry*, 45(50), 15120-15128.
- Albersheim, P., An, J., Freshour, G., Fuller, M. S., Guillen, R., Ham, K. S., ... Whitcombe, A. (1994). Structure and function studies of plant cell wall polysaccharides. *Biochemical Society transactions*, 22(2), 374-378.
- Alonso-Salces, R. M., Korta, E., Barranco, A., Berrueta, L. A., Gallo, B., & Vicente, F. (2001). Determination of Polyphenolic Profiles of Basque Cider Apple Varieties Using Accelerated Solvent Extraction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(8), 3761-3767.
- Alonso-Salces, R. M., Herrero, C., Barranco, A., Berrueta, L. A., Gallo, B., & Vicente, F. (2005). Classification of apple fruits according to their maturity state by the pattern recognition analysis of their polyphenolic compositions. *Food Chemistry*, 93(1), 113-123.
- Alvarez-Parrilla, E., De la Rosa, L. A., Torres-Rivas, F., Rodrigo-Garcia, J., & Gonzalez-Aguilar, G. A. (2005). Complexation of apple antioxidants: Chlorogenic acid, quercetin and rutin by beta-cyclodextrin (beta-CD). *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 53(1-2), 121-129.
- Amiot, M. j., Tacchini, M., Aubert, S., & Nicolas, J. (1992). Phenolic Composition and Browning Susceptibility of Various Apple Cultivars at Maturity. *Journal of Food Science*, 57(4), 958-962.
- Anderson, J. W., Baird, P., Davis Jr, R. H., Ferreri, S., Knudtson, M., Koraym, A., Williams, C. L. (2009). Health benefits of dietary fiber. *Nutrition Reviews*, 67(4), 188-205.

- Appeldoorn, M. M., Vincken, J.-P., Aura, A.-M., Hollman, P. C. H., & Gruppen, H. (2009). Procyanidin Dimers Are Metabolized by Human Microbiota with 2-(3,4-Dihydroxyphenyl)acetic Acid and 5-(3,4-Dihydroxyphenyl)- γ -valerolactone as the Major Metabolites. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(3), 1084-1092.
- Aprikian, O., Duclos, V., Guyot, S., Besson, C., Manach, C., Bernalier, A., ... Demigné, C. (2003). Apple Pectin and a Polyphenol-Rich Apple Concentrate Are More Effective Together Than Separately on Cecal Fermentations and Plasma Lipids in Rats. *The Journal of Nutrition*, 133(6), 1860-1865.
- Arnous, A., & Meyer, A. S. (2009). Quantitative Prediction of Cell Wall Polysaccharide Composition in Grape (*Vitis vinifera* L.) and Apple (*Malus domestica*) Skins from Acid Hydrolysis Monosaccharide Profiles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(9), 3611-3619.
- Aron, P. M., & Kennedy, J. A. (2008). Flavan-3-ols: Nature, occurrence and biological activity. *Molecular Nutrition & Food Research*, 52(1), 79-104.
- Arranz, S., Silván, J. M., & Saura-Calixto, F. (2010). Nonextractable polyphenols, usually ignored, are the major part of dietary polyphenols: a study on the Spanish diet. *Molecular nutrition & food research*, 54(11), 1646-1658.
- Arts, M. J. T. J., Haenen, G. R. M. M., Wilms, L. C., Beetstra, S. A. J. N., Heijnen, C. G. M., Voss, H.-P., & Bast, A. (2002). Interactions between Flavonoids and Proteins: Effect on the Total Antioxidant Capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(5), 1184-1187.
- Asen, S., Stewart, R. N., & Norris, K. H. (1972). Co-pigmentation of anthocyanins in plant tissues and its effect on color. *Phytochemistry*, 11, 1139-1144.

- Axelos, M. A. V., & Thibault, J.-F. (1991). Influence of the substituents of the carboxyl groups and of the rhamnose content on the solution properties and flexibility of pectins. *International Journal of Biological Macromolecules*, 13(2), 77-82.
- Baba, S., Osakabe, N., Natsume, M., & Terao, J. (2002). Absorption and urinary excretion of procyanidin B2 [epicatechin-(4 β -8)-epicatechin] in rats. *Free Radical Biology and Medicine*, 33(1), 142-148.
- Bagchi, D., Sen, C. K., Ray, S. D., Das, D. K., Bagchi, M., Preuss, H. G., & Vinson, J. A. (2003). Molecular mechanisms of cardioprotection by a novel grape seed proanthocyanidin extract. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 523-524, 87-97.
- Bandelet, O. J., Clawson, S. J., & Osheroff, N. (2008). Dietary Polyphenols as Topoisomerase II Poisons: B Ring and C Ring Substituents Determine the Mechanism of Enzyme-Mediated DNA Cleavage Enhancement. *Chemical Research in Toxicology*, 21(6), 1253-1260.
- Bate-Smith, E. C. (1954). Flavonoid Compounds in Foods. In E.M. Mrak and G.F. Stewart (Éd.), *Advances in Food Research* (Vol. Volume 5, p. 261-300). Academic Press.
- Bautista-Ortín, A. B., Martínez-Cutillas, A., Ros-García, J. M., López-Roca, J. M., & Gómez-Plaza, E. (2005). Improving colour extraction and stability in red wines: the use of maceration enzymes and enological tannins. *International Journal of Food Science & Technology*, 40(8), 867-878.
- Baxter, N. J., Lilley, T. H., Haslam, E., & Williamson, M. P. (1997). Multiple Interactions between Polyphenols and a Salivary Proline-Rich Protein Repeat Result in Complexation and Precipitation†. *Biochemistry*, 36(18), 5566-5577.

- Bazzocco, S., Mattila, I., Guyot, S., Renard, C. M. G. C., & Aura, A.-M. (2008). Factors affecting the conversion of apple polyphenols to phenolic acids and fruit matrix to short-chain fatty acids by human faecal microbiota in vitro. *European Journal of Nutrition*, 47(8), 442-452.
- Beart, J. E., Lilley, T. H., & Haslam, E. (1985). Polyphenol interactions. Part 2. Covalent binding of procyanidins to proteins during acid-catalysed decomposition; observations on some polymeric proanthocyanidins. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2*, (9), 1439-1443.
- Bindon, K. A., & Smith, P. A. (2013). Comparison of the affinity and selectivity of insoluble fibres and commercial proteins for wine proanthocyanidins. *Food Chemistry*, 136(2), 917-928.
- Bindon, K. A., Smith, P. A., & Kennedy, J. A. (2010). Interaction between Grape-Derived Proanthocyanidins and Cell Wall Material. 1. Effect on Proanthocyanidin Composition and Molecular Mass. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(4), 2520-2528. doi:10.1021/jf9037453
- Blumenkrantz, N., & Asboe-Hansen, G. (1973). New method for quantitative determination of uronic acids. *Analytical biochemistry*, 54(2).
- Bohin, M. C., Vincken, J.-P., van der Hijden, H. T. W. M., & Gruppen, H. (2012). Efficacy of Food Proteins as Carriers for Flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(16), 4136-4143.
- Borges, G., Degeneve, A., Mullen, W., & Crozier, A. (2010). Identification of Flavonoid and Phenolic Antioxidants in Black Currants, Blueberries, Raspberries, Red Currants, and Cranberries†. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(7), 3901-3909.

- Box, G. E. P., Hunter, W. G., & Hunter, J. S. (1978). *Statistics for experimenters. An introduction to design, data analysis and model building*. Wisconsin Univ., Madison, WI 53706, USA.: John Wiley & Sons.
- Braccini, I., & Pérez, S. (2001). Molecular Basis of Ca²⁺-Induced Gelation in Alginates and Pectins: The Egg-Box Model Revisited. *Biomacromolecules*, 2(4), 1089-1096.
- Brás, N. F., Gonçalves, R., Fernandes, P. A., Mateus, N., Ramos, M. J., & de Freitas, V. (2010). Understanding the Binding of Procyanidins to Pancreatic Elastase by Experimental and Computational Methods. *Biochemistry*, 49(25), 5097-5108.
- Bravo, L. (1998). Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance. *Nutrition Reviews*, 56(11), 317-333.
- Briand, E., Humblot, V., Pradier, C.-M., Kasemo, B., & Svedhem, S. (2010). An OEGylated thiol monolayer for the tethering of liposomes and the study of liposome interactions. *Talanta*, 81(4-5), 1153-1161.
- Brillouet, J.-M., Williams, P., Will, F., Müller, G., & Pellerina, P. (1996). Structural characterization of an apple juice arabinogalactan-protein which aggregates following enzymic dearabinylation. *Carbohydrate Polymers*, 29(3), 271-275.
- Brossaud, F., Cheynier, V., & Noble, A. C. (2001). Bitterness and astringency of grape and wine polyphenols. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 7(1), 33-39.
- Brouillard, R., & Dubois, J.-E. (1977). Mechanism of the structural transformations of anthocyanins in acidic media. *Journal of the American Chemical Society*, 99(5), 1359-1364.
- Brown, L., Rosner, B., Willett, W. W., & Sacks, F. M. (1999). Cholesterol-lowering effects of dietary fiber: a meta-analysis. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 69(1), 30-42.

- Bruyne, T. D., Pieters, L., Deelstra, H., & Vlietinck, A. (1999). Condensed vegetable tannins: Biodiversity in structure and biological activities. *Biochemical Systematics and Ecology*, 27(4), 445-459.
- Buchweitz, M., Carle, R., & Kammerer, D. R. (2012a). Bathochromic and stabilising effects of sugar beet pectin and an isolated pectic fraction on anthocyanins exhibiting pyrogallol and catechol moieties. *Food Chemistry*, 135(4), 3010-3019.
- Buchweitz, M., Nagel, A., Carle, R., & Kammerer, D. R. (2012b). Characterisation of sugar beet pectin fractions providing enhanced stability of anthocyanin-based natural blue food colourants. *Food Chemistry*, 132(4), 1971-1979.
- Buchweitz, M., Speth, M., Kammerer, D. R., & Carle, R. (2013a). Impact of pectin type on the storage stability of black currant (*Ribes nigrum* L.) anthocyanins in pectic model solutions. *Food Chemistry*, 139(1-4), 1168-1178.
- Buchweitz, M., Speth, M., Kammerer, D. R., & Carle, R. (2013b). Stabilisation of strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) anthocyanins by different pectins. *Food Chemistry*, 141(3), 2998-3006.
- Cabrita, L., Fossen, T., & Andersen, Ø. M. (2000). Colour and stability of the six common anthocyanidin 3-glucosides in aqueous solutions. *Food Chemistry*, 68(1), 101-107.
- Cai, Y., Gaffney, S. H., Lilley, T. H., Magnolato, D., Martin, R., Spencer, C. M., & Haslam, E. (1990). Polyphenol interactions. Part 4. Model studies with caffeine and cyclodextrins. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2*, (12), 2197-2209.

- Cala, O., Fabre, S., Pinaud, N., Dufourc, E., Fouquet, E., Laguerre, M., & Pianet, I. (2011). Towards a Molecular Interpretation of Astringency: Synthesis, 3D Structure, Colloidal State, and Human Saliva Protein Recognition of Procyanidins. *Planta Medica*, 77(11), 1116-1122.
- Cala, O., Pinaud, N., Simon, C., Fouquet, E., Laguerre, M., Dufourc, E. J., & Pianet, I. (2010). NMR and molecular modeling of wine tannins binding to saliva proteins: revisiting astringency from molecular and colloidal prospects. *Faseb Journal*, 24(11), 4281-4290.
- Canon, F., Giuliani, A., Paté, F., & Sarni-Manchado, P. (2010). Ability of a salivary intrinsically unstructured protein to bind different tannin targets revealed by mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 398(2), 815-822.
- Canon, F., Paté, F., Meudec, E., Marlin, T., Cheynier, V., Giuliani, A., & Sarni-Manchado, P. (2009). Characterization, stoichiometry, and stability of salivary protein-tannin complexes by ESI-MS and ESI-MS/MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 395(8), 2535-2545.
- Cao, D., Zhang, Y., Zhang, H., Zhong, L., & Qian, X. (2009). Systematic characterization of the covalent interactions between (-)-epigallocatechin gallate and peptides under physiological conditions by mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 23(8), 1147-1157.
- Carn, F., Guyot, S., Baron, A., Perez, J., Buhler, E., & Zanchi, D. (2012). Structural Properties of Colloidal Complexes between Condensed Tannins and Polysaccharide Hyaluronan. *Biomacromolecules*, 13(3), 751-759.

- Carpita, N. C., & Gibeaut, D. M. (1993). Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *The Plant Journal*, 3(1), 1–30.
- Carvalho, E., Mateus, N., Plet, B., Pianet, I., Dufourc, E., & De Freitas, V. (2006a). Influence of Wine Pectic Polysaccharides on the Interactions between Condensed Tannins and Salivary Proteins. *J. Agric. Food Chem.*, 54(23), 8936-8944.
- Carvalho, E., Póvoas, M. J., Mateus, N., & de Freitas, V. (2006b). Application of flow nephelometry to the analysis of the influence of carbohydrates on protein–tannin interactions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86(6), 891–896.
- Castañeda-Ovando, A., Pacheco-Hernández, M. de L., Páez-Hernández, M. E., Rodríguez, J. A., & Galán-Vidal, C. A. (2009). Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry*, 113(4), 859-871.
- Charlton, A. J., Baxter, N. J., Khan, M. L., Moir, A. J. G., Haslam, E., Davies, A. P., & Williamson, M. P. (2002a). Polyphenol/Peptide Binding and Precipitation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(6), 1593-1601.
- Charlton, A. J., Haslam, E., & Williamson, M. P. (2002b). Multiple Conformations of the Proline-Rich Protein/Epigallocatechin Gallate Complex Determined by Time-Averaged Nuclear Overhauser Effects. *Journal of the American Chemical Society*, 124(33), 9899-9905.
- Chassaing, S., Isorez, G., Kueny-Stotz, M., & Brouillard, R. (2008). En route to color-stable pyranoflavylium pigments—a systematic study of the reaction between 5-hydroxy-4-methylflavylium salts and aldehydes. *Tetrahedron Letters*, 49(49), 6999-7004.

- Cheng, X. R., Hau, B. Y. H., Veloso, A. J., Martic, S., Kraatz, H.-B., & Kerman, K. (2013). Surface Plasmon Resonance Imaging of Amyloid- β Aggregation Kinetics in the Presence of Epigallocatechin Gallate and Metals. *Analytical Chemistry*, 85(4), 2049-2055.
- Cheynier, V. (2005). Polyphenols in foods are more complex than often thought. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 81(1), 223S-229S.
- Cheynier, V. F., Trousdale, E. K., Singleton, V. L., Salgues, M. J., & Wylde, R. (1986). Characterization of 2-S-glutathionyl caftaric acid and its hydrolysis in relation to grape wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 34(2), 217-221.
- Chitpan, M., Wang, X., Ho, C.-T., & Huang, Q. (2007). Monitoring the Binding Processes of Black Tea Thearubigin to the Bovine Serum Albumin Surface Using Quartz Crystal Microbalance with Dissipation Monitoring. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(25), 10110-10116.
- Clifford, M. N. (1999). Chlorogenic acids and other cinnamates – nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79(3), 362–372.
- Coenen, G. J. (2007). *Structural characterization of native pectins*. Wageningen, Netherlands: Wageningen Universiteit (Wageningen University).
- Collin, S., Crouzet, J., & francophonie, A. universitaire de la. (2011). *Polyphénols et procédés: Transformation des polyphénols au travers des procédés appliqués à l'agro-alimentaire*. Lavoisier.
- Combo, Ag. M. M.; Aguedo, M.; Paquot, M. (s. d.). Les oligosaccharides pectiques : production et applications possibles.
- Corredig, M., & Wicker, L. (2001). Changes in the molecular weight distribution of three commercial pectins after valve homogenization. *Food Hydrocolloids*, 15(1), 17-23.

- Cosgrove, D. J. (2000). Expansive growth of plant cell walls. *Plant Physiology and Biochemistry*, 38(1–2), 109-124.
- Coyle, C. H., Philips, B. J., Morrisroe, S. N., Chancellor, M. B., & Yoshimura, N. (2008). Antioxidant effects of green tea and its polyphenols on bladder cells. *Life Sciences*, 83(1–2), 12-18.
- Cros, S., Imberty, A., Bouchemal, N., Dupenhoat, C., & Perez, S. (1994). Modeling of Arabinofuranose and Arabinan .2. Nmr and Conformational-Analysis of Arabinobiose and Arabinan. *Biopolymers*, 34(10), 1433-1447.
- Cros, S., Garnier, C., Axelos, M. A. V., Imberty, A., & Pérez, S. (1996). Solution conformations of pectin polysaccharides: Determination of chain characteristics by small angle neutron scattering, viscometry, and molecular modeling. *Biopolymers*, 39(3), 339–351.
- Cueva, C., Sánchez-Patán, F., Monagas, M., Walton, G. E., Gibson, G. R., Martín-Álvarez, P. J., Moreno-Arribas, M. V. (2013). In vitro fermentation of grape seed flavan-3-ol fractions by human faecal microbiota: changes in microbial groups and phenolic metabolites. *FEMS Microbiology Ecology*, 83(3), 792–805.
- Cybulska, J., Vanstreels, E., Ho, Q. T., Courtin, C. M., Craeyveld, V. V., Nicolai, B., ... Konstankiewicz, K. (2010). Mechanical characteristics of artificial cell walls. *Journal of Food Engineering*, 96(2), 287-294.
- Cybulska, J., Zdunek, A., & Konstankiewicz, K. (2011). Calcium effect on mechanical properties of model cell walls and apple tissue. *Journal of Food Engineering*, 102(3), 217-223.

- Da Costa, C. T., Nelson, B. C., Margolis, S. A., & Derek Horton. (1998). Separation of blackcurrant anthocyanins by capillary zone electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 799(1-2), 321-327.
- Daas, P. J. H., Meyer-Hansen, K., Schols, H. A., De Ruiter, G. A., & Voragen, A. G. J. (1999). Investigation of the non-esterified galacturonic acid distribution in pectin with endopolygalacturonase. *Carbohydrate Research*, 318(1-4), 135-145.
- Dangles, O., Stoeckel, C., Wigand, M. C., & Brouillard, R. (1992a). Two very distinct types of anthocyanin complexation: Copigmentation and inclusion. *Tetrahedron Letters*, 33(36), 5227-5230.
- Dangles, O., & Brouillard, R. (1992b). A spectroscopic method based on the anthocyanin copigmentation interaction and applied to the quantitative study of molecular complexes. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2*, (2), 247-257.
- Dangles, O., Saito, N., & Brouillard, R. (1993). Anthocyanin intramolecular copigment effect. *Phytochemistry*, 34(1), 119-124.
- Darvill, A. G., McNeil, M., & Albersheim, P. (1978). Structure of Plant Cell Walls VIII. A New Pectic Polysaccharide. *Plant Physiology*, 62(3), 418-422.
- Darvill, J. E., McNeil, M., Darvill, A. G., & Albersheim, P. (1980). Structure of Plant Cell Walls XI. Glucuronoarabinoxylan, a second hemicellulose in the primary cell walls of suspension-cultured sycamore cells. *Plant Physiology*, 66(6), 1135-1139.
- De Freitas, V. a. P., Glories, Y., Bourgeois, G., & Vitry, C. (1998a). Characterisation of oligomeric and polymeric procyanidins from grape seeds by liquid secondary ion mass spectrometry. *Phytochemistry*, 49(5), 1435-1441.
- De Freitas, V., & Mateus, N. (2001). Structural Features of Procyanidin Interactions with Salivary Proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(2), 940-945.

- De Freitas, V., & Mateus, N. (2002). Nephelometric study of salivary protein–tannin aggregates. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82(1), 113–119.
- De Freitas, V., Carvalho, E., & Mateus, N. (2003). Study of carbohydrate influence on protein–tannin aggregation by nephelometry. *Food Chemistry*, 81(4), 503–509.
- De Stefani, E., Boffetta, P., Deneo-Pellegrini, H., Mendilaharsu, M., Carzoglio, J. C., Ronco, A., & Olivera, L. (1999). Dietary Antioxidants and Lung Cancer Risk: A Case-Control Study in Uruguay. *Nutrition and Cancer*, 34(1), 100–110.
- De Villiers, A., Cabooter, D., Lynen, F., Desmet, G., & Sandra, P. (2009). High performance liquid chromatography analysis of wine anthocyanins revisited: Effect of particle size and temperature. *Journal of Chromatography A*, 1216(15), 3270–3279.
- De Vries, J. A., Rombouts, F. M., Voragen, A. G. J., & Pilnik, W. (1982). Enzymic degradation of apple pectins. *Carbohydrate Polymers*, 2(1), 25–33.
- Deaville, E. R., Green, R. J., Mueller-Harvey, I., Willoughby, I., & Frazier, R. A. (2007). Hydrolyzable Tannin Structures Influence Relative Globular and Random Coil Protein Binding Strengths. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(11), 4554–4561.
- Del Rio, D., Costa, L. G., Lean, M. E. J., & Crozier, A. (2010). Polyphenols and health: What compounds are involved? *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 20(1), 1–6.
- Delannoy, D. M. (2012). *Synthèse de dérivés de polyphénols bioactifs pour l'étude de leurs interactions avec des protéines*. Bordeaux 1.
- Dembitsky, V. M., Smoum, R., Al-Quntar, A. A., Ali, H. A., Pergament, I., & Srebnik, M. (2002). Natural occurrence of boron-containing compounds in plants, algae and microorganisms. *Plant Science*, 163(5), 931–942.

- Déprez, S., Brezillon, C., Rabot, S., Philippe, C., Mila, I., Lapiere, C., & Scalbert, A. (2000). Polymeric Proanthocyanidins Are Catabolized by Human Colonic Microflora into Low-Molecular-Weight Phenolic Acids. *The Journal of Nutrition*, 130(11), 2733-2738.
- Devic, E., Guyot, S., Daudin, J.-D., & Bonazzi, C. (2010). Effect of Temperature and Cultivar on Polyphenol Retention and Mass Transfer during Osmotic Dehydration of Apples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(1), 606-614.
- Dey, P. M., & Brinson, K. (1984). Plant Cell-Walls. In R. Stuart Tipson and Derek Horton (Éd.), *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry* (Vol. Volume 42, p. 265-382). Academic Press.
- Doco, T., Williams, P., & Cheynier, V. (2007). Effect of Flash Release and Pectinolytic Enzyme Treatments on Wine Polysaccharide Composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(16), 6643-6649.
- Doco, T., Williams, P., Vidal, S., & Pellerin, P. (1997). Rhamnogalacturonan II, a dominant polysaccharide in juices produced by enzymic liquefaction of fruits and vegetables. *Carbohydrate Research*, 297(2), 181-186.
- Donovan, J. L., Lee, A., Manach, C., Rios, L., Morand, C., Scalbert, A., & Rémésy, C. (2002). Procyanidins are not bioavailable in rats fed a single meal containing a grapeseed extract or the procyanidin dimer B3. *British Journal of Nutrition*, 87(04), 299-306.
- Douat-Casassus, C., Chassaing, S., Di Primo, C., & Quideau, S. (2009). Specific or Nonspecific Protein–Polyphenol Interactions? Discrimination in Real Time by Surface Plasmon Resonance. *ChemBioChem*, 10(14), 2321–2324.

- Dronnet, V. M., Renard, C. M. G. C., Axelos, M. A. V., & Thibault, J.-F. (1996). Characterisation and selectivity of divalent metal ions binding by citrus and sugar-beet pectins. *Carbohydrate Polymers*, 30(4), 253-263.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical chemistry*, 28(3), 350-356.
- Dutta, P., Sawoo, S., Ray, N., Bouloussa, O., & Sarkar, A. (2011). Engineering Bioactive Surfaces with Fischer Carbene Complex: Protein A on Self-Assembled Monolayer for Antibody Sensing. *Bioconjugate Chemistry*, 22(6), 1202-1209.
- Englyst, H., & Cummings, J. (1984). Simplified Method for the Measurement of Total Non-Starch Polysaccharides by Gas - Liquid-Chromatography of Constituent Sugars as Alditol Acetates. *Analyst*, 109(7), 937-942.
- Escarpa, A., & González, M. . (1998). High-performance liquid chromatography with diode-array detection for the determination of phenolic compounds in peel and pulp from different apple varieties. *Journal of Chromatography A*, 823(1-2), 331-337.
- Escot, S., Feuillat, M., Dulau, L., & Charpentier, C. (2001). Release of polysaccharides by yeasts and the influence of released polysaccharides on colour stability and wine astringency. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 7(3), 153-159.
- Escribano-Bailon, M. T., & Santos-Buelga, C. (2012). Anthocyanin Copigmentation - Evaluation, Mechanisms and Implications for the Colour of Red Wines. *Current Organic Chemistry*, 16(6), 715-723.

- Ferrer-Gallego, R., Gonçalves, R., Rivas-Gonzalo, J. C., Escribano-Bailón, M. T., & de Freitas, V. (2012). Interaction of phenolic compounds with bovine serum albumin (BSA) and α -amylase and their relationship to astringency perception. *Food Chemistry*, *135*(2), 651-658.
- Ficarra, R., Tommasini, S., Raneri, D., Calabrò, M. ., Di Bella, M. ., Rustichelli, C., ... Ficarra, P. (2002). Study of flavonoids/ β -cyclodextrins inclusion complexes by NMR, FT-IR, DSC, X-ray investigation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *29*(6), 1005-1014.
- Fleschhut, J., Kratzer, F., Rechkemmer, G., & Kulling, S. E. (2006). Stability and biotransformation of various dietary anthocyanins in vitro. *European Journal of Nutrition*, *45*(1), 7-18.
- Fletcher, A. C., Porter, L. J., Haslam, E., & Gupta, R. K. (1977). Plant proanthocyanidins. Part 3. Conformational and configurational studies of natural procyanidins. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, (14), 1628-1637.
- Fontoin, H., Saucier, C., Teissedre, P.-L., & Glories, Y. (2008). Effect of pH, ethanol and acidity on astringency and bitterness of grape seed tannin oligomers in model wine solution. *Food Quality and Preference*, *19*(3), 286-291.
- Fraeye, I., Colle, I., Vandevenne, E., Duvetter, T., Van Buggenhout, S., Moldenaers, P., ... Hendrickx, M. (2010). Influence of pectin structure on texture of pectin-calcium gels. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, *11*(2), 401-409.
- Frazier, R. A., Deaville, E. R., Green, R. J., Stringano, E., Willoughby, I., Plant, J., & Mueller-Harvey, I. (2010). Interactions of tea tannins and condensed tannins with proteins. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *51*(2), 490-495.

- Frazier, R. A., Papadopoulou, A., & Green, R. J. (2006). Isothermal titration calorimetry study of epicatechin binding to serum albumin. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *41*(5), 1602-1605.
- Frazier, R. A., Papadopoulou, A., Mueller-Harvey, I., Kisson, D., & Green, R. J. (2003). Probing Protein–Tannin Interactions by Isothermal Titration Microcalorimetry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *51*(18), 5189-5195.
- Fromm, M., Bayha, S., Carle, R., & Kammerer, D. R. (2012). Characterization and Quantitation of Low and High Molecular Weight Phenolic Compounds in Apple Seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *60*(5), 1232-1242.
- Fry, S. C. (1988). *The growing plant cell wall: chemical and metabolic analysis.*, 333 pp.
- Fulcrand, H., Benabdeljalil, C., Rigaud, J., Cheynier, V., & Moutounet, M. (1998). A new class of wine pigments generated by reaction between pyruvic acid and grape anthocyanins. *Phytochemistry*, *47*(7), 1401-1407.
- Gamet, L., Daviaud, D., Denis-Pouxviel, C., Remesy, C., & Murat, J.-C. (1992). Effects of short-chain fatty acids on growth and differentiation of the human colon-cancer cell line HT29. *International Journal of Cancer*, *52*(2), 286–289.
- Gao, R., Liu, H., Peng, Z., Wu, Z., Wang, Y., & Zhao, G. (2012). Adsorption of (–)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) onto oat β -glucan. *Food Chemistry*, *132*(4), 1936-1943.
- Garnier, C., Axelos, M. A. V., & Thibault, J.-F. (1993). Phase diagrams of pectin-calcium systems: Influence of pH, ionic strength, and temperature on the gelation of pectins with different degrees of methylation. *Carbohydrate Research*, *240*, 219-232.

- Glushka, J. N., Terrell, M., York, W. S., O'Neill, M. A., Gucwa, A., Darvill, A. G., Prestegard, J. H. (2003). Primary structure of the 2-O-methyl- α -l-fucose-containing side chain of the pectic polysaccharide, rhamnogalacturonan II. *Carbohydrate Research*, 338(4), 341-352.
- Gómez-Cordovés, C., Varela, F., Larrigaudiere, C., & Vendrell, M. (1996). Effect of Ethephon and Seniphos Treatments on the Anthocyanin Composition of Starking Apples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(11), 3449-3452.
- Gonçalves, R., Mateus, N., & de Freitas, V. (2010). Biological Relevance of the Interaction between Procyanidins and Trypsin: A Multitechnique Approach. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(22), 11924-11931.
- Gonçalves, R., Mateus, N., & De Freitas, V. (2011a). Influence of Carbohydrates on the Interaction of Procyanidin B3 with Trypsin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(21), 11794-11802.
- Gonçalves, R., Mateus, N., Pianet, I., Laguerre, M., & de Freitas, V. (2011b). Mechanisms of Tannin-Induced Trypsin Inhibition: A Molecular Approach. *Langmuir*, 27(21), 13122-13129.
- Goubet, F., Bourlard, T., Girault, R., Alexandre, C., Vandavelde, M.-C., & Morvan, C. (1995a). Structural features of galactans from flax fibres. *Carbohydrate Polymers*, 27(3), 221-227.
- Grant, G. T., Morris, E. R., Rees, D. A., Smith, P. J. C., & Thom, D. (1973). Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: The egg-box model. *FEBS Letters*, 32(1), 195-198.

- Green, R. J., Murphy, A. S., Schulz, B., Watkins, B. A., & Ferruzzi, M. G. (2007). Common tea formulations modulate in vitro digestive recovery of green tea catechins. *Molecular Nutrition & Food Research*, *51*(9), 1152–1162.
- Guadalupe, Z., Palacios, A., & Ayestarán, B. (2007). Maceration Enzymes and Mannoproteins: A Possible Strategy To Increase Colloidal Stability and Color Extraction in Red Wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *55*(12), 4854–4862.
- Guerreiro, J. R. L., De Freitas, V., Sutherland, D. S., & Sales, M. G. F. (2012). SPR based Studies for Pentagalloyl Glucose Binding to α -Amylase. *Procedia Engineering*, *47*, 498–501.
- Guerrero, R. F., Smith, P., & Bindon, K. A. (2013). Application of Insoluble Fibers in the Fining of Wine Phenolics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *61*(18), 4424–4432.
- Guillaumie, F., Thomas, O. R. T., & Jensen, K. J. (2002). Immobilization of Pectin Fragments on Solid Supports: Novel Coupling by Thiazolidine Formation. *Bioconjugate Chemistry*, *13*(2), 285–294.
- Gulfi, M., Arrigoni, E., & Amadò, R. (2007). In vitro fermentability of a pectin fraction rich in hairy regions. *Carbohydrate Polymers*, *67*(3), 410–416.
- Guo, W., Kong, E., & Meydani, M. (2009). Dietary Polyphenols, Inflammation, and Cancer. *Nutrition and Cancer*, *61*(6), 807–810.
- Guyot, S., Marnet, N., Sanoner, P., & Drilleau, J.-F. (2003). Variability of the Polyphenolic Composition of Cider Apple (*Malus domestica*) Fruits and Juices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *51*(21), 6240–6247.

- Guyot, S., Le Bourvellec, C., Marnet, N., & Drilleau, J. F. (2002). Procyanidins are the most Abundant Polyphenols in Dessert Apples at Maturity. *LWT - Food Science and Technology*, 35(3), 289-291. doi:10.1006/fstl.2001.0843
- Guyot, S., Le Guerneve, C., Marnet, N., & Drilleau, J. F. (2000). Methods for determining the degree of polymerization of condensed tannins: A new (1)H-NMR procedure applied to cider apple procyanidins. In G. G. Gross, R. W. Hemingway, & T. Yoshida (Éd.), *Plant Polyphenols 2: Chemistry, Biology, Pharmacology, Ecology* (Vol. 66, p. 211-222). New York: Kluwer Academic/Plenum Publ.
- Guyot, S., Marnet, N., Laraba, D., Sanoner, P., & Drilleau, J.-F. (1998). Reversed-Phase HPLC following Thiolysis for Quantitative Estimation and Characterization of the Four Main Classes of Phenolic Compounds in Different Tissue Zones of a French Cider Apple Variety (*Malus domestica* Var. Kermerrien). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(5), 1698-1705.
- Guyot, S., Doco, T., Souquet, J. M., Moutounet, M., & Drilleau, J. F. (1997). Characterization of highly polymerized procyanidins in cider apple (*Malus sylvestris* var kermerrien) skin and pulp. *Phytochemistry*, 44(2), 351-357.
- Guyot, Sylvain, Cheynier, V., Souquet, J.-M., & Moutounet, M. (1995). Influence of pH on the Enzymic Oxidation of (+)-Catechin in Model Systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43(9), 2458-2462.
- Gyémánt, G., Zajác, Á., Bécsi, B., Rangunath, C., Ramasubbu, N., Erdődi, F., Kandra, L. (2009). Evidence for pentagalloyl glucose binding to human salivary α -amylase through aromatic amino acid residues. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1794(2), 291-296.

- Ha, M.-A., Viëtor, R. J., Jardine, G. D., Apperley, D. C., & Jarvis, M. C. (2005). Conformation and mobility of the arabinan and galactan side-chains of pectin. *Phytochemistry*, 66(15), 1817-1824.
- Ha, M.-A., Apperley, D. C., Evans, B. W., Huxham, I. M., Jardine, W. G., Viëtor, R. J., ... Jarvis, M. C. (1998). Fine structure in cellulose microfibrils: NMR evidence from onion and quince. *The Plant Journal*, 16(2), 183-190.
- Hagerman, A. E., Rice, M. E., & Ritchard, N. T. (1998). Mechanisms of Protein Precipitation for Two Tannins, Pentagalloyl Glucose and Epicatechin₁₆ (4→8) Catechin (Procyanidin). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(7), 2590-2595.
- Hagerman, A. E., & Butler, L. G. (1981). The specificity of proanthocyanidin-protein interactions. *Journal of Biological Chemistry*, 256(9), 4494-4497.
- Halliwell, B. (1995). Antioxidant characterization: Methodology and mechanism. *Biochemical Pharmacology*, 49(10), 1341-1348.
- Hamazu, Y., & Mizuno, Y. (2011). Non-extractable Procyanidins and Lignin are Important Factors in the Bile Acid Binding and Radical Scavenging Properties of Cell Wall Material in some Fruits. *Plant Foods for Human Nutrition*, 66(1), 70-77.
- Hanlin, R. I., Hrmova, M., Harbertson, J. F., & Downey, M. O. (2010). Review: Condensed tannin and grape cell wall interactions and their impact on tannin extractability into wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 16(1), 173-188.
- Haslam, E. (1996). Natural Polyphenols (Vegetable Tannins) as Drugs: Possible Modes of Action. *Journal of Natural Products*, 59(2), 205-215.
- Haslam, E. (1989). *Plant Polyphenols: Vegetable Tannins Revisited*. CUP Archive.

- Havsteen, B. H. (2002). The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology & Therapeutics*, 96(2–3), 67–202.
- Hayashi, N., Chen, R., Hiraoka, M., Ujihara, T., & Ikezaki, H. (2010). β -Cyclodextrin/Surface Plasmon Resonance Detection System for Sensing Bitter-Astringent Taste Intensity of Green Tea Catechins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(14), 8351–8356.
- He, Q., Lv, Y., & Yao, K. (2007). Effects of tea polyphenols on the activities of α -amylase, pepsin, trypsin and lipase. *Food Chemistry*, 101(3), 1178–1182.
- Helfer, C. A., Sun, J.-S., Matties, M. A., Mattice, W. L., Hemingway, R. W., Steynberg, J. P., & Kelly, L. A. (1995). Implications of the fluorescence for the conformational analysis of polymeric proflisetinidins and procyanidins. *Polymer Bulletin*, 34(1), 79–85.
- Hemingway, R. W., & Karchesy, J. J. (1989). *Chemistry and significance of condensed tannins*. Plenum Press.
- Heredia, F. , Francia-Aricha, E. , Rivas-Gonzalo, J. , Vicario, I. , & Santos-Buelga, C. (1998). Chromatic characterization of anthocyanins from red grapes—I. pH effect. *Food Chemistry*, 63(4), 491–498.
- Herrero-Martínez, J. M., Ràfols, C., Rosés, M., Bosch, E., Lozano, C., & Torres, J. L. (2003). Micellar electrokinetic chromatography estimation of size and composition of procyanidins after thiolysis with cysteine. *ELECTROPHORESIS*, 24(9), 1404–1410.
- Hertog, M. G. , Feskens, E. J. , Kromhout, D., Hertog, M. G. , Hollman, P. C. , Hertog, M. G., & Katan, M. . (1993). Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *The Lancet*, 342(8878), 1007–1011.

- Holst, G.-J. van, & Varner, J. E. (1984). Reinforced Polyproline II Conformation in a Hydroxyproline-Rich Cell Wall Glycoprotein from Carrot Root. *Plant Physiology*, 74(2), 247-251.
- Hopkins, W. G. (2003). *Physiologie végétale*. De Boeck Supérieur.
- Hostettmann, K., Lederer, M., Marston, A., & Leipzig-Pagani, E. (1997). A study of the cyclodextrin complexes of flavonoids by thin layer chromatography. *Phytochemical Analysis*, 8(4), 173-175.
- Huisman, M. M. H., Brüll, L. P., Thomas-Oates, J. E., Haverkamp, J., Schols, H. A., & Voragen, A. G. J. (2001). The occurrence of internal (1→5)-linked arabinofuranose and arabinopyranose residues in arabinogalactan side chains from soybean pectic substances. *Carbohydrate Research*, 330(1), 103-114.
- Ignat, I., Volf, I., & Popa, V. I. (2011). A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chemistry*, 126, 1821-1835.
- Ishii, T., Ichikawa, T., Minoda, K., Kusaka, K., Ito, S., Suzuki, Y., Nakayama, T. (2011). Human Serum Albumin as an Antioxidant in the Oxidation of (-)-Epigallocatechin Gallate: Participation of Reversible Covalent Binding for Interaction and Stabilization. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 75(1), 100-106.
- Ishii, T., Mori, T., Tanaka, T., Mizuno, D., Yamaji, R., Kumazawa, S., Akagawa, M. (2008). Covalent modification of proteins by green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate through autoxidation. *Free Radical Biology and Medicine*, 45(10), 1384-1394.
- Ishii, T., & Matsunaga, T. (2001). Pectic polysaccharide rhamnogalacturonan II is covalently linked to homogalacturonan. *Phytochemistry*, 57(6), 969-974.

- Ishii, T., Matsunaga, T., Pellerin, P., O'Neill, M. A., Darvill, A., & Albersheim, P. (1999). The Plant Cell Wall Polysaccharide Rhamnogalacturonan II Self-assembles into a Covalently Cross-linked Dimer. *Journal of Biological Chemistry*, 274(19), 13098-13104.
- Ishii, T., & Matsunaga, T. (1996). Isolation and characterization of a boron-rhamnogalacturonan-II complex from cell walls of sugar beet pulp. *Carbohydrate Research*, 284(1), 1-9.
- Ishizu, T., Kajitani, S., Tsutsumi, H., Sato, T., Yamamoto, H., & Hirata, C. (2011). Configurational Studies of Complexes of Tea Catechins with Caffeine and Various Cyclodextrins. *Planta Medica*, 77(11), 1099-1109.
- Ishizu, T., Tsutsumi, H., Yamamoto, H., & Harano, K. (2009). NMR spectroscopic characterization of inclusion complexes comprising cyclodextrins and galled catechins in aqueous solution: cavity size dependency. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 47(4), 283-287.
- Ishizu, T., Kintsu, K., & Yamamoto, H. (1999). NMR Study of the Solution Structures of the Inclusion Complexes of β -Cyclodextrin with (+)-Catechin and (-)-Epicatechin. *The Journal of Physical Chemistry B*, 103(42), 8992-8997.
- Jakopic, J., Slatnar, A., Stampar, F., Veberic, R., & Simoncic, A. (2012). Analysis of selected primary metabolites and phenolic profile of 'Golden Delicious' apples from four production systems. *Fruits*, 67(5), 377-386.
- Janaswamy, S., & Chandrasekaran, R. (2005). Polysaccharide structures from powder diffraction data: molecular models of arabinan. *Carbohydrate Research*, 340(5), 835-839.

- Jang, Y., Lee, J. H., Kim, O. Y., Park, H. Y., & Lee, S. Y. (2001). Consumption of Whole Grain and Legume Powder Reduces Insulin Demand, Lipid Peroxidation, and Plasma Homocysteine Concentrations in Patients With Coronary Artery Disease Randomized Controlled Clinical Trial. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *21*(12), 2065-2071.
- Janisch, K. M., Ölschläger, C., Treutter, D., & Elstner, E. F. (2006). Simulated Digestion of *Vitis vinifera* Seed Powder: Polyphenolic Content and Antioxidant Properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *54*(13), 4839-4848.
- Jean-Gilles, D., Li, L., Vaidyanathan, V. G., King, R., Cho, B., Worthen, D. R., ... Seeram, N. P. (2013). Inhibitory effects of polyphenol punicalagin on type-II collagen degradation in vitro and inflammation in vivo. *Chemico-Biological Interactions*, *205*(2), 90-99.
- Jiménez-Atiénzar, M., Cabanes, J., Gandía-Herrero, F., & García-Carmona, F. (2004). Kinetic analysis of catechin oxidation by polyphenol oxidase at neutral pH. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *319*(3), 902-910.
- Jöbstl, E., O'Connell, J., Fairclough, J. P. A., & Williamson, M. P. (2004). Molecular Model for Astringency Produced by Polyphenol/Protein Interactions. *Biomacromolecules*, *5*(3), 942-949.
- Joergensen, L., Klösigen, B., Simonsen, A. C., Borch, J., & Hagesaether, E. (2011). New insights into the mucoadhesion of pectins by AFM roughness parameters in combination with SPR. *International Journal of Pharmaceutics*, *411*(1-2), 162-168.
- Kauffman, D. L., Bennick, A., Blum, M., & Keller, P. J. (1991). Basic proline-rich proteins from human parotid saliva: relationships of the covalent structures of ten proteins from a single individual. *Biochemistry*, *30*(14), 3351-3356.

- Keegstra, K., Talmadge, K. W., Bauer, W. D., & Albersheim, P. (1973). The Structure of Plant Cell Walls III. A Model of the Walls of Suspension-cultured Sycamore Cells Based on the Interconnections of the Macromolecular Components. *Plant Physiology*, *51*(1), 188-197.
- Kennedy, J. A., & Jones, G. P. (2001). Analysis of Proanthocyanidin Cleavage Products Following Acid-Catalysis in the Presence of Excess Phloroglucinol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *49*(4), 1740-1746.
- King, E. S., Dunn, R. L., & Heymann, H. (2013). The influence of alcohol on the sensory perception of red wines. *Food Quality and Preference*, *28*(1), 235-243.
- Kiss, A., Bécsi, B., Kolozsvári, B., Komáromi, I., Kövér, K. E., & Erdódi, F. (2013). Epigallocatechin-3-gallate and penta-O-galloyl- β -d-glucose inhibit protein phosphatase-1. *FEBS Journal*, *280*(2), 612-626.
- Knekt, P., Jarvinen, R., Reunanen, A., & Maatela, J. (1996). Flavonoid intake and coronary mortality in Finland: a cohort study. *BMJ*, *312*(7029), 478-481.
- Komalavilas, P., & Mort, A. J. (1989). The acetylation of O-3 of galacturonic acid in the rhamnose-rich portion of pectins. *Carbohydrate Research*, *189*, 261-272.
- Krall, S. M., & McFeeters, R. F. (1998). Pectin Hydrolysis: Effect of Temperature, Degree of Methylation, pH, and Calcium on Hydrolysis Rates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *46*(4), 1311-1315.
- Kříž, Z., Koča, J., Imberty, A., Charlot, A., & Auzély-Velty, R. (2003). Investigation of the complexation of (+)-catechin by β -cyclodextrin by a combination of NMR, microcalorimetry and molecular modeling techniques. *Organic & Biomolecular Chemistry*, *1*(14), 2590-2595.

- Kroon-Batenburg, L. M. J., & Kroon, J. (1997). The crystal and molecular structures of cellulose I and II. *Glycoconjugate Journal*, 14(5), 677-690.
- Lahiri, J., Isaacs, L., Tien, J., & Whitesides, G. M. (1999). A Strategy for the Generation of Surfaces Presenting Ligands for Studies of Binding Based on an Active Ester as a Common Reactive Intermediate: A Surface Plasmon Resonance Study. *Analytical Chemistry*, 71(4), 777-790.
- Lamport, D. T. A., Kieliszewski, M. J., Chen, Y., & Cannon, M. C. (2011). Role of the Extensin Superfamily in Primary Cell Wall Architecture. *Plant Physiology*, 156(1), 11-19.
- Lamport, D. T. A., & Miller, D. H. (1971). Hydroxyproline Arabinosides in the Plant Kingdom. *Plant Physiology*, 48(4), 454-456.
- Lao, C., Lopez-Tamames, E., Buxaderas, S., & De La Torre-Boronat, M. c. (1996). Grape Pectic Enzyme Treatment Effect on White Musts & Wines Composition. *Journal of Food Science*, 61(3), 553-556.
- Larsen, K. L., Mathiesen, F., & Zimmermann, W. (1997). Separation and analysis of cyclodextrins by capillary zone electrophoresis. *Carbohydrate Research*, 298(1-2), 59-63.
- Lau, J. M., McNeil, M., Darvill, A. G., & Albersheim, P. (1985). Structure of the backbone of rhamnogalacturonan I, a pectic polysaccharide in the primary cell walls of plants. *Carbohydrate Research*, 137, 111-125.
- Le Bourvellec, C., & Renard, C. M. G. C. (2012a). Interactions between Polyphenols and Macromolecules: Quantification Methods and Mechanisms. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 52(1-3), 213-248.

- Le Bourvellec, C., Watrelot, A. A., Ginies, C., Imberty, A., & Renard, C. M. G. C. (2012b). Impact of Processing on the Noncovalent Interactions between Procyanidin and Apple Cell Wall. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.
- Le Bourvellec, C., Bouzerzour, K., Ginies, C., Regis, S., Plé, Y., & Renard, C. M. G. C. (2011). Phenolic and polysaccharidic composition of applesauce is close to that of apple flesh. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24(4–5), 537–547.
- Le Bourvellec, C., Guyot, S., & Renard, C. M. G. C. (2009). Interactions between apple (*Malus x domestica* Borkh.) polyphenols and cell walls modulate the extractability of polysaccharides. *Carbohydrate Polymers*, 75(2), 251–261.
- Le Bourvellec, C., Le Quere, J.-M., & Renard, C. M. G. C. (2007). Impact of noncovalent interactions between apple condensed tannins and cell walls on their transfer from fruit to juice: Studies in model suspensions and application. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(19), 7896–7904.
- Le Bourvellec, C., Picot, M., & Renard, C. (2006). Size-exclusion chromatography of procyanidins: Comparison between apple and grape procyanidins and application to the characterization of fractions of high degrees of polymerization. *Analytica Chimica Acta*, 563(1-2), 33–43.
- Le Bourvellec, C., Bouchet, B., & Renard, C. (2005a). Non-covalent interaction between procyanidins and apple cell wall material. Part III: Study on model polysaccharides. *Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects*, 1725(1), 10–18.
- Le Bourvellec, C., Guyot, S., & Renard, C. M. G. (2004). Non-covalent interaction between procyanidins and apple cell wall material: Part I. Effect of some environmental parameters. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1672(3), 192–202.

- Lea, A. G. H.; Timberlake, C. F. (1974). The phenolics of ciders. I. Procyanidins. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 25(12), 1537-1545.
- Lea, A., & Arnold, G. (1978). Phenolics of Ciders - Bitterness and Astringency. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 29(5), 478-483.
- Lederer, M., & Leipzig-Pagani, E. (1996). A simple alternative determination of the formation constant for the inclusion complex between rutin and β -cyclodextrin. *Analytica Chimica Acta*, 329(3), 311-314.
- Levy, S., York, W. S., Stuike-Prill, R., Meyer, B., & Staehelin, L. A. (1991). Simulations of the static and dynamic molecular conformations of xyloglucan. The role of the fucosylated sidechain in surface-specific sidechain folding. *The Plant journal: for cell and molecular biology*, 1(2), 195-215.
- Lewis, C. E., Walker, J. R. ., & Lancaster, J. E. (1995). Effect of polysaccharides on the colour of anthocyanins. *Food Chemistry*, 54(3), 315-319.
- Leydet, Y., Gavara, R., Petrov, V., Diniz, A. M., Jorge Parola, A., Lima, J. C., & Pina, F. (2012). The effect of self-aggregation on the determination of the kinetic and thermodynamic constants of the network of chemical reactions in 3-glucoside anthocyanins. *Phytochemistry*, 83(0), 125-135.
- Liang, M., Liu, R., Qi, W., Su, R., Yu, Y., Wang, L., & He, Z. (2013). Interaction between lysozyme and procyanidin: Multilevel structural nature and effect of carbohydrates. *Food Chemistry*, 138(2-3), 1596-1603.
- Lin, J.-K. (2002). Cancer Chemoprevention by Tea Polyphenols Through Modulating Signal Transduction Pathways. *Archives of Pharmacal Research*, 25(5), 561-571.

- Liners, F., Letesson, J.-J., Didembourg, C., & Cutsem, P. V. (1989). Monoclonal Antibodies against Pectin Recognition of a Conformation Induced by Calcium. *Plant Physiology*, *91*(4), 1419-1424.
- Lorenz, M., Jochmann, N., Krosigk, A. von, Martus, P., Baumann, G., Stangl, K., & Stangl, V. (2007). Addition of milk prevents vascular protective effects of tea. *European Heart Journal*, *28*(2), 219-223.
- Lorenz, M., Stangl, K., & Stangl, V. (2009). Vascular effects of tea are suppressed by soy milk. *Atherosclerosis*, *206*(1), 31-32.
- Luck, G., Liao, H., Murray, N. J., Grimmer, H. R., Warminski, E. E., Williamson, M. P., Haslam, E. (1994). Polyphenols, astringency and proline-rich proteins. *Phytochemistry*, *37*(2), 357-371.
- MacDougall, A. J., Brett, G. M., Morris, V. J., Rigby, N. M., Ridout, M. J., & Ring, S. G. (2001). The effect of peptide–pectin interactions on the gelation behaviour of a plant cell wall pectin. *Carbohydrate Research*, *335*(2), 115-126.
- Malcolm Brown Jr, R., Saxena, I. M., & Kudlicka, K. (1996). Cellulose biosynthesis in higher plants. *Trends in Plant Science*, *1*(5), 149-156.
- Manach, C., Williamson, G., Morand, C., Scalbert, A., & Rémésy, C. (2005). Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *81*(1), 230S-242S.
- Markakēs, P. (1982). *Anthocyanins as Food Colours*. Academic Press.
- Martin, S., & Andriantsitohaina, R. (2002). Mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium. *Annales de Cardiologie et d'Angéiologie*, *51*(6), 304-315.

- Mateus, N., Carvalho, E., Luis, C., & de Freitas, V. (2004a). Influence of the tannin structure on the disruption effect of carbohydrates on protein-tannin aggregates. *Analytica Chimica Acta*, 513(1), 135-140.
- Mateus, N., Pinto, R., Ruao, P., & de Freitas, V. (2004b). Influence of the addition of grape seed procyanidins to Port wines in the resulting reactivity with human salivary proteins. *Food Chemistry*, 84(2), 195-200.
- Mazauric, J.-P., & Salmon, J.-M. (2005). Interactions between Yeast Lees and Wine Polyphenols during Simulation of Wine Aging: I. Analysis of Remnant Polyphenolic Compounds in the Resulting Wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(14), 5647-5653.
- Mazza, G., & Miniati, E. (1993). *Anthocyanins in fruits, vegetables, and grains*. Boca Raton: CRC Press.
- Mazzaracchio, P., Pifferi, P., Kindt, M., Munyaneza, A., & Barbiroli, G. (2004). Interactions between anthocyanins and organic food molecules in model systems. *International Journal of Food Science & Technology*, 39(1), 53-59.
- McCann, M. C., Wells, B., & Roberts, K. (1990). Direct visualization of cross-links in the primary plant cell wall. *Journal of Cell Science*, 96, 323-334.
- McDougall, G. J., Morrison, I. M., Stewart, D., & Hillman, J. R. (1996). Plant Cell Walls as Dietary Fibre: Range, Structure, Processing and Function. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 70(2), 133-150.
- Mcmanus, J., Davis, K., Beart, J., Gaffney, S., Lilley, T., & Haslam, E. (1985). Polyphenol Interactions .1. Introduction - Some Observations on the Reversible Complexation of Polyphenols with Proteins and Polysaccharides. *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 2*, (9), 1429-1438.

- McNeil, M., Darvill, A. G., Fry, S. C., & Albersheim, P. (1984). Structure and Function of the Primary Cell Walls of Plants. *Annual Review of Biochemistry*, 53(1), 625-663.
- McRae, J. M., Falconer, R. J., & Kennedy, J. A. (2010). Thermodynamics of Grape and Wine Tannin Interaction with Polyproline: Implications for Red Wine Astringency. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(23), 12510-12518.
- Mehansho, H., Butler, L. G., & Carlson, D. M. (1987). Dietary Tannins and Salivary Proline-Rich Proteins: Interactions, Induction, and Defense Mechanisms. *Annual Review of Nutrition*, 7(1), 423-440.
- Missang, C. E., Massiot, P., Baron, A., & Drilleau, J. F. (1993). Effect of oxidative browning of apple pulp on the chemical and enzymatic extraction of cell wall polysaccharides. *Carbohydrate Polymers*, 20(2), 131-138.
- Morata, A., Gómez-Cordovés, M. C., Suberviola, J., Bartolomé, B., Colomo, B., & Suárez, J. A. (2003). Adsorption of Anthocyanins by Yeast Cell Walls during the Fermentation of Red Wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(14), 4084-4088.
- Mori, T., Ishii, T., Akagawa, M., Nakamura, Y., & Nakayama, T. (2010). Covalent Binding of Tea Catechins to Protein Thiols: The Relationship between Stability and Electrophilic Reactivity. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 74(12), 2451-2456.
- Moroney, M. A., Alcaraz, M. J., Forder, R. A., Carey, F., & Hoult, J. R. (1988). Selectivity of neutrophil 5-lipoxygenase and cyclo-oxygenase inhibition by an anti-inflammatory flavonoid glycoside and related aglycone flavonoids. *The Journal of pharmacy and pharmacology*, 40(11), 787-792.
- Morris, G.A., Foster, T. J., & Harding, S. E. (2000). The effect of the degree of esterification on the hydrodynamic properties of citrus pectin. *Food Hydrocolloids*, 14(3), 227-235.

- Morris, G. A., Ralet, M.-C., Bonnin, E., Thibault, J.-F., & Harding, S. E. (2010). Physical characterisation of the rhamnogalacturonan and homogalacturonan fractions of sugar beet (*Beta vulgaris*) pectin. *Carbohydrate Polymers*, *82*(4), 1161-1167.
- Mullen, W., Edwards, C. A., Serafini, M., & Crozier, A. (2008). Bioavailability of Pelargonidin-3-O-glucoside and Its Metabolites in Humans Following the Ingestion of Strawberries with and without Cream. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *56*(3), 713-719.
- Naczek, M., Oickle, D., Pink, D., & Shahidi, F. (1996). Protein Precipitating Capacity of Crude Canola Tannins: Effect of pH, Tannin, and Protein Concentrations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *44*(8), 2144-2148.
- Nakamura, A., Furuta, H., Maeda, H., Nagamatsu, Y., & Yoshimoto, A. (2001). Analysis of Structural Components and Molecular Construction of Soybean Soluble Polysaccharides by Stepwise Enzymatic Degradation. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, *65*(10), 2249-2258.
- Neilson, A. P., Hopf, A. S., Cooper, B. R., Pereira, M. A., Bomser, J. A., & Ferruzzi, M. G. (2007). Catechin Degradation with Concurrent Formation of Homo- and Heterocatechin Dimers during in Vitro Digestion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *55*(22), 8941-8949.
- Nicolas, J., Richardforget, F., Goupy, P., Amiot, M., & Aubert, S. (1994). Enzymatic Browning Reactions in Apple and Apple Products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *34*(2), 109-157.
- Nishiyama, Y., Langan, P., & Chanzy, H. (2002). Crystal Structure and Hydrogen-Bonding System in Cellulose I β from Synchrotron X-ray and Neutron Fiber Diffraction. *Journal of the American Chemical Society*, *124*(31), 9074-9082.

- Noble, A. C. (2000). Bitterness and astringency of flavonoid phenols. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society*, 219, U50-U51.
- Nunan, K. J., Sims, I. M., Bacic, A., Robinson, S. P., & Fincher, G. B. (1998a). Changes in Cell Wall Composition during Ripening of Grape Berries. *Plant Physiology*, 118(3), 783-792.
- Nyamambi, B., Ndlovu, L. R., Read, J. S., & Reed, J. D. (2000). The effects of sorghum proanthocyanidins on digestive enzyme activity in vitro and in the digestive tract of chicken. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(15), 2223-2231.
- O'Neill et al., (1990). The pectic polysaccharides of primary cell walls. In *Methods in plant biochemistry* (PM Dey., p. 415-451).
- O'Neill, M. A., Warrenfeltz, D., Kates, K., Pellerin, P., Doco, T., Darvill, A. G., & Albersheim, P. (1996). Rhamnogalacturonan-II, a Pectic Polysaccharide in the Walls of Growing Plant Cell, Forms a Dimer That Is Covalently Cross-linked by a Borate Ester in vitro conditions for the formation and hydrolysis of the dimer. *Journal of Biological Chemistry*, 271(37), 22923-22930.
- Oakenfull, D., & Scott, A. (1984). Hydrophobic Interaction in the Gelation of High Methoxyl Pectins. *Journal of Food Science*, 49(4), 1093-1098.
- Ochoa-Villarreal, M., Aispuro-Hernandez, E., Vargas-Arispuro, I., & Ngel, M. (2012). Plant Cell Wall Polymers: Function, Structure and Biological Activity of Their Derivatives. In A. De Souza Gomes (Éd.), *Polymerization*. InTech.
- Oh, H. I., Hoff, J. E., Armstrong, G. S., & Haff, L. A. (1980). Hydrophobic interaction in tannin-protein complexes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 28(2), 394-398.

- Olano-Martin, E., Gibson, G. r., & Rastall, R. a. (2002). Comparison of the in vitro bifidogenic properties of pectins and pectic-oligosaccharides. *Journal of Applied Microbiology*, 93(3), 505–511.
- Oosterveld, Alexander, Beldman, G., Schols, H. A., & Voragen, A. G. J. (2000). Characterization of arabinose and ferulic acid rich pectic polysaccharides and hemicelluloses from sugar beet pulp. *Carbohydrate Research*, 328(2), 185-197.
- Oosterveld, Alexander, Voragen, A. G. J., & Schols, H. A. (2002). Characterization of hop pectins shows the presence of an arabinogalactan-protein. *Carbohydrate Polymers*, 49(4), 407-413.
- Oszmianski J; Sozynski J. (1986). Changes in the polyphenolic compounds of apple pulp. *Acta Alimentaria Polonica*, 12(1), 11-20.
- Ozawa, T., Lilley, T. H., & Haslam, E. (1987). Polyphenol interactions: astringency and the loss of astringency in ripening fruit. *Phytochemistry*, 26(11), 2937-2942.
- Padayachee, A., Netzel, G., Netzel, M., Day, L., Zabarar, D., Mikkelsen, D., & Gidley, M. J. (2012). Binding of polyphenols to plant cell wall analogues – Part 1: Anthocyanins. *Food Chemistry*, 134(1), 155-161.
- Papadopoulou, A., Green, R. J., & Frazier, R. A. (2005). Interaction of Flavonoids with Bovine Serum Albumin: A Fluorescence Quenching Study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(1), 158-163.
- Pascal, C., Paté, F., Cheynier, V., & Delsuc, M.-A. (2009). Study of the interactions between a proline-rich protein and a flavan-3-ol by NMR: Residual structures in the natively unfolded protein provides anchorage points for the ligands. *Biopolymers*, 91(9), 745–756.

- Pascal, C., Poncet-Legrand, C., Cabane, B., & Vernhet, A. (2008). Aggregation of a Proline-Rich Protein Induced by Epigallocatechin Gallate and Condensed Tannins: Effect of Protein Glycosylation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(15), 6724-6732.
- Pascal, C., Poncet-Legrand, C., Imberty, A., Gautier, C., Sarni-Manchado, P., Cheynier, V., & Vernhet, A. (2007). Interactions between a Non Glycosylated Human Proline-Rich Protein and Flavan-3-ols Are Affected by Protein Concentration and Polyphenol/Protein Ratio. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(12), 4895-4901.
- Pauly, M., Albersheim, P., Darvill, A., & York, W. S. (1999). Molecular domains of the cellulose/xyloglucan network in the cell walls of higher plants. *The Plant Journal*, 20(6), 629-639.
- Peleg, H., Gacon, K., Schlich, P., & Noble, A. C. (1999). Bitterness and astringency of flavan-3-ol monomers, dimers and trimers. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79(8), 1123-1128.
- Pellerin, P., Vidal, S., Williams, P., & Brillouet, J.-M. (1995). Characterization of five type II arabinogalactan-protein fractions from red wine of increasing uronic acid content. *Carbohydrate Research*, 277(1), 135-143.
- Pellerin, Patrice, Doco, T., Vida, S., Williams, P., Brillouet, J.-M., & O'Neill, M. A. (1996). Structural characterization of red wine rhamnogalacturonan II. *Carbohydrate Research*, 290(2), 183-197.
- Pérez, Serge, Mazeau, K., & Hervé du Penhoat, C. (2000). The three-dimensional structures of the pectic polysaccharides. *Plant Physiology and Biochemistry*, 38(1-2), 37-55.

- Perezilzarbe, F., Martinez, V., Hernandez, T., & Estrella, I. (1992). Liquid-Chromatographic Determination of Apple Pulp Procyanidins. *Journal of Liquid Chromatography*, 15(4), 637-646.
- Plumb, G. W., De Pascual-Teresa, S., Santos-Buelga, C., Cheynier, V., & Williamson, G. (1998). Antioxidant properties of catechins and proanthocyanidins: Effect of polymerisation, galloylation and glycosylation. *Free Radical Research*, 29(4), 351-358.
- Poncet-Legrand, C., Gautier, C., Cheynier, V., & Imbert, A. (2007). Interactions between Flavan-3-ols and Poly(l-proline) Studied by Isothermal Titration Calorimetry: Effect of the Tannin Structure. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(22), 9235-9240.
- Poncet-Legrand, C., Edelmann, A., Putaux, J.-L., Cartalade, D., Sarni-Manchado, P., & Vernhet, A. (2006). Poly(l-proline) interactions with flavan-3-ols units: Influence of the molecular structure and the polyphenol/protein ratio. *Food Hydrocolloids*, 20(5), 687-697.
- Poncet-Legrand, C., Cartalade, D., Putaux, J.-L., Cheynier, V., & Vernhet, A. (2003). Flavan-3-ol Aggregation in Model Ethanolic Solutions: Incidence of Polyphenol Structure, Concentration, Ethanol Content, and Ionic Strength. *Langmuir*, 19(25), 10563-10572.
- Porter, L., Hrstich, L., & Chan, B. (1986). The Conversion of Procyanidins and Prodelphinidins to Cyanidin and Delphinidin. *Phytochemistry*, 25(1), 223-230.
- Prieur, C., Rigaud, J., Cheynier, V., & Moutounet, M. (1994). Oligomeric and Polymeric Procyanidins from Grape Seeds. *Phytochemistry*, 36(3), 781-784.

- Prigent, S. (2005). *Interactions of phenolic compounds with globular proteins and their effects on food-related functional properties*. Wageningen, Netherlands: Wageningen Universiteit (Wageningen University).
- Prigent, S. V., Voragen, A. G., Li, F., Visser, A. J., van Koningsveld, G. A., & Gruppen, H. (2008). Covalent interactions between amino acid side chains and oxidation products of caffeoylquinic acid (chlorogenic acid). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88(10), 1748–1754.
- Prigent, S.V.E., Voragen, A. G. J., van Koningsveld, G. A., Baron, A., Renard, C. M. G. C., & Gruppen, H. (2009). Interactions between globular proteins and procyanidins of different degrees of polymerization. *Journal of Dairy Science*, 92(12), 5843-5853.
- Prigent, Stéphanie V. E., Gruppen, H., Visser, A. J. W. G., van Koningsveld, G. A., de Jong, G. A. H., & Voragen, A. G. J. (2003). Effects of Non-covalent Interactions with 5-O-Caffeoylquinic Acid (Chlorogenic Acid) on the Heat Denaturation and Solubility of Globular Proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(17), 5088-5095.
- Quideau, S., Deffieux, D., Douat-Casassus, C., & Pouységu, L. (2011). Plant Polyphenols: Chemical Properties, Biological Activities, and Synthesis. *Angewandte Chemie International Edition*, 50(3), 586–621.
- Ralet, M.-C., Tranquet, O., Poulain, D., Moïse, A., & Guillon, F. (2010). Monoclonal antibodies to rhamnogalacturonan I backbone. *Planta*, 231(6), 1373-1383.
- Ralet, M.-C., Dronnet, V., Buchholt, H. C., & Thibault, J.-F. (2001). Enzymatically and chemically de-esterified lime pectins: characterisation, polyelectrolyte behaviour and calcium binding properties. *Carbohydrate Research*, 336(2), 117-125.
- Rawel, H. M., & Rohn, S. (2009). Nature of hydroxycinnamate-protein interactions. *Phytochemistry Reviews*, 9(1), 93-109.

- Rawel, H. M., Frey, S. K., Meidtner, K., Kroll, J., & Schweigert, F. J. (2006). Determining the binding affinities of phenolic compounds to proteins by quenching of the intrinsic tryptophan fluorescence. *Molecular Nutrition & Food Research*, 50(8), 705–713.
- Rawel, H. M., Meidtner, K., & Kroll, J. (2005). Binding of Selected Phenolic Compounds to Proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(10), 4228-4235.
- Renard, C. M. G. C., Le Quere, J.-M., Bauduin, R., Symoneaux, R., Le Bourvellec, C., & Baron, A. (2011). Modulating polyphenolic composition and organoleptic properties of apple juices by manipulating the pressing conditions. *Food Chemistry*, 124(1), 117-125.
- Renard, C. M.G.C., & Ginies, C. (2009). Comparison of the cell wall composition for flesh and skin from five different plums. *Food Chemistry*, 114(3), 1042-1049.
- Renard, C. M. G. C., Dupont, N., & Guillermin, P. (2007). Concentrations and characteristics of procyanidins and other phenolics in apples during fruit growth. *Phytochemistry*, 68(8), 1128-1138.
- Renard, C. M.G.C, Baron, A., Guyot, S., & Drilleau, J.-F. (2001). Interactions between apple cell walls and native apple polyphenols: quantification and some consequences. *International Journal of Biological Macromolecules*, 29(2), 115-125.
- Renard, C.M.G.C, & Jarvis, M. (1999a). Acetylation and methylation of homogalacturonans 1: optimisation of the reaction and characterisation of the products. *Carbohydrate Polymers*, 39(3), 201-207.
- Renard, C. M. G. C., Crépeau, M.-J., & Thibault, J.-F. (1999b). Glucuronic acid directly linked to galacturonic acid in the rhamnogalacturonan backbone of beet pectins. *European Journal of Biochemistry*, 266(2), 566–574

- Renard, C. M. G. C., & Jarvis, M. C. (1999c). A Cross-Polarization, Magic-Angle-Spinning,¹³C-Nuclear-Magnetic-Resonance Study of Polysaccharides in Sugar Beet Cell Walls. *Plant Physiology*, *119*(4), 1315-1322.
- Renard, C.M.G.C., Rohou, Y., Hubert, C., Della Valle, G., Thibault, J.-F., & Savina, J.-P. (1997a). Bleaching of Apple Pomace by Hydrogen Peroxide in Alkaline Conditions: Optimisation and Characterisation of the Products. *LWT - Food Science and Technology*, *30*(4), 398-405.
- Renard, C. M.G.C., Lahaye, M., Mutter, M., Voragen, F. G. J., & Thibault, J.-F. (1997b). Isolation and structural characterisation of rhamnogalacturonan oligomers generated by controlled acid hydrolysis of sugar-beet pulp. *Carbohydrate Research*, *305*(2), 271-280.
- Renard, C. M.G.C., Crépeau, M.-J., & Thibault, J.-F. (1995). Structure of the repeating units in the rhamnogalacturonic backbone of apple, beet and citrus pectins. *Carbohydrate Research*, *275*(1), 155-165.
- Renard, C. M.G.C., & Thibault, J.-F. (1993). Structure and properties of apple and sugar-beet pectins extracted by chelating agents. *Carbohydrate Research*, *244*(1), 99-114.
- Renard, C.M.G.C., Voragen, A., Thibault, J., & Pilnik, W. (1991). Studies on Apple Protopectin .5. Structural Studies on Enzymatically Extracted Pectins. *Carbohydrate Polymers*, *16*(2), 137-154.
- Richard, T., Vitrac, X., Merillon, J. M., & Monti, J. P. (2005). Role of peptide primary sequence in polyphenol–protein recognition: An example with neurotensin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, *1726*(3), 238-243.

- Richard-Forget, F. C., Rouet-Mayer, M. A., Goupy, P. M., Philippon, J., & Nicolas, J. J. (1992). Oxidation of chlorogenic acid, catechins, and 4-methylcatechol in model solutions by apple polyphenol oxidase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *40*(11), 2114-2122.
- Ridley, B. L., O'Neill, M. A., & Mohnen, D. (2001). Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry*, *57*(6), 929-967.
- Rigaud, J., Escribanobailon, M., Prieur, C., Souquet, J., & Cheynier, V. (1993). Normal-Phase High-Performance Liquid-Chromatographic Separation of Procyanidins from Cacao Beans and Grape Seeds. *Journal of Chromatography A*, *654*(2), 255-260.
- Rios, L. Y., Bennett, R. N., Lazarus, S. A., Rémésy, C., Scalbert, A., & Williamson, G. (2002). Cocoa procyanidins are stable during gastric transit in humans. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *76*(5), 1106-1110.
- Riou, V., Vernhet, A., Doco, T., & Moutounet, M. (2002). Aggregation of grape seed tannins in model wine—effect of wine polysaccharides. *Food Hydrocolloids*, *16*(1), 17-23.
- Robbins, R. J., Leonczak, J., Johnson, J. C., Li, J., Kwik-Urbe, C., Prior, R. L., & Gu, L. (2009). Method performance and multi-laboratory assessment of a normal phase high pressure liquid chromatography–fluorescence detection method for the quantitation of flavanols and procyanidins in cocoa and chocolate containing samples. *Journal of Chromatography A*, *1216*(24), 4831-4840.
- Ron, H., Matlis, S., & Rubinstein, I. (1998). Self-Assembled Monolayers on Oxidized Metals. 2. Gold Surface Oxidative Pretreatment, Monolayer Properties, and Depression Formation. *Langmuir*, *14*(5), 1116-1121.
- Rouet-Mayer, M.-A., Ralambosoa, J., & Philippon, J. (1990). Roles of o-quinones and their polymers in the enzymic browning of apples. *Phytochemistry*, *29*(2), 435-440.

- Roura, E., Andrés-Lacueva, C., Estruch, R., Lourdes Mata Bilbao, M., Izquierdo-Pulido, M., & Lamuela-Raventós, R. M. (2008). The effects of milk as a food matrix for polyphenols on the excretion profile of cocoa (-)-epicatechin metabolites in healthy human subjects. *The British journal of nutrition*, *100*(4), 846-851.
- Sakamoto, T., & Sakai, T. (1995). Analysis of structure of sugar-beet pectin by enzymatic methods. *Phytochemistry*, *39*(4), 821-823.
- Salas, E., Fulcrand, H., Poncet-Legrand, C., Meudec, E., Köhler, N., Winterhalter, P., & Cheynier, V. (2005). Isolation of flavanol-anthocyanin adducts by countercurrent chromatography. *Journal of chromatographic science*, *43*(9), 488-493.
- Sanoner, P., Guyot, S., Marnet, N., Molle, D., & Drilleau, J. F. (1999). Polyphenol profiles of French cider apple varieties (*Malus domestica* sp.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *47*(12), 4847-4853.
- Sastry, M. C. S., & Rao, M. S. N. (1990). Binding of chlorogenic acid by the isolated polyphenol-free 11 S protein of sunflower (*Helianthus annuus*) seed. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *38*(12), 2103-2110.
- Sato, Y., & Miyawaki, O. (2008). Analysis of Intermolecular Interaction among Pectin Molecules in Aqueous Sugar Solutions. *Food Science and Technology Research*, *14*(3), 232-238.
- Saura-Calixto, F., & Díaz-Rubio, M. E. (2007). Polyphenols associated with dietary fibre in wine: A wine Polyphenols gap? *Food Research International*, *40*(5), 613-619.
doi:10.1016/j.foodres.2006.11.005

- Saura-Calixto, F., Pérez-Jiménez, J., Touriño, S., Serrano, J., Fuguet, E., Torres, J. L., & Goñi, I. (2010). Proanthocyanidin metabolites associated with dietary fibre from in vitro colonic fermentation and proanthocyanidin metabolites in human plasma. *Molecular Nutrition & Food Research*, 54(7), 939–946.
- Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., Rémésy, C., & Jiménez, L. (2005). Dietary Polyphenols and the Prevention of Diseases. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45(4), 287-306.
- Schols, H. A., Bakx, E. J., Schipper, D., & Voragen, A. G. J. (1995a). A xylogalacturonan subunit present in the modified hairy regions of apple pectin. *Carbohydrate Research*, 279(0), 265-279.
- Schols, H. A., Vierhuis, E., Bakx, E. J., & Voragen, A. G. J. (1995b). Different populations of pectic hairy regions occur in apple cell walls. *Carbohydrate Research*, 275(2), 343-360.
- Schols, H., & Voragen, A. (1994). Hairy (ramified) Regions of Pectins .4. Occurrence of Pectic Hairy Regions in Various Plant-Cell Wall Materials and Their Degradability by Rhamnogalacturonase. *Carbohydrate Research*, 256(1), 83-95.
- Seaman J.F., Moore W.E., Mitchell R.L., M.A. et Millet. (1954). Techniques for determination of pulp constituents by quantitative paper chromatography. *TAPPI J.*, 37, 336-343.
- Selma, M. V., Espín, J. C., & Tomás-Barberán, F. A. (2009a). Interaction between Phenolics and Gut Microbiota: Role in Human Health. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(15), 6485-6501. doi:10.1021/jf902107d

- Selma, M. V., Espín, J. C., & Tomás-Barberán, F. A. (2009b). Interaction between Phenolics and Gut Microbiota: Role in Human Health. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(15), 6485-6501.
- Sengupta, B., & Sengupta, P. K. (2002). The interaction of quercetin with human serum albumin: a fluorescence spectroscopic study. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 299(3), 400-403.
- Seo, J. H., Adachi, K., Lee, B. K., Kang, D. G., Kim, Y. K., Kim, K. R., ... Cha, H. J. (2007). Facile and Rapid Direct Gold Surface Immobilization with Controlled Orientation for Carbohydrates. *Bioconjugate Chemistry*, 18(6), 2197-2201.
- Serafini, M., & Crozier, A. (2003). Nutrition: Milk and absorption of dietary flavanols. *Nature*, 426(6968), 788-788.
- Serra, A., Macià, A., Rubió, L., Anglès, N., Ortega, N., Morelló, J. R., ... Motilva, M.-J. (2013). Distribution of procyanidins and their metabolites in rat plasma and tissues in relation to ingestion of procyanidin-enriched or procyanidin-rich cocoa creams. *European Journal of Nutrition*, 52(3), 1029-1038.
- Serra, A., Macià, A., Romero, M.-P., Anglès, N., Morelló, J.-R., & Motilva, M.-J. (2011). Metabolic pathways of the colonic metabolism of procyanidins (monomers and dimers) and alkaloids. *Food Chemistry*, 126(3), 1127-1137.
- Serra, A., Macià, A., Romero, M.-P., Salvadó, M.-J., Bustos, M., Fernández-Larrea, J., & Motilva, M.-J. (2009). Determination of procyanidins and their metabolites in plasma samples by improved liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 877(11–12), 1169-1176.

- Shoji, Toshihiko, Masumoto, S., Moriichi, N., Akiyama, H., Kanda, T., Ohtake, Y., & Goda, Y. (2006). Apple Procyanidin Oligomers Absorption in Rats after Oral Administration: Analysis of Procyanidins in Plasma Using the Porter Method and High-Performance Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(3), 884-892.
- Shoji, T., Mutsuga, M., Nakamura, T., Kanda, T., Akiyama, H., & Goda, Y. (2003). Isolation and structural elucidation of some procyanidins from apple by low-temperature nuclear magnetic resonance. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(13), 3806-3813.
- Siavoshian, S., Segain, J.-P., Kornprobst, M., Bonnet, C., Cherbut, C., Galmiche, J.-P., & Blottière, H. M. (2000). Butyrate and trichostatin A effects on the proliferation/differentiation of human intestinal epithelial cells: induction of cyclin D3 and p21 expression. *Gut*, 46(4), 507-514.
- Siebert, K. J. (1999). Effects of Protein–Polyphenol Interactions on Beverage Haze, Stabilization, and Analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(2), 353-362.
- Siebert, K. J., Troukhanova, N. V., & Lynn, P. Y. (1996). Nature of Polyphenol–Protein Interactions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(1), 80-85.
- Simon, C., Barathieu, K., Laguerre, M., Schmitter, J.-M., Fouquet, E., Pianet, I., & Dufourc, E. J. (2003). Three-Dimensional Structure and Dynamics of Wine Tannin–Saliva Protein Complexes. A Multitechnique Approach†. *Biochemistry*, 42(35), 10385-10395.

- Singleton, V. L., Salgues, M., Zaya, J., & Trousdale, E. (1985). Caftaric Acid Disappearance and Conversion to Products of Enzymic Oxidation in Grape Must and Wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 36(1), 50-56.
- Skrt, M., Benedik, E., Podlipnik, Č., & Ulrih, N. P. (2012). Interactions of different polyphenols with bovine serum albumin using fluorescence quenching and molecular docking. *Food Chemistry*, 135(4), 2418-2424.
- Slimestad, R., & Solheim, H. (2002). Anthocyanins from Black Currants (*Ribes nigrum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(11), 3228-3231.
- Soares, S., Mateus, N., & de Freitas, V. (2012). Carbohydrates Inhibit Salivary Proteins Precipitation by Condensed Tannins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(15), 3966-3972.
- Soares, S. I., Gonçalves, R. M., Fernandes, I., Mateus, N., & de Freitas, V. (2009). Mechanistic Approach by Which Polysaccharides Inhibit α -Amylase/Procyanidin Aggregation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(10), 4352-4358.
- Soares, S., Mateus, N., & de Freitas, V. (2007). Interaction of Different Polyphenols with Bovine Serum Albumin (BSA) and Human Salivary α -Amylase (HSA) by Fluorescence Quenching. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(16), 6726-6735.
- Spellman, M. W., McNeil, M., Darvill, A. G., Albersheim, P., & Dell, A. (1983). Characterization of a structurally complex heptasaccharide isolated from the pectic polysaccharide rhamnogalacturonan II. *Carbohydrate Research*, 122(1), 131-153.
- Stoupi, S., Williamson, G., Drynan, J. W., Barron, D., & Clifford, M. N. (2010). Procyanidin B2 catabolism by human fecal microflora: Partial characterization of 'dimeric' intermediates. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 501(1), 73-78.

- Sun, B., Sá, M. de, Leandro, C., Caldeira, I., Duarte, F. L., & Spranger, I. (2013). Reactivity of Polymeric Proanthocyanidins toward Salivary Proteins and Their Contribution to Young Red Wine Astringency. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *61*(4), 939-946.
- Szejtli, J. (1998). Introduction and General Overview of Cyclodextrin Chemistry. *Chemical Reviews*, *98*(5), 1743-1754.
- Tagliacruzchi, D., Verzelloni, E., Bertolini, D., & Conte, A. (2010). In vitro bio-accessibility and antioxidant activity of grape polyphenols. *Food Chemistry*, *120*(2), 599-606.
- Tan, L., Eberhard, S., Pattathil, S., Warder, C., Glushka, J., Yuan, C., ... Mohnen, D. (2013). An Arabidopsis Cell Wall Proteoglycan Consists of Pectin and Arabinoxylan Covalently Linked to an Arabinogalactan Protein. *The Plant Cell Online*, *25*(1), 270-287.
- Thibault, J., Renard, C., Axelos, M., Roger, P., & Crepeau, M. (1993). Studies of the Length of Homogalacturonic Regions in Pectins by Acid-Hydrolysis. *Carbohydrate Research*, *238*, 271-286.
- Tomás-Barberán, F. A., & Clifford, M. N. (2000). Flavanones, chalcones and dihydrochalcones – nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *80*(7), 1073-1080.
- Tønnesen, H. H., Másson, M., & Loftsson, T. (2002). Studies of curcumin and curcuminoids. XXVII. Cyclodextrin complexation: solubility, chemical and photochemical stability. *International Journal of Pharmaceutics*, *244*(1-2), 127-135.
- Trombley, J. D., Loegel, T. N., Danielson, N. D., & Hagerman, A. E. (2011). Capillary electrophoresis methods for the determination of covalent polyphenol-protein complexes. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *401*(5), 1527-1533.

- Trowell, H. (1973). Dietary fibre, coronary heart disease and diabetes mellitus. 1. Historical aspects of fibre in the food of Western man. *Plant Foods for Man*, 1(1).
- Turnbull, W. B., & Daranas, A. H. (2003). On the Value of c: Can Low Affinity Systems Be Studied by Isothermal Titration Calorimetry? *Journal of the American Chemical Society*, 125(48), 14859-14866.
- Tzounis, X., Vulevic, J., Kuhnle, G. G. C., George, T., Leonczak, J., Gibson, G. R., Spencer, J. P. E. (2008). Flavanol monomer-induced changes to the human faecal microflora. *British Journal of Nutrition*, 99(04), 782-792.
- Ulman, A. (1996). Formation and Structure of Self-Assembled Monolayers. *Chemical Reviews*, 96(4), 1533-1554.
- Valent, B. S., & Albersheim, P. (1974). The Structure of Plant Cell Walls V. On the Binding of Xyloglucan to Cellulose Fibers. *Plant Physiology*, 54(1), 105-108.
- Vernhet, A., Pellerin, P., Prieur, C., Osmianski, J., & Moutounet, M. (1996). Charge Properties of Some Grape and Wine Polysaccharide and Polyphenolic Fractions. *American Journal of Enology and Viticulture*, 47(1), 25-30.
- Vidal, S., Doco, T., Williams, P., Pellerin, P., York, W. S., O'Neill, M. A., Albersheim, P. (2000). Structural characterization of the pectic polysaccharide rhamnogalacturonan II: evidence for the backbone location of the aceric acid-containing oligoglycosyl side chain. *Carbohydrate Research*, 326(4), 277-294.
- Vidal, S., Francis, L., Noble, A., Kwiatkowski, M., Cheynier, V., & Waters, E. (2004). Taste and mouth-feel properties of different types of tannin-like polyphenolic compounds and anthocyanins in wine. *Analytica Chimica Acta*, 513(1), 57-65.

- Vincken, J.-P., Schols, H. A., Oomen, R. J. F. J., McCann, M. C., Ulvskov, P., Voragen, A. G. J., & Visser, R. G. F. (2003). If Homogalacturonan Were a Side Chain of Rhamnogalacturonan I. Implications for Cell Wall Architecture. *Plant Physiology*, *132*(4), 1781-1789.
- Voragen, A. G. J., Coenen, G.-J., Verhoef, R. P., & Schols, H. A. (2009). Pectin, a versatile polysaccharide present in plant cell walls. *Structural Chemistry*, *20*(2), 263-275.
- Voragen, A. G. J., Pilnik, W., Thibault, J. F., Axelos, M. A. V., and Renard, C. M. G. C. (1995). Pectins. In *Food Polysaccharides and Their Applications*. (Stephen A. M., p. 287- 369).
- Wang, Y., Liu, J., Chen, F., & Zhao, G. (2013). Effects of Molecular Structure of Polyphenols on Their Noncovalent Interactions with Oat β -glucan. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *61*(19), 4533-4538.
- Wang, S.-H., Liu, F.-F., Dong, X.-Y., & Sun, Y. (2010). Thermodynamic Analysis of the Molecular Interactions between Amyloid β -Peptide 42 and (-)-Epigallocatechin-3-gallate. *The Journal of Physical Chemistry B*, *114*(35), 11576-11583.
- Wang, X., Ho, C.-T., & Huang, Q. (2007). Investigation of Adsorption Behavior of (-)-Epigallocatechin Gallate on Bovine Serum Albumin Surface Using Quartz Crystal Microbalance with Dissipation Monitoring. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *55*(13), 4987-4992.
- Whitesides, G. M., & Krishnamurthy, V. M. (2005). Designing ligands to bind proteins. *Quarterly Reviews of Biophysics*, *38*(04), 385-395.
- Williamson, G., & Clifford, M. N. (2010). Colonic metabolites of berry polyphenols: the missing link to biological activity? *British Journal of Nutrition*, *104*, S48-S66.

- Wojdyło, A., Oszmiański, J., & Laskowski, P. (2008). Polyphenolic Compounds and Antioxidant Activity of New and Old Apple Varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(15), 6520-6530.
- Wong, D. (2008). Enzymatic Deconstruction of Backbone Structures of the Ramified Regions in Pectins. *The Protein Journal*, 27(1), 30-42.
- Wróblewski, K., Muhandiram, R., Chakrabartty, A., & Bennick, A. (2001). The molecular interaction of human salivary histatins with polyphenolic compounds. *European Journal of Biochemistry*, 268(16), 4384-4397.
- Xiao, J., Zhao, Y., Wang, H., Yuan, Y., Yang, F., Zhang, C., & Yamamoto, K. (2011). Noncovalent Interaction of Dietary Polyphenols with Common Human Plasma Proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(19), 10747-10754.
- Xiao, J., Suzuki, M., Jiang, X., Chen, X., Yamamoto, K., Ren, F., & Xu, M. (2008). Influence of B-Ring Hydroxylation on Interactions of Flavonols with Bovine Serum Albumin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(7), 2350-2356.
- Yan, C., Xiu, Z., Li, X., & Hao, C. (2007). Molecular modeling study of β -cyclodextrin complexes with (+)-catechin and (-)-epicatechin. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 26(2), 420-428.
- Yan, Q., & Bennick, A. (1995). Identification of histatins as tannin-binding proteins in human saliva. *The Biochemical journal*, 311 (Pt 1), 341-347.
- Yao, J.-W., Lin, F., Tao, T., & Lin, C.-J. (2011). Affinity interactions between natural pigments and human whole saliva. *Archives of Oral Biology*, 56(3), 285-293.
- Yapo, B. M. (2011). Rhamnogalacturonan-I: A Structurally Puzzling and Functionally Versatile Polysaccharide from Plant Cell Walls and Mucilages. *Polymer Reviews*, 51(4), 391-413.

- Yeap Foo, L., & Lu, Y. (1999). Isolation and identification of procyanidins in apple pomace. *Food Chemistry*, 64(4), 511-518.
- Yokozawa, T., Chen, C. P., Dong, E., Tanaka, T., Nonaka, G.-I., & Nishioka, I. (1998). Study on the Inhibitory Effect of Tannins and Flavonoids against the 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl Radical. *Biochemical Pharmacology*, 56(2), 213-222.
- Yoneda, S., & Nakatsubo, F. (1998). Effects of the Hydroxylation Patterns and Degrees of Polymerization of Condensed Tannins on their Metal-Chelating Capacity. *Journal of Wood Chemistry and Technology*, 18(2), 193-205.
- Zanchi, D., Konarev, P. V., Tribet, C., Baron, A., Svergun, D. I., & Guyot, S. (2009). Rigidity, conformation, and solvation of native and oxidized tannin macromolecules in water-ethanol solution. *The Journal of Chemical Physics*, 130(24), 245103-245103-13.
- Zhang, Q.-F., Cheung, H.-Y., Shanguan, X., & Zheng, G. (2012). Structure selective complexation of cyclodextrins with five polyphenols investigated by capillary electrokinetic chromatography. *Journal of Separation Science*, 35(23), 3347-3353.
- Zhao, G.-Y., Diao, H.-J., & Zong, W. (2013). Nature of pectin-protein-catechin interactions in model systems: Pectin-protein-catechin interactions. *Food Science and Technology International*, 19(2), 153-165.
- Zykwinska, A., Thibault, J.-F., & Ralet, M.-C. (2008). Competitive binding of pectin and xyloglucan with primary cell wall cellulose. *Carbohydrate Polymers*, 74(4), 957-961.
- Zykwinska, A., Thibault, J.-F., & Ralet, M.-C. (2007). Organization of pectic arabinan and galactan side chains in association with cellulose microfibrils in primary cell walls and related models envisaged. *Journal of Experimental Botany*, 58(7), 1795-1802.

Zykwinska, A., Rondeau-Mouro, C., Garnier, C., Thibault, J.-F., & Ralet, M.-C. (2006).

Alkaline extractability of pectic arabinan and galactan and their mobility in sugar beet and potato cell walls. *Carbohydrate Polymers*, 65(4), 510-520.

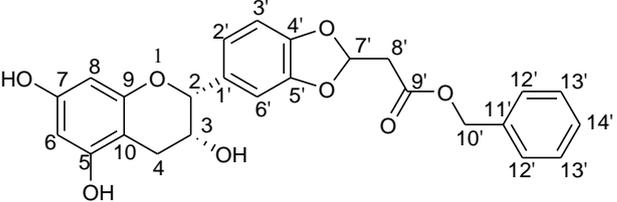
Zykwinska, A. W., Ralet, M.-C. J., Garnier, C. D., & Thibault, J.-F. J. (2005). Evidence for In

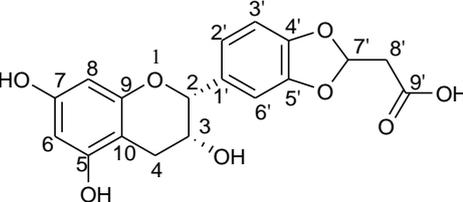
Vitro Binding of Pectin Side Chains to Cellulose. *Plant Physiology*, 139(1), 397-407.

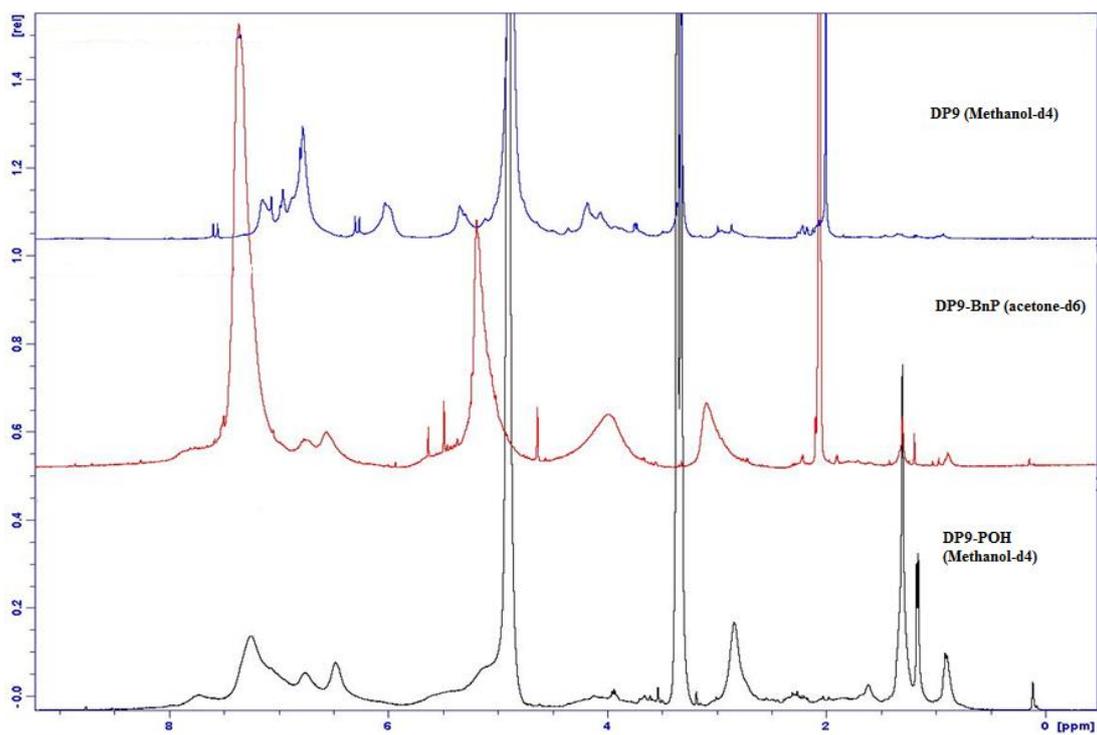
Annexes

Partie Résultats et Discussion :

Partie 1 : Caractérisation RMN des procyanidines après modification par un linker benzyle et déprotection.

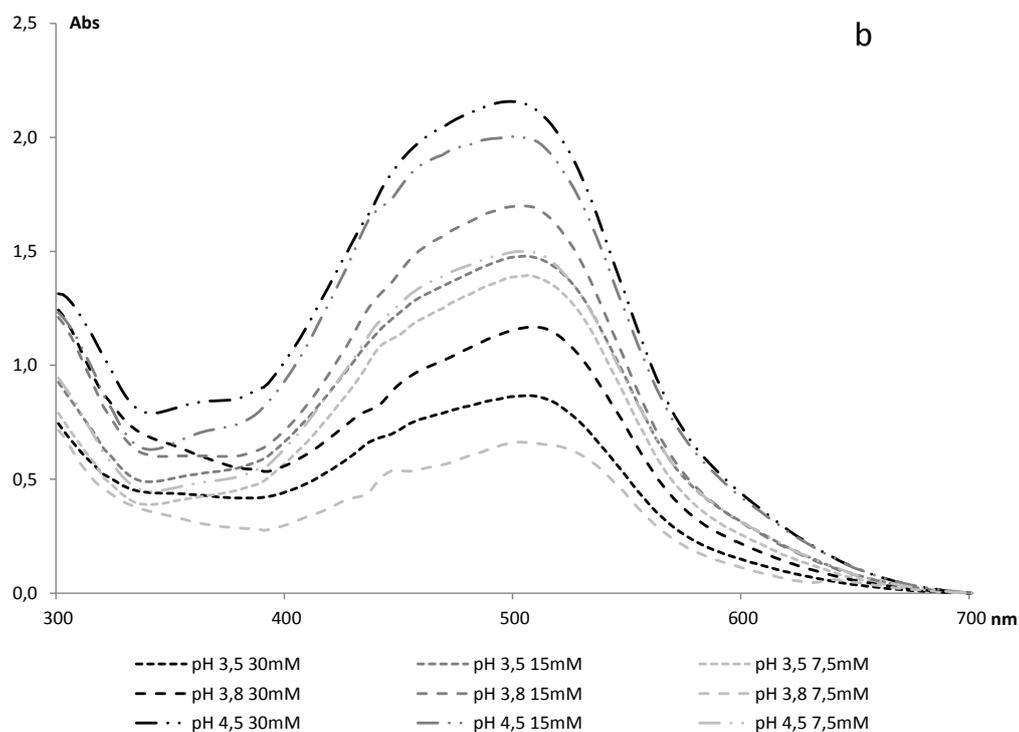
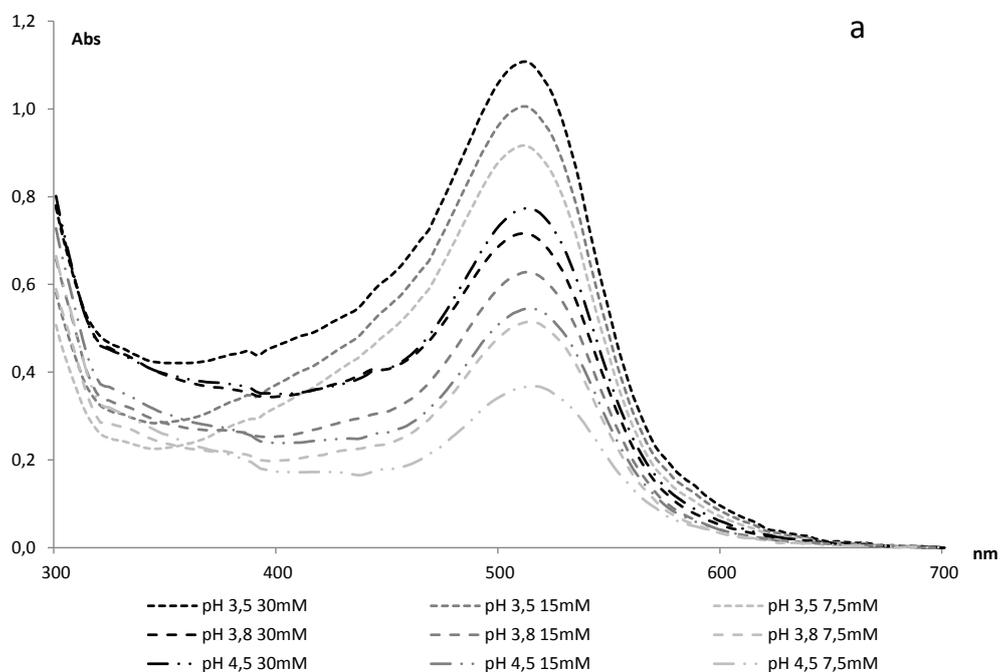
	<p>EPI-BnP</p> <ul style="list-style-type: none"> · MM : 450,4 g.mol-1 · ME : 450,1315 · FM : C25H22O8
<p>¹H RMN (acétone-d₆, 300 MHz, d ppm) : d 2,76 (dd, 3J_{4-3cis}= 3,0 Hz, 2J_{4-4trans}= 16,8 Hz, H_{4-cis}), 2,89 (dd, 3J_{4-3trans}= 4,5 Hz, 2J_{4-4trans}= 16,6 Hz, H_{4-trans}), 3,11 (d, 3J_{8'-7'} = 5,1 Hz, 2 H_{8'}), 3,77 (d, 3J = 5,7 Hz, OH₃), 4,22-4,24 (m, H₃), 4,94 (sl, H₂), 5,20 (s, 2 H_{10'}), 5,95 (d, 4J₆₋₈ = 2,1 Hz, H₆), 6,04 (d, 4J₈₋₆ = 2,3 Hz, H₈), 6,57 (t, 3J_{7'-8'} = 5,2 Hz, H_{7'}), 6,80 (d, 3J_{3'-2'} = 8,1 Hz, H_{3'}), 6,97-7,00 (m, H_{2'}), 7,10 (sl, H_{6'}) 7,33-7,42 (m, H_{12'}, H_{13'} et H_{14'}), 8,00 (s, OH 7 ou 5), 8,17 (s, OH 7 ou 5).</p>	
<p>¹³C RMN (acétone-d₆, 75,5 MHz, d ppm) : d 168,3 (C_{9'}), 157,2 (C₇), 157,2 (C₉), 156,5 (C₅), 147,4 (C_{5'}), 146,9 (C_{4'}), 136,0 (C_{11'}), 134,4 (C_{1'}), 128,9 (C_{12'}), 128,6 (C_{13'}), 128,5 (C_{14'}), 120,8 (C_{2'}), 108,7 (C_{3'}), 108,3 (C_{7'}), 108,0 (C_{6'}), 99,3 (C₁₀), 95,9 (C₆), 95,3 (C₈), 79,0 (C₂), 66,6 (C_{10'}), 66,5 (C₃), 40,2 (C_{8'}), 28,7 (C₄).</p>	

	<p>EPI-POH</p> <ul style="list-style-type: none"> · MM : 360,3 g.mol-1 · ME : 360,0845 · FM : C₁₈H₁₆O₈
<p>¹H RMN (acétone-d₆, 300 MHz, d ppm) : d 2,73-2,97 (m, 2 H₄), 3,02 (d, 3J_{8'-7'} = 5,3 Hz, 2 H_{8'}), 4,23 (sl, H₃), 4,94 (sl, H₂), 5,94 (d, 4J₆₋₈ = 2,1 Hz, H₆), 6,03 (d, 4J₈₋₆ = 2,3 Hz, H₈), 6,53 (t, 3J_{7'-8'} = 5,3 Hz, H_{7'}), 6,80 (d, 3J_{3'-2'} = 8,0 Hz, H_{3'}), 6,97-6,99 (m, H_{2'}), 7,08 (sl, H_{6'}).</p>	
<p>¹³C RMN (acétone-d₆, 75,5 MHz, d ppm) : d 169,5 (C_{9'}), 157,3 (C₇), 157,2 (C₉), 156,6 (C₅), 147,5 (C_{5'}), 147,0 (C_{4'}), 134,3 (C_{1'}), 120,8 (C_{2'}), 109,0 (C_{3'}), 108,3 (C_{7'}), 108,0 (C_{6'}), 99,3 (C₁₀), 95,9 (C₆), 95,4 (C₈), 79,0 (C₂), 66,5 (C₃), 40,1 (C_{8'}), 28,8 (C₄).</p>	



Partie 2 : Interactions entre anthocyanes et pectines

- Spectres d'absorbance des homogalacturonanes déméthylés à pH et concentrations variables avec la cyanidine-3-O-glucoside (a) et la delphinidine-3-O-glucoside (b) à 3 mmol/L.



- Spectres d'absorbance des zones hérissées à 30 mmol/L dans le tampon citrate / phosphate à pH 3,8 et FI 0,1 mol/L à 25 °C.

