



HAL
open science

Étude des propriétés biologiques des constituants des vins de Champagne

David Vauzour

► **To cite this version:**

David Vauzour. Étude des propriétés biologiques des constituants des vins de Champagne. Autre [q-bio.OT]. Université Montpellier I, 2004. Français. NNT : . tel-00460764

HAL Id: tel-00460764

<https://theses.hal.science/tel-00460764>

Submitted on 2 Mar 2010

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.

UNIVERSITÉ MONTPELLIER 1

UNITES DE FORMATION ET DE RECHERCHE PHARMACEUTIQUES

ÉTUDE DES PROPRIÉTÉS BIOLOGIQUES DES CONSTITUANTS DES VINS DE CHAMPAGNE

Thèse présentée pour obtenir le grade de :

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ MONTPELLIER 1

ÉCOLE DOCTORALE : Sciences Chimiques et Biologiques pour la Santé

FORMATION DOCTORALE : Interface Chimie Biologie : Systèmes Moléculaires à
visée Thérapeutique

N° DISCIPLINE : 50

N° DE SECTION DU CNU : 40

SPÉCIALITÉ : Pharmacognosie

PAR

M. David VAUZOUR

Maître en Biochimie Moléculaire et Cellulaire

Soutenue le 17 décembre 2004 devant le jury composé de :

M. Elias CASTANAS	Professeur, Université de Crète	Examineur
M. Bruno DUTEURTRE	Docteur, Société Moët et Chandon	Examineur
M. Djavad MOSSALAYI	Professeur, Université Bordeaux 2	Rapporteur
M. Jean-François ROSSI	Professeur, Université Montpellier 1	Président
M. Joseph VERCAUTEREN	Professeur, Université Montpellier 1	Directeur de Thèse
M. Michael WINK	Professeur, Université d'Heidelberg	Rapporteur

UNIVERSITE MONTPELLIER I

Présidente : Mme le Professeur Dominique DEVILLE de PERIERE

FACULTE DE PHARMACIE

Doyen : Professeur Alain TEROL

PROFESSEURS DES UNIVERSITES

Rentrée 2004

M.	ANDARY	Claude	Botanique et Cryptogamie
M.	AUDRAN	Michel	Physique et Biophysique
M.	BATAILLE	Bernard	Energétique et Génie des Procédés
Mme	BILAK	Estelle	Bactériologie et Virologie
M.	BLAISE	Alain	Oenologie
M.	BONNET	Pierre	Chimie Organique
M.	BOUDEVILLE	Philippe	Chimie Générale et Minérale
Mme	BRES	Janine	Pharmacocinétique
M.	BROUILLET	Jean-Paul	Biochimie Générale et Clinique
Mme	CASELLAS	Claude	Sciences de l'Environnement
Mme	CASSANAS	Geneviève	Physique Industrielle et Traitement de l'Information
M.	CHAPAT	Jean-Pierre	Chimie Organique
M.	CROS	Gérard	Pharmacologie
M.	DELARBRE	Jean-Louis	Physique Moléculaire et Structurale
M.	DELONCA	Henri	Technique Pharmaceutique Industrielle
M.	DEVOISSELLE	Jean-Marie	Technique Pharmaceutique Industrielle
M.	ESCALE	Roger	Chimie Organique
Mlle	FABRE	Huguette	Chimie Analytique et Bromatologie
M.	FULCRAND	Pierre	Chimie Thérapeutique
M.	GALLEYRAND	Jean-Claude	Physique et Biophysique
M.	GIAIMIS	Jean	Immunologie, Parasitologie et Mycologie Médicale
M.	GORENFLOT	André	Biologie cellulaire et Moléculaire
M.	GRASSY	Gérard	Chimie Organique
M.	GRIMMONPREZ	Louis	Biochimie Générale et Clinique
M.	GRIS	Jean-Christophe	Hématologie
Mlle	HANSEL	Sylvie	Pharmacie Clinique
Mme	MAILLOLS	Hélène	Technique Pharmaceutique Industrielle

Mme	MALLIE	Michèle	Immunologie, Parasitologie et Mycologie Médicale
M.	MARTINEZ	Jean	Pharmachimie
M.	MAURY	Luc	Physique Moléculaire et Structurale
M.	MICHEL	Alain	Pharmacologie
M.	MODAT	Guy	Physiologie
Mme	MONLEAUD	Jacqueline	Droit et Economie de la Santé
Mme	MULLER	Agnès	Physiologie/Histologie-Pathologie
M.	PELISSIER	Yves	Pharmacognosie
Mme	PICOT	Bernadette	Sciences de l'Environnement et Santé Publique
M.	PRECIGOUT	Eric	Biologie Cellulaire et Moléculaire
M.	PUEL	Jean-Luc	Physique et Biophysique - Audioprothèse
M.	RAMBAUD	André	Sciences de l'Environnement et Santé Publique
Mlle	RAPIOR	Sylvie	Botanique et Cryptogamie
M.	RAYNAUD	Eric	Biochimie
M.	ROSSI	Jean-Claude	Chimie Organique
M.	ROUMESTAND	Christian	Biochimie Structurale
M.	ROUSSEL	Jean-Louis	Botanique et Cryptogamie
Mme	SIMEON DE BUOCHBERG	Michèle	Bactériologie et Virologie
M.	TEROL	Alain	Chimie Générale et Minérale
M.	VERCAUTEREN	Joseph	Pharmacognosie
Mlle	VIAN	Laurence	Toxicologie
M.	ZINE	Azel	Audioprothèse

UNIVERSITE MONTPELLIER I

Présidente : Mme le Professeur Dominique DEVILLE de PERIERE

FACULTE DE PHARMACIE

Doyen : Professeur Alain TEROL

MAITRES DE CONFERENCES

Rentrée 2004

M.	AKNINE	Achour	Physique Biophysique – Audioprothèse
M.	ALLAIN	Philippe	Pharmacognosie
Mme	ARMYNOT DU CHATELET	Anne-Marie	Bactériologie et Virologie
Mme	ARTIS	Anne-Marie	Chimie Thérapeutique
Mme	AUBERT-POUESSEL	Anne	Pharmacie Galénique
M.	BEGEL	Michel	Didactique Physiologie
Mme	BEGU	Sylvie	Technique Pharmaceutique Industrielle
M.	BERGE	Gilbert	Chimie Thérapeutique
M.	BERTOUT	Sébastien	Immunologie-Parasitologie et Mycologie Médicale
Mme	BICHON	Florence	Pharmacologie
Mlle	BLANCHIN	Marie-Dominique	Chimie Analytique et Bromatologie
Mme	BLONDEL	Mary	Chimie Analytique et Bromatologie
M.	BOMPART	Jacques	Chimie Organique
M.	BOUDARD	Frédéric	Immunologie
Mme	BOURRET	Evelyne	Physique Moléculaire et Structurale
Mlle	BRESSOLLE	Françoise	Pharmacocinétique
M.	CARCY	Bernard	Biologie Cellulaire et Moléculaire
Mme	CASADEBAIG	Jacqueline	Pharmacie Galénique
Mme	CASTEX	Françoise	Immunologie
Mlle	CHATEAU	Marie-Thérèse	Biologie Cellulaire
M.	CHAUVET	Alain	Chimie Générale et Minérale
M.	CHAVANIEU	Alain	Biochimie Structurale
Mlle	CHOQUET	Armelle	Toxicologie
Mme	COCIGLIO	Marylène	Pharmacologie
Mlle	COHEN	Pascale	Immunologie
Mme	COSSON	Laurence	Botanique et Cryptogamie
M.	COUDANE	Jean	Chimie des Matériaux
Mme	CUQ	Catherine	Pharmacologie
M.	CUQ	Pierre	Toxicologie

M.	DARMANADEN	Roland	Chimie Thérapeutique
M.	DELBECQ	Stéphane	Biologie Cellulaire et Moléculaire
M.	DURAND	Denis	Chimie Générale et Minérale
M.	DURU	Christian	Pharmacie Galénique
Mlle	DUSART	Ghislaine	Bactériologie et Virologie
M.	EL GHZAOUI	Abdelsam	Physique Industrielle et Traitement de l' Information
M.	ENGEL	Robert	Chimie des Matériaux
M.	EVARD	Alexandre	Toxicologie
Mme	FABRE	Françoise	Physiologie
M.	FARINES	Vincent	Chimie analytique, Oenologie
Mme	FAVEREAU	Danièle	Biochimie Générale et Clinique
Mlle	FENET	Hélène	Chimie analytique et Bromatologie
Mme	FINE	Françoise	Toxicologie
Mme	FLORAC	Marie-Elisabeth	Botanique et Cryptogamie
M.	FOULONGNE	Vincent	Bactériologie et Virologie
Mme	FOURCROY	Stella	Physiologie
Mme	FOURNAJOUX	Josyane	Physique et Biophysique
M.	GAGNE	Didier	Biochimie Générale et Clinique
M.	GARREAU	Henri	Chimie des Matériaux
M.	GAUDY	Daniel	Pharmacie Clinique
Mme	GOMEZ HERNANDEZ	Maria Elena	Sciences de l'Environnement
Mme	GOZE	Catherine	Chimie Thérapeutique
Mme	GUIBAL	Jacqueline	Immunologie
Mme	GUIBERT	Marie-Sophie	Physique et Biophysique
Mme	GUIDICELLI	Claudette	Biochimie et Biologie Moléculaire
Mme	ILLES	Suzanne	Sciences de l'Environnement et Santé Publique
M.	JEANJEAN	Bernard	Chimie Générale et Minérale
M.	LAGET	Jean-Pierre	Technique Pharmaceutique Industrielle
Mlle	LAMBERT	Karen	Biochimie Générale et Nutrition
M.	LARROQUE	Michel	Chimie Analytique et Bromatologie
M.	LASSERRE	Yves	Pharmacie Galénique
M.	LISOWSKI	Vincent	Chimie Thérapeutique
Mme	MARION	Chantal	Pharmacognosie
Mme	MARY	Sophie	Biochimie Générale et Clinique
Mme	MASQUEFA	Carine	Chimie Organique
Mme	MENAGE	Karina	Biologie Cellulaire et Moléculaire
M.	MERCIER	Eric	Hématologie
M.	MESTRES	Jean-Paul	Chimie Analytique
Mme	MESTRES	Gilberte	Technique Pharmaceutique Industrielle
Mme	MILHAU	Jacqueline	Pharmacologie

M.	MILHAVET	Jean-Claude	Chimie Organique
Mme	NIELLOUD	Françoise	Technique Pharmaceutique Industrielle
Mlle	NURIT	Josyane	Chimie Générale et Minérale
Mlle	PERRIN	Catherine	Chimie Analytique
M.	PERSONNE	Christian	Bactériologie et Virologie
Mlle	PEYRIERE	Hélène	Pharmacie Clinique
Mme	PHAM	Tuyet Nga	Physique et Biophysique
M.	POUCHERET	Patrick	Pharmacologie
M.	SABATIER	Robert	Physique Moléculaire et Structurale
Mme	SALHI	Sharon	Immunologie
M.	SUBRA	Gilles	Pharmachimie
M.	SUSPLUGAS	Paul	Pharmacognosie
Mlle	TEYSSIER	Corinne	Bactériologie et Virologie
M.	TEISSEDRE	Pierre-Louis	Chimie Analytique et Bromatologie
M.	VACHOUD	Laurent	Physique Moléculaire et Structurale
Mlle	VIE	Marie-Thérèse	Physique et Biophysique
Mlle	VIGOR	Claire	Pharmacognosie
Mlle	VIVIEN	Myrtille	Physique Industrielle et Traitement de l'Information
Mlle	VO HOANG	Yen	Chimie Organique

Voici venu le temps de l'exercice des remerciements. Peut-être est-ce le plus difficile dans une thèse ! En effet, chaque personne qui y est citée mérite la plus belle phrase alors que rares sont les docteurs ou futurs docteurs à avoir de réels talents littéraires... Ainsi, comme tout un chacun, je vais essayer de faire au mieux et que tous les gens qui me liront sachent que ces pages ont été écrites avec tout mon coeur.

*Je voudrais exprimer ici ma plus sincère gratitude au **Professeur Joseph Vercauteren**, pour m'avoir donné une chance en m'acceptant au sein de son équipe depuis le DEA, et de m'avoir permis de travailler sur cette thèse et sur bien d'autres sujets passionnants. Je le remercie particulièrement pour m'avoir fait confiance et encouragé tout au long de ces années, et surtout pour m'avoir laissé une grande liberté de pensée et d'expression, ainsi qu'une totale autonomie dans l'organisation et la réalisation de mes travaux. Son soutien n'a pas seulement été d'ordre scientifique, mais aussi humain, par son enthousiasme, son dynamisme, sa motivation sans faille et sa générosité, que ce soit dans le cadre du laboratoire, ou celui, plus général, de notre qualité de vie à Montpellier.*

*Je remercie également les membres de l'équipe du CIVC, sans laquelle ce projet n'aurait évidemment pas vu le jour, pour m'avoir accordé leur confiance, et m'avoir permis de travailler dans une ambiance chaleureuse : **Fabienne Peters** pour sa disponibilité et sa gentillesse, **Bruno Duteurtre**, **Bertrand Robillard** et **Dominique Tusseau** pour leur regard, leurs commentaires scientifiques et l'intérêt constant qu'ils ont porté à mes travaux pendant ces trois années.*

*Je suis profondément reconnaissant à tous ceux qui ont su se mobiliser autour de mes recherches, et m'apporter non seulement leur expertise technique, mais aussi leur temps et leurs conseils avisés, contribuant ainsi à la qualité de mon travail et de ma formation. Merci au **Professeur Jean-François Rossi** pour tout l'intérêt qu'il a pu porter à cette thèse, m'ouvrant ainsi de nouvelles perspectives de recherches par l'accès à de nombreuses plates-formes techniques. Merci au **Docteur Catherine Barjot**, qui, sans compter son temps et son énergie, m'a initié avec patience et enthousiasme aux subtilités de la culture cellulaire cancéreuse. Je tiens également à remercier le **Docteur Roland Zini**, non seulement pour notre collaboration scientifique, mais également pour son accueil à l'Université de Médecine de Créteil. Merci encore à **Emmanuelle Meudec** et **Jean-Marc Souquet** pour leur disponibilité et leur soutien technique lors de mes passages fréquents à l'ENSA.M.*

*Je tiens à remercier tout particulièrement le **Professeur Elias Castanas** pour son accueil à la Faculté de Médecine d'Héraclion. Sa disponibilité et son efficacité ont permis à ce séjour a d'être particulièrement fructueux en terme de résultats. Son accueil chaleureux et la découverte de la gastronomie crétoise ont contribué à faire de ce séjour un moment inoubliable. Une mention spéciale à toute son équipe, en particulier **Phoebe**, **Ismène**, **Marilena**, **Despina**, **Olga**, **Takis**, **Niki** et **Kiki**, qui, sans compter la qualité de leur accueil crétois, n'ont pas hésité à se faire piquer 8 fois de suite pour me permettre de mener à bien mes mesures d'activités in vivo, tout cela sans se départir de leur bonne humeur.*

*Mes plus grands remerciements vont aussi à toute l'équipe avec laquelle j'ai partagé ces quelques années. Il y a bien sur mes co-expatriés de Bordeaux, **Chantal** et **Jocelyn**, pour avoir partagé ensemble l'aventure Montpelliéraine ; nos fous rires, nos coups de gueule ont développé un esprit d'équipe bien utile dans les moments difficiles. Je remercie également ceux qui sont plus fraîchement arrivés enrichir notre équipe à Montpellier : **Antoine** qui a parfois fait les frais de mon sens de l'humour douteux, **Audrey** qui a supporté sans faillir mon encadrement lors de son DEA, et bien sûr **Sylvie**, pour sa bonne humeur et son soutien, bien qu'elle ait contribué d'une façon certaine à augmenter ma consommation de cigarettes et mon taux de gamma GT.*

*Je tiens également à remercier chaleureusement les Professeurs **Djavad Mossalayi** et **Michael Wink** qui m'ont fait l'honneur d'accepter de me consacrer du temps et de porter leur jugement expert sur ce travail.*

*A mes vieux compagnons d'armes bordelais, **Benoit, Wilfried, Julie et Fanny**, pour leur soutien indéfectible et le plaisir des retrouvailles canaulaises, merci. Pas la peine de dissenter, vous êtes des amis, des vrais. Faisons que notre amitié résiste au temps qui passe et aux kilomètres qui nous séparent...*

*A mon ami de toujours, **Franck**, et tout ce qu'il continue à m'apporter malgré la distance, à **Nathalie et Philippe, Fabienne et Hugues, Eric, Nadège et Charly, Julien**, avec qui j'espère pouvoir continuer à partager des moments très agréables, merci.*

*Merci également au petit groupe de joyeux lurons que l'aventure montpelliéraine nous a permis de rencontrer. Hé oui, bien que ce soit toujours le sud, Montpellier c'est pas bien... mais c'est pas grave. Votre amitié nous a bien aidé à faire passer la pilule. Merci donc aux Montpelliérains pur souche ou également en transit : **Laetitia et David, Sylvain, Sandra, Isabelle, Agnès, Sylvie et Jean** (n'oublie pas, bientôt **Khò-Lantha**), **Séverine et Olivier**.*

*Mes pensées finales reviendront à **ma mère et mon père** qui m'ont soutenus pendant toutes ces années, chacun à leur manière, et sans qui je n'aurais pas pu aller au bout de mes projets..., ainsi qu'à mes deux frères, **Alexandre et Benjamin** et à l'ensemble de ma famille. Ils constituent le socle solide qui m'a permis d'arriver là où je suis. Il va sans dire que je n'oublie pas ceux qui sont devenus au fil des années bien plus qu'une belle-famille : **Romain et Surimi, Emilie, Xavier** et la petite **Jeanne, Julie, Benjamin, Marie et Quentin**.*

*Cette thèse t'es dédiée, à toi, **Sophie**, qui a toujours été à mes côtés pour me soutenir, m'encourager, et pour compenser mes faiblesses littéraires... Sans toi, je ne serais certainement pas en train d'écrire ces lignes. Je n'ai pas de mots pour te dire à quel point je te remercie, pour tout. Mais, tu le sais, le plus beau est à venir pour nous... Il nous reste la vie entière pour en profiter. Merci...*

liste des communications	XVII
liste des abréviations	XXI
liste des figures	XXIII
liste des tableaux	XXV
INTRODUCTION	1
PREMIÈRE PARTIE : ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE	3
INTRODUCTION	5
1. L'ÉLABORATION DU CHAMPAGNE	6
1.1. LES CÉPAGES	6
1.2. LE PROCESSUS D'ÉLABORATION	6
2. LES CONSTITUANTS DES VINS DE CHAMPAGNE	8
2.1. L'ÉTHANOL.....	9
2.2. LES POLYOLS	9
2.3. LES PROTÉINES	9
2.4. LES PEPTIDES	10
2.5. LES LIPIDES.....	10
2.6. LES NUCLÉOTIDES MONOPHOSPHATES	10
2.7. LES ACIDE ORGANIQUES	10
2.8. LES ÉLÉMENTS MINÉRAUX.....	11
2.9. LES POLYPHÉNOLS.....	11
2.9.1 <i>Voies biogénétiques menant aux différentes classes de polyphénols</i>	11
2.9.2 <i>Les polyphénols du vin de Champagne</i>	13
3. LES ESPÈCES OXYGÉNÉES ET CARBONYLÉES RÉACTIVES	18
3.1. L'OXYGÈNE ET LA VIE	18
3.2. LES « ESPÈCES OXYGÉNÉES RÉACTIVES ».....	18
3.2.1 <i>Formes activées par les UV</i>	19
3.2.2 <i>Formes issues de réductions radicalaires</i>	19
3.2.3 <i>Origine et rôle biologique des radicaux libres</i>	20
3.3. LES « ESPÈCES CARBONYLÉES RÉACTIVES ».....	21
3.3.1 <i>La « réaction de Maillard » in vivo</i>	21
3.3.2 <i>Conséquences cellulaires et tissulaires de la réaction de Maillard in vivo</i>	23
3.4. LES PATHOLOGIES ASSOCIÉES AU DÉSÉQUILIBRE OXYDATIF	24
3.4.1 <i>Les défenses antioxydantes physiologiques</i>	26
3.4.2 <i>Les antioxydants apportés par l'alimentation</i>	27
4. PROPRIÉTÉS BIOLOGIQUES ET MÉTABOLISME DES POLYPHÉNOLS	28
4.1. MÉTABOLISME ET BIODISPONIBILITÉ	28
4.1.1 <i>Métabolisme des cellules du système nerveux central</i>	29
4.1.2 <i>Métabolisme des cellules cancéreuses</i>	31
4.2. PROPRIÉTÉS BIOLOGIQUES DES POLYPHÉNOLS	33
4.2.1 <i>Polyphénols et cancer</i>	33
4.2.2 <i>Polyphénols et neuroprotection</i>	43
CONCLUSION	46
DEUXIÈME PARTIE : TRAVAUX PERSONNELS	47
INTRODUCTION	48
1. ISOLEMENT DES MOLÉCULES ACTIVES DES VINS DE CHAMPAGNE	49
1.1. INTRODUCTION	49
1.2. DÉTERMINATION DE LA MÉTHODE D'ACCÈS AUX EVC	50
1.2.1 <i>Extraction par démixtion eau/alcool</i>	51
1.2.2 <i>Extraction après lyophilisation</i>	51

1.2.3	<i>Extraction par des solvants à polarité croissante</i>	51
1.2.3.1	<i>Extraction par l'hexane (EVC-SPC-h)</i> :	51
1.2.3.2	<i>Extraction par le chloroforme (EVC-SPC-chloro)</i> :	52
1.2.3.3	<i>Extraction par le dichlorométhane (EVC-SPC-dichlo)</i> :	52
1.2.3.4	<i>Extraction par l'acétate d'éthyle (EVC-SPC-ae)</i> :	52
1.2.3.5	<i>Extraction par le butanol-1 (EVC-SPC-but)</i> :	52
1.3.	CHOIX DE LA MÉTHODE DE PRÉPARATION DES EVC	54
1.4.	PRÉPARATION DES EVC AUX TESTS DE BIOGUIDAGE	56
1.4.1	<i>Obtention des EVC de Blancs de Blancs</i>	57
1.4.2	<i>Obtention des EVC de Blancs de Noirs</i>	57
1.4.3	<i>Analyse des blocs obtenus après extraction des EVC</i>	59
1.4.4	<i>Dosage des polyphénols totaux par la méthode de Folin-Ciocalteu</i>	59
1.5.	SÉPARATION DES EVC PAR CHROMATOGRAPHIE DE PARTAGE CENTRIFUGE	60
1.5.1	<i>Généralités : la Chromatographie de Partage Centrifuge</i>	60
1.5.2	<i>Détermination des coefficients de partage par spectrophotométrie UV/Vis.</i>	62
1.5.3	<i>Choix des solvants</i>	63
1.5.4	<i>Séparations des phases DC_{BB} et DC_{BN}</i>	63
1.5.4.1	<i>Profil UV en mode Ascendant de la séparation CPC</i>	63
1.5.4.2	<i>Profil UV en mode Descendant de la séparation CPC</i>	64
1.5.4.3	<i>Création des blocs CPC et rendements d'extraction</i>	65
1.5.5	<i>Séparation des phases DB_{BB} et DB_{BN}</i>	65
1.5.5.1	<i>Profil UV en mode Ascendant de la séparation CPC</i>	65
1.5.5.2	<i>Profil UV en mode Descendant de la séparation CPC</i>	66
1.5.5.3	<i>Création des blocs CPC et rendements d'extraction</i>	67
1.6.	ANALYSE STRUCTURALE DES MOLÉCULES DU CHAMPAGNE	67
1.6.1	<i>Synthèse enzymatique du GRP</i>	67
1.6.1.1	<i>Extraction et caractérisation de la PPO</i>	68
1.6.1.2	<i>Préparation du GRP</i>	68
1.6.2	<i>Étude de l'acide caftarique</i>	71
1.6.3	<i>Étude du gallate d'éthyle</i>	73
1.6.4	<i>Étude du tyrosol</i>	75
1.6.5	<i>Etude de l'acide gallique</i>	77
1.6.6	<i>Analyse des molécules présentes dans les vins de Champagne par LC/ESI-MS</i>	78
1.7.	DOSAGE DES COMPOSÉS PHÉNOLIQUES DANS LES VINS DE CHAMPAGNES	79
1.7.1	<i>Dosage dans les phases aqueuses des Champagnes BB et BN</i>	79
1.7.2	<i>Dosage dans la phase organique des Champagnes Blancs de Blancs</i>	80
1.7.3	<i>Dosage dans la phase aqueuse MilliQ des Champagnes Blancs de Blancs</i>	80
1.7.4	<i>Dosage dans la phase organique des Champagnes Blancs de Noirs</i>	81
1.7.5	<i>Dosage dans la phase aqueuse MilliQ des Champagnes Blancs de Noirs</i>	82
1.7.6	<i>Récapitulatif des dosages dans les vins de Champagne</i>	82
1.8.	CONCLUSION	83
2	PROPRIÉTÉS BIOLOGIQUES DES EXTRAITS DE VIN DE CHAMPAGNE	84
2.1	INTRODUCTION	84
2.2	ÉTUDE DE L'EFFET PROTECTEUR SUR DES MITOCHONDRIES ISOLÉES DE CERVEAU DE RAT	84
2.2.1	<i>Introduction</i>	84
2.2.2	<i>Effet protecteur des EVC sur les mitochondries de cerveau de rat</i>	85
2.2.3	<i>Effet protecteur des blocs séparés sur les mitochondries de cerveau de rat</i>	87
2.2.4	<i>Conclusion</i>	90
2.3	TRANSPORT DE MOLÉCULES À TRAVERS LA MONOCOUCHE DE CELLULES ENDOTHÉLIALES	91
2.3.1	<i>Introduction</i>	91
2.3.2	<i>Résultats</i>	91
2.3.3	<i>Conclusions</i>	94
2.4	EFFET PROTECTEUR DES EVC SUR UN MODÈLE CELLULAIRE MURIN	95
2.4.1	<i>Introduction</i>	95
2.4.2	<i>Résultats</i>	96
2.4.3	<i>Conclusion</i>	97
2.5	INTERNALISATION DES CONSTITUANTS DU CHAMPAGNE DANS LES CELLULES PC12	97
2.5.1	<i>Introduction</i>	97
2.5.2	<i>Résultats</i>	99

2.5.3	Conclusion	99
2.6	ACTIVITÉ DES EVC DANS LE DOMAINE DU CANCER.....	99
2.6.1	Introduction.....	99
2.6.2	Lignées cellulaires cancéreuses employées.....	101
2.6.3	Généralités : Principe de fonctionnement de la cytométrie en flux.....	101
2.6.4	Viabilité cellulaire en présence des EVC.....	103
2.6.5	Détermination de la DL ₅₀ des phases organiques.....	104
2.6.6	Action des phases organiques de Champagne sur d'autres lignées cellulaires.....	105
2.6.7	Étude de la prolifération cellulaire.....	105
2.6.8	Etude des blocs séparés par CPC sur la viabilité de cellules cancéreuses.....	106
2.6.9	Conclusion	107
2.7	INHIBITION DE L'ACÉTYLCHOLINESTÉRASE PAR LES EVC	109
2.7.1	Introduction.....	109
2.7.2	Inhibition de l'AChE par les EVC.....	109
2.7.3	Inhibition de l'AChE par les blocs séparés par CPC.....	111
2.7.4	Conclusion	111
2.8	POTENTIEL ANTIOXYDANT DES MOLÉCULES DES VINS DE CHAMPAGNES	113
2.8.1	Les tests de mesure employés	113
2.8.2	Résultats	114
2.8.3	Conclusion	114
2.9	ÉTUDE DE LA CAPACITÉ OXYDANTE TOTALE PLASMATIQUE	115
2.9.1	Introduction.....	115
2.9.2	Schéma d'organisation du protocole	115
2.9.3	Principe de la mesure du TOC.....	116
2.9.4	Mesure du TAC et du cTAC plasmatique	116
2.9.5	Résultats	117
2.9.6	Conclusion	119
2.10	MODIFICATIONS DE LA RÉPONSE CYTOKINIQUE APRÈS INGESTION DE CHAMPAGNE	120
2.10.1	Introduction.....	120
2.10.2	Résultats	120
2.10.3	Conclusion.....	121
CONCLUSION		122
3	ANALYSE DES MÉCANISMES D'ACTION BIOLOGIQUES	123
3.1	INTRODUCTION	123
3.2	EFFETS DE « LAVAGES » SUR LA VIABILITÉ DES LIGNÉES U266	124
3.3	ÉTUDE DE L' APOPTOSE	124
3.3.1	Définition	124
3.3.2	Mesure d'apoptose par marquage à l'Annexine-V-Fluos	125
3.3.3	Résultats	125
3.3.4	Conclusion	126
3.4	ÉTUDE DU CYCLE CELLULAIRE	127
3.4.1	Introduction.....	127
3.4.2	Résultats	127
3.4.3	Conclusion	128
3.5	ÉTUDE DES POTENTIELS TRANSMEMBRANAIRES MITOCHONDRIAUX	128
3.5.1	Introduction.....	128
3.5.2	Résultats	129
3.5.3	Conclusion	130
3.6	TESTS DE VIABILITÉ CELLULAIRE DE DC _{BB} SUR LES PBMC.....	131
3.6.1	Définition :	131
3.6.2	Résultats	132
3.6.3	Conclusion	133
3.7	UTILISATION DES « PUCES À ADN »	133
3.7.1	Détermination des IC ₅₀ prolifération et cytotoxicité.....	134
3.7.2	Extraction des ARNs	134
3.7.3	Principe des Pucés à ADN Affymetrix Human Genome U133 Set.....	135
3.7.4	Résultats	137
3.7.5	Conclusion	140
3.8	CONCLUSION	141

CONCLUSION GÉNÉRALE	143
TROISIÈME PARTIE : PARTIE EXPÉRIMENTALE	147
1. GÉNÉRALITÉS	148
1.1. APPAREILLAGE	148
1.1.1 <i>Ultraviolet</i>	148
1.1.2 <i>Résonance Magnétique Nucléaire</i>	148
1.1.3 <i>Spectrométrie de masse</i>	148
1.2. MÉTHODES CHROMATOGRAPHIQUES	149
1.2.1 <i>Chromatographie sur couche mince (CCM)</i>	149
1.2.2 <i>Chromatographe de Partage Centrifuge</i>	149
1.2.3 <i>Chromatographie liquide haute performance (CLHP)</i>	150
1.2.4 <i>HPLC/MS</i>	151
2. ISOLEMENT DES SUBSTANCES ACTIVES DU CHAMPAGNE	151
2.1. EXTRACTION PAR DES SOLVANTS À POLARITÉ CROISSANTE	151
2.1.1 <i>Extraction par l'hexane (EVC-SPC-h)</i>	152
2.1.2 <i>Extraction par du chloroforme (EVC-SPC-chloro)</i>	152
2.1.3 <i>Extraction par du dichlorométhane (EVC-SPC-dichlo)</i>	152
2.1.4 <i>Extraction par l'acétate d'éthyle (EVC-SPC-ae)</i>	152
2.1.5 <i>Extraction au butanol-1 (EVC-SPC-but)</i>	152
2.2. PROTOCOLE D'EXTRACTION DES CHAMPAGNES DE BLANCS DE BLANCS	152
2.3. PROTOCOLE D'EXTRACTION DES CHAMPAGNES BLANCS DE NOIRS	153
2.4. DOSAGE DES POLYPHÉNOLS TOTAUX PAR LA MÉTHODE DE FOLIN-CIICALTEU	154
2.5. ANALYSE STRUCTURALE DES MOLÉCULES DU CHAMPAGNE	155
2.5.1 <i>Protocole d'extraction de la PPO</i>	155
2.5.2 <i>Dosage des protéines selon la méthode de Bradford</i>	155
2.5.3 <i>Dosage de l'activité de la PPO par polarographie</i>	156
2.5.4 <i>Préparation du GRP</i>	156
3. PROPRIÉTÉS BIOLOGIQUES DES EXTRAITS DE VIN DE CHAMPAGNE	157
3.1. EFFETS PROTECTEURS DES EVC SUR DES MITOCHONDRIES DE CERVEAU DE RAT	157
3.1.1 <i>Préparation des mitochondries</i>	157
3.1.2 <i>Consommation d'oxygène dans le modèle d'anoxie-réoxygénation</i>	157
3.1.3 <i>Analyse statistique</i>	158
3.2. PROTOCOLE DE L'ÉTUDE DU TRANSPORT	158
3.2.1 <i>Détermination du coefficient de perméabilité</i>	158
3.2.2 <i>Etude de la restauration de la synthèse d'ATP après hypoxie</i>	159
3.3. PROTOCOLE D'ÉTUDE POUR LA PROTECTION DES CELLULES PC12 PAR LES EVC	160
3.4. PROTOCOLE D'ÉTUDE PAR MICROSCOPIE CONFOCALE	161
3.5. PROTOCOLE DE VIABILITÉ ET DE PROLIFÉRATION CELLULAIRE	162
3.5.1 <i>Etude de la prolifération cellulaire</i>	162
3.5.2 <i>Préparation du milieu de culture et des cellules</i> :.....	162
3.5.3 <i>Préparation des solutions de molécules à tester</i> :.....	162
3.6. INHIBITION DE L'ACÉTYLCHOLINESTÉRISE PAR LES POLYPHÉNOLS DE CHAMPAGNE	163
3.7. POTENTIEL ANTIOXYDANT DES VINS DE CHAMPAGNE	164
3.7.1 <i>Mesure du pouvoir antioxydant par la méthode DPPH</i>	164
3.7.2 <i>Mesure du pouvoir antioxydant par la méthode TAS</i>	164
3.7.3 <i>Mesure de la capacité antioxydante par la méthode TAC</i>	165
3.8. PROTOCOLE DE LA MESURE DU TOC	166
4. MÉCANISMES D'ACTION BIOLOGIQUE	167
4.1. PROTOCOLE CONCERNANT L' APOPTOSE.....	167
4.1.1 <i>Préparation du tampon Annexine</i>	167
4.2. PROTOCOLE CONCERNANT LE CYCLE CELLULAIRE	167
4.2.1 <i>Solution d'IP</i>	167
4.2.2 <i>Méthode</i>	168
4.3. TEST DE VIABILITÉ SUR LES PBMC	168
4.3.1 <i>Préparation de PBMC à partir de Buffy's Coat</i>	168
4.3.2 <i>Préparation du gradient de Ficoll</i>	168

4.3.3	<i>Protocole d'activation des PBMC</i>	169
4.3.4	<i>Préparation du PMA et de la ionomycine</i>	170
	VALORISATION DES COMPÉTENCES	171
	ANNEXES	185
	BIBLIOGRAPHIE	209
	GLOSSAIRE	227

LISTE DES COMMUNICATIONS

Publications

- 2003** "Wine and Health : recent findings".
Bénédicte Berké, **David Vauzour**, Chantal Castagnino, Arnaudinaud Valérie, Nay Bastien, Catherine Chèze, et Joseph Vercauteren,
J. Pharm. Belg., **2003**, 58(3), 57-74
- 2005** " Moderate Champagne wine Consumption decrease Total Oxidant Capacity and modifies cytokines expression in healthy volunteers plasma"
David Vauzour, Marilena Kampa, Artemissia-Phoebe Nifli, Elias Castanas and Joseph Vercauteren
J Nutrition **xx**, xxx-xxx (*soumis*).
- 2005** "Protection against brain oxidative stress: the champagne polyphenols contribution"
David Vauzour, Artemissia-Phoebe Nifli, Vassilia-Ismini Alexaki, Roland Zini, Jean-Paul Tillement, Elias Castanas and Joseph Vercauteren
J Neurochemistry **xx**, xxx-xxx (*soumis*).
- 2005** "Preparative separation of Champagne's polyphenols by centrifugal partition chromatography"
David Vauzour, Audrey Julia, Emmanuelle Meudec, Chantal Castagnino and Joseph Vercauteren
J Chrom A **xx**, xxx-xxx (*soumis*)

Chapitres d'ouvrages

- 2003** "Polyphénols du Vin au cœur de la vie"
David VAUZOUR, Chantal CASTAGNINO and Joseph VERCAUTEREN
In: Proceedings des "*Journées Scientifiques de l'Académie de Pharmacie de Belgique*", Université de Liège, Belgique, **2003**, pp. 1-31.
- 2003** "The French Paradox: source of wine biological property discoveries"
David VAUZOUR, Chantal CASTAGNINO and Joseph VERCAUTEREN
In: Proceedings of 4th *Symposium in Perioperative Medicine*, Bordeaux, France, **2003**, pp. 8-26.
- 2003** "Functional and Biological Properties of Wine's Polyphenols : the 13C-labelled procyanidols and FACS tools".
David VAUZOUR, Chantal CASTAGNINO, Catherine Barjot, Jean-François ROSSI, VALÉRIE ARNAUDINAUD, BASTIEN NAY, et Joseph VERCAUTEREN,
In : 3rd *In vino Analytica Scientia* Symposium Proceedings, Aveiro, Portugal, **2003**, pp. 7-7ter.
- 2004** "Etude de l'activité antiproliférative des polyphénols des vins de champagne"
David VAUZOUR, Chantal Castagnino, Catherine Barjot, Jean-François Rossi, Joseph Vercauteren.
In Proceedings des Journées scientifiques CBS2, ENSA.M, Montpellier, 21 au 23 avril **2004**, pp 98
- 2004** «Protection against brain oxidative stress: The Champagne Polyphenols contribution.»
David VAUZOUR, Audrey JULIA, Sylvie MUNIER, Antoine Bosson KOUAMÉ, Chantal CASTAGNINO, Roland ZINI, Jean-Paul TILLEMENT and Joseph VERCAUTEREN
In Proceedings of XXII International Conference on Polyphenols, Helsinki, Finland- 25-28 August, **2004**, pp 419
- 2004** «Champagne Polyphenol Extract Induces apoptosis and Cell Cycle Modifications In Human Cancer Cell Lines»
David VAUZOUR, Chantal CASTAGNINO, Audrey JULIA, Sylvie MUNIER, Antoine Bosson KOUAMÉ, Catherine BARJOT, Jean-François ROSSI and Joseph VERCAUTEREN.
In Proceedings of XXII International Conference on Polyphenols, Helsinki, Finland- 25-28 August, **2004**, pp 421

- 2004** «Further stilbenoids from *Vitis vinifera* stalk extracts»
Chantal CASTAGNINO, **David VAUZOUR**, Sylvie MUNIER, Antoine BOSSON KOUAMÉ,
Audrey JULIA and Joseph VERCAUTEREN
In Proceedings of XXII International Conference on Polyphenols, Helsinki, Finland- 25-28 August,
2004, pp 709
- 2004** "Champagne Polyphenols: Biological Activity on Human Haematopoietic Tumor Cell Lines".
David VAUZOUR, Chantal CASTAGNINO, Catherine BARJOT, Jean-François ROSSI and Joseph
VERCAUTEREN
In Proceedings of 9^{ième} Symposium ICSN : Cancer et cibles thérapeutiques, gif sur Yvette, France, 10
et 11 juin **2004**, pp 49.
- 2004** "Polyphenols and Therapeutical activity".
David VAUZOUR, Chantal CASTAGNINO and Joseph VERCAUTEREN
In Proceedings of The 3rd Congress of Health, Environment and Natural Products, Mashad, Iran, 25-28
September **2004**, pp 14.
- 2005** "Dietary resveratrol oligomers and haematopoietic cancer"
Chantal CASTAGNINO, **David VAUZOUR**, Catherine BARJOT, Jean François ROSSI and Joseph
VERCAUTEREN
39th Annual Scientific Meeting of the European Society for Clinical Investigation, Athens, Greece, 6 –
9 April **2005**, pp xx
- 2005** "Extracts preparation from Champagne wine for biological studies"
David VAUZOUR, Sylvie MUNIER and Joseph VERCAUTEREN
In proceeding of In Vino Analytica Scientia, Montpellier, France, 7-9 July **2005**, pp xx

Conférences Internationales

- 2001** "Vin et santé : découvertes récentes",
Chantal CASTAGNINO, Mireille BARBASTE, Stéphanie SOULET, Bénédicte BERKÉ, **David
VAUZOUR**, Catherine CHÈZE, Joseph VERCAUTEREN,
1^{er} décembre **2001**, *Centre d'Études d'Histoire de la Pharmacie et du Médicament* – Université
Catholique de Louvain, Bruxelles, BELGIQUE.
- 2002** "Polyphenols of Wine : absorption",
David VAUZOUR, Stéphanie SOULET, Bénédicte BERKÉ, Catherine CHÈZE, Chantal
CASTAGNINO, Joseph VERCAUTEREN,
March 12th, **2002**, *XXVIth World meeting of O.I.V., Section "Wine and Health"*, Paris, FRANCE.
- 2002** "The polyphenols of wine and their role in the cell biology"
David VAUZOUR, Stéphanie Soulet, Chantal Castagnino, Catherine Chèze and Joseph Vercauteren,
June 14-17th, 2002, International Meeting on « Wine and Health », Heraklion, Creeta, GREECE.
- 2003** "Polyphénols du Vin, au cœur de la vie"
David VAUZOUR, Chantal CASTAGNINO and Joseph VERCAUTEREN
March 15th, **2003**, *Les Journées Scientifiques du Cercle Gilkinet*, Université de Liège, BELGIQUE.
- 2003** "The French Paradox: source of wine biological property discoveries"
David VAUZOUR, Chantal CASTAGNINO and Joseph VERCAUTEREN
May 11-12th, **2003**, *Controversies in Perioperative Medicine Symposium, Château Les Vigiers*,
Dordogne, France.
- 2003** "Functional and biological properties of wine's polyphenols: the 13C-labelled procyanidols and FACS
tools",
David VAUZOUR, Chantal CASTAGNINO, Catherine BARJOT, Jean-François ROSSI, Valérie
ARNAUDINAUD, Bastien NAY and Joseph VERCAUTEREN,
July 10-12th, **2003**, *In Vino Analytica Scientia 2003*, Aveiro, PORTUGAL.
- 2004** "Polyphenols and Therapeutical activity".
David VAUZOUR, Chantal CASTAGNINO and Joseph VERCAUTEREN
September 25-28, **2004**, *The 3rd Congress of Health, Environment and Natural Products*, Mashad, Iran

Conférences Nationales

- 2001** "Vin et santé : l'action des polyphénols".
Jean-Claude DELAUNAY, Bénédicte BERKÉ, Chantal CASTAGNINO, Mireille BARBASTE, Stéphanie SOULET, Sarah VERGÉ, **David VAUZOUR**, Bastien NAY, Valérie ARNAUDINAUD, Catherine CHÈZE, et Joseph VERCAUTEREN
1^{er} Colloque "Sang et Vin", Bordeaux, 18 avril **2001**.
- 2002** "Polyphénols de la vigne : des molécules très re-marquées",
David VAUZOUR, Bénédicte BERKÉ, Mireille BARBASTE, Stéphanie SOULET, Catherine CHÈZE, Chantal CASTAGNINO, Joseph VERCAUTEREN,
Séminaires du laboratoire des Molécules marquées, CEA, Saclay (France) 15 janvier **2002**.
- 2002** "Biodisponibilité des polyphénols du vin : Impact sur leurs propriétés".
David VAUZOUR, Bénédicte BERKÉ, Stéphanie SOULET, Catherine CHÈZE, Chantal CASTAGNINO, Joseph VERCAUTEREN
Société de Pharmacie de Bordeaux - 21 mars **2002**.

Communications affichées

- 2001** "Étude de la voie biogénétique menant aux flavan-3-ols".
David VAUZOUR, Valérie ARNAUDINAUD, Stéphanie KRISA, Catherine CHÈZE, Joseph VERCAUTEREN.
2^{ème} Journée Scientifique de l'Université Victor Segalen Bordeaux 2, Bordeaux, 26 octobre **2001**.
- 2003** « Les polyphenols : des molecules pour la vie ! »
David VAUZOUR, Antoine Bosson KOUAME, Chantal CASTAGNINO, Sylvie MUNIER, Joseph VERCAUTEREN.
Journée Jean Le Men, Faculté de Pharmacie, Reims, 28 novembre **2003**.
- 2004** « Biological activity of *Vitis vinifera* polyphenols on human cancer cell line »
David VAUZOUR, Chantal CASTAGNINO, Catherine BARJOT, Jean-François ROSSI, Joseph VERCAUTEREN.
Journée scientifique de l'Institut Max Mousseron, Université Montpellier 2, Montpellier, 29 mars **2004**.
- 2004** « Separation of Champagne polyphenols by bioguided activity on human cancer cell lines »
David VAUZOUR, Audrey JULIA, Catherine BARJOT, Chantal CASTAGNINO, Sylvie MUNIER, Antoine Bosson KOUAME, Jean-François ROSSI, Joseph VERCAUTEREN.
Journée scientifique de l'Institut Max Mousseron, Université Montpellier 2, Montpellier, 29 mars **2004**.
- 2004** « Stilbenoids compounds isolated from *Vitis vinifera* stems by centrifugal partition chromatography »
Chantal CASTAGNINO, **David VAUZOUR**, Sylvie MUNIER, Audrey JULIA, Antoine Bosson KOUAME, Joseph VERCAUTEREN.
Journée scientifique de l'Institut Max Mousseron, Université Montpellier 2, Montpellier, 29 mars **2004**.
- 2004** « Etude de l'activité antiproliférative des polyphenols des vins de champagne »
David VAUZOUR, Chantal CASTAGNINO, Catherine BARJOT, Jean-François ROSSI, Joseph VERCAUTEREN.
Journées scientifiques CBS2, ENSA.M, Montpellier, 21 au 23 avril **2004**
- 2004** « Protection against brain oxidative stress: The Champagne Polyphenols contribution. »
David VAUZOUR, Audrey JULIA, Sylvie MUNIER, Antoine Bosson KOUAMÉ, Chantal CASTAGNINO, Roland ZINI, Jean-Paul TILLEMENT and Joseph VERCAUTEREN.
XXII International Conference on Polyphenols, Helsinki, Finland- 25-28 August, **2004**
- 2004** « Champagne Polyphenol Extract Induces apoptosis and Cell Cycle Modifications In Human Cancer Cell Lines »
David VAUZOUR, Chantal CASTAGNINO, Audrey JULIA, Sylvie MUNIER, Antoine Bosson KOUAMÉ, Catherine BARJOT, Jean-François ROSSI and Joseph VERCAUTEREN.
XXII International Conference on Polyphenols, Helsinki, Finland- 25-28 August, **2004**.

- 2004** «Further stilbenoids from *Vitis vinifera* stalk extracts»
Chantal CASTAGNINO, **David VAUZOUR**, Sylvie MUNIER, Antoine BOSSON KOUAMÉ, Audrey JULIA and Joseph VERCAUTEREN.
XXII International Conference on Polyphenols, Helsinki, Finland- 25-28 August, **2004**.
- 2004** “Champagne Polyphenols: Biological Activity on Human Haematopoietic Tumor Cell Lines”.
David VAUZOUR, Chantal CASTAGNINO, Catherine BARJOT, Jean-François ROSSI and Joseph VERCAUTEREN
9^{ième} Symposium ICSN : Cancer et cibles thérapeutiques, Gif sur Yvette, France, 10 et 11 juin **2004**
- 2005** “Extracts preparation from Champagne wine for biological studies”
David VAUZOUR, Sylvie MUNIER and Joseph VERCAUTEREN
In proceeding of In Vino Analytica Scientia, Montpellier, France, 7-9 July **2005**

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ABG	Association Bernard Gregory
AChE	Acétylcholinestérase
AcOEt	Acétate d'éthyle
AGE	Advanced Glycation End-products
API	Atmospheric Pressure Ionization
APP	Amyloid Precursor Protein
BB	Blancs de Blancs
BHE	Barrière Hémato Encéphalique
BN	Blancs de Noirs
Bp	Point d'ébullition
CCM	Chromatographie sur Couche Mince
CDK	Kinases Dépendantes des Cyclines
CID	Collision Induced Dissociation
CLHP	Chromatographie Liquide Haute Performance
CMF	Cytométrie de Flux
CoA	Coenzyme A
COX	Cyclooxygénase
cP	Centipoise
CPC	Chromatographie de Partage Centrifuge
CR	Contrôle Respiratoire
CSF	Fluide Cérébro Spinal
DAG	Diacyl Glycérol
DISC	Death Inducing Signaling Complex
DMEM	Dubelco's Modified Eagle Medium
DPPH	1,1-diphényl-2-picryl-hydrazyle
ECA	Enzyme de conversion de l'angiotensine
ECR	Espèces Carbonylées Réactives
EGCG	Epigallocatechine Gallate
EOR	Espèces Oxygénées Réactives
ESI	Electrospray ionisation
EtOH	Ethanol
EVC	Extrait de Vin de Champagne
FACS	Fluorescence-Activated Cell Sorter
FITC	Isothiocyanate de fluorescéine
FSC	Foward Scatter
GAE	Gallic Acid Equivalent
GRP	Grape Reaction Product
GSH	Glutathion réduit
HRP	Horseradish Peroxydase
IFN	Interféron
IP	Iodure de propidium
IP3	Inositol tri phosphate
kDa	Kilo dalton
LC	Chromatographie liquide
LOX	Lipoxygénase

LPS	Lipopolysaccharides
LT	Leucotriène
MDR	Multidroque résistance
MHz	Mega Hertz
mM	Milli molaire
NGFR	Nerve Growth Factor Receptor
NK	natural Killer
Nst	Non Stimulé
ODC	Ornithine Décarboxylase
Papp	Perméabilité apparente
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells
PBS	Phosphate Buffer Saline
PCR	Réaction de polymérisation en chaine
PDA	Photodiode array
PE	Phycoérythrine
PG	Prostaglandine
P-gp	P-glycoprotéine
PHA	Phytohémaglutinine
PKC	Protéine Kinase C
PLCg	Phospholipase C
PMA	Phorbol Myristate Acetate
PMT	Photomultiplicateur
Ppm	Partie par million
PPO	Polyphénol oxydase
PPS	Poly-Phénylènesulfide
PTK	Protéines à Tyrosine Kinase
PTPC	Permeability Transition Pore Complex
RAGE	Receptor of Advanced Glycation Endproducts
Rdt	Rendement
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
RPM	Rotation Par Minute
SAB	Sérum Albumine Bovine
SM	Spectrométrie de Masse
SOD	Superoxyde Dismutase
SSC	Side Scatter
SVF	Sérum de Veau Fœtal
TAC	Total Antioxydant Capacity
TAS	Total Antioxydant Status
TFA	Acide Trifluoro Acétique
TMB	3,3',5,5' tétraméthyl benzidine
TNF	Tumor Necrosis Factor
TOC	Total Oxidant Capacity
TX	Thromboxane
UV	Ultra-Violet

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1: VOIES D'ACCÈS AUX DIFFÉRENTES CLASSES DE POLYPHÉNOLS.....	12
FIGURE 2: STRUCTURE DES POLYPHÉNOLS DU CHAMPAGNE ET AUTRES POLYPHÉNOLS.....	16
FIGURE 3: CONFIGURATIONS ÉLECTRONIQUES DE L'OXYGÈNE ET DES ESPÈCES ISSUES DE L'OXYGÈNE	18
FIGURE 4: FORMATION DU RADICAL HYDROXYLE SELON LA RÉACTION DE FENTON	19
FIGURE 5: PRINCIPE DE LA RÉACTION DE MAILLARD <i>IN VIVO</i>	22
FIGURE 6: PRINCIPALES VOIES DE SYNTHÈSE DES (AGE) PAR RÉACTION DE MAILLARD <i>IN VIVO</i>	23
FIGURE 7: OXYDATION RADICALE EN CHAÎNE DES ACIDES GRAS: "CONSÉQUENCES BIOLOGIQUES"	25
FIGURE 8: ACIDE ASCORBIQUE (VIT C).....	26
FIGURE 9: TOCOPHÉROL (VIT E).....	26
FIGURE 10: RÉDUCTION TOTALE EN EAU ET OXYGÈNE DE L'ANION SUPEROXYDE	27
FIGURE 11: INTERNALISATION ET MÉTABOLISME DES FLAVONOÏDES DANS LE CERVEAU	31
FIGURE 12: REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DES ÉTAPES DE CARCINOGENÈSE.....	34
FIGURE 13: SCHÉMA DU CYCLE CELLULAIRE ET DE SES RÉGULATEURS.....	37
FIGURE 15: SPECTRE PROTON WATERGATE SUR LE « TOTUM » DE CHAMPAGNE	50
FIGURE 16: PROTOCOLE D'EXTRACTION DES VINS DE CHAMPAGNE PAR ÉPUISEMENT DE LA PHASE AQUEUSE	53
FIGURE 17: SPECTRE RMN ¹ H DE L'EXTRAIT PAR LE BUTANOL-1	54
FIGURE 18: SPECTRE RMN ¹ H DE LA PHASE ACÉTATE D'ÉTHYLE EVC-XX-ACOET.....	55
FIGURE 19: SCHÉMA D'EXTRACTION DES CHAMPAGNES BLANCS DE BLANCS	58
FIGURE 20: SCHÉMA D'EXTRACTION DES CHAMPAGNES BLANCS DE NOIRS	58
FIGURE 21: DIAGRAMME DE PHASE TERNAIRE	61
FIGURE 22: DOSAGE POLAROGRAPHIQUE DE L'ACTIVITÉ DE LA PPO	68
FIGURE 23: CLHP ET CARACTÉRISTIQUES SPECTRALES DU GRP ET DE L'ACIDE CAFTARIQUE	69
FIGURE 24: FRACTIONNEMENT DES VINS DE CHAMPAGNE.....	69
FIGURE 25: SPECTRE UV-VIS DE L'ACIDE CAFTARIQUE.....	71
FIGURE 26: SPECTRE UV-VIS DU COMPOSÉ C1	73
FIGURE 27: SPECTRE UV-VISIBLE DU TYROSOL	75
FIGURE 28: SPECTRE UV-VISIBLE DE L'ACIDE GALLIQUE	77
FIGURE 29: PRINCIPE DU MODÈLE D'ANOXIE-RÉOXYGÉNATION	85
FIGURE 30: EFFET DES EXTRAITS POLYPHÉNOLIQUES SUR LE CR DES MITOCHONDRIES DE CERVEAU DE RAT.....	86
FIGURE 31: EFFET DES EXTRAITS POLYPHÉNOLIQUES SUR LE CR DES MITOCHONDRIES TÉMOINS 10 MINUTES.	86
FIGURE 32: EFFET DES EXTRAITS POLYPHÉNOLIQUES SUR LE CR AVANT ANOXIE-RÉOXYGÉNATION.....	87
FIGURE 33: INHIBITION DE L'ACÉTYLCHOLINESTÉRISE EN PRÉSENCE DES EVC.	109
FIGURE 34: PRINCIPE DU TEST DPPH.....	113
FIGURE 35: SCHÉMA DU PROTOCOLE D'ESSAI <i>IN VIVO</i>	116
FIGURE 36: OXYDATION DU TMB	116
FIGURE 37: MODIFICATION DU TOC APRÈS INGESTION DE CHAMPAGNE.....	118
FIGURE 38: MODIFICATION DU CTAC APRÈS INGESTION DE CHAMPAGNE.....	119
FIGURE 39: GÈNES PRÉSENTS ET MODULÉS PAR LE CHAMPAGNE.....	138
FIGURE 40: COURBE DE CALIBRATION DE L'ACIDE GALLIQUE	155
FIGURE 41: ÉTUDE DU TRANSPORT À TRAVERS LA MONOCOUCHE DE CELLULES ENDOTHÉLIALES	158
FIGURE 42: SCHÉMA DES ÉTAPES NÉCESSAIRES À L'ÉTUDE DE LA RESTAURATION DE LA SYNTHÈSE D'ATP.....	159
FIGURE 43: PRINCIPE DU TEST D'INHIBITION DE L'ACÉTYLCHOLINESTÉRISE.....	164
FIGURE 44: COURBE DE CALIBRATION DU TOC	166
FIGURE 45: SPECTRE ¹ H WATER GATE DE LA PHASE AQUEUSE EPC-XX-H ₂ O	186
FIGURE 46: SPECTRE ¹ H SUR LA PHASE EPC-XX-ACOET _{AMQ}	187
FIGURE 47: SPECTRE ¹ H SUR LA PHASE EPC-XX-MQ	188
FIGURE 48: SPECTRE PROTON DE L'ACIDE CAFTARIQUE	189
FIGURE 49: SPECTRE PROTON DU GALLATE D'ÉTHYLE	190
FIGURE 50: SPECTRE PROTON DU TYROSOL ET DU SUCCINATE D'ÉTHYLE.....	191
FIGURE 51: FRAGMENTATION DES PRINCIPALES MOLÉCULES.....	192
FIGURE 52: FRAGMENTATION DES PRINCIPALES MOLÉCULES.....	193
FIGURE 53: CHROMATOGRAMME CLHP DE LA FRACTION DC _{BB} -BLOC 1 À 280 NM.....	194
FIGURE 54: CHROMATOGRAMME CLHP DE LA FRACTION DC _{BB} -BLOC 2 À 280 NM.....	194
FIGURE 55: CHROMATOGRAMME CLHP DE LA FRACTION DC _{BB} -BLOC 3 À 280 NM.....	195

FIGURE 56: CHROMATOGRAMME CLHP DE LA FRACTION DC _{BB} -BLOC 4 à 280 NM.....	195
FIGURE 57: CHROMATOGRAMME CLHP DE LA FRACTION DC _{BB} -BLOC 5 à 280 NM.....	196
FIGURE 58: CHROMATOGRAMME CLHP DE LA FRACTION DC _{BN} -BLOC 1 à 280 NM	196
FIGURE 59: CHROMATOGRAMME CLHP DE LA FRACTION DC _{BN} -BLOC 2 à 280 NM	197
FIGURE 60: CHROMATOGRAMME CLHP DE LA FRACTION DC _{BN} -BLOC 3 à 280 NM	197
FIGURE 61: CHROMATOGRAMME CLHP DE LA FRACTION DC _{BN} -BLOC 4 à 280 NM	198
FIGURE 62: CHROMATOGRAMME CLHP DE LA FRACTION DC _{BN} -BLOC 5 à 280 NM	198
FIGURE 63: CHROMATOGRAMME CLHP DE LA FRACTION DC _{BN} -BLOC 6 à 280 NM	199
FIGURE 64: CHROMATOGRAMME CLHP DE LA FRACTION DB _{BB} -BLOC 1 à 280 NM.....	199
FIGURE 65: CHROMATOGRAMME CLHP DE LA FRACTION DB _{BB} -BLOC 2 à 280 NM.....	200
FIGURE 66: CHROMATOGRAMME CLHP DE LA FRACTION DB _{BB} -BLOC 3 à 280 NM.....	200
FIGURE 67: CHROMATOGRAMME CLHP DE LA FRACTION DB _{BB} -BLOC 5 à 280 NM.....	201
FIGURE 68: CHROMATOGRAMME CLHP DE LA FRACTION DB _{BB} -BLOC 6 à 280 NM.....	201
FIGURE 69: CHROMATOGRAMME CLHP DE LA FRACTION DB _{BB} -BLOC 7 à 280 NM.....	202
FIGURE 70: CHROMATOGRAMME CLHP DE LA FRACTION DB _{BN} -BLOC 8 à 280 NM.....	202
FIGURE 71: CHROMATOGRAMME CLHP DE LA FRACTION DB _{BN} -BLOC 1 à 280 NM	203
FIGURE 72: CHROMATOGRAMME CLHP DE LA FRACTION DB _{BN} -BLOC 2 à 280 NM	203
FIGURE 73: CHROMATOGRAMME CLHP DE LA FRACTION DB _{BN} -BLOC 3 à 280 NM	204
FIGURE 74: CHROMATOGRAMME CLHP DE LA FRACTION DB _{BN} -BLOC 4 à 280 NM	204
FIGURE 75: CHROMATOGRAMME CLHP DE LA FRACTION DB _{BN} -BLOC 5 à 280 NM	205
FIGURE 76: CHROMATOGRAMME CLHP DE LA FRACTION DB _{BN} -BLOC 6 à 280 NM	205
FIGURE 77: EXEMPLE DE VOIE MÉTABOLIQUE TRAITÉE PAR PATHWAY ASSIST : GÈNES « UP RÉGULÉS ».....	207

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1: COMPOSITION EN POLYPHÉNOLS DES VINS ROUGES, BLANCS ET CHAMPAGNES	17
TABLEAU 2: RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES DES MODIFICATEURS DU CYCLE CELLULAIRE	39
TABLEAU 3: POLYPHÉNOLS ET APOPTOSE	41
TABLEAU 4: POLYPHÉNOLS ET NEUROPROTECTION	44
TABLEAU 5: DOSAGE DES POLYPHÉNOLS DANS LA PHASE ORGANIQUE DES CHAMPAGNES BB.....	80
TABLEAU 6: DOSAGE DES POLYPHÉNOLS DANS LA PHASE AQUEUSE MILLIQ DES CHAMPAGNES BB.....	81
TABLEAU 7: DOSAGE DES POLYPHÉNOLS DANS LA PHASE ORGANIQUE DES CHAMPAGNES BN.....	81
TABLEAU 8: DOSAGE DES POLYPHÉNOLS DANS LA PHASE AQUEUSE MILLIQ DES CHAMPAGNES BN	82
TABLEAU 9: RÉCAPITULATIF DU DOSAGE DES POLYPHÉNOLS DANS LES VINS DE CHAMPAGNE.....	83
TABLEAU 10: CR DES MITOCHONDRIES SOUMISES AUX BLOCS CPC DE LA PHASE DC _{BB}	87
TABLEAU 11: CR DES MITOCHONDRIES SOUMISES AUX BLOCS CPC DE LA PHASE DC _{BN}	88
TABLEAU 12: CR DE MITOCHONDRIES ISOLÉES DE CERVEAU DE RAT EN PRÉSENCE DE PRODUITS PURS.....	89
TABLEAU 13: DL ₅₀ DES PHASES ORGANIQUES DE CHAMPAGNE SUR DIVERSES LIGNÉES CELLULAIRES	105
TABLEAU 14: DONNÉES HÉMATOLOGIQUES ET BIOCHIMIQUES DES VOLONTAIRES	117

INTRODUCTION

« Si le vin disparaissait de la production humaine, il se ferait dans la santé et dans l'intelligence un vide, une absence plus affreuse que tous les excès dont on le rend coupable »

Charles Baudelaire

Le vin, plus qu'une boisson, renferme des substances douées de propriétés physico-chimiques exceptionnelles ; les études épidémiologiques effectuées ont permis de relier une consommation modérée et journalière de vin à la diminution du risque de maladies cardiovasculaires et/ou de cancer [1-3].

Lors d'une récente réunion, les plus grands spécialistes mondiaux du domaine ont admis [4] que la majorité des travaux de la dernière décennie permettent de conclure que la consommation régulière et modérée de vin diminue nettement le risque relatif de développer une pathologie cardiovasculaire. Les travaux visant à identifier les molécules responsables des effets anti-inflammatoires, anti-oxydants, anti-prolifératifs et autres propriétés biologiques, les attribuent de plus en plus clairement aux composés du vin et notamment aux polyphénols.

Au cours des processus pathologiques ou inflammatoires, les défenses de l'organisme en antioxydants physiologiques sont amoindries, faisant place à la production d'espèces réactives fortement délétères pour l'organisme. Toutes ces défenses peuvent alors être renforcées par des apports exogènes en molécules polyphénoliques (flavonoïdes, acides phénols, stilbènes, ...) [5, 6]. On trouve en effet ces molécules en quantité importante dans les vins rouges [7], le thé vert [8] ou le cacao [9].

La plupart des travaux effectués dans cette optique concernent essentiellement les vins rouges, mais qu'en est-il des vins de Champagne ?

Afin de répondre à cette question, la *première partie* de ce document est consacrée à l'étude bibliographique des connaissances acquises à ce jour sur la composition chimique des vins de Champagne.

Etant donné le rôle important joué par les « espèces oxygénées réactives » ou « les radicaux libres » dans un grand nombre de pathologies, nous ferons un point des connaissances sur ces

déséquilibres oxydatifs, ainsi que sur les substances naturelles capables de moduler ces désordres.

L'essentiel de notre travail personnel fait l'objet de la *deuxième partie*. Elle décrit la mise au point d'un protocole permettant l'obtention et la séparation d'extraits de vins de Champagne, nous menant à l'obtention de trois phases représentant la totalité de ces vins, en distinguant les vins blancs de blancs des vins blancs de noirs. La séparation par chromatographie de partage centrifuge bioguidée sur la base de résultats biologiques pertinents (cancer et neuroprotection) nous permettra d'établir une relation entre les constituants des vins de Champagne et leur potentiel protecteur concernant diverses pathologies. Une étude plus approfondie des mécanismes biologiques impliqués dans les résultats observés et l'internalisation des substances constituants ces vins dans des lignées cellulaires nous permettront d'émettre des hypothèses quant à leur action *in vivo*. Ces dernières pourront alors être vérifiées par une étude d'intervention sur des sujets sains afin de tenter de montrer une contribution des constituants des vins de Champagne dans la diminution des espèces oxydantes plasmatiques et la modulation de la réponse cytokinique cellulaire.

La partie expérimentale de ce travail sera quant à elle décrite dans la *troisième partie* de ce document.

Un véritable inventaire et une mise en valeur des compétences qui ont été nécessaires au bon déroulement de la thèse feront l'objet d'une *quatrième partie* non conventionnelle de ce document. Il n'a aucun caractère académique et n'implique sa prise en compte ni dans l'évaluation de la thèse, ni dans l'obtention du diplôme.

Ce travail inclut une analyse critique du déroulement de la thèse dans une optique de projet, une identification et une mise en valeur des acquis professionnels et compétences développés pendant la thèse et prouvés par des exemples puisés dans sa préparation.

L'exercice "*valorisation des compétences – un nouveau chapitre de la thèse*" offre ainsi un rapport "efficacité / temps passé" particulièrement favorable puisqu'il s'appuie sur la thèse elle-même et qu'il fait bénéficier le doctorant de l'accompagnement d'un spécialiste en recrutement.

PREMIÈRE PARTIE

ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I : Les constituants des vins de Champagne

Chapitre II : Les espèces oxygénées et carbonylées réactives

Chapitre III : Propriétés biologiques et métabolisme des polyphénols

INTRODUCTION

Les radicaux libres, et plus généralement les espèces oxygénées réactives ont été associés à l'étiologie et/ou la progression de certaines pathologies telles que le cancer ou les maladies cardiovasculaires. Bien que ces molécules soient nécessaires à la détoxification cellulaire, l'oxydation de protéines par le fait de radicaux libres peut conduire à certaines pathologies du vieillissement telles que la maladie d'Alzheimer ou de Parkinson.

Une alimentation équilibrée, riche en vitamines mais également en substances phénoliques, molécules connues pour leurs propriétés antioxydantes, contribue à la diminution des ces espèces oxygénées, délétères pour l'organisme quant elles sont produites en trop grande quantité.

Ces composés phénoliques sont retrouvés en grande quantité dans les fruits et les légumes, mais également dans les vins.

Afin de mieux apprécier le « chemin parcouru » au cours de ce travail, cette première partie fera un état des lieux des connaissances acquises à ce jour sur les points suivants :

- Les constituants des vins de Champagne
- les espèces oxygénées et carbonylées réactives et leur participation dans diverses pathologies
- le métabolisme et les propriétés biologiques de ces constituants

1. L'élaboration du Champagne

L'Appellation d'Origine Contrôlée "Champagne" date du début de ce siècle et est la seule appellation ayant le droit de ne pas faire apparaître la mention "AOC" sur l'étiquette.

De manière générale, l'élaboration suit un processus complexe, aux étapes délicates et multiples. Chaque étape du processus est cruciale pour le développement des différents caractères qui donneront au champagne son goût, son bouquet, sa mousse...[10]

1.1. Les cépages

Les **trois cépages autorisés** sur l'aire d'appellation Champagne sont : le **Chardonnay**, le **Pinot noir** et le **Pinot meunier**. Ces trois cépages sont en parfaite adéquation avec les plantes, le sol et le climat de la région Champagne-Ardenne. Traditionnellement, le Champagne est élaboré par l'assemblage de ces trois cépages.

- Le Chardonnay : il est le seul cépage blanc, et exprime des notes florales et d'agrumes. Il apporte fraîcheur, élégance, finesse et vivacité aux cuvées. Son évolution, particulièrement lente quand il est issu des meilleurs crus, lui confère des notes de noisette, de café ou de moka.
- Le Pinot noir : est un cépage noir à jus blanc. Il apporte le fruité, le corps, la puissance et la longueur en bouche. Il développe des arômes de petits fruits rouges pour évoluer ensuite, lentement, vers de arômes plus soutenus.
- Le pinot meunier : est également un cépage noir à jus blanc. Il complète les deux autres cépages par sa rondeur. Il évolue plus rapidement et apporte à l'assemblage fraîcheur et arômes de fruits blancs (pêche, nectarine).

1.2. Le processus d'élaboration

Le processus d'élaboration est multiple, complexe et suivra les grandes lignes suivantes [10] :

- **La vendange** : La cueillette doit être particulièrement soignée en amenant au pressoir une vendange entière, sans meurtrissures sur les pellicules afin d'éviter une extraction de matières tanniques et/ou colorantes de la pellicule dans le jus de raisin (ou « moût »).

- **Le pressurage** : Le pressurage champenois est très particulier et très précis. Son objectif est d'obtenir le **jus de la pulpe sans extraction des composants de la pellicule ou de la rafle** apportant coloration et goût herbacé. La pression exercée sur le grain ne doit pas excéder celle exercée entre le pouce et l'index. A l'issue du pressurage, les moûts obtenus sont protégés par addition d'anhydride sulfureux (SO₂). Le SO₂ permet alors de protéger le moût des attaques de l'oxygène de l'air en jouant un rôle d'**antioxydant** et de sélectionner les micro-organismes présents dans le moût avant fermentation.
- **La fermentation alcoolique** : les levures indigènes, étant situées sur la pellicule des baies, ne sont presque pas en mélangées aux jus, de ce fait le **levurage** est donc très largement pratiqué. Les levures sélectionnées, appartenant à l'espèce *Saccharomyces cerevisiae*, sont inoculées (2 à 3.10⁶ cellules/mL) dans les moûts pour provoquer la fermentation alcoolique. Celle-ci transforme le sucre contenu dans le moût en éthanol et en gaz carbonique conformément au bilan établi par Pasteur. Cette fermentation conduit à l'obtention d'un vin de base à 10,5-11% d'alcool en fin de fermentation. Lorsqu'il n'y a pas assez de sucre présent dans le moût, l'AOC Champagne tolère la **chaptalisation** (ajout de sucre dans le moût). La fermentation alcoolique est suivie d'un soutirage dans le but d'éliminer les lies constituées de levures mortes.
- **La fermentation malolactique** : La fermentation malolactique est provoquée quasi systématiquement. L'acide malique, un diacide, est converti en un monoacide-alcool, l'acide lactique, sous l'action des bactéries lactiques appartenant à l'espèce *Oenococcus oeni* permettant ainsi de réduire l'acidité et d'obtenir des vins plus souples par une remontée du pH.
- **L'assemblage** : Les vins sont analysés (sucre restant, titre alcoolémique, acidité volatile, SO₂, acides organiques...) puis dégustés systématiquement afin de constituer les pré-assemblages homogènes qui seront utilisés lors de l'assemblage de la cuvée.
- **Le tirage** : le vin de base est additionné :
 - De liqueur de tirage, c'est-à-dire, du sucre dans du vin de base
 - De levures sélectionnées appartenant à l'espèce *Saccharomyces cerevisiae* (1.10⁶ à 2.10⁶ cellules/mL). Ces levures ont été préalablement adaptées au milieu du vin pour permettre le bon déroulement de la prise de mousse
 - D'adjuvants de remuage (bentonite, alginate).

Ensuite le vin sera mis en bouteille et ces dernières seront entreposées en cave à l'horizontale (encore appelé « sur lattes »).

- **La prise de mousse** : sous l'action des levures, le sucre est transformé en éthanol et CO₂ et confère ainsi l'effervescence et la mousse au Champagne. La transformation du sucre ajouté permet d'obtenir une pression de 5 à 7 atmosphères dans une bouteille de Champagne et d'accroître la teneur en alcool de 1,3 à 1,5 %.
- **Le vieillissement** : le vieillissement « sur lattes » favorise les échanges entre le dépôt de levures (ou « lies ») et le vin. La durée du vieillissement est de 15 mois minimum (comme l'exige la législation) pour les cuvées courantes, et de 36 mois minimum pour les millésimes.
- **Le dégorgement et la commercialisation** : lors de la prise de mousse, les levures forment un léger dépôt à l'intérieur de la bouteille. Le remuage permet de concentrer ce dépôt et de le faire glisser jusqu'au goulot, afin de clarifier le vin. Le col des bouteilles, goulot vers le bas, est immergé dans un bain de saumure dont la température avoisine -25°C. Quelques millilitres de vin sont alors congelés emprisonnant le dépôt de levure dans la glace. Ainsi, lorsque l'on enlève la capsule ou le bouchon, le dépôt est alors expulsé sous la forme d'un glaçon. Les bouteilles sont ensuite dosées par ajout d'une liqueur d'expédition composée de vin de réserve et de sucre. Les quantités de liqueur ajoutées sont fonction du type de Champagne (sec, demi-sec, brut, extra-dry). Un bouchon de liège, coiffée d'une plaque de muselet et d'un muselet en fil métallique, vient fermer la bouteille et protéger le vin en préservant la richesse de ses arômes. Les bouteilles sont ensuite parées de leur étiquette et de leur colerette, puis conditionnées pour l'expédition.

2. Les constituants des vins de Champagne

Les vins de Champagne, au même titre que les vins rouges ou blancs, sont constitués de nombreuses molécules, base de leur couleur et de leurs propriétés organoleptiques. Au cours des dernières décennies, l'engouement des scientifiques pour les substances phénoliques n'a cessé de croître, constituant une bibliographie importante pour ces molécules. Ainsi, nous étudierons globalement les constituants des vins de Champagne, en insistant principalement sur les composés polyphénoliques qui les composent.

2.1. L'éthanol

L'alcool éthylique, ou éthanol, est après l'eau, le constituant quantitativement le plus important du vin. La richesse du vin est exprimée par le degré alcoolique qui représente le pourcentage, en volume, d'alcool dans le vin. Ce degré alcoolique, pour les vins de Champagne se situe en moyenne à 12 % vol [11]. L'éthanol du vin provient pour l'essentiel de la fermentation alcoolique du sucre du moût. Cependant les cellules de la baie elles-mêmes sont capables d'en former une petite quantité, surtout en anaérobiose [12].

2.2. Les polyols

Les polyols se caractérisent par la présence de plusieurs radicaux « hydroxyles » plus ou moins proches, dans une même molécule, linéaire ou cyclique. D'une manière générale, l'accumulation de radicaux hydroxyles dans un composé entraîne une élévation importante du point d'ébullition, sous l'effet de la multiplication de liaisons hydrogène, ainsi qu'une augmentation de la viscosité et de la propriété d'antigel.

Le glycérol est probablement le constituant chimique du vin le plus important après l'eau et l'éthanol et se retrouve dans les vins de Champagne à la concentration de 5 g/L [13].

2.3. Les protéines

Les concentrations protéiques des vins de Champagnes se situent entre 10 et 30 mg/L, alors que celles des moûts sont comprises entre 25 à 95 mg/L [14].

Les protéines du raisin sont des molécules de masse moléculaire supérieure à 10 kDa, qui possèdent en solution un caractère colloïdal.

La libération de protéines et d'acides aminés par des enzymes cellulaires au cours du vieillissement sur lies (qui représente 20 à 32 % de l'azote total des vins [15]) est généralement considérée comme étant l'un des aspects les plus importants de l'autolyse des levures [10]. Au cours de cette autolyse, une activité protéasique intracellulaire a été mise en évidence [16]. Les protéines présentes dans les vins peuvent également être retrouvées sous forme de glycoprotéines. En 1995, Marchal et coll. ont pu déterminer la présence de telles substances dans les vins de Champagne [17].

2.4. Les peptides

La fraction peptidique représente en moyenne 25 à 40 % de l'azote total [15]. Dans les vins de Champagne, l'étude de la fraction peptidique < 3000 Da (pour des cuvées âgées de 3 à 19 ans) a révélé la présence de ces composés à des concentrations allant de 70 à 100 mg/L d'azote peptidique [18]. Très récemment, des travaux ont pu mettre en évidence la présence de 9 dipeptides présents dans les vins de Champagne [19] par la méthode de LC-ESI-MS/MS, parmi lesquels certains présentent des activités inhibitrices de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA) [10].

2.5. Les lipides

Au cours de la deuxième fermentation des vins de Champagne, la composition lipidique est affectée. La caractéristique majeure de ce processus est le relargage du triacylglycérol de la levure vers le vin. L'oxydation des acides gras du triacylglycérol (particulièrement en C2), leur relargage et leur dégradation en petites molécules dans le vin auraient alors d'importantes implications dans les propriétés organoleptiques [20].

2.6. Les nucléotides monophosphates

Ces nucléotides monophosphates peuvent être produits par dégradation enzymatique de l'ARN au cours de l'autolyse des levures. Cet ARN représente un peu plus de 95 % de la totalité des acides nucléiques et est dégradé plus rapidement que l'ADN au cours de l'autolyse. Des travaux réalisés sur les vins de Champagne ont permis de mettre en évidence pour la première fois dans ces vins la présence de 5 nucléotides monophosphates (5'-IMP, 5'-AMP, 5'-CMP, 5'-GMP, 5'-UMP) et de leurs isomères 3' et/ou 2' pour les quatre derniers [21].

2.7. Les acide organiques

Les acides carboxyliques jouent un rôle important pour la stabilité et les propriétés organoleptiques des vins.

En 1987, Tusseau et Benoit ont mis au point une technique chromatographique permettant de déterminer, dans les vins de Champagne, la présence des principaux acides organiques (acide

tartrique, acide malique, acide shikimique, acide lactique, acide acétique, acide succinique, acide fumarique et acide propionique) contenus dans les autres types de vins [22].

2.8. Les éléments minéraux

L'analyse du contenu minéral des vins a fait l'objet de nombreuses études du au fait des implications organoleptiques, hygiéniques, diététiques mais également toxicologiques de ces éléments. Les vins de Champagne ne dérogent pas à la règle et une étude récente a permis de déterminer le contenu minéral de ce dernier par la technique de spectrométrie atomique (ICP-AES). L'analyse permet de mettre en évidence la présence d'Al, As, Ba, Cd, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, Sr et de montrer que le calcium (86 mg/L), le potassium (339 mg/L), le magnésium (83 mg/L), le sodium (10 mg/L) et le phosphore (118 mg/L) sont les éléments minéraux majoritaires du vin de Champagne [23].

2.9. Les polyphénols

Les polyphénols sont des molécules issues du règne végétal et fabriquées exclusivement par les plantes : elles sont leurs principales substances de défense (phytoalexines). Les preuves de leur présence chez les végétaux sont nombreuses (couleur des fleurs jaunes (flavonoïdes), rougissement des feuilles à l'automne et couleur des fruits rouges (anthocyanes)), mais le brunissement d'une plante lésée ou attaquée par la pourriture est sûrement l'un des signes les plus visibles de l'intervention des polyphénols dans sa protection.

2.9.1 Voies biogénétiques menant aux différentes classes de polyphénols

La biogenèse des composés aromatiques nommée encore « aromagenèse » est une caractéristique quasi exclusive des végétaux, à quelques exceptions près (aromatisation des cycles aliphatiques par des aromatases dans le métabolisme des hormones stéroïdiennes chez les animaux).

L'aromagenèse peut emprunter différentes voies selon les familles de composés auxquelles on s'adresse, et se divise en deux grandes parties :

- La voie des phénylpropanoïdes (C6-C3) ou encore de l'acide *p*-coumarique (5), *via* la phénylalanine et/ou la tyrosine.

Première Partie : Étude bibliographique

- La voie des flavonoïdes, combinant la voie des phénylpropanoïdes, et celle de l'acide acétique conduisant aux polyacétates.

Les acides benzoïques, composés en C6-C1, sont issus de la dégradation oxydante des acides cinnamiques ou *p*-hydroxy-cinnamiques et conduisent à la formation d'acides hydroxybenzoïques (cf. Figure 1).

L'élaboration du squelette flavonoïde en C6-C3-C6 est effectuée par la chalcone synthase. Pour que cette enzyme soit fonctionnelle, il faut que l'acide *p*-coumarique soit activé sous la forme d'un acide *p*-coumarique-Coenzyme A par une CoA-ligase non spécifique. Le précurseur ainsi activé pourra réagir et former une liaison covalente avec la chalcone synthase par intermédiaire avec une fonction thiol. Une série de réaction pourra ensuite permettre l'élongation de la chaîne latérale par utilisation successive de trois acétyl-CoA activés sous forme de malonyl-CoA. Par la suite, la cyclisation du triacétate s'effectue selon une réaction de Claisen, et conduit à la formation de la chalcone (cf. Figure 1).

Une cyclisation de « Michael » conduira à l'obtention du noyau flavone, intermédiaire de la synthèse des flavonoïdes, des tanins condensés et des anthocyanines.

La synthèse des stilbènes, composés en C6-C2-C6, se fait par cyclisation du triacétate selon une réaction d'aldolisation (cf. Figure 1).

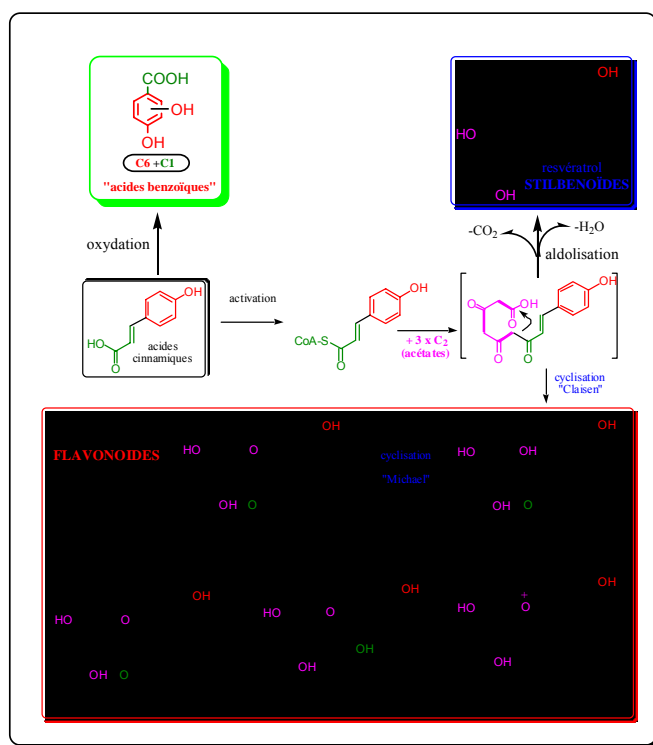


Figure 1: Voies d'accès aux différentes classes de polyphénols

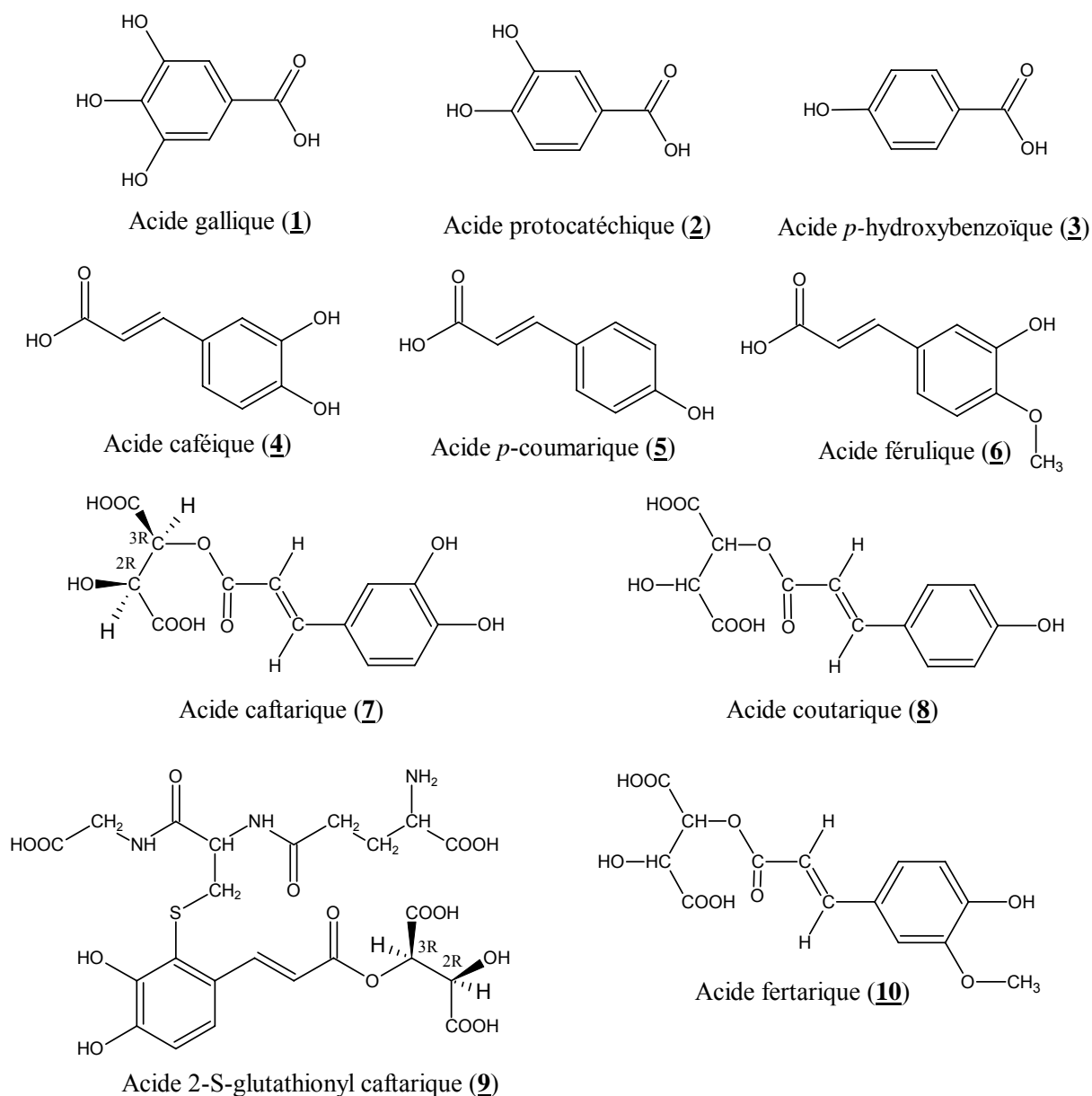
2.9.2 Les polyphénols du vin de Champagne

La plupart des études menées sur la composition phénolique des vins concernent essentiellement les vins rouges, et peu d'informations sont disponibles sur les vins blancs. Quelques études reportent la composition phénolique des « cavas » Espagnols [24], un vin effervescent naturel, très similaire aux Champagnes, obtenu également par méthode « Champenoise » de vinification. Mais il y a peu d'informations dans la littérature sur la composition polyphénolique des vins de Champagne [25, 26]. Les principaux composés phénoliques présents dans les vins blancs sont les acides hydroxycinnamiques et particulièrement l'acide caftarique (caféoyltartrique) (**7**). Le contenu total en polyphénol des vins blancs est compris entre 50 et 300 mg/L GAE (équivalent en acide gallique ou Gallic Acid Equivalent en anglais) ; il est en cela bien inférieur à celui décrit dans les vins rouges (800 mg/L à 4 g/L GAE) [27]. Celui des Champagnes, quant à lui, varie de 200 à 300 mg/L [28] en fonction des régions de production et des cépages utilisés, avec une composition en monomères de flavonoïdes comprise entre 50 et 150 mg/L (contre 40 à 200 mg/L pour les vins blancs et 100 à 360 mg/L pour les vins rouges) [29]. En effet, les Champagnes sont obtenus en utilisant trois variétés de raisin : le Chardonnay, le Pinot Noir et le Pinot Meunier. Un Champagne « Blanc de Blancs » est obtenu en utilisant uniquement du Chardonnay et est caractérisé par sa finesse. Un Champagne « Blanc de Noirs » est composé à base de Pinot Noir et/ou de Pinot Meunier qui lui donneront son fruité.

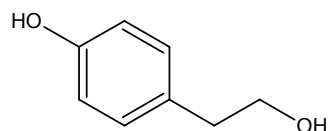
Récemment, une publication a présenté la composition polyphénolique des vins de Champagne [30]. Deux millésimes (2000 et 2001) de deux cuvées différentes, Blanc de Blancs et Blanc de Noirs, ont été étudiés. Ces travaux ont permis la mise en évidence dans ces vins de Champagne de dix neuf composés phénoliques, incluant les acides hydroxybenzoïques, les acides hydroxycinnamiques, ainsi que les flavonoïdes. L'ensemble de ces travaux ont été réalisés grâce à la technique de chromatographie liquide couplée à la spectroscopie de masse, et la quantité totale des polyphénols (en équivalents « acide gallique ») a pu être déterminée par la technique de Folin-Ciocalteu [31]. Les auteurs ont également pu montrer une influence des conditions climatiques sur la concentration en polyphénols, les faibles précipitations de l'année 2000 leur permettant une étude comparative. Les deux composés majoritaires identifiés sont l'**acide caftarique (7)** et le **tyrosol (11)**. Lors de la vinification, l'acide caftarique s'oxyde rapidement en présence de polyphénoloxydase (PPO), pour conduire à une quinone [32]. Par sa haute réactivité électrophile, elle peut former en présence de flavanols des oligomères catéchines-acide caftarique [33]. En présence de

Première Partie : Étude bibliographique

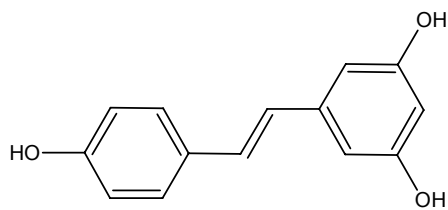
glutathion réduit, la quinone peut également conduire par addition de Michaël à la formation de l'**acide 2-S-glutathionyl-caftarique (9)** encore appelé GRP (Grape Reaction Product)[34]. La teneur moyenne de ces polyphénols a été dosée dans les vins de Champagne (cf. Tableau 1). Pour comparaison, les teneurs moyennes dans les vins rouges et les vins blancs sont données.



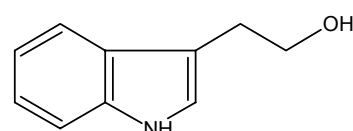
Première Partie : Étude bibliographique



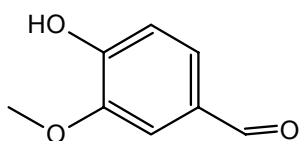
Tyrosol (**11**)



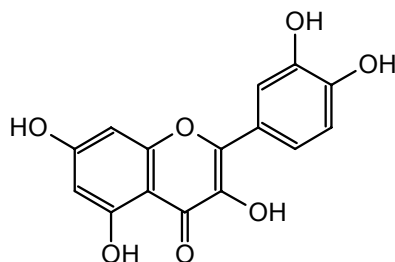
Resvératrol (**12**)



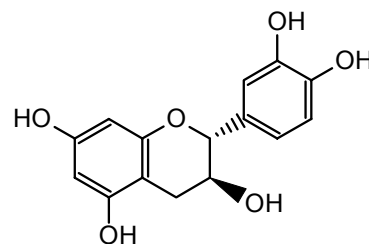
Tryptophol (**13**)



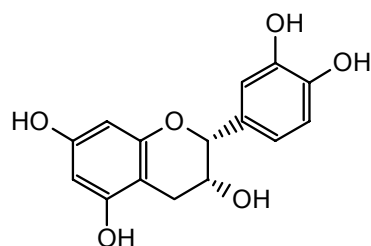
Vanilline (**14**)



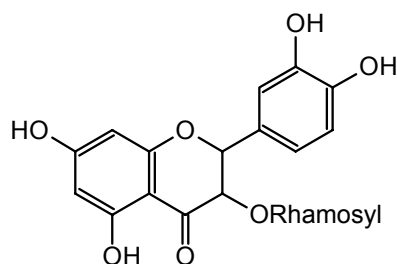
Quercétol (**15**)



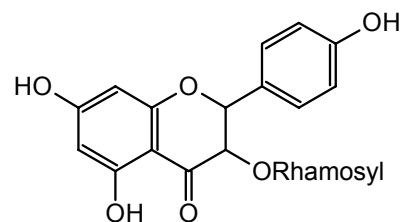
(+)-catéchine (**16**)



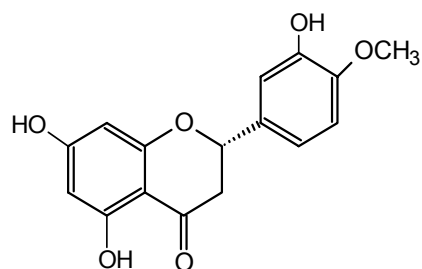
(-)-épicatéchine (**17**)



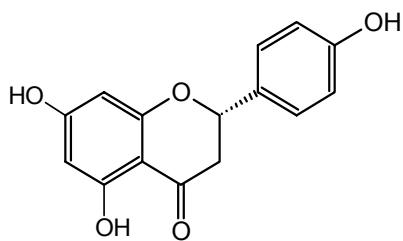
Astilbine (**18**)



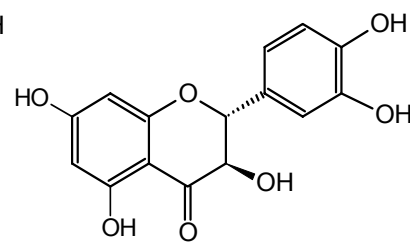
Engélétine (**19**)



Hespérétine (**20**)



Naringénine (**21**)



Taxifoline (**22**)

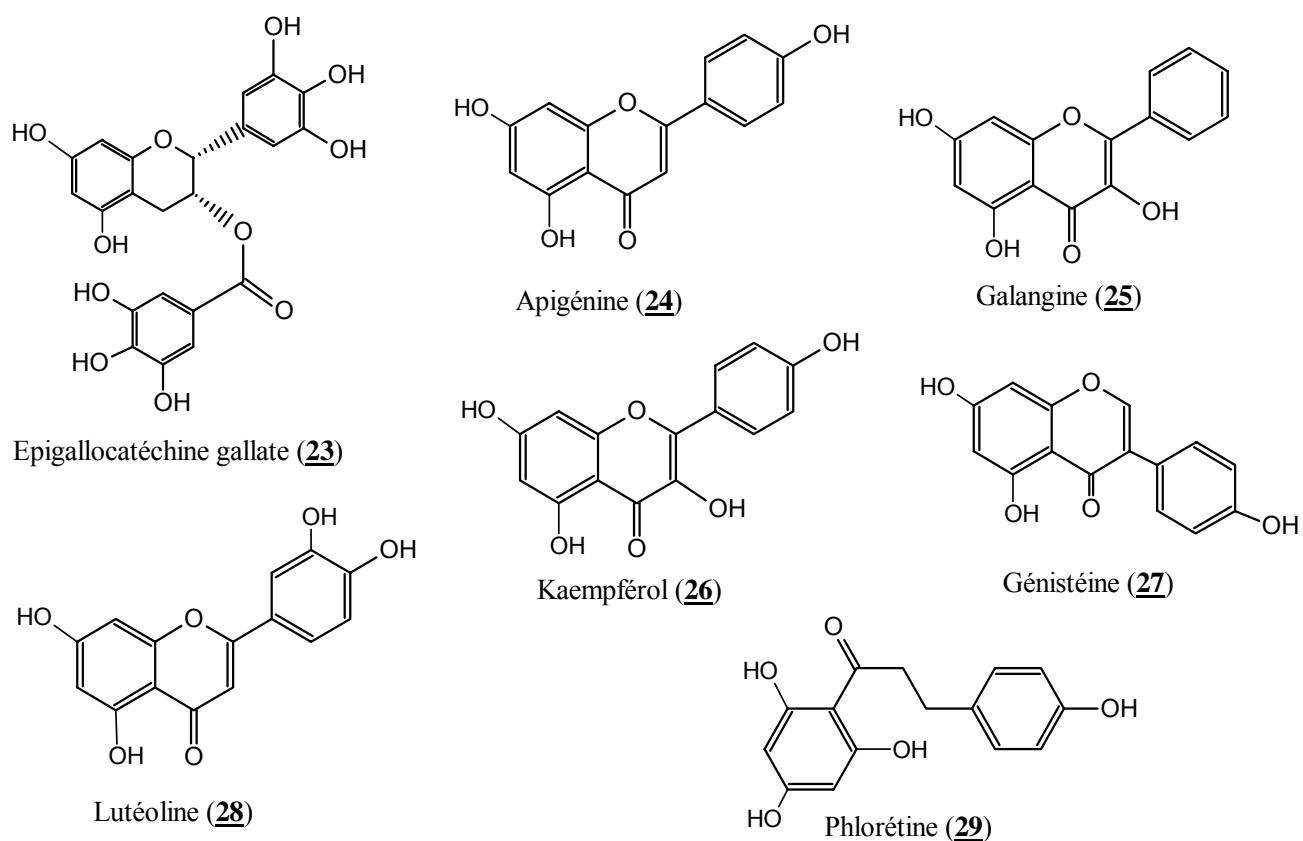


Figure 2: Structure des polyphénols du Champagne (1 à 19) et autres polyphénols (20 à 29)

Première Partie : Étude bibliographique

	Vin Rouge (mg/L)		Vin Blanc (mg/L)		Champagne (mg/L)	
	Mini-maxi	Moyenne	Mini-maxi	Moyenne	Chardonnay Moyenne Cuvées 2000/2001	Pinot Noir Moyenne Cuvées 2000/2001
NON- FLAVONOÏDES						
Acides benzoïques						
Acide gallique (1)	2 à 130	95	1 à 18	7	0,625 (2,6*)	0,46 (39,8*)
Acide protocatéchique (2)	0,2 à 20	12	-	-	0,235	0,41
Acide p-hydroxybenzoïque (3)	0,2 à 15	5	-	-	0,085	0,115
Acide syringique	1,3 à 15	8	-	-	-	-
Acides hydroxycinnamiques						
Acide caféique (4)	0,4 à 15	6	0,4 à 8	4	1,45 (4,9*)	1,855 (12,8*)
Acide p-coumarique (5)	7 à 200	60	-	-	0,48	0,35
Acide férulique (6)	-	-	-	-	0,235	0,385
Acide caftarique (7)	7 à 200	60	1 à 225	50	30 (24,7*)	20 (40,4*)
Acide coutarique (8)	2 à 20	15	0,2 à 70	15	0,74	0,285
Acide 2-S-glutathionylcaftarique (9)	-	-	5 à 50	20	2,8	5,66
Acide fertarique (10)	-	-	-	-	0,8	0,62
Divers						
Tyrosol (11)	1,7 à 80	25	nd à 1,1	-	33,5	15
Trans-resvératrol (12)	0,6 à 10	1,5	0,11 à	0,04	0,09	0,12
Cis-resvératrol	0,2 à 3	0,7	0,221	0,056	-	-
Trans-picéide	1 à 4	1,5	0,02 à 0,45	0,16	-	-
Cis-picéide	0,3 à 2	0,3	0,025 à	0,12	-	-
Tryptophol (13)	0,9 à 18	8	0,45	-	0,875	0,465
Vanilline (14)	-	-	-	-	0,275	0,22
FLAVONOÏDES						
Anthocyanes						
3-glucoside de delphinidol	2 à 70	-	-	-	-	-
3-glucoside de cyanidol	0,4 à 30	-	-	-	-	-
3-glucoside de pétunidol	4 à 60	-	-	-	-	-
3-glucoside de malvidol	24 à 240	-	-	-	-	-
Flavonols						
3-glucoside de myricétol	2 à 6	-	-	-	-	-
3-glucoside de quercétol	3 à 30	-	traces	traces	-	-
Myricétol	2 à 20	-	-	-	-	-
Quercétol (15)	3 à 20	-	-	-	0,1	0,115
Rutine	2 à 35	-	-	-	-	-
Flavanols						
Catéchine (16)	8 à 400	190	1 à 46	35	1,455 (7,5*)	2,605 (74*)
Epicatéchine (17)	6 à 160	80	0,1 à 60	20	0,825 (7*)	1,14 (32,4*)
Procyanidol B1	2 à 200	80	0,1 à 55	6	nd (0,8*)	nd (26,2*)
Procyanidol B2	2 à 152	40	0,1 à 11	4	nd (4,7*)	nd (37,1*)
Procyanidol B3	1 à 55	17	0,02 à 3	2	nd (7,6*)	nd (102*)
Flavanonols						
Astilbine (18)	-	-	0,1 à 2,3	-	nd	nd
Engeletine (19)	-	-	0,06 à 2	-	nd	nd

Tableau 1: Composition en polyphénols des vins rouges, blancs[35] et Champagnes[30]

(*) comparaison des vins de Champagne avec des vins monovariétaux rouges et blancs issus des cépages Pinot noir et Chardonnay respectivement [36]

3. Les espèces oxygénées et carbonylées réactives

Les espèces oxygénées réactives sont connues pour être potentiellement dangereuses, mais néanmoins nécessaires aux voies de signalisation et de détoxification cellulaire. Afin de mieux comprendre les mécanismes médiés non seulement par les espèces oxygénées réactives, mais aussi par les espèces carbonylées réactives, dans l'étiologie ou la progression de différentes pathologies, ce chapitre fera un inventaire non exhaustif des propriétés de ces composés.

3.1. L'oxygène et la vie

L'oxygène que nous respirons (20% de l'atmosphère) est indispensable à la vie. C'est une molécule di-radicalaire dans son état fondamental (Figure 3), il porte deux électrons célibataires, mais du fait de l'état de leurs spins identiques, ils ne peuvent s'apparier, ce qui le rend assez peu réactif.

Il est suffisamment peu réactif pour que nous puissions vivre à son contact sans nous « consumer ». Il l'est assez cependant pour **accepter les électrons** (« oxyder ») du glucose au sein de nos cellules et y produire l'énergie nécessaire à son bon fonctionnement [5].

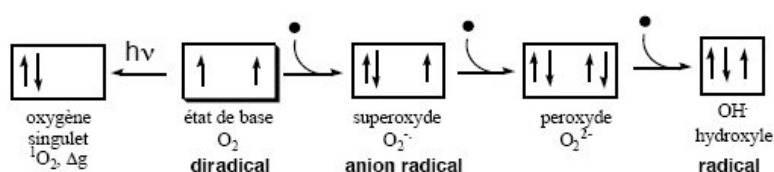


Figure 3: Configurations électroniques de l'oxygène et des différentes espèces issues de l'oxygène

Cette caractéristique est à la base des principales contraintes dont la cellule est l'objet : située entre le besoin de respirer (« consommer de l'oxygène ») et celui de s'en protéger, elle est en permanence à la recherche d'un équilibre autour de l'état d'activation de l'oxygène.

Les principaux désordres biologiques qui l'atteignent résultent de la rupture de cet équilibre avec formation d'Espèces Oxygénées Réactives (EOR, ou Reactive Oxygen Species, ROS en anglais) très délétères si elles ne sont pas rapidement détruites.

3.2. Les « Espèces Oxygénées Réactives »

Les EOR, plus largement que les seuls Radicaux Libres Oxygénés, correspondent à toutes les formes activées de l'oxygène (oxygène singulet, peroxydes, chloronium, nitrites, etc.).

Deux formes principales de l'oxygène activé seul existent. La première résulte d'une simple excitation par les photons lumineux (UV) et ne correspond à aucune réduction, tandis que la seconde découle d'une suite de réductions radicalaires.

3.2.1 Formes activées par les UV

Lorsque la molécule d'oxygène est exposée à des rayonnements ultraviolets d'une certaine longueur d'onde (UV A et B notamment), l'apport énergétique est tel que le spin électronique est inversé. Cette inversion de spin conduit à une espèce activée de l'oxygène appelée « oxygène singulet » (Cf. Figure 3). Sa durée de vie en solution aqueuse est voisine de la microseconde, néanmoins sa grande réactivité avec des molécules riches en électrons laisse supposer qu'il joue un rôle dans de nombreux phénomènes biologiques.

3.2.2 Formes issues de réductions radicalaires

L'apport à l'oxygène diradicalaire, dans son état fondamental, d'un premier électron (obligatoirement de spin opposé à celui existant), provoque sa mono réduction et conduit à la formation d'un radical : l'**anion superoxyde** (Figure 3). Cette nouvelle molécule est toujours radicalaire, mais elle porte en outre une charge négative qui lui confère une certaine polarité. Une telle espèce ne peut rester dans la phase lipidique ; même si elle y a été créée initialement, elle migre alors rapidement dans la phase aqueuse.

Un second électron peut la transformer en **peroxyde d'hydrogène** H_2O_2 (Figure 3), écrit ici sous sa forme ionique O_2^{2-} . C'est l'équivalent de l'eau oxygénée à laquelle les deux protons auraient été arrachés, pour former un dianion, très polaire, soluble toujours exclusivement en phase aqueuse.

Cette espèce oxygénée est très réactive puisqu'elle peut se transformer rapidement par réduction supplémentaire selon la réaction de Fenton ou de Haber et Weiss en une espèce radicalaire très dévastatrice : le **radical hydroxyle $OH\cdot$** (Figure 4).

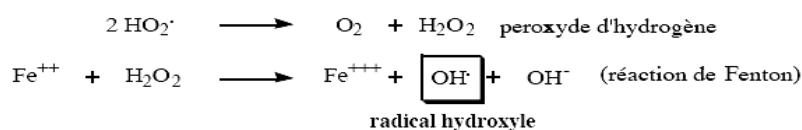


Figure 4: Formation du radical hydroxyle selon la réaction de Fenton[37]

3.2.3 Origine et rôle biologique des radicaux libres

Dans les cellules animales, au sein des mitochondries, le glucose est oxydé en présence d'oxygène, pour produire de l'énergie (ATP). Les cellules relarguent le CO₂ issu de la combustion complète du sucre. Ceci reste vrai tant que tout se passe bien, c'est-à-dire dans environ 95% des cas. Pour la part restante (5% environ), des dysfonctionnements (« fuites » encore appelé « burst respiratoire ») apparaissent et induisent la production de radicaux hydroxyles ou nitroxyles, de peroxyde, de peroxydinitrite, d'anion superoxyde, d'hypochlorite, de chloronium ou autres EOR, dangereux pour l'organisme.

Cependant, ces radicaux libres auraient pu jouer un rôle important dans l'origine de la vie et son évolution biologique, impliquant des effets bénéfiques sur l'organisme [38]. Par exemple, le radical oxygène exerce des actions cruciales dans les transductions de signaux, dans la transcription des gènes et dans la régulation de l'activité de la guanylate cyclase soluble des cellules [39, 40]. De la même manière, le NO[•] est l'une des molécules de signalisation les plus répandues, elle participe aux fonctions cellulaires dans l'organisme [41]. Des concentrations physiologiques de NO[•] produites par les cellules endothéliales sont essentielles pour la régulation de la relaxation et la prolifération des cellules vasculaires du muscle lisse, l'adhésion leucocytaire, l'agrégation plaquettaire, l'angiogenèse, la thrombose, le tonus vasculaire et l'hémodynamique [41]. De plus, le NO[•] produit par les neurones sert de neuromédiateur et le NO[•] généré par les macrophages activés représente un point central de la réponse du système immunitaire [42]. Des études récentes ont montré que les EOR pouvaient également jouer un rôle au niveau moléculaire. Maintenu inactif dans le cytoplasme, le NF-κB, facteur de transcription spécifique des lymphocytes B et inductible dans une très grande variété de types cellulaires, peut être activé par de nombreux facteurs comme les cytokines, les agents infectieux mais aussi par les EOR agissant comme messagers secondaires. En modifiant la régulation rédox du glutathion (GSH), la thiorédoxine (TRX), protéine induite par le stress oxydatif, augmente aussi l'activité biologique du NF-κB. Une fois activé, celui-ci migre dans le noyau de la cellule où il peut transactiver des gènes cibles. Il est ainsi impliqué dans la synthèse de nombreux médiateurs de la réponse immunitaire et de l'inflammation (cytokines, facteur du complément). Plusieurs virus comme le HIV dépendent également du NF-κB pour leur réplication intracellulaire [43].

3.3. Les « Espèces Carbonylées Réactives »

Au cours des deux dernières décennies, les scientifiques ont posé une hypothèse de travail permettant d'expliquer au mieux les principaux dysfonctionnements observés dans certaines pathologies. Les liaisons croisées non enzymatiques résultant d'interactions entre sucres et protéines conduisent à la formation de macromolécules. L'excès de glucose favorise ainsi la « réaction de Maillard » *in vivo*, laquelle est une source d'un excès de « stress oxydant » aboutissant aux phénomènes de glycation et de formation de « produits avancés d'alkylation » (Advanced Glycation End-products, ou AGE en anglais).

3.3.1 La « réaction de Maillard » *in vivo*

L'**excès de glucose** permet à la « réaction de Maillard [44-48]», connue pour survenir à haute température lors de la cuisson des aliments, de se produire aussi *in vivo* [45]. Le sucre réagit avec une amine pour former une base de Schiff instable qui se réarrange spontanément en un produit d'Amadori à l'origine d'un excès de « **stress oxydant** » avec formation d'EOR et d'espèces carbonylées encore plus électrophiles (Espèces Carbonylées Réactives = **ECR** ou Reactive Carbonyl Species (**RCS**) en anglais) à l'origine du « **stress carbonylé** ». Par oxydation, ils se transforment en « produits finaux de glycation avancée » (Advanced Glycation End-products = **AGE**) [49-51].

Ces sucres sont avant tout des espèces **électrophiles** (fonction carbonylées) induisant la formation accrue de produits d'additions de résidus nucléophiles d'acides aminés (peptides, protéines, enzymes, ...) et formant les **bases de Schiff** (Figure 5). Ces imines sont en équilibre avec leurs produits de réarrangement par prototropie 1,3 conduisant aux énamines. Étant bêta-hydroxylées (énols), elles se transforment alors en leurs cétones correspondantes, thermodynamiquement favorisées, appelées « **produits d'Amadori** » (Figure 5). Ces énaminocétones sont encore davantage **réductrices** que les sucres dont elles dérivent et peuvent subir diverses réactions d'oxydation qui conduisent aux « produits terminaux d'alkylation » (AGE) en même temps qu'elles augmentent considérablement, et peut-être très "localement", le stress oxydant.

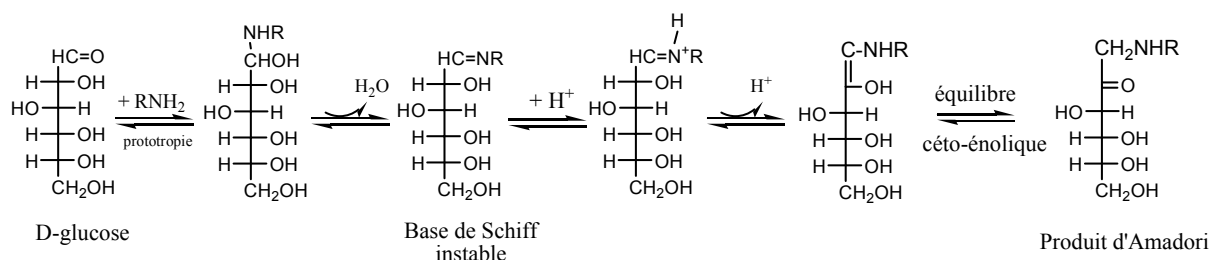


Figure 5: Principe de la réaction de Maillard *in vivo*

Ces sucres sont aussi des « **réducteurs** ». En excès, ils renforcent donc les possibilités de formation d'espèces réactives de l'oxygène et de métaux sous forme réduite induisant particulièrement le **stress oxydant** responsable de l'**irréversibilité** de ces additions débouchant sur des phénomènes de glycation et/ou de glycoxydation.

On peut classer schématiquement ces événements en 3 secteurs, selon les types de réactivités chimiques des composés formés (Figure 6):

- **Secteur I** : ce sont les composés sucrés, leurs bases de Schiff (sucres électrophiles) en équilibre éventuel avec leurs précurseurs, qui se caractérisent par la **réversibilité des réactions**. Dans le cas des oxydations (sucres réducteurs), les mécanismes impliqués restent sous le contrôle des systèmes enzymatiques et des réducteurs biologiques (vitamines, coenzymes, métaux).
- **Secteur II** : il comporte les produits de réarrangements d'Amadori oxydés, ou de glycolyse, dont les fonctions réductrices et électrophiles sont fortement exaltées (composés alpha-dicarbonylés, glyoxal, ac. glyoxylique, ...).
- **Secteur III** : les composés formés à partir des adduits « sucres-amino-acides » (réaction de Maillard) sont oxydés au point de former les « produits terminaux d'alkylation » (AGE + CML, CEL, ...). Le franchissement de cette barrière (secteur II à III) rend leur formation pratiquement "irréversible".

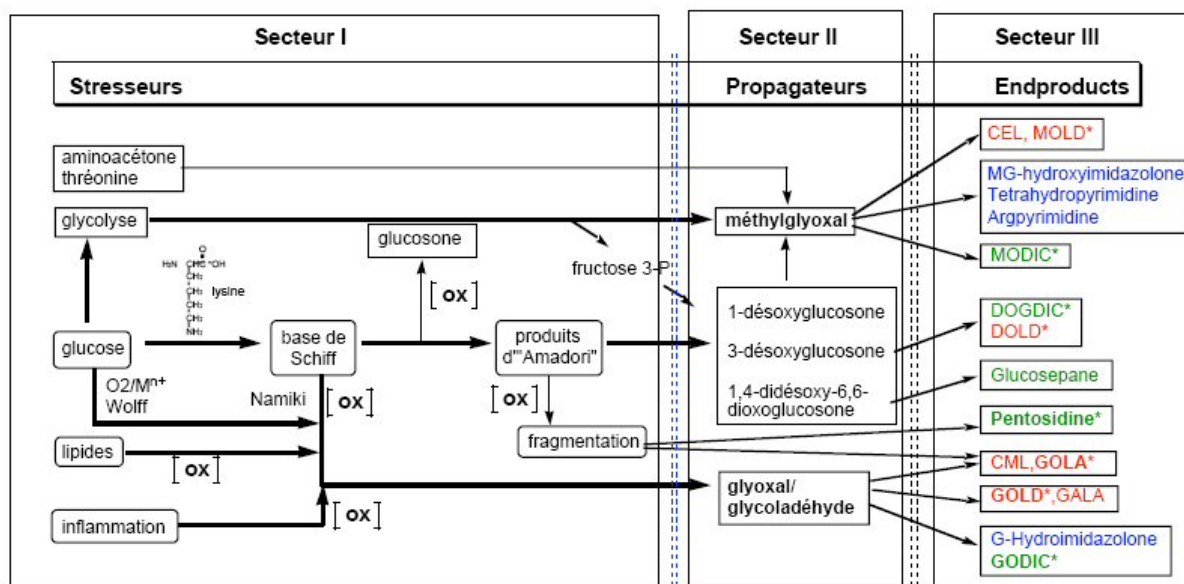


Figure 6: Principales voies de synthèse des « produits terminaux d'alkylation » (AGE) par réaction de Maillard *in vivo* et stress oxydant.

(CEL, carboxyethyl lysine ; MOLD, methylglyoxal lysine dimer ; MODIC, methylglyoxal-derived imidazolamine cross-links ; DOGDIC, 3-deoxyglucosone-derived imidazolamine cross-links ; DOLD ; déoxyglucosone lysine dimer ; CML, carboxymethyl lysine ; GOLA, glyoxal lysine amide ; GOLD, glyoxal lysine dimer ; GALA, glycoaldehyde lysine amide ; GODIC, glyoxal-derived imidazolamine cross-links)

En résumé, la réaction de Maillard *in vivo*, se développant à partir d'un excès de sucre dans le sang (qui peut être transitoire), génère un double stress cellulaire [52, 53] :

- un stress oxydant lié à la production des **EOR** [54],
- un stress carbonylé lié à la production des **ECR** ou intermédiaires réactionnels issus des réarrangements d'Amadori conduisant aux **AGEs** [55].

3.3.2 Conséquences cellulaires et tissulaires de la réaction de Maillard *in vivo*

Les conséquences de la glycation des protéines sont multiples. Glyquées, les protéines perdent certaines de leurs propriétés. Cette modification a des conséquences importantes sur le métabolisme et les fonctions cellulaires.

Les alkylations répétées et irréversibles des protéines intracellulaires (enzymes (SOD, alcool déshydrogénase), récepteurs, ...) aussi bien que des éléments de structure et de la matrice extracellulaire conduisent à l'altération des propriétés cellulaires et inexorablement à la perte de la fonctionnalité tissulaire (**communication intercellulaire, plasticité membranaire, ...**).

Ce faisant, la **tolérance au glucose** diminue, déclenchant le cercle vicieux de la présence de glucose en augmentation, induisant la formation accrue de produits d'addition de résidus nucléophiles d'aminoacides conduisant à des produits d'Amadori. Ces derniers provoquent

une augmentation du stress oxydant et ainsi la formation des produits terminaux d'alkylation ("AGE"), ...

3.4. Les pathologies associées au déséquilibre oxydatif.

La surproduction d'EOR et de ECR est invoquée pour expliquer les altérations cellulaires observées dans plus d'une centaine de physiopathologies différentes[43].

Dans le cas précis du diabète de type II par exemple, les mécanismes biomoléculaires à l'origine des modifications cellulaires et tissulaires ont des conséquences physiologiques évidentes du fait de la concentration élevée de sucre dans le sang.

Sur le plan physiopathologique, des travaux ont étudié le processus de développement de l'augmentation de la pression artérielle consécutive à l'induction d'un déséquilibre alimentaire chez des animaux que leur terrain génétique prédispose à développer la pathologie diabétique. Les résultats ont montré que l'insulinorésistance et les dysfonctionnements endothéliaux précèdent le développement de l'hypertension artérielle, qui augmente pour devenir une hypertension caractérisée [56]. Les auteurs concluent que le dysfonctionnement de l'endothélium vasculaire constitue le mécanisme liant l'insulinorésistance, donc les stress carbonylé et oxydant, à l'hypertension artérielle. Des données complémentaires indiquent que les cellules endothéliales développent elles-mêmes une insulinorésistance [57, 58]. De plus, le traitement par des insulino sensibilisants ou l'augmentation de l'activité physique, deux facteurs améliorant la sensibilité des tissus à l'insuline et la pression artérielle, corrigent et normalisent le fonctionnement de l'endothélium vasculaire [59, 60].

Cette théorie est consolidée par le fait que l'insuline est connue pour augmenter la vasodilatation "endothélium dépendante", et donc, que toute augmentation de l'insulinorésistance s'accompagne de la baisse de la fonction endothéliale [61, 62].

Parallèlement à ces mécanismes et sous l'action des EOR, des peroxydations des structures membranaires (acide arachidonique par exemple) déclenchent la formation d'une série de composés très divers comme les prostaglandines (PG), les thromboxanes (TX) ou les leucotriènes (LT). (Figure 7)

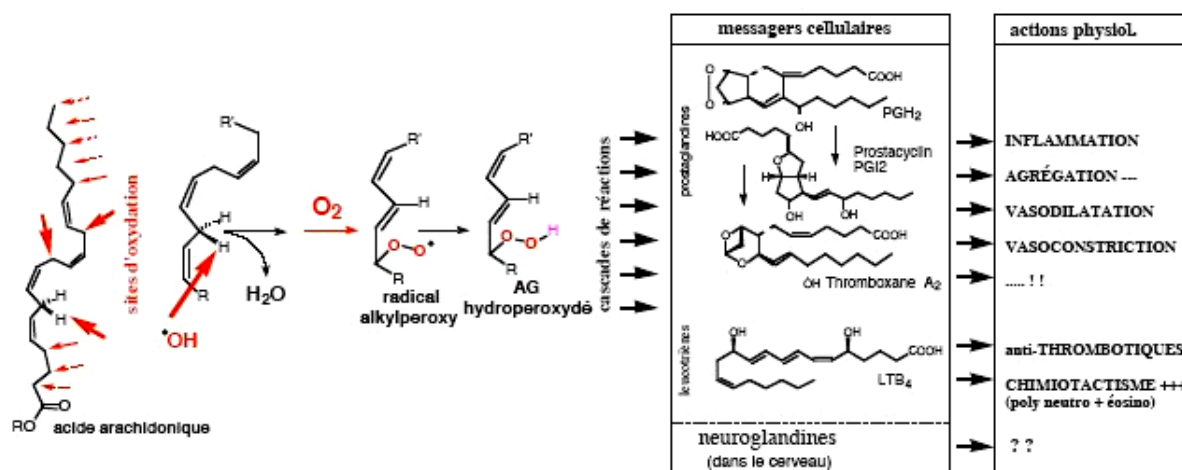


Figure 7: Oxydation radicalaire en chaîne des acides gras: "conséquences biologiques" [63]

Ces molécules sont des messagers cellulaires à la base des réponses biologiques de la réaction inflammatoire. Il est clairement établi que ces phénomènes contribuent pour une grande part à la mise en place des éléments caractéristiques de l'athérosclérose : activation des plaquettes et des macrophages, migration dans l'endothélium vasculaire, transformation en cellules spumeuses, etc...[64-66].

Et lorsqu'il s'agit de peroxydation du cholestérol et des acides gras situés dans les transporteurs sanguins (VLDL, LDL et autres HDL), ils ne sont plus cédés aux cellules qui ne les reconnaissent plus [67] et sont alors à l'origine d'une aggravation de la pathologie par accumulation dans le sang et formation de la plaque athéromateuse.

Outre les pathologies cardiovasculaires et inflammatoires, les EOR et les ECR sont également impliqués dans les cancers, les maladies neurodégénératives (Alzheimer, Parkinson, Huntington) [54, 68-76].

Au niveau du macrophage, des cellules endothéliales, des fibres musculaires lisses et des fibroblastes, il existe un récepteur spécifique des produits de glycation (AGE) appelé RAGE (receptor of Advanced Glycation Endproducts) [77]. Celui-ci est distinct des récepteurs scavengers (captant les LDL oxydés). Son expression est inhibée par l'insuline et augmentée par le TNF (Tumor Necrosis Factor). La liaison des AGEs au récepteur RAGE des cellules conduit à des états cellulaires dits «activés» : elle provoque la formation de radicaux libres, elle stimule l'expression des molécules d'adhésion et déclenche une activité procoagulante ; elle induit la sécrétion de messagers extracellulaires et notamment de cytokines (TNF- α , IL-1, IFN).

3.4.1 Les défenses antioxydantes physiologiques

Cette production physiologique d'EOR est régulée par des systèmes de défense composés d'enzymes (les SODs, superoxydes dismutases, dont une est intracellulaire et l'autre extracellulaire, qui accélèrent la dismutation de l'anion superoxyde, les catalases localisées exclusivement dans le peroxyosome, les glutathions peroxydases ou GPx's qui complètent l'action de la SOD en transformant H_2O_2 en H_2O et O_2 en présence de glutathion, le couple thiorédoxine/thiorédoxine réductase, l'hème oxygénase, la peroxyrédoxine...), de molécules antioxydantes de petite taille (caroténoïdes, vitamine C ou acide ascorbique (Figure 8), vitamines E ou tocophérols (Figure 9), vitamines Q (coenzyme Q10 ou ubiquinone), glutathion (GSH), acide urique, bilirubine...) et de protéines (transferrine, ferritine, céruléoplasmine) qui maintiennent les métaux de transition dans un état inactif pour la formation d'EOR [78]. Certains oligo-éléments comme le cuivre, le zinc, le sélénium sont indispensables pour l'activité des enzymes antioxydantes (Cu, Zn-SOD, Mn-SOD, Se-GPx). Le zinc est également un inducteur des métallothionéines [79], protéines à activité antioxydante et un inhibiteur des réactions de production d'EOR induite par le cuivre.

En situation physiologique, il y a un équilibre parfait entre la production d'EOR et les systèmes de défense antioxydante. Un stress oxydant se définira lorsqu'il y aura un déséquilibre profond entre antioxydants et pro-oxydants en faveur de ces derniers. Cette situation peut résulter d'un dysfonctionnement de la chaîne mitochondriale (ischémie-reperfusion, vieillissement), d'une activation de systèmes enzymatiques (xanthine oxydase, NADPH oxydase, glucose oxydase, monoamine oxydase), d'une libération de fer libre à partir des protéines chélatrices (ferritine) ou d'une oxydation de certaines molécules (glucose, hémoglobine, catécholamines, ...)[78].

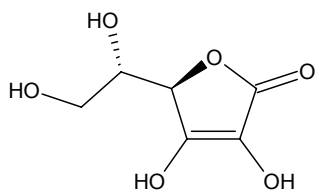


Figure 8: Acide ascorbique (Vit C)

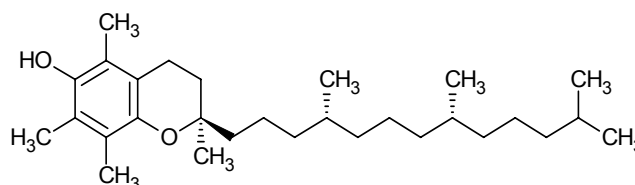


Figure 9: Tocophérol (Vit E)

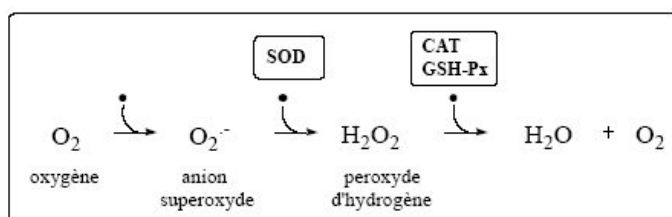


Figure 10: Réduction totale en eau et oxygène de l'anion superoxyde

3.4.2 Les antioxydants apportés par l'alimentation

Un nombre croissant d'études épidémiologiques visant à mieux connaître l'impact de l'alimentation sur la santé montre qu'une alimentation équilibrée de type « méditerranéenne » [80] est fortement associée à une meilleure santé et une plus grande longévité [2]. Ce régime « méditerranéen » est un régime riche en fibres, contenant de faibles proportions de graisses saturées, mais enrichi en graisses mono insaturées, provenant essentiellement de l'huile d'olive [81, 82].

Des recommandations prônant l'augmentation de la consommation de fruits et de légumes ont déjà été diffusées dans de nombreux pays. Cependant, comme les mécanismes et les molécules actives mis en jeu dans les effets protecteurs n'ont pas encore été élucidés, il est suggéré d'en consommer une grande variété [83].

Des études épidémiologiques ont permis de relier la consommation **modérée** et **journalière de vin** à la diminution du risque de maladies cardiovasculaires et/ou de cancer [3, 84, 85]. Lors d'une récente réunion, les plus grands spécialistes mondiaux du domaine ont admis [4] que la majorité des travaux de la dernière décennie permettent de conclure que la consommation régulière et modérée de vin rouge diminue nettement le risque relatif de développer une pathologie cardiovasculaire. Les travaux visant à identifier les molécules responsables des effets anti-inflammatoires, anti-oxydants, anti-prolifératifs et autres propriétés biologiques, les attribuent de plus en plus clairement aux composés du vin et notamment aux **polyphénols** (décrits au paragraphe 4.2).

Les polyphénols sont des molécules fabriquées exclusivement par les plantes ; elles sont leur principale substance de défense (**phytoalexines**). Par exemple, dans les baies de raisin « botrytisées » (pourriture noble), des polyphénols, dont le **resvératrol** (12) sont synthétisés en plus grande quantité pour lutter contre l'invasion du champignon.

Les preuves de leur présence chez les végétaux sont nombreuses, couleur des fleurs jaunes (flavonoïdes), rougissement des feuilles à l'automne et couleur des fruits rouges (anthocyanes), mais le brunissement d'une plante lésée ou attaquée par la pourriture est sûrement l'un des signes les plus visibles de l'intervention des polyphénols dans sa protection.

Quand toutes les défenses physiologiques de l'organisme sont dépassées, ces dernières peuvent alors être renforcées par des apports exogènes en molécules **polyphénoliques** (flavonoïdes, acides phénols, stilbènes, ...) [5, 6]. Ces molécules se retrouvent en quantité importante dans les vins rouges [7], le thé vert [8] ou le cacao [9].

4. Propriétés biologiques et métabolisme des polyphénols

La plupart des travaux visant à démontrer les propriétés biologiques des polyphénols sont réalisées essentiellement *in vitro*. La grande difficulté qui demeure aujourd'hui est de tenter de corréler ces observations à des propriétés *in vivo*. Ainsi, nous nous proposons donc d'étudier tout d'abord le métabolisme et la biodisponibilité de telles molécules avant de nous intéresser à leurs propriétés biologiques.

4.1. Métabolisme et biodisponibilité

Pour explorer et déterminer les mécanismes d'action des micro-constituants de l'alimentation et leur rôle dans la prévention des pathologies humaines, une connaissance des facteurs permettant leur libération des aliments où ils sont contenus, leur absorption et leur devenir dans l'organisme est cruciale [86]. Ce problème, souvent décrit sous le terme de **biodisponibilité**, vocabulaire emprunté à la pharmacologie décrivant généralement la destinée et la proportion d'une drogue à atteindre un site actif, permet aujourd'hui de rendre compte du métabolisme et des potentiels effets des antioxydants alimentaires sur la santé humaine.

Ainsi, tout composé qui est absorbé sera « bioactif », néanmoins, cette activité varie énormément en fonction de la cible. Le concept de « biodisponibilité » regroupe en fait plusieurs paramètres : (i) la disponibilité pour l'absorption ou sa « bio-accessibilité », (ii) l'absorption en elle-même, (iii) la distribution dans les tissus et (iv) sa bio-activité. Il est important de souligner que les antioxydants n'ont pas besoin de pénétrer le système circulatoire pour être bioactifs. En effet, beaucoup de ces composés peuvent jouer un rôle en

limitant les dommages potentiels causés par les EOR ou le stress oxydant dans le tractus gastro-intestinal, sans cependant qu'ils soient absorbés.

Il est devenu clair aujourd'hui que les formes bioactives des flavonoïdes ne sont pas nécessairement les formes phytochimiques naturelles. Plusieurs transformations ont été rapportées dans le colon où les enzymes de la flore intestinale dégradent les flavonoïdes en acide phénols simples, qui pourront être absorbés puis métabolisés par le foie [87].

Les formes circulantes de glucuronides, de sulfates ou de *O*-méthyl sont considérées comme celles étant les plus actives et comme exerçant les meilleurs bénéfices pour l'homme et l'animal [88].

Bien qu'il soit possible que les glucuronides, les sulfates ou les formes *O*-méthylées participent directement aux réactions antioxydantes du plasma en chélatant les formes oxygénées ou nitrosylées dans la circulation sanguine (de la même manière que les formes aglycones) [89], leur concentration circulante demeure trop faible pour être significative. Cependant, il reste des questions concernant leur activité biologique au niveau cellulaire. Les effets cellulaires des métabolites de flavonoïdes dépendent alors très fortement de leur capacité à s'associer aux cellules ou à être internalisés dans le cytosol pour venir interagir avec la cascade des molécules de signalisation [90], vitales pour la fonction cellulaire. Il reste important de souligner que le métabolisme des flavonoïdes dépend également de la nature des cellules à laquelle il s'adresse. Nous étudierons donc deux types cellulaires distincts : les cellules du système nerveux central et les cellules cancéreuses.

4.1.1 Métabolisme des cellules du système nerveux central

Des études épidémiologiques et d'intervention alimentaire récentes, réalisées aussi bien chez l'homme que chez l'animal, ont suggéré que les dérivés phénoliques alimentaires et en particulier les flavonoïdes pouvaient jouer un rôle bénéfique dans la prévention des maladies neurodégénératives [91], des maladies cognitives liées à l'âge [92] et dans les lésions causées par des ischémies-reperfusion [93, 94]. Il est important de souligner que l'accumulation des flavonoïdes dans le cerveau et leur rôle bioactif potentiel est gouverné par les processus mis en jeu au niveau de la Barrière Hémato-encéphalique (BHE), qui permet ou empêche à de tels composés d'entrer dans le cerveau.

Les citroflavonoïdes, comme l'hespérette (20), la naringénine (21) ou leurs métabolites glucuronidés, ainsi que les anthocyanines, les cyanidine-3-rutinoside et les pelargonidine-3-glucoside ont été observés comme étant internalisés sur deux lignées cellulaires endothéliales

de cerveau (bEND5 pour la souris, et RBE4 pour le rat) [95]. Dans ces deux lignées cellulaires, une meilleure internalisation de l'hespéretine (20) et de la naringénine (21) a été observée, ceci étant à mettre en relation avec le caractère polaire de leurs métabolites glucuronidés. Ces résultats démontrent que les flavonoïdes et leurs métabolites sont capables de traverser la BHE, mais cette potentialité de perméation est dépendante du caractère lipophile de ces derniers. Par conséquent, l'internalisation des métabolites de flavonoïdes *O*-méthylés, comme par exemple le 3'-*O*-méthyl de la quercétine (15), serait plus importante que celle de son aglycone. Pour les mêmes raisons, les flavonoïdes glucuronidés, comme la quercétine-7-*O*- β -D-glucoronide, pourraient alors ne pas traverser la BHE, ceci étant à mettre en relation avec leur faible valeur de perméabilité apparente (P_{app}). Cependant, des études ont démontré que certaines drogues glucuronidées, comme la morphine-6-glucuronide, sont capable de traverser la BHE et d'engendrer des effets pharmacologiques [96], ceci suggérant l'existence potentielle d'un mécanisme spécifique pour de tels composés.

Peu de choses sont connues concernant la distribution des flavonoïdes dans les différentes régions du cerveau suite au transport à travers la BHE. Bien que certaines études aient investigué la distribution des flavonoïdes dans le cerveau après une administration orale, celles-ci sont incapables d'identifier le système de transport et/ou les mécanismes métaboliques mis en œuvre.

L'internalisation de l'épicatéchine (17) et de ses métabolites *O*-méthylés a été démontrée dans des cultures primaires de neurones corticaux de souris [97]. Cette perméation de l'épicatéchine (17) et plus particulièrement de ses deux métabolites *O*-méthylés est faible en comparaison des phénomènes observés sur des cultures primaires d'astrocytes [87].

Au même titre que ce qui a été observé pour les métabolites *O*-méthylés de l'épicatéchine (17), les formes *O*-méthylées de la quercétine (15) s'accumulent aussi bien dans les neurones que dans les astrocytes. Cette accumulation est maximale après 2h d'incubation et spécialement pour les formes 3'-*O*-méthyl de ces métabolites [87]. On a pu également observer la conjugaison de glutathion sur la quercétine (15) dans des astrocytes, mais aucun adduit n'a pu être décelé dans les neurones.

Grâce à ces études, il est clair aujourd'hui que les astrocytes accumulent de grosse quantité de flavonoïdes et sont capables de les métaboliser via des voies non-oxydatives. Ces observations pourraient avoir d'importantes implications et notamment *in vivo* où les cellules gliales et les populations de neurones coexistent. L'accumulation astrocytaire et le métabolisme des flavonoïdes auraient alors lieu avant l'exposition aux neurones. Les métabolites astrocytaires pourraient ainsi pénétrer dans les neurones pour influencer leurs

fonctions. La Figure 11 présente l'internalisation et le métabolisme des flavonoïdes dans le cerveau. Les flavonoïdes traversent la BHE (I) et entrent dans les astrocytes où ils sont métabolisés en différents composés oxydés et thiol-conjugués (II). Les flavonoïdes et leurs métabolites peuvent alors accéder aux neurones où ils exercent leurs activités biologiques sur les mitochondries (III) ou sur les molécules de signalisation cellulaire (IV). Le métabolisme astrocytaire peut alors agir pour protéger le neurone de l'exposition excessive de polyphénols réactifs et/ou toxiques tels que la quercétine (15).

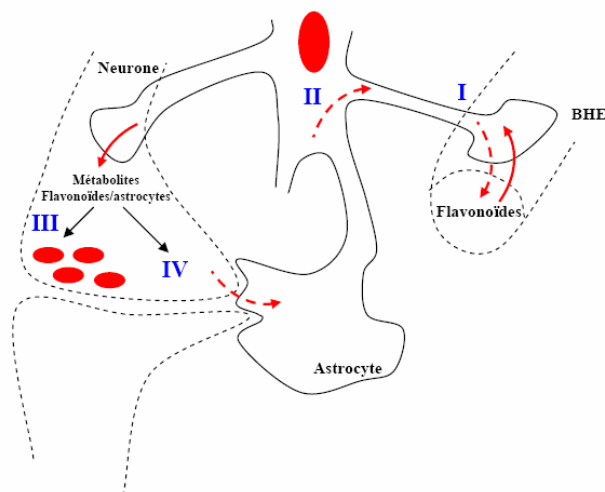


Figure 11: Internalisation et métabolisme des flavonoïdes dans le cerveau [87]

4.1.2 Métabolisme des cellules cancéreuses

La voie par laquelle les flavonoïdes peuvent agir comme agents chimio-préventifs peut être divisée en trois mécanismes distincts : (1) prévention de l'activation des métabolites carcinogènes, (2) prévention des proliférations cellulaires tumorales par inactivation ou « down-régulation » des enzymes pro-oxydantes ou des enzymes intervenant dans la transduction de signaux et (3) induction de la mort cellulaire programmée (apoptose) des cellules tumorales. La capacité d'internalisation et le niveau de métabolisme des flavonoïdes dans les cellules cancéreuses sont centralisés sur ces trois mécanismes d'action.

L'internalisation, le métabolisme et l'élimination de la quercétine (15) ont été étudiés sur des cultures cellulaires humaines d'hépatocarcinomes HepG2 en utilisant des composés marqués au ^{14}C [98]. Ces cellules montrent une accumulation de ce composé et la formation de métabolites 3'-O-méthylés. Une élimination rapide de quercétine (15), aucun composé n'étant détectable après 8 heures, a été envisagée comme étant le résultat d'une dégradation métabolique par le système oxydatif. Les intermédiaires réactionnels initiaux provoqueraient

alors la peroxydation, menant au dioxétane (molécule de haute énergie susceptible de se dissocier en donnant deux molécules de cétones) [98]. Par la suite, l'ouverture du cycle C, mènerait à la formation d'acides carboxyliques, dont un majoritairement observé : l'acide protocatéchique (2). Il est postulé que la dégradation et les changements métaboliques pourraient alors contribuer aux multiples effets cellulaires observés pour la quercétine (15) sur les modèles de cultures cellulaires et *in vivo*. En effet, le potentiel de la quercétine (15) à agir comme un agent cytotoxique, propriété intéressante dans le cas des cellules cancéreuses, est lié à son métabolisme oxydatif menant à des ortho-quinones [99].

L'internalisation cellulaire de l'épicatéchine (17), de l'épigallocatechine gallate (EGCG (23)), de l'acide gallique (1) et de la quercétine-3-glucoside, ainsi que leurs effets sur le cycle cellulaire ont été étudiés sur des cultures cellulaires d'adénocarcinome de colon (Caco-2) [100]. L'épicatéchine (17), l'EGCG (23), l'acide gallique (1) et la quercétine-3-glucoside ont tous révélé une internalisation significative dans les cellules Caco-2 après 24 heures. Les auteurs ont également montré que l'épicatéchine (17) pénètre les cellules à hauteur de $0,43 \pm 0,22$ ng/10⁶ cellules après 24 heures d'incubation et augmente jusqu'à $3,50 \pm 2,2$ ng/10⁶ cellules après 72 heures d'exposition. De plus, ils ont observé des différences concernant la pénétration de l'épicatéchine (17) et de l'EGCG (23), la quantité d'épicatéchine (17) augmentant régulièrement entre 12 et 72 heures, alors que celle de l'EGCG (23) atteint un niveau maximal à 48 heures. Alors que l'accumulation de l'épicatéchine (17) et l'EGCG (23) demeure importante et détectable à tous les temps d'incubation, la quercétine-3-glucoside, en revanche, pénètre moins la cellule et est indétectable après 72 heures. Cette faible accumulation serait due au caractère polaire de ces composés (résultats observés également pour les composés glucuronidés sur des cultures de fibroblastes et de cellules de cerveau). Néanmoins, ce type de composé pourrait être un meilleur substrat pour les protéines de résistance multi-drogues (MRP2) [101]. Des preuves de l'accumulation indirecte de flavonoïdes dans la cellule sont à mettre en relation avec le fait que les flavonoïdes poly-*O*-méthylés, nobilétine et tangéretine, inhibent très fortement la croissance de cellules carcinomateuses (HTB43), alors que la quercétine (15) et la taxifoline (22) n'ont aucun effet significatif (du fait du caractère hydrophobe des composés poly-*O*-méthylés en comparaison aux produits méthoxyméthylés). Dans tous les cas, les composés *O*-méthylés demeurent plus « bio-disponibles » pour les cellules cancéreuses que les composés aglycones natifs.

4.2. Propriétés biologiques des polyphénols

Les scientifiques recherchent activement aujourd'hui les raisons médicales qui sous-tendent les observations faites par les épidémiologistes au sujet du « French Paradox » [102]. Leur découverte et les mécanismes qui les sous-tendent sont des enjeux considérables pour la santé de demain. Par leur extrême réactivité, les radicaux libres sont responsables de nombreuses pathologies (cf. paragraphe 3.4) et la capacité des composés polyphénoliques à assurer une protection efficace contre ces espèces délétères a été maintes fois proposée comme une des meilleures explications scientifiques des observations faites par les épidémiologistes.

Depuis une dizaine d'années, les travaux tentant d'élucider les mécanismes biologiques mis en jeu dans différentes pathologies et l'action de polyphénols sur ces dernières n'ont cessé d'augmenter.

4.2.1 Polyphénols et cancer

Outre le bénéfice apporté par les polyphénols dans la prévention des maladies cardiovasculaires, de nombreuses études épidémiologiques tendent à montrer les effets protecteurs des polyphénols du vin contre les pathologies cancéreuses [103]. Il s'agit d'une propriété majeure des polyphénols du vin, qui n'est pas entièrement liée à leurs propriétés antioxydantes.

La carcinogenèse est caractérisée par un processus complexe qui implique une série d'étapes individuelles. Depuis le début des expérimentations animales, il a été généralement admis que la carcinogenèse consiste en trois étapes distinctes : l'**initiation**, la **promotion** et la **progression** (cf. Figure 12).

- L'**initiation** est un événement irréversible qui débute quand la cellule saine est exposée à un carcinogène et aux dommages de l'ADN génomique demeurant non réparé ou mal réparé par les systèmes enzymatiques. Dans le cas d'une induction carcinogène par un agent chimique, l'initiation implique la capture de l'agent carcinogène, sa distribution et son transport vers les organes ou les tissus dans le but d'être métabolisé. L'interaction d'un métabolite avec de l'ADN cellulaire conduit à des dommages génotoxiques et cause des mutations.
- La **promotion** est l'expansion des cellules endommagées pour former une tumeur pré-maligne composée de nombreuses cellules activement proliférantes.

- La **progression** est un processus **irréversible** qui produit de nouveaux clones de cellules tumorales possédant des propriétés prolifératives accrues, invasives et des potentiels métastatiques.

Les agents bloquants sont généralement des composés qui inhibent l'initiation, autant en jouant sur la formation de carcinogènes provenant de molécules précurseurs ou de métabolites réactifs, qu'en empêchant les espèces carcinogéniques d'interagir avec l'ADN, l'ARN ou les protéines. Ainsi, les stilbénoides, tel le resvératrol (12) ont montré *in vitro* une action inhibitrice sur les trois phases principales de cancérisation [104] : initiation, promotion (par diminution caractéristique de ces états précancéreux : cyclooxygénase-2), propagation (par induction de la différenciation des cellules cancéreuses : perte de leur caractère immortel (apoptose)).

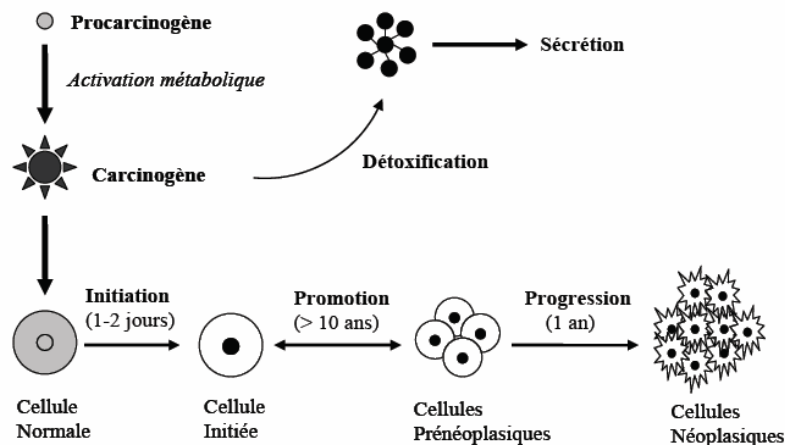


Figure 12: Représentation schématique des étapes de carcinogénèse [105]

De nombreux mécanismes biologiques participent à l'oncogénèse. De récents progrès en biologie moléculaire ont permis de mieux comprendre les mécanismes de régulation notamment de la prolifération et de l'apoptose, ainsi que les signaux de transduction à partir d'un récepteur cellulaire jusqu'à son gène effecteur [106].

Les mécanismes de régulation des polyphénols sur les lignées cancéreuses peuvent alors être scindés en sept actions distinctes : (1) Prévention de l'activation métabolique de carcinogènes ; (2) Antiprolifération ; (3) Modification ou arrêt du cycle cellulaire ; (4) Induction de l'apoptose ; (5) Promotion de la différenciation cellulaire ; (6) Inhibition des mécanismes d'angiogénèse ; (7) Modulation de la résistance multi-drogue [107].

➤ **PRÉVENTION DE L'ACTIVATION DE CARCINOGENÈS**

Les études *in vitro* et *in vivo* ont montré que certains polyphénols modulent le métabolisme ainsi que la disponibilité des carcinogènes et peuvent ainsi contribuer à la prévention des cancers [108].

Un mécanisme important par lequel les polyphénols peuvent exercer leurs effets se situe au travers des enzymes du métabolisme (cytochrome P-450). Ces dernières activent un large nombre de pro-carcinogènes en intermédiaires métaboliques qui pourront interagir à leur tour et finalement promouvoir la carcinogénèse.

Les flavonoïdes (quercétine (15), apigénine (24), galangine (25) et kaempférol (26)) ont montré leur capacité à inhiber l'activité de certaines iso-enzymes du cytochrome P-450 comme la CYP1A1 et la CYP1A2 (ces enzymes jouent un rôle majeur dans l'activation de carcinogènes, comme les hydrocarbures poly-cycliques et les amines hétérocycliques) [109]. CYP1A1 est une des enzymes clé du métabolisme des xénobiotiques. Avec la cytochrome P-450 réductase, ils forment un système mono oxygénase qui active certains pro-mutagènes comme le B[a]P ou d'autres polluants à activité mutagénique.

Un autre mécanisme d'action est l'induction des enzymes du métabolisme telles que la glutathion-S-transférase, la quinone réductase ou l'UDP-glucuronyl transférase [110], par lesquelles les carcinogènes sont détoxifiés et donc plus facilement éliminés de l'organisme. Ceci peut également expliquer les effets chimio-préventifs des flavonoïdes contre le cancer.

De plus, quelques flavonoïdes sont de puissants inhibiteurs des aromatasés [111]. Les études montrent que l'œstrogène est impliqué dans les cancers du sein. L'œstradiol, le plus puissant œstrogène endogène est biosynthétisé par le complexe du cytochrome P-450, nommé aromatasé. L'inhibition de l'aromatasé est une importante approche dans la réduction des effets de l'œstrogène dans les cancers du sein hormono-dépendants. De ce fait, les flavonoïdes peuvent être considérés comme des agents potentiels contre les cancers du sein, au travers de l'inhibition de l'activité aromatasé.

➤ **ANTIPROLIFÉRATION**

La non régulation de la prolifération cellulaire apparaît comme étant le **point clé** d'une susceptibilité cellulaire à la **néoplasie**. La prévention des cancers est généralement associée à une inhibition, une réversion ou un retard de l'hyper-prolifération cellulaire. De nombreux polyphénols ont montré leur potentialité à inhiber les proliférations cellulaires, sur un nombre important de lignées humaines, sachant qu'ils sont alors peu ou pas toxiques pour les cellules saines [112].

Les mécanismes moléculaires de l'antiprolifération impliquent l'inhibition des processus pro-oxydants responsables de la promotion des cancers. Il est généralement admis que la formation d'espèces oxydantes (EOR), catalyse la promotion des tumeurs et les phases de propagation, qui font suite aux étapes d'initiations (activation métabolique des carcinogènes en mutagènes).

Les enzymes pro-oxydantes induites ou activées par divers promoteurs de tumeurs, comme par exemple les esters de phorbol, comprennent les enzymes du métabolisme de l'acide arachidonique : la cyclooxygénase (COX) et la lipoxigénase (LOX). La cyclooxygénase-2 (COX-2) est une enzyme clé catalysant la production de prostaglandines en réponse à des stimuli inflammatoires. De nombreux travaux suggèrent que celle-ci est impliquée dans le développement de tumeurs [113, 114]. Il a été montré que les flavonoïdes sont particulièrement efficaces pour inhiber la COX [115], mais également la xanthine oxydase (transforme la xanthine en acide urique) [116], ou encore la LOX [117] et ainsi inhiber la prolifération cellulaire des tumeurs.

Une corrélation existe entre la capacité d'une molécule à induire le relargage de prostaglandines *in vitro* et la capacité de promouvoir une tumeur chez la souris. Des études antérieures ont pu montrer que les prostaglandines jouent ainsi un rôle crucial dans l'induction de l'activité ornithine décarboxylase (ODC) [118]. L'ODC, enzyme impliquée dans la biosynthèse des polyamines, est corrélée au taux de synthèse de l'ADN et à la prolifération cellulaire dans de nombreux tissus. L'inhibition de la biosynthèse des polyamines peut contribuer au mécanisme de l'activité antiproliférative des flavonoïdes. Des expérimentations montrent que les polyphénols (par exemple le resvératrol (12)) peuvent inhiber l'ODC induite par les promoteurs de tumeur et donc diminuer fortement la quantité de polyamines formées ainsi que la synthèse de protéines ou d'ADN [119].

Une dernière solution permettant de réguler la prolifération cellulaire est de tenter d'agir par le biais de molécules naturelles sur les enzymes de transduction de signal comme par exemple les protéines à tyrosine kinase (PTK), les protéines kinase C (calcium dépendantes), les phosphoinositide-3-kinases (PIP₃) ou les MAP kinase [90].

➤ **MODIFICATION OU ARRÊT DU CYCLE CELLULAIRE**

Les composantes moléculaires du cycle cellulaire et de ses points de surveillance, « *checkpoints* » en anglais, sont importantes en cancérologie. En effet, leur connaissance peut servir à évaluer individuellement les tumeurs et à identifier leurs déterminants moléculaires,

ainsi qu'à mettre au point de nouvelles approches thérapeutiques, éventuellement adaptées à chaque type de tumeur en fonction de ses caractéristiques moléculaires.

Un des mécanismes fondamentaux de la cancérogenèse est la prolifération incontrôlée de cellules tumorales. La majorité des cellules d'un organisme normal ne se divisent pas : elles sont dites **quiescentes** (phase G₀ pour *Gap 0*). Le passage des cellules dans une phase de prolifération nécessite le déclenchement du **cycle cellulaire**, ceci étant décrit comme un point de non retour (*restriction point* en anglais). Passé celui-ci, la cellule progresse dans le cycle cellulaire, qui se décompose en quatre phases : G₁ (*Gap 1* ou pause 1, qui précède la synthèse d'ADN), S (synthèse d'ADN), G₂ (*Gap 2* ou pause 2) qui précède la phase M (mitose).

Le déroulement correct des phases successives du cycle cellulaire est assuré par une famille de kinases sérine-thréonine dites kinases dépendantes des cyclines (**CDK**). La chronologie de leurs activations est déterminée par leurs modifications post-traductionnelles (phosphorylation/déphosphorylation) et par l'association à une **cycline**, qui constitue la sous unité régulatrice du complexe enzymatique. On distinguera ainsi les cyclines dites G₁ (cyclines C, D1-3 et E) qui contrôlent la progression en phase G₁ et la transition G₁/S et les cyclines dites mitotiques (cyclines A et B) qui interviennent à la transition G₂/M et en mitose [120, 121] (cf. Figure 13).

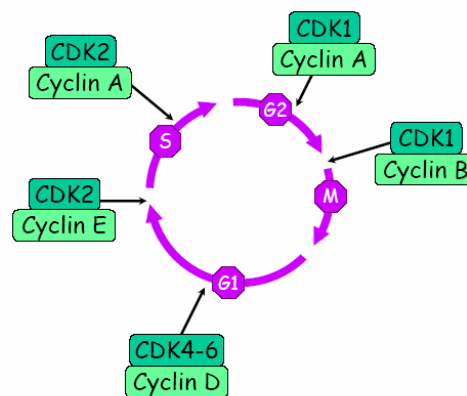


Figure 13: Schéma du cycle cellulaire et de ses régulateurs

Les CDKs ont été reconnues comme des clés régulatrices de la progression du cycle cellulaire. Des altérations et des dérégulations de l'activité de ces dernières sont les marqueurs pathogéniques de la néoplasie. Un certain nombre de cancers sont associés à une hyperactivité des CDKs, due à une mutation génique ou à une inhibition génique de ces derniers. De ce fait, des inhibiteurs ou des modulateurs pourraient être intéressants comme nouveaux agents thérapeutiques.

Un certain nombre d'études ont montré les actions des polyphénols sur la régulation du cycle cellulaire. Quelques unes d'entre elles sont résumées dans le Tableau 2.

De nombreux travaux révèlent également que le flavopiridol (flavone synthétique) est capable d'induire l'arrêt du cycle cellulaire en phase G₁ ou G₂/M en inhibant les CDKs [122].

Auteurs	Lignées cellulaires	Résultats
Estrov et coll. [123] Etude de l'impact du resvératrol sur des lignées cellulaires de leucémie myéloïde aiguë.	OCIM2	L'analyse est effectuée après 6 heures d'incubation. Les cellules sont bloquées en phase S. Avec 50µM de resvératrol (12) 64% des cellules sont arrêtées en phase S, 11 % en G ₂ /M et 14% en G ₀ /G ₁ .
Ferry-Dumazet et coll. [124] Etude de l'impact du resvératrol sur des lignées cellulaires hématopoïétiques humaines.	K562 (myéloïde) KCL22 (LLC, Bcr-Abl ⁺) THP1 (promonocytiques)	Le resvératrol (12) à 100µM mène les cellules THP1 hors du cycle cellulaire au travers de l'apoptose. Pour les lignées KCL22 et K562, celles-ci sont bloquées en phase G ₂ /M consécutif à une accumulation de cyclines A et B ₁ .
Hsieh et coll. [125] Effet du resvératrol sur des cellules lymphocytaires du sang périphérique activées par du PHA.	Lymphocytes du sang périphérique	L'addition de 50µM de resvératrol (12) sur les lignées lymphocytaires non stimulées par du PHA n'a aucun effet sur le cycle cellulaire. Sur les cellules stimulées, 50 µM de RES bloque les cellules en G ₁ /S.
Bernhard et coll. [126] Effet du resvératrol sur des lignées cellulaires de leucémie aiguë.	CEM-C7H2	Le resvératrol (12) à 20 µM et au dessous induit un arrêt du cycle cellulaire en phase S sur les lignées lymphocytaires leucémiques.
Ahmad et coll. [127] Effet de l'EGCG (23) sur les carcinomes épidermoïdes humains.	A431	EGCG (23) provoque un arrêt cellulaire en G ₀ /G ₁ sur les lignées A431, ceci étant dû à une surexpression de p21/WAF1, de p27/KIP1, de p16 et p18, et une sous-modulation de l'expression des cyclines D1, des cdk4 et cdk6.
Gupta et coll. [128] Effet de l'EGCG (23) sur les lignées de cancer de la prostate.	DU145 et LNCaP	Les auteurs observent un arrêt du cycle cellulaire en G ₀ /G ₁ sur les lignées de cancer de la prostate, accompagné par une augmentation de l'expression de p53 et une induction de p21/WAF1.
Semenov et coll. [129] Effet du flavopiridol (flavone synthétique) sur le myélome multiple.	U266 et RPMI 8226	Aucune des cyclines D1 (protéines des phases G ₁ /2), ou A (protéines des phases G ₂ /M) sont affectées par le traitement au flavopiridol. Cependant les auteurs observent une diminution du taux de Bcl-2 et/ou de Mcl-1 (trouvé dans les cellules de myélomes).
Kennedy et coll. [130] Effet de la (-)-épigallocatechine sur les tumeurs d'ascites de Ehrlich.	EATC (Ehrlich ascite tumor cells)	Les auteurs montrent une accumulation des cellules en phase G ₁ en présence d'épigallocatechine. Ils observent également une diminution de la phosphorylation de la protéine du rétinoblastome (pRb).
Della Ragione et coll. [131] Effet du resvératrol sur des lignées	HL-60	Les auteurs montrent que pour une concentration de 30µM de resvératrol

Auteurs	Lignées cellulaires	Résultats
cellulaires pro-myélocitaires.		(12), les cellules HL-60 sont toutes bloquées en S/G ₂ , ceci étant coordonné à une augmentation des cyclines A et E, mais également des formes phosphorylées (inactives) de cdc2.
Liang et coll. [132] Etude de l'activité du resvératrol sur les tumeurs du colon.	HT29	Les auteurs montrent que les cellules de tumeurs du colon HT29 sont bloquées en phase G ₂ du cycle cellulaire en présence de 100µM de resvératrol (12). Cet arrêt est dû à l'inactivation de la protéine kinase p34 ^{CDC2} , et à l'augmentation du nombre de protéines inactives de p34 ^{CDC2} .

Tableau 2: Références bibliographiques des modificateurs du cycle cellulaire

➤ **INDUCTION DE L' APOPTOSE**

Le terme d'**apoptose** ou **mort cellulaire programmée** désigne un tableau morphologique associant condensation cytoplasmique et chromatinienne, fragmentation de l'ADN, externalisation des phosphatidylsérines membranaires. La synthèse de macromolécules est parfois requise et ces changements sont rapidement suivis de la phagocytose des cellules mortes. Il existe d'autres tableaux morphologiques de mort cellulaire, comme la mort **nécrotique** ou la mort par **vacuolisation** [133].

La mort cellulaire joue un rôle fondamental dans le maintien de l'intégrité de l'organisme et son dérèglement a été identifié dans de nombreux processus pathologiques. Une activation en cascade des protéases à cystéine : les **caspases** (dont 14 sont connues à ce jour), conduit au clivage de leurs substrats protéiques essentiels à la survie cellulaire et permet l'amplification d'un signal de mort provenant principalement de deux voies : (1) l'une déclenchée par des protéines relarguées par des mitochondries, (2) l'autre engendrée dans la membrane plasmique par des récepteurs, membres de la famille du TNFR (*Tumor Necrosis Factor Receptor*). Pour chacune de ces deux voies, les mécanismes d'intégration des signaux s'établissent au niveau d'un complexe multi-protéique, respectivement l'**apoptosome** et le **DISC** (*Death Inducing Signaling Complex*).

La mitochondrie, depuis longtemps identifiée comme l'organite indispensable à la production d'ATP, a été plus récemment également impliquée dans la régulation moléculaire de mort cellulaire. En effet dans une cellule engagée dans un processus de mort cellulaire, on observe une perméabilisation de la membrane mitochondriale (à l'origine de la libération de protéines pro-apoptotiques de l'espace intermembranaire vers le cytosol), accompagnée dans la plupart des cas d'une chute du potentiel transmembranaire mitochondrial ($\Delta\Psi_m$). Une des hypothèses postule l'ouverture d'un mégapore mitochondrial appelé PTPC (*Permeability*

Transition Pore Complex), complexe multiprotéique composé en majorité de la porine de la membrane mitochondriale externe : VDAC (*Voltage dependent Anion Chanel*) et d'un « translocateur » de nucléotides à adénine (ANT) inséré dans la membrane mitochondriale interne. Selon ce modèle, les protéines pro-apoptotiques telles que Bax, en s'associant au PTPC, favoriseraient son ouverture, provoquant ainsi un gonflement ou « swelling » en anglais de la matrice mitochondriale (du à une entrée d'eau et de solutés provoqués par une hyperosmolarité de la matrice). Ceci provoquerait la rupture mécanique de la membrane[134].

La découverte des récepteurs de surface TNFR mieux connus sous le nom de « récepteur de mort », et constitués de sept sous-membres : Fas (CD95/APO-1), TNFR1 (p55/CD120a), DR3, DR6, p75NGFR (*Nerve Growth Factor Receptor*), DR4 (TRAIL-R1) et DR5 (TRAIL-R2), a permis de mieux comprendre les mécanismes moléculaires mis en place lors de l'induction de la mort cellulaire programmée.

Le complexe multiprotéique formé à la membrane par Fas, FADD (*Fas Death Domain*) et la caspase 8 à la suite de la multimérisation du récepteur Fas par son ligand (Fas-L) a été appelé DISC. Le rapprochement des pro-caspases 8 dans le DISC permet leur clivage réciproque et la libération des formes actives de la caspase 8 dans le cytosol, qui vont à leur tour cliver un certain nombre de caspases effectrices telles que les caspases 3, 6 et 7 [134].

De nombreuses études montrent que les polyphénols possèdent une activité apoptotique sur un certain nombre de cellules cancéreuses alors qu'ils sont non toxiques pour les cellules saines. Un certain nombre de mécanismes sont mis en jeu, comme par exemple l'inhibition de l'activité des ADN topoisomérases I/II, la régulation de l'expression des protéines de choc thermique (HSP), le relargage du cytochrome C, une down-régulation de Bcl-2 et Bcl-X(L) mais une promotion de Bax et Bak, suppression de Mcl-1, etc.

Quelques unes des études réalisées sur des cellules cancéreuses en présence de polyphénols sont rassemblées dans le Tableau 3.

Auteurs	Lignées cellulaires	Résultats
Dorrie et coll. [135] Etude de l'action du resvératrol sur des lignées de leucémie lymphoblastique aiguë de patients.	SEM, RS4 ;11 MV4 ;11 REH Nalm-6 Jurkat CEM HL-60	Les auteurs ont montré que toutes les lignées cellulaires meurent par apoptose non CD95 dépendante en présence de resvératrol (12) (50µM). Les auteurs montrent également que l'apoptose passe par la mitochondrie et par l'activation de la caspase 9.
Clément et coll.[136] Etude de l'action du resvératrol sur des lignées cellulaires tumorales	HL-60 T47D	Les auteurs montrent que les cellules incubées 18 heures en présence d'une concentration de 32

Auteurs	Lignées cellulaires	Résultats
leucémiques et cancer du sein.		μM de resvératrol (12) meurent par apoptose (externalisation des PS). Apoptose passant par la voie CD-95.
Delmas et coll. [137] Étude de l'action du resvératrol sur des lignées cancéreuses de colon.	SW480	Les auteurs montrent que pour une gamme de 10 à $100\mu\text{M}$ de resvératrol (12), l'apoptose est induite dans les cellules SW480. Cette mort apoptotique n'est pas due à l'intervention de Fas, mais passe par les caspases mitochondriales activées par Bax et Bak.
Tsan et coll. [138] Étude de l'action du resvératrol sur les lignées cellulaires cancéreuses monocytaires.	THP1	Les auteurs montrent que le resvératrol (12) ($30\mu\text{M}$) induit l'apoptose sur les lignées THP1. Cette dernière semble Fas indépendante.
Zhao et coll. [139] Étude de l'action des polyphénols du thé sur des lignées cellulaires leucémiques.	HL-60	Les auteurs montrent que les lignées cellulaires HL-60 incubées avec $250\mu\text{g/ml}$ de polyphénols de thé pendant 5 heures, meurent par apoptose.
Liu et coll. [140] Étude de l'effet de la woodfordine sur les cellules cancéreuses de leucémie myéloïde chronique.	K562	Les auteurs montrent que la woodfordine ($15\mu\text{M}$) est capable d'induire l'apoptose dans les cellules K562. Celle-ci est due à une diminution du potentiel transmembranaire mitochondrial, l'activation des caspases 3 et 9.
Roman et coll. [141] Étude de l'effet du resvératrol sur les cellules cancéreuses de leucémie lymphoïde chronique.	WSU-CLL ESKOL	Les auteurs montrent que le resvératrol (12) (dès $6\mu\text{M}$) induit l'apoptose dans les cellules de LLC, avec une perte du potentiel transmembranaire mitochondrial et l'activation des caspases.
Smith et Dou. [142] Effet de l'épigallocatechine (EGC) de thé sur les cellules leucémiques.	Jurkat HL-60 K562	Les auteurs montrent une accumulation des cellules en phase S et une inhibition en phase S/G ₂ due à l'apoptose en présence d'EGC. Sur des populations pauvres en cellules en phase S, l'EGC ne produit pas d'apoptose.
Billard et coll. [143] Étude de l'effet du vinéatrol (resvératrol et epsilon viniférine) sur les cellules de leucémie lymphoïde chronique (LLC).	Cellules de LLC	Les auteurs montrent une action du vinéatrol (mélange de resvératrol et viniférine) sur les cellules leucémiques provoquant l'apoptose suite à une perte du potentiel transmembranaire mitochondrial, l'activation des caspases 3, la diminution de Bcl-2.

Tableau 3: Polyphénols et apoptose

➤ **PROMOTION DE LA DIFFÉRENTIATION CELLULAIRE**

En supplément des propriétés anticancéreuses décrites précédemment, il est intéressant de noter que certains flavonoïdes peuvent permettre la différenciation de lignées cellulaires cancéreuses, leur permettant d'acquérir les caractéristiques phénotypiques de cellules matures[144].

Par exemple, la génistéine (27), l'apigénine (24), la lutéoline (28), la quercétine (15) et la phlorétine (28) sont capables de différencier les lignées de leucémie myéloïde aiguë en granulocytes et monocytes [145].

Ainsi, l'induction terminale de la différenciation par les flavonoïdes peut mener à l'élimination éventuelle des cellules tumorigéniques et les transformer en cellules normales. Ces composés pourraient donc être développés comme des agents anticancéreux prometteurs.

➤ *INHIBITION DES PROCESSUS D'ANGIOGÈNESE*

Les flavonoïdes sont connus comme des inhibiteurs de l'angiogénèse [146]. La capacité particulière de ces derniers à stopper le développement des tumeurs solides [147] tient essentiellement à l'inhibition des processus néo-angiogéniques. Les inhibiteurs de l'angiogénèse, tels que les polyphénols, sont capables d'interférer avec de nombreuses étapes de celle-ci, comme la destruction des vaisseaux sanguins néoformés, la prolifération et la migration des cellules endothéliales ou la formation du « lumen ». Par exemple, récemment le resvératrol (12) a été montré comme inhibiteur de l'angiogénèse en agissant comme suppresseur de FGF-2 et VEGF. La quercétine (15) a montré les mêmes particularités, mais pour des concentrations plus élevées [148].

➤ *MODULATION DE LA RÉSISTANCE MULTI-DROGUE*

La P-glycoprotéine (P-gp) a tout d'abord été étudiée dans le contexte de la recherche sur le cancer où sa surexpression dans les cellules tumorales était associée à une résistance multidrogue (MDR). Dans les cellules cancéreuses, la P-gp agit comme une pompe qui permet l'extrusion des agents cytotoxiques, abaissant ainsi leur concentration intracellulaire. Ce transporteur ATP-dépendant peut également exporter une grande quantité de composés comme par exemple les alcaloïdes (étoposide, paclitaxel et vinca-alcaloïdes), les antibiotiques (anthracyclines, actinomycine) [149], les cytokines [150].

Certains polyphénols ont montré de puissants effets contre les fonctions exportatrices de la P-gp. En effet, certains flavonoïdes (EGCG (23) par exemple) sont capables d'augmenter les concentrations de doxorubicine (médicament administré pour traiter le cancer du sein, du

poumon, de la vessie, de l'endomètre, de l'utérus et les lymphomes) dans les tumeurs, grâce à leur capacité de réverser l'action des protéines multi-drogues [151].

4.2.2 Polyphénols et neuroprotection.

Comme nous l'avons vu précédemment, le stress oxydant est responsable d'un nombre important de pathologies. Le cerveau, qui consomme une grande quantité d'oxygène, n'échappe pas à la règle et se retrouve exposé pendant toute sa vie à ce stress. Certaines pathologies cérébrales ou du système nerveux central sont alors provoquées par les radicaux libres formés lors de ce déséquilibre oxydants/antioxydants. La formation naturelle des oxydants pendant le transport mitochondrial, l'auto-oxydation de neurotransmetteurs (norépinéphrine, dopamine) ou l'initiation d'une cascade d'évènements résultants d'une hypoxie ou d'une ischémie, peuvent contribuer à la formation EOR et à des dommages conséquents sur les tissus. Ainsi, les maladies d'Alzheimer, de Parkinson ou encore les dommages causés par les phénomènes d'ischémie-reperfusion sont le résultat, pour une part, d'un déséquilibre oxydatif [69].

4.2.1.1. La maladie d'Alzheimer

La maladie d'Alzheimer est un désordre neuropsychiatrique progressif dont l'étiologie est à ce jour inconnue. Elle est caractérisée par une dégénérescence neuronale et une détérioration des fonctions cognitives, particulièrement chez les personnes âgées [152]. La dégénérescence neuronale est accompagnée par le dépôt important de protéines β -amyloïdes (β A) formant les **plaques séniles** et la présence d'enchevêtrements neurofibrillaires dus à la présence de protéines *tau* anormalement phosphorylées [153]. (NB : la protéine amyloïde n'est pas cytotoxique avant d'avoir acquis sa conformation β)

β A est un peptide de 40-42 acides aminés dérivant du processus protéolytique d'une protéine précurseur amyloïde (APP, *Amyloid Precursor Protein*) par action de la γ -secrétase [154]. Il a été démontré que β A est directement toxique pour des cultures de neurones [155], supposant ainsi que ces dernières sont impliquées dans la pathologie d'Alzheimer, cependant les mécanismes de sa neurotoxicité restent non éclaircis.

La neurotoxicité de β A a alors été proposée comme étant responsable de la mort cellulaire neuronale par une régulation des inducteurs ou des répresseurs de l'apoptose, par une induction du stress oxydant et en causant la mort par un mécanisme médié par les radicaux libres [156].

De ce fait, et parce que la maladie d'Alzheimer semble être en partie médiée par les stress oxydants, de nombreuses études tentent de le combattre en employant des antioxydants.

Les résultats de l'enquête épidémiologique PAQUID (*Personnes Agées Quid*) montrent que des personnes buvant trois à quatre verres de vin par jour voient décroître de 80% l'incidence de démence ou de maladie d'Alzheimer. Ainsi, les chercheurs se sont intéressés au vin et à ses constituants comme source d'antioxydants [157, 158].

Le stress oxydant n'est cependant pas la seule cible pour la découverte de nouvelles thérapeutiques. En effet, la recherche active d'inhibiteurs de l'acétylcholinestérase (AChE, EC 3.1.1.7) autres que ceux déjà connus (Donepezil, rivastigmine, galantamine [159]), pourrait apporter de nouvelles solutions à cette pathologie.

Une bibliographie non exhaustive est présentée dans le Tableau 4.

Auteurs	Résultats
Savaskan et coll. [160] Etude du rôle protecteur potentiel du resvératrol sur la toxicité des β A peptides.	Les auteurs montrent que le resvératrol (15 μ M) est capable de restaurer le niveau intracellulaire de GSH après un stress provoqué par le β A peptide. En revanche, le resvératrol est incapable de restaurer le niveau de GSH après un stress oxydant médié par H ₂ O ₂ .
Levites et coll. [161] Etude de l'EGCG (23) en tant que neuroprotecteur de la neurotoxicité engendrée par le peptide β A.	Les auteurs montrent que pour de faibles concentrations d'EGCG (23) (1 μ M), les lignées PC12 sont protégées de la toxicité du β A peptide. Ils montrent également que l'EGCG (23) affecte le métabolisme de l'APP en stimulant le relargage de la secretase α .
Choi et coll. [156] Etude de l'effet protecteur de l'EGCG (23) sur la toxicité du peptide β A.	Les auteurs montrent que l'EGCG (23) protège de l'apoptose cellulaire neuronale induite par le peptide β A en chélatant les espèces oxygénées réactives.
Kontush et coll. [162] Etude de l'influence de la supplémentation en vitamines E et C sur la lipoperoxydation de patients atteints d'Alzheimer.	Les auteurs montrent qu'une supplémentation de 400 UI de vitamine E et 1000 UI de vitamine C, augmente la concentration des deux vitamines dans le plasma et dans le fluide cérébro-spinal (CSF), permettant de décroître le taux de lipoprotéine oxydées <i>in vitro</i> . Par contre, une supplémentation de 400 UI de vitamine E seule augmente sa concentration dans le plasma et dans le CSF, mais ne permet pas de diminuer le taux de lipoprotéines oxydées. Il faut donc une combinaison des deux vitamines.
Bastianetto et Quirion [163] Etude de la protection de cellules de l'hippocampe soumises au stress oxydant du peptide β A par un extrait de <i>Ginkgo biloba</i> (EGb 761) et des constituants du vin rouge.	Les auteurs montrent que l'extrait EGb 761 (100 μ g/ml) et les polyphénols de vin rouge (quercétine (15) (10 μ M); (+)-catéchine (17) (10 μ M) et resvératrol (10 μ M)) sont capables de protéger complètement les cellules d'hippocampe E19 soumises au stress oxydant du peptide β A.
Trujillo-Ferrara et coll. [164] Etude de l'inhibition de l'acétylcholinestérase par des dérivés de l'acide malique et succinique.	Les auteurs montrent que pour les deux familles, la partie aromatique joue un rôle crucial dans la reconnaissance du site actif de l'enzyme. Dans le cas d'inhibition réversible, quand une fonction ester remplace une fonction hydroxyle, les auteurs observent une importante augmentation de l'affinité de l'enzyme pour son substrat.

Tableau 4: Polyphénols et neuroprotection

4.2.1.2. *Ischémie-reperfusion*

L'ischémie-reperfusion du cerveau provoque une série complexe de modifications biochimiques et structurales et de changements métaboliques menant à des altérations des tissus cérébraux. Un de ces événements est l'accumulation d'acide arachidonique, qui est oxydé durant la reperfusion (réoxygénation) par la COX et la LOX, menant à la synthèse de LT, PG, TX et radicaux oxygène. Les eicosanoïdes et les lipoperoxydes ont alors été impliqués dans les dommages causés après une ischémie-reperfusion du cerveau par leur capacité à altérer la perméabilité membranaire, à induire des oedèmes et provoquer la mort cellulaire neuronale [165].

Dans de telles conditions de stress oxydant, la mitochondrie devient à la fois une source, mais également une cible pour les EOR, induisant l'ouverture du MPTP provoquant ainsi la mort cellulaire par nécrose/apoptose [166]. Les EOR générés par le transport mitochondrial échappent ainsi aux défenses antioxydantes et peuvent alors provoquer l'activité des radicaux libres hydroxyles causant des dommages important sur le cerveau [167].

De nombreuses études tentent de prévenir les dommages causés par les radicaux libres dans les tissus soumis à une anoxie-réoxygénation, par utilisation de molécules antioxydantes.

Ainsi, le resvératrol est capable de chélater l'anion superoxyde généré par les mitochondries neuronales et de décroître l'activité du complexe III par compétition avec le coenzyme Q (propriété intéressante car ce complexe est celui qui est générateur de radicaux libres) [168].

Des études portant sur les polyphénols du thé ont également montré que les EGCG (23) (25 à 50 mg/kg) sont capables de protéger les cellules neuronales des dommages causés par une ischémie-reperfusion chez la gerbille [94].

CONCLUSION

La connaissance actuelle de la composition des vins de Champagne est encore très « limitée », comparée à celle des vins rouges et ceci se conçoit parfaitement du fait des faibles concentrations des molécules qui le compose. La complexité de ce mélange moléculaire que représente le vin ne facilite pas les choses, et les techniques de séparation et d'analyse employées aujourd'hui ne suffisent pas à en étudier tout le contenu.

Les études menées pour tenter d'expliquer l'étiologie et la progression de certaines pathologies attribuent aujourd'hui la prévalence de celles-ci à la présence d'espèces oxygénées ou carbonylées réactives.

L'étude des propriétés physico-chimiques des substances polyphénoliques, constituants essentiels des plantes, a permis de considérer certaines d'entre elles comme des molécules pouvant posséder des activités biologiques intéressantes. Les études menées *in vitro* démontrent les potentialités de telles molécules dans la protection contre les maladies cardiovasculaires, le cancer ou la maladie d'Alzheimer.

Pour qu'une substance soit active, elle nécessite d'être avant tout bio-disponible pour l'organisme, et les expérimentations réalisées *in vivo* ne permettent pas toujours de corrélérer les observations *in vitro*.

De plus, la majorité des recherches menées ne prennent en compte que la potentialité des polyphénols à chélater les radicaux libres. Quasiment aucune d'entre elle ne s'intéresse à l'étude de ces substances en tant que probables « inhibiteurs » de la formation des produits d'Amadori, et donc des AGEs.

Nous avons montré au cours de cette étude bibliographique que nous ne pouvions plus considérer les progressions des pathologies que par le simple fait des espèces oxygénées réactives mais qu'il fallait également prendre en compte la production des espèces carbonylées réactives elles mêmes productrices de radicaux libres.

Nous savons que les polyphénols sont capables de se lier aux protéines mais qu'en est-il de leur liaison avec les récepteurs membranaires, au RAGE, ... ? Peut on considérer ces substances comme de potentielles « Amadoriase » et ainsi envisager de pouvoir réverser la production des AGEs dans les pathologies comme le diabète ?

DEUXIÈME PARTIE

TRAVAUX PERSONNELS

Chapitre I : Isolement des molécules actives des vins de Champagne

Chapitre II : Propriétés biologiques des extraits de vin de Champagne

Chapitre III : Analyse des mécanismes d'action biologique

INTRODUCTION

Le thème qui nous a été confié «Étude des propriétés biologiques des constituants des vins de Champagne» fait suite à des travaux réalisés au laboratoire de recherche Moët et Chandon [169].

Notre objectif est de caractériser les substances naturelles présentes dans les vins de Champagne et d'en étudier les propriétés biologiques.

Les propriétés biologiques des vins de Champagne n'ont été que très peu étudiées, et jusqu'à aujourd'hui seules trois études ont pu être recensées [10, 170, 171].

Compte tenu de la « nouveauté » du sujet, un long et fastidieux travail a été nécessaire pour surmonter les problèmes de séparation et de purification que nous avons rencontrés.

Les propriétés physico-chimiques particulières de ces composés permettent de comprendre leur présence insoupçonnée dans certaines phases aqueuses.

Dans un *premier chapitre* seront présentés les travaux mis en œuvre pour la préparation d'Extraits de Vin de Champagne issus de vins Blancs de Blancs et de vins Blancs de Noirs, la séparation de ces derniers bioguidée sur la base de tests biologiques pertinents et l'analyse structurale des composés présents et potentiellement impliqués dans ces propriétés biologiques.

Les propriétés biologiques font l'objet de travaux effectués sur divers modèles expérimentaux, principalement concernant la neuroprotection et le cancer, et qui constitueront l'objet du *deuxième chapitre* de cette partie. Parmi les fractions isolées, certaines possèdent en effet des activités surprenantes.

Dans le *troisième chapitre*, une étude des mécanismes d'action biologique impliqués dans les propriétés mises en évidence permettra de mieux comprendre comment les substances naturelles contenues dans les vins de Champagne peuvent agir sur ces pathologies d'actualité. Pour ce faire des méthodes d'investigation par les « puces à ADN » nous permettront d'envisager des voies métaboliques de transductions potentielles.

1. Isolement des molécules actives des vins de Champagne

1.1. Introduction

Les vins de Champagne, au même titre que les vins blancs, renferment de manière constante quelques polyalcools tel que le glycérol (propan-1,2,3-triol), dont la teneur varie dans les vins blancs de 5 à 15 g/L [172]. Le glycérol est totalement miscible à l'eau, à l'alcool et partiellement soluble dans l'acétate d'éthyle et dans l'éther diéthylique. Sa viscosité (19,9 cP à 25°C) et son point d'ébullition (bp = 290°) sont tels qu'il est difficile d'évaporer à sec ou de lyophiliser des fractions contenant ce polyalcool.

Quelques millilitres de vin de Champagne obtenus après dégazage sous agitation magnétique et réduction par évaporation sous pression réduite ($T < 40^{\circ}\text{C}$), sont repris dans D_2O et sont étudiés par RMN (spectre proton Watergate à 303 °K). Par cette méthode d'acquisition, le signal très intense observé généralement à 4,8 ppm et correspondant au pic de l'eau, disparaît du spectre protonique.

Le spectre proton (Figure 15) met en évidence :

- des signaux très intenses entre 3,5 et 4 ppm dus en majeure partie au glycérol (flèche rouge)
- des signaux entre 1 et 3 ppm caractéristiques de la présence de chaînes alkyles, de l'acide succinique (Figure 14, $\delta = 2,6$ ppm) et de proton H4 de dérivés de type épicatechine (2,8 à 3 ppm).

Au delà de 5 ppm, le spectre ne comporte aucun signal, ceci laissant à penser que les composés aromatiques des vins de Champagne sont des produits minoritaires, ayant des signaux en dessous de la limite du seuil de détection.

Ces analyses préliminaires mettent alors en évidence la nécessité de définir un mode particulier d'extraction des composés des vins de Champagne, sachant qu'il est indispensable :

- d'**éliminer le glycérol** des vins ou de l'**isoler** dans une phase
- d'extraire la **quantité maximale** de composés = **EVC** (Extrait de Vin de Champagne)

Le mode d'extraction étant établi, nous pourrons alors préparer ces composés pour leurs études biologiques.

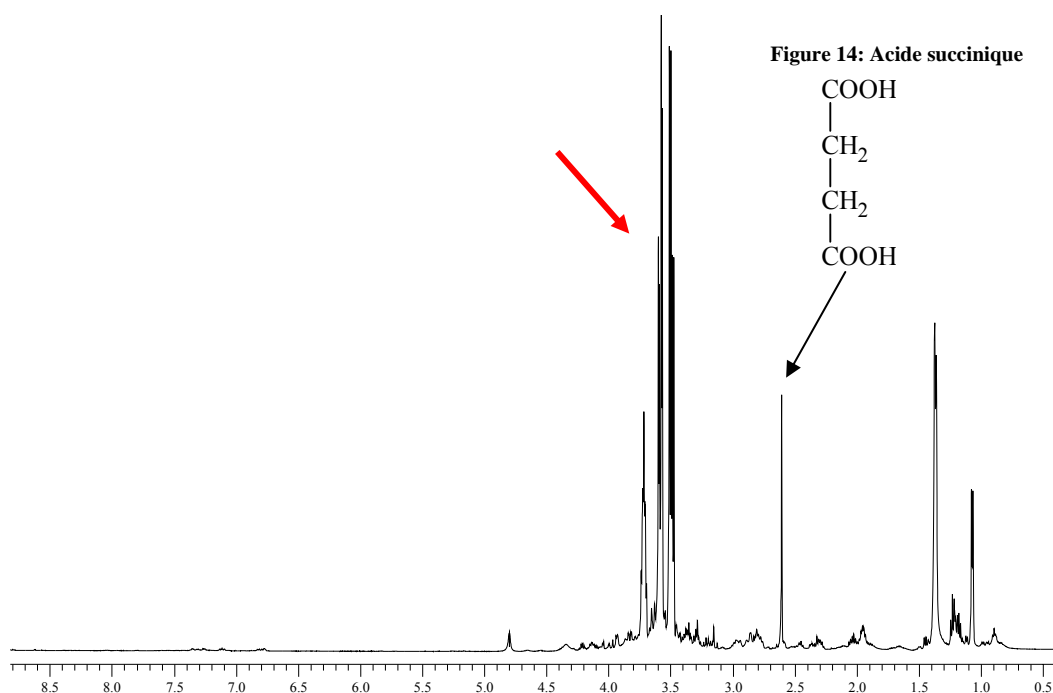


Figure 15: Spectre proton Watergate sur le « Totum » de Champagne dans D2O à 303 K

1.2. Détermination de la méthode d'accès aux EVC

Dans le but d'étudier la **totalité du contenu des molécules actives des vins de Champagne** une méthode d'extraction permettant d'éliminer ou d'isoler le glycérol est recherchée.

Deux types de vins de Champagne sont étudiés :

- les vins de Champagne Blancs de Blancs (BB)
- les vins de Champagne Blancs de Noirs (BN)

1.2.1 Extraction par démixtion eau/alcool

Cette méthode consiste à saturer l'eau en sel de sulfate d'ammonium $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ afin de relarguer la partie alcoolique de la phase aqueuse. Cette méthode employée initialement par D. CHAUDRUC [169] sur des vins de Champagne, nous conduit à différentes fractions saturées en sels et dont les rendements d'extraction sont relativement faibles

1.2.2 Extraction après lyophilisation

Etant donné les propriétés physiques du glycérol contenu en grande quantité dans les vins, il nous est impossible de lyophiliser les vins de Champagne. Cependant, l'ajout de maltodextrines (environ 70% p/p) permet tout de même une lyophilisation efficace. Ainsi, nous avons pu obtenir des lyophilisats de Champagne issus des deux types de vins : BB et BN.

La dissolution du lyophilisat dans de l'eau distillée, suivie d'une extraction par l'acétate d'éthyle, nous a conduit à une fraction contenant des composés aromatiques (observés par RMN du proton). Néanmoins, l'ajout de maltodextrines apporte des contaminants externes dont nous ne pouvons nous débarrasser.

1.2.3 Extraction par des solvants à polarité croissante

Afin de rechercher le solvant adéquat pour nos futures extractions, des expériences par épuisement successif de la phase aqueuse ont été réalisées en présence de solvants à polarité croissante. Le mode opératoire précis est décrit dans la partie expérimentale au paragraphe 2.1 p 151

Ainsi, cinq solvants ont été retenus et testés pour leur capacité à extraire les substances naturelles : hexane, chloroforme, chlorure de méthylène, acétate d'éthyle et butanol (cf. schéma d'extraction Figure 16).

Les résultats des extractions sont analysés grâce à des mesures de RMN Haute résolution du proton dans le solvant deutérié le plus adapté à l'acquisition.

1.2.3.1 Extraction par l'hexane (EVC-SPC-h) :

L'extraction à l'hexane conduit à un résidu d'aspect gras, transparent et odorant, représentant un rendement d'extraction de **140 mg/L** du champagne initial

1.2.3.2 Extraction par le chloroforme (EVC-SPC-chloro):

La phase aqueuse résiduelle est extraite à son tour par du chloroforme. Le résidu obtenu est jaune, huileux et odorant. Le rendement d'extraction représente **580 mg/L** du champagne initial.

1.2.3.3 Extraction par le dichlorométhane (EVC-SPC-dichlo) :

Le résidu obtenu après extraction est transparent, gras et odorant. Son rendement d'extraction est de **80 mg/L** du champagne initial.

1.2.3.4 Extraction par l'acétate d'éthyle (EVC-SPC-ae) :

Le résidu d'extraction obtenu est orange clair, huileux et odorant. Son rendement d'extraction est de **1,58 g/L** du champagne initial

1.2.3.5 Extraction par le butanol-1 (EVC-SPC-but) :

Le résidu obtenu est brun et odorant. Son rendement d'extraction est de **3,88 g/L**. Cependant, les spectres proton de ce derniers révèlent la présence de glycérol dans cet extrait (Figure 17, flèche rouge), ceci étant du à la capacité du butanol de s'hydrater, entraînant avec lui le glycérol plus soluble dans les phases aqueuses que dans les phases organiques.

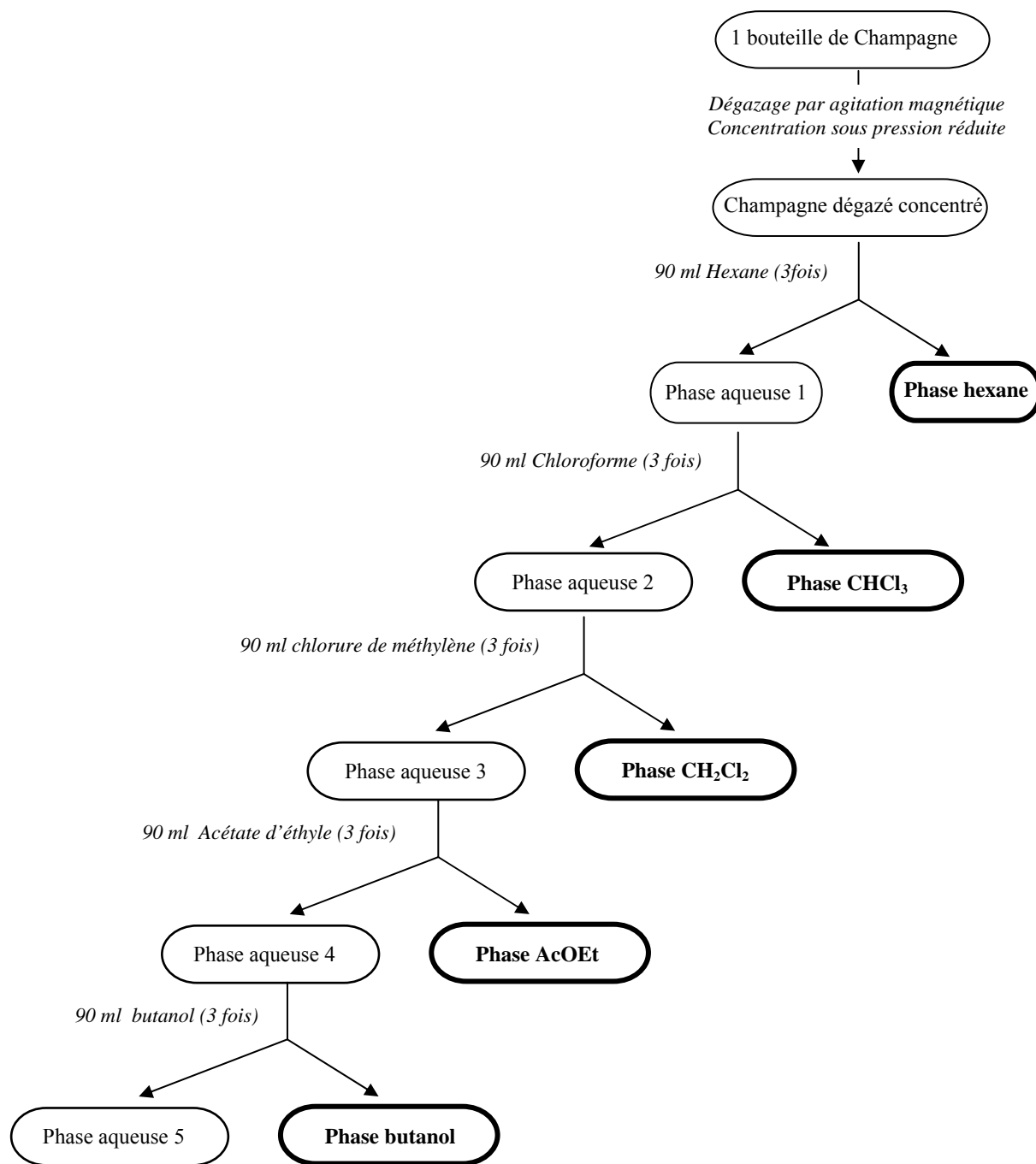


Figure 16: Protocole d'extraction des vins de Champagne par épuisement successif de la phase aqueuse

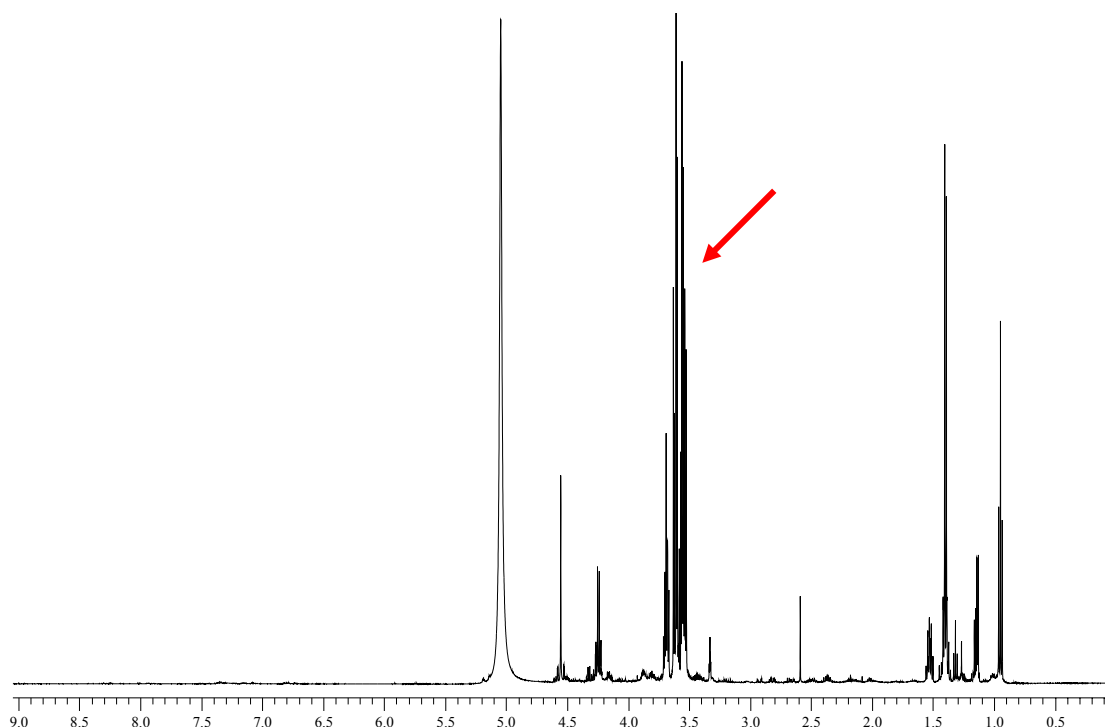


Figure 17: Spectre RMN ^1H de l'extrait par le butanol-1 dans $\text{CD}_3\text{OD}/303\text{K}$

1.3. Choix de la méthode de préparation des EVC

Au vu des différentes méthodes employées et décrites précédemment, et dans le but d'accéder aux EVC, il apparaît que la concentration préliminaire des vins de Champagnes respectant au maximum l'intégrité des molécules présentes est la meilleure alternative. Le concentré de Champagne ainsi obtenu pourra ensuite être partitionné par l'acétate d'éthyle, solvant le mieux adapté à l'extraction des composés aromatiques pour sa sélectivité vis-à-vis du glycérol, son bon rendement d'extraction, sa polarité intermédiaire (0,58) et son point d'ébullition peu élevé (77°C). De plus, l'analyse RMN ^1H Haute Résolution de cet extrait (cf. Figure 18), révélant la présence de signaux dans la zone de déplacement chimiques comprise entre 5,5 et 8 ppm, confirme la présence de composés aromatiques. Un agrandissement et une expansion de cette zone permettent de reconnaître des **systèmes de spins attribuables à des polyphénols**.

Une telle méthode assure la possibilité d'étudier, du point de vue de leur activité biologique, **la totalité du contenu des composés du Champagne** (ce qui était recherché par le procédé de démixtion). En outre, elle offre l'avantage de ne pas apporter de pollution externe qui pourrait remettre en cause les résultats obtenus ultérieurement à partir de molécules présentes en faible quantité.

Grâce à cette méthode nous pouvons accéder d'ores et déjà à quatre fractions polyphénoliques de Champagne :

- la phase organique acétate d'éthyle des Champagnes blancs de blancs : **EVC-BB-AcOEt**
- la phase organique acétate d'éthyle des Champagnes blancs de noirs : **EVC-BN-AcOEt**
- la phase aqueuse des Champagnes blancs de blancs : **EVC-BB-H₂O** notée **DA_{BB}**
- la phase aqueuse des Champagnes blancs de noirs : **EVC-BN-H₂O** notée **DA_{BN}**

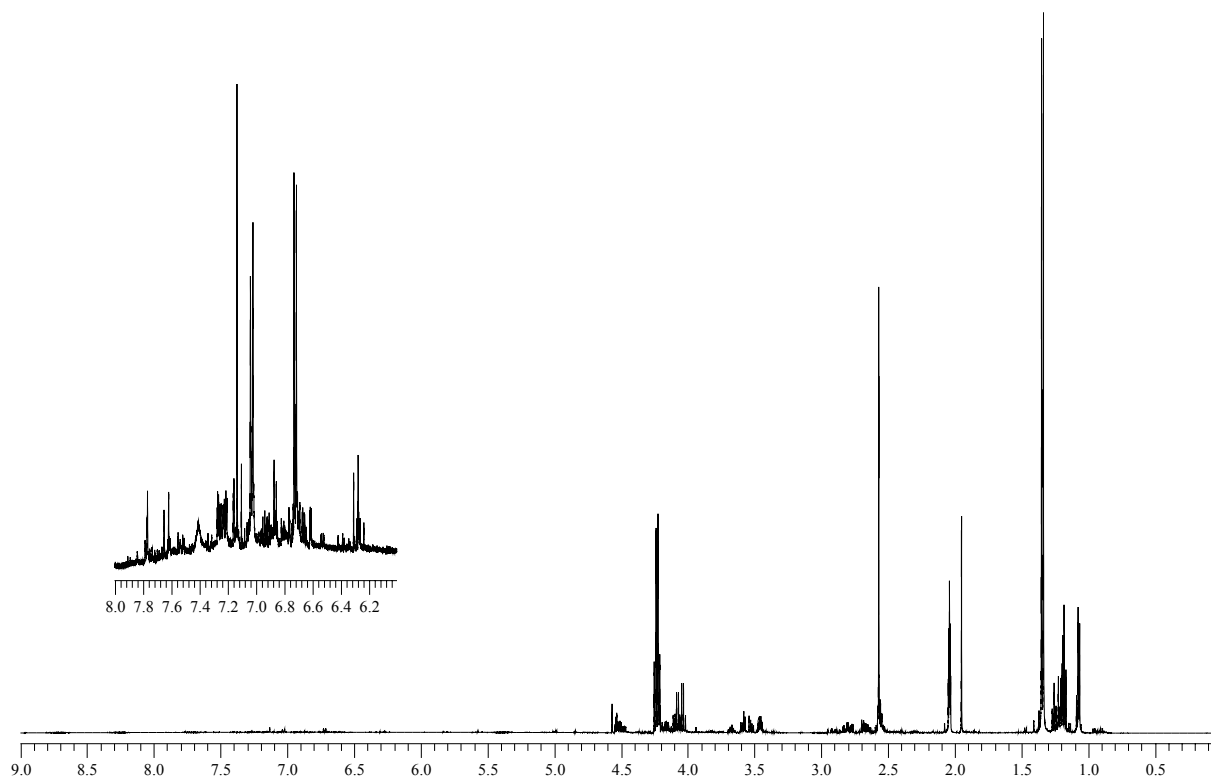


Figure 18: Spectre RMN ¹H de la phase acétate d'éthyle EVC-xx-AcOEt dans CD₃OD/303K

1.4. Préparation des EVC aux tests de bioguidage

La préparation d'un extrait « total » de vin de Champagne imposait tout d'abord de mettre au point une technique extractive idéale qui serait appliquée ensuite à un « grand » volume de champagne.

Après les essais d'utilisation de solvants de polarité croissante (SPC), relatés au point 1.2.3, ce paragraphe fait état d'une technique de séparation employant de l'eau MilliQ que nous avons spécialement mise au point pour respecter les exigences particulières requises lors de certains tests biologiques (absence d'ions sodium).

L'absence complète d'ions sodium n'est pas aussi évidente à obtenir qu'il n'y paraisse puisque le champagne lui-même en contient déjà des centaines de fois trop, que l'eau permutée en est riche et que par ailleurs le verre ordinaire des récipients qui servent aux extractions peut en relarguer. Nous avons donc profité de l'existence des extraits **EVC-BB-AcOEt** et **EVC-BN-AcOEt** préparés à partir des deux champagnes BB et BN pour mettre au point la préparation d'extraits privés de tous leurs ions minéraux. Pour ce faire, les phases organiques sont lavées par de l'eau désionisée obtenue par osmose inverse et de très haute résistivité (18.2 MΩ.cm), appelée encore « MilliQ ». De plus, toutes ces expériences sont réalisées dans une verrerie borosilicatée pour éviter au maximum le relargage d'ions indésirables.

Au cours de cette étape de lavage, nous avons remarqué qu'une partie importante de la couleur passait de la phase organique à la phase aqueuse MilliQ. Cette observation peut être expliquée par la différence de tensioactivité entre l'eau MilliQ et l'eau distillée, employée lors de la préparation de ces mêmes phases organiques.

En effet, l'eau MilliQ est dépourvue d'ions minéraux à la différence de l'eau distillée, ce qui lui permet de dissoudre beaucoup plus d'éléments organiques que l'eau distillée. Cette différence est renforcée par l'absence dans la phase organique des acides organiques polaires restés dans la phase aqueuse initiale. Ce phénomène a pu être observé pour nos molécules, ce qui fait de l'eau MilliQ un « solvant » intéressant pour la suite de notre travail : elle nous permet de préparer des fractions particulièrement polaires à partir des extraits totaux organiques de champagne.

Afin de réaliser l'ensemble des tests biologiques ultérieurs, nous avons donc considéré les deux types de Champagnes BB et BN individuellement et produit leurs EVC en quantité suffisante.

Dans un souci de proximité avec la réalité, nous nous sommes adressés à des Champagnes « finis », tels que ceux qui sont présentés aux consommateurs, c'est-à-dire ayant subi la mise en bouteilles et la deuxième fermentation (donc renfermant du CO₂).

Ainsi, 150 bouteilles de chacun des deux vins de Champagne ont été employés afin d'obtenir les EPC.

1.4.1 Obtention des EVC de Blancs de Blancs

Pour obtenir la meilleure qualité possible des extraits, pour des raisons pratiques de taille d'échantillon à traiter et pour être capable de vérifier la répétabilité de la méthode, nous avons décidé d'opérer par lots de 10 bouteilles.

Le protocole employé pour cette séparation est décrit dans la partie expérimentale au paragraphe 2.2 p 152, et est schématisé Figure 19.

A ce stade, terme de la première étape, nous obtenons donc les 3 blocs d'EVC-BB qui pourront être étudiés séparément :

	EVC-BB-H₂O = DA_{BB}	EVC-BB-AcOEt_{amQ} = DC_{BB}	EVC-BB-mQ = DB_{BB}
Masse totale	1612,9 g	7,32 g	223,3 g
Rendements	14,81 g/L	70 mg/L	2,04 g/L

1.4.2 Obtention des EVC de Blancs de Noirs

Les Champagnes Blancs de Noirs ont fait l'objet d'un protocole spécifique de concentration. En effet, ces derniers ont été traités par une société de Champagne-Ardenne selon un cahier des charges établi lors d'expérimentations préalables.

Ainsi, nous avons récupéré 2508,4 grammes de concentrât de Champagne BN réparti en 16 pots de 150 g et 1 pot de 108,4 g. Le rendement de concentration obtenu de **22,96 g/L** est quasiment identique à celui obtenu pour les Champagnes BB (**21,10 g/L**).

Le protocole employé pour la séparation des BN, décrit au paragraphe 2.3 est identique à celui employé pour les BB et est schématisé Figure 20.

	EVC-BN-H₂O = DA_{BN}	EVC-BN-AcOEt = DC_{BN}	EVC-BN-mQ = DB_{BN}
Masse totale	1950,7 g	10,5 g	260,7 g
Rendements	16,54 g/L	90 mg/L	1,84 g/L

Deuxième Partie – Travaux Personnels

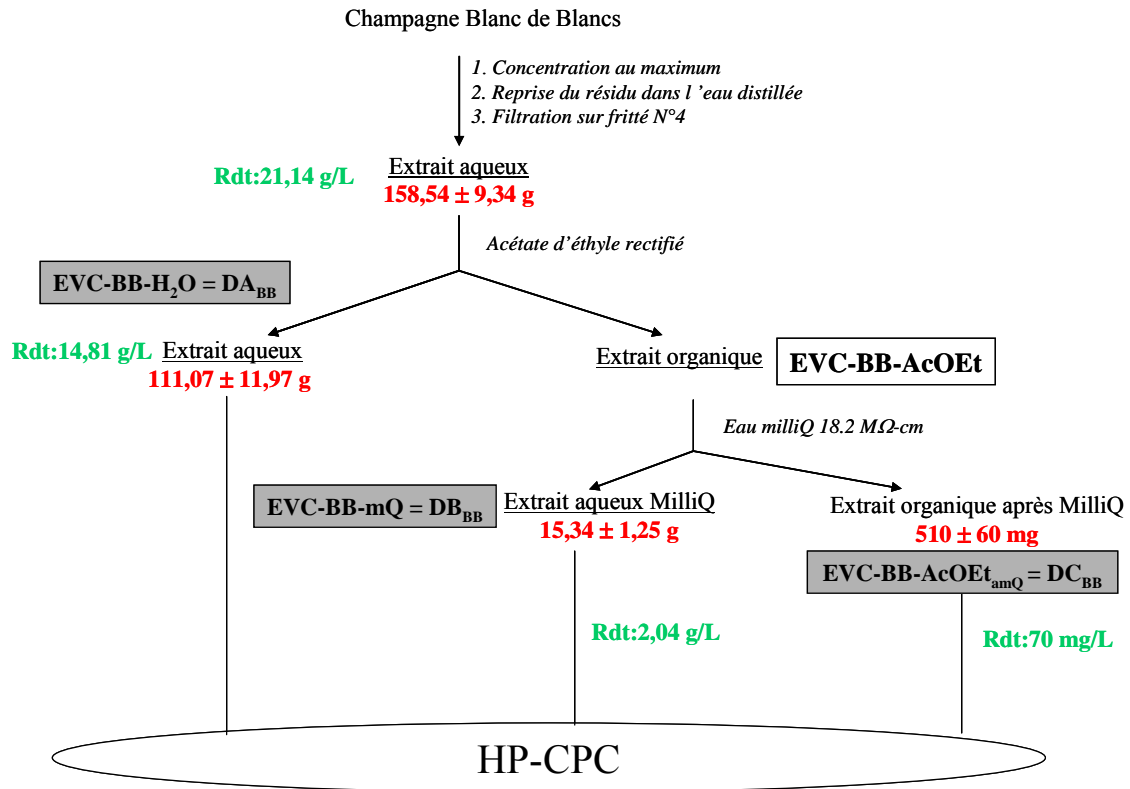


Figure 19: Schéma d'extraction des Champagnes Blancs de Blancs

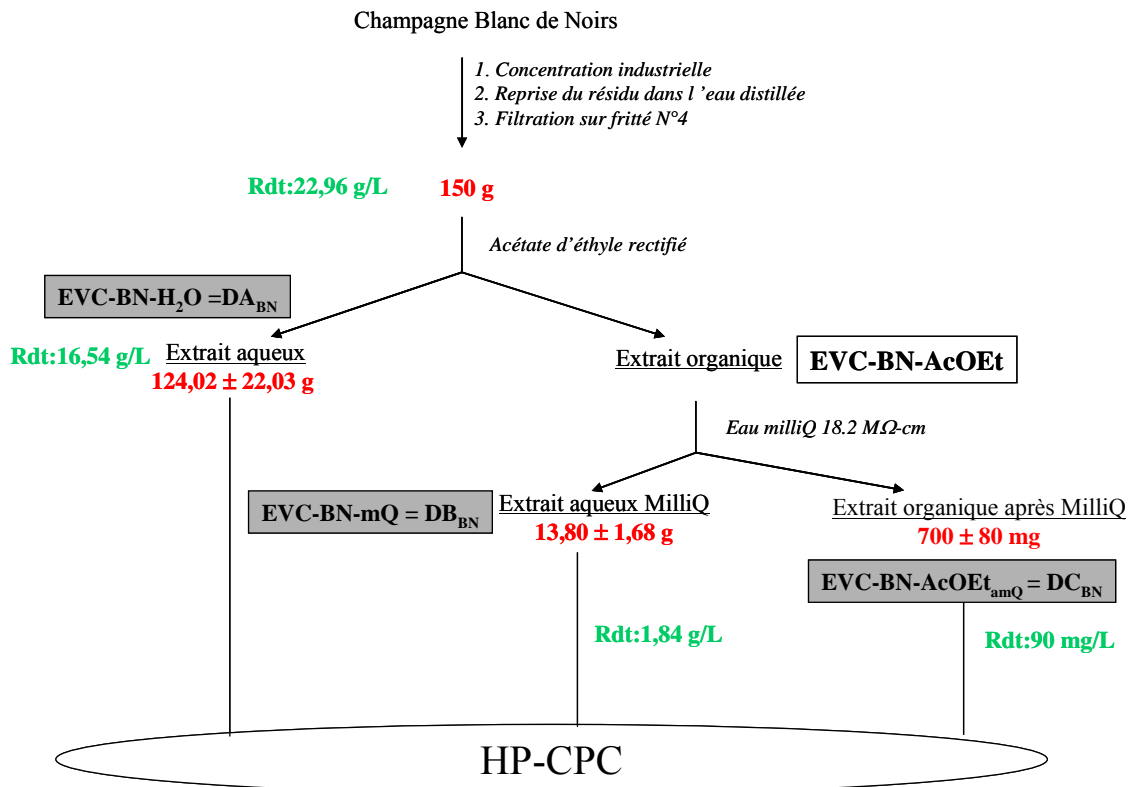


Figure 20: Schéma d'extraction des Champagnes Blancs de Noirs

1.4.3 Analyse des blocs obtenus après extraction des EVC

L'analyse par RMN du proton de chacune des phases obtenues, nous permet d'observer un enrichissement des composés aromatiques dans la phase organique issue de l'extraction à l'eau MilliQ (visible entre 6 et 8 ppm). En effet, le lavage à l'eau désionisée permet d'extraire les molécules polaires insolubles dans la phase aqueuse du fait de la barrière de tensioactivité (cette hypothèse n'est retenue qu'après vérification du fait que le pH des phases aqueuses extraites n'était que très peu modifié).

Ainsi, les phases aqueuses DA_{BB} et DA_{BN} renferment la quasi-totalité du glycérol. Les composés phénoliques, s'ils s'ont présents, ne sont pratiquement pas visibles du fait des intensités relatives des pics du glycérol. Ceci laisse à penser que la quantité de polyphénols contenus dans cette fraction est très minoritaire en comparaison aux polyalcools.

La phase organique intermédiaire EVC-xx-AcOEt laisse apparaître des signaux dans la partie des déplacements chimiques compris entre 6 et 8 ppm. Un zoom de cette zone, montre la présence de signaux dont les spins sont attribuables à des composés phénoliques (cf. Figure 18).

Les phases organiques résiduelles après extraction à l'eau MilliQ (DC_{BB} et DC_{BN}) laissent apparaître des signaux de composés phénoliques sans nécessité de zoom. Ceci démontre que le lavage avec l'eau MilliQ a permis un enrichissement en polyphénols de cette fraction. (Cf. Figure 46 p 187).

Enfin, les fractions DB_{BB} et DB_{BN} ne présentent quasiment aucun signal dans les zones de déplacement chimique des composés aromatiques, et semblent essentiellement constituées d'acides organiques tel que l'acide succinique (singulet à 2,5 ppm, Cf.

Figure 47). Cependant la présence de signaux dans la zone des déplacements chimiques comprise entre 2,5 et 3 ppm rappelle la présence de protons H4 de l'épicatéchine.

1.4.4 Dosage des polyphénols totaux par la méthode de Folin-Ciocalteu

Cette méthode, initialement décrite en 1965 par Singleton [31] puis modifiée en 2004 par Skerget et collaborateurs [173], permet d'apprécier le contenu polyphénolique total d'un échantillon donné.

Ce dosage permet ainsi d'estimer la quantité de substances ayant un pouvoir réducteur vis à vis des sels de tungstène et de molybdène. Le détail du protocole employé est décrit au paragraphe 2.4 de la partie expérimentale.

Les résultats des dosages des polyphénols totaux vont dans le même sens que ceux observés par RMN. En effet, les phases organiques acétate d'éthyle semblent renfermer une quantité

non négligeable de composés phénoliques. Cependant, la quantité de polyphénols contenus dans les vins Blancs de Blancs reste tout de même inférieure à celle présente dans les vins de Champagne Blancs de Noirs. Les phases aqueuses, quant à elles, contiennent peu de composés phénoliques.

Phases	Absorbance	Concentrations (mg/ml) en GAE
DC _{BB}	0,271 ± 0,006	2.5
DC _{BN}	0,330 ± 0,004	3.35
DB _{BB}	0,225 ± 0,004	0.184
DB _{BN}	0,214 ± 0,002	0.172
DA _{BB}	0,184 ± 0,011	0.125
DA _{BN}	0,176 ± 0,008	0.113

1.5. Séparation des EVC par Chromatographie de Partage Centrifuge

Après l'obtention des extraits EVC, l'étape suivante consiste à fractionner, isoler, purifier et caractériser les molécules les plus représentées ou les plus typiques et les plus actives du Champagne. La **sélection** des molécules d'intérêt sera « **bioguidée** », c'est à dire que lors de la purification, des tests d'activité biologique pertinents permettront de repérer les molécules d'intérêt parmi toutes celles présentes dans les EVC ou les blocs qui en seront issus.

C'est pourquoi, nous nous sommes attachés à la mise en place d'un protocole de séparation par Chromatographie de Partage Centrifuge (CPC) de ces différentes fractions, et à étudier leur comportement vis-à-vis de tests biologiques.

1.5.1 Généralités : la Chromatographie de Partage Centrifuge

La Chromatographie de Partage Centrifuge ou **CPC** [174-176] est définie comme une technique chromatographique originale basée sur le partage de solutés **entre deux phases liquides non miscibles** préparées par mélange de deux ou plusieurs solvants ou solutions. Une phase est maintenue stationnaire par une force centrifuge, et la deuxième, étant pompée au travers, joue le rôle de phase mobile. Des échanges (transferts de masse) sont ainsi possibles entre les deux phases et le soluté n'est à aucun moment en contact avec un support solide.

Les phénomènes d'adsorption irréversibles et/ou de dégradation des solutés par interactions moléculaires avec un support solide sont ainsi évités.

En CPC, le choix du système biphasique de solvants est équivalent à la fois au choix du type de colonne et à celui de l'éluant en CLHP. C'est donc le système biphasique qui conditionne la qualité de la séparation. Il faudra choisir un système biphasique de solvants ayant la bonne polarité pour chacune des deux phases et solubilisant bien l'échantillon. Tout en étant différents, **les coefficients de partage** des solutés à séparer doivent **entourer la valeur 1**.

Face à la multitude des systèmes biphasiques de solvants utilisables en CPC, il est nécessaire d'adopter une approche logique et rigoureuse. De nombreux systèmes biphasiques sont décrits dans la littérature. Ils peuvent être constitués de deux, trois, quatre solvants ou plus, les **systèmes ternaires** étant les plus fréquemment utilisés. Pour ces derniers il faut se reporter au diagramme de phases pour pouvoir ajuster la composition et donc la polarité des deux phases.

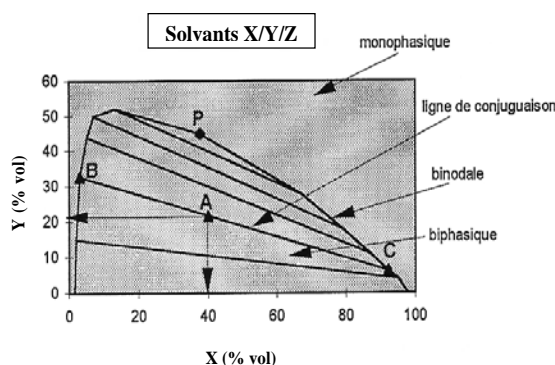


Figure 21: Diagramme de phase ternaire issu de [175]

Cette représentation, illustrée en Figure 21, permet de visualiser aisément :

- La **binodale** qui est la frontière entre les domaines mono- et biphasique
- Les **lignes de conjugaison** qui permettent de connaître les compositions respectives des deux phases. Ainsi, un système A (cf. Figure 21), correspondant à un mélange biphasique donné des trois solvants, fournira une phase supérieure de composition B et une phase inférieure de composition C. Tous les mélanges à la ligne de conjugaison BC donneront les mêmes compositions B et C des deux phases mais dans des rapports de volumes différents.
- Le **point P** (qui n'existe pas toujours suivant les systèmes biphasiques) est l'endroit du diagramme de phases où la composition des phases inférieure et supérieure est identique, tous les coefficients de partage des solutés devenant égaux à 1.

Il est recommandé d'éviter les compositions de solvant trop proches du point P qui risquent de devenir monophasiques à l'intérieur de la colonne CPC.

La CPC nous permet également de travailler selon deux modes d'élution :

- **ascendant** : quant la phase supérieure est choisie comme phase mobile
- **descendant** : quant la phase inférieure est choisie comme phase mobile

1.5.2 Détermination des coefficients de partage par spectrophotométrie UV/Vis.

La méthode pour mesurer les coefficients de partage par spectrophotométrie UV/Vis a été décrite par Renault [175]. Elle ne s'applique, bien évidemment, qu'à des substances absorbant en UV/Vis.

Un millilitre de chacune des phases pré-équilibrées est nécessaire. Après y avoir dissous une quantité connue de l'échantillon, les phases sont agitées puis séparées après décantation. Une dilution est ensuite réalisée pour demeurer dans le domaine de réponse linéaire du spectrophotomètre. Afin de compenser la différence de composition des deux tubes dilués, un millilitre de la phase conjuguée est ajouté. Les solutions pour réaliser les blancs sont obtenues de la même façon que précédemment mais sans ajouter d'échantillon.

Le coefficient de partage est alors calculé par :

$$Kp = \frac{Abs_{éch}^{Org} - Abs_{Réf}}{Abs_{éch}^{Aq} - Abs_{Réf}}$$

Avec $Abs_{éch}^{Org}$ et $Abs_{éch}^{Aq}$ = absorbance des solutions correspondant respectivement à la phase organique et à la phase stationnaire.

Les coefficients de partage ont été déterminés pour chacune des trois phases et pour une longueur d'onde d'absorption de 280 nm.

Les résultats ci-dessous ne sont donc valables que pour les composés dont la longueur d'onde maximale d'absorption est de 280 nm, et ne rendent pas compte de la totalité des composés du vin de Champagne

Phase	Absorbance	Kp
Stationnaire phase DA _{BB}	0.309	0.374
Mobile phase DA _{BB}	0.455	
Stationnaire phase DC _{BB}	0.259	0.115
Mobile phase DC _{BB}	0.604	
Stationnaire phase DB _{BB}	0.217	0.064
Mobile phase DB _{BB}	0.273	
Stationnaire référence	0.212	
Mobile référence	0.196	

1.5.3 Choix des solvants

Différents systèmes de solvants biphasiques utilisables en CPC sont décrits dans la littérature concernant l'extraction de substances naturelles : flavonoïdes, saponines, acides phénols...[177-180], y compris des systèmes concernant l'extraction des anthocyanes des cépages des vins de Champagne [181].

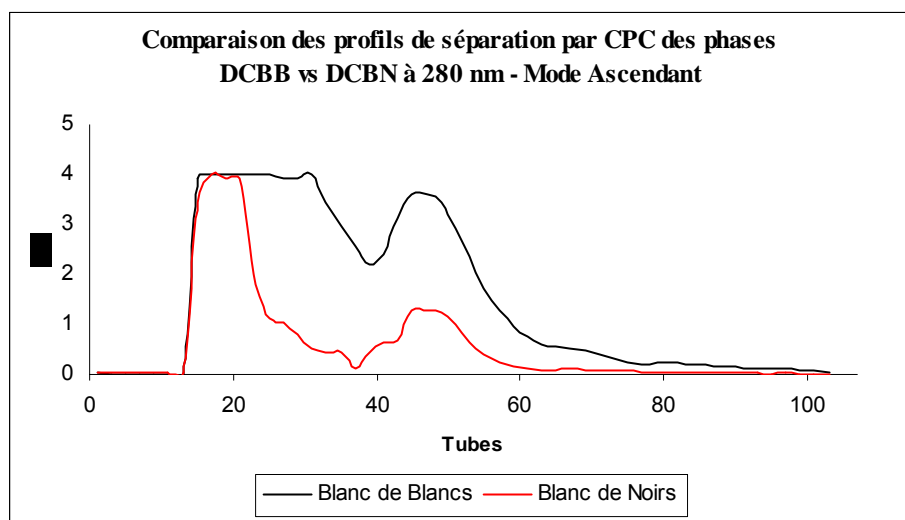
Le système de solvant que nous allons employer consiste en un mélange de quatre solvants encore appelé mélange quaternaire : **hexane/ acétate d'éthyle/ éthanol/ eau (1 :8 :2 :7 ; v/v)** [182] **noté Q1**.

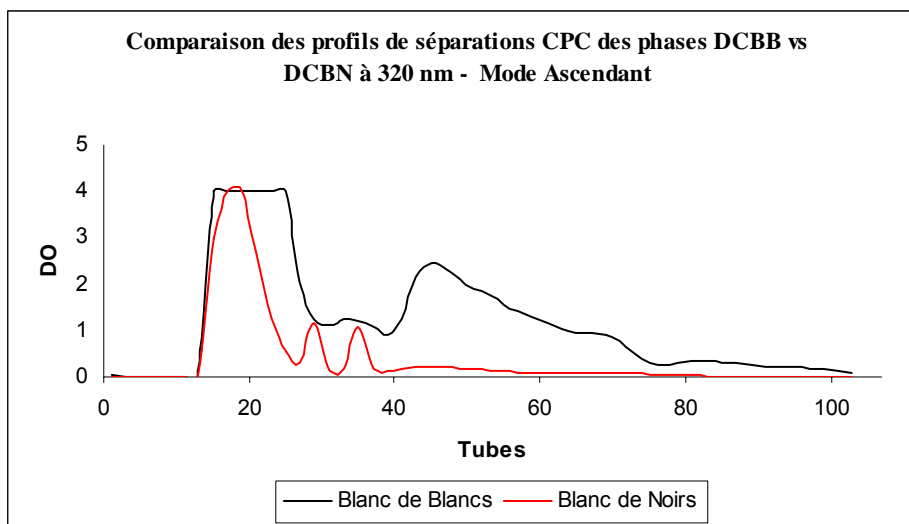
1.5.4 Séparations des phases DC_{BB} et DC_{BN}

Il s'agit ici de la séparation des phases organiques issues de l'extraction à l'eau MilliQ des vins de Champagne Blancs de Blancs et Blancs de Noirs par Chromatographie de Partage Centrifuge en utilisant le système de solvant Q1.

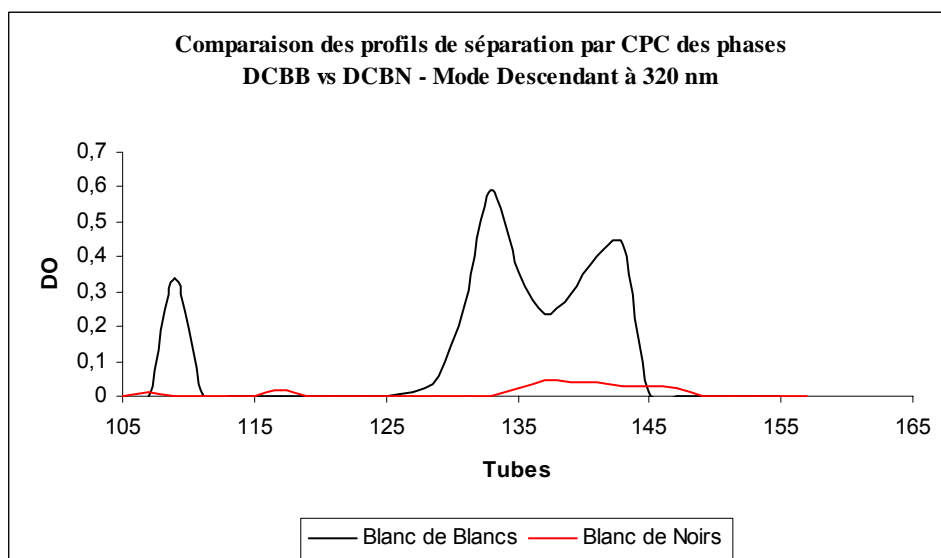
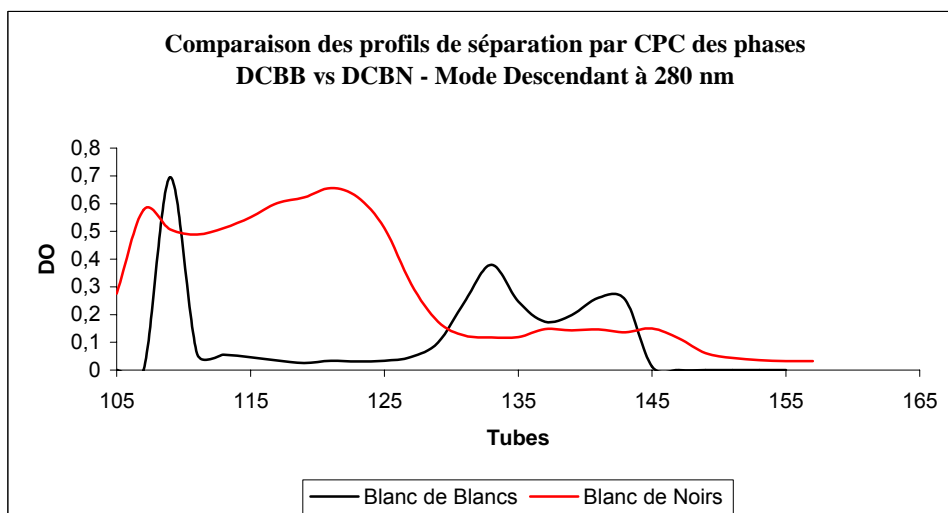
Le protocole employé pour la séparation est décrit au paragraphe 1.2.3 partie expérimentale.

1.5.4.1 Profil UV en mode Ascendant de la séparation CPC





1.5.4.2 Profil UV en mode Descendant de la séparation CPC

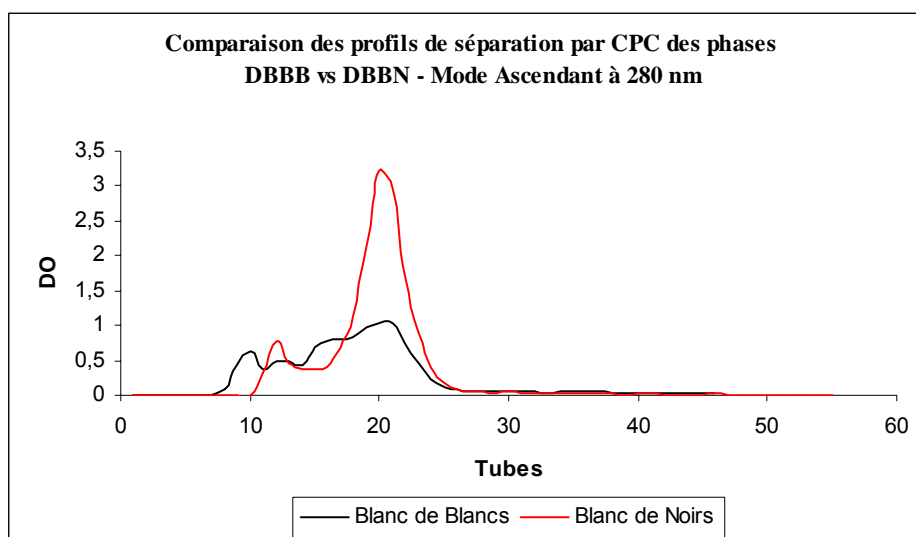


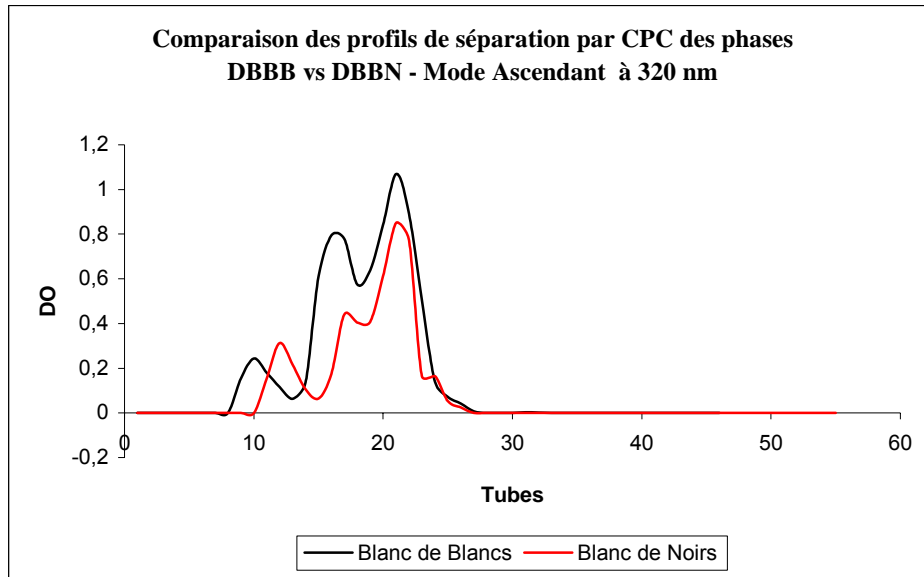
1.5.4.3 Création des blocs CPC et rendements d'extraction

MODE ASCENDANT					
<i>Vins Blancs de Blancs</i>			<i>Vins Blancs de Noirs</i>		
<i>Blocs</i>	<i>Tubes</i>	<i>Rendement</i>	<i>Blocs</i>	<i>Tubes</i>	<i>Rendement</i>
DC _{BB} -Bloc I	1 et 8	21,6 %	DC _{BN} -Bloc I	1 à 7	3 %
DC _{BB} -Bloc II	9	8,7 %	DC _{BN} -Bloc II	8	10,5 %
DC _{BB} -Bloc III	10	17,5 %	DC _{BN} -Bloc III	9	9,8 %
DC _{BB} -Bloc IV	11 à 15	39,4 %	DC _{BN} -Bloc IV	10	12,4 %
DC _{BB} -Bloc V	16 à 22	4,7 %	DC _{BN} -Bloc V	11 à 14	29,7 %
DC _{BB} -Bloc VI	23 à 70	6,9 %	DC _{BN} -Bloc VI	15 à 24	14,5 %
			DC _{BN} -Bloc VII	25 à 32	4,7 %
			DC _{BN} -Bloc VIII	33 à 70	13,3 %
MODE DESCENDANT					
<i>Vins Blancs de Blancs</i>			<i>Vins Blancs de Noirs</i>		
<i>Blocs</i>	<i>Tubes</i>	<i>Rendement</i>	<i>Blocs</i>	<i>Tubes</i>	<i>Rendement</i>
DC _{BB} -Bloc Pré D1	71 et 72	0,2 %	DC _{BN} -Bloc Pré D1	71	0,2 %
DC _{BB} -Bloc D1	73 à 105	0,9 %	DC _{BN} -Bloc D1	72 à 105	1,9 %

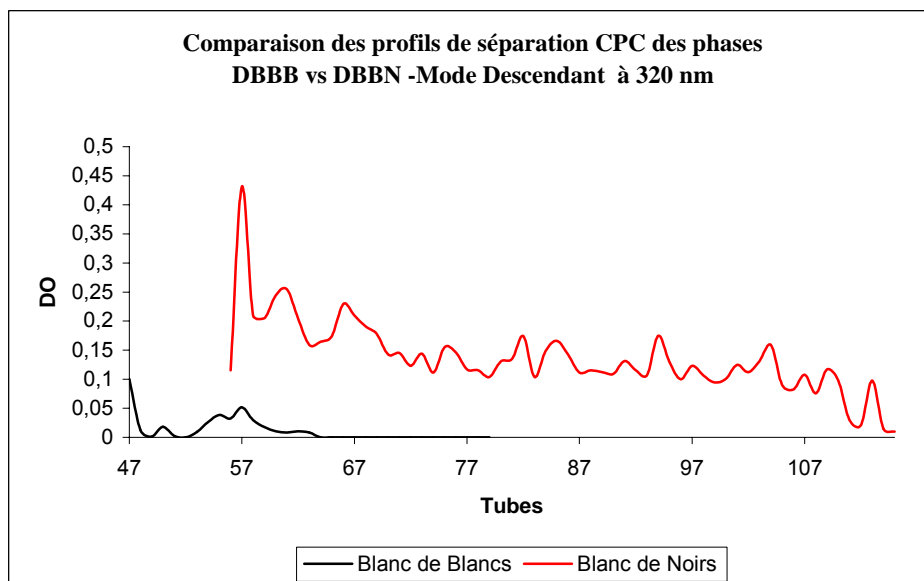
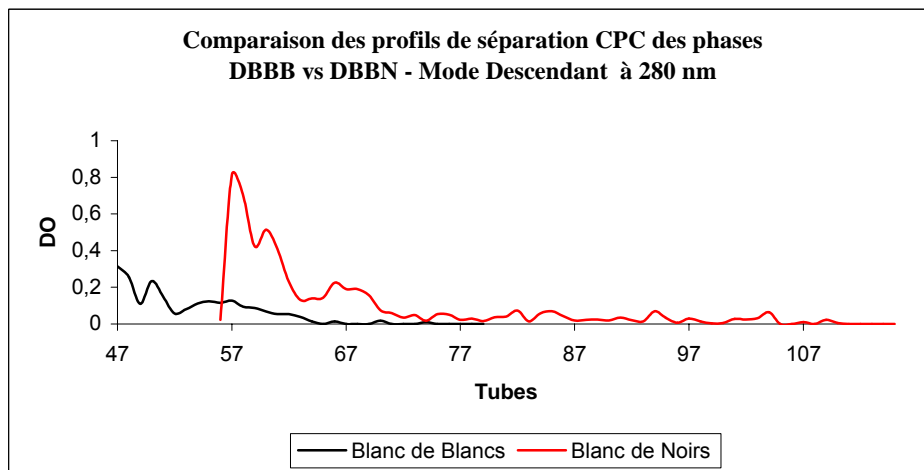
1.5.5 Séparation des phases DB_{BB} et DB_{BN}

Pour cette séparation, nous employons le même protocole que celui utilisé précédemment et décrit au paragraphe 1.2.3.

1.5.5.1 Profil UV en mode Ascendant de la séparation CPC



1.5.5.2 Profil UV en mode Descendant de la séparation CPC



1.5.5.3 Création des blocs CPC et rendements d'extraction

MODE ASCENDANT					
<i>Vins Blancs de Blancs</i>			<i>Vins Blancs de Noirs</i>		
<i>Blocs</i>	<i> Tubes</i>	<i>Rendement</i>	<i>Blocs</i>	<i> Tubes</i>	<i>Rendement</i>
DB _{BB} -Bloc I	6 à 8	0,02 %	DB _{BN} -Bloc I	11	0,1 %
DB _{BB} -Bloc II	9 et 10	0,5 %	DB _{BN} -Bloc II	12 à 14	2 %
DB _{BB} -Bloc III	11 à 13	3,2 %	DB _{BN} -Bloc III	15 et 16	0,7 %
DB _{BB} -Bloc IV	14 à 16	0,78 %	DB _{BN} -Bloc IV	17 à 19	1,3 %
DB _{BB} -Bloc V	17 à 29	1,5 %	DB _{BN} -Bloc V	20 à 22	2,4 %
DB _{BB} -Bloc VI	20 et 21	1 %	DB _{BN} -Bloc VI	23 à 26	4,5 %
DB _{BB} -Bloc VII	22 à 24	1,7 %	DB _{BN} -Bloc VII	27 à 30	3,9 %
DB _{BB} -Bloc VIII	25 à 34	10,6 %	DB _{BN} -Bloc VIII	31 à 42	9,6 %
DB _{BB} -Bloc IX	35 à 39	8,5 %	DB _{BN} -Bloc IX	43 à 50	25,8 %
DB _{BB} -Bloc X	40 à 46	2,6 %	DB _{BN} -Bloc X	51 à 55	23,6 %
MODE DESCENDANT					
<i>Vins Blancs de Blancs</i>			<i>Vins Blancs de Noirs</i>		
<i>Blocs</i>	<i> Tubes</i>	<i>Rendement</i>	<i>Blocs</i>	<i> Tubes</i>	<i>Rendement</i>
DB _{BB} -Bloc D1	47	1 %	DB _{BN} -Bloc D1	56 à 58	4,5 %
DB _{BB} -Bloc D2	48	2,9 %	DB _{BN} -Bloc D2	59 à 63	10,9 %
DB _{BB} -Bloc D3	49 à 51	7,7 %	DB _{BN} -Bloc D3	64 à 67	3,3 %
DB _{BB} -Bloc D4	52 à 55	7,9 %	DB _{BN} -Bloc D4	68 à 72	6,9 %
DB _{BB} -Bloc D5	56 à 59	24,1 %	DB _{BN} -Bloc D5	73 à 115	0,5 %
DB _{BB} -Bloc D6	60 à 73	26 %			

1.6. Analyse structurale des molécules du Champagne

Au terme de la séparation des composés du vin de Champagne, il était important de connaître le contenu des différentes fractions obtenues. Deux méthodes ont été essentiellement utilisées pour permettre de déterminer les molécules présentes : la RMN précédée d'une séparation par CLHP semi-préparative, et la spectroscopie de masse couplée à la chromatographie liquide haute performance. Cette détermination nous permettra de mieux comprendre quelles sont les molécules impliquées dans les propriétés biologiques observées.

1.6.1 Synthèse enzymatique du GRP

La publication mettant en évidence quelques uns des polyphénols présents dans les vins de Champagne fait mention de l'existence de l'acide 2-S-glutathionyl caftarique encore appelé

GRP [30]. Afin de pouvoir caractériser le temps de rétention de ce composé, et de le co-injecter en CLHP, nous en avons effectué la synthèse enzymatique.

Pour réaliser cette synthèse, il a d'abord fallu isoler l'enzyme responsable de la formation *in vivo* de ce composé : la polyphénol oxydase (PPO)

1.6.1.1 Extraction et caractérisation de la PPO

Cette enzyme a été extraite des moûts de vin de Champagne par la méthode dite de « PPO soluble » décrite par S. Guyot [183] et dont le protocole est décrit au paragraphe 2.5.1 de la partie expérimentale. Par cette méthode, nous avons obtenu 17 mg de PPO à partir de 450 ml de moûts (Rdt = 32 mg/L)

Le dosage et l'évaluation de l'activité des protéines ont été réalisés par les techniques de Bradford [184] et de dosage polarographique dont les protocoles sont décrits respectivement au paragraphe 2.5.2 et 2.5.3

Les résultats obtenus mettent en évidence 0,114 mg/ml de protéines présentes dans l'extrait avec une activité 411 O₂/min/ml d'extrait (Cf. Figure 22).

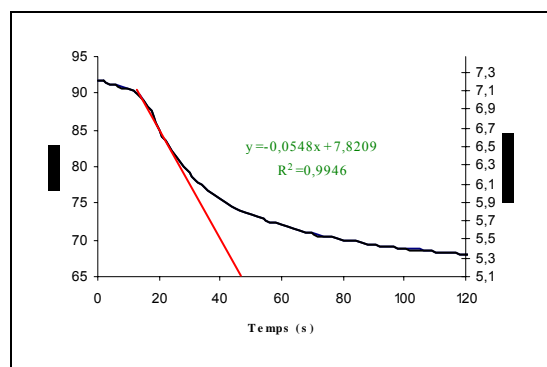


Figure 22: Dosage polarographique de l'activité de la PPO

1.6.1.2 Préparation du GRP

La synthèse du GRP est effectuée selon la méthode décrite par V. Cheynier [185], et dont le protocole est décrit au paragraphe 2.5.4.

L'injection en CLHP analytique en employant le gradient d'élution décrit en partie expérimentale paragraphe 1.2.3, nous a permis d'observer l'apparition du GRP, dont nous avons pu déterminer le temps de rétention ($t_R = 26,7$ minutes), ainsi que les caractéristiques spectrales (Figure 23).

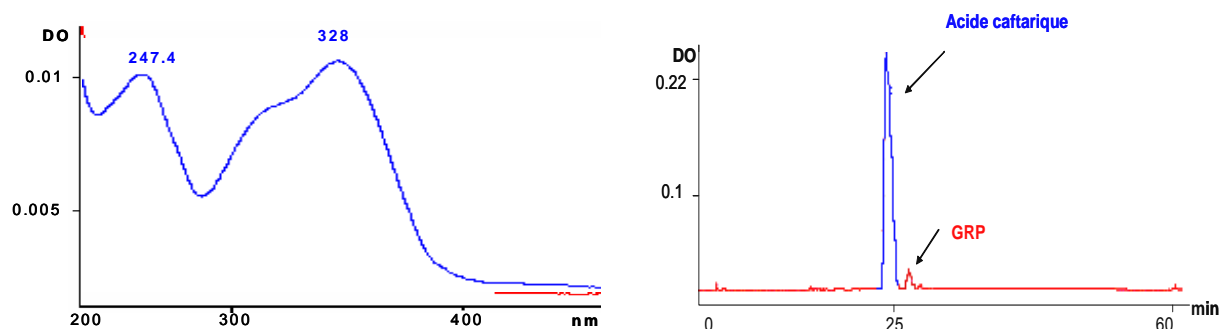


Figure 23: CLHP et caractéristiques spectrales du GRP et de l'acide caftarique

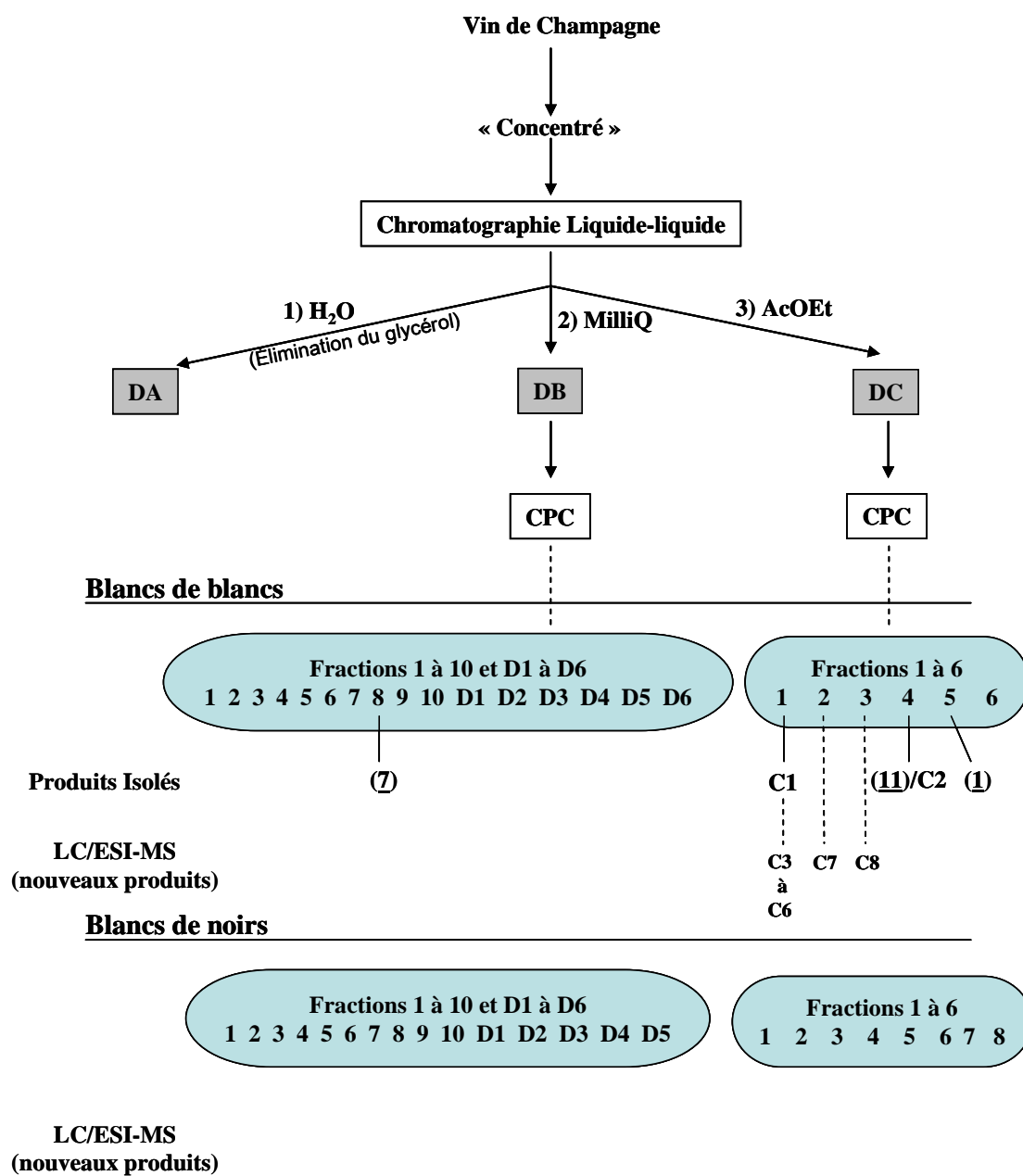


Figure 24: Fractionnement des vins de Champagne

Étude de l'acide caftarique

Cette substance est obtenue par CLHP semi préparative (Cf. paragraphe 1.2.3) de la fraction DB-8, préparée à partir d'un vin de Champagne BB (cf. Figure 24).

En solution dans l'eau ou dans le méthanol, le composé (7) possède une coloration jaune. Son spectre UV-Vis dans le méthanol (Figure 25) présente trois maxima d'absorption (λ_{\max} = 243, 299 et 328 nm).

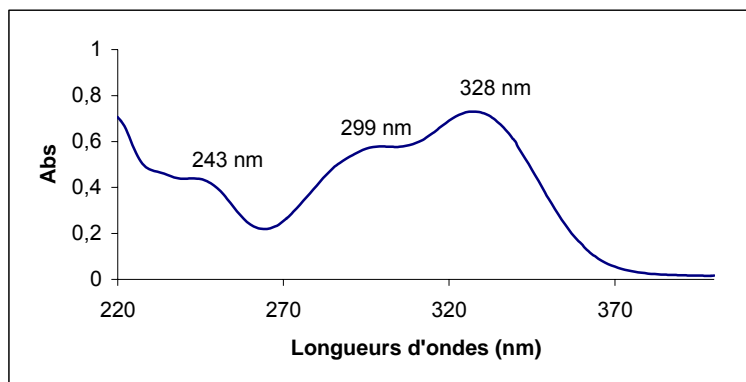
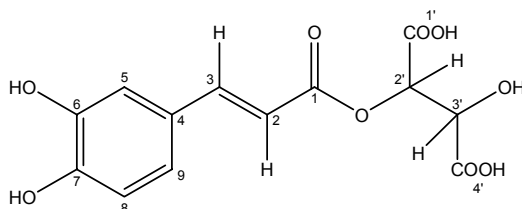


Figure 25: Spectre UV-vis de l'acide caftarique

L'étude RMN de ce produit (annexe Figure 48, p189) dissous dans D₂O à 303 °K, montre qu'il s'agit de **l'isomère E de l'acide cafféoyl tartrique** ou **acide caftarique (7)**.



Acide caftarique (7)

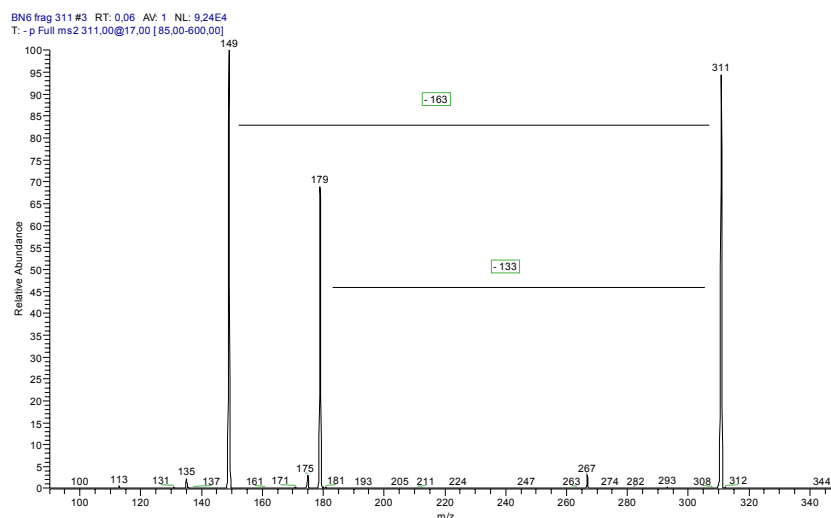
Ses caractéristiques spectrales ¹H sont les suivantes :

PROTONS	δ (ppm)	multiplicité	J (Hz)	intégration
H3	7,71	d	$J_{3-2} = 15,8$	1
H5	7,26	sl	$w_{1/2} = 2,1$	1
H9	7,19	d	$J_{9-8} = 8,1$	1
H8	6,99	d	$J_{8-9} = 8,1$	1
H2	6,47	d	$J_{2-3} = 15,8$	1
H2'	5,37	sl	$w_{1/2} = 1,35$	1

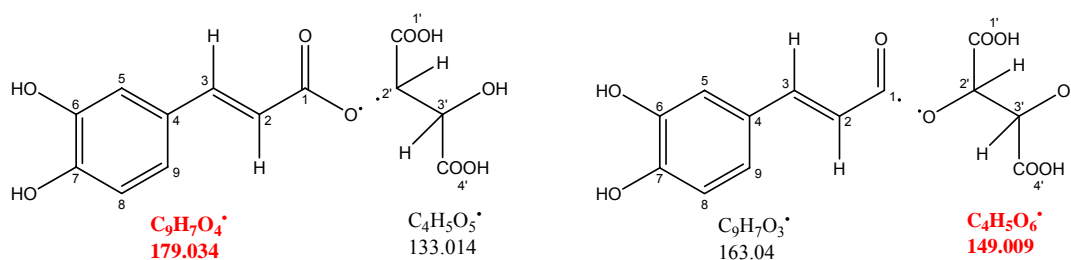
Les déplacements chimiques et les valeurs des constantes de couplages correspondent à celles décrites par S. BIAU [172].

La valeur de la constante de couplage observée entre H2 et H3 (15,8 Hz) permet de montrer qu'il s'agit de protons éthyléniques en position trans.

Afin de nous assurer de la présence de l'acide caftarique, nous avons effectué une injection en spectroscopie de masse (mode négatif)



L'ion moléculaire à $m/z = 311$ est observé et correspond bien à $[M-H]^+$ et donc à la formule brute $C_{13}H_{12}O_9$. La capture de l'ion moléculaire dans la trappe et sa fragmentation en MS2 avec une énergie de collision de 17%, nous conduit à l'obtention de deux ions fils de $m/z = 179$ et $m/z = 149$, ceci étant caractéristique de l'**acide caftarique**.



Ce composé a été décrit par Chamkha et coll. [30] comme étant un des composés majoritaire des vins de Champagne (11 à 31 mg/L), et son temps de rétention en CLHP analytique est $t_R = 24,8$ minutes.

L'oxydation de l'acide caftarique par la polyphénol oxydase (PPO) en présence de glutathion conduit à la formation de l'acide 2-S-glutathionyl caftarique encore appelé GRP [32].

Des mesures de perméabilité de l'acide caftarique à travers la monocouche de cellules épithélio-intestinales Caco-2, ont montré que ce composé diffusait très peu [186].

1.6.2 Étude du gallate d'éthyle

Cette substance a été isolée par CLHP semi-préparative de la fraction DC-4 (Cf paragraphe 1.2.3), préparée à partir d'un Champagne BB.

En solution dans le méthanol, ce produit est incolore, ceci étant confirmé par son spectre UV-visible ($\lambda_{max} = 273$).

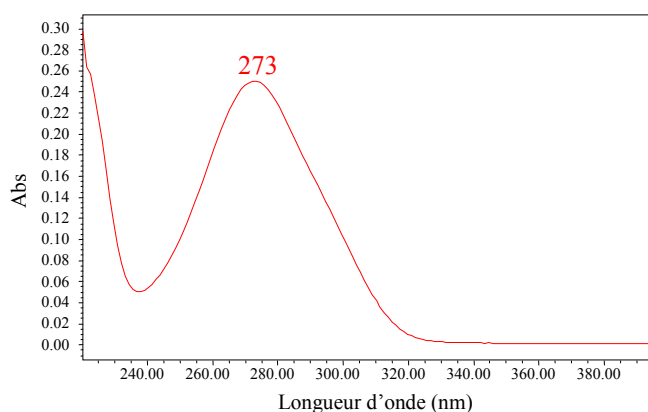
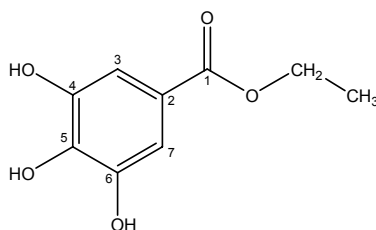


Figure 26: Spectre UV-vis du composé C1

Les différentes données spectrales et chromatographiques recueillies tendent à montrer que le composé isolé est le **gallate d'éthyle (C1)**.



Composé C1

Les signaux observés sur le spectre 1H de ce produit (annexe

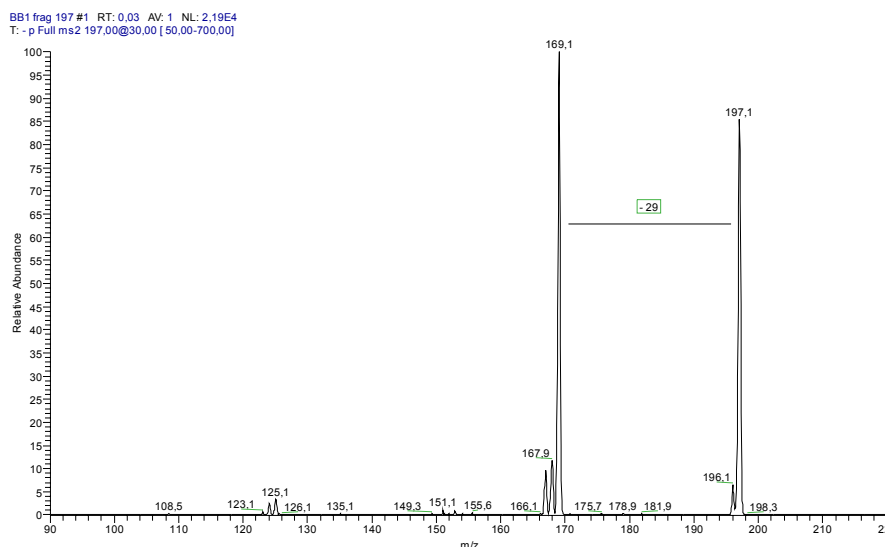
Figure 49, p.190) sont donnés dans le tableau suivant

PROTONS	δ (ppm)	multiplicité	J (Hz)	intégration
CH ₃	1,33	t	7,1	3
CH ₂	4,26	q	7,1	2
H3, H7	7,03	s		2

Le spectre de masse (ESI en mode négatif) met en évidence :

- un ion moléculaire à $m/z = 197$, correspondant à $[M-H]^-$ et donc à la formule brute C₉H₁₀O₅
- un ion moléculaire à $m/z = 169$, correspondant à la perte du CH₃-CH₂
- un ion moléculaire à $m/z = 125$ (de très faible intensité (4%)) correspondant à la perte du CH₃-CH₂-CO₂.

Ces données confirment donc que le composé (**C1**) est bien le **gallate d'éthyle**.



Ce composé a été décrit en 2001 dans les vins de Riesling (vins blancs également) par Baderschneider et Wintehalter [187]. Son temps de rétention en CLHP analytique est de $t_R = 26$ minutes.

Des mesures biologiques effectuées sur des cellules endothéliales ombilicales (HUVEC) en présence de gallate d'éthyle (3 à 10 $\mu\text{mol/L}$) mettent en évidence une diminution significative de l'interleukine 1 α (IL-1 α) ou le TNF- α , induisant l'expression des molécules d'adhésion (VCAM-1 et ICAM-1). Ces mesures démontrent donc une activité anti-inflammatoire du gallate d'éthyle pouvant jouer un rôle préventif dans l'athérosclérose [188].

1.6.3 Étude du tyrosol

Cette substance est obtenue par CLHP semi-préparative de la fraction DC-4 extraite des Champagne BB.

En solution dans le méthanol, ce composé est incolore, ceci étant confirmé par la mesure de son spectre UV-visible ($\lambda_{\max} = 221$ et 277 nm ; Figure 27).

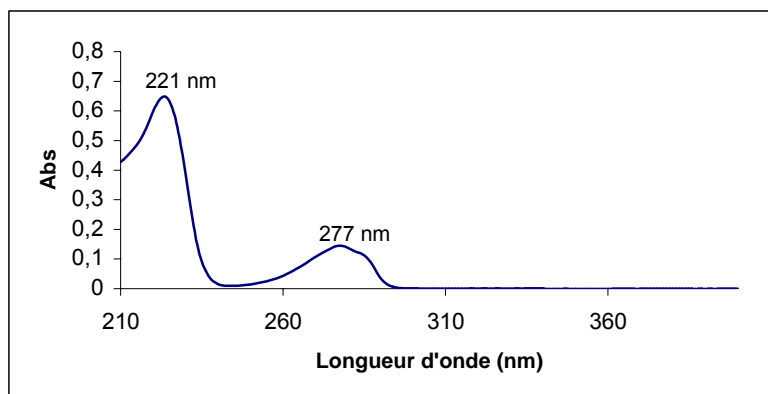
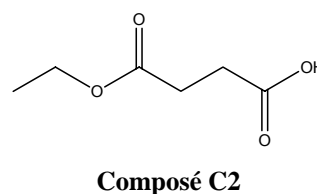
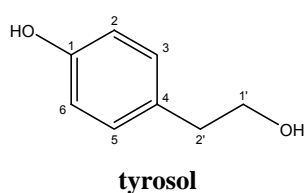


Figure 27: Spectre UV-visible du tyrosol

L'étude RMN de ce composé dans le méthanol deutérié à 303 °K a montré qu'il s'agissait de l'**alcool hydroxyphényl-éthylénique** ou **tyrosol (11)** (annexe Figure 50, p191). Cependant, sur le spectre proton nous pouvons observer des signaux n'appartenant pas au tyrosol. En effet, pendant la purification, et étant donné que nous travaillons à longueur d'onde fixe (280 ou 320 nm), un composé n'absorbant pas en UV a été co-élué. Ce composé est le **succinate d'éthyle** ou composé **C2**



Les caractéristiques spectrales du tyrosol sont les suivantes :

PROTONS	δ (ppm)	multiplicité	J (Hz)	intégration
H1'	3,68	t	7,3	2
H2'	2,70	t	7,3	2
H2, H6	6,69	m		2
H3, H5	7,01	m		2

Deuxième Partie – Travaux Personnels

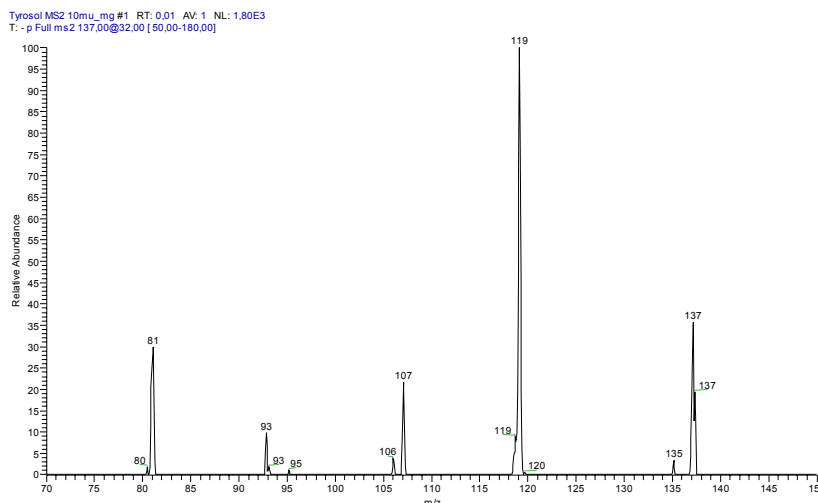
On observe sur le spectre un effet de « toit » entre les deux couples de protons H2, H6 et H3, H5 ; ceux-ci forment un système de spin AA'BB', système complexe ininterprétable au premier ordre. Les protons H2 et H6 en *ortho* d'un groupement hydroxyle en subissent l'effet mésomère blindant ; leur déplacement chimique est donc inférieur à celui des protons H3 et H5 en *mé*ta de ce groupement –OH.

Le temps de rétention du tyrosol en CLHP analytique est de $t_R = 18,9$ minutes.

L'injection en spectrométrie de masse du tyrosol nous fournit un ion moléculaire à $m/z = 137$.

Sa fragmentation avec une énergie de collision équivalente à 32 % donne :

- un ion moléculaire à $m/z = 119$ correspondant à la perte d'une molécule d'eau
- un ion moléculaire à $m/z = 107$ correspondant à la perte de CH_3O
- un ion moléculaire à $m/z = 93$ correspondant à la perte de $\text{C}_2\text{H}_5\text{O}$
- un ion moléculaire à $m/z = 81$ correspondant à la molécule C_6H_9 .



Les caractéristiques spectrales du composé C2 sont les suivantes :

PROTONS	δ (ppm)	multiplicité	J (Hz)	intégration
CH_3	1,21	t	7,1	3
CH_2 (éthyl)	4,10	q	7,1	2
CH_2	2,56	sl		2

L'injection en spectrométrie de masse nous a donné un ion moléculaire à $m/z = 145$ confirmant la masse du **succinate d'éthyle**.

Les expériences de Giovannini en 2002 [189], ont montré que l'adjonction de tyrosol sur des monocytes humains était capable d'inhiber le relargage de TNF- α induit par des lipopolysaccharides (LPS). Le tyrosol est donc capable de moduler la réponse inflammatoire.

1.6.4 Etude de l'acide gallique

Cette substance est obtenue par CLHP semi-préparative de la fraction DC-4 extraite des Champagne BB.

En solution dans le méthanol, ce produit est incolore. Ceci est vérifié par l'analyse de son spectre UV-visible (Figure 28 ; $\lambda_{\max} = 216,5$ nm et 272 nm).

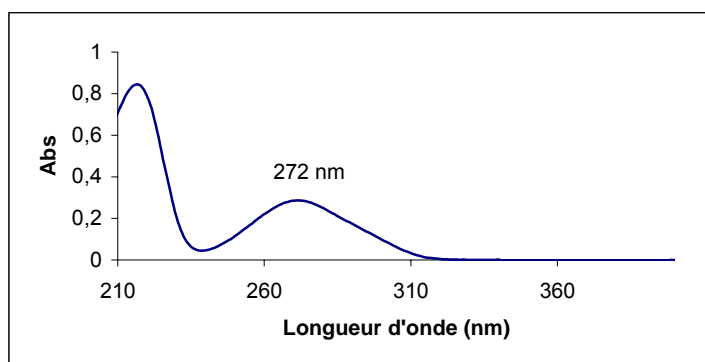


Figure 28: Spectre UV-visible de l'acide gallique

Le spectre proton de cette substance révèle la présence d'un signal unique caractéristique de protons aromatiques magnétiquement équivalents à 7,1 ppm (Cf.

Figure 49).

La comparaison du spectre avec celui de **l'acide gallique (1)** [172] et l'injection d'une référence possédant les mêmes temps de rétention ($t_R = 10$ minutes) permet de conclure à l'identité de celui-ci.

Le spectre de masse (ESI) permet de mettre en évidence :

- un ion moléculaire à $m/z = 170$
- un ion moléculaire à $m/z = 153$ correspondant au fragment résiduel après la perte d'un groupement -OH
- un ion moléculaire à $m/z = 125$ correspondant au fragment résiduel après la perte d'un groupement -COOH.

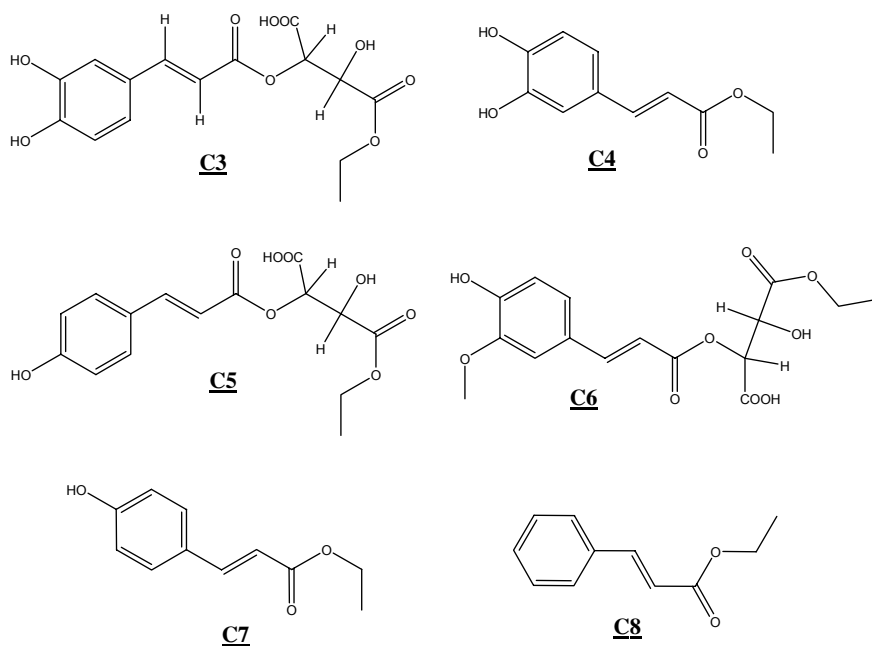
1.6.5 Analyse des molécules présentes dans les vins de Champagne par LC/ESI-MS

L'identification des composés des vins de Champagne a été réalisée par analyse en CLHP-DAD-MS, sur la base de leur temps de rétention et de leurs spectres UV visible et de masse.

L'ensemble des mesures ont été réalisées en mode d'ionisation négatif. La vérification de la présence des composés « commerciaux » a été réalisée par co-injection.

Grâce à ces techniques nous avons pu mettre en évidence 14 molécules, dont **6 sont mises en évidence pour la première fois dans le champagne.**

Molécules	t _R (min)	λ _{max} (nm)	[M-H] ⁻	Fragments
Acide protocatéchique (2)	14,6	293	153	109
(+)-catéchine (16)	18,8	279	289	245/205/179
Cinnamate d'éthyle (C8)	19,0	276	175	156/128/85
Acide caféique (4)	22,4	323	179	135
(-)-épicatéchine (17)	22,9	279	289	245/205/179
Acide coutarique (8)	26,9	313	295	163/119
Acide <i>p</i> -coumarique (5)	27,0	310	163	119
Acide férulique (8)	28,1	323	193	178/149/121
Acide fertarique (10)	29,2	321	325	193/149/113
Engéléline (19)	29,8	290	433	287
Astilbine (18)	30,6	290	449	303/285
Coutarate d'éthyle (C5)	32,0	313	323	277/119
Resvératrol (12)	33,0	306	227	185/159/143
Caftarate d'éthyle (C3)	33,8	329	339	293/177/159
Caféate d'éthyle (C4)	37,5	325	207	179/161/135
Coumarate d'éthyle (C7)	38,0	311	191	163/145/119
Fertarate d'éthyle (C6)	39,0	323	353	353/325/193



Certains de ces composés ont déjà été caractérisés dans certains vins. Ainsi, le caftarate d'éthyle a été identifié dans les vins de Riesling [187], le cinnamate d'éthyle dans les cépages Chardonnay [190] et le caféate d'éthyle dans des vins du sud de l'Espagne [191] ou dans les vins blancs [192]. Ceci nous confirme donc la présence de tels composés dans les vins de Champagne, et non un artéfact du à la préparation des extraits.

1.7 Dosage des composés phénoliques dans les vins de Champagnes

1.7.1 Dosage dans les phases aqueuses des Champagnes BB et BN

Les phases aqueuses obtenues à partir des extractions avec de l'eau distillée sont les plus importantes en termes de masse et représentent environ 90% du volume du Champagne. Une injection en HPLC de ces phases ne nous a pas permis de mettre en évidence la présence de molécules polyphénoliques. La forte dilution de ces composés dans un milieu renfermant en grande majorité du glycérol rend difficile l'observation de telles molécules initialement en faibles quantité. Néanmoins la mise au point d'une technique de séparation permettant d'éliminer le glycérol (Séphadex LH20 ou technique CPC) pourrait nous permettre de mettre en évidence la présence potentielles de molécules polaires (glucosides par exemple) ou hydrosolubles.

1.7.2 Dosage dans la phase organique des Champagnes Blancs de Blancs

Dosage dans la phase organique des Champagnes BB = DC_{BB} (mg/L)						
Molécules	Bloc 1	Bloc 2	Bloc 3	Bloc 4	Bloc 5	Total
Tyrosol (11)	-	-	0,7	10,25	-	10,95
Ac. Caféique (4)	-	0,37	0,23	-	-	0,6
Ac. Protocatéchique (2)	0,02	0,008	0,17	0,41	0,05	0,658
Ac. <i>p</i> OH benzoïque (3)	-	0,38	0,52	0,41	-	1,31
Ac. <i>p</i> -coumarique (5)	0,26	-	-	-	-	0,26
Ac. Gallique (1)	-	-	-	-	0,23	0,23
Ac. Férulique (6)	-	-	-	-	-	nd
Vanilline (14)	-	-	-	-	-	nd
(+)-catéchine (16)	-	-	-	-	-	nd
<i>trans</i> -resvératrol (12)	-	0,01	-	-	-	0,01
(-)-épicatechine (17)	-	-	-	-	-	nd
Quercétine (15)	-	-	-	-	-	nd
GRP (9)	-	-	-	-	-	nd
Astilbine (18)	-	-	1,22	1,27	0,31	2,8
Ac. Fertarique (10)	-	-	-	-	0,08	0,08
Ac. Coutarique (8)	-	-	-	-	0,11	0,11
Ac. Caftarique (7)	-	-	-	-	0,02	0,02
C1	0,08	3,1	0,3	-	-	3,48
C2	-	-	-	-	-	nd
C3	0,24	-	-	-	-	0,24
C4	0,15	0,16	0,15	-	-	0,46
C5	0,04	-	-	0,03	-	0,07
C6	0,13	-	-	-	-	0,13
C7	-	0,05	-	-	-	0,05
C8	-	-	-	-	0,04	0,04

Tableau 5: Dosage des polyphénols dans la phase organique des Champagnes Blancs de Blancs (nd = non dosé)

1.7.3 Dosage dans la phase aqueuse MilliQ des Champagnes Blancs de Blancs

Dosage dans la phase aqueuse MilliQ des Champagnes BB = DB_{BB} (mg/L)								
Molécules	Bloc 1	Bloc 2	Bloc 3	Bloc 5	Bloc 6	Bloc 7	Bloc 8	Total
Tyrosol (11)	-	-	6,7	4,8	0,95	-	-	12,45
Ac. Caféique (4)	0,01	0,25	-	-	-	-	-	0,26
Ac. Protocatéchique (2)	0,015	-	0,76	-	0,4	2	0,5	3,675
Ac. <i>p</i> OH benzoïque (3)	-	-	0,3	-	-	-	-	0,3
Ac. <i>p</i> -coumarique (5)	0,01	-	-	-	-	-	-	0,01
Ac. Gallique (1)	-	-	-	0,71	0,3	1,04	0,22	2,27
Ac. Férulique (6)	-	-	-	-	-	-	-	nd
Vanilline (14)	-	0,06	-	-	-	-	-	0,06
(+)-catéchine (16)	0,01	0,12	-	-	-	-	-	0,13
<i>trans</i> -resvératrol (12)	-	-	-	-	-	-	-	nd
(-)-épicatechine (17)	0,005	-	0,65	0,16	-	-	-	0,815
Quercétine (15)	-	-	-	-	-	-	-	nd

GRP (9)	-	-	-	-	-	-	4,4	4,4
Astilbine (18)	-	-	-	-	-	-	-	nd
Ac. Fertarique (10)	-	-	-	1,34	1,1	-	-	2,44
Ac. Coutarique (8)	0,01	-	-	1	-	0,2	-	1,21
Ac. Caftarique (7)	-	-	-	-	1	10,8	6,8	18,6
C1	0,02	0,6	1,26	-	-	-	-	1,88
C2	-	-	-	-	-	-	-	nd
C3	-	-	-	-	-	-	-	nd
C4	-	-	-	-	-	-	-	nd
C5	-	-	-	-	-	-	-	nd
C6	-	-	-	-	-	-	-	nd
C7	-	0,01	-	-	-	-	-	0,01
C8	-	-	-	-	-	-	-	nd

Tableau 6: Dosage des polyphénols dans la phase aqueuse MilliQ des Champagnes Blancs de Blancs (nd = non dosé)

1.7.4 Dosage dans la phase organique des Champagnes Blancs de Noirs

Dosage dans la phase organique des Champagnes BN = DC _{BN} (mg/L)							
Molécules	Bloc 1	Bloc 2	Bloc 3	Bloc 4	Bloc 5	Bloc 6	Total
Tyrosol (11)	-	-	-	0,3	5,7	-	6
Tryptophol (13)	-	-	0,96	-	-	-	0,96
Ac. Caféique (4)	-	0,33	1	0,4	-	-	1,73
Ac. Protocatéchique (2)	-	-	-	0,1	0,3	0,12	0,52
Ac. <i>p</i> OH benzoïque (3)	-	-	-	0,45	1,2	-	1,65
Ac. <i>p</i> -coumarique (5)	0,007	0,1	0,3	-	-	-	0,407
Ac. Gallique (1)	-	-	-	-	-	1	1
Ac. Férulique (6)	-	0,8	0,65	-	-	-	1,45
Vanilline (14)	-	-	-	-	-	-	nd
(+)-catéchine (16)	-	-	-	-	-	-	nd
<i>trans</i> -resvératrol (12)	-	-	-	-	-	-	nd
(-)-épicatéchine (17)	-	-	-	-	-	-	nd
Quercétine (15)	-	-	-	-	-	-	nd
GRP (9)	-	-	-	-	-	-	nd
Astilbine (18)	0,62	-	-	-	1,01	-	1,63
Ac. Fertarique (10)	-	-	-	-	-	-	nd
Ac. Coutarique (8)	-	-	-	-	-	-	nd
Ac. Caftarique (7)	-	-	-	-	-	10,4	10,4
C1	-	0,1	1	0,2	-	-	1,3
C2	-	-	-	-	-	-	nd
C3	-	-	0,08	0,34	0,17	-	0,59
C4	0,06	0,35	-	-	-	-	0,41
C5	-	-	0,03	-	-	-	0,03
C6	-	-	-	-	-	-	nd
C7	0,16	0,14	-	-	-	-	0,3
C8	-	-	-	-	-	-	nd

Tableau 7: Dosage des polyphénols dans la phase organique des Champagnes Blancs de Noirs (nd = non dosé)

1.7.5 Dosage dans la phase aqueuse MilliQ des Champagnes Blancs de Noirs

Dosage dans la phase aqueuse MilliQ des Champagnes BN = DB_{BN} (mg/L)							
Molécules	Bloc 1	Bloc 2	Bloc 3	Bloc 4	Bloc 5	Bloc 6	Total
Tyrosol (11)	-	8,4	5,6	-	-	-	14
Ac. Caféique (4)	0,06	1,2	-	0,06	3,4	-	4,72
Ac. Protocatéchique (2)	-	1	0,09	0,06	0,83	0,22	2,2
Ac. <i>p</i> OH benzoïque (3)	-	-	-	-	-	-	nd
Ac. <i>p</i> -coumarique (5)	0,4	1	-	-	-	-	1,4
Ac. Gallique (1)	-	-	0,5	1	4,2	0,3	6
Ac. Férulique (6)	0,4	-	-	-	-	-	0,4
Vanilline (14)	-	-	-	-	-	-	nd
(+)-catéchine (16)	-	-	-	0,5	-	-	0,5
<i>trans</i> -resvératrol (12)	0,16	-	-	-	-	-	0,16
(-)-épicatechine (17)	0,4	1	-	-	-	-	1,4
Quercétine (15)	-	-	-	-	-	-	nd
GRP (9)	-	-	-	-	-	-	nd
Astilbine (18)	-	-	-	-	-	-	nd
Ac. Fertarique (10)	-	-	-	-	-	-	nd
Ac. Coutarique (8)	-	-	-	-	-	-	nd
Ac. Caftarique (7)	-	-	-	8	-	2	10
C1	0,2	0,9	-	-	-	-	1,1
C2	-	-	-	-	-	-	nd
C3	-	0,54	0,05	-	-	-	0,59
C4	0,07	0,05	-	-	-	-	0,12
C5	-	-	-	-	-	-	nd
C6	-	-	-	-	-	-	nd
C7	-	-	-	-	-	-	nd
C8	-	-	-	-	-	-	nd

Tableau 8: Dosage des polyphénols dans la phase aqueuse MilliQ des Champagnes Blancs de Noirs (nd = non dosé)

1.7.6 Récapitulatif des dosages dans les vins de Champagne

Molécules	Champagnes Blanc de Blancs (mg/L)			Champagnes Blanc de Noirs (mg/L)		
	DC_{BB}	DB_{BB}	Somme BB	DC_{BN}	DB_{BN}	Somme BN
Tyrosol (11)	10,95	12,45	23,4	6	14	20
Ac. Caféique (4)	0,6	0,26	0,86	1,73	4,72	6,45
Ac. Protocatéchique (2)	0,66	3,68	4,34	0,52	2,2	2,72
Ac. <i>p</i> OH benzoïque (3)	1,31	0,3	1,61	1,65	0	1,65
Ac. <i>p</i> -coumarique (5)	0,26	0,01	0,27	0,41	1,4	1,81
Ac. Gallique (1)	0,23	2,27	2,5	1	6	7
Ac. Férulique (6)	nd	nd	nd	1,45	0,4	1,85
Tryptophol (13)	nd	nd	nd	0,96	nd	0,96
Vanilline (14)	nd	0,06	0,06	0	0	nd
(+)-catéchine (16)	nd	0,13	0,13	0	0,5	0,5
<i>trans</i> -resvératrol (12)	0,01	Nd	0,01	0	0,16	0,16

(-)-épicatéchine (17)	nd	0,82	0,82	0	1,4	1,4
Quercétine (15)	nd	nd	nd	0	0	nd
GRP (9)	nd	4,4	4,4	0	0	nd
Astilbine (18)	2,8	0	2,8	1,63	0	1,63
Ac. Fertarique (10)	0,08	2,44	2,52	0	0	nd
Ac. Coutarique (8)	0,11	1,21	1,32	0	0	nd
Ac. Caftarique (7)	0,02	18,6	18,62	10,4	10	20,4
C1	3,48	1,88	5,36	1,3	1,1	2,4
C2	nd	nd	nd	0	0	nd
C3	0,24	nd	0,24	0,59	0,59	1,18
C4	0,46	nd	0,46	0,41	0,12	0,53
C5	0,07	nd	0,07	0,03	0	0,03
C6	0,13	nd	0,13	0	0	nd
C7	0,05	0,01	0,06	0,3	0	nd
C8	0,04	nd	0,04	0	0	nd
		Total BB	70 mg/L	Total BN		70,7 mg/L

Tableau 9: Récapitulatif du dosage des polyphénols dans les vins de Champagne (nd = non dosé)

1.8 Conclusion

Au terme de cette première étape, consistant à préparer des Extraits de Vins de Champagne (EVC), nous avons pu mettre au point la méthode la plus adaptée à la séparation des substances naturelles qui permette l'analyse de **TOUT** le Champagne, et le maintien maximum de leur intégrité.

La méthode extractive productrice des trois fractions consiste simplement à employer de l'eau désionisée face à la fraction organique (EVC-xx-AcOEt). Celle-ci diminue fortement en masse, mais s'enrichit proportionnellement en composés aromatiques et particulièrement en polyphénols.

La mise au point d'un protocole expérimental de séparation par Chromatographie de Partage Centrifuge des fractions obtenues présentant des activités biologiques intéressantes nous a conduit à la purification de quatre substances, et à la caractérisation de six nouvelles molécules grâce à la technique de couplage CLHP-DAD-ESI/MS.

Ces substances déjà décrites dans la littérature sont pour la première fois mises en évidence dans les vins de Champagne.

Le dosage des composés phénoliques totaux dans les deux vins de Champagne ne permet pas d'observer de différence entre les BB et les BN (environ 70 mg/L de composés phénoliques présents). La différence s'effectue sur la répartition de certains composés plus concentrés dans les Champagnes BN que dans les Champagnes BB (acides *p*-coumarique, caféique, férulique ou encore le *trans*-resvératrol, etc. (cf. Tableau 9)).

2 Propriétés biologiques des extraits de vin de Champagne

2.1 Introduction

Les méthodes de séparation et d'extraction mises au point précédemment nous ont permis d'obtenir des Extraits de Vin de Champagne, représentatifs de la totalité du vin.

Le but ultime de cette séparation est l'évaluation des propriétés biologiques des substances naturelles contenues dans ces fractions. Pour ce faire et pour arriver à caractériser les molécules biologiquement actives, une méthode consistant à **bioguider** cette séparation a été employée. Elle consiste à repérer les fractions, puis les blocs séparés par CPC démontrant une activité biologique pertinente

Ainsi l'utilisation d'eau MilliQ, dans le but de produire des fractions ne contenant plus d'ions sodium, nous a permis de tester deux de ces fractions extraites, sur un modèle de mitochondries de cerveau de rat. Cependant, ce seul modèle ne suffisant pas à explorer l'ensemble des phases obtenues, d'autres activités biologiques ont pu être testées (cancer, inhibition de l'activité acétylcholinestérase).

2.2 Étude de l'effet protecteur sur des mitochondries isolées de cerveau de rat

2.2.1 Introduction

L'apport sanguin de l'oxygène explique que les premières cellules cérébrales étant soumises aux effets d'un stress oxydatif soient les cellules vasculaires, et d'abord l'endothélium des vaisseaux et les astrocytes qui les entourent. Les EOR y sont formés in situ. Les cellules pro inflammatoires circulantes, en particulier les neutrophiles, constituent une autre source d'EOR après adhésion aux cellules vasculaires. Les processus neurodégénératifs engendrés dans ces conditions commencent toujours par atteindre la barrière hémato-encéphalique (BHE) et ses deux principaux composants, les cellules endothéliales et les astrocytes [193, 194].

Le but de cette expérimentation (réalisée en collaboration avec le Laboratoire de Pharmacologie, Faculté de Médecine à Créteil) est d'étudier l'effet protecteur potentiel d'extraits de vin de Champagne sur des mitochondries isolées de cerveau de rat.

Dans un premier temps, l'activité de ces polyphénols incubés avec les mitochondries isolées a été testée en mesurant le Contrôle Respiratoire (CR). Dans un deuxième temps, leur activité a

été étudiée en présence de mitochondries soumises à une anoxie-réoxygénation pour simuler une ischémie-reperfusion in vitro afin d'évaluer leur effet protecteur.

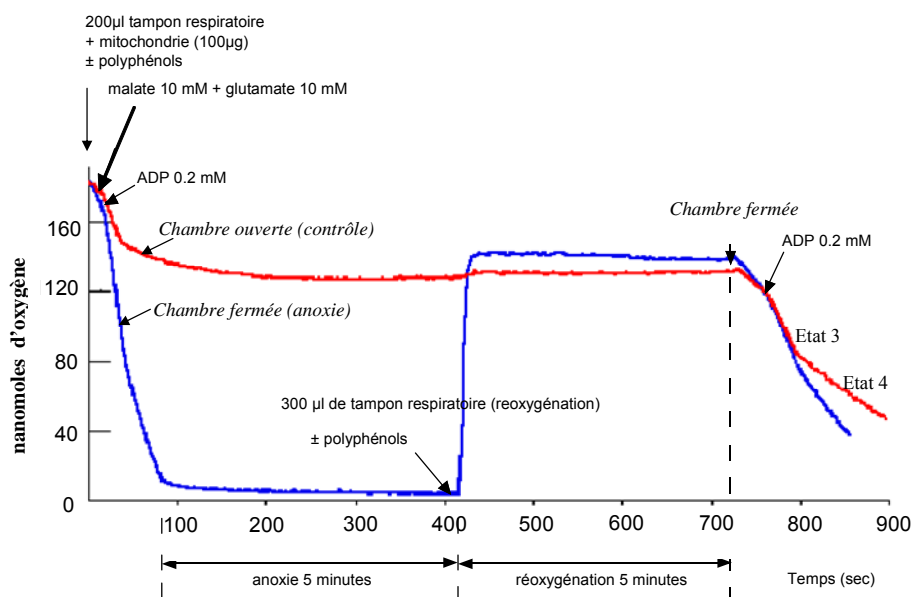


Figure 29: Principe du modèle d'anoxie-réoxygénation

Dans le but de pouvoir comparer entre eux les différents CR exprimés en pourcentages, l'équation suivante est employée :

$$\text{Variation de CR (\%)} = (\text{CR essai} - 1) / (\text{CR contrôle} - 1) \times 100$$

2.2.2 Effet protecteur des EVC sur les mitochondries de cerveau de rat

Etant donné les impératifs exigés par cette expérimentation (absence d'ions Na), seuls quatre échantillons ont été testés. Les échantillons issus de l'extraction à l'eau MilliQ sont ré extraits par du butanol pour s'affranchir des minéraux résiduels.

Le protocole employé pour la mesure des paramètres mitochondriaux est décrit au paragraphe 3.1. Les échantillons employés pour ces tests sont les deux phases organiques issues des vins BB et BN (DC_{BB} et DC_{BN}) et les deux phases MilliQ issues des vins BB et BN (DB_{BB} et DB_{BN}).

A la concentration de 1 μM , les quatre échantillons testés ne modifient pas le CR (3.15 ± 0.20) des mitochondries fraîchement isolées (Figure 30).

En revanche, à la concentration de 100 μM , les échantillons DC_{BN} et DB_{BN} diminuent significativement ($p < 0.05$) le CR d'environ 10 à 15% (Figure 30).

Dans le modèle d'anoxie-réoxygénation, les mitochondries témoins incubées à 37°C pendant 10 min ont un CR de 2.64 ± 0.21 . En présence des échantillons à la concentration de 1 μM , le

CR est légèrement diminué (# 10 % ; $p < 0.05$) pour les échantillons DCBN et DBBN et non modifié pour les échantillons DC_{BB} et DB_{BB} (Figure 31). Cependant à la concentration de 100 μM , les quatre échantillons diminuent significativement ($p < 0.01$) de l'ordre de 38 % le CR (1.64 ± 0.04) (Figure 31).

Dans ce même modèle, les mitochondries ayant subi une anoxie de 5 min suivie d'une réoxygénation de 5 min, ont un CR diminué de 55 % (1.45 ± 0.11). Dans ces conditions, seuls les échantillons DCBB et DCBN sont capables de restaurer partiellement (# 11 % ; $p < 0.05$) le CR des mitochondries ayant subi cette anoxie-réoxygénation (Figure 32).

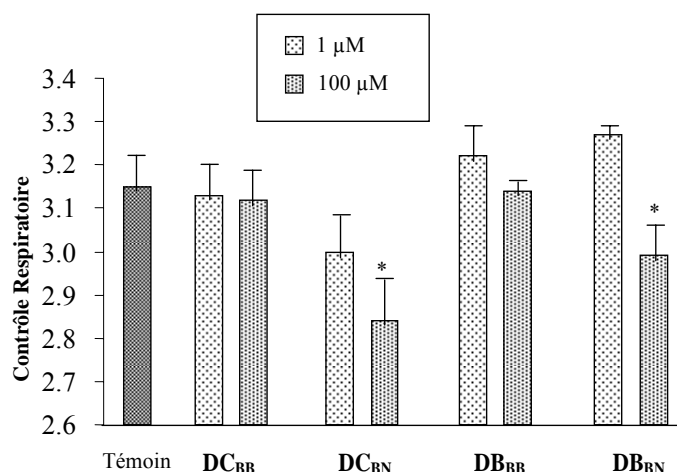


Figure 30: Effet des extraits polyphénoliques sur le CR des mitochondries de cerveau de rat.

La consommation d'oxygène par les mitochondries (0.2 mg/ml final concentration) est déterminée à 37°C avec une électrode de Clark. Le CR est calculé comme décrit dans la partie expérimentale en présence des extraits polyphénoliques à 1 et 100 μM . Les résultats sont exprimés comme la moyenne \pm s.e.m. (barres) de six préparations différentes de mitochondries mesurées en triple.

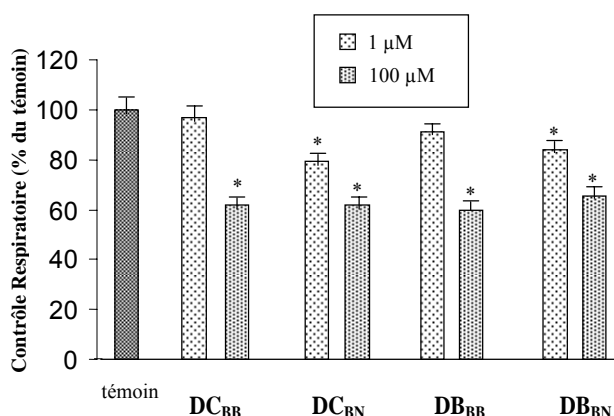


Figure 31: Effet des extraits polyphénoliques sur le CR des mitochondries témoins de cerveau de rat laissées 10 min à 37°C.

La consommation d'oxygène par les mitochondries (0.2 mg/ml final concentration) est déterminée à 37°C avec une électrode de Clark. Le CR est calculé comme décrit dans la partie expérimentale en présence des extraits polyphénoliques à 1 et 100 μM mis avant les 10 min à 37°C. Chaque valeur est exprimée en pourcentage du témoin sans anoxie pendant 10 min à 37°C (100%). Les résultats sont exprimés comme la moyenne \pm s.e.m. (bars) de six préparations différentes de mitochondries mesurées en triple.

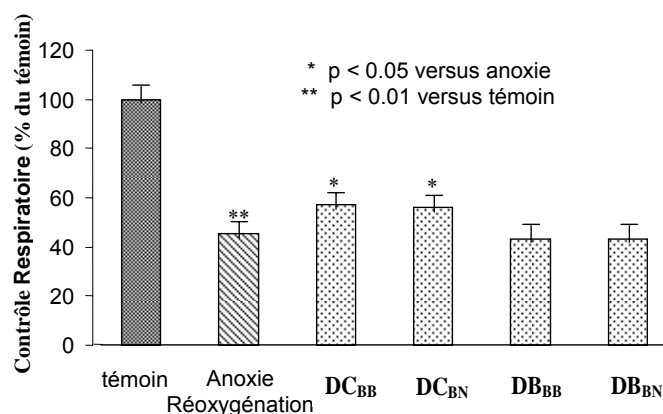


Figure 32: Effet des extraits polyphénoliques sur le CR des mitochondries de cerveau de rat avant anoxie-réoxygénation.

La consommation d'oxygène par les mitochondries (0.2 mg/ml final concentration) est déterminée à 37°C avec une électrode de Clark. Le CR est calculé comme décrit dans la partie expérimentale en présence des extraits polyphénoliques à 1 μ M mis avant l'anoxie-réoxygénation. Chaque valeur est exprimée en pourcentage du témoin sans anoxie (100%). Après anoxie-réoxygénation, le CR est diminué d'environ 55% ($p < 0.01$). Les résultats sont exprimés comme la moyenne \pm s.e.m. (barres) de six préparations différentes de mitochondries mesurées en triple.

2.2.3 Effet protecteur des blocs séparés sur les mitochondries de cerveau de rat

Il s'agit de vérifier que les blocs issus des phases DC_{BB} et DC_{BN} obtenus par séparation CPC sont capables de restaurer le CR de mitochondries isolées de cerveau de rat dans le modèle d'anoxie-réoxygénation. Les premiers résultats montraient une capacité des phases organiques à restaurer l'activité mitochondriale, les blocs séparés de ces phases devraient nous mener à la ou les molécules responsables de cette activité. Pour ce faire, le protocole employé pour ces mesures est identique à celui utilisé précédemment, et est décrit au paragraphe 3.1.

2.2.3.1 Blocs issus de la séparation CPC de la phase DC_{BB}

EXTRAITS	CR Témoin	CR + Extraits (1 μ M)	CR + Extraits (100 μ M)	CR 10 min Témoin	CR 10 min + Extraits (100 μ M)	CR Anoxie	CR Anoxie + Extraits (100 μ M)
DCBB -Bloc 1	2.82 \pm 0.26	3.00 \pm 0.39	^o 2.31 \pm 0.09	2.64 \pm 0.11	2.44 \pm 0.16	*2.12 \pm 0.18	*2.14 \pm 0.12
DCBB -Bloc 2	3.18 \pm 0.20	3.24 \pm 0.17	3.10 \pm 0.08	2.68 \pm 0.22	2.49 \pm 0.13	*2.10 \pm 0.11	*2.11 \pm 0.07
DCBB -Bloc 3	2.87 \pm 0.24	2.91 \pm 0.24	3.06 \pm 0.07	3.00 \pm 0.10	2.93 \pm 0.43	*2.10 \pm 0.12	*2.20 \pm 0.30
DCBB -Bloc 4	2.84 \pm 0.10	2.91 \pm 0.18	2.86 \pm 0.22	2.23 \pm 0.28	2.37 \pm 0.40	*1.90 \pm 0.19	*1.80 \pm 0.17
DCBB -Bloc 5	2.86 \pm 0.13	2.89 \pm 0.31	2.86 \pm 0.26	2.33 \pm 0.21	2.53 \pm 0.19	*1.71 \pm 0.08	*1.70 \pm 0.16
DCBB -Bloc 6	2.35 \pm 0.16	2.59 \pm 0.19	2.39 \pm 0.20	2.33 \pm 0.33	2.47 \pm 0.25	*1.65 \pm 0.07	*1.66 \pm 0.08
DCBB -Bloc D1	2.30 \pm 0.08	2.40 \pm 0.11	2.47 \pm 0.10	2.63 \pm 0.24	2.50 \pm 0.23	*1.95 \pm 0.18	*1.89 \pm 0.18

Tableau 10: CR des mitochondries soumises aux blocs CPC de la phase DC_{BB}

^o $p < 0.05$ comparé au CR 10 min témoin ; * $p < 0.05$ comparé au CR après anoxie/réoxygénation.

Aux concentrations de 1 et 100 μM , les sept échantillons testés ne modifient pas le CR (Tableau 10) des mitochondries fraîchement isolées, à l'exception de l'extrait DC_{BB} -Bloc1 qui diminue le CR des mitochondries témoins d'environ 28% à la concentration de 100 μM . Tous les extraits ont donc été testés à la concentration maximale de 100 μM , sauf l'extrait DC_{BB} -Bloc1 qui a été utilisé à une concentration de 1 μM , concentration qui n'altère pas le CR des mitochondries témoins.

Dans le modèle d'anoxie-réoxygénation, les mitochondries témoins incubées à 37°C pendant 10 min ont un CR en général plus faible (environ 10%) que celui des mitochondries témoins incubées immédiatement (Tableau 10). En présence des échantillons à la concentration de 1 ou 100 μM , le CR n'est pas modifié pour les différents extraits (Tableau I). Dans ce même modèle, les mitochondries ayant subi une anoxie de 5 min suivie d'une réoxygénation de 5 min, ont un CR diminué d'environ 40 % (Tableau 10). Dans ces conditions, aucun des extraits n'est capable de restaurer partiellement ou totalement le CR des mitochondries ayant subi cette anoxie-réoxygénation

2.2.3.2 Blocs issus de la séparation CPC de la phase DC_{BN}

EXTRAITS	CR Témoin	CR Témoin 10 min	CR Anoxie	CR Anoxie + Extraits (1 μM)	CR Anoxie + Extraits (100 μM)
DC_{BN} -Bloc 1	3.08 \pm 0.35	2.96 \pm 0.15	$^{\circ}$ 2.63 \pm 0.15	2.77 \pm 0.13	$^{\circ}$ *2.10 \pm 0.16
DC_{BN} -Bloc 2	3.28 \pm 0.25	3.18 \pm 0.12	$^{\circ}$ 2.82 \pm 0.23	*3.06 \pm 0.13	$^{\circ}$ 2.72 \pm 0.08
DC_{BN} -Bloc 3	2.97 \pm 0.11	2.80 \pm 0.09	$^{\circ}$ 2.48 \pm 0.17	*2.82 \pm 0.23	$^{\circ}$ 2.52 \pm 0.19
DC_{BN} -Bloc 4	3.17 \pm 0.12	3.14 \pm 0.26	$^{\circ}$ 2.70 \pm 0.19	*3.18 \pm 0.10	*2.94 \pm 0.14
DC_{BN} -Bloc 5	3.23 \pm 0.19	2.95 \pm 0.10	$^{\circ}$ 2.55 \pm 0.11	$^{\circ}$ *3.23 \pm 0.28	*2.93 \pm 0.21
DC_{BN} -Bloc 6	2.85 \pm 0.04	2.93 \pm 0.13	$^{\circ}$ 2.48 \pm 0.25	*2.78 \pm 0.15	$^{\circ}$ 2.67 \pm 0.22
DC_{BN} -Bloc 7	3.01 \pm 0.20	3.25 \pm 0.38	$^{\circ}$ 2.48 \pm 0.13	*2.98 \pm 0.11	$^{\circ}$ 2.69 \pm 0.26
DC_{BN} -Bloc 8	2.83 \pm 0.08	2.84 \pm 0.18	$^{\circ}$ 2.38 \pm 0.12	*2.86 \pm 0.31	$^{\circ}$ 2.56 \pm 0.18
DC_{BN} -Bloc D1	2.51 \pm 0.11	2.45 \pm 0.21	$^{\circ}$ 2.18 \pm 0.14	$^{\circ}$ 2.10 \pm 0.18	$^{\circ}$ 2.13 \pm 0.19

Tableau 11: CR des mitochondries soumises aux blocs CPC de la phase DC_{BN}

$^{\circ}$ p < 0.05 comparé au CR 10 min témoin ; * p < 0.05 comparé au CR après anoxie/réoxygénation.

Le CR de mitochondries fraîchement isolées, est en moyenne de 3,01 après 10 minutes à 37°C. Celui des mitochondries après une anoxie-réoxygénation est en moyenne de 2,26 montrant une diminution significative de 37 % (Tableau 11).

A 100 μM , DC_{BN}-Bloc 1 est le seul bloc à montrer un effet délétère sur les mitochondries après une anoxie réoxygénation, en diminuant le CR d'environ 33 % (Tableau 11).

A la concentration de 1 μM , les extraits DC_{BN}-Bloc 2, 3, 4, 5 et l'extrait DC_{BN}-Bloc 8 sont capables de restaurer totalement (100%) le CR après une anoxie réoxygénation.

A la concentration de 100 μM , ces mêmes blocs protègent partiellement les mitochondries ayant subies une anoxie-réoxygénation (85%), excepté pour l'extrait DC_{BN}-Bloc 5 qui est capable de restaurer le CR de 100 % (Tableau 11).

L'extrait issu du mode descendant de la CPC quand à lui, ne montre aucune protection, ni toxicité sur les mitochondries isolées.

2.2.3.3 Expériences effectuées sur des molécules pures

Des expérimentations ont été effectuées sur des composés purs afin de rechercher les molécules responsables de l'effet observé en présence des phases organiques de vins de Champagne. Pour ce faire, huit références ont été choisies parmi les 19 composés phénoliques mis en évidence par Chamkha et collaborateurs [30] : l'acide caféique, l'acide caftarique, l'acide *p*-coumarique, l'acide gallique, la (+)-catéchine, la (-)-épicatéchine, le tryptophol et le tyrosol.

PRODUITS	CR Témoin	CR 10 min	Anoxie	Anoxie + Produit (1 μM)	Anoxie + Produit (100 μM)
Acide caféique	3.25 \pm 0.23	2.73 \pm 0.17	$^{\circ}$ 2.23 \pm 0.12	$^{\circ}$ 2.14 \pm 0.21	*2.55 \pm 0.27
Acide caftarique	2.59 \pm 0.10	2.65 \pm 0.37	$^{\circ}$ 2.15 \pm 0.15	$^{\circ}$ 2.20 \pm 0.16	$^{\circ}$ 2.19 \pm 0.15
Acide <i>p</i> -coumarique	3.04 \pm 0.14	2.66 \pm 0.10	$^{\circ}$ 2.23 \pm 0.12	$^{\circ}$ 2.27 \pm 0.07	* $^{\circ}$ 2.49 \pm 0.09
Acide gallique	2.80 \pm 0.07	2.65 \pm 0.11	$^{\circ}$ 2.17 \pm 0.19	$^{\circ}$ 2.18 \pm 0.14	*2.48 \pm 0.19
(+) - Catéchine	2.84 \pm 0.07	2.52 \pm 0.08	$^{\circ}$ 2.29 \pm 0.14	$^{\circ}$ 2.19 \pm 0.16	*2.49 \pm 0.20
(-) -Epicatéchine	3.01 \pm 0.13	2.51 \pm 0.12	$^{\circ}$ 2.14 \pm 0.22	$^{\circ}$ 2.13 \pm 0.26	$^{\circ}$ 2.16 \pm 0.11
Tryptophol	2.82 \pm 0.19	2.43 \pm 0.17	$^{\circ}$ 2.11 \pm 0.12	$^{\circ}$ 2.09 \pm 0.13	$^{\circ}$ 2.22 \pm 0.19
Tyrosol	2.88 \pm 0.11	2.44 \pm 0.05	$^{\circ}$ 2.09 \pm 0.17	$^{\circ}$ 2.06 \pm 0.27	$^{\circ}$ 2.07 \pm 0.11

Tableau 12: Contrôle Respiratoire de mitochondries isolées de cerveau de rat en présence de produits purs

$^{\circ}$ $p < 0.05$ comparé au CR 10 min témoin ; * $p < 0.05$ comparé au CR après anoxie-réoxygénation.

Parmi les huit polyphénols testés, l'acide caféique, l'acide *p*-coumarique, l'acide gallique et la (+)-catéchine, sont capables à 100 μM d'augmenter ou de restaurer le CR après une anoxie-

réoxygénation d'au moins 80% (83% pour l'acide caféique, 81% pour l'acide *p*-coumarique, 90% pour l'acide gallique et 100% pour la (+)-catéchine).

2.2.4 Conclusion

De cette étude, il ressort que les concentrations élevées (100 μM) des phases DC_{BB} , DC_{BN} , DB_{BB} et DB_{BN} sont capables de diminuer l'activité de la chaîne respiratoire à la fois de mitochondries saines et de mitochondries ayant subi une anoxie-réoxygénation. Toutefois à des concentrations plus faibles (1 μM), ces extraits ne montrent aucune toxicité envers les mitochondries, et en outre deux extraits DC_{BB} et DC_{BN} sont même capables de protéger partiellement celles-ci lors d'une anoxie-réoxygénation. Ces deux extraits issus d'une extraction en milieu acétate d'éthyle sont relativement lipophiles et donc diffusent bien au travers des membranes mitochondriales.

Pour des concentrations élevées (100 μM) des extraits issus de la séparation CPC des phases DC_{BB} et DC_{BN} , l'activité de la chaîne respiratoire à la fois de mitochondries saines et de mitochondries ayant subi une anoxie-réoxygénation n'est pas modifiée. Toutefois on peut noter que les extraits DC_{BB} -Bloc1 et DC_{BN} -Bloc1 diminuent cette activité à 100 μM mais non à 1 μM .

Les expériences effectuées sur les blocs séparés issus de DC_{BB} ne montrent aucune toxicité envers les mitochondries, y compris pour les fortes concentrations (100 μM), mais sont incapables de protéger partiellement ou totalement celles-ci lors d'une anoxie-réoxygénation.. Il apparaît donc que l'on perd l'activité initiale quand on sépare la fraction originale. Des expériences consistant à re-rassembler les différents blocs issus de DC_{BB} , nous ont cependant permis de retrouver l'activité initialement mise en évidence. Ces résultats nous suggèrent donc un **effet synergique** des molécules présentes dans la phase DC_{BB} .

A contrario, la séparation de la phase DC_{BN} permet de renforcer l'activité initialement observée, nous permettant par la même de mettre en évidence la présence d'une fraction capable de restaurer la totalité de l'activité mitochondriale après anoxie-réoxygénation, et ceci pour des concentrations de 1 μM .

L'étude de l'activité de molécules pures présentes dans les vins de Champagne, nous a également permis d'observer que les résultats obtenus pour les Champagne BN, ne peuvent être expliqués par la seule présence des molécules testées. Il peut s'agir soit de la présence d'une molécule non testée, soit de l'effet synergique de plusieurs molécules.

2.3 Transport de molécules à travers la monocouche de cellules endothéliales

Outre les informations obtenues par l'étude des principales fonctions mitochondriales (respiration cellulaire, phosphorylation oxydative des cellules cérébrales), des expérimentations utilisant le modèle *in vitro* d'hypoxie sur des co-cultures de cellules endothéliales de capillaires de boeuf et d'astrocytes de rat sont employées [195]. Celles-ci ont pour but de rechercher s'il est possible de s'opposer aux effets toxiques engendrés par un stress oxydatif avec des extraits polyphénoliques de vin de Champagne. Ces expérimentations ont été réalisées par le Laboratoire de Physiopathologie de la barrière hémato-encéphalique *in vitro*, Faculté Jean Perrin à Lens.

2.3.1 Introduction

Les cellules endothéliales de capillaires cérébraux, support anatomique de la barrière hémato-encéphalique (BHE), présentent des caractéristiques structurales et métaboliques qui restreignent considérablement les échanges entre le sang et le parenchyme cérébral. Nécessaire au maintien de l'homéostasie du système nerveux central, ce filtre sélectif reste un problème pour le traitement des maladies cérébrales. Afin de recréer les interactions qui existent *in vivo* et d'étudier les mécanismes cellulaires et moléculaires qui régissent le passage des molécules vers le cerveau, un modèle de BHE *in vitro* a été établi. Ce modèle consiste en une coculture de cellules endothéliales de capillaires cérébraux et de cellules glialesensemencées de part et d'autre d'un filtre. Dans ces conditions de culture, les cellules endothéliales expriment toutes les caractéristiques, tant physiques que métaboliques, de l'endothélium *in vivo* [196].

2.3.2 Résultats

2.3.2.1 Détermination du coefficient de perméabilité

Cette expérience a pour but de déterminer le passage potentiel de nos échantillons à travers la BHE. Le protocole employé pour la détermination du coefficient de perméabilité est décrit au paragraphe 3.2.1. Les échantillons employés pour ces tests sont les deux phases DC_{BB} et DC_{BN} à deux concentrations : 0,5 et 1 μ M.

Après 12 jours de coculture avec les cellules gliales, les cellules endothéliales présentent toutes les caractéristiques de l'endothélium *in vivo* et peuvent être utilisées pour les études de transport.

Afin de déterminer les coefficients de perméabilité des cellules endothéliales pour chaque molécule, la clearance de chaque substance est déterminée selon la formule suivante :

$$Clearance(\mu l) = Cl(\mu l) = \frac{X}{Cd}$$

où X est la quantité de substance dans le compartiment inférieur

où Cd est la concentration de substance dans le compartiment supérieur.

Pendant 45 minutes, la clearance augmente linéairement avec le temps. Sur le graphe clearance = f(t), la mesure de la pente nous donne la valeur « PSt » où PS = perméabilité x surface de la monocouche (en $\mu l/min$) pour les filtres recouverts de cellules endothéliales de capillaires cérébraux. Pour les filtres témoins « PSf » est calculée de la même façon. La perméabilité pour la monocouche de cellules endothéliales seules (PSe) est donnée par la formule suivante :

$$\frac{1}{PSe} = \frac{1}{Pst} - \frac{1}{PSf}$$

Le coefficient de perméabilité endothéliale « Pe » est calculé en divisant « PSe » par la surface de la monocouche de cellules endothéliales. « Pe » s'exprime en « cm/min ».

	PSt	PSf	PSe	Pe (10^{-3} cm/min)	% de passage
Contrôle	1,42	12	1,61	0,38	-
DC_{BB} 0,5 μM	1,35	12	1,52	0,36	0 %
DC_{BN} 0,5 μM	1,42	12	1,61	0,38	0 %
DC_{BB} 1 μM	1,7	12	1,98	0,47	24 %
DC_{BN} 1 μM	1,37	12	1,55	0,37	0 %

2.3.2.2 Détermination de la toxicité

Outre le passage des molécules, il est important de vérifier que les molécules qui diffusent à travers la BHE ne sont pas toxiques pour les cellules jouxtant cette barrière.

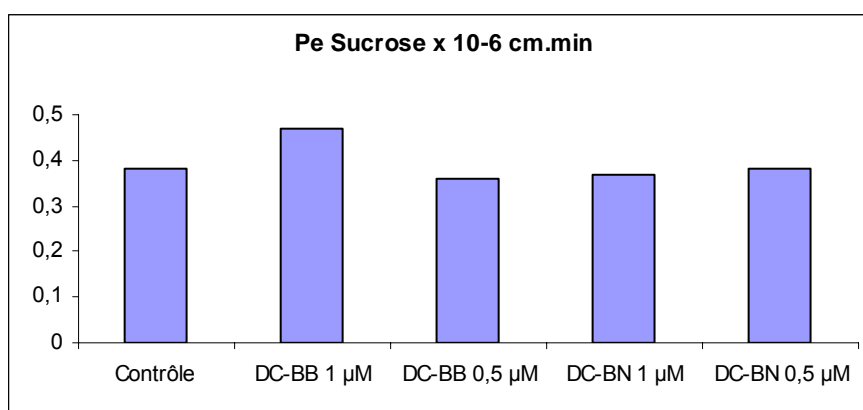
Les échantillons employés pour ces tests sont les deux phases DC_{BB} et DC_{BN} à deux concentrations : 0,5 et 1 μ M.

Cette expérience est réalisée en présence de la molécule à tester + [¹⁴C]-saccharose (marqueur d'intégrité). Les résultats obtenus sont comparés à la condition contrôle (saccharose seul).

La détermination de la toxicité se fait par la mesure de la clearance des molécules, c'est-à-dire la quantité de molécules passées à travers la monocouche par rapport à la quantité de molécules introduites.

Si $Pe > 1$, les molécules sont toxiques pour les cellules car elles sont capables d'ouvrir les jonctions serrées.

Si $Pe < 1$, il n'y a pas d'effet toxique des molécules testées.



2.3.2.3 Etude de la P-glycoprotéine (P-gp)

La protéine P-gp est présente dans les capillaires cérébraux qui forment la barrière hémato-encéphalique. Elle joue un rôle clé dans la restriction de l'entrée de drogues lipophiles dans le cerveau, et semble être responsable de l'extrusion des substances endogènes telles que les opioïdes. Dans le but de vérifier l'inhibition de la P-gp, des mesures sont réalisées en présence de polyphénols de vin de Champagne.

L'expérience est identique à celle de la toxicité, mais on étudie ici le passage d'un **substrat P-gp** ([³H]-vincristine (50 nM) dans notre étude) seul ou en présence d'une molécule **inhibitrice** de la P-gp (S9788 (1 µM), Vérapamil (25 µM)) que l'on compare avec l'effet des molécules testées (DC_{BB} et DC_{BN}) à 1 µM.

On mesure ici la quantité de vincristine expulsée en présence des molécules polyphénoliques de Champagne, et donc leur capacité à inhiber la P-gp. Si le Pe de la vincristine est inférieur à 2, les molécules ne sont pas capables d'inhiber la P-gp, par contre si le Pe de la vincristine est supérieur à 2, les molécules inhibent la P-gp.

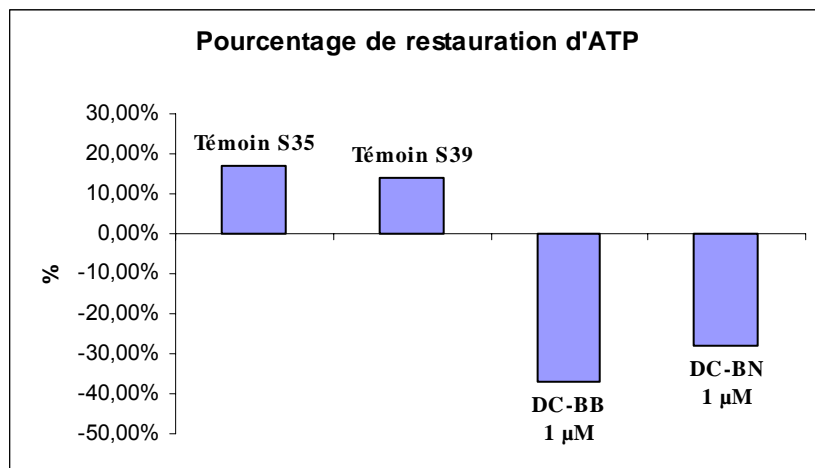
	Pe VCR x 10 ⁻³ cm/min
Contrôle Vincristine (VCR)	0,37
DC_{BB}	0,48
DC_{BN}	0,36

2.3.2.4 Etude de la restauration de la synthèse d'ATP après hypoxie

Comme nous l'avons vu précédemment, une des caractéristiques de l'hypoxie-réoxygénation est de favoriser l'apparition du stress oxydatif délétère pour les cellules. Ces modifications physiologiques agissent sur le métabolisme mitochondrial en faisant chuter leur capacité à synthétiser l'ATP.

Au cours de cette expérience, nous étudions la capacité des molécules actives du Champagne à restaurer cette synthèse d'ATP nécessaire à la survie des cellules ayant subies des dommages.

Le protocole employé pour l'étude de la restauration de la synthèse d'ATP est décrit au paragraphe 3.2.2. Les échantillons employés pour ces tests sont les deux phases DC_{BB} et DC_{BN} à la concentration de 1 µM.



Les témoins S35 et S39 sont des molécules antioxydantes des laboratoires SERVIER.

2.3.3 Conclusions

De cette étude ressort que les polyphénols issus de la phase DC_{BB} semblent passer librement la monocouche de cellules endothéliales. Cette perméabilité d'environ 20%, n'est cependant pas suffisante pour restaurer la synthèse d'ATP, et ceci pour des concentrations équivalentes à

1 μM . Pour ces mêmes concentrations, aucune toxicité et aucune inhibition de la P-gp n'a été mis en évidence.

Les polyphénols issus de la phase DC_{BN} quant à eux ne passent pas la monocouche de cellules endothéliales, et sont incapables de restaurer la synthèse d'ATP pour des concentrations de 1 μM . Pour ces mêmes concentrations aucune toxicité et aucune inhibition n'a été révélée.

Il apparaît donc que les résultats observés sur les cellules entières ne sont pas identiques à ceux obtenus sur les organites isolés. Cependant, ce modèle d'étude ne représente qu'une approche non complète de la réalité. En effet, il existe une autre approche consistant à vérifier ces résultats sur l'animal entier en dosant les molécules actives dans les tissus cérébraux. Néanmoins et étant donné la difficulté de ces manipulations, celles-ci n'ont pas été réalisées.

2.4 Effet protecteur des EVC sur un modèle cellulaire murin

2.4.1 Introduction

Ce travail a été effectué au laboratoire d'Endocrinologie Expérimentale, Héraklion, Crète.

Au cours de cette étude, nous avons utilisé la lignée cellulaire murine PC12. Cette lignée issue d'un phéochromocytome de rat possède les caractéristiques préalablement définies par Greene et Tischler [197] : synthèse de la tyrosine hydroxylase et différenciation induite par le facteur de croissance nerveux (NGF).

Afin de pouvoir observer l'effet protecteur des constituants du vin de Champagne, les cellules sontensemencées dans un milieu dépourvu de sérum. Ceci conduit les cellules en apoptose et nous permet d'observer l'influence de l'adjonction des phases organiques des vins de Champagne (DC_{BB} et DC_{BN}) aux concentrations évaluées lors de mesures effectuées sur les mitochondries de cerveau de rat.

Afin de mesurer l'effet protecteur des polyphénols de Champagne, des sondes fluorescentes sont ajoutées au milieu de culture avant la lecture au cytomètre de flux : la Rhodamine 123 et la Déhydrorhodamine.

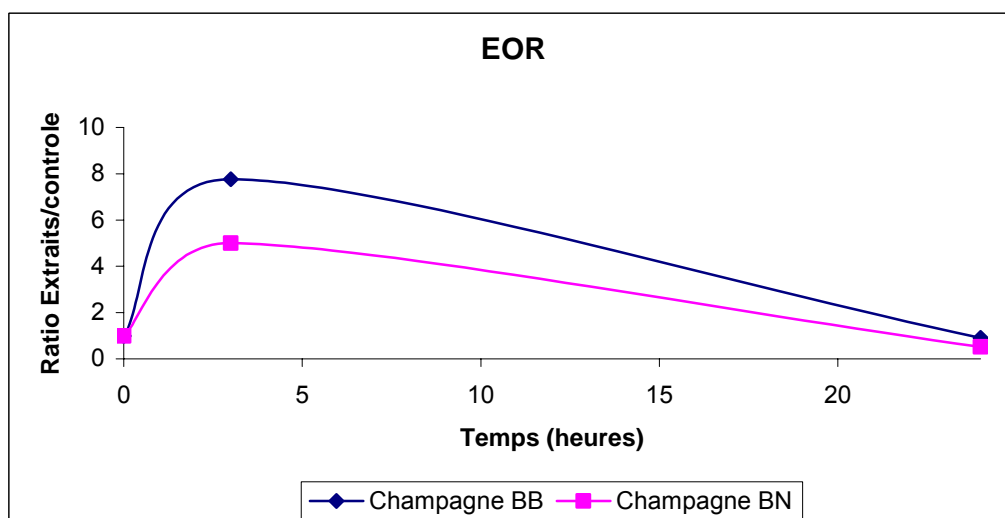
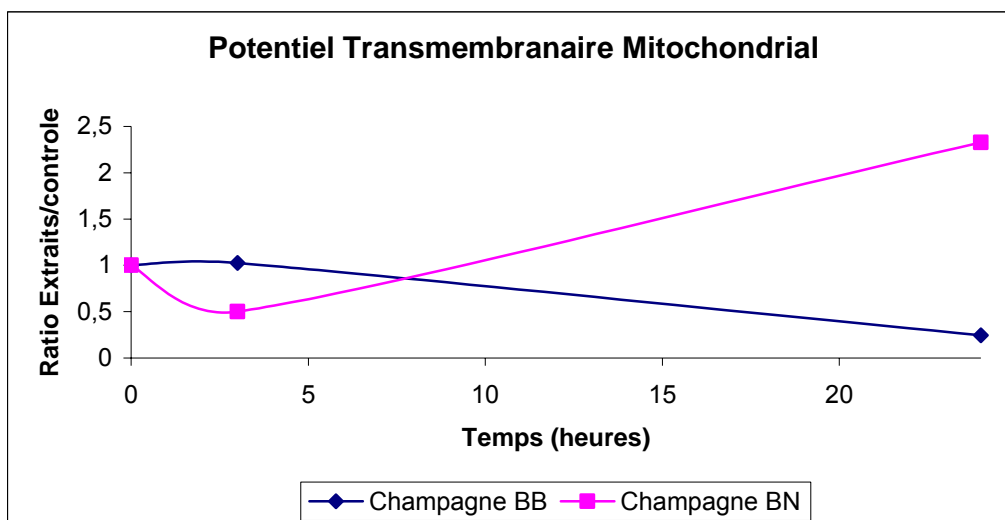
La Rhodamine 123 (R-123) est une sonde cationique lipophile dont les caractéristiques chimiques expliquent son mode d'action. L'incorporation de la sonde dépend principalement du potentiel de membrane (en raison de sa charge). Le potentiel interne de la mitochondrie étant 2 à 3 fois plus élevé que celui de la membrane plasmique, l'accumulation de la sonde est majoritairement mitochondriale. La sonde se fixe aussi dans une moindre mesure en fonction de sa solubilité dans la membrane interne de la mitochondrie et dans la matrice (la fixation

dépend aussi de la concentration en protéines). Cette fixation potentielle dépendante s'accompagne d'un quenching de fluorescence et d'un léger déplacement des spectres d'excitation et d'émission, ce phénomène est alors mis à profit pour effectuer des mesures quantitatives du **potentiel de membrane**.

La déhydro-rhodamine-123 (DHR-123), quant à elle, est une sonde qui peut pénétrer la membrane cellulaire. La DHR-123 est alors transformée en R-123 qui ne peut plus sortir de la cellule. L'interaction de cette sonde avec les **radicaux libres** permet alors de mesurer la quantité d'espèces oxygénées réactives par fluorescence.

Le protocole employé est décrit au paragraphe 3.3 de la partie expérimentale.

2.4.2 Résultats



2.4.3 Conclusion

Il apparaît très clairement que les Champagnes Blancs de Noirs sont capables de protéger les cellules PC12 en diminuant au cours du temps la quantité d'EOR et en maintenant le potentiel transmembranaire mitochondrial. Ces effets sont observables dès 3 heures d'incubation. En revanche, même si les Champagnes BB sont capables de décroître la quantité d'EOR, ceux-ci sont incapables de protéger les cellules PC12 de l'apoptose.

Ces résultats sont en accord avec ceux observés sur des mitochondries isolées de cerveau de rat, montrant un effet plus important des Champagnes BN vs BB.

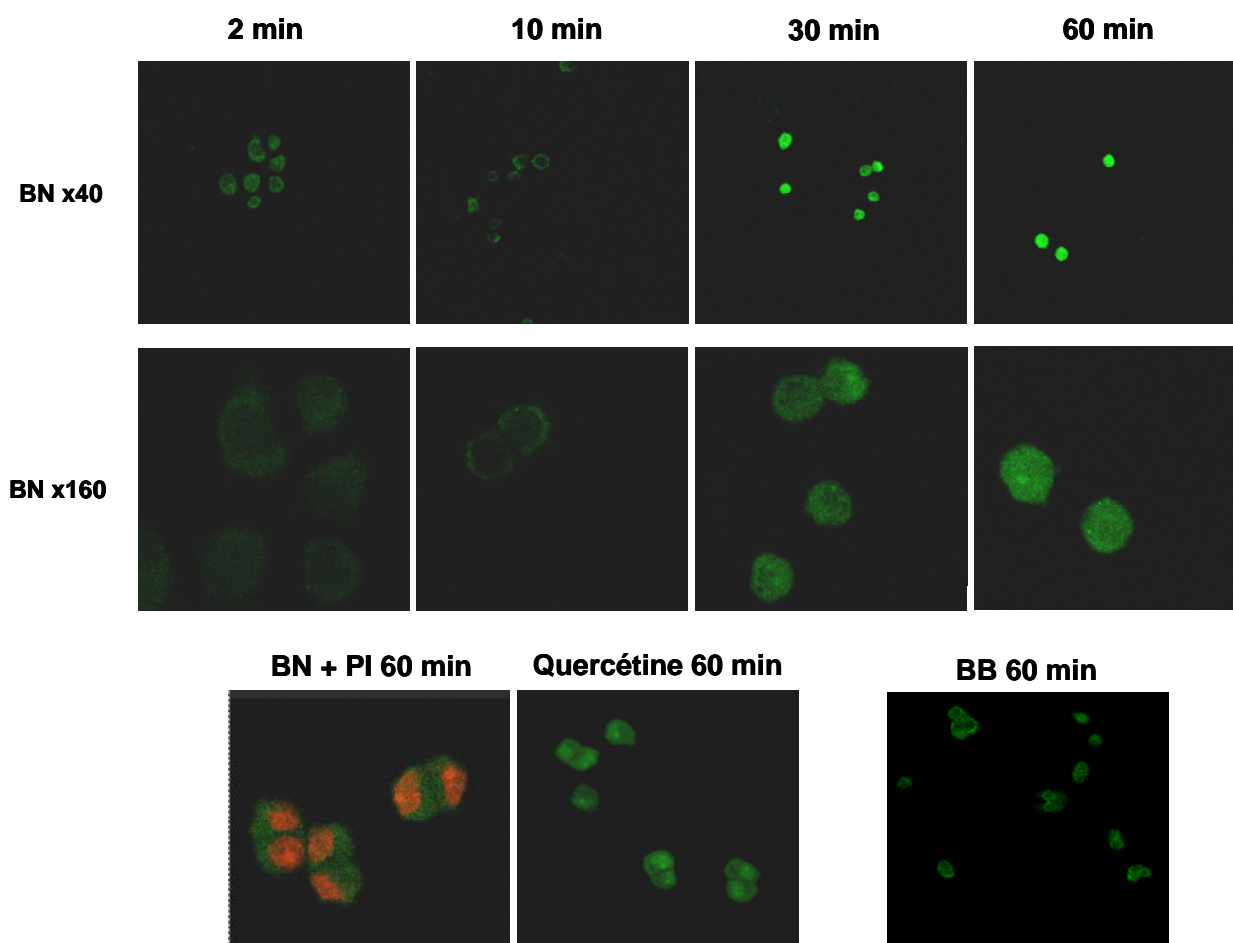
2.5 Internalisation des constituants du Champagne dans les cellules PC12

2.5.1 Introduction

Ces expérimentations ont été réalisées au laboratoire d'Endocrinologie expérimentale, Héraklion, Crète et ont pour but d'observer l'internalisation des constituants du vin de Champagne dans les cellules murines PC12. Pour ce faire, nous avons utilisé la fluorescence intrinsèque des molécules composant les fractions testées (DC_{BB} et DC_{BN}) afin de pouvoir observer une internalisation par microscopie confocale de fluorescence. Ces mesures ont été effectuées sur un microscope confocal LEICA TCS SP à différents temps d'incubation cellulaire. Le protocole employé pour ces mesures est décrit au paragraphe 3.4 de la partie expérimentale.

Afin de pouvoir distinguer l'internalisation des constituants dans le cytoplasme ou dans le noyau, nous avons employé de l'iodure de propidium (IP) se fixant sur l'ADN et l'ARN. Nous avons également utilisé la quercétine comme contrôle.

2.5.2 Résultats



2.5.3 Conclusion

Les images obtenues par microscopie confocale de fluorescence nous permettent d’observer une internalisation des constituants du vin de Champagne BN dès 2 minutes après l’adjonction des produits. L’internalisation est cytoplasmique et ne pénètre pas le noyau (visible sur la photo prise en présence d’IP) comme dans le cas de la quercétine. Pour les vins de Champagne BB, nous observons également une internalisation cytoplasmique, néanmoins celle-ci n’est visible qu’après 60 minutes de mise en contact des constituants.

2.6 *Activité des EVC dans le domaine du cancer*

2.6.1 Introduction

La préparation d’échantillons privés de sodium nécessaires aux tests sur les mitochondries de cerveau de rat, nous a conduit à l’obtention d’une phase aqueuse MilliQ venant s’ajouter aux deux premières phases extraites. Sur les trois phases représentant la totalité du vin de

Champagne, seulement deux ont pu être testées pour leur capacité à protéger la Barrière Hémato Encéphalique vis-à-vis du stress oxydatif.

En effet, il nous était impossible de priver la phase aqueuse initiale de ses minéraux. Nous n'avons pu tester que les extraits issus de la phase organique EVC-BB-AcOEt et EVC-BN-AcOEt. Néanmoins, il est important de pouvoir étudier **la totalité** du vin de Champagne.

Afin d'étudier les propriétés biologiques de la totalité des composés du champagne, nous avons décidé de tester les trois blocs obtenus par la méthode de purification à l'eau MilliQ : DA, DB et DC pour les Blancs de Blancs et les Blancs de Noirs, sur des lignées de cellules cancéreuses.

Pour se faire des études ont pu être menées en collaboration avec l'équipe du Pr. Jean François ROSSI à l'unité INSERM U475 de Montpellier.

2.6.2 Lignées cellulaires cancéreuses employées

Différentes lignées cellulaires cancéreuses hématopoïétiques ont été choisies pour tester l'effet des composés des vins de Champagne :

- U266 (myélome, autocrine IL-6)
- K562 (érythroleucémie)
- Jurkat (Lymphome T)
- Raji (Lymphome B, syndrome de Burkitt)
- THP1 (monocyte)

Parmi ces lignées, nous en avons retenu une sur laquelle l'ensemble des tests de screening en présence des trois phases extraites des Vins de Champagne ont été réalisés : la lignée U266.

Les viabilités cellulaires sont analysées par cytométrie de flux en présence d'un marqueur fluorescent : l'iodure de propidium.

2.6.3 Généralités : Principe de fonctionnement de la cytométrie en flux

C'est une technologie qui permet la mesure simultanée de plusieurs caractéristiques physiques d'une cellule :

- Sa taille relative (Foward Scatter : FSC)
- Sa granularité ou sa complexité interne relative (Side Scatter : SSC)

- Son intensité relative de fluorescence.

La cytométrie en flux (CMF) est définie comme l'étude précise de *cellules isolées* entraînées par *un flux liquide*. C'est une technique de caractérisation individuelle, quantitative et qualitative de particules en suspension dans un liquide.

Elle consiste à analyser les *signaux optiques ou physiques* émis par une particule coupant le faisceau lumineux d'un laser ou d'une lampe à arc. Les signaux mesurés sont essentiellement relatifs :

- Aux propriétés optiques intrinsèques des particules qui correspondent aux phénomènes de *diffusion lumineuse* liés aux dimensions de la particule, à leur structure interne, ou à l'auto fluorescence de certaines cellules comme les végétaux, le phytoplancton...
- Aux propriétés optiques induites de *fluorescence* obtenues par des marquages spécifiques de structures ou de fonctions cellulaires.

Ces signaux séparés par des *filtres optiques* sont collectés par des photomultiplicateurs, amplifiés, numérisés, traités et stockés par un ordinateur.

Ce procédé d'analyse individuelle (cellule par cellule) est multiparamétrique et peut s'effectuer à une vitesse de plusieurs milliers d'évènements par seconde. L'ordinateur calcule les données statistiques associées aux distributions des paramètres mesurés et les représente sous la forme d'*histogrammes* (1 paramètre) ou de *cytogrammes* (2 paramètres) sur une ou plusieurs populations dont les propriétés cellulaires sont ainsi évaluées.

Principale application de la CMF :

L'hématologie a été l'une des premières disciplines médicales à bénéficier des applications clinique de la CMF. Certaines de ces applications sont maintenant utilisées régulièrement pour le diagnostic ou le suivi thérapeutique de différentes affections. Ces applications concernent aussi bien l'étude fonctionnelle de cellules saines que la mise en évidence du caractère pathologique des cellules analysées.

2.6.4 Viabilité cellulaire en présence des EVC

2.6.4.1 Introduction

Afin de mesurer l'activité cytostatique et cytotoxique potentielle de nos extraits, nous soumettons la lignée cellulaire U266 à différentes concentrations en molécule de Champagne issues respectivement des trois phases extraites des BB et BN : DA, DB et DC

Le protocole employé pour cette étude est décrit en partie expérimentale paragraphe 3.5 p162. Les résultats sont exprimés ici en pourcentage de mort cellulaire, visible par cytométrie de flux en présence d'iodure de propidium au quatrième jour de culture.

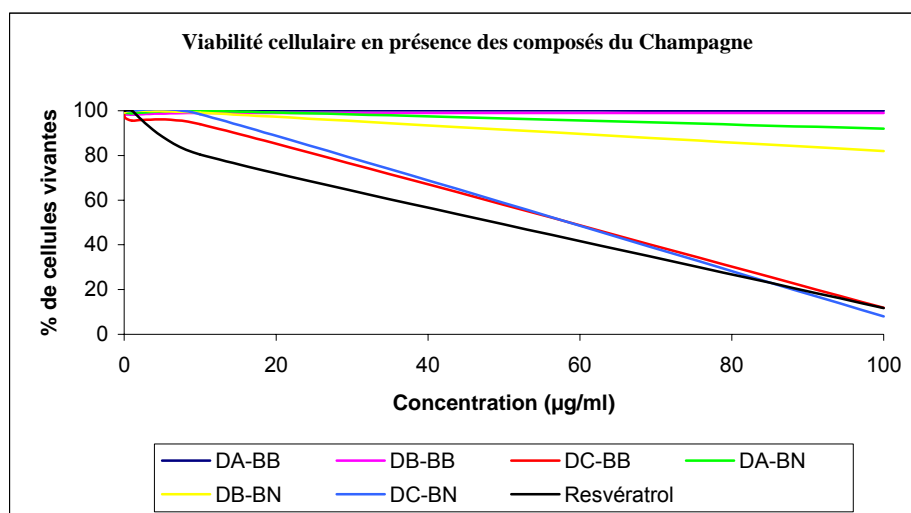
Le contrôle est effectué sur des cellules seules et sur des cellules en présence d'une molécule connue pour ses effets cytotoxiques sur les cellules cancéreuses : le resvératrol.

Afin de vérifier que l'adjonction d'éthanol prévu par le protocole expérimental ne provoque pas de mort cellulaire surnuméraire, celui-ci est testé en contrôle positif aux différentes concentrations prévues.

2.6.4.2 Résultats

Chaque mesure est effectuée en triplicat (écart type < 15%)

Les résultats représentés dans le graphique suivant sont donnés avec les contrôles éthanol déduit.



2.6.4.3 Conclusion

De cette étude ressort que seules les phases issues des extraits acétate d'éthyle des vins de Champagne BB et BN (DC_{BB} et DC_{BN}) possèdent une activité sur les lignées cancéreuses U266. Ces deux phases encore en mélange possèdent une activité quasi-similaire au resvératrol.

Bien que les extraits aqueux n'aient pas d'activité intéressante, nous pouvons tout de même observer que les extraits MilliQ provenant des vins BN (DB_{BN}) possèdent une meilleure réponse que les BB (20% d'activité contre 0% respectivement).

Désormais, nous utiliserons seulement les phases organiques issues des vins BB et BN (DC_{BB} et DC_{BN}) pour les tests ultérieurs.

2.6.5 Détermination de la DL_{50} des phases organiques

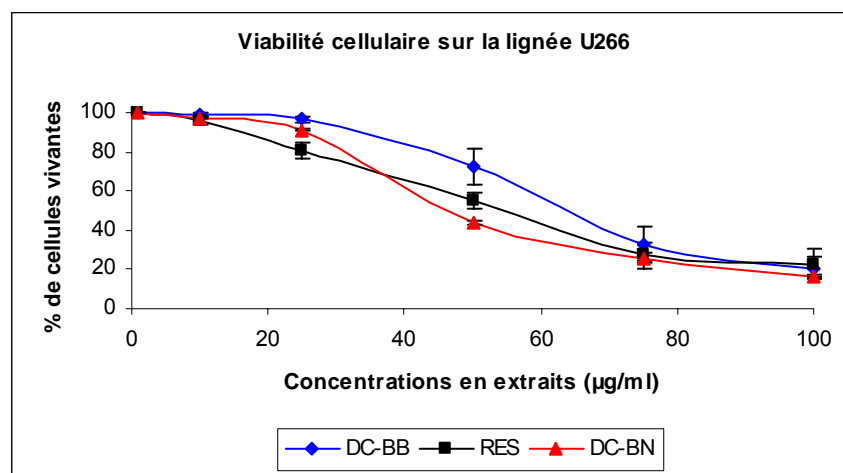
2.6.5.1 Introduction

L'intérêt des résultats obtenus dans la première phase de notre étude, nous a conduit à une mesure dose-réponse nous permettant de déterminer avec exactitude la valeur pour laquelle nous obtenons 50% de l'effet sur la viabilité cellulaire des lignées cancéreuses U266 (DL_{50}).

Les étapes de préparation des cellules sont identiques à celles effectuées précédemment et décrite au paragraphe 3.5. Seules les concentrations sont différentes et sont comprises entre 10 et 100 $\mu\text{g/ml}$ pour encadrer le DL_{50} .

Ces expériences ont été réalisées cinq fois de façon à nous donner une moyenne et un écart type (écart type < 18%).

2.6.5.2 Résultats



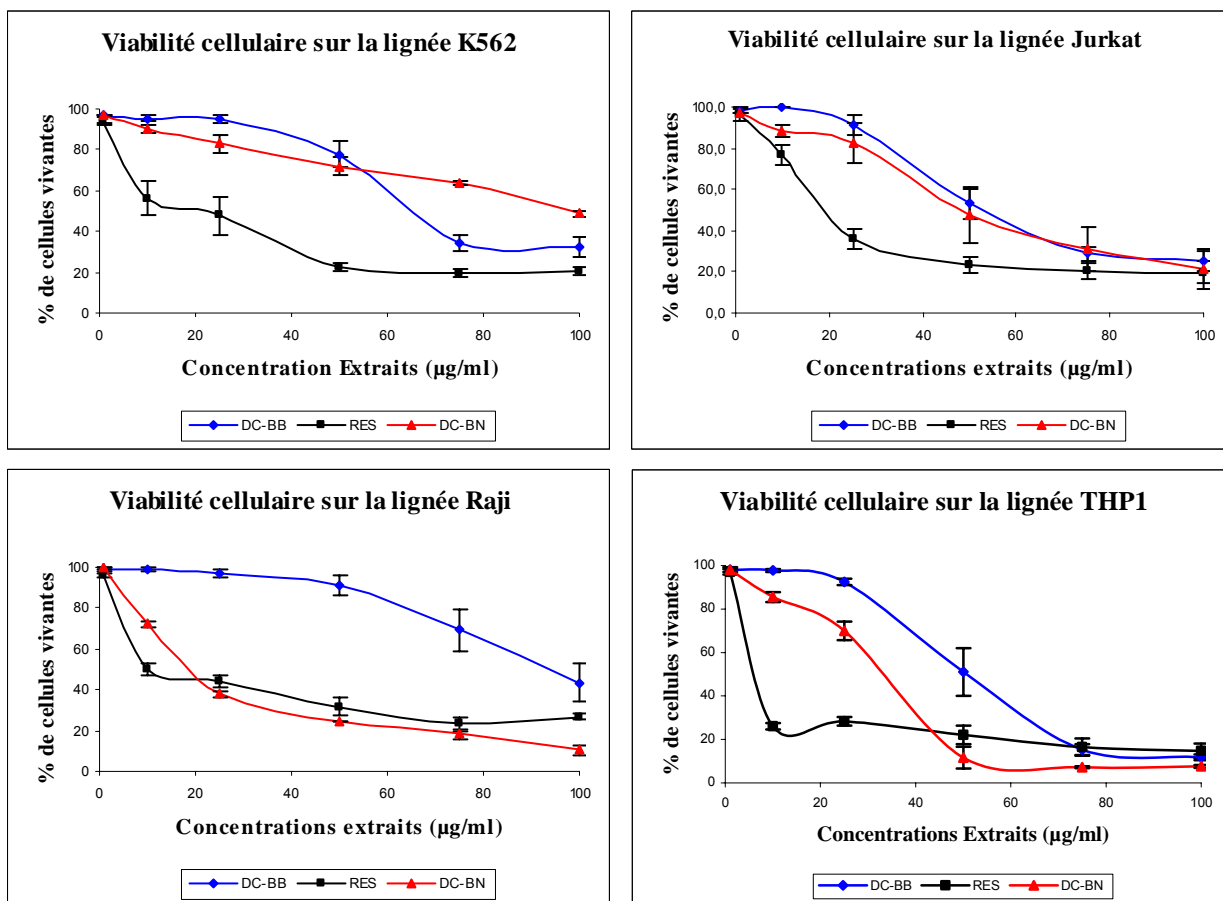
	DC_{BB}	DC_{BN}	Resvératrol
DL_{50}	64 $\mu\text{g/ml}$	46 $\mu\text{g/ml}$	54 $\mu\text{g/ml}$

2.6.5.3 Conclusion

Il apparaît ici que les extraits acétate d'éthyle issus des vins Blancs de Noirs possèdent une activité supérieure à celle des vins Blancs de Blancs. On peut également observer que les

extraits de vins Blancs de Noirs possèdent une meilleure activité que le resvératrol pur, bien que la fraction soit encore en mélange..

2.6.6 Action des phases organiques de Champagne sur d'autres lignées cellulaires



	DC _{BB}	DC _{BN}	Resvératrol
K562	61,8 µg/ml	98 µg/ml	20,6 µg/ml
Jurkat	53,2 µg/ml	48,3 µg/ml	19,8 µg/ml
Raji	93,6 µg/ml	19,7 µg/ml	10,5 µg/ml
THP1	50,7 µg/ml	33,5 µg/ml	6,6 µg/ml

Tableau 13: DL₅₀ des phases organiques de Champagne sur diverses lignées cellulaires

2.6.7 Étude de la prolifération cellulaire

La prolifération cellulaire a été étudiée selon le protocole décrit au paragraphe 3.5.1.

Le tableau suivant résume les IC₅₀ prolifération des différentes lignées cellulaires cancéreuses en fonction de la phase organique de Champagne utilisée. Les résultats sont donnés en µg/ml.

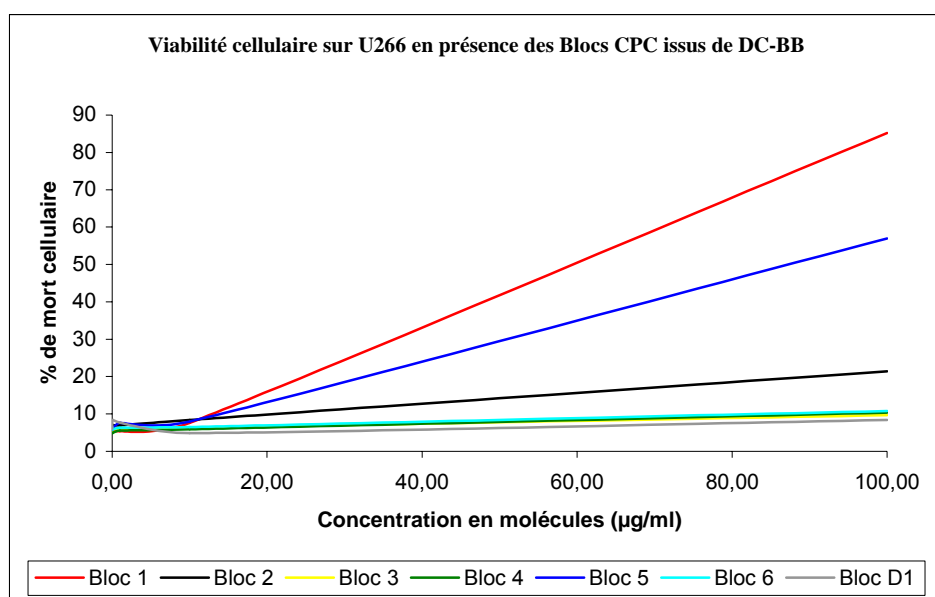
	DC_{BB}	DC_{BN}	Resvératrol
U266	18,5	8,5	10,6
K562	25,3	11,5	nd
Jurkat	13,7	4,8	nd
Raji	12,7	5,8	nd
THP1	17,8	14,1	nd

2.6.8 Etude des blocs séparés par CPC sur la viabilité de cellules cancéreuses

Au même titre que les études menées sur les mitochondries isolées de cerveau de rat, nous avons étudié l'action des fractions issues de la séparation CPC sur la lignée cellulaire cancéreuse U266. Le protocole employé pour ces études est le même que celui utilisé précédemment (Cf. paragraphe 3.5).

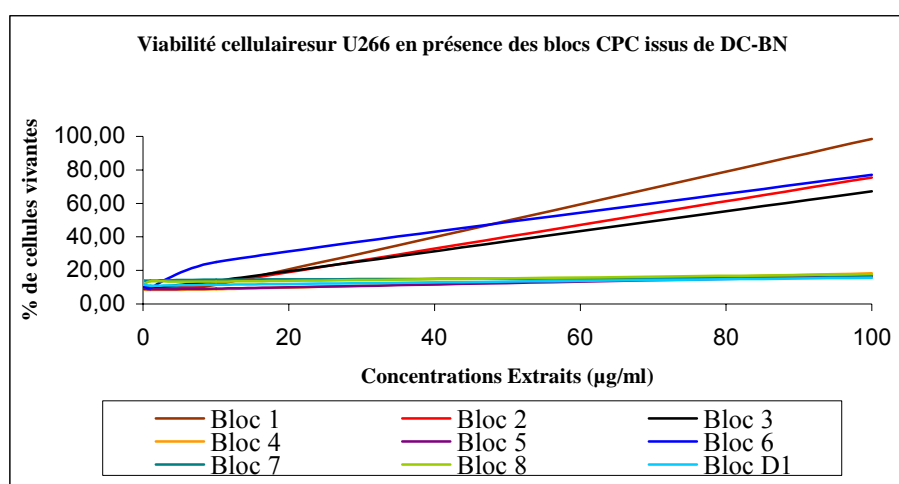
2.6.8.1 Blocs issus de la séparation de la phase DC_{BB}

	0,01 µg/ml	0,1 µg/ml	1 µg/ml	10 µg/ml	100 µg/ml
DC_{BB}-Bloc1	5,73 %	5,48 %	5,43 %	7,61 %	85,22 %
DC _{BB} -Bloc 2	5,61 %	7,02 %	6,93 %	8,36 %	21,39 %
DC _{BB} -Bloc 3	5,26 %	5,92 %	5,86 %	6,24 %	9,65 %
DC _{BB} -Bloc 4	4,78 %	5 %	5,54 %	5,94 %	10,32 %
DC_{BB}-Bloc 5	6,59 %	5,93 %	7,61 %	7,96 %	56,93 %
DC _{BB} -Bloc 6	6,55 %	5,88 %	6,34 %	6,55 %	10,76 %
DC _{BB} -Bloc D1	6,11 %	8,38 %	7,71 %	4,88 %	8,36 %



2.6.8.2 Blocs issus de la séparation de la phase DC_{BN}

	0,01 µg/ml	0,1 µg/ml	1 µg/ml	10 µg/ml	100 µg/ml
DC_{BN}-Bloc 1	9,12 %	9,76 %	10,69 %	11,45 %	98,41 %
DC_{BN}-Bloc 2	9,71 %	9,88 %	10,35 %	12,16 %	75,46 %
DC_{BN}-Bloc 3	9,59 %	9,64 %	9,95 %	13,82 %	67,27 %
DC _{BN} -Bloc 4	8,82 %	8,58 %	8,32 %	8,84 %	18,39 %
DC _{BN} -Bloc 5	8,76 %	8,98 %	8,74 %	9,14 %	16,66 %
DC_{BN}-Bloc 6	11,14 %	10,61 %	9,62 %	24,92 %	77,10 %
DC _{BN} -Bloc 7	12,96 %	13,88 %	13,86 %	14,44 %	15,82 %
DC _{BN} -Bloc 8	12,25 %	11,46 %	13,64 %	13,41 %	17,82 %
DC _{BN} -Bloc D1	14,05 %	11,63 %	10,91 %	11,49 %	15,62 %

2.6.9 Conclusion

Au cours de ces expérimentations, nous avons pu observer que seules les phases organiques DC_{BB} et DC_{BN} possédaient une action sur les lignées cellulaires cancéreuses. De plus, dans le cas de la fraction issue des Champagnes BN, nous avons noté une action supérieure à celle du resvératrol. La séparation des fractions concernées nous a conduit à l'obtention de 2 blocs dans le cas des BB, et de 4 blocs dans le cas des BN, possédant à leur tour les mêmes activités.

L'étude de la prolifération cellulaire de ces mêmes lignées en présence des fractions de Champagne, nous a permis d'observer que les IC₅₀ mesurés sont inférieurs à ceux de la cytotoxicité.

2.7 Inhibition de l'acétylcholinestérase par les EVC

2.7.1 Introduction

Cette technique ajoute une mesure supplémentaire aux tests d'activité biologique déjà menés. L'acétylcholinestérase est une enzyme qui intervient au niveau des synapses neuronales. Elle clive la liaison ester du neuromédiateur et libère ainsi de la choline de l'acide acétique. Dans la maladie d'Alzheimer, cette enzyme est surexprimée, provoquant ainsi une diminution importante de l'acétylcholine. Aujourd'hui, la recherche active d'inhibiteurs de cette enzyme est de plus en plus sollicitée.

2.7.2 Inhibition de l'AChE par les EVC

Le protocole employé pour cette mesure est décrit au paragraphe 3.6

Quand la présence d'inhibiteur est détectée, celle-ci se manifeste par une absence de coloration (taches blanches sur les plaques de chromatographie).

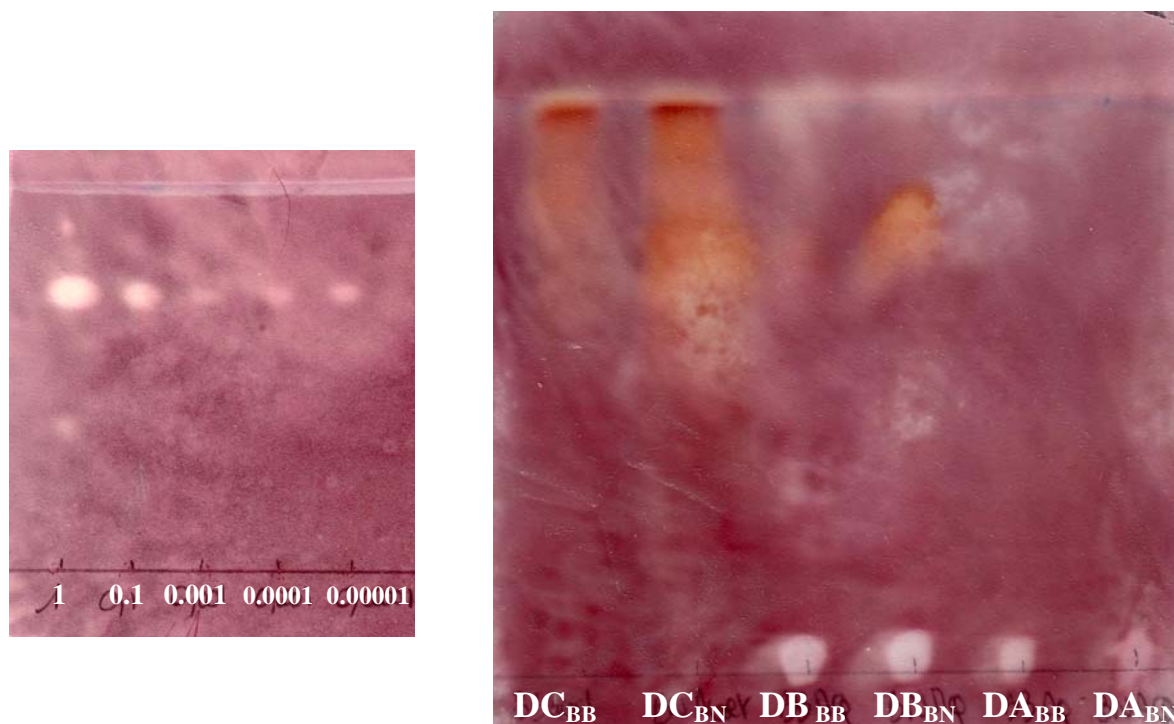
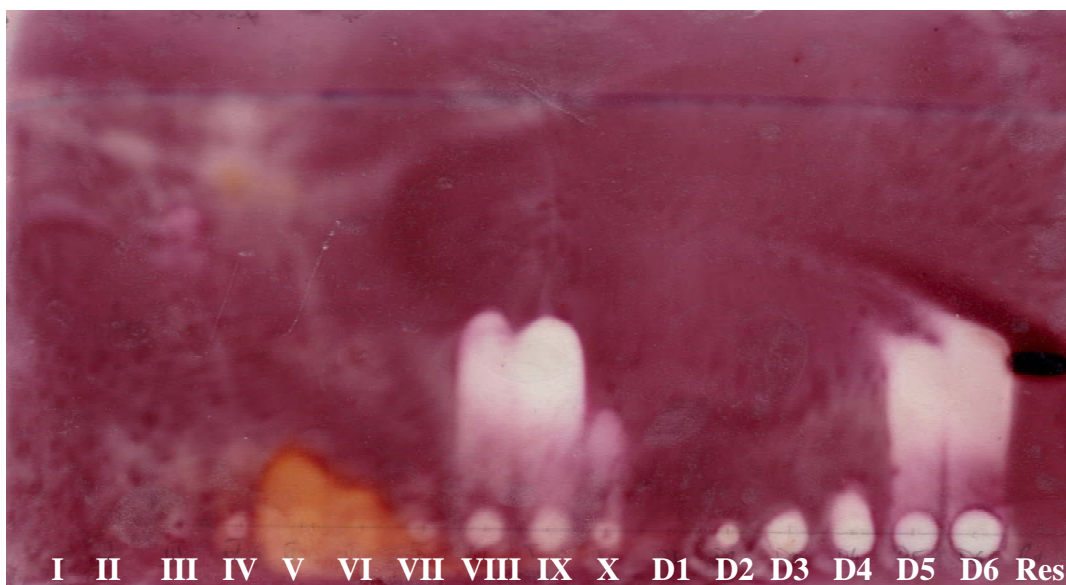


Figure 33: Inhibition de l'acétylcholinestérase en présence des EVC (droite) et contrôle en présence d'ésérine (gauche).

2.7.3 Inhibition de l'AChE par les blocs séparés par CPC

2.7.3.1 *Inhibition de l'AChE par la phase DB_{BB}*



2.7.3.2 *Inhibition de l'AChE par la phase DB_{BN}*



2.7.4 Conclusion

Contrairement à tout ce que nous avons pu observer jusqu'à présent, ici ce ne sont pas les phases organiques qui possèdent une activité biologique, mais les phases aqueuses. En effet ces dernières renferment de potentiels inhibiteurs de l'acétylcholinestérase, visualisables par l'absence de coloration pourpre sur les plaques de chromatographie. La coloration jaune orange qui apparaît en front de solvant pour les phases organiques peut correspondre à une

interaction entre des fonctions phénoliques et le sel de Fast Blue B formant un complexe stable.

Selon la publication de Marston et coll.[198], cette coloration peut être également due à la présence d'alcaloïdes.

Bien que la présence d'inhibiteur soit décelée, rien ne nous permet d'affirmer que cette dernière est due à des polyphénols, il peut très bien s'agir d'acides organiques présents dans ces phases aqueuses.

2.8 Potentiel Antioxydant des molécules des vins de Champagnes

Afin de pouvoir vérifier et tenter de corréler les propriétés biologiques observées à des propriétés antioxydantes, ou de chélateur de radicaux libres, des tests de mesure du pouvoir antioxydant ont été réalisés.

2.8.1 Les tests de mesure employés

Pour effectuer ces expériences, nous avons employé trois tests de mesures différents : le DPPH, le TAS et le TAC.

2.8.1.1 Mesure du pouvoir antioxydant par la méthode DPPH

Le test DPPH (1,1-diphényl-2-picryl-hydrazyle) permet de mesurer le pouvoir réducteur et de calculer l'IC₅₀ de substances antioxydantes contenues dans un extrait.

Lorsque le DPPH réagit avec un composé antioxydant, celui-ci lui cède un hydrogène, réduisant ainsi le DPPH [199] (cf Figure 34).

Le protocole employé pour cette mesure est décrit au paragraphe 3.7.1.

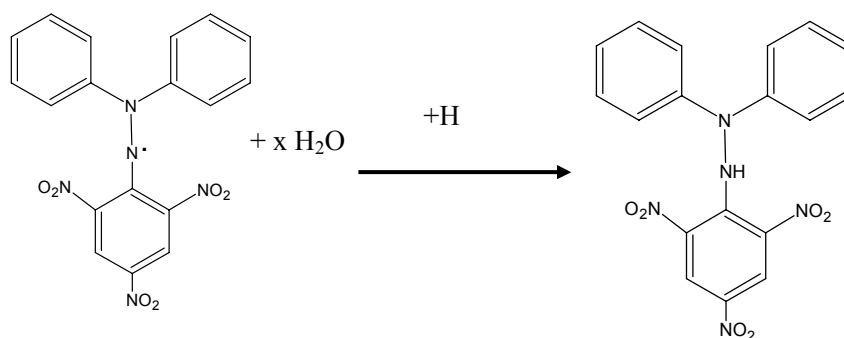


Figure 34: Principe du test DPPH

2.8.1.2 Mesure du pouvoir antioxydant par la méthode TAS

Le test TAS ou « Total Antioxydant Status » repose sur une réaction colorimétrique.

L'ABTS (2,2-Azino-di-[3-éthylbenzthiazoline sulphonate]) est incubé avec une peroxydase (metmyoglobine) et H₂O₂ pour donner un radical cationique ABTS*⁺. Celui-ci a une couleur bleu vert relativement stable, qui est mesurée à 600 nm. Ce test se présente sous la forme d'un Kit T.A.S. (Radox[®], Mauguio) Les antioxydants présents dans l'échantillon induisent une diminution de la production de couleur proportionnellement à leur concentration.

Le protocole employé pour cette mesure est décrit au paragraphe 3.7.2.

2.8.1.3 Mesure du pouvoir antioxydant par la méthode TAC

Le test TAC ou « Total Antioxydant Capacity » repose sur deux réactions concurrentes entre un donneur de radicaux peroxyde, ABAP par exemple (ABAP : 2,2'-Azobis-(2-amidinopropane) dihydrochloride) qui décolore la crocine en l'oxydant, et d'éventuels antioxydants présents dans l'échantillon, (les polyphénols) qui sont oxydés à sa place et qui inhibent la décoloration de la crocine [200].

Ce test se présente sous la forme d'un Kit TAC (Hellas Medicon, Gerakas, Grèce)

Le protocole manuel employé pour cette mesure est décrit au paragraphe 3.8.1.1 de la partie expérimentale.

2.8.2 Résultats

	DPPH (IC ₅₀ μM)	TAS (mM)	TAC (mM)
DC _{BB}	194	1,13.10 ⁻³	2,10.10 ⁻³
DC _{BN}	85	1,62.10 ⁻³	2,01.10 ⁻³
DB _{BB}	> 2000	0	2,61.10 ⁻³
DB _{BN}	1150	0	2,58.10 ⁻³
DA _{BB}	> 2000	1,46.10 ⁻³	2,76.10 ⁻³
DA _{BN}	> 2000	1,44.10 ⁻⁴	2,87.10 ⁻³
Acide gallique	5	1,59.10 ⁻³	2,14.10 ⁻³

2.8.3 Conclusion

Il demeure très difficile d'établir une corrélation entre les différents tests antioxydants utilisés. Néanmoins, les tests DPPH et TAC possèdent des variations similaires nous permettant de confirmer les potentiels antioxydants des phases organiques.

Bien que les résultats de tests antioxydants varient dans le même sens, il nous est impossible de déterminer la participation de ces phénomènes dans les propriétés biologiques observées.

Concernant les phases aqueuses, ces dernières possèdent un potentiel antioxydant relativement faible. Il semblerait donc que les résultats observés sur l'inhibition de l'AChE ne puissent être imputés à la présence d'antioxydants.

2.9 Etude de la capacité oxydante totale plasmatique

2.9.1 Introduction

L'épidémiologie a observé qu'une consommation modérée et raisonnée de vin au cours des repas est un facteur de réduction du risque de mortalité par accident cardio-vasculaire. Il est aujourd'hui difficile de faire le lien entre ces constatations épidémiologiques confirmées et les propriétés biologiques observées *in vitro*. L'utilisation de tests simples telle que la mesure de la capacité oxydante totale (TOC ou Total Oxidant Capacity) ou de la capacité antioxydante totale (TAC) du plasma après une ingestion modérée de vin de champagne contenant des molécules originales permettrait de valider l'existence d'une biodisponibilité de ces molécules et de proposer une piste de recherche complémentaire dans ce domaine.

Cette étude se propose donc de vérifier chez des sujets sains, si l'ingestion de 2 coupes de champagne correspondant à une quantité très faible de substances polyphénoliques (démontrées actives *in vitro*), induit ou non les effets biologiques *in vivo*. Cette étude sera objectivée par la mesure des variations de la capacité oxydante ou antioxydante totale du plasma, qu'on interprétera alors comme la conséquence d'une biodisponibilité globale des molécules d'intérêt du Champagne. Cela nous permettrait d'envisager la capacité du Champagne, combiné à une alimentation « de qualité », à contribuer aux effets positifs sur la santé constatés par les études épidémiologiques en situation normale.

2.9.2 Schéma d'organisation du protocole

Dix volontaires de la région de Héraklion en Crète (3 hommes et 7 femmes) participent à cette étude. Pour la première expérience, les volontaires sont divisés en deux groupes (5 personnes par groupe) qui consommeront chacun 250 ml (deux coupes) de Champagne "Blanc de blancs" ou de Champagne "Blanc de noirs" respectivement. Aux temps 0, 30, 60 and 120 minutes après ingestion, des prélèvements sanguins seront effectués pour la détermination du TOC et du TAC (Figure 35). Les examens biochimiques standards (NFS, glycémie,

Cholestérol, LDL, HDL, bilirubine, acide urique, albumine, TG) sont effectués au temps T0 afin de s'assurer de l'état de bonne santé des patients.

Deux jours après le premier essai, les mêmes individus se voient donner un volume équivalent (250 ml) d'éthanol absolu dilué dans une eau gazeuse (Perrier, 12% v/v). Les mêmes paramètres que précédemment sont alors mesurés. Cette deuxième mesure nous permet d'obtenir des informations sur les effets de l'éthanol, et ainsi d'évaluer l'effet « net » des microconstituants du Champagne sur les paramètres étudiés.

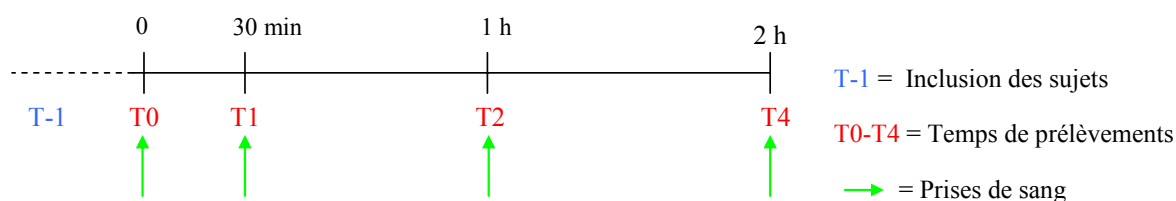


Figure 35: Schéma du protocole d'essai *in vivo*

2.9.3 Principe de la mesure du TOC

Le TOC ou Total Oxidant Capacity reflète l'état oxydant du plasma des sujets. Ce test, simple d'utilisation, repose sur l'oxydation d'un substrat, le 3,3',5,5' tétraméthyl benzidine ou TMB, couplé à la peroxydase (HRP) par les espèces oxydantes plasmatiques. L'avantage de ce système est que l'oxydation est stable à pH acide. L'oxydation du TMB conduit alors à un dication (imine) de couleur jaune et observable à 450 nm par spectrométrie UV (Figure 36).

Le protocole employé pour la mesure du TOC est décrit au paragraphe 3.8 de la partie expérimentale.

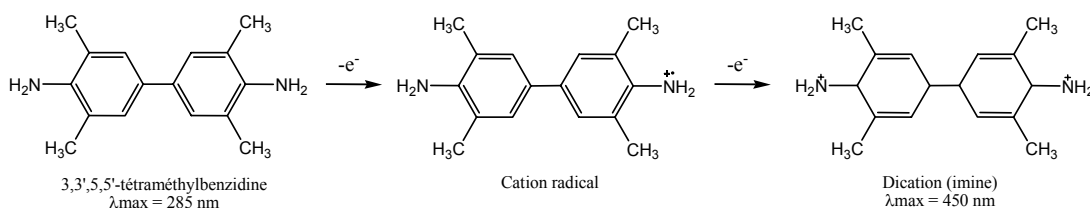


Figure 36: Oxydation du TMB

2.9.4 Mesure du TAC et du cTAC plasmatique

Des preuves récentes suggèrent que les antioxydants alimentaires, inhibent le développement de maladies telles que les maladies cardiovasculaires et certains cancers. Le plasma et les autres fluides biologiques possèdent leurs propres molécules antioxydantes. Ces molécules piègent les espèces radicalaires libres pour prévenir ou ralentir les dommages causés par le

stress oxydant sur d'importantes macromolécules. La majorité des antioxydants naturels sont des antioxydants endogènes, tels que la bilirubine, l'acide urique, ou les protéines thiols, néanmoins, une bonne parties de ces antioxydants proviennent de l'alimentation (Vitamines C et E, stilbènes, flavonoïdes, acides phénol) [201, 202].

Étant donné la présence d'analytes plasmatiques possédant des propriétés antioxydantes et interférant avec la mesure du TAC (voir le principe de fonctionnement au paragraphe 2.8.1.3), il a été proposé récemment le calcul du TAC corrigé noté cTAC [201, 202].

Le cTAC est obtenu par soustraction des antioxydants endogènes selon la formule suivante : $cTAC = TAC - (0.11 \times \text{acide urique} + 0.14 \times \text{bilirubine} + 0.01 \times \text{albumine})$. Les valeurs obtenues pour le TAC et le cTAC sont alors exprimées en mmol/L d'équivalent Trolox.

La méthode employée pour la mesure du TAC sur automates est décrite au paragraphe 3.8.1.2 de la partie expérimentale.

2.9.5 Résultats

2.9.5.1 Données hématologiques et biochimiques des volontaires

Comme nous pouvons le constater dans le Tableau 14, le groupe des dix volontaires ne présente aucune anomalie biochimique ou hématologique. De plus, les paramètres étudiés ne montrent aucune variation en fonction du sexe, exception faite et comme attendu pour les globules rouges en plus faible quantité chez la femme. Les fonctions hépatiques sont également normales, suggérant un bon métabolisme de l'alcool.

	1 ^{ère} expérience	2 ^{ème} expérience	Valeurs normales
Glucose	80,5 ± 8,66	83,89 ± 8,59	70-115 mg/dL
SGOT/AST	19,2 ± 6,78	16,00 ± 2	5-40 IU/L
SGPT/ALT	16,5 ± 7,63	14,00 ± 6,80	5-40 IU/L
Bilirubine Totale	0,637 ± 0,19	0,53 ± 0,19	0,1-1,3 mg/dL
Bilirubine Directe	0,109 ± 0,05	0,11 ± 0,04	0,01-0,4 mg/dL
Bilirubine Indirecte	0,528 ± 0,17	0,41 ± 0,15	-
Cholestérol Total	194,1 ± 30,19	194,11 ± 24,56	< 200 mg/dL
HDL-Cholestérol	55,3 ± 8,22	56,78 ± 7,29	> 35 mg/dL
LDL-Cholestérol	129 ± 46,85	129,11 ± 46,79	< 130 mg/dL
Triglycérides	102,5 ± 28,81	105,00 ± 31,22	40-160 mg/dL
Albumine	4,75 ± 0,23	4,70 ± 0,19	3,5 - 5 g/dL
Acide Urique	4,08 ± 1,18	4,14 ± 0,98	3 - 7 mg/dL
Globules rouges	4,84 ± 0,55	4,71 ± 0,45	4,2 - 6,3 M/ μ L
Hématocrite	41,61 ± 5,59	40,41 ± 4,15	37 - 51 %
Lymphocytes	2,88 ± 1,19	2,86 ± 1,13	0,6 - 4,1

Tableau 14: Données hématologiques et biochimiques des volontaires

2.9.1.1 Mesure de la capacité oxydante totale plasmatique (TOC)

La méthode employée pour la mesure de la capacité oxydante totale plasmatique dans le sérum est robuste, présentant un coefficient de variation inter-essai de 6,3% et intra-essai de 3,2%. Cette mesure peut être effectuée aussi bien dans le sérum que dans le plasma, et sa courbe de calibration est linéaire pour des concentrations comprises entre 0 et 1 mmol/L H₂O₂. (Figure 44 p166)

La consommation d'éthanol ne modifie pas significativement les valeurs du TOC obtenues à partir du sérum des volontaires. Seule une légère diminution (5 %, non significative) a pu être observée à 30 minutes, retournant ensuite à la valeur initiale (graphe non montré).

Une consommation de Champagne au contraire diminue significativement les valeurs du TOC, et ceci dépendamment de la variété. En effet, une consommation de Champagne BB induit 2 heures après l'ingestion, une diminution significative ($p < 0,05$) des valeurs du TOC (Figure 37). Une consommation de Champagne BN provoque quant à elle une importante diminution du TOC (50 %) dès 30 minutes après l'ingestion, et persiste jusqu'à la fin de l'essai (Figure 37).

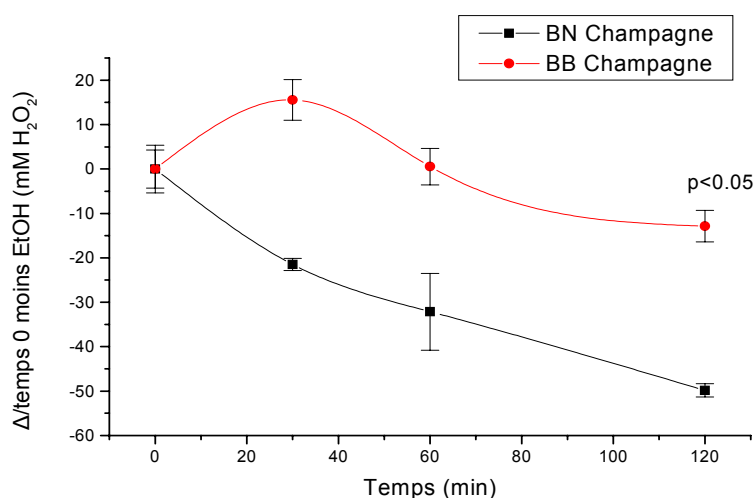


Figure 37: Modification du TOC après ingestion de Champagne

2.9.1.2 Mesure de la capacité antioxydante totale plasmatique (TAC)

Une consommation d'éthanol ne modifie pas significativement les valeurs du TAC obtenues à partir du sérum des volontaires.

Cependant, une consommation de Champagne modifie les valeurs du TAC et du cTAC, et ceci de manière significative ($p < 0,05$) à 120 minutes après l'ingestion.

La Figure 38 présente l'effet net du Champagne sur la mesure du cTAC (différence normalisée entre le contrôle à T0 et les valeurs obtenues à chaque temps de prélèvement, après élimination de l'effet de l'alcool). Aucune différence significative entre les deux variétés de Champagne n'est observée comme dans le cadre de la mesure du TOC.

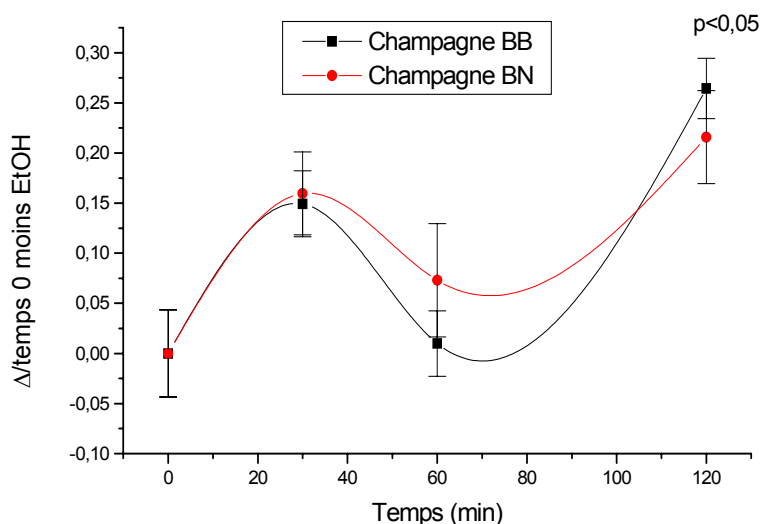


Figure 38: Modification du cTAC après ingestion de Champagne

2.9.6 Conclusion

Il apparaît très clairement que l'absorption de 2 coupes de Champagne en aigu diminue de façon significative la capacité oxydante totale du plasma. Cette décroissance est particulièrement visible pour les Champagnes BN dès 30 minutes suivant l'ingestion. Pour les Champagnes BB, celle-ci ne devient significative que 2 heures après l'ingestion.

Les résultats obtenus pour la mesure du TOC sont corrélés à une augmentation de la capacité antioxydante plasmatique (cTAC). Cependant dans le cadre de la mesure du cTAC, aucune différence significative entre les deux variétés de Champagne n'a pu être établie.

Ces résultats suggèrent donc la capacité des vins de Champagne, au même titre que les vins rouges à protéger partiellement contre les espèces oxygénées réactives fortement délétères pour l'organisme.

2.10 Modifications de la réponse cytokinique après ingestion de Champagne

2.10.1 Introduction

Outre les médiateurs et les hormones, l'organisme utilise pour s'adapter à son environnement un certain nombre de messagers qui sont des facteurs de croissance : les cytokines.

Les travaux effectués précédemment démontrent une activité antioxydante des vins de Champagne *in vivo*. Au cours de cette étude, nous avons cherché à savoir si l'ingestion de 2 coupes de Champagne permettait de modifier la réponse cytokinique des cellules mononuclées en étudiant les sérums des patients.

Pour ce faire, nous avons effectué le dosage de 13 cytokines par l'utilisation d'un kit multiplex (Linco Resarch Kit) et effectué les dosages grâce à un système LUMINEX SD.

2.10.2 Résultats

Les résultats présentés tiennent compte de l'effet de l'éthanol, celui-ci ayant été retranché.

Cytokines	Modification de l'expression	Pourcentage de modification
IL-1 bêta	pas de changement	-
IL-2	pas de changement	-
IL-4	augmentation les 30 premières minutes	30 %
IL-5	pas de changement	-
IL-6	augmentation à partir de 30 minutes	120 %
IL-7	pas de changement	-
IL-8	pas de changement	-
IL-10	pas de changement	-
IL-12p70	augmentation à partir de 30 minutes	80 %
IL-13	augmentation à partir de 30 minutes	30 %
IFN- γ	pas de changement	-
GM-CSF	pas de changement	-
TNF- α	diminution à jusqu'à 60 minutes	80 %

L'interleukine 4, IL-4, est secrétée par les lymphocytes T de type CD₄⁺, notamment au cours des manifestations allergiques. Elle augmente la croissance et la différenciation des lymphocytes B préalablement activés, favorise la production d'IgE qui joue un rôle important dans les réactions d'hypersensibilité immédiate, et active les macrophages.

L'interleukine 6 ou IL-6 encore appelée « hepatocyte stimulating factor » ou « B cell stimulating factor » est une glycoprotéine secrétée par les monocytes, les cellules endothéliales, les lymphocytes T et B, les fibroblastes. Sa concentration plasmatique s'élève

au cours des chocs septiques et de diverses agressions (traumatismes, brûlures). Elle stimule la croissance et la différenciation des lymphocytes B et augmente la production de plaquettes. Elle a un effet cytotoxique vis-à-vis de certaines tumeurs.

L'interleukine 12 est une cytokine à large spectre dont le rôle principal est de potentialiser l'activité cytotoxique et de participer à la régulation de la prolifération des lymphocytes T et des cellules NK. Elle induit la production de l'interféron (IFN), et favorise la différenciation des cellules auxiliaires de type Th-1.

L'interleukine-13 présente environ 30% d'homologie avec l'IL4, avec qui elle partage un même composant constituant le récepteur. De nombreuses activités attribuées à l'IL-4 ont été retrouvées pour l'IL-13. Ainsi l'IL-13 entraîne la synthèse d'IgG4 et d'IgE par les cellules B humaines et l'expression du marqueur CD23. L'IL-13 inhibe la production des cytokines de l'inflammation par les monocytes. L'IL-13 induit la production d'interféron- γ par les cellules NK.

Le TNF- α ou « Tumor Necrosis factor » est un médiateur de l'immunité naturelle car sa sécrétion ne nécessite pas l'intervention d'un antigène. Le TNF- α est sécrété par les monocytes et les macrophages, les lymphocytes et les mastocytes. Le TNF semble être le principal responsable du choc septique et être impliqué dans le développement de la maladie de Crohn, de l'athérosclérose, et de l'insuffisance cardiaque. Il semble de plus jouer un rôle important dans la polyarthrite rhumatoïde.

2.10.3 Conclusion

Nous pouvons donc observer une variation de certaines cytokines après ingestion de deux coupes de vin de Champagne, cependant celle-ci n'est pas différente en fonction du vin auquel on s'intéresse.

Il apparaît clairement que les cytokines modifiées impliquent les cellules T CD₄⁺ et les macrophages. Les vins de Champagne posséderaient donc des propriétés anti-inflammatoires, accompagnées d'une réduction du TNF- α responsable du développement de certaines pathologies.

CONCLUSION

Au vu de l'ensemble des mesures biologiques effectuées, il apparaît clairement une différence d'activité entre les Champagnes Blancs de Blancs et les Champagnes Blancs de Noirs.

La séparation des substances présentes dans les Champagnes BB conduit à une perte d'activité sur le modèle d'étude de l'effet protecteur de la BHE vis-à-vis du stress oxydant.

Par contre, la séparation des Champagnes BN par la même technique démultiplie cette activité permettant même de restaurer l'activité mitochondriale à 100 % après une anoxie-réoxygénation.

Cette différence d'activité peut être expliquée par la différence de composition de ces deux vins, la séparation supprimant des effets synergiques préalablement établis.

De plus, nous avons montré par l'utilisation de modèles mimant la BHE, que cette fraction issue des BB, était la seule capable de traverser cette barrière. Ces résultats démontrent une fois de plus la différence de composition de ces deux vins.

Les expérimentations effectuées sur un modèle cellulaire murin confirment les résultats précédemment obtenus concernant la protection des cellules neuronales par un extrait de Champagne. Cette protection semble entre autre être due à la capacité des ces constituants à pénétrer les membranes cellulaires

On retrouve de la même manière cette variation d'activité sur le modèle de cellules cancéreuses. Au même titre que les travaux effectués auparavant, seules les phases organiques des vins de Champagne sont douées de propriétés biologiques, et une fois de plus cette activité est différente en fonction du vin auquel on s'adresse.

Quand on s'adresse à des expérimentations *in vivo* nous observons de nouveau une différence très nette entre les deux types de vins. Les Champagnes blancs de noirs permettent de réduire très significativement le potentiel oxydant plasmatique chez des sujets sains.

Une modification de la réponse cytokinique a pu être également observée chez ces mêmes patients, laissant à penser que les vins de Champagne possèdent également des propriétés anti-inflammatoires. Cependant cette fois-ci, la modification n'est pas spécifique au vin de Champagne auquel on s'adresse.

3 Analyse des mécanismes d'action biologiques

3.1 Introduction

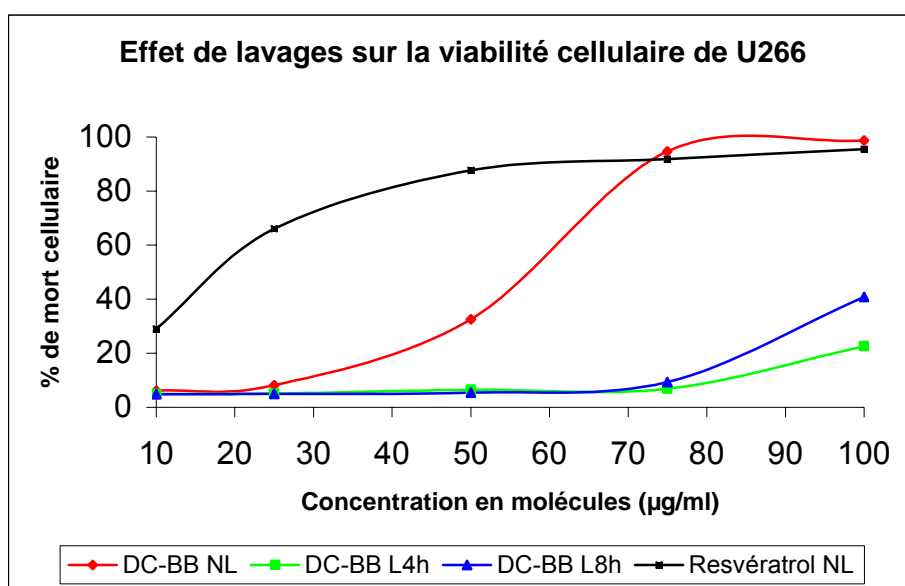
Il est difficile d'étudier les propriétés biologiques d'une substance sans en analyser les mécanismes d'action afin de tenter de corréler son activité à un schéma métabolique donné. Pour y arriver il peut être intéressant d'observer un paramètre et d'en noter ses variations. Cependant, il peut être tout aussi passionnant de s'intéresser non plus à un mécanisme, mais à l'ensemble des voies métaboliques modulées par la seule présence de cette substance.

Dans notre cas, le problème est un peu différent, puisque nous n'avons pas affaire à une molécule isolée, mais à un ensemble de molécules. Néanmoins, ce mélange est la meilleure représentation de ce que le consommateur va absorber et peut donc prendre en compte les mécanismes de synergie qui pourraient exister dans ces « totums »

Pour réaliser ces mesures, nous nous sommes donc intéressés aux systèmes de puces à ADN, nous permettant de screener en une seule fois l'ensemble des voies métaboliques, et de tenter d'isoler un noeud principal caractéristique de l'action du Champagne pris dans son ensemble.

3.2 Effets de « lavages » sur la viabilité des lignées U266

Afin de mieux comprendre les mécanismes mis en jeu lors de l'adjonction des extraits de vin de Champagne, des expérimentations ont été réalisées en lavant les cellules avec du tampon phosphate après 4 et 8 heures d'incubation. Ces expériences ont été réalisées en présence d'une molécule référence : le resvératrol.



Il apparaît clairement que des lavages effectués à 4 et 8 heures diminuent fortement l'activité des molécules DC_{BB} de près de 60%. L'action des molécules du Champagne semble donc dépendante du temps d'incubation. Les lavages successifs suppriment l'activité de ces molécules, ce qui nous permet d'envisager que le mécanisme d'action de ces dernières peut intervenir au niveau de récepteurs membranaires. En effet, une fixation non covalente, ou une inhibition par compétition (tel que la voie de régulation autocrine de l'IL6 par exemple) serait alors une explication probable de mécanisme d'action.

3.3 Étude de l'apoptose

3.3.1 Définition

L'apoptose ou mort cellulaire programmée est un processus de mort cellulaire physiologique qui permet à l'organisme d'éliminer les cellules non désirées ou endommagées et potentiellement dangereuses. Elle joue un rôle crucial dans le développement des organismes

pluricellulaires et le maintien de l'homéostasie cellulaire qui résulte d'un équilibre contrôlé entre la prolifération et la mort cellulaire, ce qui nous intéresse particulièrement dans le cas des cellules cancéreuses.

La mort cellulaire par apoptose est caractérisée par des altérations morphologiques spécifiques. Parmi ces altérations, on peut observer une réduction du volume cytoplasmique, la condensation de la chromatine au niveau de la membrane nucléaire, une perte d'asymétrie de la membrane plasmique et la fragmentation de l'ADN. La cellule entière finit par être démantelée sous forme de vésicules ou corps apoptotiques qui contiennent le cytoplasme, les organelles cellulaires ainsi que la chromatine fragmentée.

Il s'agit ici de tester les molécules issues des fractions DC_{BB} et DC_{BN} pour leur capacité à induire l'apoptose ou la nécrose (mort non programmée).

3.3.2 Mesure d'apoptose par marquage à l'Annexine-V-Fluos

Dans les premières étapes de l'apoptose, des changements ont lieu à la surface cellulaire. Une des altérations de la membrane plasmique est la translocation de la phosphatidylsérine (PS) de la membrane interne à la face externe de celle-ci par mécanisme de flip-flop, PS devenant ainsi exposé à la surface externe de la membrane cellulaire.

En 1992, Fadok et collaborateurs [203] montrèrent que le macrophage reconnaît spécifiquement la PS exposée à la surface des lymphocytes durant le développement de l'apoptose. La reconnaissance et la phagocytose des cellules apoptotiques protègent ainsi l'organisme contre les agressions extérieures menant aux inflammations.

Il s'agit ici de pouvoir différencier la mort des cellules cancéreuses par apoptose, de la mort par nécrose. Des expérimentations nous ont montré que l'apoptose ne pouvait pas être étudiée après de deux jours d'incubation. Au-delà de deux jours, la quantité de cellules mortes étant importante, il nous est impossible de distinguer les cellules mortes par apoptose des cellules mortes par nécrose.

3.3.3 Résultats

L'analyse des phosphatidylsérines du feuillet externe des cellules en apoptose est accomplie en utilisant l'Annexine-V-Fluos (marqueur précoce de l'apoptose) et l'iodure de propidium pour la différenciation entre les cellules nécrotiques et les cellules apoptotiques (IP spécifique des cellules mortes : intercalant de l'ADN).

Le protocole employé est décrit au paragraphe 4.1.

Nous décidons de travailler ici sur les phases organiques issues des EVC respectivement BB et BN pour une concentration équivalente à leur DL₅₀. Les expériences ont été réalisées trois fois pour chaque lignée au deuxième jour après incubation. Pour contrôle, le resvératrol et l'éthanol sont testés dans les mêmes conditions.

Lignées	Concentrations/Molécules	A+/IP- (%)	A+/IP+ (%)
U266	Normal	4	7,4
	EtOH 65 µg/ml	5,5	9,5
	RES 50 µg/ml	20	56,5
	DC_{BB} 65 µg/ml	30	25
	DC_{BN} 46 µg/ml	30	30,5
K562	Normal	5	5
	EtOH 65 µg/ml	4	5
	RES 20 µg/ml	6,5	31
	DC_{BB} 65 µg/ml	16	25
	DC_{BN} 98 µg/ml	17	32
Jurkat	Normal	7	7,5
	EtOH 50 µg/ml	6	7,5
	RES 20 µg/ml	7	60
	DC_{BB} 50 µg/ml	9,5	47
	DC_{BN} 48 µg/ml	10	30
Raji	Normal	7,5	20
	EtOH 100 µg/ml	7,5	26
	RES 8 µg/ml	8	27
	DC_{BB} 100 µg/ml	9	57
	DC_{BN} 20 µg/ml	7	25
THP1	Normal	1	3
	EtOH 50 µg/ml	1	3,5
	RES 8 µg/ml	4,5	54
	DC_{BB} 50 µg/ml	3	46
	DC_{BN} 34 µg/ml	3	6

3.3.4 Conclusion

De cette étude ressort que les cellules U266 et K562 meurent par apoptose, et ceci pour des concentrations équivalentes à la DL₅₀. Pour les autres lignées cellulaires (Raji, THP1, Jurkat), deux solutions sont envisageables : soit ces cellules ne meurent pas par apoptose, soit l'apoptose se déroule avant la lecture au cytomètre de flux rendant impossible la détection par l'annexine.

3.4 Etude du cycle cellulaire

3.4.1 Introduction

Le cycle cellulaire représente l'intégralité de la période de division, c'est à dire l'ensemble des évènements biochimiques et morphologiques qui sont responsables de la prolifération cellulaire. Afin de comprendre les mécanismes mis en jeu dans l'arrêt de la prolifération cellulaire, il est nécessaire de caractériser le point de contrôle au niveau du cycle cellulaire

La mesure du cycle cellulaire par des méthodes classiques de CMF divise le cycle en trois phases :

- G₀/G₁, phase d'activation des cellules
- S, phase de synthèse de l'ADN
- G₂/M, phase de préparation à la mitose

La méthode choisie utilisant un intercalant de l'ADN, l'IP, permettra l'identification du point de blocage parmi les trois phases citées ci-dessus.

3.4.2 Résultats

Le protocole employé pour l'analyse du cycle cellulaire est décrit au paragraphe 4.2.

Les molécules testées, quant à elles, sont les mêmes que celles utilisées pour l'annexine et dans les mêmes concentrations.

L'étude se fera par marquage du DNA par l'iodure de propidium (IP), puis lecture au cytomètre de flux.

Le tableau qui suit résume les résultats obtenus pour l'analyse du cycle cellulaire. Ces résultats sont exprimés en pourcentage de présence des cellules dans une phase donnée du cycle cellulaire et sont obtenus après analyse statistique par MODFIT[®] v2.

Lignées	Molécules/Concentration	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
U266	Normal	56,8	32,5	10,6
	EtOH 65 µg/ml	52,5	36,4	11
	RES 50 µg/ml	66,5	25,1	8,4
	DC_{BB} 65 µg/ml	78,5	12	9,5
	DC_{BN} 46 µg/ml	30,9	26,8	42,3
K562	Normal	43,5	50,3	6,2
	EtOH 65 µg/ml	42,8	50,9	6,3
	RES 20 µg/ml	39,2	55,5	5,3
	DC_{BB} 65 µg/ml	25,6	67	7,4
	DC_{BN} 98 µg/ml	35	53,8	11,2

Jurkat	Normal	50,8	42	7,2
	EtOH 50 µg/ml	51	40,6	7,4
	RES 20 µg/ml	27,2	62,5	10,3
	DC_{BB} 50 µg/ml	60,6	30,4	9
	DC_{BN} 48 µg/ml	46,4	38,8	14,8
Raji	Normal	52,5	37,1	10,4
	EtOH 100 µg/ml	53,2	35,6	11,2
	RES 8 µg/ml	74,3	21,7	3,8
	DC_{BB} 100 µg/ml	80,5	15,4	4,1
	DC_{BN} 20 µg/ml	28,5	38,5	32,1
THP1	Normal	54,9	34,7	10,4
	EtOH 50 µg/ml	54	33,6	12,4
	RES 8 µg/ml	27	60,9	12,1
	DC_{BB} 50 µg/ml	67,4	24,2	8,4
	DC_{BN} 34 µg/ml	51,9	35,7	12,4

3.4.3 Conclusion

Nous pouvons donc noter une différence en fonction de la lignée cellulaire à laquelle on s'adresse, mais également en fonction du type de Champagne.

Pour les lignées U266 et Raji et THP1 et Jurkat, nous avons un blocage à la transition G₀G₁/S, très marqué pour les Champagnes BB, alors que l'on modifie la transition G₂M/G₀G₁ (U266, Raji et Jurkat) et S/G₂M (THP1) pour les BN.

Pour la lignée K562, les Champagne BB modifient la transition S/G₂M alors que les BN modifient la transition G₂M/G₀G₁.

Il y a donc de nouveau une grosse différence d'activité en fonction des Champagnes auxquels on s'adresse.

3.5 *Étude des potentiels transmembranaires mitochondriaux*

3.5.1 Introduction

Étant donné les résultats obtenus pour l'étude de l'apoptose en présence des Champagne BB (nombre de cellules en apoptose insuffisant comparé au nombre de cellules mortes pour les lignées Jurkat, Raji et THP1), nous avons décidé d'observer l'apoptose entre 0 et 24 heures. En parallèle à cette mesure, nous avons également regardé la modification du potentiel transmembranaire mitochondrial, marqueur supplémentaire du phénomène d'apoptose.

Au cours de la mort cellulaire programmée, le potentiel de membrane est modifié. Afin de pouvoir étudier ce phénomène, nous avons utilisé une sonde cationique capable de

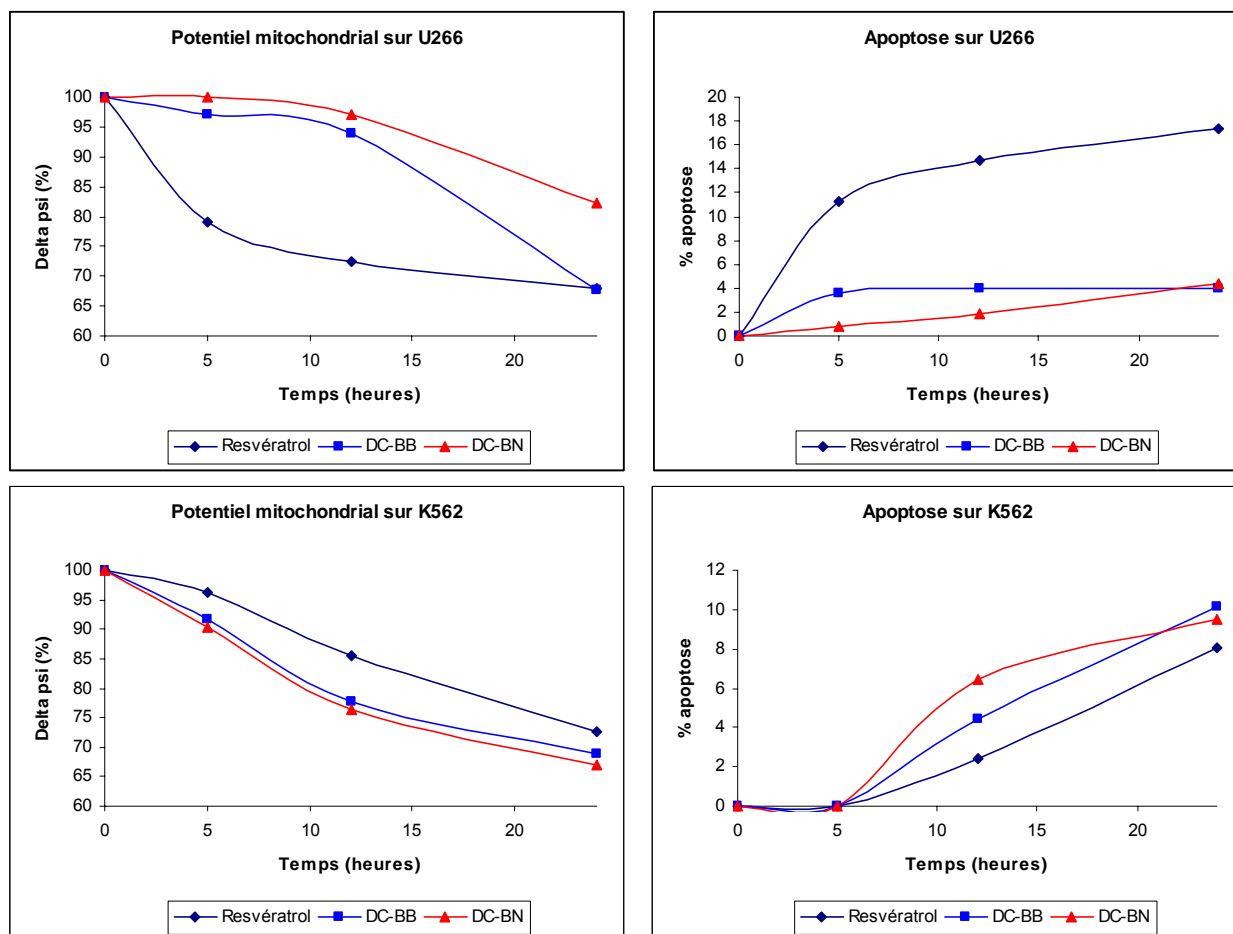
s'accumuler dans la cellule en réponse à ce potentiel : DiOC₆(3) ou dihexaoxocarbocyanine iodide.

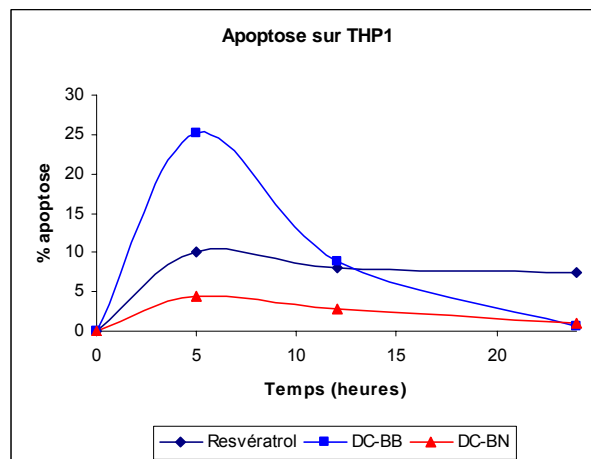
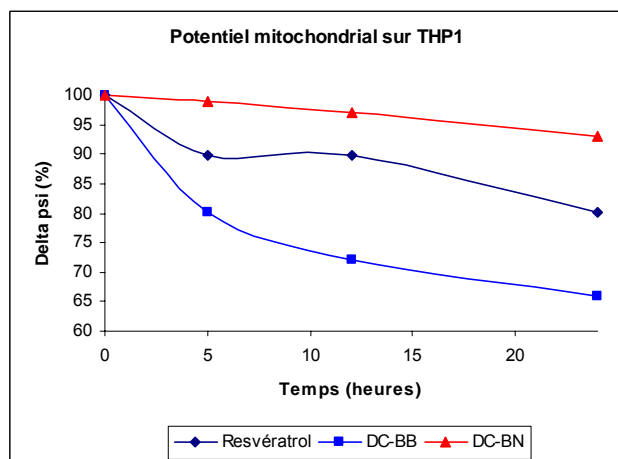
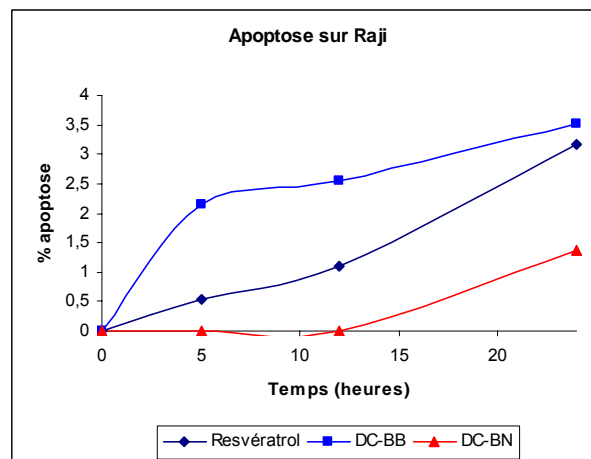
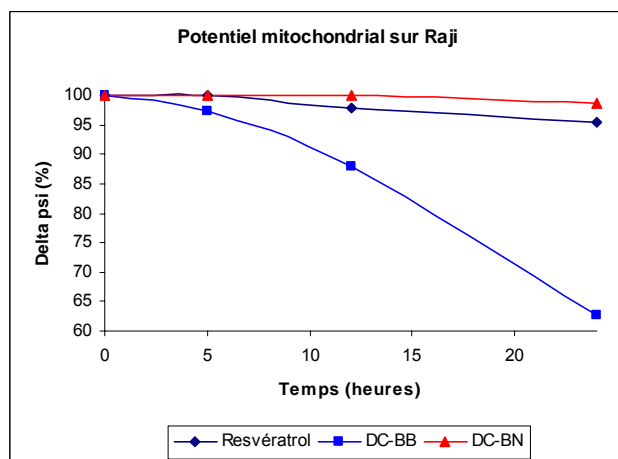
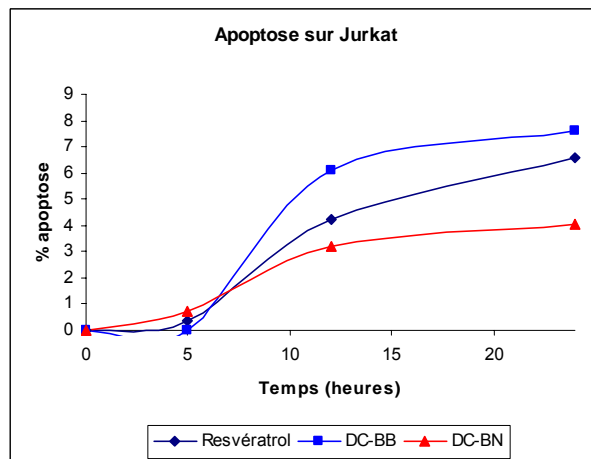
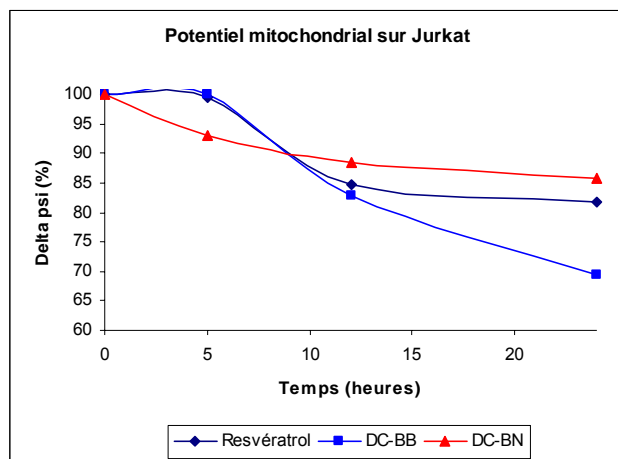
Le DiOC₆ est une molécule chargée capable de pénétrer la cellule au travers de la membrane plasmique. Pour de faibles concentrations (inférieures à 100 nM), celle-ci s'accumule dans la mitochondrie du fait du fort potentiel membranaire négatif. Dans les mitochondries saines, la sonde s'accumule, permettant ainsi un « stacking » de ces dernières, ayant pour effet une augmentation de la fluorescence. Quand la cellule est traitée par des molécules capables de casser la membrane mitochondriale, on observe une diminution de cette fluorescence.

Les cellules ayant incorporé la sonde peuvent ainsi être analysée par cytométrie de flux (excitation dans le bleu et émission dans le vert et le rouge).

3.5.2 Résultats

Pour ces expérimentations, les cellules de chaque lignée sont incubées en présence de DC_{BB} et DC_{BN} à leur DL₅₀.





3.5.3 Conclusion

Ces résultats nous apportent donc la preuve que les cellules Jurkat, Raji et THP1 meurent par apoptose. Cette dernière est corrélée à une perte du potentiel transmembranaire mitochondrial très marqué pour les vins Blancs de Blancs dès 5 heures d'incubation. Pour les vins Blancs de Noirs, il semblerait que l'apoptose n'apparaisse réellement qu'après 24 heures d'incubation, seule exception faite de la lignée K562.

3.6 Tests de viabilité cellulaire de DC_{BB} sur les PBMC

3.6.1 Définition :

Les PBMC [204, 205] (Peripheral Blood Mononuclear Cells), ou cellules mononuclées du sang périphérique, sont issues d'une fraction cellulaire nommée Buffy Coat.

Quand un échantillon de sang est centrifugé, les éléments cellulaires les plus lourds sont entraînés au fond du tube, laissant le plasma en surface. Les éléments solides constituent approximativement 45 % du volume sanguin total ; le plasma comptant pour les 55 % restants.

Les globules rouges (érythrocytes) sont les éléments solides les plus abondants du sang. Les globules blancs (leucocytes) et les plaquettes forment une couche appelée « Buffy Coat » se localisant entre les globules rouges et le plasma.

Les leucocytes regroupent 3 grandes familles de cellules :

- Les lymphocytes : LB, LT (CD⁴⁺, CD⁸⁺), NK,
- Les monocytes,
- Les polynucléaires (neutrophiles, éosinophiles, basophiles),

ainsi qu'une faible quantité de cellules souches CD³⁴⁺ (1% environ).

Les PBMC seront issus de cette fraction leucocytaire en employant un protocole d'extraction décrit en paragraphe 4.3.1.

Les sous populations cellulaires constituant les PBMCs ont été analysées grâce à des anticorps monoclonaux spécifiques de chacune des sous populations :

- Anti CD 14 pour les monocytes
- Anti CD3 pour les LT (sous unité du TCR)
- Anti CD20 pour les LB (marqueur de différenciation)
- Anti CD56 pour les NK

Chacun de ces anticorps étant couplé à un fluorochrome qui, selon le type, est soit du FITC (Isothiocyanate de fluorescéine) soit du PE (Phycoérythrine).

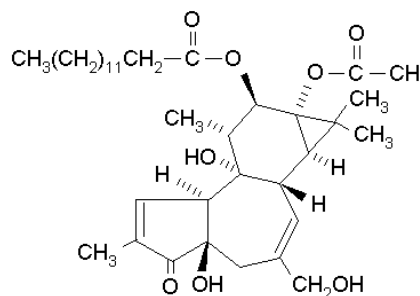
Les résultats de cette analyse confirment la **présence majoritaire de lymphocytes T** dans cette fraction de PBMC.

Afin d'étudier les effets de nos molécules sur les PBMCs, deux systèmes ont été employés : les PBMCs non stimulés et les PBMCs stimulés. Cette stimulation est effectuée selon deux procédés :

- Stimulation par utilisation conjuguée de PMA + ionomycine

- Stimulation par utilisation de PHA (Phytohémaglutinine)[206]

PMA : Phorbol 12-myristate 13-acétate :



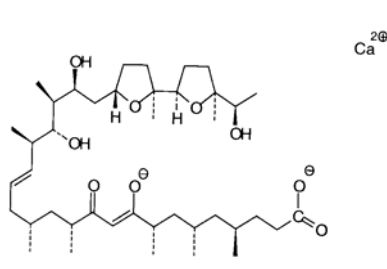
L'activation des lymphocytes T est généralement déclenchée par l'interaction de sa molécule ligand sur le récepteur cellulaire de surface. Ce binding déclenche l'hydrolyse rapide des phosphatidyl inositol 4,5 diphosphate (PIP2 ou Ptd Ins 4,5 P₂) en diacyl glycérol (DAG) et inositol tri phosphate (IP₃) par l'action de la Phospholipase C (PLC γ)

Le DAG est un activateur allostérique de la Protéine Kinase C (PKC) et l'IP₃ permet de déclencher le relargage et la mobilisation du Ca²⁺ intracellulaire, résultant en une cascade de réponses cellulaires médiant l'activation des lymphocytes T.

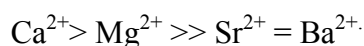
Une de ces réponses est la production et la sécrétion de l'interleukine 2 (IL-2).

Le PMA possède une structure analogue à celle du DAG, cependant, sa structure lui permet de passer la membrane plasmique librement, et donc d'activer la PKC.

Ionomycine :



L'ionomycine est un antibiotique polyétheré produit par *Streptomyces globatus*. C'est un canal ionophore à calcium, mais qui peut également laisser passer d'autres ions sélectivement :



Le PMA permet d'activer la PKC et l'ionomycine permet d'augmenter le flux calcique.

L'activation de la PKC et le flux calcique mime donc une activation par le TCR.

3.6.2 Résultats

Les résultats sont observés avec ou sans stimulation des PBMCs

Le tableau présente le pourcentage de cellules mortes

DC_{BB}

	5 µg/ml	10 µg/ml	25 µg/ml	50 µg/ml	75 µg/ml
PBMC NSt J5	8%	21%	60%	69%	69%
PBMC NSt J3	7,8%	10,8%	21,5%	48,6%	67,1%
PBMC PHA J3	28,1%	27,3%	34,4%	53,3%	68,2%
PBMC Iono/PMA J3	0%	13,2%	34%	69%	83,1%

Resvératrol :

	5 µg/ml	10 µg/ml	25 µg/ml	50 µg/ml	75 µg/ml
PBMC NSt J5	3%	30%	66%	69%	ND
PBMC NSt J3	3,2%	8,4%	33,6% 0% ; >40%	57%	62%
PBMC PHA J3	17,6% 60%	22% 60%	24,2% 90%	48,4%	58,6%
PBMC Iono/PMA J3	0%	0,8%	4%	50%	70,9%

Les pourcentages en couleur font référence à des valeurs trouvées dans la littérature :

En rouge : article de Ferry-Dumazet [124]

En bleu : article de Dörrie [135]

3.6.3 Conclusion

Il apparaît clairement que les molécules présentes dans les vins de Champagne possèdent une activité cytotoxique sur les cellules saines. Il existe cependant une différence de toxicité en fonction de l'activation utilisée. L'utilisation des composés présents dans les Champagnes BN, à leur IC₅₀ prolifération, permettrait de limiter cette dernière sans tuer des proportions importantes de cellules saines.

3.7 Utilisation des « puces à ADN »

Les mesures effectuées jusqu'à aujourd'hui sur les puces à ADN n'ont été réalisées qu'en présence de l'extrait organique des Champagnes Blancs de Blancs. Cette étude nous permet donc d'avoir des informations sur le transcriptome des cellules myélomateuses U266 en

présence d'une substance cytotoxique, substance qui représente la référence de tous nos tests d'activité biologique.

Les étapes chronologiques menant à la lecture des puces (qui représente la dernière étape) vont être détaillées ci-dessous.

3.7.1 Détermination des IC₅₀ prolifération et cytotoxicité

Afin d'observer un effet sur le transcriptome, il est nécessaire de connaître la dose 50 à ajouter aux cultures cellulaires myélomateuses U266. En fonction de ce que l'on veut observer (inhibition de prolifération ou cytotoxicité), l'IC₅₀ peut s'avérer être différente.

Nous avons donc utilisé les deux méthodes précédemment décrites aux paragraphes 2.6.5 et 2.6.7 :

3.7.2 Extraction des ARNs

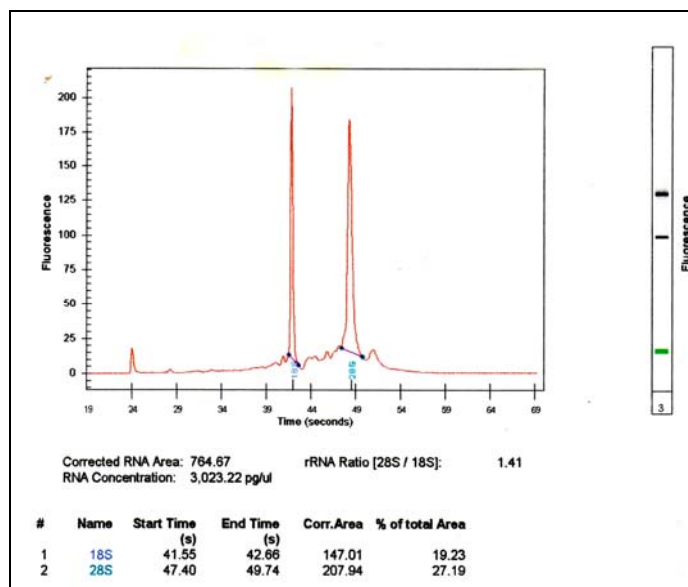
Les cellules U266 sont incubées en présence des molécules à tester (ici resvératrol à son IC₅₀ prolifération, soit 10,6 µg/ml, et DC_{BB} à son IC₅₀ prolifération, soit 18,5 µg/ml), puis les ARNs sont extraits 24 heures après l'ensemencement.

Les ARNs sont extraits par l'utilisation d'un kit, le RNeasy kit QIAGEN, incluant la digestion à la DNase.

L'ARN total est ensuite quantifié par spectrophotométrie, où une unité d'absorbance à 260 nm équivaut à 40 µg/ml de RNA.

L'absorbance est vérifiée à 260 et 280 nm pour déterminer la concentration de l'échantillon et sa pureté. Le ratio A_{260}/A_{280} doit être égal à 2 pour un ARN pur (des ratios entre 1,9 et 2,1 sont acceptables).

La concentration de l'ARN total sera amenée entre 50 et 100 ng/µL pour les puces à ADN. Afin de pouvoir vérifier au préalable son intégrité, ce dernier est passé sur un BioAnalyser Agilent 2100 RNA Pico. L'absence de traînées, en particulier sous la bande 18S, et un rapport d'intensité des bandes 28S/18S d'environ 2, garantissent l'intégrité des ARNs.



3.7.3 Principe des Puces à ADN Affymetrix Human Genome U133 Set.

Les puces que nous avons employées sont les puces Affymetrix UG-U133 Set. Pour des raisons de compréhension, nous allons faire un peu de terminologie :

- **Sondes** : les oligos à la surface de la puce sont appelés sondes parce qu'ils explorent ou interrogent l'échantillon.
- **Cible = Target** : la cible est l'acide nucléique (RNAc) marqué qui est interrogé par les sondes (elles s'hybrident aux sondes de la puce)
- **Cellule de sonde = Probe Cell** : Endroit spécifique sur la puce qui contient des oligos d'une séquence spécifique.

Les sondes « GeneChip® [207] » sont fabriquées, en utilisant une technologie qui combine la photolithographie et la chimie combinatoire.

- 10 à 100 milliers d'oligonucléotides différents sont synthésés sur chaque puce.
- Chaque oligonucléotide est localisé dans un endroit spécifique de la puce appelé « Probe Cell ».
- Chaque Probe Cell contient des millions de copies d'un oligonucléotide ou sonde.

Les puces sont fabriquées par une série de cycles :

- Initialement, un **substrat de verre** est déposé avec des ligands contenant des **groupements protecteurs photos labiles**.
- Puis un masque est appliqué, exposant certaines parties de la puce aux UV.
- L'**illumination** enlève les groupements photo labiles permettant l'addition de

phosphoramidite nucléoside de façon sélective seulement aux sites prévus et exposés.

- Ensuite, un masque différent est appliqué et le **cycle d'illumination et de couplage chimique** est exécuté de nouveau.

En répétant ce cycle, un **ensemble spécifique d'oligonucléotides** est **synthétisé** pour chaque type de sonde, à un endroit précis de la puce. Les puces terminées sont placées dans des **cassettes**.

Le **RNA marqué à la biotine** (appelés cible = Target) est hybridé à la puce. La puce hybridée est colorée avec de la **Phycoérythrine conjuguée à la streptavidine** et scannée par le *Gene Array Scanner* à une longueur d'onde de 488 nm.

La **quantité de lumière** émise à 570 nm est **proportionnelle à la cible liée** (RNAc Hybridé) pour chaque partie de puce.

1. Préparation du RNAc (Target Preparation).

Pour les échantillons eucaryotes, le **DNAc double brin** est synthétisé à partir d'**ARN total** ou d'**ARN messager** purifié Poly(A)⁺, provenant de tissus ou de cellules.

Une **transcription in vitro** est ensuite réalisée pour obtenir du RNAc marqué à la biotine (à partir du DNAc db).

Le **RNAc est fragmenté** avant hybridation sur puce test.

2. Hybridation de la cible (Target hybridization)

Un **cocktail d'hybridation** est préparé, incluant la **cible fragmentée** et les **contrôles** de la puce (Oligo B₂, bioB, bioC, bioD, cre), de la **BSA** et du **DNA de sperme de hareng**.

Ce cocktail est ensuite hybridé à la puce, par incubation pendant 16 heures dans un four rotatif (60 rpm) à 45°C.

3. Expérience et station de lavage

L'**information spécifique expérimentale** est déterminée en utilisant *MicroArray Suite* d'Affymetrix sur un PC compatible avec un système d'exploitation Windows NT.

Le type de puce, la description des échantillons et les commentaires sont entrés dans **MicroArray Suite** et enregistrés sous un nom unique (= celui de l'expérience).

La station de lavage est amorcée par différents rinçages avec les tampons appropriés, pour pouvoir être utilisée.

4. Lavage et coloration des puces

Immédiatement après hybridation, la puce est lavée et colorée sur la station de lavage.

5. Scanning de la puce

Chaque station de travail possédant MicroArray Suite d’Afymetrix peut contrôler un scanner. Chaque puce est scannée 2 fois : cela prend environ 10 minutes suivant le format de la puce. Le logiciel calcule une moyenne de 2 images, définit les « Probe Cell » et calcule une intensité pour chaque « Probe Cell ».

Le double scanning améliore la sensibilité de l’essai et réduit le bruit de fond.

L’image de chaque puce est conservée dans un fichier identifié par le nom de l’expérience et enregistrée avec une extension « data image file (.dat) ».

6. Les données de l’analyse

Les données sont analysées en utilisant la fenêtre MicroArray Suite Expression Analysis. La « dat.image » est étudiée pour les intensités des sondes : les résultats sont exprimés sous forme de graphiques et tableaux.

3.7.4 Résultats

Les résultats nous sont communiqués sous forme de fichiers Excel, faisant apparaître les sondes classées par intensité de régulation : up ou down régulation.

L’ensemble de ces résultats sont compilés dans un logiciel de traitement : Pathway Assist nous permettant de rechercher les nœuds métaboliques potentiels et les cibles (Annexe, Figure 77)

Ces résultats nous permettent d’émettre des hypothèses sur le mécanisme mis en jeu lors de l’adjonction de nos molécules, cependant des expérimentations par PCR ou Western Blot s’avèrent nécessaires afin de démontrer la/les voie(s) de transduction.

Sur 22284 gènes étudiés, nous avons pu mettre en évidence 8253 gènes présents pour 13360 absents.

Lors de l’analyse statistique visant à étudier les polyphénols du Champagne vs éthanol, nous avons trouvé 710 gènes up régulés dont le ratio est supérieur ou égal à 2, et 1072 gènes down régulés dont le ratio est compris entre 0 et 0,5.

Si l’on traite ces gènes par le logiciel Pathway Assist, cela nous permet d’obtenir 110 gènes appartenant à des voies métaboliques connues pour les « up régulés » et 266 gènes pour les « down régulés » (Figure 39)

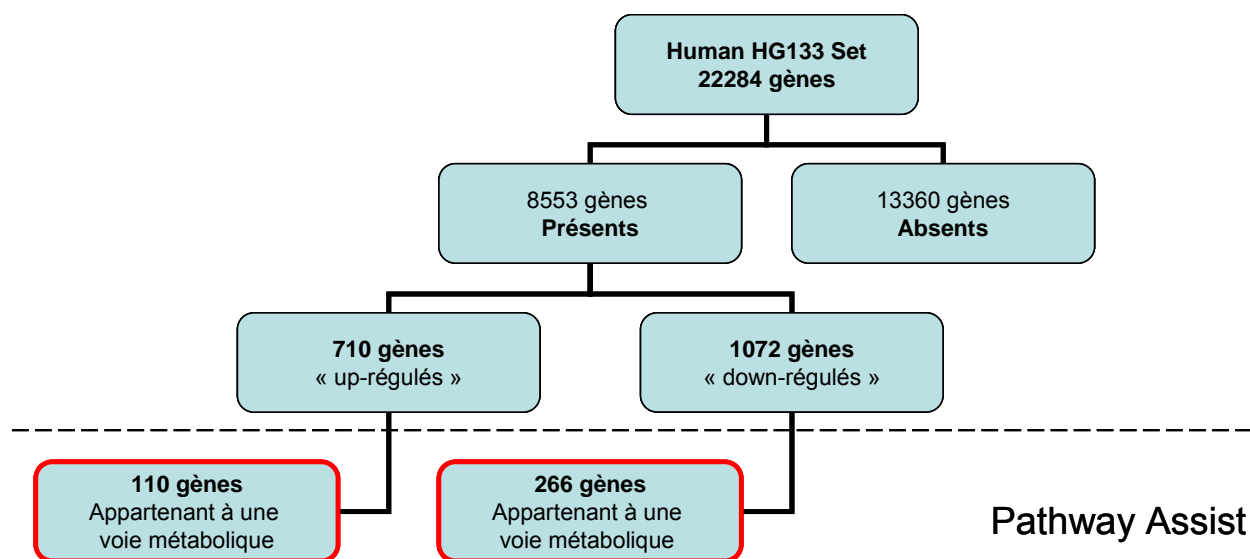


Figure 39: Gènes présents et modulés par le Champagne

3.7.4.1 Échantillon de gènes augmentés

Abréviations	Noms complets	Description
BRCA1	Breast cancer A	Suppresseur de tumeur.
IGFBP3	Insulin-like growth factor binding protein 3	Régulateur de la prolifération cellulaire et de l'apoptose.
BCL2L1	BCL-2 Like 1	Anti ou pro-apoptotique.
TNFRSF1A	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 26	Récepteur au TNF- α .
IL-15	Interleukin-15	Régulateur de l'activation et prolifération des LT et NK.
IGFBP1	Insuline-like growth factor binding protein	Protéine de liaison à l'insuline.
IL2RB	Interleukin-2 receptor beta	Réponse immunitaire médiée par les cellules T.
CASP9	Caspase-9	Apoptose.
BID	BH3 interacting domain death agonist	Régulateur de la mort cellulaire.
APAF1	Apoptotic protease activating factor	Rôle dans l'apoptose.
FGFR1	Fibroblast growth factor receptor 1	Récepteur aux facteurs de croissance
TRADD	TNFRSF1A-associated via death domain	Activation de NF-kappaB et médiation de la mort cellulaire.
TNFSF10	Tumor necrosis factor (ligand) member 10	Induction de l'apoptose sur cellules cancéreuses.
STAT2	Signal transducer and activator of transcription 2	Facteur de transcription
CDC2L2	Cell division cycle-2 like-2	Contrôle du cycle cellulaire
LDLR	LDL receptor	Athérosclérose
BCL6	B-cell CLL/lymphoma 6	Répresseur de transcription

ABCA1	ATP binding cassette, sub family A	Multidroque résistance
IL15RA	Interkeukin-15 receptor alpha	Récepteur aux cytokines
MICB	MHC class I polypeptide-related sequence B	Activation de la réponse des NK

3.7.4.2 Échantillon de gènes diminués

Abréviations	Noms complets	Description
BCL2	B-cell CLL/lymphoma	Antiapoptotique
IL6R	Interleukin-6 receptor	Régulation de la différenciation et croissance cellulaire
PTPRC	Protein tyrosine phosphatase, receptor type C	Différenciation et mitose
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3	Croissance cellulaire
SDC1	Syndecan-1	Récepteur de la matrice extracellulaire
ICAM1	Intercellular adhesion molecule 1 (CD54)	Communication cellulaire
TOP2A	Topoisomerase II alpha	Contrôle l'état topologique de l'ADN
TIMM44	Translocase of inner mitochondrial membrane 44	Translocase
CDC2	Cell division cycle 2	Transition G1 à S et G2 à M
CDKN2C	Cyclin dependant kinase inhibitor 2C	Inhibiteur des CDKs
FGF2	Fibroblast growth factor	Facteur de croissance
CCND2	Cyclin D2	Régulateur du cycle cellulaire
CDC20	Cell division cycle 20	Régulateur du cycle cellulaire
VDAC1	Voltage dependant anion channel 1	Canal mitochondrial
CDK4	Cyclin dependant kinase 4	Régulateur du cycle cellulaire
CDK6	Cyclin dependant kinase 6	Régulateur du cycle cellulaire
CCNA2	Cyclin A2	Régulateur du cycle cellulaire
CDK2	Cyclin dependant kinase 2	Régulateur du cycle cellulaire
POLR2H	Polymerase (RNA) II	RNA polymérase
IFNAR2	Interferon receptor 2	Cytokine
STAT2	Signal transducer and activator of transcription 2	Croissance cellulaire
POLR2B	Polymerase (RNA) II	RNA polymérase

BAG1	BCL2 –associated protein	Apoptose
TGFBRAP1	Transforming growth factor beat receptor associated protein 1	Récepteur aux facteurs de croissance
POLR2D	Polymerase (RNA) II	RNA polymérase
POLR2L	Polymerase (RNA) II	RNA polymérase
POLR2K	Polymerase (RNA) II	RNA polymérase
CCNE1	Cyclin E1	Régulateur du cycle cellulaire
POLR2C	Polymerase (RNA) II	RNA polymérase
CDC6	Cell division cycle 6	Régulateur du cycle cellulaire
ICAM3	Intercellular adhesion molecule 3	Communication cellulaire
CDK9	Cyclin dependant kinase 9	Régulateur du cycle cellulaire

3.7.5 Conclusion

Au terme de cette analyse des gènes modifiés par la seule présence du Champagne, nous pouvons observer une augmentation des protéines impliquées dans les phénomènes d'apoptose, ainsi que celle responsable des réponses inflammatoires. Ceci est corrélé à la diminution des protéines impliquées dans la communication et la prolifération conduisant à la mort cellulaire.

3.8 Conclusion

Au terme de cette étude des mécanismes d'actions biologiques, nous avons pu révéler que les vins de Champagne sont capables de moduler l'activité tumorale par la mise en place au sein de la cellule du mécanisme d'apoptose.

En sus de ce mécanisme, on observe également une modification de la régulation du cycle cellulaire conduisant les cellules dans l'arrêt des phases de prolifération.

L'analyse du transcriptome nous a permis de révéler que l'action probable des molécules présentes dans le Champagne pouvait s'expliquer par l'activation du récepteur au TNF, conduisant à l'activation de facteurs de transcriptions induisant la mort cellulaire.

Bien que l'ensemble de ces paramètres soit en faveur d'une action cytostatique et cytotoxique des molécules du Champagne, l'adjonction de celles-ci sur des cellules saines engendre pour les mêmes concentrations une mort cellulaire. Cependant, la dose létale 50 de ces molécules sur les cellules saines est supérieure à l'IC₅₀ de prolifération des cellules cancéreuses en ce qui concerne les Champagnes BN.

CONCLUSION GÉNÉRALE

L'objectif principal de ce travail était la mise en évidence des propriétés biologiques des vins de Champagne ce qui permettait d'envisager l'établissement d'une relation entre une consommation modérée de cette boisson et un bénéfice potentiel pour la santé, telle qu'on a pu la décrire dans le cas des vins rouges.

Les recherches effectuées au cours des dernières décennies ont en effet permis de relier une consommation modérée de vin rouge à la diminution du risque de maladies cardiovasculaires et/ou de cancer. Les chercheurs attribuent aujourd'hui de plus en plus clairement les propriétés observées aux molécules présentes dans les vins, et plus particulièrement aux polyphénols.

En partant du vin de Champagne en bouteille, notre première étape a été l'obtention de trois extraits représentatifs de la totalité de ces vins, et ceci en distinguant les Blancs de Blancs des vins Blancs de Noirs. La séparation de ces trois extraits par chromatographie de partage centrifuge, bioguidée par la mesure d'activités biologiques pertinentes, nous a menés à la préparation de trois fractions particulièrement actives. Une analyse chimique des constituants de ces dernières nous a permis de mettre en évidence et de décrire six molécules non encore décrites dans les vins de Champagne.

Leurs propriétés biologiques ont été étudiées plus en détails et en particulier dans les domaines de l'hémato-oncologie et de pathologies neurologiques. Nous avons pu mettre en évidence des différences significatives entre les deux types de vins : la protection de mitochondries isolées de cerveau de rat par des fractions issues des extraits Blancs de blancs n'est pas équivalente à celle de l'extrait entier. Cela nous permet de proposer une action synergique de certaines des molécules contenues dans ces extraits. *A contrario*, la séparation des vins de Champagne Blancs de Noirs nous a permis d'observer un renforcement des activités biologiques testées, et certaines des fractions sont mêmes capables de restaurer complètement l'activité des mitochondries soumises à une anoxie-réoxygénation.

Nous avons pu également observer un effet cytostatique et cytotoxique des constituants des vins de Champagne sur différentes lignées de cancer hématopoïétique, et ceci quel que soit le

vin auquel on s'adresse. Ces effets sont confirmés par la mise en évidence d'une activité proapoptotique reliée à une perte du potentiel transmembranaire mitochondrial et à une modification importante de la régulation du cycle cellulaire.

L'accumulation de résultats positifs et prometteurs dans de nombreux tests de mesure biologiques nous conforte donc dans l'idée que les vins de Champagne possèdent, au même titre que les vins rouges, des propriétés biologiques importantes dans la prévention de certaines pathologies.

L'observation chez des sujets sains, après absorption de deux coupes de vins de Champagne, d'une diminution de la capacité oxydante plasmatique corrélée à une augmentation de la capacité antioxydante et d'une modification de la synthèse de certaines cytokines anti-inflammatoires, a confirmé, *in vivo*, les effets bénéfiques potentiels des constituants des vins de Champagne.

L'analyse par la technique des puces à ADN nous a non seulement permis d'émettre des hypothèses quant aux voies de signalisation empruntées, mais également de confirmer la modification par les constituants du Champagne des gènes responsables de la synthèse de certaines cytokines. On a par exemple pu observer sous l'effet des fractions issues des vins de Champagne une diminution de la synthèse de TNF, protéine impliquée dans de nombreuses pathologies. Ces observations *in vitro* viennent à leur tour donner une explication des résultats positifs obtenus *in vivo*.

Au terme de cette étude, il apparaît clairement que les constituants des vins de Champagne sont partiellement disponibles pour l'organisme, et qu'ils contribuent à le protéger contre les espèces oxygénées réactives. La piste des propriétés anti-oxydantes n'est pas la seule à être prometteuse, compte tenu du fait que les fractions issues du vin de Champagne ont également pu induire une modification de la réponse inflammatoire et montrer des activités neuro-protectrices et antiprolifératives non négligeables, pouvant intéresser le domaine de la prévention de diverses pathologies telles que le cancer ou la maladie d'Alzheimer.

A l'issue de ce travail de thèse, diverses perspectives sont envisageables, et notamment la recherche par séparation et purification de la ou des molécules responsables des effets biologiques observés. La mise en évidence d'une telle molécule à l'état pur nous permettra non seulement d'en étudier tous les paramètres pharmaco-cinétiques et biochimiques, mais

également de déterminer sa biodisponibilité pour l'organisme (modifications stomacales, hépatiques, etc...). Si, comme le laisse supposer nos observations sur les vins de Champagne Blancs de Blancs, les effets observés sont l'œuvre de plusieurs molécules agissant en synergie, il pourrait alors être intéressant d'en déterminer les proportions relatives dans les vins de Champagne, afin d'en comprendre le mécanisme et, dans la mesure du possible, d'en reproduire les effets bénéfiques.

Les résultats obtenus par l'utilisation des puces à ADN montrent des modifications non négligeables de certains des gènes impliqués dans la régulation du glucose sanguin (facteurs de croissance de l'insuline, transporteurs au glucose,...). Cela ouvre des perspectives intéressantes concernant l'étude de l'action de ces constituants des vins de Champagne sur de pathologies diabétiques. Dans cette optique, l'observation de la modification des produits avancés de la réaction de Maillard semble être une piste intéressante dans la compréhension des mécanismes liés à cette pathologie.

Les résultats de nos travaux permettent d'ores et déjà d'avancer une allégation santé en ce qui concerne une consommation modérée de vin de Champagne. Mais au delà de ce constat immédiat, ils ouvrent des perspectives de recherches qui méritent d'être exploitées dans de nombreux domaines. La voie est ouverte et, le vin de Champagne pourra probablement être considéré à terme comme un vin blanc possédant des propriétés biologiques dignes des vins rouges, méritant à ce titre toute notre attention.

TROISIÈME PARTIE
PARTIE EXPÉRIMENTALE

1. Généralités

Le plan adopté dans la présentation de ces résultats expérimentaux est le même que celui emprunté au cours de la partie théorique.

1.1. Appareillage

1.1.1 Ultraviolet

Les spectres ultraviolets (UV) sont mesurés en solution dans le méthanol sur un spectrophotomètre JASCO V530.

1.1.2 Résonance Magnétique Nucléaire

Les spectres de résonance magnétique nucléaire (RMN) ^1H et ^{13}C sont enregistrés en solution dans un solvant deutérié précisé dans chaque cas, à 303K sur un spectromètre BRUKER DRX-500 opérant à 500,13 MHz pour le proton et à 125,03 MHz pour le carbone, ou un spectromètre BRUKER AMX-300, opérant à 300,13 MHz pour le proton et à 75,03 MHz pour le carbone. L'acquisition est réalisée grâce au logiciel XWinNMR, le retraitement des données est effectué par le logiciel MestreC.

1.1.3 Spectrométrie de masse

Les spectres de masse sont réalisés à l'aide d'un spectrographe de masse de type FINNIGAN LCQ Advantage. Cet appareillage se divise en quatre parties :

- La source électrospray, qui est directement reliée à l'HPLC par un capillaire en verre. L'azote servant à nébuliser le liquide est connecté sur le devant de la source.
- La région API (Atmospheric Pressure Ionization): les ions électrosprayés traversent un capillaire chauffant (180-250°C) qui a pour fonction l'élimination complète du solvant, puis ils sont dirigés vers le tube lens qui a une tension entre 0 et ± 60 V (*tube lens offset voltage*). Cette tension sert à aider à la désolvation par l'accélération des ions. L'écumoire sert de zone tampon entre la « haute » pression de la région API (1 Torr) et la « basse pression » (10^{-3} Torr) des octapôles. La zone entre le *tube lens* et l'écumoire est celle de la fragmentation CID (*Collision induced Dissociation*), car la pression résiduelle est suffisante pour induire une collision entre les différents ions.
- Les octapôles, qui servent uniquement à transférer les ions de la région API à la trappe ionique et à éliminer les ions instables et métastables produits au cours du

déplacement. Les deux octapôles sont reliés par des lentilles (*interoctapole lenses*) qui focalisent les ions durant leur transfert.

- La trappe ionique : elle est l'analyseur de masse du LCQ. Grâce aux différents modes de scans, nous avons pu effectuer plusieurs types d'analyses suivant l'information recherchée. Les ions à analyser sont ensuite expulsés de la trappe vers la dynode, puis vers le multiplicateur d'électrons.

En général, les conditions suivantes ont été appliquées :

Tension de la source : 5 kV en positif et -3.5 kV en négatif

Température du capillaire : 210 °C

Flux d'azote : 900 mL/min

Flux auxiliaire d'azote : 300 mL/min

Tube lens offset : -40 à +40 V

Tension du capillaire : -30 à +30 V

Ces paramètres ne sont pas exhaustifs. Ils varient en fonction de la sensibilité de la méthode et de la calibration de l'appareil.

1.2. Méthodes chromatographiques

1.2.1 Chromatographie sur couche mince (CCM)

Les conditions d'analyse sur CCM sont les suivantes :

- Support : silice 60F₂₅₄ (MERCK, Référence 5554) sur une feuille d'aluminium 0,2 mm.
- Solvant de migration : **solvant I (SI)** = CHCl₃/MeOH/AcOH (v/v/v = 90/10/3)
- Solvant de migration : **solvant II (SII)** = CHCl₃/MeOH/H₂O (v/v/v = 65/35/5)

La révélation s'effectue par pulvérisation du réactif à l'anisaldéhyde suivi du chauffage de la plaque à 300 °C.

Composition du réactif à l'anisaldéhyde

Anisaldéhyde	25 mL
Acide acétique concentré	5 mL
Ethanol	450 mL
Acide sulfurique concentré	25 mL

1.2.2 Chromatographe de Partage Centrifuge

L'appareil de CPC utilisé est une **CPC EverSeiko LLB-M** dont les caractéristiques techniques sont définies ci dessous :

Vitesse de rotation	0-2000 RPM
Matériau des disques de partage	Poly-phénylènesulfide (PPS)
Pression maximum	60 bars
Cellules de partage	2136
Longueur des cellules	15 mm
Section des cellules	0,0588 cm ²
Dimension du rotor	Ø 200 mm ; H 75 mm
Rayon de centrifugation moyen	82,5 mm
Capacité de la colonne	230 ml
Poids du rotor	9,3 kg
Dimensions (LxPxH)	310x470x500 (mm)
Poids total	45 kg
Pompes	Bischoff têtes préparatives (0,1 -19,9 ml/min)
Collecteur	SuperFrac Pharmacia Biotech

Cette CPC nous permet de travailler selon deux modes d'élution :

- **ascendant** : quand la phase supérieure est choisie comme phase mobile,
- **descendant** : quand la phase inférieure est choisie comme phase mobile.

Quelle que soit la manipulation, le système de solvants **Q1** est toujours le même :

- Hexane : 1 volume
- Acétate d'éthyle : 8 volumes rectifiés
- Ethanol : 2 volumes filtrés sur filtres GHP 0,45 µm
- Eau : 7 volumes MilliQ 18,2 MΩ.

En premier lieu, la colonne est vidée du méthanol qu'elle contient en le remplaçant par de la phase stationnaire (débit de 8 ml/min). Une fois la colonne remplie de phase stationnaire, le rotor est mis en marche (1000 RPM). Après équilibre, de la phase mobile est pompée avec un débit de 5 ml/min. A l'équilibre de la colonne, la pression stabilisée est de 27 à 28 bars en mode ascendant, et de 12-13 bars en mode descendant.

Une fois les pressions stabilisées, environ 2 g d'échantillon sont injectés, puis récupérés dans des tubes à essai en sortie de colonne grâce à un collecteur de fractions (5 minutes par tubes). L'ensemble des tubes est ensuite déposé sur chromatographie en couche mince (solvant de migration S1), révélé sous UV à 254 et 365 nm, puis à l'anisaldéhyde.

1.2.3 Chromatographie liquide haute performance (CLHP)

L'échantillon analysé est dissous dans l'éluant de départ (H₂O) et filtré sur un filtre Millipore (0,45 µm).

Éluant A : H₂O / TFA (v/v = 100/0,025 ; soit 25 µL TFA/L de H₂O)

Éluant B : MeOH / TFA (v/v = 100/0,025 ; soit 25 µL TFA/L de MeOH)

Le gradient d'élution est linéaire sur 60 minutes pour le mode analytique.

	0 minute	60 minutes
Éluant A	100 %	0 %
Éluant B	0 %	100 %

Ce même gradient est adapté sur 120 minutes pour la séparation en semi-préparative.

Caractéristique des appareillages CLHP

	<i>Mode analytique</i>	<i>Mode semi-préparatif</i>
Pompes binaires	Waters 1525	
Détecteur	PDA Waters 2996	
Injecteur	Waters autosampler 717 Plus	
Pré-colonnes	Symmetry C18 Longueur = 1 cm Diamètre des particules = 5 µm Diamètre interne = 5 mm	Ultrasep RP18 Longueur = 2,5 cm Diamètre des particules = 6 µm Diamètre interne = 5 mm
Boucles d'injection	20 µL	1 ml
Colonnes	C18 Symmetry 4,6 x 250 mm, 5 µm	Ultrasep RP18, 8 x 250 nm, 6 µm
Température	30 °C	
Logiciel	Système Empower [®] : acquisition et retraitement des données	

1.2.4 HPLC/MS

Les analyses LC/MS ont été effectuées sur le LCQ de Thermofinnigan (USA) en mode positif ou négatif. Le flux provenant de l'HPLC est séparé par un *Split* post-colonne, ainsi 90% du solvant est éliminé et 10% sont introduits dans la source ESI. Les paramètres utilisés sont identiques à ceux décrits précédemment au paragraphe 1.1.3.

2. Isolement des substances actives du Champagne

2.1. Extraction par des solvants à polarité croissante

À partir d'une bouteille de champagne dégazée par agitation magnétique, puis concentrée sous pression réduite à l'évaporateur rotatif sans jamais dépasser 40°C et à l'abri de la lumière, nous obtenons en moyenne 15 grammes d'un composé brun, sirupeux et odorant.

Celui-ci est dissous dans 75 ml d'eau distillée sur lequel nous effectuons des extractions successives par des solvants de polarités croissantes :

2.1.1 Extraction par l'hexane (EVC-SPC-h).

La solution aqueuse est extraite par 3 fois 90 ml d'hexane. La phase organique recueillie après décantation est séchée sur Na₂SO₄ puis évaporée à sec. On récupère ainsi 28 mg d'un résidu d'aspect gras, transparent et odorant (Rdt = 140 mg/L du champagne initial).

2.1.2 Extraction par du chloroforme (EVC-SPC-chloro)

La phase aqueuse précédente est extraite par 3 fois 90 ml de chloroforme, puis les mêmes étapes que précédemment sont effectuées. On récupère 116 mg d'un résidu jaune, huileux et odorant. (Rdt = 580 mg/L du champagne initial).

2.1.3 Extraction par du dichlorométhane (EVC-SPC-dichlo)

La phase aqueuse précédente est extraite par 3 fois 90 ml de chlorure de méthylène, puis les mêmes étapes que précédemment sont effectuées. On récupère 16 mg d'un composé gras, transparent et odorant. (Rdt = 80 mg/L du champagne initial).

2.1.4 Extraction par l'acétate d'éthyle (EVC-SPC-ae)

La phase aqueuse est extraite par 3 fois 90 ml d'AcOEt, puis les mêmes étapes que précédemment sont effectuées. On récupère 317,4 mg d'un résidu jaune, huileux et odorant (Rdt = 1,580 g/L du champagne initial).

2.1.5 Extraction au butanol-1 (EVC-SPC-but)

La phase aqueuse est extraite par deux fois 90 ml de butanol-1, puis les mêmes étapes que précédemment sont effectuées. On récupère 777 mg d'un résidu brun et odorant. (Rdt = 3,88 g/L du champagne initial)

2.2. Protocole d'extraction des Champagnes de Blancs de Blancs

Dix bouteilles de champagne BB, dégazées par agitation au barreau magnétique, sont évaporées sous pression réduite à une température n'excédant pas 40° C, sous atmosphère inerte et à l'obscurité maximale afin de ne pas détériorer le pool polyphénolique.

Nous obtenons pour l'ensemble des fractions $158,54 \pm 9,34$ grammes ($n=14$) d'un résidu brun, sirupeux et odorant (**Rdt : 21,10 g/l**).

Le résidu d'évaporation des 10 bouteilles (150 ml, environ) est dissous à nouveau dans 450 ml d'eau distillée pour donner une solution d'un volume total de 600 ml.

Cette phase aqueuse est extraite par 3 fois 800 ml d'acétate d'éthyle rectifié.

- La **phase aqueuse** résiduelle **EVC-BB-H₂O** notée **DA_{BB}** fournit en moyenne $111,07 \pm 11,97$ g d'un résidu brun foncé et très sirupeux.
- La phase organique **EVC-BB-AcOEt** est séchée sur Na₂SO₄ puis évaporée sous pression réduite. Nous obtenons $17,45 \pm 1,43$ grammes d'un résidu brun clair odorant (Rdt : 2,32 grammes/litres).
- L'extrait organique est ensuite repris dans 200 ml d'acétate d'éthyle rectifié, puis extrait par 3 fois 300 ml d'eau MilliQ (18,2 MΩ.cm sur un appareil PureLab ELGA®). Par évaporation sous vide de la phase organique séchée sur Na₂SO₄, nous obtenons 510 ± 60 mg de résidu brun et odorant **EVC-BB-AcOEt_{amQ}** notée **DC_{BB}**
- La phase **aqueuse MilliQ** résiduelle **EVC-BB-mQ** notée **DB_{BB}** après concentration maximale livre $15,34 \pm 1,25$ g de résidu.

2.3. Protocole d'extraction des Champagnes Blancs de noirs

Hormis la phase de concentration initiale des vins de Champagne BN effectué par une société externe, le protocole employé est identique à celui utilisé pour la séparation des Champagne Blanc de Blancs, décrit en 2.2. Pour mémoire, une brève description est faite ici :

Afin de pouvoir obtenir des valeurs moyennes d'extraction et leurs écarts type respectifs, les 7 premières extractions ont été réalisées sur des pots de 150 grammes indépendants (NB : un pot de 150g représente en moyenne le poids résiduel de concentration de 10 bouteilles de Champagne.). Les 10 autres pots ont été extraits en deux fois 5 pots.

Pour ce faire, 1 pot (soit 150g de concentrât) est repris dans un volume final d'eau distillée de 600 ml. Cette phase aqueuse est ensuite extraite par trois fois 800 ml d'acétate d'éthyle rectifié.

- La phase aqueuse **EVC-BN-H₂O** notée **DA_{BN}** résultante est concentrée sous pression réduite et nous fournit **124,04 ± 22,03 g** d'un composé odorant, brun foncé et sirupeux.
- La phase organique **EVC-BN-AcOEt** obtenue est, quant à elle, dissoute dans 200 ml d'acétate d'éthyle rectifié, puis extraite par 3 fois 300 ml d'eau MilliQ (18,2 MΩ.cm sur un appareil PureLab ELGA®).

A ce stade nous obtenons deux fractions distinctes : la phase organique **EVC-BN-AcOEt_{amQ}** notée **DC_{BN}** qui après séchage sur Na₂SO₄ nous livre **700 ± 80 mg** d'un composé brun clair (couleur « or » en solution), très odorant et légèrement sirupeux et la phase aqueuse MilliQ **EVC-BN-mQ** notée **DB_{BN}** qui après concentration sous pression réduite nous fournit **13,80 ± 1,68 g** d'un composé marron clair, odorant et légèrement sirupeux.

2.4. Dosage des polyphénols totaux par la méthode de Folin-Ciocalteu

Le mélange d'acide phosphotungstique (H₃PW₁₂O₄₀) et l'acide phosphomolybdique (H₃PMo₁₂O₄₀) est réduit par les phénols en un mélange d'oxydes bleus : W₈O₂₃ et Mo₈O₂₃.

La coloration bleue possède alors un maximum d'absorption à 760 nm et est proportionnel au taux de composés phénoliques.

Le réactif de Folin-Ciocalteu (Merck KGaA, réf 109001) est dilué au 1/10 et 2.5 ml sont ajoutés à 0.5 ml d'échantillon. Après 2-3 min, 2 ml de carbonate de sodium (Na₂CO₃) à 75g/L est ajouté Le mélange au préalable vortexé est mis au bain marie 5 min à 50°C. Au bout de 5 min le tube est refroidi dans la glace et l'absorbance est lue à 760 nm. La manipulation est réalisée en triplicat pour chaque échantillon, nous permettant d'obtenir une moyenne et un écart type.

Pour interpréter les résultats, une courbe étalon est réalisée en présence d'acide gallique à des concentrations variant de 0.001mg/ml à 0.005mg/ml, permettant d'obtenir une réponse linéaire en absorbance (i.e.< 0.5). Afin de respecter les conditions de linéarité, les échantillons sont alors dilués. Ainsi, les phases organiques DC_{BB} et DC_{BN} sont diluées au 1/10000, les phases aqueuses DB_{BB} et DB_{BN} et DA_{BB} et DA_{BN} sont diluées au 1/1000. L'acide gallique ayant servi de référence est quant à lui dilué au 1/100.

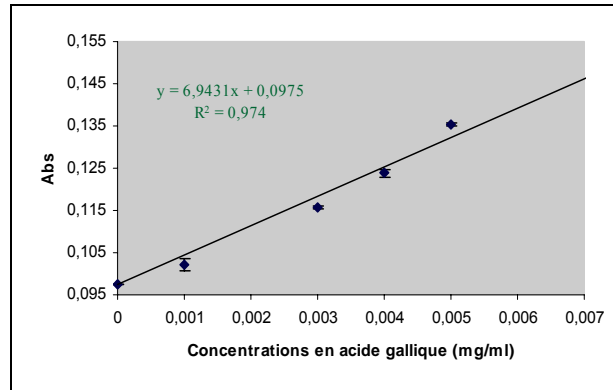


Figure 40: Courbe de calibration de l'acide gallique

2.5. Analyse structurale des molécules du Champagne

2.5.1 Protocole d'extraction de la PPO

- 450 ml de moût provenant de Pinot meunier (Plumecoq), vendanges 2003, ont été centrifugés pendant 5 minutes à 4000 tours/minutes, à 4°C ; le culot a été mis en suspension dans 80 ml de tampon acétate de sodium (pH 4, 0,1M) supplémenté avec de l'acide ascorbique (10g/L) centrifugé à 4000 tours/minutes pendant 5 minutes. Le culot a été repris dans 50 ml de tampon dilué au 1/2 auquel on a ajouté 1% de Triton X-100 (Sigma).
- La suspension a alors été soumise aux ultrasons pendant 30 minutes puis centrifugée à 8000 tours/minutes pendant 10 minutes.
- On a récupéré le surnageant qui a été additionné d'acétone jusqu'à obtenir un mélange acétone : tampon 80 : 20 (v/v). L'ensemble a été placé au congélateur pendant 3 heures pour faire flocculer les protéines.
- Après élimination d'un maximum de surnageant par pipetage, le précipité en suspension a été centrifugé 10 minutes à 4000 tours/minute.
- Le culot a été lyophilisé. Il a constitué alors l'extrait enzymatique soluble de la polyphénoloxydase du raisin noté PPO S. Cet extrait a été conservé au congélateur à -18°C.

2.5.2 Dosage des protéines selon la méthode de Bradford

C'est une des méthodes les plus sensibles, la gamme de détection des protéines allant de 0 à 25µg/ml [184]. Cette méthode fait appel à la coloration des protéines par le bleu de

Coomassie. L'intensité est proportionnelle à la quantité de protéines contenues dans le tube à essai.

Le réactif de Bradford est préparé extemporanément (10 mg de Bleu de Coomassie G 250, 5 ml d'éthanol, 10 ml d'acide phosphorique à 85%).

Une courbe étalon est établie avec de la Sérum Albumine Bovine (SAB) pour des concentrations comprises entre 0.2 g/l à 1g/l. La mesure est faite à 595 nm avec 50 µl de suspension protéique et 2,5 ml de réactif, après 5 min d'incubation à température ambiante.

2.5.3 Dosage de l'activité de la PPO par polarographie

Le dosage est effectué par une méthode polarographique de mesure de la consommation d'oxygène, à 30 °C, au moyen d'un oxymètre OXI 196 (WTW, Allemagne) équipé d'une électrode de Clark EOT 196 et connecté à un enregistreur LKB Bromma 2210.

7.8 ml de substrat, solution de 10mM de 4-méthyl catéchol dans un tampon phosphate-citrate (tampon Mc Ilvaine 0.1 M à pH 4.6), ont été déposés dans la cellule de mesure sous agitation magnétique. Lorsque la température de la solution a été équilibrée à 30°C, l'incubation a été déclenchée par ajout de 200 µl de suspension enzymatique (diluée à 1mg/ml dans du tampon Mc Ilvaine).L'électrode a été immédiatement enfoncée dans la cellule en prenant soin de ne laisser aucune bulle d'air sur la membrane.

Le tracé obtenu représente la consommation d'oxygène du milieu en fonction du temps. La tangente à l'origine donne l'évolution de la concentration en oxygène en fonction du temps et permet de calculer la vitesse de consommation d'oxygène.

2.5.4 Préparation du GRP

Dans un volume réactionnel aéré aqueux de 2ml, sous agitation magnétique, du phosphate hydrogenotartrate (2.5g/L), l'acide caftarique et du Glutathion réduit GSH en excès (5/1, p/p) ont été ajoutés. La PPO est ensuite ajoutée à une concentration de 6g/L. Le mélange formé au bout de 2h est passé en HPLC pour vérifier la formation de GRP.

3. Propriétés biologiques des extraits de vin de Champagne

3.1. Effets protecteurs des EVC sur des mitochondries de cerveau de rat

Pour pouvoir travailler en concentration molaire, des poids moléculaires moyens sont affectés à chacune des fractions.

- Échantillon DC_{BB}: PM = 150
- Échantillon DC_{BN}: PM = 150
- Échantillon DB_{BB}: PM = 330
- Échantillon DB_{BN}: PM = 330

Les échantillons DC_{BB} et DC_{BN} sont dissous dans le diméthyl formamide à la concentration de 1 M.

Les échantillons DB_{BB} et DB_{BN} sont dissous dans l'eau distillée à la concentration de 1 M.

3.1.1 Préparation des mitochondries

Les mitochondries sont obtenues à partir d'un encéphale de rat (Wistar mâle ; 280-300g) prélevé le plus rapidement possible après décapitation. Après avoir enlevé les méninges, l'encéphale est homogénéisé dans un Potter Elvehjem (6 aller-retours) contenant 6 ml de tampon Tris-HCl 20 mM, saccharose 250 mM, KCl 40 mM, EGTA 2 mM, Sérum Albumine Bovine (SAB) 1 mg/ml, pH 7.2 à 4°C. Cet homogénat est centrifugé à 2000 g dans un rotor à angle fixe SM 24 pendant 8 min. Le surnageant est ensuite centrifugé à 12 000 g pendant 10 min. Le culot mitochondrial est remis en suspension avec 300 µl d'un tampon KH₂PO₄ 10 mM, mannitol 300 mM, KCl 10 mM, MgCl₂ 5 mM, pH 7.2 à 37°C. La suspension mitochondriale est impérativement conservée à 4°C et sa concentration protéique déterminée par la méthode de Lowry.

3.1.2 Consommation d'oxygène dans le modèle d'anoxie-réoxygénation

La consommation d'oxygène est déterminée à l'aide d'une microélectrode de Clark (Hansatech[®], UK). L'anoxie est réalisée comme suit : 200 µg de mitochondries cérébrales sont introduits dans 200 µl de tampon de respiration (KH₂PO₄ 10 mM, mannitol 300 mM, KCl 10 mM, MgCl₂ 5 mM, pH 7.2 à 37°C) présent dans une chambre d'incubation fermée à 37°C. Le substrat utilisé est un mélange malate/glutamate (10/10 mM). Les conditions d'anaérobiose sont obtenues après l'ajout d'ADP (0.2 mM) dans les deux minutes qui suivent.

L'anoxie est alors continuée pendant 5 min puis la réoxygénation est obtenue par l'ajout de 300 μ l de tampon de respiration et continuée pendant 5 min. La chambre d'incubation est alors fermée et la consommation d'oxygène est mesurée à la fois après l'ajout de 0.2 mM d'ADP (Etat 3) et lorsque tout l'ADP est converti en ATP (Etat 4). Le contrôle respiratoire (CR) est exprimé comme le rapport Etat 3 / Etat 4. Les témoins sont réalisés dans les mêmes conditions mais sans anoxie. Les molécules à tester sont ajoutées soit avant l'anoxie, soit avant la réoxygénation.

3.1.3 Analyse statistique

Pour chaque expérience, les valeurs moyennes ou les pourcentages sont comparés par une analyse de variance à un facteur et un test de Dunnett, à l'aide du logiciel Micropharm[®].

3.2. *Protocole de l'étude du transport*

3.2.1 Détermination du coefficient de perméabilité

Le jour de l'expérience, une solution de Ringer-HEPES (NaCl, 150 mM ; KCl, 5,2 mM ; CaCl₂, 2,2 mM ; MgCl₂ 6H₂O, 0,2 mM ; NaHCO₃, 6 mM ; HEPES, 5 mM ; glucose 2,8 mM) est placée dans le compartiment inférieur d'une boîte à 6 puits (2,5 ml par puits).

Un filtre recouvert d'une couche de cellules endothéliales est transféré dans le premier puits de la boîte à 6 puits. 1,5 ml de la solution de Ringer-HEPES contenant la molécule à tester sont placés dans le compartiment supérieur du filtre. Aux temps choisis après addition de la molécule, les filtres sont transférés dans un autre puits de la boîte à 6 puits afin de réduire au maximum le passage possible de la molécule du compartiment inférieur au compartiment supérieur (Figure 41).

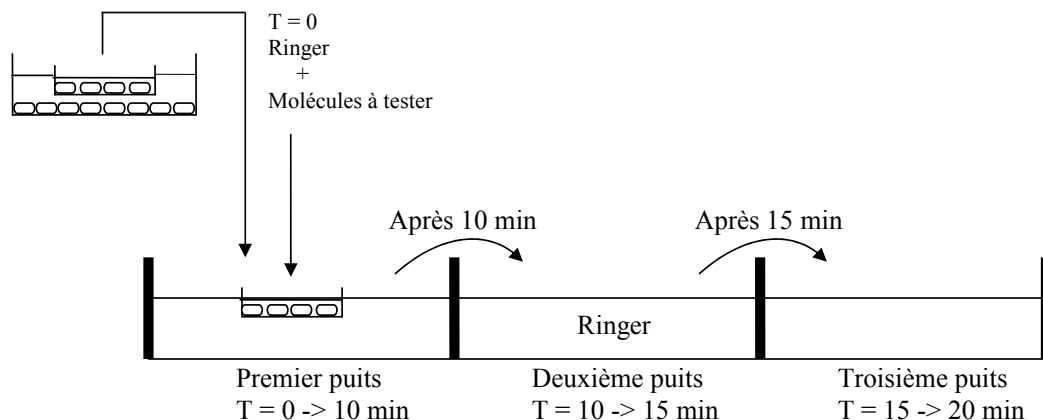


Figure 41: Schéma de l'étude du transport des molécules à travers la monocouche de cellules endothéliales de capillaires cérébraux

Les expériences sont réalisées en triplicat avec des filtres couverts d'une monocouche de cellules endothéliales de capillaires cérébraux ou de collagène seul comme témoin. Ceux-ci sont placés sous agitation et à 37°C tout au long de l'expérience.

La quantité de substance est déterminée dans les différents compartiments inférieurs et supérieurs en comptant la radioactivité pour les molécules marquées (¹⁴C-Saccharose ou ³H vincristine dans nos études).

3.2.2 Etude de la restauration de la synthèse d'ATP après hypoxie

3.2.2.1 *Mise en hypoxie*

Les cellules sont utilisées trois à six semaines après la mise en culture selon un modèle d'hypoxie décrit par Plateel et coll. en 1995 [195]. Le milieu est changé 24 heures avant la mise en hypoxie, afin de reconstituer les réserves en ATP. Après addition de milieu de culture dégazé en O₂ et contenant une concentration de 1 µM des molécules à tester, l'hypoxie est réalisée dans un caisson anaérobie pour une durée de 24 heures (Cf. Figure 42).

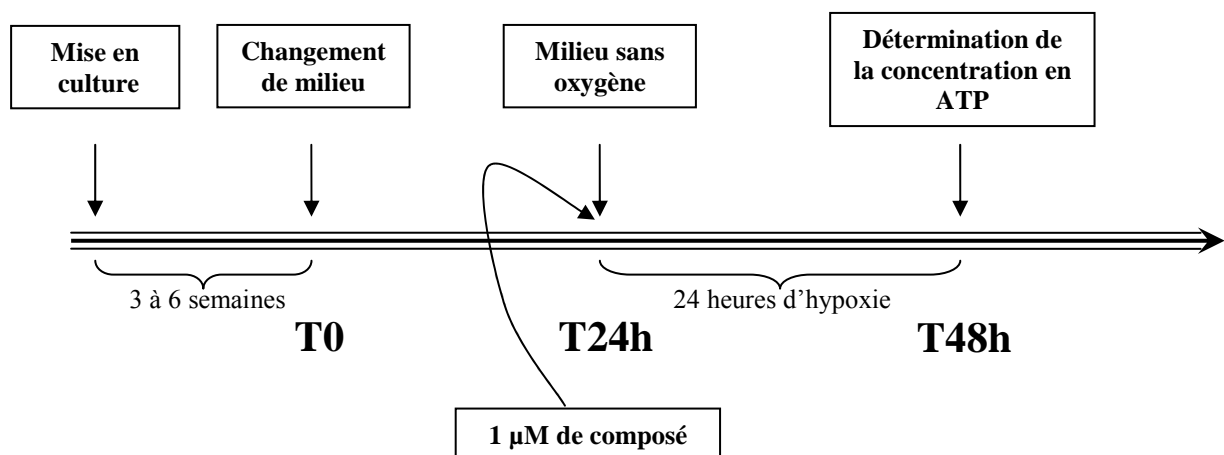


Figure 42: Schéma des étapes nécessaires à l'étude de la restauration de la synthèse d'ATP

3.2.2.2 *Détermination de la concentration en ATP*

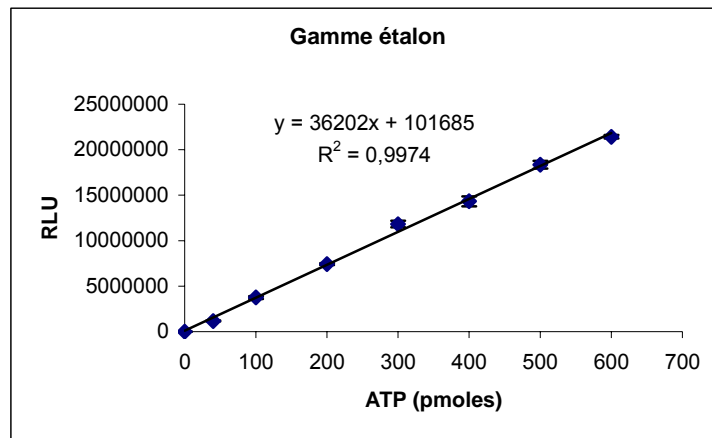
Après 24 heures d'hypoxie, les cellules sont lavées trois fois par 2 ml de PBS CaMg dans le caisson anaérobie, puis celles-ci sont récupérées dans 400 µl de tampon de lyse dilué au 1/10 et enfin transférées dans des micro-tubes de 1 ml. Une fois le tampon de lyse déposé sur les cellules, le travail est effectué à l'extérieur du caisson anaérobie. Les micro tubes sont placés à 100 °C pendant 5 minutes, puis centrifugés à 10 000 tr/min pendant 5 minutes à la

température de 4 °C. Le dosage de l'ATP (Kit Sigma *FL-ASC Bioluminescent somatic cell assay kit*) est effectué sur le surnageant et le dosage des protéines est effectué dans le culot.

Chaque produit est étudié dans les conditions suivantes :

- témoin normoxie
- témoin hypoxie : hypoxie de 24 heures en absence de produit
- molécules à tester : hypoxie de 24 heures en présence de 1 µM de la molécule à tester.

Chaque condition est réalisée sur 3 puits.



La lumière relative à la concentration en ATP est mesurée par un luminomètre de type LUMAT LB 9501 et est exprimée en RLU.

Le calcul de la quantité d'ATP est effectué selon la formule suivante :

$$\text{Quantité d'ATP} = \frac{RLU - b}{a} \times \frac{400}{10}$$

a et b sont obtenus à partir de la gamme étalon et correspondent à la pente et à l'ordonnée à l'origine respectivement.

400/10 correspond au facteur de dilution.

3.3. Protocole d'étude pour la protection des cellules PC12 par les EVC

En règle générale, les cellules PC12 sont cultivées en milieu DMEM (Dubelco's Modified Eagle Medium, pH 7,5 ; 4,5 g/L de glucose, Cambrex, Belgique) supplémenté avec 10 % de sérum de veau fœtal (SVF, Cambrex, Belgique), 5 % de sérum de cheval (HS, Gibco-Life

technology, France), 4 mM de L-Glutamine, 100 U/ml de Pénicilline et 50 µg/ml de Streptomycine, à 37°C dans une atmosphère humidifiée contenant 5% de CO₂.

Le passage des cellules s'effectue par détachement après traitement par de la trypsine 0,25% dans du PBS (130 mM NaCl, ; 2,7 mM de KCl, ;5 mM de Na₂HPO₄, 12 H₂O ; 1,7 mM de KH₂PO₄, pH 7,4) pendant 5 minutes à 37°C. Les cellules PC12 sont ensuite passées à travers d'une seringue pour être correctement dissociées.

Pour notre étude le milieu de culture est dépourvu des sérums, conduisant inexorablement les cellules en apoptose.

A cette culture cellulaire sont ajoutés 1µM de DC_{BB} et DC_{BN} (la masse moléculaire utilisée est celle employée pour les études effectuées sur les mitochondries isolées de cerveau de rat : 150 g/mol).

La mesure est ensuite effectuée en ajoutant de la Rhodamine 123 et de la Déhydrorhodamine avant de lire au cytomètre de flux (Becton Dickinson, Faescalibur).

3.4. Protocole d'étude par microscopie confocale

Les cellules PC12 sont cultivées dans du milieu DMEM supplémenté avec 10 % de sérum de veau fœtal (SVF, Cambrex, Belgique), 5 % de sérum de cheval (HS, Gibco-Life technology, France), 4 mM de L-Glutamine, 100 U/ml de Pénicilline et 50 µg/ml de Streptomycine, à 37°C dans une atmosphère humidifiée contenant 5% de CO₂.

Pour les expérimentations d'internalisation, les cellules sont placées sur des lamelles recouvertes de poly-L-lysine dans une boîte à 6 puits, à la concentration initiale de 5x10⁴ cellules et recouvertes de 1 ml de milieu de culture. Toutes les substances testées sont ajoutées aux cultures un jour après l'ensemencement (désigné comme le jour 0), dans le but de s'assurer de l'attachement des cellules au départ des expérimentations.

Pour les manipulations d'internalisation, le milieu de culture est enlevé et les cellules sont lavées trois fois par du PBS. Après traitement (DC_{BB} et DC_{BN} à 300 µM), les cellules sont rapidement lavées avec du PBS et fixées par 4% de formaldéhyde pendant 15 minutes.

Les lamelles sont ensuite lavées deux fois par du PBS et sont retournées sur la surface d'une lame pour microscope contenant une goutte de Mowiol.

La préparation microscopique ainsi effectuée est observée par microscopie confocale de fluorescence sur un microscope LEICA TCS SP avec un laser Argon-Krypton. L'analyse est effectuée grâce au logiciel LEICA TCS SP (Heildeberg GmbH).

Pour l'observation au microscope, deux filtres d'excitation sont employés, 488 et 568 nm, les fenêtres d'émission étant quant à elles comprises entre 500 et 540 nm pour le vert, et 610 à 660 nm pour le rouge.

Le laser est réglé à 60 % de son intensité, avec un PMT (photomultiplicateur) de 900 et un nombre de scans de 3.

3.5. Protocole de viabilité et de prolifération cellulaire

3.5.1 Etude de la prolifération cellulaire

Les lignées U266, K562, Jurkat, Raji et THP1 sont incubées en présence des molécules actives du Champagne à la concentration de 1.10^4 cellules par puits dans une microplaque 96 puits.

Les molécules testées sont à la concentration de 1, 10, 25, 50, 75 et 100 $\mu\text{g/ml}$.

Les cellules sont ensuite dénombrées sur cellule de Malassez en présence de bleu trypan.

3.5.2 Préparation du milieu de culture et des cellules :

Les cellules U266 sont dénombrées au microscope sur cellule de Malassez en présence de bleu Trypan.

A partir de ce comptage, 1.10^5 cellules sontensemencées en présence de 10% de Sérum de Veau Fœtal (SVF, Cambrex), Pénicilline/Streptomycine 1X (Cambrex), et milieu de culture RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute, Cambrex) dans une boîte 96 puits à fond plat.

3.5.3 Préparation des solutions de molécules à tester :

Les solutions mères des échantillons à tester sont préparées à 200 $\mu\text{g/ml}$ en présence d'éthanol à 4%. Nous décidons de faire une étude sur une gamme de 5 concentrations comprises entre 0,01 $\mu\text{g/ml}$ et 100 $\mu\text{g/ml}$ notées D1 à D5 :

Dilution D1 : 250 μl de la solution mère à 200 $\mu\text{g/ml}$ des molécules à tester + 250 μl de RPMI

Dilution D2 : 50 μl de la solution D1 + 450 μl de RPMI

Dilution D3 : 50 μl de la solution D2 + 450 μl de RPMI

Dilution D4 : 50 μl de la solution D3 + 450 μl de RPMI

Dilution D5 : 50 μl de la solution D4 + 450 μl de RPMI

Un contrôle en présence d'éthanol est réalisé en employant les mêmes dilutions.

Une fois les dépôts effectués sur la plaque 96 puits, les cellules sont placées dans un incubateur pendant 4 jours à 37°C, 5% de CO₂.

Avant d'être analysées, les cellules sont lavées deux fois au PBS (Phosphate Buffer Saline) pH = 7,4-7,5 et centrifugées 5 minutes à 1500 tr/min à 10°C.

Le surnageant est retiré et on ajoute 500 µl de PBS, puis extemporanément 5 µl d'iodure de propidium.

Les cellules sont ensuite analysées par cytométrie en flux au FACS (fluorescence-activated cell sorter) Becton Dickinson.

3.6. Inhibition de l'acétylcholinestérase par les polyphénols de Champagne

Les extraits de vin de Champagne sont dilués à une concentration de 5 mg/ml dans de l'éthanol. L'AchE (1000U) est dissoute dans 150 ml de tampon Tris-HCl 0,05M pH 7.8.

De la sérum albumine bovine (150 mg) est ajoutée à la solution dans le but de stabiliser l'enzyme pendant le bio essai. La solution stock enzymatique est alors conservée à 4°C. Les plaques CCM sont préalablement éluées avec un solvant de nettoyage (acétone) puis séchées afin de faire disparaître les éventuelles traces résiduelles de solvant juste avant utilisation. Les composés sont élués dans le solvant de migration SI ou SII. Le contrôle positif est réalisé avec de la Physostigmine (ésérine) dans le solvant de migration SII. La plaque est séchée, puis sprayée par la solution enzymatique et incubée pendant 20 minutes à 37°C dans une atmosphère humide (conditions optimales de l'activité enzymatique). Pour la détection de l'enzyme, une solution d'acétate de 1-naphtyl (250mg) dans 100 ml d'éthanol et de sel de Fast Blue B (400mg) dans 160 ml d'eau MilliQ sont préparées. Après incubation, 10 ml de la solution de naphtyl acétate et 40 ml de Fast Blue B sont mélangés puis sprayés sur la plaque pour donner une coloration violette après 1 à 2 minutes [198].

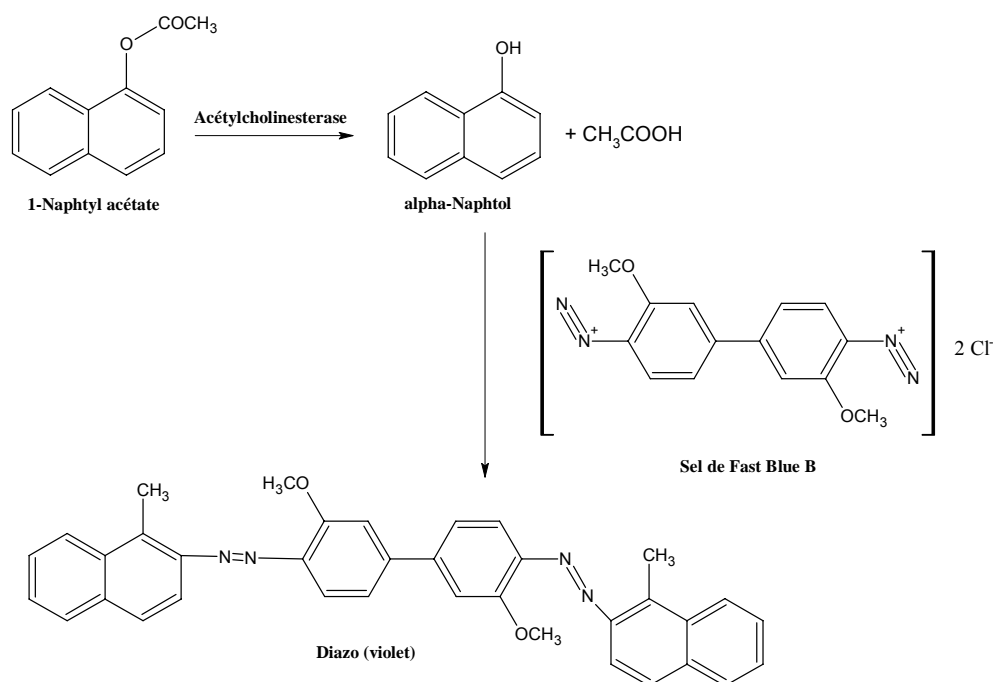


Figure 43: Principe du test d'inhibition de l'acétylcholinestérase

3.7. Potentiel antioxydant des vins de Champagne

3.7.1 Mesure du pouvoir antioxydant par la méthode DPPH

Une solution de 100 μM de DPPH est mélangée avec différentes concentrations de la molécule à tester (de 0,5 à 2000 μM).

Pour les manipulations, la masse molaire employée est la moyenne des masses des 19 composés polyphénoliques déjà décrits dans la littérature [30]: 257,6 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$.

Ce mélange est ensuite dosé par spectrophotométrie UV à 515 nm (spectrophotomètre UV/Vis Hitachi U2000). Les densités optiques mesurées permettent de calculer le pourcentage d'inhibition de l'oxydation par la substance et donc de connaître son caractère antioxydant par la formule suivante :

$$\% \text{ Inhibition} = \left\{ \frac{[\text{DO} (100\%) - \text{DO} (\text{Extrait})]}{[\text{DO} (100\%)]} \right\} * 100$$

3.7.2 Mesure du pouvoir antioxydant par la méthode TAS

Les échantillons sont préparés à une concentration de 1,65mmol/l. Nous avons considéré un poids moyen des échantillons comme étant de 257,4g/mol (poids moyen des polyphénols contenus dans le Champagne

L'échantillon (20µl) et 1 ml de chromogène (ABTS et metmyoglobine) sont mélangés dans la cuve, une première absorbance A1 est notée. Le substrat est ensuite ajouté (200µl) et l'absorbance A2 est au lue bout de 3 min exactement. Au préalable, un blanc avec de l'eau MilliQ et un étalon (TROLOX) a été mesuré.

	Blanc réactif	Etalon	Echantillon
Eau déionisée	20 µL	---	---
Etalon	---	20 µL	---
Echantillon	---	---	20 µL
Chromogène	1 ml	1 ml	1 ml
Mélanger et lire l'absorbance A1 puis ajouter			
Substrat	200 µL	200 µL	200 µL
Mélanger et démarrer le chronomètre simultanément Lire absorbance A2, après <u>3 minutes très précisément</u>			

Ainsi on peut déterminer le TAS :

$\text{Facteur} = [\text{Concentration de l'étalon} / (\Delta A \text{ blanc} / \Delta A \text{ étalon})]$ $\text{TAS mmol/l} = \text{Facteur} \times (\Delta A \text{ blanc} / \Delta A \text{ échantillon})$
--

3.7.3 Mesure de la capacité antioxydante par la méthode TAC

3.8.1.1 *Mesure en mode manuel*

Les échantillons sont préparés à une concentration de 1,50 mmol/L (équivalente à la concentration du Trolox dans le Kit).

Le kit est constitué de 2 réactifs et d'un calibrateur :

- Réactif 1 (R1) : crocine (10 µmol/L)
- Réactif 2 (R2) : ABAP (50 mg/ml)
- Calibrateur : Trolox (1,50 mmol/L)

La température du spectrophotomètre est réglée à 37 °C et la longueur d'onde à 450 nm.

Ajouter	Cuvette 1	Cuvette 2
Réactif 1	1.25 ml	1.25 ml
Réactif 2	1.25 ml	1.25 ml
Agiter et mesurer l'absorbance (A1) immédiatement		
Calibrateur	10 µl	-
Échantillon	-	10 µl
Agiter et mesurer l'absorbance (A2) après 5 minutes exactement.		
Calculer dA = A2 - A1 pour le calibrateur (dAc) et l'échantillon (dAs)		

Calculer le TAC par la formule suivante :

$\text{TAC}_S = \text{TAC}_C (\text{dA}_S / \text{dA}_C)$

TAC_S = TAC de l'échantillon

TAC_C = TAC du calibrateur (Trolox)

3.8.1.2 Mesure sur automates

La capacité antioxydante plasmatique est mesurée par l'utilisation d'un kit TAC (Medicon Hellas, Gerakas, Grèce) [200].

Toutes les mesures sont effectuées à 37 °C sur un analyseur automatique Olympus AU-600 (Medicon Hellas, Gerakas, Grèce) et selon le protocole suivant :

2 µL d'échantillon, de calibrateur ou de control interne sont mélangés avec 250 µL de réactif à la crocine (R1), et incubés pendant 160 secondes. Juste après l'incubation, 250 µL d'ABAP (R2) sont ajoutés et la décroissance d'absorbance mesurée à 450 nm, est mesurée 256 secondes après l'ajout.

La détermination du TAC est alors obtenue selon la formule décrite au paragraphe précédent.

3.8. Protocole de la mesure du TOC

Dans une plaque de 96 puits, 10 µL de standard (H_2O_2 30 %, 9,79 M) ou de sérum sont mélangés à 200 µL de substrat composé de TMB et Horseradish Peroxydase (HRP) tel que TMB : HRP soit égal à 100 :1.

La solution est laissée 15 minutes pour incubation à l'obscurité. En fin de réaction, 50 µL d'une solution stop 4N de H_2SO_4 sont ajoutés et l'absorbance est lue à 450 nm.

La droite étalon est au préalable effectuée en présence du H_2O_2 30 % (9,79 M) pour les concentrations suivantes : 0 ; 15,625 ; 32,25 ; 62,5 ; 125 ; 250 ; 500 et 1000 µM de peroxyde d'hydrogène.

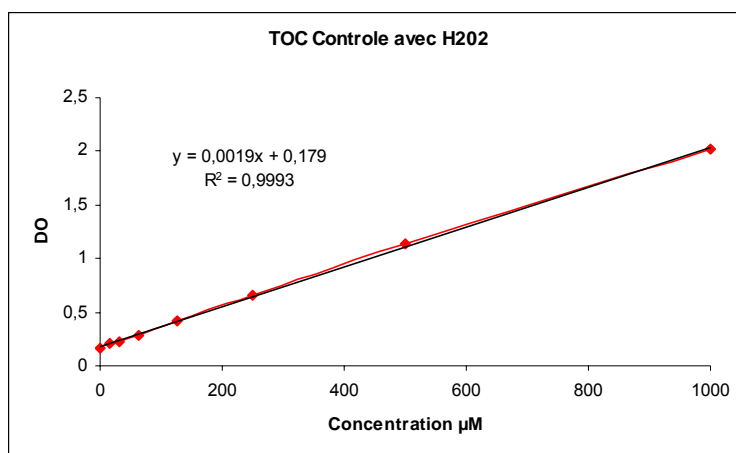


Figure 44: Courbe de calibration du TOC

4. Mécanismes d'action biologique

4.1. Protocole concernant l'apoptose

4.1.1 Préparation du tampon Annexine

	Soit pour 100 ml
10 mM HEPES ajusté à pH 7.4 avec NaOH	0.238 g HEPES
140 mM NaCl	0.818 g NaCl
5 mM CaCl ₂	0.055 g CaCl ₂ ou
	0.5 ml de CaCl ₂ (1M).

Aliquoté par 5 ml, il se garde 1 mois à -20°C.

On prend 1.10^5 cellules par tube (préalablement incubée avec nos molécules + contrôle EtOH et contrôle cellules seules).

Centrifugation 5 minutes à 1500 tr/min

Rinçage 1 fois au PBS

Centrifugation 5 minutes à 1500 tr/min

Ajout de 500 µl de tampon annexine par aliquot de 10 µl d'Annexine V.

Mettre 100 µl de cette solution par tube et vortexer

Laisser 15 minutes à l'obscurité et à température ambiante

Rajouter 500 µl de tampon Annexine dans chaque tube et vortexer

Passer au cytomètre (FACScan) en rajoutant extemporanément 5 µl d'IP à 1 mg/ml.

4.2. Protocole concernant le cycle cellulaire

4.2.1 Solution d'IP

25µg/ml d'IP

0.1% en poids/volume de tri-sodium citrate dihydrate

10 % volume/volume de solution de RNase (RNase-A, 1 mg/ml dans du PBS avec 0,5 mM EDTA).

0,1% v/v de TRITON X-100

Eau distillée

4.2.2 Méthode

Cette méthode est issue de la publication de Brons et coll. [208].

Centrifuger les cellules (400g, 5 min à 5°C),

Mettre le culot cellulaire sur la glace pendant 10 minutes (minimum),

Ajouter 900 µl de solution froide d'IP,

Laisser ½ voire 1 heure au frigo,

Lecture au cytomètre de flux.

4.3. Test de viabilité sur les PBMC

4.3.1 Préparation de PBMC à partir de Buffy's Coat

4.3.1.1 Produits nécessaires :

Pour 1 Buffy coat :

- 1 flacon de 100 ml de LYMPHOCYTE SEPARATION MEDIUM (Biowhittaker, ref. 17 829E).
- 1 flacon 500ml de HBSS (Biowhittaker, ref BE10-543F)
- Tubes Falcons 50 ml

4.3.1.2 Préparation de la poche

La poche est conservée à 4°C jusqu'à utilisation (utiliser la poche dans la journée).

Avant utilisation, elle est nettoyée avec de l'amniospray, les ciseaux, ainsi que la partie du tuyau qui doit être coupée étant « bétadinés ».

Rem : une poche contient généralement entre 25 et 35 ml de sang.

4.3.2 Préparation du gradient de Ficoll

Environ 28 ml de HBSS sont distribués dans 6 tubes Falcons 50ml

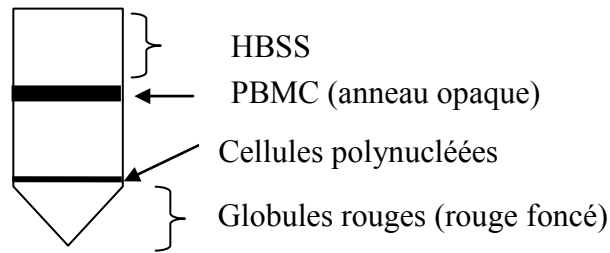
Rem : le volume de HBSS + sang ne doit pas excéder 30 à 32 ml.

Le sang est ensuite réparti dans chaque tube (3 à 5ml/tube) et homogénéisé à l'aide d'une pipette. 13 ml de Lymphocyte Préparation Medium sont prélevé et déposé lentement au fond du tube en maintenant la pipette verticale.

Les tubes sont ensuite centrifugés, 25 min, 2000 trs/min, 20°C plus freins

4.3.2.1 Récupération des PBMC's

Après centrifugation la répartition des différents types cellulaires se présente selon le schéma suivant :



A l'aide d'une pipette, le HBSS est enlevé jusqu'à ce qu'il reste environ 10 ml au dessus de l'anneau de PBMC's. L'anneau de PBMC's est pipeté à son tour en prenant soin de balayer toute la surface de l'anneau. Le contenu des tubes est ensuite « poolé » dans un tube contenant 10 ml de HBSS.

4.3.2.2 Elimination du Ficoll

Les tubes sont centrifugés 12 min à 2200 trs/min à 20°C plus freins

Le surnageant est enlevé délicatement jusqu'à ce qu'il reste environ 2 ml de milieu sur le culot cellulaire. On ajoute alors environ 8 ml d'HBSS sur chaque culot, on homogénéise et on « pool » l'ensemble dans un seul tube.

On centrifuge pendant 5 min à 1500 trs/min à 20°C plus freins, puis on enlève délicatement le surnageant en prenant soin de laisser environ 2 ml de milieu sur le culot, et on remet les cellules en suspension en tapotant le tube.

4.3.2.3 Déplaquettation

On ajoute 40 ml de HBSS sur le culot cellulaire (concentration en globules blancs doit être inférieure ou égale à $20 \cdot 10^6$ cellules/ml), puis on centrifuge pendant 15 à 20 min à 700 trs/min à 4-10°C. On prélève délicatement le surnageant qui contient les plaquettes et on reprend les cellules dans 30 ml d'HBSS.

On centrifuge les cellules 5 min à 1500 trs/min, on enlève le surnageant et on reprend les cellules dans le milieu de culture ou milieu de congélation.

4.3.3 Protocole d'activation des PBMC

Les manipulations seront effectuées sur 100 μ l de suspension cellulaire par puits soit $1 \cdot 10^5$ cellules par puits. Les PBMC seront soit non activés, soit activés par un mélange PMA + ionomycine ou PHA

4.3.4 Préparation du PMA et de la ionomycine

1. Préparation d'une solution stock à 10 mg/ml : dissoudre 1 mg de chaque produit dans 100 μ l d'EtOH. Faire 10 aliquots de 10 μ l et conserver à -80°C.
2. Préparation des working solution : solution à 1 mg/ml. Diluer 10 μ l de solution stock dans 90 μ l de RPMI 1640, faire 10 aliquots de 10 μ l et les conserver à -80°C.
3. Pour le PMA : au moment d'utiliser la working solution, diluer 10 μ l de working solution dans 100 μ l de RPMI 1640 : solution à 100 μ g/ml (congélation).

VALORISATION DES COMPÉTENCES

« UN NOUVEAU CHAPITRE DE LA THÈSE »

Le maître d'ouvrage de la campagne 2004 est le ministère de la jeunesse, de l'éducation nationale et de la recherche. Le maître d'oeuvre en est l'Association Bernard Gregory (ABG). Le pilotage est assuré par un comité présidé par Pierre Léna, professeur à l'université Paris VII, vice-président de l'ABG et membre de l'Institut.

Sujet de thèse :

ÉTUDE DES PROPRIETES BIOLOGIQUES DES CONSTITUANTS DES VINS DE CHAMPAGNE.

Prénom, Nom du doctorant : David VAUZOUR

Ecole doctorale : Sciences Biologiques et Chimiques pour la Santé (ED168)

Nom du directeur de thèse : Pr. Joseph VERCAUTEREN

Nom du "mentor" : Madame Martine VIGUIER

Date probable de soutenance : Décembre 2004

Cadre général et enjeux de ma thèse

Présentation succincte

Etude des propriétés biologiques des constituants des vins de Champagne

Les travaux effectués dans le cadre de ma thèse ont eu pour but de définir les activités biologiques des molécules, en particuliers des composés polyphénoliques, contenues dans les vins de Champagne. Les polyphénols sont des substances naturelles que l'on retrouve dans les végétaux et leurs dérivés. Elles sont connues pour leurs propriétés biologiques et en particulier anti-oxydantes.

Partant du Champagne en bouteille, il s'est donc agi dans un premier temps d'extraire l'ensemble des molécules polyphénoliques, puis d'étudier les propriétés biologiques de ce « totum », en particulier concernant les domaines de l'hémato-oncologie et de la neurobiologie. Lorsque des activités sont observées, l'objectif ultime est alors de tenter d'isoler et de caractériser la ou les molécules responsables.

Il a été observé dans le cadre d'enquêtes épidémiologiques tentant d'expliquer le « French Paradox » qu'une consommation modérée et journalière de vin permet d'abaisser quantitativement les risques d'apparition d'accidents cardiovasculaires et/ou de cancer. Les nombreuses recherches menées à ce jour confortent de plus en plus l'idée que ces propriétés sont le fait des polyphénols. La communauté scientifique s'est particulièrement intéressée aux vins rouges ou blancs, mais les études portant sur le vin de Champagne sont rares.

Une telle étude est bien sûr une occasion de faire la découverte de nouvelles molécules et/ou de nouvelles activités biologiques dont elles seraient responsables.

L'intérêt pour le Comité Interprofessionnel des Vins de Champagne (CIVC) serait de pouvoir relier des allégations santé, comparables à celles dont bénéficient aujourd'hui les vins rouges, à une consommation modérée de Champagne. Sans en faire un « alicament », la perspective d'isoler de cette boisson des molécules ayant un lien important avec le bénéfice santé lié à sa consommation reste un enjeu majeur de la recherche comme de l'industrie agro-alimentaire.

Mon objectif prioritaire a donc été de caractériser les molécules actives contenues dans les vins de Champagne, après les avoir isolées en fonction de la mise en évidence de leurs activités biologiques (favorables à la santé). Ce « bioguidage » permet d'envisager une contribution éventuelle de mes études à la découverte de nouvelles applications thérapeutiques.

Ma thèse dans son contexte

Ma thèse s'inscrit dans un programme intitulé « Vins de Champagne et Santé ». Ce projet a été sélectionné parmi les réponses à un appel d'offres lancé par le CIVC (Comité Interprofessionnel des Vins de Champagne), qui est donc l'organisme demandeur et financeur. Mon laboratoire d'accueil est particulièrement adapté pour ce type de recherche. En effet, il s'agit d'un laboratoire de Pharmacognosie, spécialisé dans la recherche de substances naturelles à intérêt thérapeutique, et plus particulièrement dans les produits de la vigne et ses dérivés. Il fait partie d'une UMR INRA avec l'Agro-M, intitulée « Sciences pour l'Œnologie ».

L'équipe du Pr. Joseph Vercauteren m'a ainsi apporté son expertise dans les domaines de l'extraction des substances naturelles, de la chimie de synthèse de composés marqués ou de la détermination structurale, me permettant de compléter mes propres compétences en biochimie cellulaire et moléculaire. La mixité des techniques acquises m'a ainsi permis de mener à bien mon projet en toute autonomie, tout en ouvrant de nouvelles perspectives de recherche dans le domaine de la biologie à mon laboratoire d'accueil.

Concernant les moyens techniques, la première année de ma thèse s'est déroulée à Bordeaux dans l'ancien laboratoire du Pr. Vercauteren. Il offrait un équipement particulièrement performant en matière d'extraction des substances naturelles et de détermination structurale. Notre équipe comprenait également du personnel technique et administratif (techniciens, ingénieur de recherche en Résonance Magnétique Nucléaire, secrétaire), des enseignants-chercheurs et des étudiants en thèse. Le laboratoire était inclus dans un groupe de recherche, le GESNIT (Groupe d'Etude des substances Naturelles à Intérêt Thérapeutique), me permettant d'avoir accès à des plateformes techniques supplémentaires dans le domaine de la biologie végétale.

Mon directeur de thèse, le Pr. Joseph Vercauteren, rejoignant l'Université de Montpellier, j'ai accepté sa proposition de l'y suivre afin de continuer notre collaboration sur ce projet.

L'arrivée à Montpellier comprenait la réinstallation complète d'un nouveau laboratoire. Compte tenu des différents aléas techniques et administratifs, un an environ s'est écoulé avant que nous soyons totalement opérationnels. Cette période, si elle a été moins fructueuse que la première année en matière d'expérimentations scientifiques, m'a permis de développer de nouveaux savoir-faire administratifs, organisationnels et techniques du fait des impératifs liés à l'installation *ab initio* du laboratoire, et à la nécessité de travailler dans le cadre de nombreux échanges inter laboratoires. En effet, l'absence de personnel administratif et

technique nous a contraints à prendre en charge l'ensemble des opérations nécessaires au bon fonctionnement du laboratoire, y compris celles de gestion et de logistique.

Le laboratoire de Montpellier bénéficie aujourd'hui de l'ensemble des techniques auxquelles nous avons accès à Bordeaux, et de nouveaux pôles techniques ont été développés en ce qui concerne la culture cellulaire et l'étude des propriétés biologiques.

Pendant la dernière année de ma thèse, le Pr. Vercauteren m'a confié l'encadrement d'une étudiante en DEA dont les travaux étaient en rapport direct avec mon sujet de recherche. L'investissement en termes de formation et de suivi a permis à notre collaboration de fructifier par l'obtention de nouveaux résultats dans le domaine de la biologie.

Le laboratoire appartient à une UMR (Unité Mixte de Recherche) INRA (Institut National de la Recherche Agronomique) spécialisée dans les polyphénols et les produits de la vigne : l'unité SPO (Science pour l'œnologie), apportant une expertise supplémentaire des composés polyphénoliques sur lesquels je travaille en particulier.

Récemment, le laboratoire s'est également rattaché à un Institut de recherche : l'Institut Max Mousseron, constituant une interface chimie-biologie. Cet institut compte une centaine de chercheurs et enseignants-chercheurs, et soixante cinq personnels IATOS. Outre la possibilité de rencontrer d'autres chercheurs, le rattachement à cet institut me permet d'accéder à une plateforme technique dans les domaines de la chimie.

Dans le but de développer mes travaux de recherches vers la cancérologie et la neurobiologie, des collaborations avec le laboratoire de Pharmacologie de l'Université de Créteil à Paris 12 (neurobiologie) et le service d'Hémo-oncologie de l'Hôpital Lapeyronie à Montpellier (cancérologie et hématologie), m'ont permis d'accéder à des techniques modernes supplémentaires (culture cellulaire, cytométrie de flux, puces à ADN...) et m'ont ouvert de nouvelles perspectives de recherche.

La recherche de substances naturelles actives intéressant fortement la plupart des industriels du secteur agro-alimentaire, le laboratoire a pu faire vivre de nombreuses collaborations sur des produits aussi divers que le vin, le cacao, l'huile d'olive, le citron, le thé, ... auxquelles j'ai pu participer. Cela m'a permis de valider ma capacité à mobiliser mes compétences acquises quelque soit le matériau de recherche. Mon responsable est à l'origine de la création d'une structure innovante (Polyphénols R&D), qui est reconnue par l'Incubateur Régional (LRI). Cette SARL est hébergée dans notre Université et entretient des partenariats étroits avec des laboratoires de l'industrie cosmétique (CAUDALIE[®], DIOR[®], ...) ou de l'Agro-Alimentaire

(Barry-Callebaut®). Cet environnement m'a permis d'affiner non seulement la culture, mais aussi les compétences nécessaires à la valorisation industrielle des travaux de recherche.

Moi dans ce contexte

Ma thèse a été précédée d'un DEA de Sciences Biologiques et Médicales option oenologie-ampélogie, également effectué dans le laboratoire du Pr. Vercauteren. Le projet avec le CIVC avait été négocié en amont de ma participation dans l'optique d'une étude postdoctorale de 2 ans.

Durant cette année de DEA, j'ai complété mes compétences de biologie par des techniques de détermination structurale, d'extraction et de synthèse organique. Sachant que je travaillais sur un projet en lien avec les polyphénols, le Pr. Vercauteren a décidé de me proposer ce projet dans le cadre d'une thèse.

Mon ambition étant de m'orienter vers des recherches pouvant avoir des applications thérapeutiques, et sachant que ce projet me permettait de développer une multi compétence, nous avons convenu de proposer ma candidature au CIVC. Au terme du processus de recrutement, celle-ci a été retenue.

Bien que l'initiative du projet n'ait pas été de mon ressort, sa gestion et sa conduite m'ont été entièrement confiées. J'ai eu « carte blanche » pour atteindre les objectifs fixés. J'ai ainsi pu définir en toute autonomie le calendrier et les différentes phases expérimentales et proposer régulièrement des ajustements ou de nouveaux axes de recherche en fonction des résultats obtenus.

Déroulement, gestion et coût de mon projet

Préparation, financements et cadrage du projet

Le laboratoire étant rattaché à l'UMR INRA, dont mon directeur de recherche est le responsable de la composante universitaire UM1 (Université de Montpellier 1), les budgets de recherches sont ceux attribués par l'INRA. Viennent se rajouter à ces derniers, le budget de fonctionnement provenant de la convention liant notre laboratoire à l'organisme demandeur du projet (CIVC). La proposition préalable comprenant la stratégie et le financement du projet ont été élaborés par le Pr. Vercauteren, en amont de ma participation.

Conduite du projet

Mon projet de thèse a fait l'objet de rapports de recherches trimestriels et de présentations orales de mes travaux et résultats au comité scientifique du CIVC. Les points d'avancement avec mon directeur de recherche ont été, quant à eux, très réguliers. En effet, si j'élaborais en toute autonomie les orientations et les modalités de mes recherches, je les soumettais à mon

responsable de thèse pour validation. Ainsi, le processus de décision concernant la conduite du projet nous appartenait, compte tenu du fait que les réunions avec le comité scientifique du CIVC avaient essentiellement un but informatif et consultatif.

Ces travaux ont également fait l'objet de présentations au sein de l'UMR INRA à laquelle nous appartenons, et également dans une unité CNRS de Chimie. Ces réunions m'ont permis d'avoir un recul sur mes travaux.

Concernant les partenaires scientifiques, sous-traitants, ou industriels, la démarche était la même que pour la conduite du projet. Dans la mesure du possible, je gérais l'intégralité de ces relations tout en sachant que je pouvais recourir aux compétences de mon directeur de recherche pour valider mes décisions ou en cas d'incertitude.

Compte tenu du contexte de déménagement exposé plus haut, les difficultés rencontrées ont été essentiellement du fait de l'absence de personnel ou de matériel, ce qui ralentissait mes travaux mais m'a permis de développer autonomie et adaptabilité.

Evaluation du coût consolidé de mon projet

Catégorie	Montant
Salaires	
Doctorant (incluant prime de précarité, personnel, gestion)	100 000 €
Equipement	
HPLC, CPC, UV, RMN ...	25000 €
Fonctionnement	
Directeur, personnel technique, hébergement, déplacements...	210 000 €
Evaluation totale du coût	335 000 €

Compétences, savoir faire, qualités professionnelles et personnelles illustrées par des exemples

Compétences scientifiques

Mon parcours universitaire de second cycle m'a permis de développer une expertise scientifique en Biochimie et Biologie cellulaire nécessaire à la compréhension et à la détermination des processus biologiques. Ainsi, ces compétences ont été mises en jeu lors de l'élaboration des protocoles expérimentaux et de l'analyse des résultats obtenus lors des tests biologiques. Par exemple, les études sur le cancer m'ont amené à gérer des cultures cellulaires de lignées cancéreuses hématologiques. L'évaluation de la toxicité des extraits polyphénoliques de Champagne sur les lignées cancéreuses et la compréhension des mécanismes mis en jeu, m'ont amené à utiliser la cytométrie de flux ou encore les puces à ADN.

Concernant mes propres travaux et toutes les collaborations menées dans le cadre de l'étude biologique, mes compétences ont été également mises en jeu dans l'analyse des résultats et l'élaboration d'hypothèses explicatives (effet protecteur potentiel des polyphénols de vin de Champagne sur des mitochondries isolées de cerveau de rat mimant un accident vasculaire cérébral, détermination des voies métaboliques impliquées dans l'effet anti-prolifératif et anti-tumorale...).

Mon année de DEA et les trois années de ma thèse, passées en collaboration étroite avec des chimistes et des pharmaciens m'ont permis d'étendre mon domaine de compétences scientifiques et techniques à la chimie d'extraction et à la chimie organique de synthèse des substances naturelles. Ainsi, lors de mon DEA, j'ai réalisé la synthèse totale de composés polyphénoliques marqués au carbone 13 (molécule naturelle non radioactive) permettant leur inclusion dans des cultures cellulaires végétales afin de tenter d'élucider une voie métabolique. L'évaluation de leur métabolisme a nécessité l'emploi de techniques de Chromatographie de Partage Centrifuge (CPC), ainsi que de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN du proton, du deutérium et du carbone 13). Dans ce cadre, j'ai reçu une formation complète de la théorie à la pratique me permettant d'être parfaitement autonome de la mesure au traitement des données.

Concernant l'étude des propriétés biologiques des vins de Champagne, j'ai pu mettre à profit et approfondir ces techniques et développer de nouvelles compétences. Ainsi, à partir de bouteilles de Champagne, j'ai pu mettre en place un protocole de séparation me permettant d'isoler une phase organique très active pour les propriétés biologiques citées plus haut. J'ai analysé les fractions obtenues par des techniques de RMN et d'HPLC analytique (Chromatographie Liquide Haute Performance) couplée à des détecteurs UV à barrette de diodes ou à un spectromètre de masse.

Les fractions ayant donné des résultats lors des tests biologiques, ont été séparés par CPC. Les blocs obtenus lors de cette séparation ont de nouveau été testés pour leurs propriétés. Ceux ayant donné des résultats ont été analysés par RMN, puis HPLC analytique. Si la complexité et le nombre de molécules présentes dans ce bloc le permettaient, une séparation par HPLC semi ou préparative était effectuée. Ces expérimentations successives m'ont apporté la maîtrise complète de toutes les techniques utilisées. Durant ma thèse, la validation du certificat de Pharmacologie moléculaire et cellulaire m'a permis d'acquérir des compétences supplémentaires.

Publications

Les travaux de recherches ont pour vocation d'être publiés. Dans un premier temps (à partir du DEA), j'ai été associé à différents travaux de publication. J'ai peu à peu pu acquérir les techniques rédactionnelles nécessaires à l'élaboration de publications scientifiques en anglais et à partir de la thèse, prendre en charge l'intégralité de la rédaction. J'ai ainsi élaboré des posters scientifiques, des chapitres d'ouvrages (proceedings), des publications internationales, etc.

Pédagogie

La dernière année de ma thèse a été l'occasion pour moi de développer mes compétences en termes d'encadrement et de formation d'une étudiante de DEA. Ainsi, je lui ai transmis les compétences nécessaires à l'exécution de ses travaux de recherches. J'ai défini avec le Pr. Vercauteren son sujet et ses axes de recherche, et encadré la conduite de ses travaux et la rédaction de son mémoire. Pendant l'année de mon DEA, j'ai pu dispenser des cours de chimie organique et de biologie à des étudiants de Pharmacie et de 1ère scientifique, au sein d'une structure privée (Math 1^{er}). Au cours de mon cursus universitaire, j'ai également dispensé des cours de tutorat en informatique pour les étudiants de DEUG.

Pluridisciplinarité

Le travail en équipe pluridisciplinaire m'a permis d'acquérir de nouvelles compétences, de partager, d'échanger des savoirs faire et des pratiques en particulier dans le domaine de la biologie et de l'informatique. De plus, dans le cadre d'une étude *in vivo* permettant d'étudier le potentiel antioxydant plasmatique chez l'homme, j'ai effectué, en collaboration avec un médecin, la rédaction d'un dossier de demande d'autorisation de réalisation d'étude biomédicale auprès du CCPPRB (Comité Consultatif pour la Protection des Personnes en Recherche Biomédicale).

Formation continue

Les différents séminaires auxquels j'ai assisté, m'ont également permis d'acquérir de nouvelles connaissances dans des domaines aussi variés que la création d'entreprise innovante (séminaire des Doctoriales, Mèze 2003), les techniques de recherches d'emploi avec mise en situation, les bases de la Process Communication (modules externes de l'école doctorale), et également les systèmes d'expression des gènes (Journées techniques Agilent : Gene expression, Montpellier 2003 et Workshop de PCR quantitative, Roche Diagnostic,

Montpellier 2003) ou encore des congrès internationaux : International Congress on Polyphenols à Helsinki 2004, Cancer et cibles thérapeutiques, ICSN à Gif sur Yvette 2004.

Gestion de projets

En ce qui concerne la gestion de projet, j'ai dans un premier temps acquis les compétences nécessaires à sa conduite et à son suivi. Comme expliqué plus haut, mon directeur de recherche avait préparé le cadre général du projet et son financement. Cette étape m'a permis de développer les compétences nécessaires au suivi de projet : organisation, planification, communication avec l'organisme financeur, information des différents protagonistes, élaboration et présentation des axes de recherche, rédaction de rapports écrits et présentations orales, animation de réunions de travail, gestion des partenaires scientifiques et industriels, etc.

Dans un deuxième temps, j'ai pu participer en collaboration avec le porteur de projet à la phase initiale d'un appel à projet de recherche. J'ai ainsi développé de nouvelles compétences : montage du projet, état actuel des recherches et argumentation scientifique (enjeux), détermination du réseau de compétences nécessaires, élaboration de l'hypothèse d'étude et inventaire des moyens nécessaires, calendrier des travaux, évaluation du coût et demande de financements.

Cela m'a permis d'acquérir une expérience précieuse de la gestion des aspects contractuels d'un projet.

Administratif et logistique

Dans le contexte de changement de laboratoire exposé plus haut, j'ai été amené à développer mes savoir-faire administratifs et logistiques : gestion des bons de commande, des devis, des contacts avec les commerciaux, des clés de suivi d'achats, de l'enlèvement des solvants, négociations avec les fournisseurs, etc. Cela a été également vrai en ce qui concerne les compétences techniques (installation et programmation du nouveau matériel, maintenance des appareils, etc.)

Compétences humaines

Les différentes situations rencontrées au cours de ces quatre années m'ont permis de valider mes qualités personnelles dans des situations concrètes. Ainsi, j'ai particulièrement mis à profit mon autonomie et mon sens de l'initiative, ainsi que ma capacité d'adaptation. J'ai su faire preuve tout au long de ma démarche et lors de mes différentes présentations de rigueur

scientifique et valider ma motivation à travailler dans le domaine de la recherche scientifique. De plus, sens de l'écoute et esprit d'équipe me permettent non seulement de travailler en équipe multidisciplinaire et d'encadrer des étudiants (pharmaciens et DEA), mais aussi d'animer une équipe de projet.

Un exercice réalisé au cours du séminaire des Doctoriales[®] m'a également permis de connaître les premières impressions faites sur mes collègues. Ces derniers m'ont défini comme : posé, réfléchi et ayant un grand sens de l'écoute et de l'initiative.

Les différentes manifestations scientifiques auxquelles j'ai assisté (colloques, séminaires, conférences,...) ainsi que les différentes collaborations engendrées par mon projet ou par l'activité du laboratoire m'ont permis de me créer mon réseau professionnel de contacts scientifiques ainsi que d'autres compétences complémentaires.

Résultats, impact de la thèse

Pour le laboratoire et l'équipe

Les résultats de ma thèse montrent une activité anti-cancéreuse et neuroprotectrice des molécules contenues dans les vins de Champagne.

Ceci permet donc de montrer qu'au même titre que les vins rouges, les vins de Champagne possèdent des molécules capables d'activités biologiques intéressantes. Une consommation modérée et journalière de Champagne peut donc contribuer à réduire les risques de cancer et à protéger partiellement contre les risques de maladies neurodégénératives.

De plus, comme établi ci-dessus, les échanges auxquels ont donné lieu mes différents travaux ont permis au laboratoire d'acquérir de nouvelles compétences en enzymologie et biologie cellulaire.

Pour moi-même

Les résultats de ma thèse ne sont pas directement exploitables en terme de perspectives industrielles, toutefois les compétences professionnelles acquises durant ces trois années me permettront de mener à bien les différentes étapes de mon projet professionnel.

Aujourd'hui, ma volonté est d'élargir ces compétences en travaillant dans un autre contexte culturel et technique, et de perfectionner ma pratique de la langue anglaise. Mes acquis me permettent d'intégrer un projet de recherche dans le secteur auquel je me destine, celui de la recherche biomédicale, que ce soit au sein d'une équipe pluri disciplinaire ou en toute

Quatrième Partie – Valorisation des compétences

autonomie. En sus des compétences techniques et humaines, j'ai également pu développer un réseau de contacts intéressants dans la discipline à laquelle je me destine.

RÉSUMÉ

Mon projet professionnel à long terme est d'être enseignant-chercheur dans le secteur de la recherche biomédicale.

Aujourd'hui, par la recherche d'un post doctorat au Royaume Uni, ma volonté est d'élargir ces compétences en travaillant dans un autre contexte culturel et technique, et de perfectionner ma pratique de la langue anglaise, atout majeur dans la communication scientifique internationale. Mes acquis me permettent d'intégrer un projet de recherche dans le secteur de la recherche biomédicale, que ce soit au sein d'une équipe pluri disciplinaire ou en toute autonomie.

En effet, mon parcours en thèse m'a permis de développer une expertise technique dans de nombreux domaines, et surtout de valider les qualités professionnelles nécessaires à la recherche scientifique. J'ai ainsi pu acquérir les méthodes de travail et les compétences qui, associées à ma capacité d'adaptation, me permettront d'étendre peu à peu mon domaine d'expertise technique à de nouvelles thématiques du secteur biomédical, m'ouvrant des perspectives de recherches riches et variées.

Outre le partage des compétences intra ou inter laboratoires, la formation continue sur des domaines aussi variés que la résonance magnétique nucléaire, la création d'entreprise, la pharmacologie moléculaire ou les systèmes d'expression des gènes, est une des facettes essentielles de ce travail de développement de mon expertise.

J'ai également pu prolonger ce système d'échanges par la publication de mes résultats, que ce soit à l'occasion de congrès nationaux ou internationaux, de posters, de chapitres d'ouvrages, ou d'articles dans des revues scientifiques internationales.

De plus, le contexte de réimplantation de laboratoire dans lequel j'ai évolué durant ce projet de recherche, m'a permis d'acquérir une autonomie particulière en terme de gestion et de logistique. Les domaines administratif, organisationnel et technique me sont familiers, ce qui est un atout certain en matière de gestion de projet, qu'il soit scientifique ou non.

Dans le cadre de cette problématique, j'ai également développé ma capacité à travailler en équipe pluridisciplinaire et à partager des compétences.

En sus des compétences techniques, administratives et humaines, j'ai également pu construire un réseau de contacts dans la discipline à laquelle je me destine.

Je me suis également initié à l'encadrement de recherches et à la pédagogie, compétences largement ré exploitables dans la mission d'un enseignant-chercheur.

ANNEXES

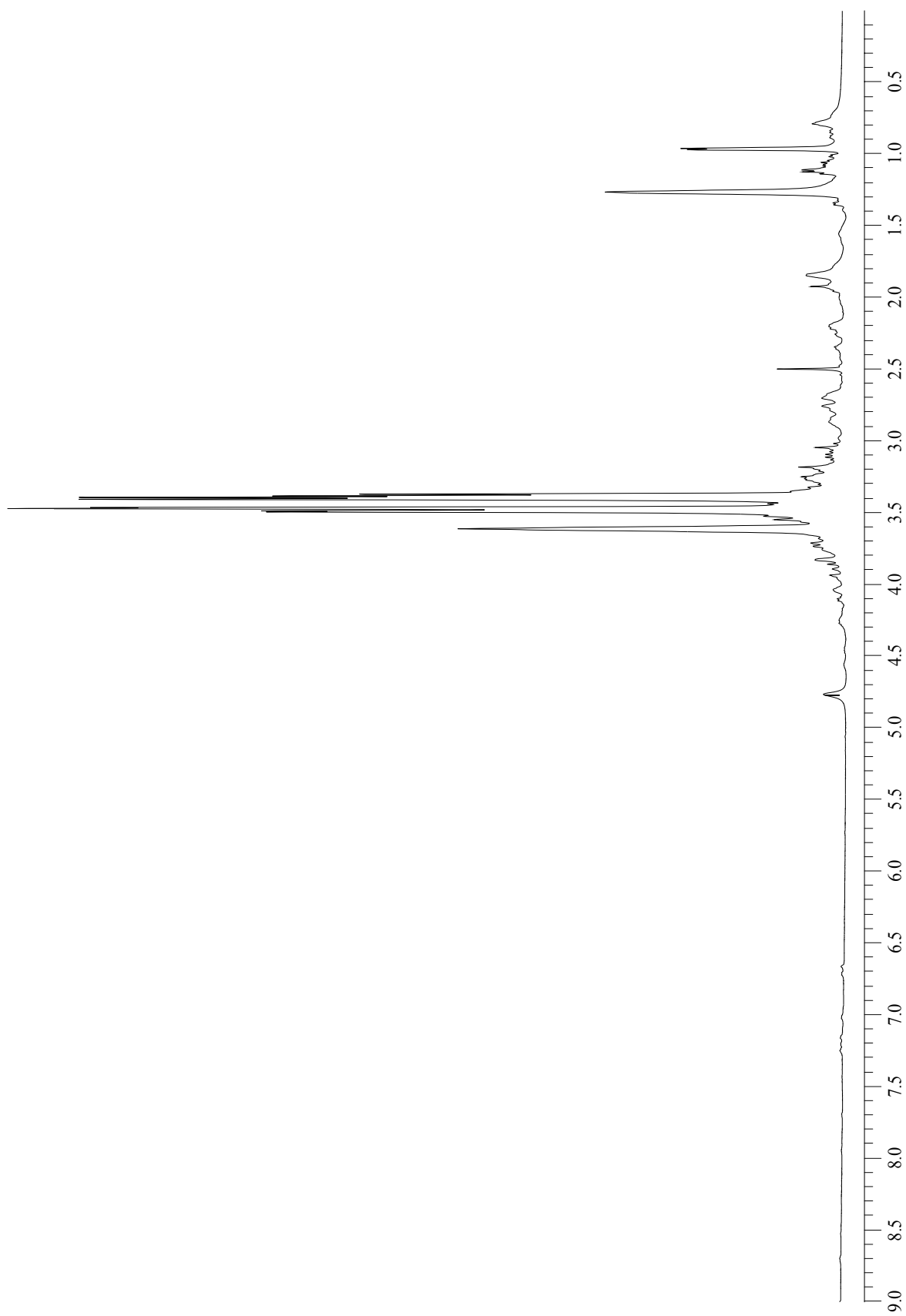


Figure 45: Spectre ^1H Water gate de la phase aqueuse EPC-xx- H_2O dans $\text{D}_2\text{O}/303\text{K}$

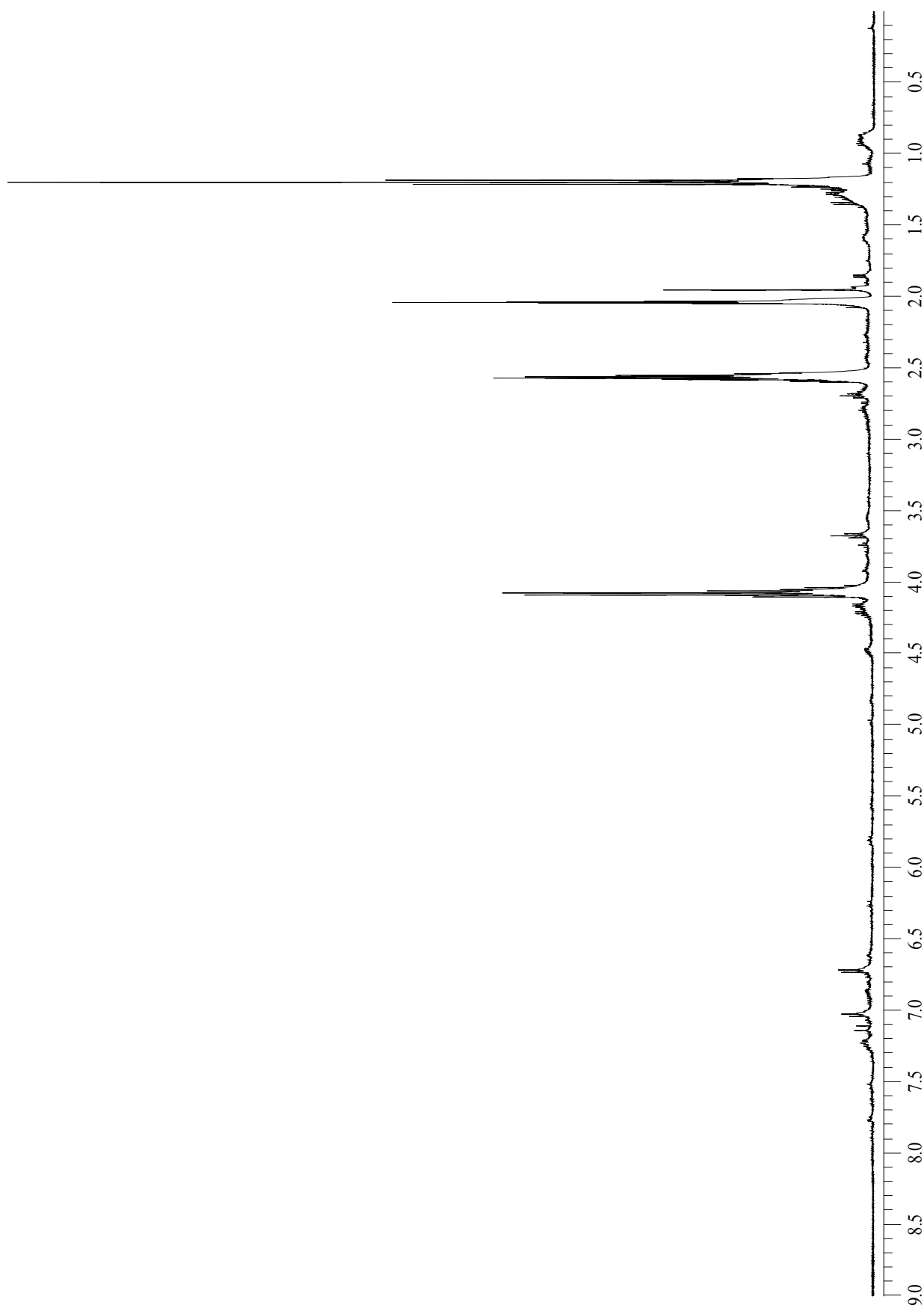


Figure 46: Spectre ^1H sur la phase EPC-xx-AcOEt_{amQ} dans de l'acétone D6/303K

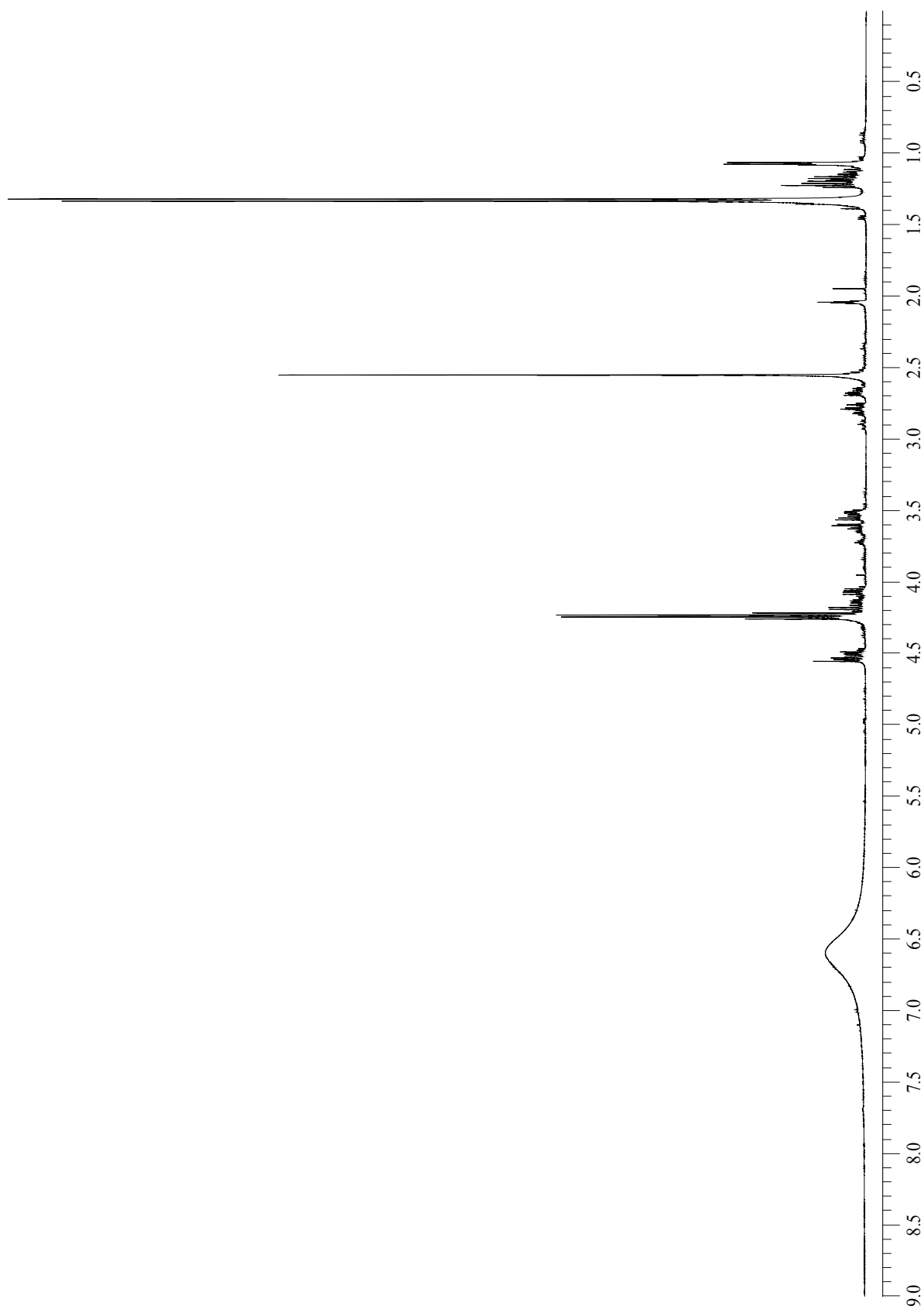


Figure 47: Spectre ^1H sur la phase EPC-xx-mQ dans de l'acétone D6/303K

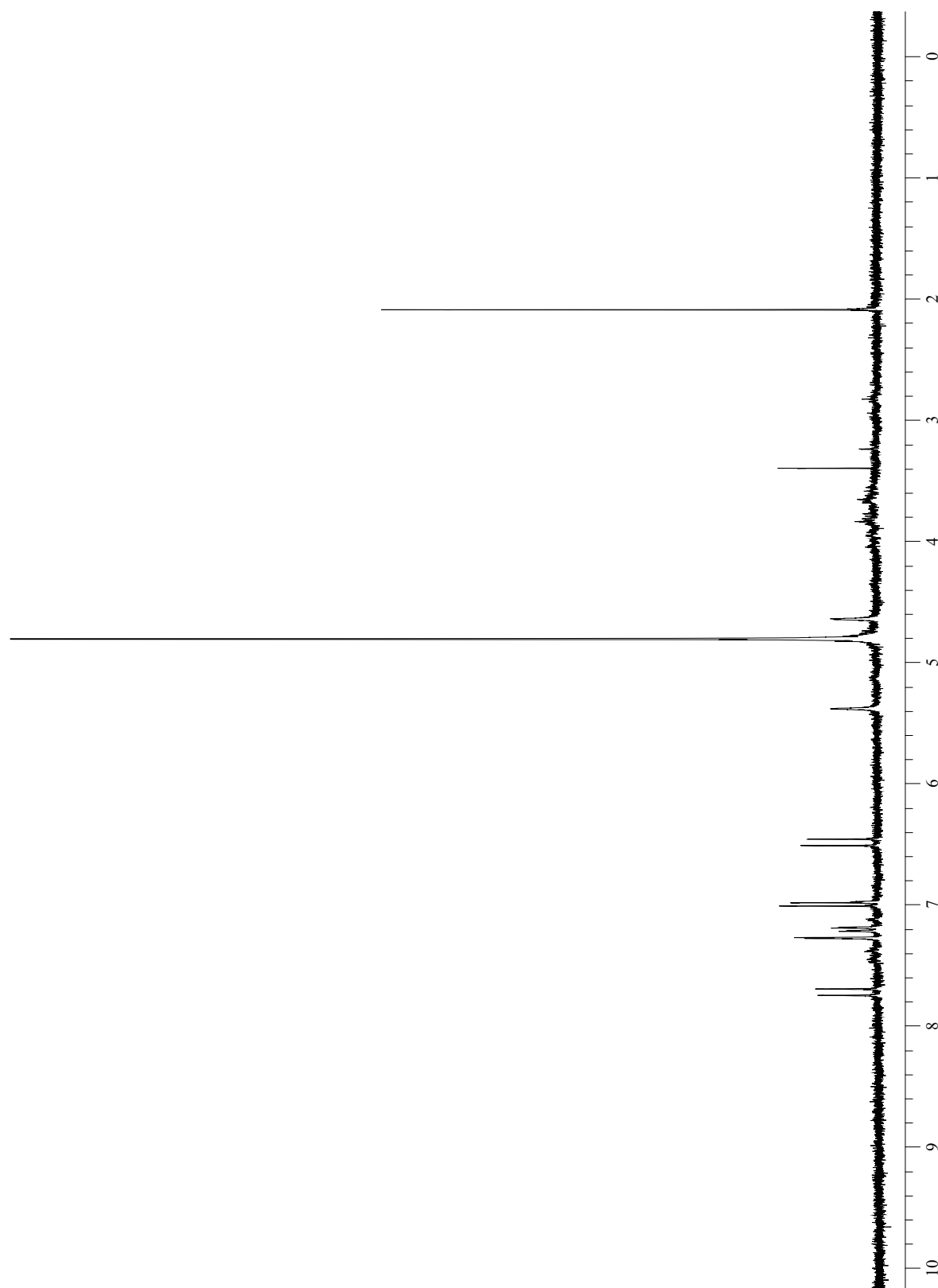


Figure 48: Spectre proton de l'acide caftarique dans D₂O, 303 K

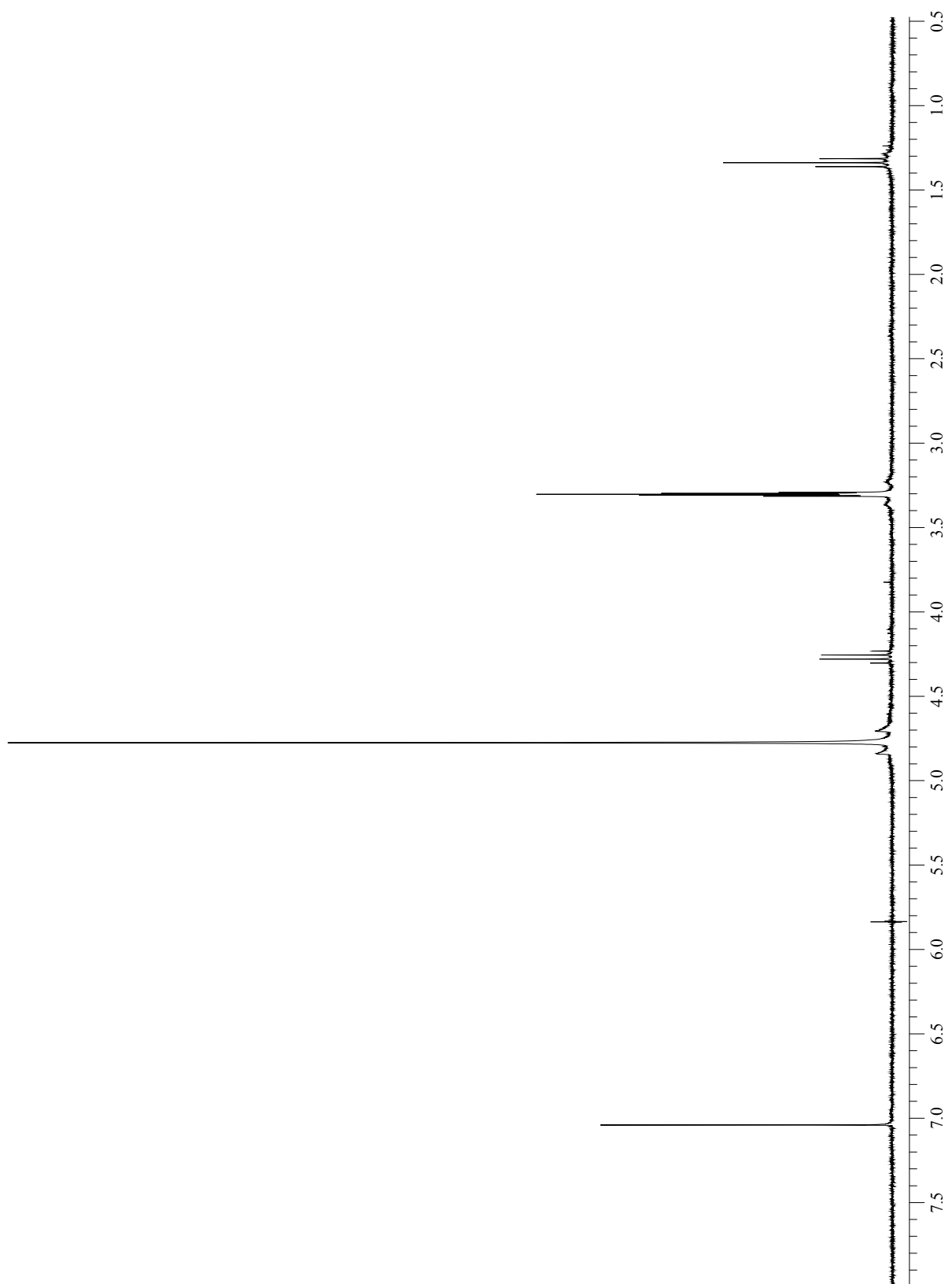


Figure 49: Spectre proton du gallate d'éthyle dans CD_3OD , 303 °K

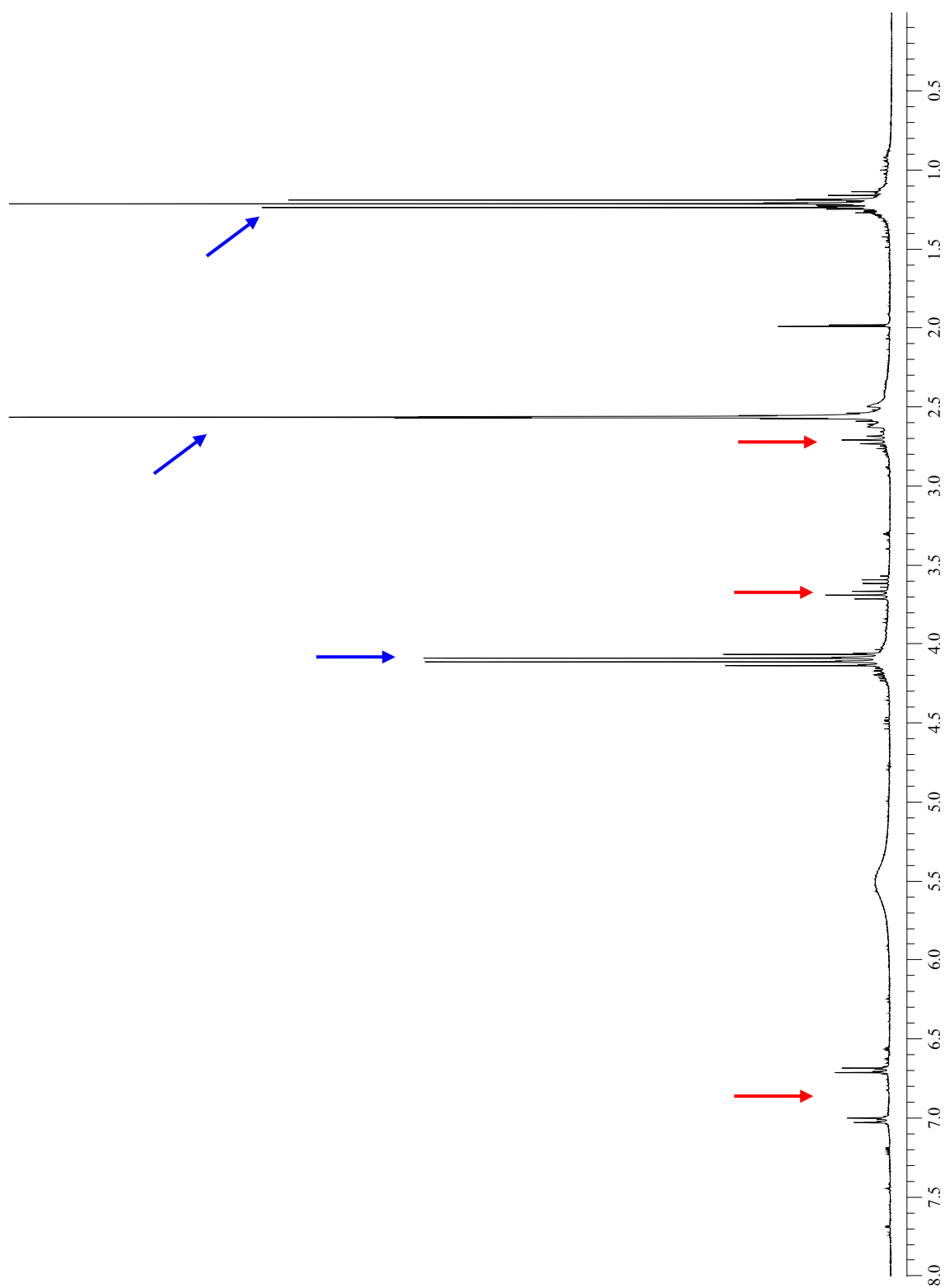


Figure 50: Spectre proton du tyrosol (rouge) et du succinate d'éthyle (bleu) dans CD_3OD , 303 K

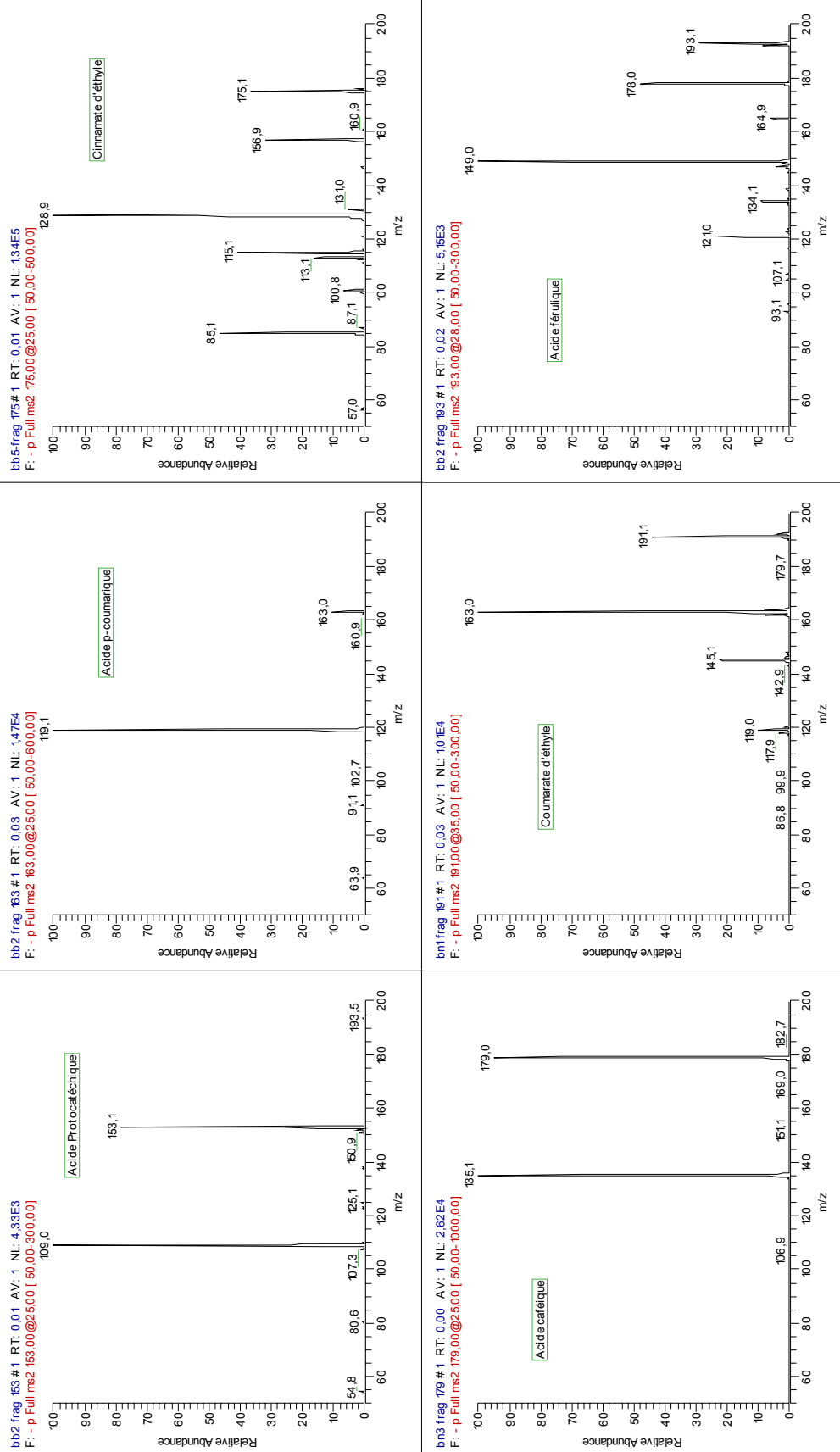


Figure 51: Fragmentation des principales molécules

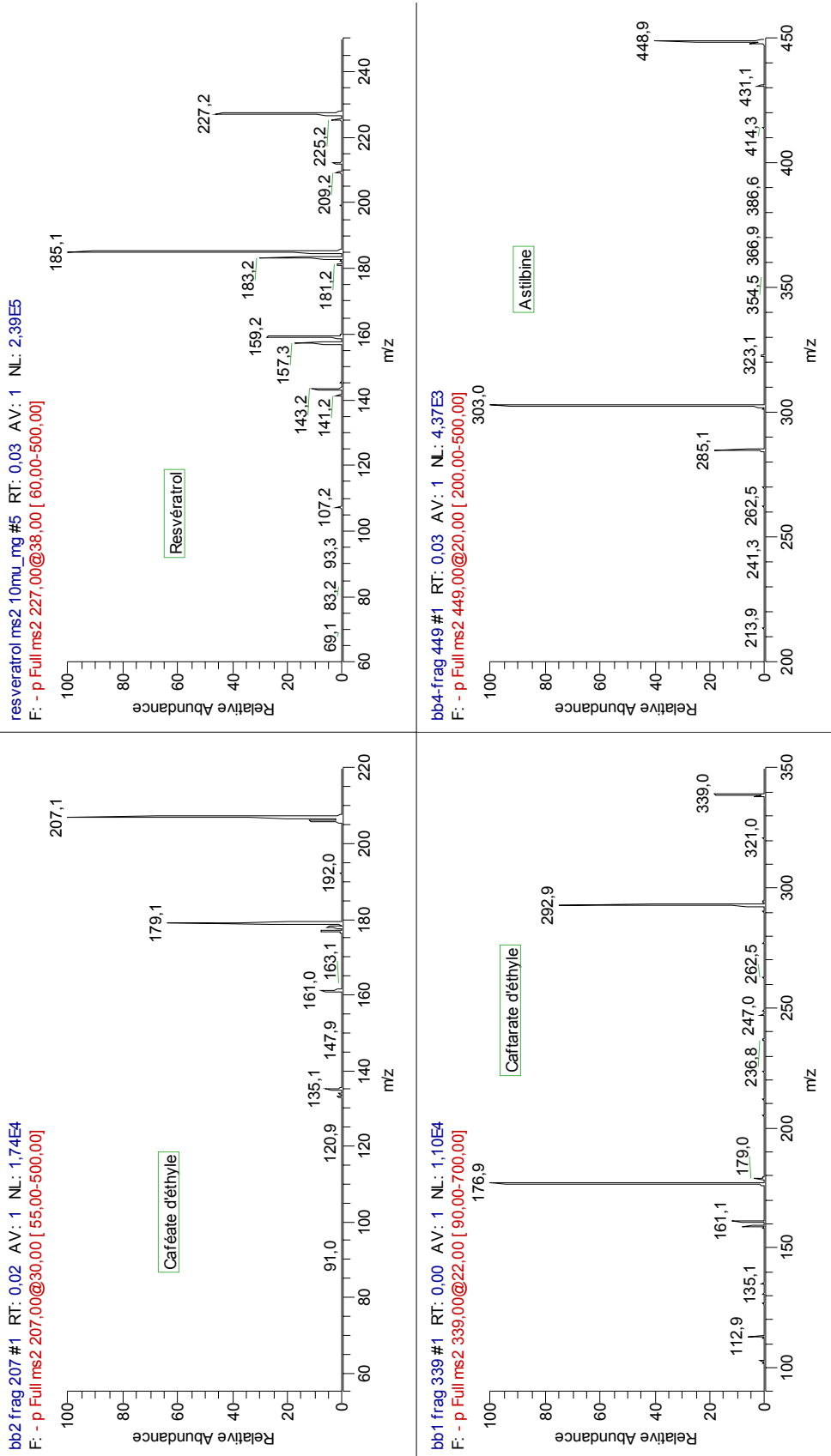


Figure 52: Fragmentation des principales molécules

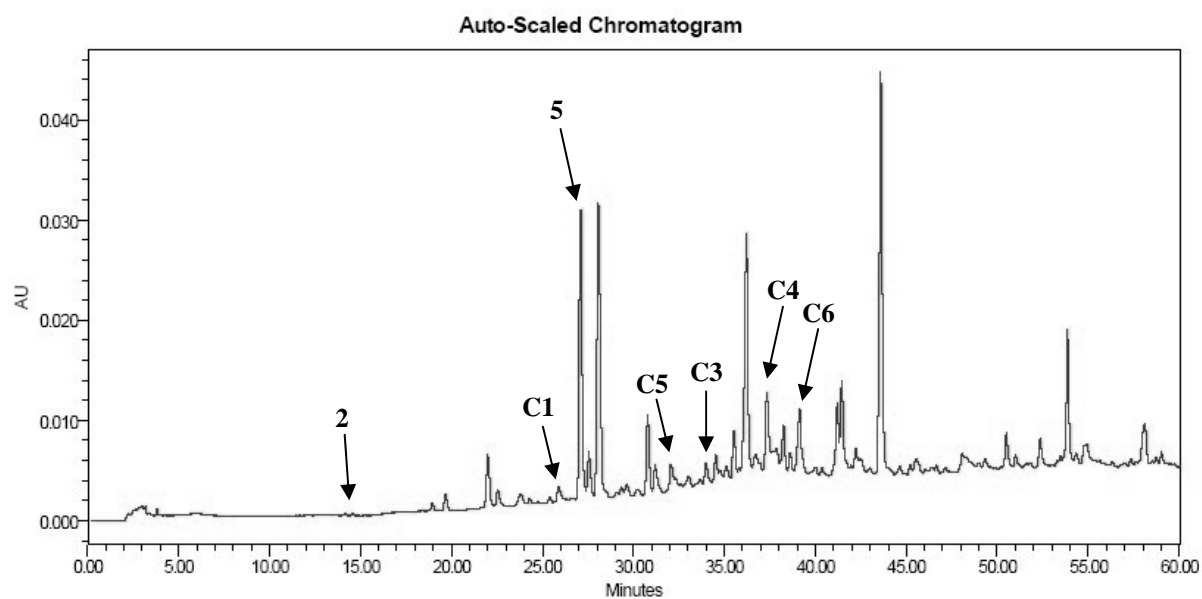


Figure 53: Chromatogramme CLHP de la fraction DC_{BB}-Bloc 1 à 280 nm

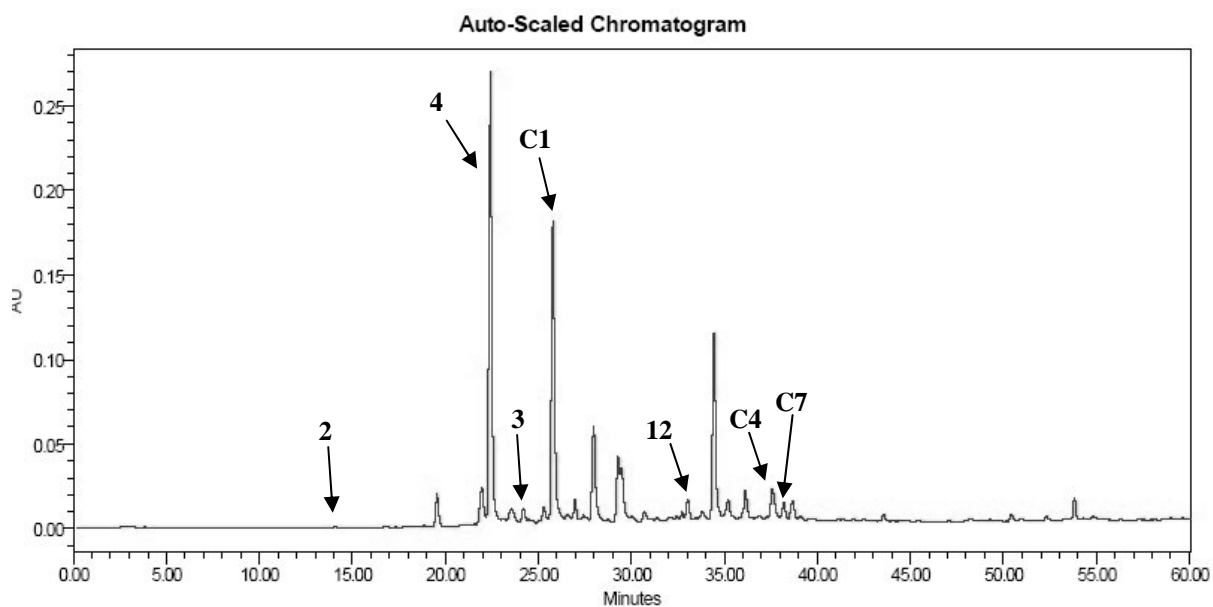


Figure 54: Chromatogramme CLHP de la fraction DC_{BB}-Bloc 2 à 280 nm

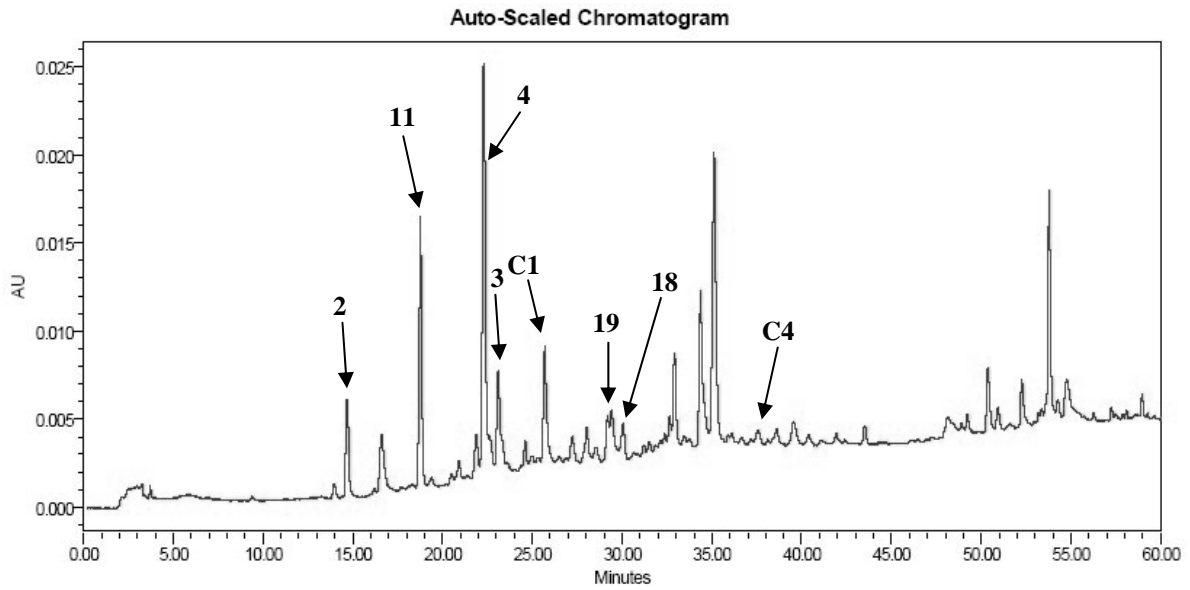


Figure 55: Chromatogramme CLHP de la fraction DC_{BB}-Bloc 3 à 280 nm

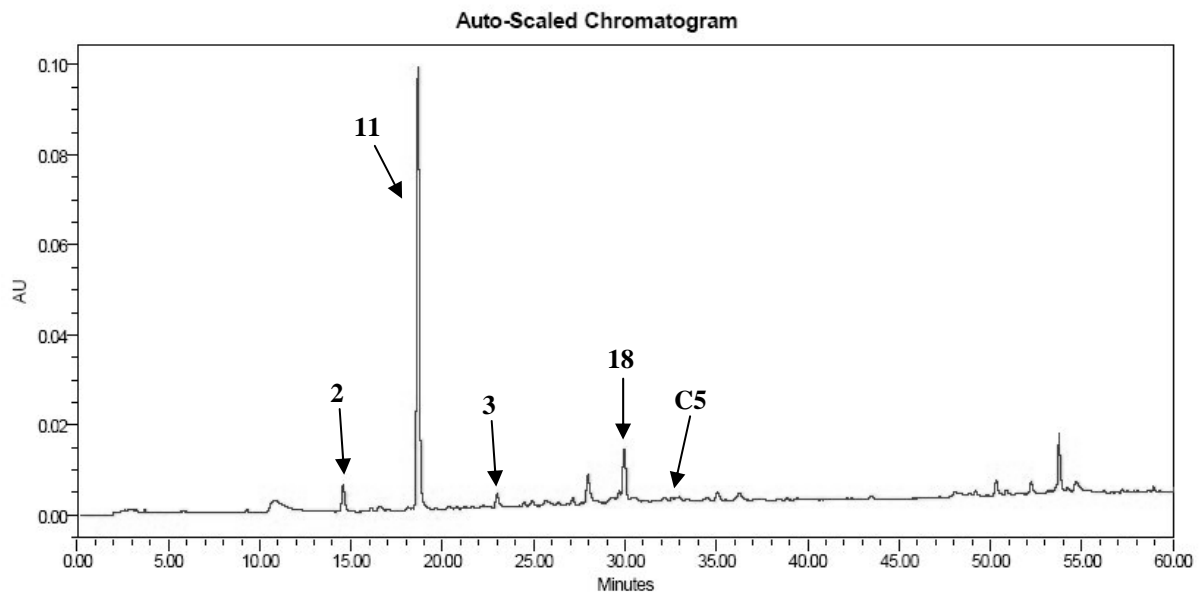


Figure 56: Chromatogramme CLHP de la fraction DC_{BB}-Bloc 4 à 280 nm

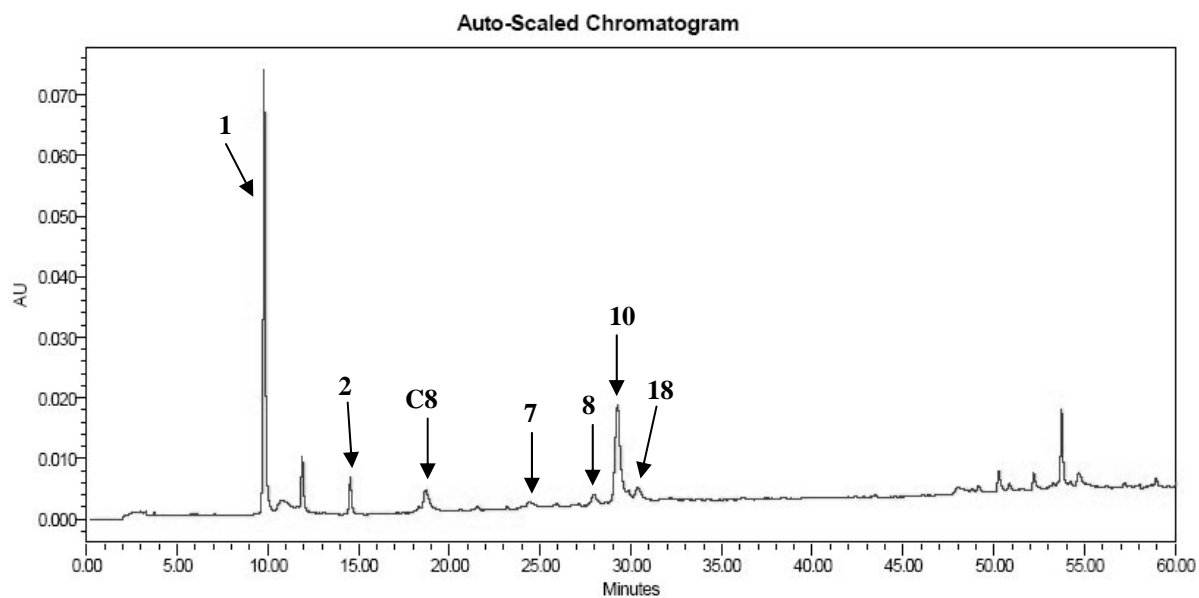


Figure 57: Chromatogramme CLHP de la fraction DC_{BB}-Bloc 5 à 280 nm

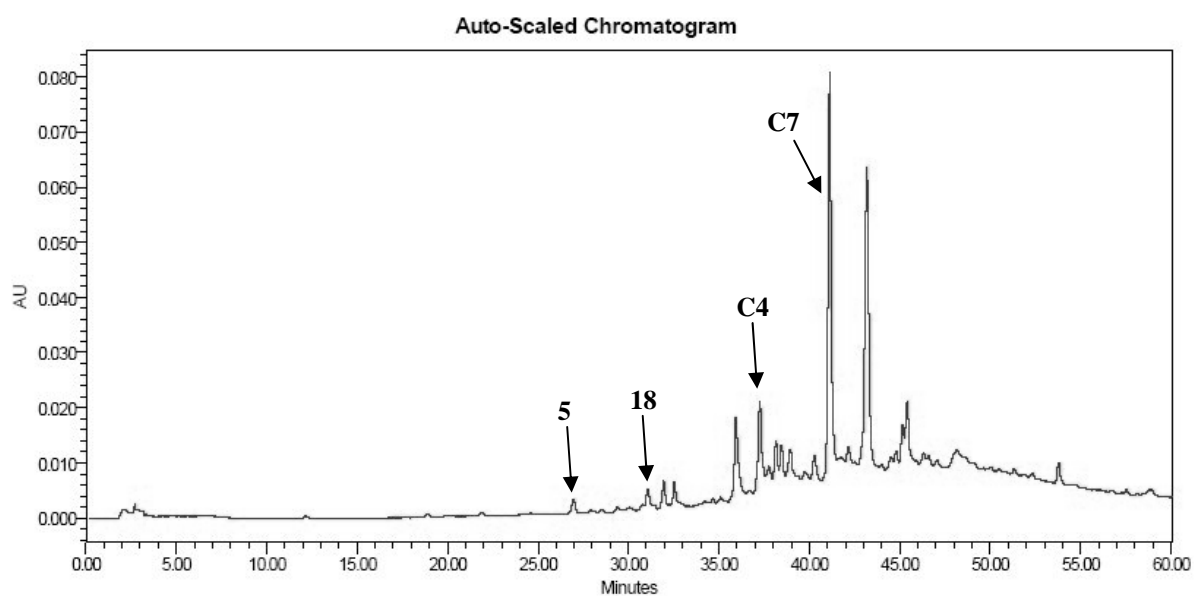


Figure 58: Chromatogramme CLHP de la fraction DC_{BN}-Bloc 1 à 280 nm

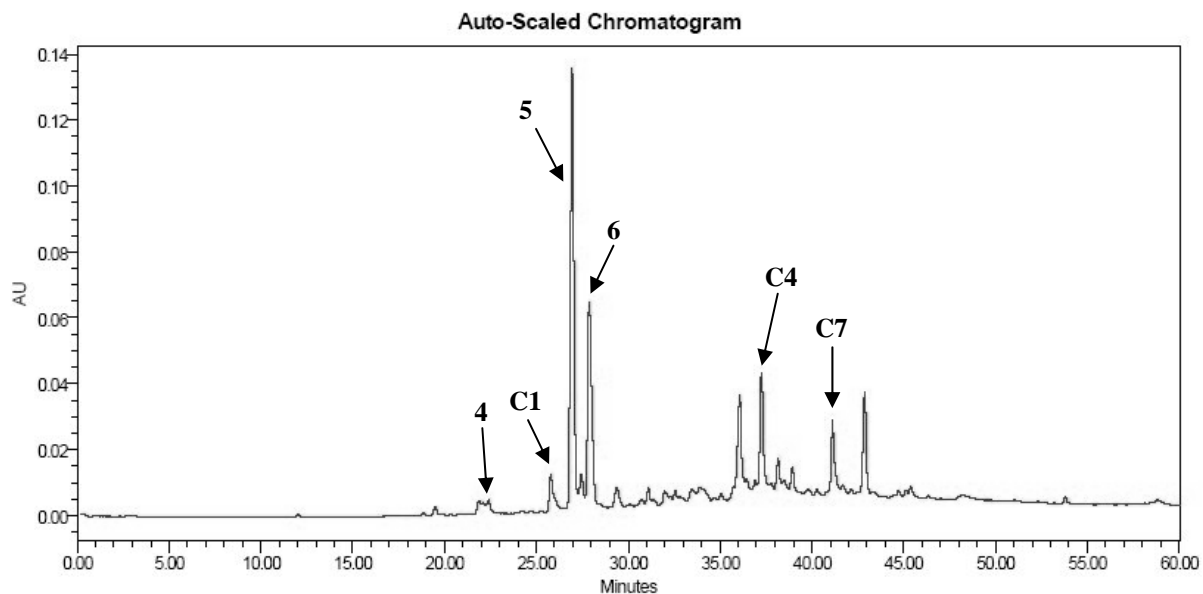


Figure 59: Chromatogramme CLHP de la fraction DC_{BN}-Bloc 2 à 280 nm

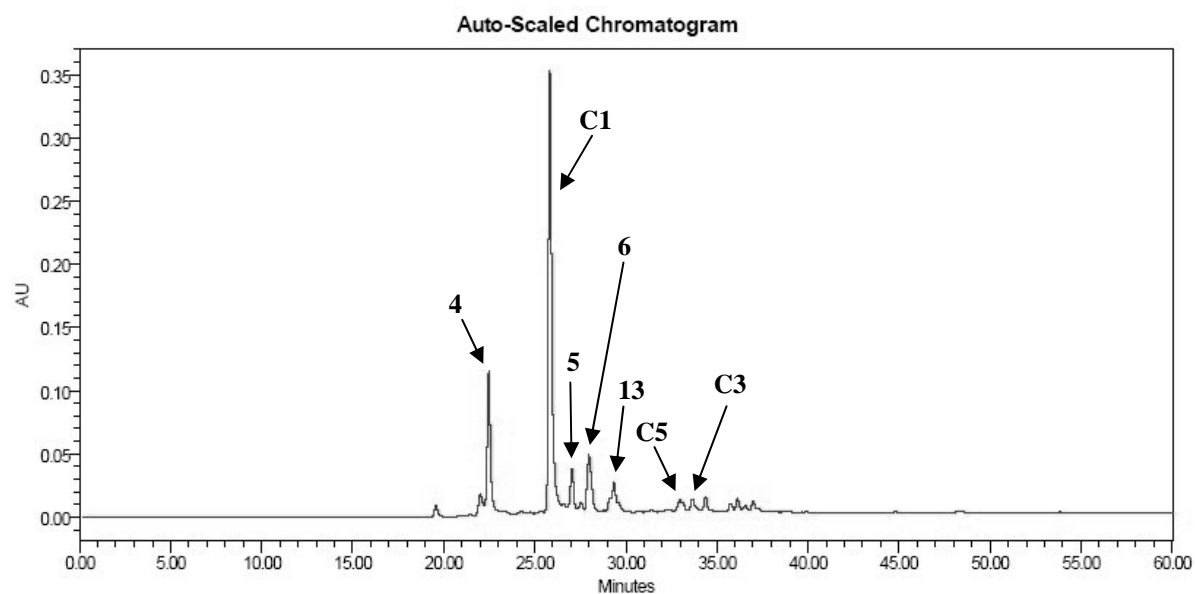


Figure 60: Chromatogramme CLHP de la fraction DC_{BN}-Bloc 3 à 280 nm

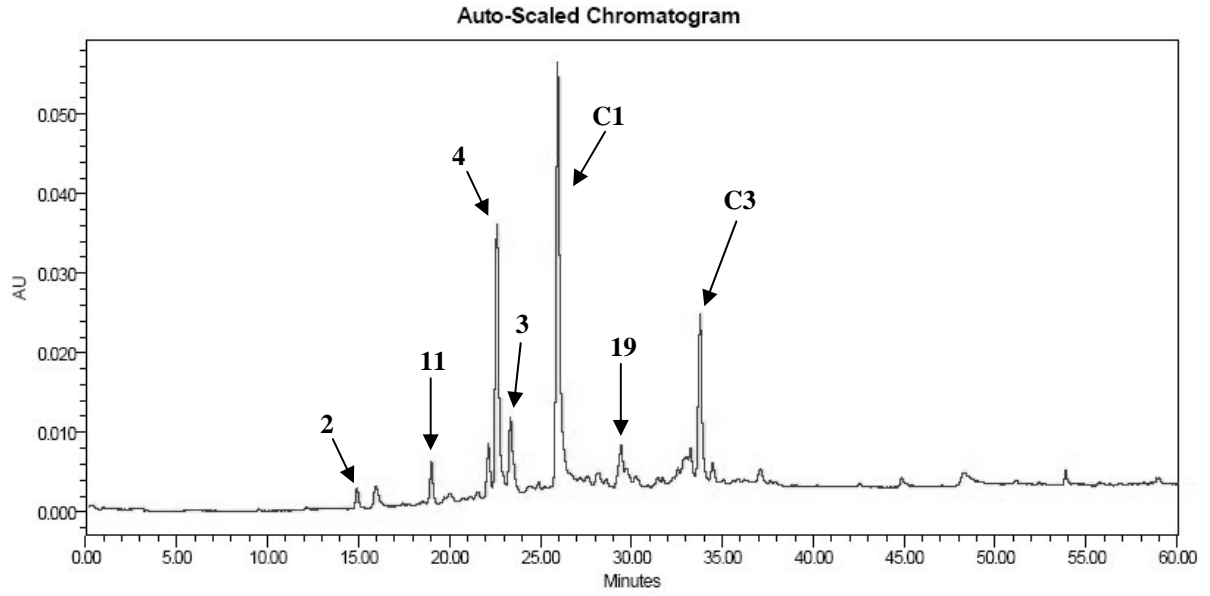


Figure 61: Chromatogramme CLHP de la fraction DC_{BN}-Bloc 4 à 280 nm

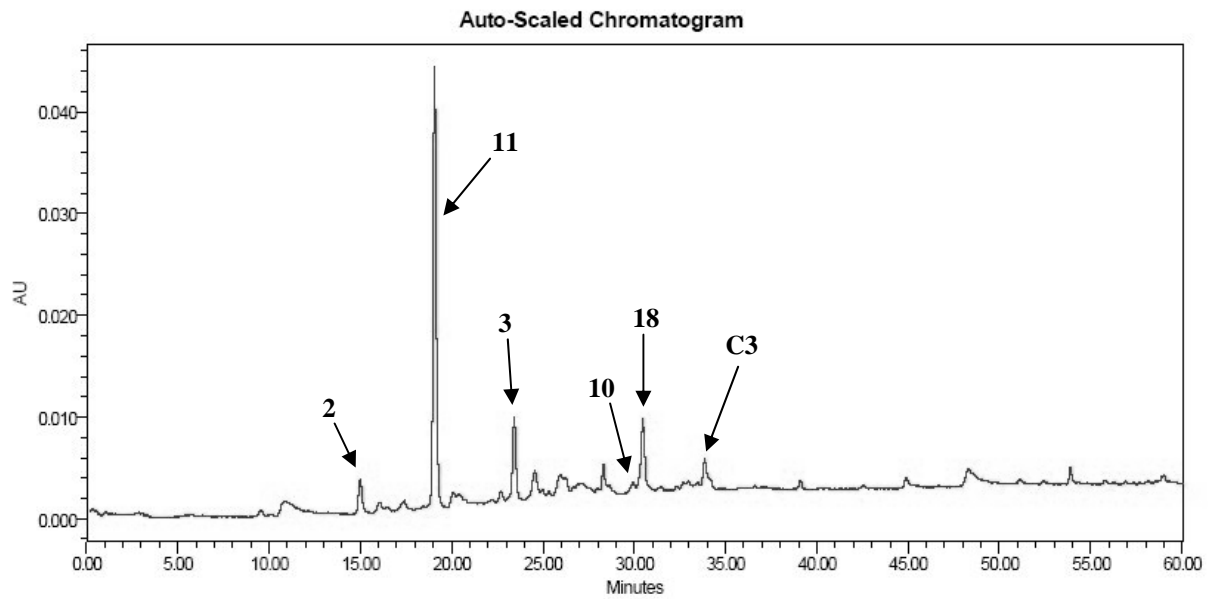


Figure 62: Chromatogramme CLHP de la fraction DC_{BN}-Bloc 5 à 280 nm

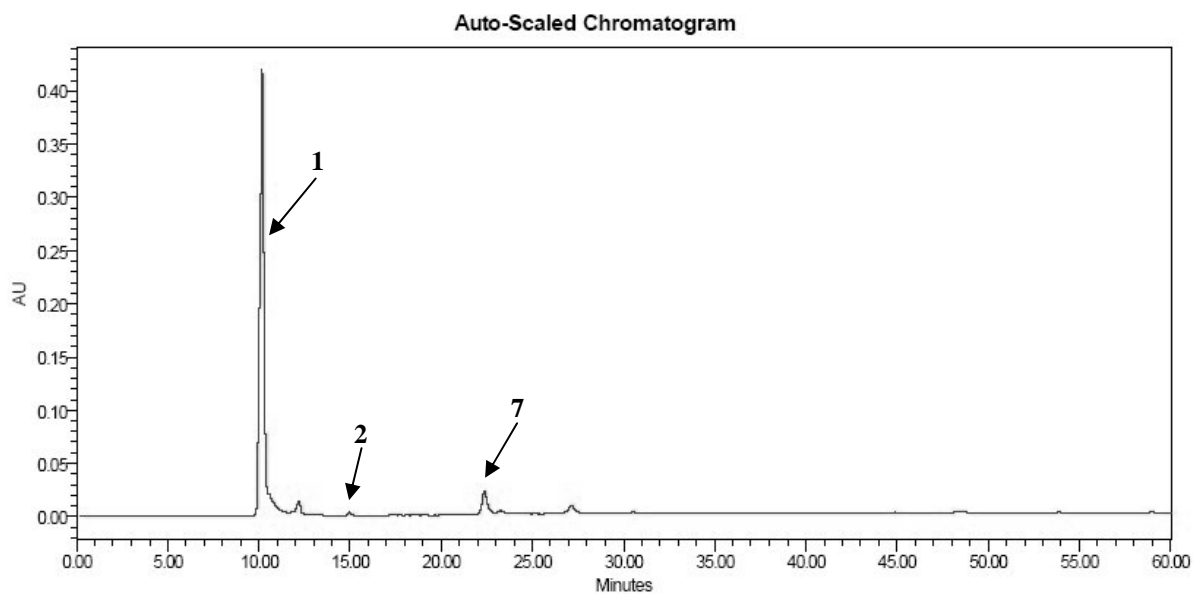


Figure 63: Chromatogramme CLHP de la fraction DC_{BN}-Bloc 6 à 280 nm

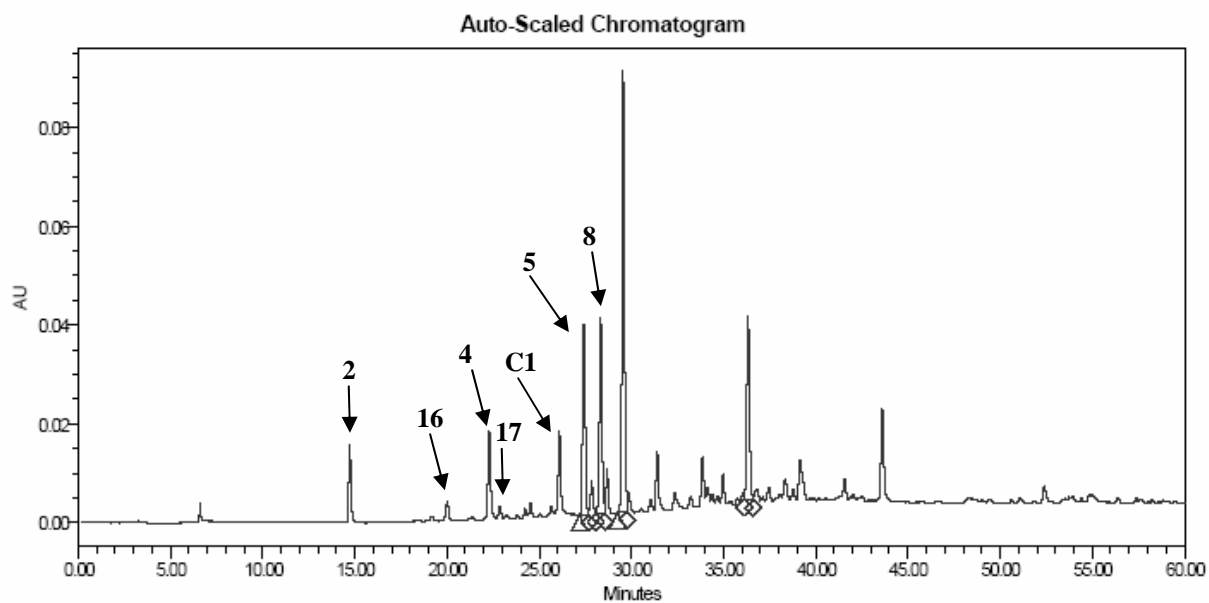


Figure 64: Chromatogramme CLHP de la fraction DB_{BB}-Bloc 1 à 280 nm

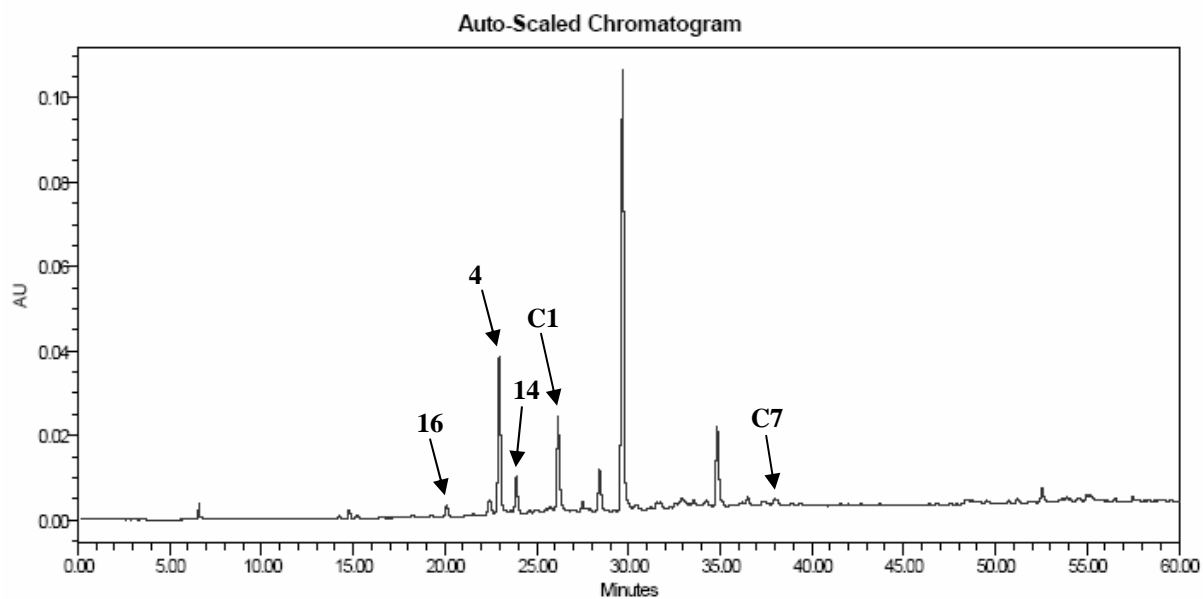


Figure 65: Chromatogramme CLHP de la fraction DB_{BB}-Bloc 2 à 280 nm

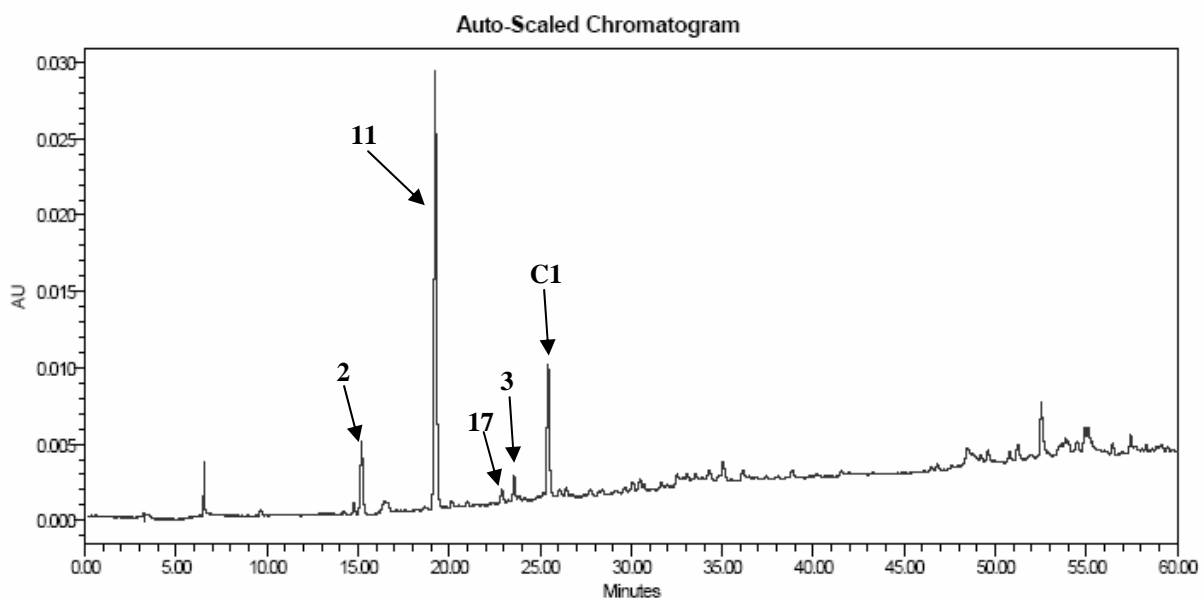


Figure 66: Chromatogramme CLHP de la fraction DB_{BB}-Bloc 3 à 280 nm

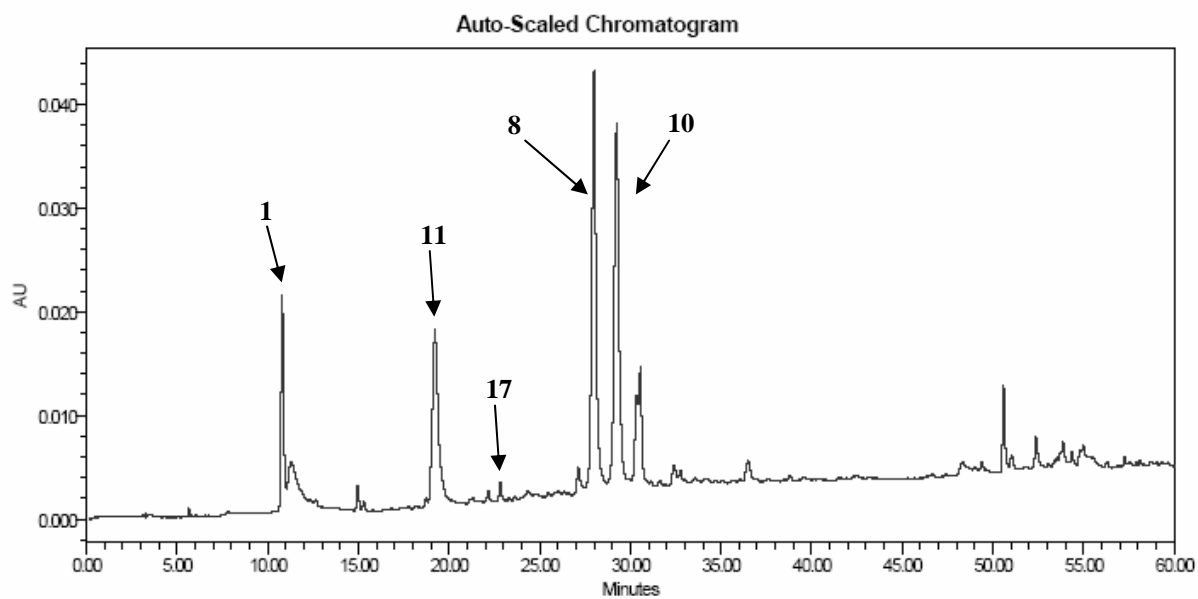


Figure 67: Chromatogramme CLHP de la fraction DB_{BB}-Bloc 5 à 280 nm

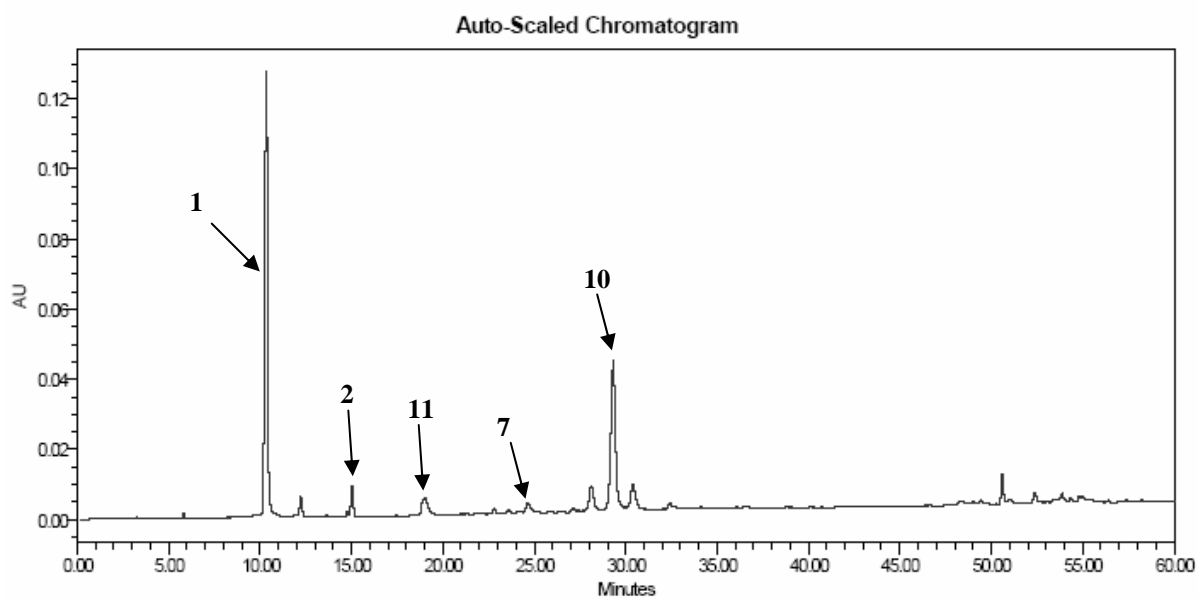


Figure 68: Chromatogramme CLHP de la fraction DB_{BB}-Bloc 6 à 280 nm

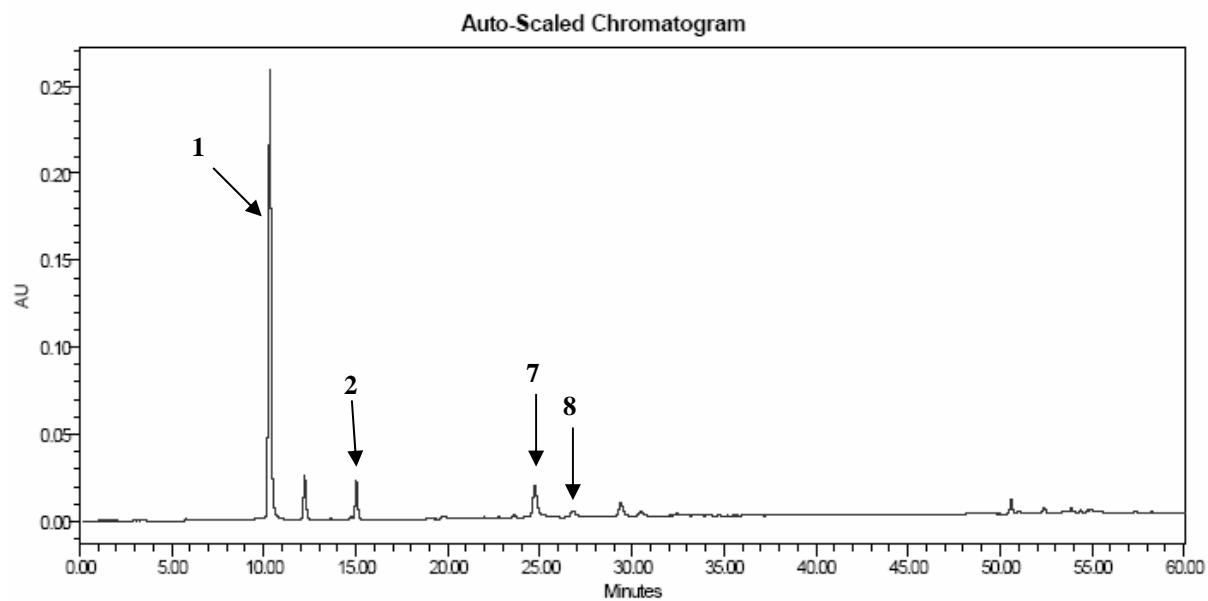


Figure 69: Chromatogramme CLHP de la fraction DB_{BB}-Bloc 7 à 280 nm

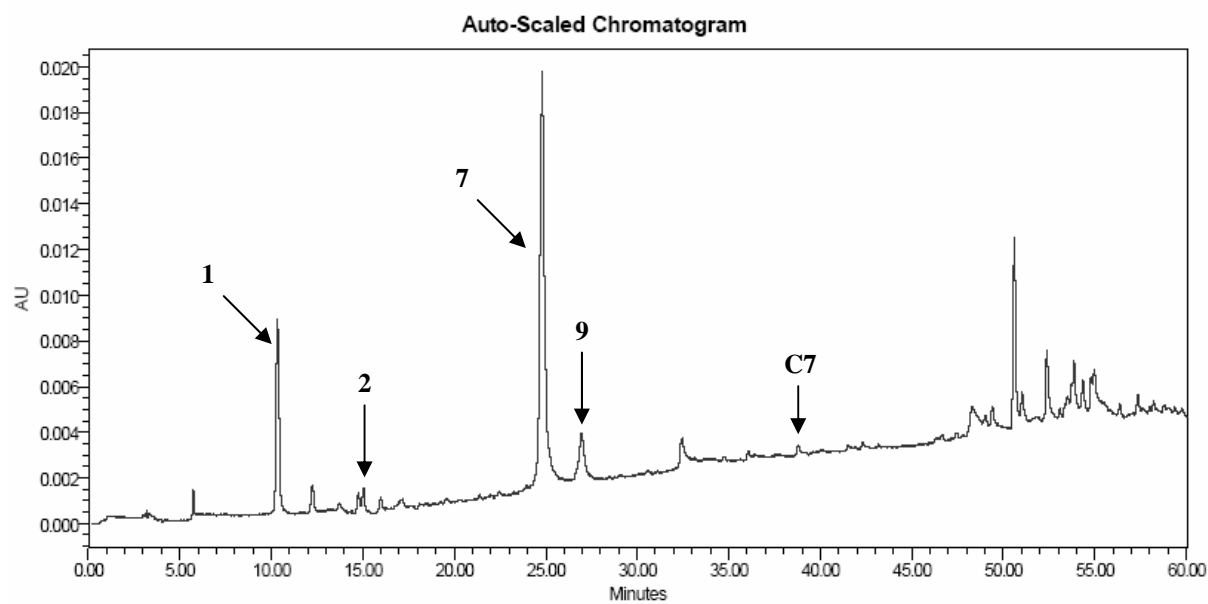


Figure 70: Chromatogramme CLHP de la fraction DB_{BB}-Bloc 8 à 280 nm

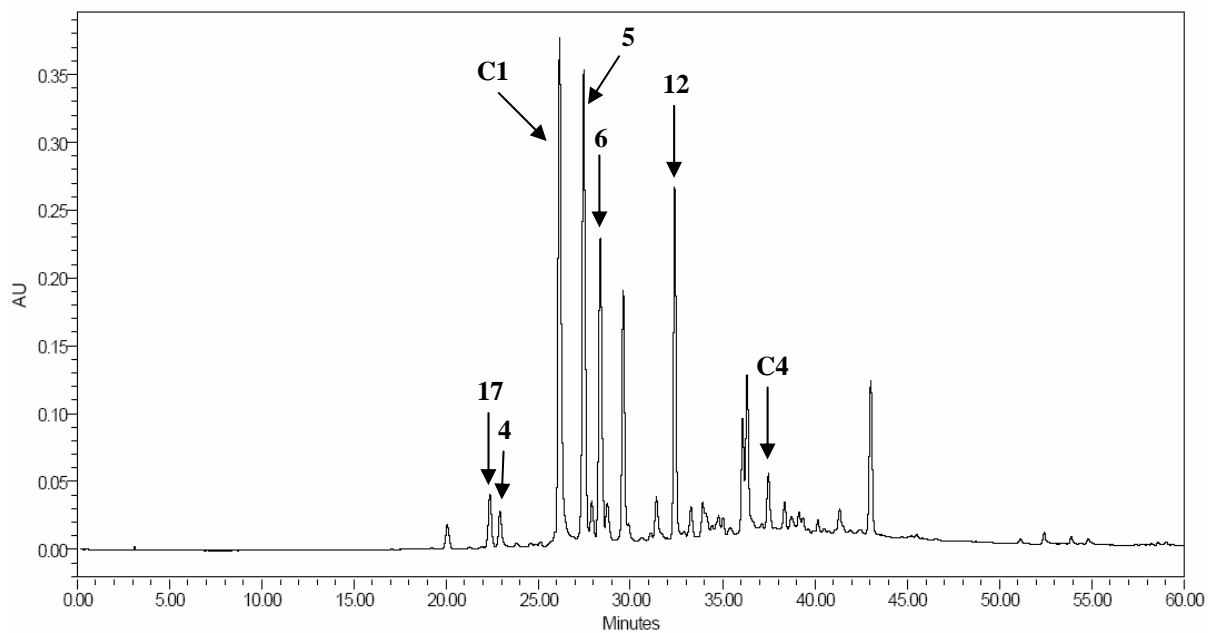


Figure 71: Chromatogramme CLHP de la fraction DB_{BN}-Bloc 1 à 280 nm

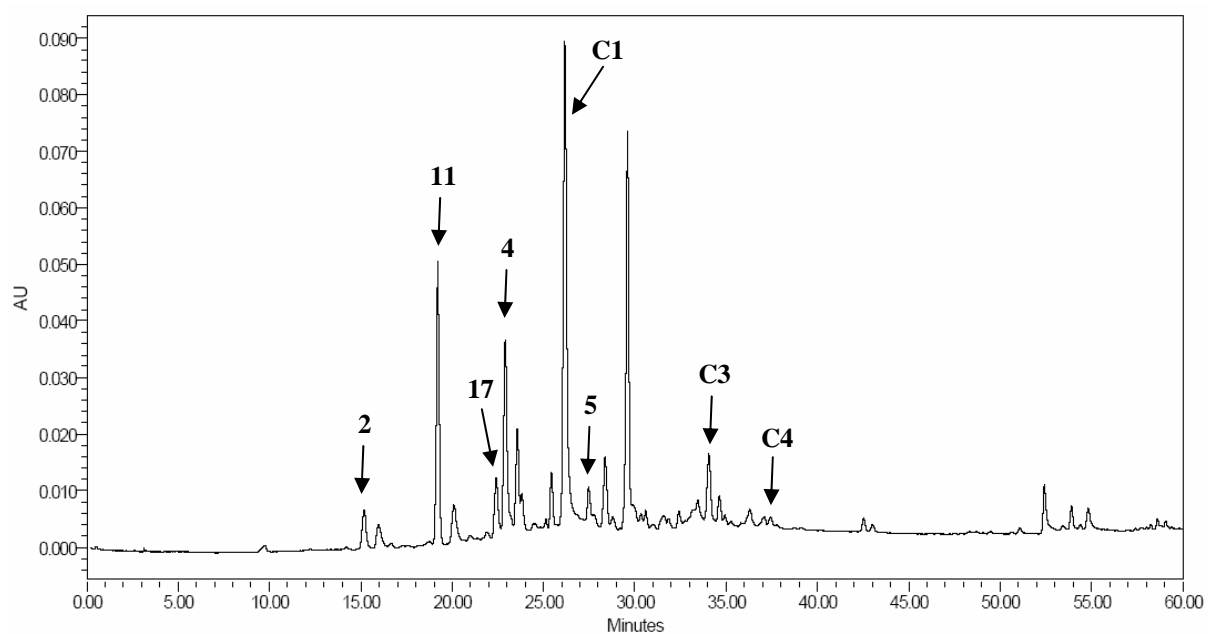


Figure 72: Chromatogramme CLHP de la fraction DB_{BN}-Bloc 2 à 280 nm

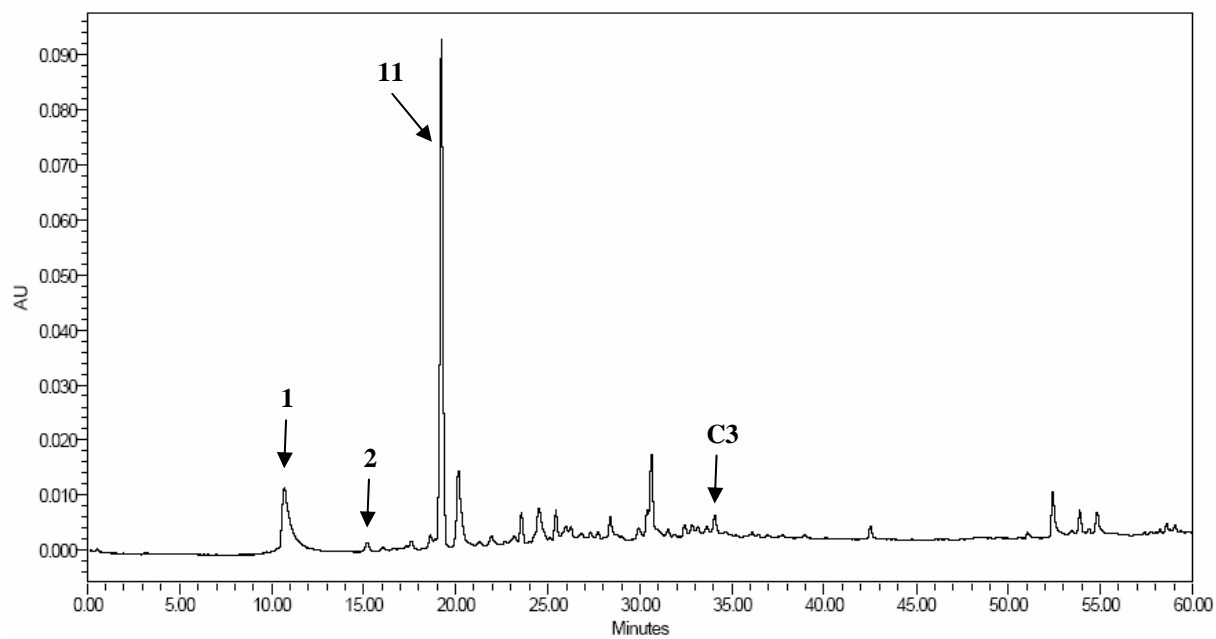


Figure 73: Chromatogramme CLHP de la fraction DB_{BN}-Bloc 3 à 280 nm

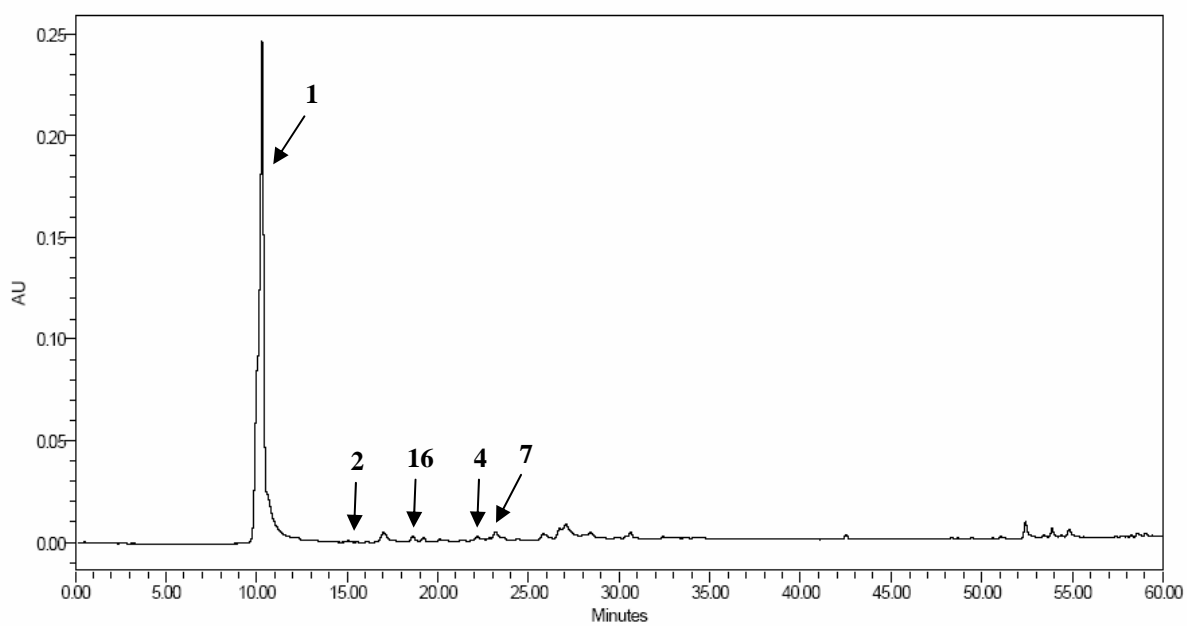


Figure 74: Chromatogramme CLHP de la fraction DB_{BN}-Bloc 4 à 280 nm

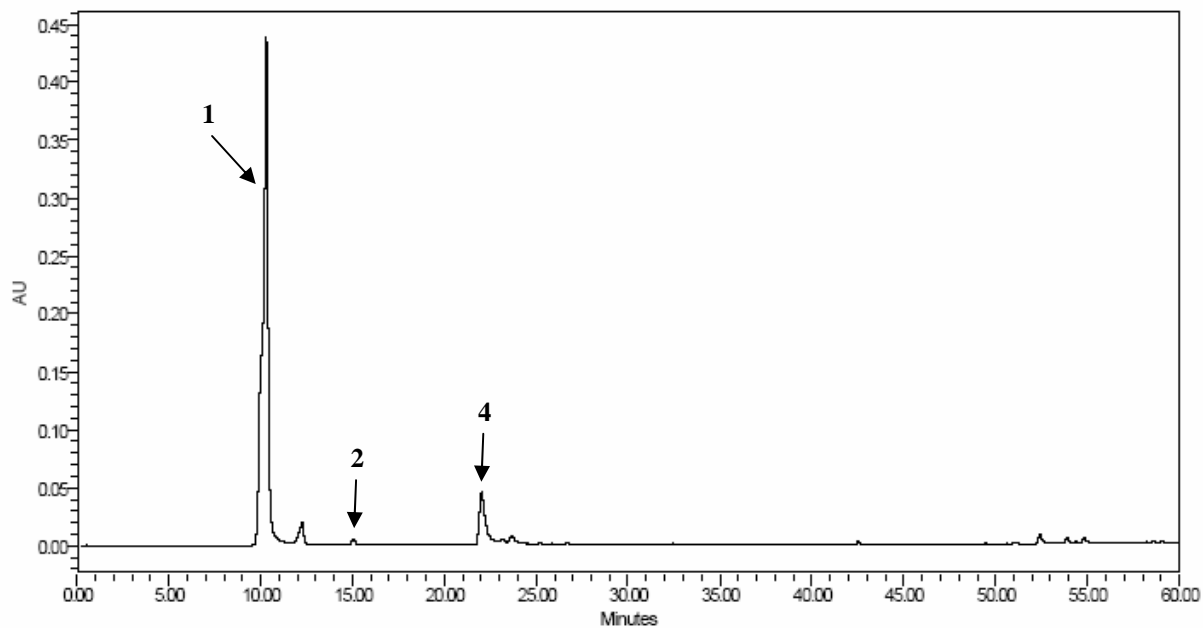


Figure 75: Chromatogramme CLHP de la fraction DB_{BN}-Bloc 5 à 280 nm

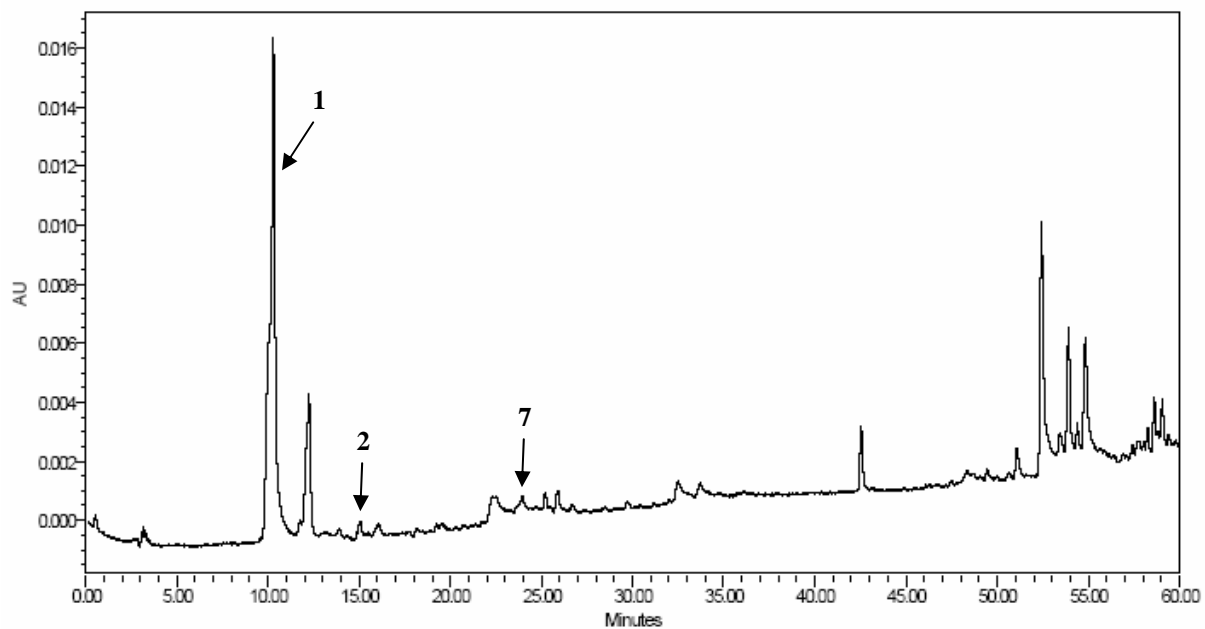


Figure 76: Chromatogramme CLHP de la fraction DB_{BN}-Bloc 6 à 280 nm

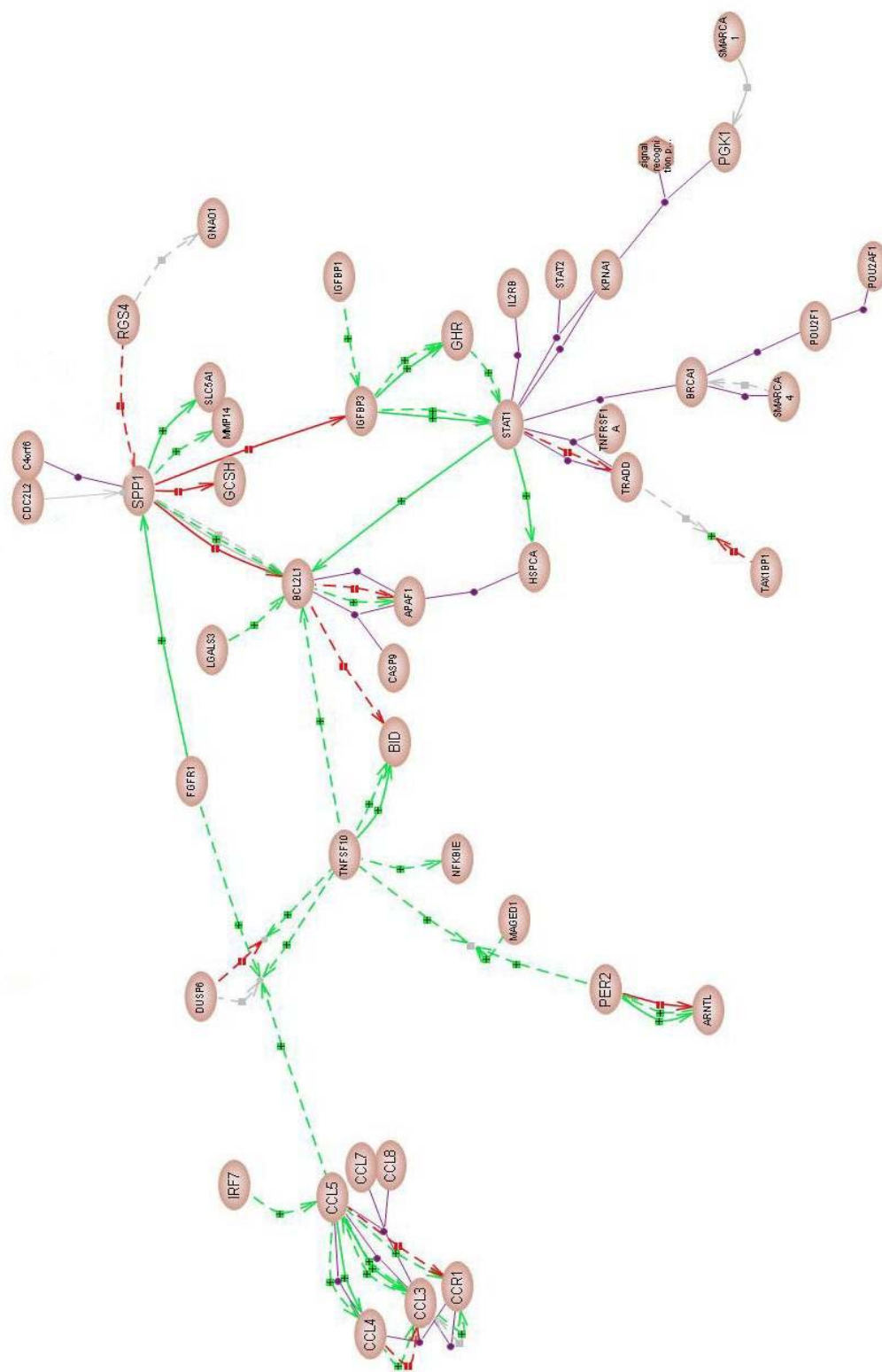


Figure 77: Exemple de voie métabolique traitée par Pathway Assist : gènes « up régulés »

BIBLIOGRAPHIE

1. Saint Leger, A.S., A.L. Cochrane, and F. Moore, *Factors associated with cardiac mortality in developed countries with particular reference to the consumption of wine*. Lancet, 1979. **12**: p. 1017-1020.
2. Renaud, S. and M. De Lorgeril, *Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease*. Lancet, 1992. **339**(8808): p. 1523-1526.
3. Belleville, J., *The French Paradox: Possible Involvement of Ethanol in the Protective Effect Against Cardiovascular Diseases*. Nutrition, 2002. **18**: p. 173-177.
4. Bertelli, A.A.E., et al., *Consommation modérée de vin et maladies cardiovasculaires : Bilan de dix ans de connaissances*, in *Colloque international de l'Institut Européen Vin et Santé des Régions Viticoles*. 2004, Agropolis International: Montpellier. p. 1.
5. Berké, B., et al., *Wine and Health: recent findings*. J. Pharm. Belg, 2003. **58**(3): p. 57-74.
6. Tapiero, H., et al., *Polyphenols: Do they play a role in the prevention of human pathologies ?* Biomed Pharmacother, 2002. **56**: p. 200-207.
7. Soleas, G.J., et al., *A comparison of the anticarcinogenic properties of four red wine polyphenols*. Clinical Biochemistry, 2002. **35**: p. 119-124.
8. Higdon, J.V. and B. Frei, *Tea Catechins and Polyphenols: Health Effects, Metabolism, and Antioxidant Functions*. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2003. **43**(1): p. 89-143.
9. Wollgast, J. and E. Anklam, *Polyphenols in chocolate: is there a contribution to human health?* Food Research International, 2000. **33**(449-459).
10. Perrot, L., *Evaluation de l'effet antihypertenseur de la fraction oligopeptidique du vin de Champagne. Identification et caractérisation d'oligopeptides.*, in *Thèse de l'Université de Reims Champagne-Ardenne*. 2004.
11. *Le vigneron Champenois*. N°8, Septembre 2001. **Annexe 4**: p. 70.
12. Riberau-Gayon, P., et al., *Traité d'Oenologie : La Chimie du Vin, Stabilisation et Traitements*. Edition La Vigne. Vol. Tome II. 1998: Dunod.

13. Senee, J., B. Robillard, and M. Vignes-Adler, *The [zeta]-potential of the endogenous particles of a wine of Champagne in relation to the foaming behaviour*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2001. **21**(1-3): p. 59-67.
14. Tusseau, D. and S. Van Laer, *Macromolecules in wines of Champagne*. Science des aliments, 1993. **13**(3): p. 463-82.
15. Feuillat, M., *Les constituants azotés des raisins et du vin*. Ann. Univ. et A.R.E.R.S, 1973. **11**: p. 37-46.
16. Perrot, L., et al., *Yeast adapted to wine: Nitrogen compounds released during induced autolysis in a model wine*. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2002. **29**: p. 134-9.
17. Marchal, R., S. Bouquelet, and A. Maujean, *Purification and partial characterization of glycoproteins of Champagne base wine.*, in *Oenology 95, Symposium International d'oenologie, 5th*, A. Lonvaud-Funel, Editor. 1996, Tec & Doc - Lavoisier: Bordeaux. p. 486-90.
18. Desportes, C., *Contribution à la connaissance de la fraction peptidique des vins. Isolement et caractérisation organoleptiques de quelques peptides du Champagne.*, in *Thèse de l'Université de Reims*. 1999. p. 140.
19. de Person, M., et al., *Characterization of low-molecular weight peptides in champagne wine by liquid chromatography/tandem mass spectrometry*. Analytica Chimica Acta, 2004. **520**: p. 149-58.
20. Troton, D., et al., *Evolution of the lipid contents of Champagne wine during the second fermentation of Saccharomyces cerevisiae*. American Journal of Enology and Viticulture, 1989. **40**(3): p. 175-82.
21. Aussenac, J., et al., *Purification method for the isolation of monophosphate nucleotides from Champagne wine and their identification by mass spectrometry*. Journal of chromatography A, 2001. **907**: p. 155-64.
22. Tusseau, D. and C. Benoit, *Routine high-performance liquid chromatographic determination of carboxylic acids in wines and Champagne*. Journal of chromatography A, 1987. **395**: p. 323-33.
23. Jos, A., et al., *Differentiation of sparkling wines (cava and champagne) according to their mineral content*. Talanta, 2004. **63**(2): p. 377-382.
24. Ibern Gomez, M., et al., *Phenolic compounds in white wine and cava. Relations to health*. Alimentacion, Equipos y Tecnologia, 1999. **18**(10): p. 105-109.
25. Cheynier, V., et al., *Estimation of must oxidation during pressing in Champagne*. American Journal of Enology and Viticulture, 1993. **44**(4): p. 393-9.

26. Kalkova, N., S. Dimov, and M. Garabedian, *The phenolic composition and quality of naturally sparkling white wine*. Lozarstvo i Vinarstvo, 1989. **38**(3): p. 12-16.
27. Cheynier, V., M. Moutounet, and P. Sarni-Manchado, *Les composés phénoliques*, in *Oenologie: fondements scientifiques et technologiques.*, C. Flanzy, Editor. 1998, Lavoisier: Cachan, France.
28. Zoecklein, B., *A review of méthode Champenoise production*. Practical Winery and Vineyard, <http://www.ext.vt.edu/pubs/viticulture/463-017/463-017.html>, 2002.
29. Baronnat, J., *Vins et Santé - Guide 1997*. Les édition du voyage ed.
30. Chamkha, M., et al., *Phenolic composition of Champagnes from Chardonnay and Pinot noir vintages*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003. **51**(10): p. 3179-84.
31. Singleton, V.L. and J. Rossi, *Colorimetry of Total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents*. American Journal of Enology and Viticulture, 1965. **16**: p. 144.
32. Cheynier, V. and M. Van Hulst, *Oxidation of trans-caftaric acid and 2-S glutathionylcaftaric acid in model solutions*. J. Agric. Food. Chem., 1988. **36**: p. 10-15.
33. Cheynier, V., C. Osse, and J. Rigaud, *Oxidation of grape juice phenolic compounds in model solutions*. J.Food.Sci., 1988. **53**(6): p. 1729-1760.
34. Cheynier, V., et al., *Characterization of 2-S-glutathionyl caftaric acid and its hydrolysis in relation to grape wines*. J. Agric. Food Chem., 1986. **34**: p. 217-221.
35. Flanzy, C., *Oenologie fondements scientifiques*, in *Collection Sciences et Techniques Agroalimentaires*. 1998.
36. Landrault, N., et al., *Antioxidant capacities and phenolics levels of French wines from different varieties and vintages*. J Agric Food Chem, 2001. **49**(7): p. 3341-8.
37. Barbaste, M., et al., *Dietary antioxidants, peroxidation and cardiovascular risks*. Journal of Nutrition Health and Aging, 2002. **6**(3): p. 209-223.
38. McCord, J., *The evolution of free radicals and oxidative stress*. American Journal of Medicine, 2000. **108**: p. 652.
39. Zheng, M. and G. Storz, *Redox sensing by prokaryotic transcription factors*. Biochem. Pharmacol, 2000. **59**: p. 1.

40. Lander, H.M., *An essential role for free radicals and derived species in signal transduction*. FASEB. J, 1997. **11**: p. 118.
41. Ignarro, L.J., et al., *Nitric oxide as a signaling molecule in the vascular system: an overview*. J. Cardiovasc. Pharmacol, 1999. **34**: p. 879.
42. Freidovich, I., *Fundamental aspects of reactive oxygen species, or what's the matter with oxygen?* Ann. NY. Acad. Sci, 1999. **893**: p. 13.
43. Pincemail, J. *Espèces oxygénées réactives*. in *1^{er} Symposium francophone stress oxydant et maladies, exploration biologique prévention et thérapeutique d'appoint*. 30 septembre 2000. Paris (France).
44. Maillard, L.C., *Synthesis of Lower Peptides by a New and Direct Method, Akin to Biological Reactions*. Comptes Rendus des Seances de la Societe de Biologie et de Ses Filiales, 1912. **71**: p. 546-9.
45. Guest-Editorial, *Intervention against the Maillard reaction in vivo*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2003. **419**: p. 1-15.
46. Reynolds, T., *Chemistry of nonenzymic browning. II*. Advances in food research, 1965. **14**: p. 167-283.
47. Adrian, J., et al., *Nutritional repercussions of soluble products formed during the Maillard reaction*. Annales de la nutrition et de l'alimentation, 1966. **20**: p. 257-277.
48. Vlassara, H., et al., *Inflammatory mediators are induced by dietary glycotoxins, a major risk factor for diabetic angiopathy*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2002. **99**(24): p. 15596-15601.
49. Wu, X. and V.M. Monnier, *Enzymatic deglycation of proteins*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2003. **419**: p. 16-24.
50. Ulrich, P. and A. Cerami, *Protein glycation, diabetes, and aging*. Recent progress in hormone research, 2001. **56**: p. 1-21.
51. Baynes, J.W. and S.R. Thorpe, *Glycation and advanced glycation reactions*, in *Diabetes in the New Millenium*, J.R. Turtle, T. Kaneko, and S. Osato, Editors. 1999, Endocrinology and Diabetes Research Foundation: Sidney. p. 337-350.
52. Vasan, S., P. Foiles, and H. Founds, *Therapeutic potential of breakers af advanced glycation en product-protein crosslinks*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2003. **419**(89-96).
53. Rahbar, S. and J.L. Figarola, *Novel inhibitors of advanced glycation enproducts*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2003. **419**: p. 63-79.

54. Brownlee, M., *Advanced protein glycosylation in diabetes and aging*. Annual review of medicine, 1995. **46**: p. 223-34.
55. Bartos, V., *Atherosclerosis, alcohol, and diabetes*. Vnitri Lekarstvi, 2002. **48**(6): p. 529-530, 532-533.
56. Katakam, P.V.G., et al., *Endothelial dysfunction preceds hypertension in diet-induced insulin resistance*. The American Physiological Society, 1998. **275**(3 Pt 2): p. R788-92.
57. Scherrer, U., et al., *Nitric oxide release accounts for insulin's vascular effect in humans*. Journal of Clinical Investigation, 1994. **94**: p. 2511-2515.
58. Zeng, G. and M.J. Quon, *Insulin stimulated production of nitric oxide is inhibited by Wortmannin: direct measurement in vascular endothelial cells*. Journal of clinical investigation, 1996. **98**: p. 894-898.
59. Sakamoto, S., et al., *Effect of exercise training and food restriction on endothelium dependent relaxation of the Otsuka Long-Evans tokushima Fatty rat, a model of spontaneous NIDDM*. Diabetes, 1998. **42**: p. 82-86.
60. Kotchen, T., S. Reddy, and H.Y. Zhang, *Increasing insulin sensitivity lowers blood pressure in the fructose-fed rat*. American Journal Of Hypertension, 1997. **10**: p. 1020-1026.
61. Pettrie, J.R., et al., *Endothelial nitric oxide production and insulin sensitivity: a physiological link with implications for pathogenesis of cardiovascular disease*. Circulation, 1996. **93**(1331-1333).
62. Steinberg, H.O., et al., *Insulin-mediated skeletal muscle vasodilation is nitric oxide dependent: a novel action of insulin to increase nitric oxide release*. Journal of clinical investigation, 1994. **94**: p. 1172-1179.
63. Vauzour, D., C. Castagnino, and J. Vercauteren, *Polyphénols du vin au coeur de la vie*. Proceedings des "Journées Scientifiques de l'Académie de Pharmacie de Belgique", Université de Liège, Belgique, 2003, pp. 1-31.
64. Coudray, C., et al., *Lipid peroxidation level and antioxidant micronutrient status in a pre-aging population; correlation with a chronic disease prevalence in a french epidemiological study (Nantes, France)*. J.Am.Coll.Nutr, 1997. **16**(6): p. 584-591.
65. Witztum, J. and D. Steinberg, *Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis*. J.Clin.Invest, 1991. **88**(6): p. 1785-1792.
66. Sigari, F., et al., *Fibroblasts that overexpress 15-lipoxygenase generate bioactive and minimally modified LDL*. Arterioscl.Thromb.Vasc.Biol., 1997. **17**(12): p. 3629-3645.

67. Gillotte, K., et al., *Oxidized phospholipids, linked to apolipoprotein B of oxidized LDL, are ligands for macrophage scavenger receptors*. J.Lipid.Res, 2000. **41**(5): p. 824-833.
68. Hensley, K., et al., *A model for β -amyloid aggregation and neurotoxicity based on free radical generation by the peptide: relevance to Alzheimer disease*. Proc. Nat. Acad. Sci USA, 1994. **91**: p. 3270-3274.
69. Gilgun Sherki, Y., E. Melamed, and D. Offen, *Oxidative stress induced-neurodegenerative diseases: the need for antioxidants that penetrate the blood brain barrier*. Neuropharmacology, 2001. **40**(8): p. 959-975.
70. Veszelovzky, E., et al., *Plasma nitrate clearance in mice: modeling of the systemic production of nitrate following the induction of nitric oxide synthesis*. Cancer. Chemother. Pharmacol, 1995. **36**(2): p. 155-159.
71. Hanna, A.N., et al., *In vitro and in vivo inhibition of microsomal lipid peroxidation by MA-631*. Pharmacol. Biochem. Behav, 1994. **48**(2): p. 505-510.
72. Oldreive, C., et al., *Inhibition of nitrous acid-dependent tyrosine nitration and DNA base deamination by flavonoids and other phenolic compounds*. Chem. Res. Toxicol., 1998. **11**(12): p. 1574-1579.
73. Munch, G., et al., *Intraneuronal advanced glycation endproducts in presenilin-1 Alzheimer's disease*. Neuroreport, 2002. **13**(5): p. 601-4.
74. Stitt, A.W., et al., *Elevated AGE-modified ApoB in sera of euglycemic, normolipidemic patients with atherosclerosis: relationship to tissue AGEs*. Molecular medicine (Cambridge, Mass.), 1997. **3**(9): p. 617-27.
75. Nagai, R., et al., *Identification in Human Atherosclerotic Lesions of GA-pyridine, a Novel Structure Derived from Glycolaldehyde-modified Proteins*. Journal of Biological Chemistry, 2002. **277**(50): p. 48905-48912.
76. Anderson, M.M., et al., *The myeloperoxidase system of human phagocytes generates Nepsilon-(carboxymethyl)lysine on proteins: a mechanism for producing advanced glycation end products at sites of inflammation*. Journal of clinical investigation, 1999. **104**(1): p. 103-13.
77. Hudson, B.I., et al., *Blockade of receptor for advanced glycation endproducts: a new target for therapeutic intervention in diabetic complications and inflammatory disorders*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2003. **419**: p. 80-88.
78. Pincemail, J., et al., *Mécanismes physiologiques de la défense antioxydante*. Nutrition Clinique et Métabolisme, 2002. **16**: p. 233-239.

79. Coyle, P., et al., *Metallothionein: the multipurpose protein*. Cell. Mol. Life Sci., 2002. **59**: p. 627-647.
80. Keys, A. and M. Keys, *How to eat well and stay well, the Mediterranean way*. New York: DoubleDay Company Inc., 1975.
81. WHO, *The traditional healthy mediterranean diet pyramid, Oldways Preservation & Exchange Trust*. WHO/FAO collaborating Center for Nutrition at Harvard School of Public Health, and the World Health Organization Regional Office for Europe., 1994.
82. Auger, C., et al., *Catechins and procyanidins in Mediterranean diets*. Food Research International, 2004. **37**: p. 233-245.
83. Svilaas, A., et al., *Intakes of Antioxidants in Coffee, Wine, and Vegetables Are Correlated with Plasma Carotenoids in Humans*. J. Nutr, 2004. **134**: p. 562-567.
84. Renaud, S.C., et al., *Wine, beer, and mortality in middle-aged men from eastern France*. Archives of internal medicine, 1999. **159**(16): p. 1865-70.
85. Nève, J., *Modulation de l'apport alimentaire en anti-oxydants*. Nutrition Clinique et Métabolisme, 2002. **16**: p. 292-300.
86. Stahl, W., et al., *Bioavailability and metabolism, Chapter 2*. Molecular Aspect of Medicine, 2002. **23**: p. 39-100.
87. Spencer, J.P.E., M.M. Abd El Mohsen, and C. Rice-Evans, *Cellular uptake and metabolism of flavonoids and their metabolites: implications for their bioactivity*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2004. **423**: p. 148-161.
88. Spencer, J.P.E., et al., *Epicatechin and its in vivo metabolite, 3'-O-méthyl epicatechin, protect human fibroblast from oxidative-stress-induced cell death involving caspase-3 activation*. Biochem. J, 2001. **354**(Pt 3): p. 493-500.
89. Terao, J., et al., *Protection by quercetin and quercetin 3-O-beta-D-glucuronide of peroxynitrite-induced antioxidant consumption in human plasma low-density lipoprotein*. Free Radic. Res., 2001. **35**(6): p. 925-31.
90. Williams, R.J., J.P.E. Spencer, and C. Rice-Evans, *Flavonoids: antioxidants or signalling molecules?* Free Radical Biology and Medicine, 2004. **36**(7): p. 838-849.
91. Abd El Mohsen, M.M., et al., *Uptake and metabolism of epicatechin and its access to the brain after oral ingestion*. Free Radical Biology & Medicine, 2002. **33**(12): p. 1693-1702.

92. Bickford, P.C., B. Shukitt-Hale, and J. Joseph, *Effects of aging on cerebellar noradrenergic function and motor learning: nutritional intervention*. Mech. Ageing Develop, 1999. **111**: p. 141-154.
93. Inanami, O., et al., *Oral administration of (-)-catechin protects against ischemia/reperfusion-induced neuronal death in the gerbil*. Free Radic. Res, 1998. **29**: p. 359-365.
94. Lee, S., S. Suh, and S. Kim, *Protective effects of green tea polyphenol (-)-epigallocatechin gallate against hippocampal neuronal damage after transient global ischemia in gerbils*. Neurosci. Lett., 2000. **287**: p. 191-194.
95. Youdim, K.A., et al., *Interaction between flavonoids and the blood-brain barrier: in vitro studies*. J. Neurochem., 2003. **85**(&): p. 180-192.
96. Osborne, R., et al., *Analgesic activity of morphine-6-glucuronide*. Lancet, 1988. **1**(8589): p. 828.
97. Spencer, J.P., et al., *Contrasting influences of glucuronidation and O-methylation of epicatechin on hydrogen peroxide-induced cell death in neurons and fibroblasts*. Free Radic Biol Med, 2001. **31**(9): p. 1139-46.
98. Watanabe, C.M., et al., *The in vivo neuromodulatory effects of the herbal medicine ginkgo biloba*. Proc. Nat. Acad. Sci USA, 2001. **98**(12): p. 6577-80. Epub 2001 May 29.
99. Spencer, J.P., G.G. Kuhnle, and R.J. Williams, *Intracellular metabolism and bioactivity of quercetin and its in vivo metabolites*. Biochem. J, 2003. **372**(Pt 1): p. 173-81.
100. Salucci, M., et al., *Flavonoids uptake and their effect on cell cycle of human colon adenocarcinoma cells (Caco2)*. Br. J. Cancer, 2002. **86**(10): p. 1645-51.
101. Walgren, R.A., et al., *Efflux of dietary flavonoid quercetin 4'-beta-glucoside across human intestinal Caco-2 cell monolayers by apical multidrug resistance-associated protein-2*. J. Pharmacol. Exp. Ther., 2000. **294**(3): p. 830-6.
102. Ferrières, J., *The French Paradox: Lessons for other countries*. Heart, 2004. **90**: p. 107-111.
103. Le Marchand, L., *Cancer preventive effect of flavonoids-a review*. Biomed Pharmacother, 2002. **56**: p. 296-301.
104. Jang, M., et al., *Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes*. Science, 1997. **275**(5297): p. 218-20.

105. Surh, Y.J., *Molecular mechanisms of chemopreventive effects of selected dietary and medicinal phenolic substances*. Mutation Res., 1999. **428**: p. 305-327.
106. Rossi, J.F., *Effets antiproliférants et pro-apoptotiques sélectifs des polyphénols du vin sur les lignées de myélome par rapport à des cellules hématopoïétiques souches humaine CD34+*, in *Cahiers Scientifiques: Etat de l'art des recherches sur les relation entre vin et santé. I.E.V.S.R.V - La journée Vinicole (Ed.) - Montpellier*. 2004. p. 39-44.
107. Ren, W., et al., *Flavonoids: Promising anticancer agents*. Med. Res. Rev., 2003. **23**(4): p. 519-34.
108. Wattenberg, L.W., *Inhibition of carcinogenesis by minor dietary constituents*. Cancer Res., 1992. **52**: p. 2085s-91s.
109. Le Marchand, L., et al., *Intake of flavonoids and lung cancer*. J. Natl. Cancer. Inst., 2000. **92**: p. 154-60.
110. Bu-Abbas, A., et al., *Contribution of caffeine and flavanols in the induction of hepatic phase II activities by green tea*. Food Chem. Toxicol., 1998. **36**: p. 617-21.
111. Brueggemeier, R.W., *Aromatase, aromatase inhibitors, and breast cancer*. Am. J. Ther., 2001. **8**: p. 333-44.
112. Kawaii, S., et al., *Antiproliferative activity of flavonoids on several cancer cell lines*. Bioscience, biotechnology, and biochemistry, 1999. **63**(5): p. 896-9.
113. Prescott, S.M. and F.A. Fitzpatrick, *Cyclooxygenase-2 and carcinogenesis*. Biochim. Biophys. Acta, 2000. **1470**: p. M69-78.
114. Dannenberg, A.J., et al., *Cyclooxygenase 2: A pharmacological target for the prevention of cancer*. Lancet Oncology, 2001. **2**(9): p. 544-551.
115. Kundu, J.K., et al., *Inhibition of Phorbol Ester-Induced COX-2 Expression by Epigallocatechin Gallate in Mouse Skin and Cultured Human Mammary Epithelial Cells*. J. Nutr., 2003. **133**(11): p. 3805S-3810.
116. Selloum, L., et al., *Effects of Flavonols on the Generation of Superoxide Anion Radicals by Xanthine Oxidase and Stimulated Neutrophils*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2001. **395**(1): p. 49-56.
117. Sadik, C.D., H. Sies, and T. Schewe, *Inhibition of 15-lipoxygenases by flavonoids: structure-activity relations and mode of action*. Biochemical Pharmacology, 2003. **65**(5): p. 773-781.

118. Verma, A.K., C.L. Ashendel, and R.K. Boutwell, *Inhibition by prostaglandin synthesis inhibitors of the induction of epidermal ornithine decarboxylase activity, the accumulation of prostaglandins, and tumor promotion caused by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate*. *Cancer Res.*, 1980. **40**: p. 308-15.
119. Schneider, Y., et al., *Anti-proliferative effect of resveratrol, a natural component of grapes and wine, on human colonic cancer cells*. *Cancer Letters*, 2000. **158**(1): p. 85-91.
120. Pommier, Y. and K.W. Kohn, *Cycle cellulaire et points de contrôle en oncologie: nouvelles cibles thérapeutiques*. *Médecine/Sciences*, 2003. **19**: p. 173-86.
121. Viillard, J.F., et al., *Mécanismes moléculaires contrôlant le cycle cellulaire: aspects fondamentaux et implications en cancérologie*. *Cancer/Radiother.*, 2001. **5**: p. 109-29.
122. Sedlacek, H.H., *Mechanisms of action of flavopiridol*. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 2001. **38**(2): p. 139-170.
123. Estrov, Z., et al., *Resveratrol blocks interleukin-1 β -induced activation of the nuclear transcription factor NF- κ B, inhibits proliferation, causes S-phase arrest, and induces apoptosis of acute myeloid leukemia cells*. *Blood*, 2003. **102**(3): p. 987-95.
124. Ferry-Dumazet, H., et al., *Resveratrol inhibits the growth and induces the apoptosis of both normal and leukemic hematopoietic cells*. *Carcinogenesis*, 2002. **23**(8): p. 1327-1333.
125. Hsieh, T.-c., et al., *Effects of resveratrol on the G0-G1 transition and cell cycle progression of mitogenically stimulated human lymphocytes*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2002. **297**(5): p. 1311-1317.
126. Bernhard, D., et al., *Resveratrol causes arrest in the S-phase prior to Fas-independent apoptosis in CEM-C7H2 acute leukemia cells*. *Cell Death Differ.*, 2000. **7**(9): p. 834-42.
127. Ahmad, N., P. Cheng, and H. Mukhtar, *Cell Cycle Dysregulation by Green Tea Polyphenol Epigallocatechin-3-Gallate*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2000. **275**(2): p. 328-334.
128. Gupta, S., et al., *Growth Inhibition, Cell-Cycle Dysregulation, and Induction of Apoptosis by Green Tea Constituent (-)-Epigallocatechin-3-gallate in Androgen-Sensitive and Androgen-Insensitive Human Prostate Carcinoma Cells*. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2000. **164**(1): p. 82-90.
129. Semenov, I., et al., *Growth inhibition and apoptosis of myeloma cells by the CDK inhibitor flavopiridol*. *Leukemia Research*, 2002. **26**(3): p. 271-280.

130. Kennedy, D.O., et al., *Cellular thiol status-dependent inhibition of tumor cell growth via modulation of retinoblastoma protein phosphorylation by (-)-epigallocatechin*. *Cancer Letters*, 2002. **179**(1): p. 25-32.
131. Della Ragione, F., et al., *Resveratrol Arrests the Cell Division Cycle at S/G2 Phase Transition*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1998. **250**: p. 53-58.
132. Liang, Y.-C., et al., *Resveratrol-induced G2 arrest through the inhibition of CDK7 and p34CDC2 kinases in colon carcinoma HT29 cells*. *Biochemical Pharmacology*, 2003. **65**(7): p. 1053-1060.
133. Adam, M., J.P. Levraud, and P. Golstein, *Approches génétiques de la mort cellulaire programmée: succès et questions*. *Médecine/Sciences*, 2002. **18**(8-9): p. 831-40.
134. Couzinet, A., Z. Hérincs, and A.O. Hueber, *Régulation de la mort cellulaire programmée: vers une conception plus dynamique*. *Médecine/Sciences*, 2002. **18**(8-9): p. 841-52.
135. Dorrie, J., et al., *Resveratrol induces extensive apoptosis by depolarizing mitochondrial membranes and activating caspase-9 in acute lymphoblastic leukemia cells*. *Cancer Research*, 2001. **61**(12): p. 4731-4739.
136. Clement, M.V., et al., *Chemopreventive agent resveratrol, a natural product derived from grapes, triggers CD95 signaling-dependent apoptosis in human tumor cells*. *Blood*, 1998. **92**(3): p. 996-1002.
137. Delmas, D., et al., *Resveratrol-induced Apoptosis Is Associated with Fas Redistribution in the Rafts and the Formation of a Death-inducing Signaling Complex in Colon Cancer Cells*. *Journal of Biological Chemistry*, 2003. **278**(42): p. 41482-41490.
138. Tsan, M.F., et al., *Resveratrol induces Fas signalling-independent apoptosis in THP-1 human monocytic leukaemia cells*. *British journal of haematology*, 2000. **109**(2): p. 405-12.
139. Zhao, Y., et al., *Apoptosis induced by tea polyphenols in HL-60 cells*. *Cancer Letters*, 1997. **121**: p. 163-67.
140. Liu, M.J., et al., *Mitochondrial dysfunction as an early event in the process of apoptosis induced by woodfordin I in human leukemia K562 cells*. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2004. **194**(2): p. 141-155.
141. Roman, V., et al., *Analysis of resveratrol-induced apoptosis in human B-cell chronic leukaemia*. *British Journal of Haematology*, 2002. **117**(4): p. 842-851.

142. Smith, D.M. and Q.P. Dou, *Green tea polyphenol epigallocatechin inhibits DNA replication and consequently induces leukemia cell apoptosis*. International journal of molecular medicine, 2001. **7**(6): p. 645-52.
143. Billard, C., et al., *Comparative antiproliferative and apoptotic effects of resveratrol, epsilon-viniferin and vine-shots derived polyphenols (vineatrols) on chronic B lymphocytic leukemia cells and normal human lymphocytes*. Leuk. Lymphoma, 2002. **43**(10): p. 1991-2002.
144. Mata-Greenwood, E., et al., *Discovery of novel inducers of cellular differentiation using HL-60 human promyelocytic cells*. Anticancer Res., 2001. **21**: p. 1763-70.
145. Takahashi, T., et al., *Structure-activity relationships of flavonoids and the induction of granulocytic- or monocytic-differentiation in HL-60 human myeloid leukemia cells*. Biosci. Biotechnol. Biochem., 1998. **62**: p. 2199-204.
146. Paper, D., *Natural products as angiogenesis inhibitors*. Planta Med., 1998. **64**: p. 686-95.
147. Tosetti, F., et al., *Angioprevention': Angiogenesis is a common and key target for cancer chemopreventive agents*. FASEB. J, 2002. **16**: p. 2-14.
148. Cao, Y., R. Cao, and E. Brakenhielm, *Antiangiogenic mechanisms of diet-derived polyphenols*. The Journal of Nutritional Biochemistry, 2002. **13**(7): p. 380-390.
149. Ruefli, A.A. and R.W. Johnstone, *A role for P-glycoprotein in regulating cell growth and survival*. Clinical and Applied Immunology Reviews, 2003. **4**(1): p. 31-47.
150. Drach, J., et al., *Involvement of P-glycoprotein in the transmembrane transport of interleukin-2 (IL-2), IL-4, and interferon-gamma in normal human T lymphocytes*. Blood, 1996. **88**(5): p. 1747-54.
151. Zhang, Q., D. Wei, and J. Liu, *In vivo reversal of doxorubicin resistance by (-)-épigallocatechin gallate in a solid human carcinoma xenograft*. Cancer Letters, 2004. **208**: p. 179-86.
152. Flynn, B.L. and A.E. Ranno, *Pharmacologic management of Alzheimer disease, Part II: Antioxidants, antihypertensives, and ergoloid derivatives*. Annals of pharmacotherapy, 1999. **33**(2): p. 188-97.
153. Braak, H., et al., *Neuropathological hallmarks of Alzheimer's and Parkinson's diseases*. Prog. Brain Res., 1998. **117**: p. 267-85.
154. Multhaup, G., et al., *Reactive oxygen species and Alzheimer's disease*. Biochemical Pharmacology, 1997. **54**(5): p. 533-539.

155. Behl, C., et al., *Hydrogen peroxide mediates amyloid beta protein toxicity*. Cell, 1994. **77**(6): p. 817-27.
156. Choi, Y., et al., *The green tea polyphenol (-)-epigallocatechin gallate attenuates β -amyloid-induced neurotoxicity in cultured hippocampal neurons*. Life Sciences, 2001. **70**: p. 603-14.
157. Orgogozo, J.M., et al., *Wine consumption and dementia in the elderly: a prospective community study in the Bordeaux area*. Revue neurologique, 1997. **153**(3): p. 185-92.
158. Bastianetto, S., *Red wine consumption and brain aging*. Nutrition, 2002. **18**(5): p. 432-433.
159. Pettenati, C., R. Annicchiarico, and C. Caltagirone, *Clinical pharmacology of anti-alzheimer drugs*. Fund. Clin. Pharmacol., 2003. **17**: p. 659-72.
160. Savaskan, E., et al., *Red wine ingredient resveratrol protects from β -amyloid neurotoxicity*. Gerontology, 2003. **49**: p. 380-3.
161. Levites, Y., et al., *Neuroprotection and neurorescue against $A\beta$ toxicity and PKC-dependent release of nonamyloidogenic soluble precursor proreïn by green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate*. FASEB. J, 2003. **17**: p. 952-4.
162. Kontush, A., et al., *Influence of vitamin E and C supplementation on lipoprotein oxidation in patients with alzheimer's disease*. Free Radic Biol Med, 2001. **31**(3): p. 345-54.
163. Bastianetto, S. and R. Quirion, *Natural extracts as possible protective agents of brain aging*. Neurobiology of Aging, 2002. **23**(5): p. 891-897.
164. Trujillo-Ferrara, J., et al., *Reversible and irreversible inhibitory activity of succinic and maleic acid derivatives on acetylcholinesterase*. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2003. **18**(5): p. 313-322.
165. Hong, J.T., et al., *Neuroprotective effect of green tea extract in experimental ischemia-reperfusion brain injury*. Brain Research Bulletin, 2000. **53**(6): p. 743-749.
166. Lemasters, J.J. and A.L. Nieminen, *Mitochondrial oxygen radical formation during reductive and oxidative stress to intact hepatocytes*. Bioscience Report, 1997. **17**: p. 281-91.
167. Piantadosi, C.A. and J. Zhang, *Mitochondrial generation of reactive oxygen species after brain ischemia in the rat*. Stroke; a journal of cerebral circulation, 1996. **27**(2): p. 327-31; discussion 332.

168. Zini, R., et al., *Effects of resveratrol on the rat forebrain respiratory chain*. *Drugs. Exp. Clin. Res.*, 1999. **XXV**(2/3): p. 87-97.
169. Chaudruc, D., *Mesure du pouvoir antioxydant d'extraits de Champagne et dosage des composés phénoliques*, in *DESS "Extraction, fractionnement, analyse et contrôle des substances naturelles à visée industrielle"*. 2000: Université de Reims.
170. Cartron, E., et al., *Red-wine beneficial long-term effect on lipids but not on antioxidant characteristics in plasma in a study comparing three types of wine - Description of two O-methylated derivatives of gallic acid in humans*. *Free Radic. Res.*, 2003. **37**(9): p. 1021-35.
171. Teyssen, S., et al., *Alcoholic beverages produced by alcoholic fermentation but not by distillation are powerful stimulants of gastric acid secretion in humans*. *Gut*, 1997. **40**: p. 49-56.
172. Biau, S., *Etude de la Matière Colorante des Vins Blancs de Bordeaux.*, in *Thèse de l'Université de Bordeaux II*. 1996.
173. Skerget, M., et al., *Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities*. *Food Chemistry*, 2004.
174. Renault, J.H. and M. Zeches-Hanrot, *La chromatographie de contre courant: une technique d'avenir pour la purification des substances naturelles*, in *Spectra analyse*. 1995. p. 33-40.
175. Renault, J.H., *La chromatographie de partage centrifuge (CPC): étude théorique et applications à l'isolement de substances naturelles*. 1997, Université de Reims Champagne Ardenne: Reims. p. 233.
176. Rolet, M., D. Thiebaut, and R. Rosset, *La chromatographie de partage centrifuge (CPC)*. *Analysis*, 1992. **20**: p. 1-11.
177. Hazekamp, A., R. Verpoorte, and A. Panthong, *Isolation of a bronchodilator flavonoid from the Thai medicinal plant Clerodendrum petasites*. *Journal of Ethnopharmacology*, 2001. **78**: p. 45-49.
178. Intes, O., et al., *Fractionation of low-molecular-mass heparin by centrifugal partition chromatography in the ion-exchange displacement mode*. *Journal of chromatography A*, 2001. **918**: p. 47-57.
179. Marston, A., C. Borel, and K. Hostettmann, *Separation of natural products by centrifugal partition chromatography*. *Journal of chromatography*, 1988. **450**: p. 91-99.
180. Yoshida, T., T. Hatano, and T. Okuda, *Chromatography of tannins*. *Journal of chromatography A*, 1989. **467**: p. 139-147.

181. Renault, J.H., et al., *Preparative separation of anthocyanins by gradient elution centrifugal partition chromatography*. Journal of chromatography A, 1997. **763**: p. 345-352.
182. Delaunay, J.C., et al., *Preparative isolation of polyphenolic compounds from Vitis vinifera by centrifugal partition chromatography*. Journal of chromatography A, 2002. **964**: p. 123-128.
183. Guyot, S., *Obtention et caractérisation de produits d'oxydation enzymatique de la (+)-catéchine et de l'acide t-caféoyltartrique. Inhibition d'enzymes impliquées dans la dégradation des polysaccharides pariétaux.*, in *Thèse, Université de Rennes I*. 1994.
184. Bradford, M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal. Biochem., 1976. **72**: p. 248-254.
185. Cheynier, V. and M.W.J. Van Hulst *Oxydation of trans- caftaric acid and 2-S glutathionylcaftaric acid in model solutions*. Journal of agricultural and food chemistry, 1988. **36**(10).
186. Matthias, A., et al., *Permeability studies of alkylamides and caffeic acid conugates from echinacea using a Caco-2 cell monolayer*. Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics, 2004. **29**(1): p. 7-13.
187. Baderschneider, B. and P. Winterhalter, *Isolation and characterization of novel benzoates, cinnamates, flavonoids, and lignans from Riesling wine and screening for antioxidant activity*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2001. **49**(6): p. 2788-98.
188. Murase, T., et al., *Gallates inhibit cytokine-induced nuclear translocation of NF- κ B and expression of leukocyte adhesion molecules in vascular endothelial cells*. Arterioscl.Thromb.Vasc.Biol., 1999. **19**(6): p. 1412-20.
189. Giovannini, L., et al., *Inhibitory activity of the white wine compounds, tyrosol and caffeic acid, on lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor- α release in human peripheral blood mononuclear cells*. Int. J. Tiss. Reac., 2002. **24**(2): p. 53-56.
190. Ferreira, V., et al., *Semipreparative reversed-phase liquid chromatographic fractionation of aroma extracts frpm wine and other aloholic beverages*. Journal of chromatography A, 1999. **864**(1): p. 77-88.
191. Garcia-Parilla, M.C., et al., *Differentiation of wine vinegars based on phenolic composition*. J. Agric. Food Chem., 1997. **45**(9): p. 3487-92.
192. Makris, D.P., et al., *The effect of polyphenolic composition as related to antioxidant capacity in white wines*. Food Research International, 2003. **36**: p. 805-14.

193. Dehouck, M.P., et al., *Drug transfer across the blood-brain barrier: correlation between in vitro and in vivo models*. Journal of neurochemistry, 1992. **58**(5): p. 1790-7.
194. Cecchelli, R., et al., *In vitro model for evaluating drug transport across the blood-brain barrier*. Advanced Drug Delivery Reviews, 1999. **36**(2,3): p. 165-178.
195. Plateel, M., et al., *Hypoxia increases the susceptibility to oxidant stress and the permeability of the blood-brain barrier endothelial cell monolayer*. J Neurochem, 1995. **65**(5): p. 2138-45.
196. Fenart, L., et al., *Transfert cérébral et neuroprotection*. Thérapie, 2004. **59**(2): p. 191-195.
197. Greene, L.A. and A.S. Tischler, *Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve factor*. Proc. Nat. Acad. Sci USA, 1976. **73**: p. 2424-28.
198. Marston, A., J. Kissling, and K. Hostettmann, *A rapid TLC bioautographic method for the detection of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors in plants*. Phytochemical Analysis, 2002. **13**: p. 51-54.
199. Miliauskas, G., P.R. Venskutonis, and T.A. Van Beek, *Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plants extracts*. Food chemistry, 2004. **85**: p. 231-237.
200. Kampa, M., et al., *A new automated method for the determination of the Total Antioxidant Capacity (TAC) of human plasma, based on the crocin bleaching assay*. BMC Clinical Pathology, 2002. **2**(3): p. 1-16.
201. Malliaraki, N., et al., *Total and corrected antioxidant capacity in hemodialized patients*. BMC Nephrology, 2003. **4**(4): p. 1-8.
202. Koutrobakis, I.E., et al., *Decreased Total and Corrected Antioxidant Capacity in Patients with Inflammatory Bowel Disease*. Digestive Diseases and Sciences, 2004. **49**(9): p. 1433-37.
203. Fadok, V., et al., *Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages*. J. Immunol, 1992. **148**(7): p. 2207-16.
204. Mao, T.K., et al., *The effect of cocoa procyanidins on the transcription and secretion of interleukin 1 β in peripheral blood mononuclear cells*. Life Sciences, 2000. **66**(15): p. 1377-1386.
205. Falchetti, R., et al., *Effects of resveratrol on human immune cell function*. Life Sciences, 2001. **70**: p. 81-96.

206. Boscolo, P., et al., *Effects of resveratrol on lymphocyte proliferation and cytokine release*. Ann Clin Lab Sci, 2003. **33**(2): p. 226-31.
207. Affymetrix, *GeneChip Eukaryotic Small Sample Target Labelling Assay Version II*. Gene Expression Monitoring. **Technical Note**.
208. Brons, P., et al., *Simultaneous Measurement of DNA content and Cell-Surface Immunofluorescence of human bone marrow cells using a single laser flow cytometry*. Cytometry, 1990. **11**: p. 837-844.

GLOSSAIRE

Acétylcholine : neurotransmetteur chimique qui favorise la transmission de l'influx nerveux dans les synapses du système nerveux central et du système nerveux périphérique.

Angiogenèse : processus actif complexe de formation de nouveaux capillaires sanguins à partir de vaisseaux sanguins existants. L'angiogenèse est un processus de courte durée (deux ou trois semaines) qui est essentiel au développement normal des tissus, et auquel participent des facteurs de croissance.

Anticorps monoclonaux : anticorps homologues, strictement identiques, issus d'un même clone plasmocytaire, ayant donc tous le même isotype (Caractère propre aux immunoglobulines d'une espèce, tous les individus de l'espèce ayant le caractère), les mêmes allotypes (variété antigénique d'une protéine sous contrôle génétique), les mêmes idiotypes (déterminant antigénique d'une immunoglobuline porté par la partie variable et lié à la spécificité de l'anticorps pour l'antigène), la même spécificité fine pour l'antigène lorsque celui-ci est connu.

Apoptose : ou « mort cellulaire programmée », elle correspond aux phénomènes qui conduisent normalement à la mort « programmée » de cellules, fait indispensable à l'homéostasie du corps pour tenir compte du renouvellement des tissus.

Astrocyte : cellule gliale de forme étoilée présente en abondance dans la substance blanche et surtout dans la substance grise du système nerveux central, comprenant un noyau dépourvu de nucléole et des prolongements cytoplasmiques qui forment les pieds vasculaires et constituent la barrière hémato-cérébrale.

Autocrine : fonctionnement où la cellule productrice est également la cible de la substance produite.

Bio-disponibilité : fraction d'une substance (aliment, médicament, hormone, etc.) captée dans l'organisme sous forme biologiquement active. La bio-disponibilité se mesure en fonction du pourcentage de substance effectivement assimilée par l'organisme et, s'il y a lieu en fonction de la rapidité avec laquelle elle atteint le site visé.

Carcinogène : se dit de tout ce qui est susceptible de favoriser ou de provoquer le développement d'un cancer ou d'une lésion pouvant constituer le point de départ d'un cancer.

Clearance : rapport entre le débit d'élimination d'une substance à partir d'un compartiment humoral donné et sa concentration dans le plasma.

Cyclines : famille de protéines jouant un rôle important dans la régulation de la division cellulaire.

Cytokine : petite protéine très puissante sécrétée par les monocytes et les macrophages, responsable de la régulation de la réponse immunitaire et de la communication intercellulaire. Sont regroupés sous ce terme de cytokines : certains facteurs de croissance, les interleukines, les interférons.

Cytostatique : médicament qui s'oppose à la croissance et à la multiplication des cellules. Les cytostatiques sont employés dans le traitement du cancer.

Cytotoxique : concerne la propriété que possède une substance ou un médicament d'avoir un effet de poison sur une cellule vivante. Doué d'une activité agressive contre certaines cellules qui se trouvent ainsi lésées ou tuées.

Décantation : séparation par différence de gravité, de produits non miscibles, dont l'un au moins est liquide.

Flip-flop : échanges de lipides d'une couche à l'autre de la membrane par mouvements verticaux, permettant l'obtention de distributions asymétriques des différents lipides et conférant ainsi des fonctions discriminatives aux feuilletts membranaires selon qu'ils sont orientés vers l'extérieur ou vers le cytosol.

Glycation : Le glucose se fixe à toutes les protéines sur leurs fonctions amines, par une liaison céto-amine, selon un processus non enzymatique qui constitue la glycation.

Hématopoïèse : ensemble des processus par lesquels les cellules souches totipotentes de la moelle osseuse se multiplient, se différencient et aboutissent à des cellules sanguines matures.

Insulinorésistance : résistance d'un organisme aux effets biologiques hypoglycémiantes de l'insuline.

Insulino-sensibilisant : classe de médicaments qui agissent en réduisant l'insulinorésistance dont souffrent les personnes atteintes du diabète de type 2.

Ionophore : antibiotiques capables d'induire le passage spécifique d'ions à travers des membranes biologiques.

Lymphocyte : leucocyte mononucléaire présent dans le sang, la lymphe, la moelle osseuse et les organes lymphoïdes. Le lymphocyte correspond à la cellule finale de la série lymphocytaire. Contrairement aux autres cellules du sang, tous les lymphocytes ne sont pas identiques : chacun d'eux ne sait reconnaître qu'un seul antigène qui lui est spécifique. On distingue les lymphocytes B, les lymphocytes T et les lymphocytes à cytoplasme granuleux ou cellules NK (pour « natural killer »).

Macrophage : cellule qui dérive d'un monocyte ayant quitté la circulation sanguine pour passer dans un tissu et qui joue un rôle important dans l'immunité grâce, notamment, à son pouvoir de phagocytose.

Mastocyte : cellule dont le cytoplasme contient de nombreuses granulations basophiles, riches en médiateurs (héparine, sérotonine, histamine).

Métastatique : transport d'un point à un autre de l'organisme de produits pathologiques issus d'une lésion quelconque, entraînant la reproduction à distance d'une lésion analogue à la première.

Mitose : division du noyau d'une cellule en deux noyaux-filles identiques, à la suite d'un processus qui sépare les chromatides de chacun des chromosomes appariés, et maintient ainsi la condition diploïde.

Moût : jus de raisin qui n'a pas encore subi de fermentation alcoolique.

Néoplasie : formation pathologique de tissu nouveau ressemblant au tissu normal adulte ou embryonnaire aux dépens duquel elle s'est développée, qui a tendance à persister et à s'accroître après l'arrêt des stimuli qui lui ont donné naissance, et qui échappe aux règles biologiques de la croissance et de la différenciation cellulaire.

Phagocytose : phénomène physiologique par lequel certaines cellules absorbent et digèrent dans leur protoplasme des éléments étrangers solides ou liquides. Les microbes sont ainsi détruits.

Phytoalexine : substance antibiotique produite par une plante pour se défendre contre des champignons ou des bactéries.

Plasma : le plasma est le constituant liquide du sang, contrairement aux éléments figurés qui constituent sa partie solide. Il a pour fonctions de donner au sang sa viscosité et de transporter les hormones, les sels minéraux, les nutriments et les déchets à éliminer par l'organisme. L'unique différence entre le plasma et le sérum est que ce dernier ne contient pas de fibrinogène.

Plasticité : malléabilité et ductilité permanente d'un corps qui ne retrouve pas ses formes primitives parce que dénué d'élasticité. Propriété d'un corps qui conserve des modifications dimensionnelles après suppression de la contrainte qui les a provoquées.

Polarographie : méthode d'analyse qualitative et quantitative d'une solution électrolytique, basée sur la détermination de l'intensité du courant électrique circulant dans une cuve électrolytique, en fonction de la différence de potentiel appliquée aux bornes.

Transcription : passage de l'information génétique de l'ADN à l'ARN, sous forme de ribonucléotides complémentaires, survenant durant la synthèse de l'ARN simple brin à partir d'une matrice d'ADN par l'action d'une ARN polymérase.

Transcriptome : ensemble des ARN messagers transcrits à partir du génome.

Xénobiotique : se dit d'une substance étrangère à l'organisme vivant.

Vu et permis d'imprimer

Montpellier, le

La Présidente de l'Université MONTPELLIER 1

Dominique DEVILLE de PERIERE