



**HAL**  
open science

# Libération en bouche des molécules de la flaveur : influence des composés salivaires au niveau macroscopique et moléculaire

Sandy Pagès-Hélary Pagès-Hélary

► **To cite this version:**

Sandy Pagès-Hélary Pagès-Hélary. Libération en bouche des molécules de la flaveur : influence des composés salivaires au niveau macroscopique et moléculaire. Alimentation et Nutrition. Université de Bourgogne, 2014. Français. NNT : 2014DIJOS055 . tel-01134143

**HAL Id: tel-01134143**

**<https://theses.hal.science/tel-01134143>**

Submitted on 23 Mar 2015

**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.

**UNIVERSITE DE BOURGOGNE**

Ecole doctorale Environnement Santé

UMR Centre des Sciences du Goût et de l'Aliment

THESE

Pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université de Bourgogne

Discipline : Sciences de l'Aliment

**Sandy Pagès-Hélary**

Le 11 décembre 2014

**Libération en bouche des molécules de la flaveur :  
influence des composés salivaires au niveau  
macroscopique et moléculaire**

Directeur de thèse :

**Elisabeth Guichard**

Co-encadrant de thèse :

**Francis Canon**

Composition du jury:

Dr Isabelle Souchon  
Pr Philippe Darriet  
Pr Ziya Gunata  
Dr Fabrice Neiers  
Dr Elisabeth Guichard  
Dr Francis Canon

INRA, AgroParisTech, Thiverval-Grignon  
Université de Bordeaux  
Université de Montpellier  
Université de Bourgogne, Dijon  
INRA, Dijon  
INRA, Dijon

Rapporteur  
Rapporteur  
Examineur  
Examineur  
Directeur de thèse  
Co-encadrant de thèse





# Remerciements

---

Ce travail de recherche a été réalisé au sein de l'équipe 1 de l'INRA (institut national de recherche agronomique) de Dijon, sous la direction de Madame Elisabeth Guichard, directrice de l'équipe 1 de recherche de l'INRA de Dijon et co-encadrée par Monsieur Francis Canon chargé de recherche à l'INRA de Dijon.

Je tiens tout d'abord à remercier Madame Elisabeth Guichard et Monsieur Francis Canon pour leur encadrement, leur disponibilité et la qualité de leurs conseils scientifiques tout au long de ma thèse.

J'adresse un grand remerciement à Madame Véronique Cheynier, directrice de recherche à l'INRA de Montpellier et Monsieur Bernard Cabane, directeur de recherche au CNRS de l'ESPCI Paris Tech qui ont accepté de faire partie de mon comité de suivi de thèse, malgré les distances géographiques qui les sépare de Dijon, pour leurs pertinents conseils et remarques au cours des trois comités réalisés.

Je suis honorée que Madame Isabelle Souchon, directrice de recherche à l'INRA de AgroParisTech et Monsieur Philippe Darriet, professeur à l'université de Bordeaux aient accepté de lire et examiner ce travail de recherche en qualité de rapporteur.

Je remercie également Monsieur Ziya Gunata, professeur à l'université de Montpellier et Monsieur Fabrice Neiers, maître de conférences à l'université de Bourgogne, d'avoir accepté d'évaluer ce travail de recherche en qualité d'examineur.

Je remercie sincèrement Madame Isabelle Andriot et Monsieur Nicolas Deprêtre pour leur gentillesse et leurs précieuses aides dans le domaine de la chromatographie gazeuse.

Je remercie chaleureusement Hélène Brignot pour son investissement et son aide dans la caractérisation des salives, ainsi que pour sa bonne humeur tout au long de ces analyses même lorsque celles-ci ne donnaient pas les résultats escomptés.

Je n'oublie pas Madame Chantal Septier qui a été d'une aide indispensable tout au long de mon travail de recherche, pour sa disponibilité, pour ses réponses à mes nombreuses questions, ses conseils avisés et son dynamisme.

## Remerciements

---

Merci à Monsieur Etienne Sémon pour sa bonne humeur, ses explications et son aide dans les expériences en APCI, ainsi que pour son investissement dans l'identification de composés par impact électronique et ionisation chimique.

Mes pensées vont aussi à Madame Anne Tromelin, Madame Martine Morzel, Monsieur Éric Neyraud, Monsieur Charfedinne Ayed et Monsieur Gilles Feron, pour avoir su trouver réponse à mes interrogations et m'avoir éclairée sur de nombreux sujets.

Merci à Madame Sylvie Millot, Madame Laurence Petit et Madame Véronique Ponchelet pour avoir répondu avec bonne humeur à mes nombreuses sollicitations.

Je remercie de même Monsieur Jacques Maratray et Monsieur Michaël Mazon que j'ai sollicités de nombreuse fois en raison de ma malchance en informatique.

Je tiens tout particulièrement à remercier tous les volontaires qui ont participé aux collectes de salives réalisées au cours de ma thèse, ainsi que les dix volontaires qui ont participé à mon étude *in vivo*, pour leur gentillesse, leur patience, leur assiduité et sans qui je n'aurais pas pu réaliser ce travail de recherche.

Mes remerciements vont à l'ensemble des membres de l'unité mixte de recherche l'INRA, permanents ou de passage qui ont contribué à l'ambiance chaleureuse et agréable tout au long de ma thèse.

Je tiens aussi à remercier le Conseil Général de Bourgogne d'avoir financé ma thèse.

Je remercie amicalement Maiken et Nicolas pour avoir été de très sympathiques collègues de bureau et m'avoir soutenue avec gentillesse.

Je n'oublie pas non plus tous les petits mots d'encouragement réguliers de Rachel, Hélène, Chantal, Sarah, Nicolas, Charfedinne et Éric. Et je souhaite bon courage à Rachel, Sarah et Nicolas pour la suite et fin de leur thèse.

Mes derniers remerciements les plus chaleureux vont à ma famille, notamment mes parents qui m'ont toujours soutenu dans mes choix et mes projets. Ainsi que mes amis de helleaven qui m'ont permis de me changer les idées par la musique et mes amis de triathlon qui m'ont permis de me vider l'esprit quand cela fût nécessaire. Je remercie très chaleureusement Cyril d'être à mes côtés depuis ces nombreuses années et qui a su m'encourager au quotidien tout au long de ce travail de recherche.

# Valorisation des travaux de recherche

---

### Publications

Pagès-Hélary S, Guichard E, Canon F, 2015. Is aroma release affected by salivary composition. Weurman book (submitted, under revision).

Pagès-Hélary S, Andriot I, Guichard E, Canon F, 2014. Retention effect of human saliva on aroma release and respective contribution of salivary mucin and  $\alpha$ -amylase. Food Research International, 64, 424-431.

Tromelin A, Ayed C, Lubbers S, Pagès-Hélary S, Andriot I, Guichard E, 2011. Proposed alternative phase ratio variation method for the calculation of liquid-vapour partition coefficients of volatiles. Journal of Chromatography A, 1263, 158-168.

### Communications

Pagès-Hélary S, Cellier-Holzem E, 2011 à 2014. Vulgarisation scientifique, Expérimentarium, culture scientifique, CSG, Dijon, France.

Pagès-Hélary S, Guichard E, Canon F, 2014. Is aroma release affected by salivary composition. Weurman Symposium, Cambridge, Angleterre.

Pagès-Hélary S, Guichard E, Canon F, 2014. Libération en bouche des molécules odorantes. Forum des jeunes chercheurs, Besançon, France.

Pagès-Hélary S, Guichard E, Canon F, 2013. Quand les arômes se noient dans la salive. Journée des doctorants, CSG, Dijon, France.

Pagès-Hélary S, Guichard E, Canon F, 2012. Salive et arômes une relation complexe. Journée des doctorants, CSG, Dijon, France.

## Posters

Pagès-Hélary S, Guichard E, Canon F, 2014. Mucines and  $\alpha$ -amylase, the main salivary proteins, impact on aroma release. Congrès Vitagora, Dijon, France.

Pagès-Hélary S, Guichard E, Canon F, 2013. Effect of human saliva versus artificial saliva on aroma release. Forum des jeunes chercheurs, Dijon, France.

Pagès-Hélary S, Canon F, Andriot I, Tromelin A, Ayed C, Depetre N, Feron G, Salles C, Guichard E, 2013. Does saliva modify the volatility of aroma compounds. Congrès Vitagora, Dijon, France.

Pagès-Hélary S, Canon F, Andriot I, Tromelin A, Ayed C, Depetre N, Feron G, Salles C, Guichard E, 2012. Does saliva modify the volatility of aroma compounds. Forum des jeunes chercheurs, Besançon, France.

Pagès-Hélary S, Canon F, Andriot I, Tromelin A, Ayed C, Depetre N, Feron G, Salles C, Guichard E, 2012. Salivary proteins restrict the taking flight of aroma. Food Oral Processing Symposium, Beaune, France.

# Résumé

---

L'objectif de cette étude est d'étudier le rôle de la salive dans la libération des molécules odorantes, par deux approches, *in vitro* et *in vivo*.

L'effet des protéines salivaires sur la libération de 10 molécules odorantes (5 esters et 5 cétones, de longueur de chaîne hydrophobe variable) a été étudié *in vitro* dans des systèmes modèles composés de salives artificielles et humaine. Les salives artificielles contiennent les protéines majoritairement présentes dans la salive (mucine et alpha-amylase), seules et en mélange. Les quantités de chaque molécule odorante présentes dans la phase gazeuse à l'équilibre thermodynamique ont été mesurées par une analyse headspace en mode statique couplée à la chromatographie en phase gazeuse (SH-GC). Les coefficients de partage entre l'air et chacun des systèmes modèles ont été calculés pour chacune des molécules.

Cette approche *in vitro* nous a permis de démontrer une diminution des coefficients de partage air/salive artificielle en présence de mucine et d'alpha-amylase, par un effet hydrophobe. Aucun effet cumulatif n'est observé lorsque les deux protéines sont mises ensemble en solution. En présence de salive humaine, une diminution des coefficients de partage est également observée, les esters étant plus affectés par la présence de salive humaine que les cétones. Cette observation est due à une activité des estérases de la salive, qui augmente avec l'hydrophobicité des esters.

La libération *in vivo* du propanoate d'éthyle et de l'hexanoate d'éthyle a été suivie sur 10 sujets par spectrométrie de masse à ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI-MS) dans des conditions physiologiques différentes : au repos, après stimulation et après élimination du film salivaire résiduel. La salive de chaque sujet a été caractérisée dans les différentes conditions physiologiques testées. De grandes variations de flux, viscosité et de composition salivaire ont été mises en évidence entre les sujets, ainsi qu'entre les conditions physiologiques pour un même sujet. Les différences observées sur les paramètres de libération *in vivo* des molécules odorantes sont discutées en regard de ces paramètres physiologiques. Nous avons ainsi observé qu'une viscosité salivaire élevée diminue la quantité de molécules odorantes libérées sur un temps donné. Dans le même temps, la présence d'une quantité importante d'alpha-amylase dans la salive augmente de façon significative le temps de libération de la molécule la plus hydrophobe, l'hexanoate d'éthyle. Nous avons ainsi mis en évidence que la rétention des molécules hydrophobes par les protéines salivaires peut induire une modification de leur cinétique de libération en conditions réelles de consommation et pourrait intervenir dans la persistance aromatique.

**Mots clef** : molécules odorantes, salive humaine, alpha-amylase, mucine, effet hydrophobe, libération *in vivo*, conditions physiologiques.



# Abstract

---

The aim of this work is to give a deeper understanding of the impact of the salivary composition on aroma release, by two approaches, an *in vitro* and an *in vivo* approach.

The impact of salivary proteins on the release of 10 aroma compounds (5 esters and 5 ketones, varying in their hydrophobic chain length) was first investigated by *in vitro* model systems composed of artificial and human saliva. Artificial salivas were composed of the main salivary proteins, mucins and alpha-amylase, alone and in mixture. The amount of aroma released in the vapor phase at equilibrium was analyzed by Static Headspace Gas Chromatography analysis. Air/system partition coefficients have been calculated. This *in vitro* approach allowed us to demonstrate the ability of both mucin and alpha-amylase to decrease the release of aroma compounds by hydrophobic effect (increase of retention with aroma hydrophobicity). Interestingly, no cumulative effect was observed when both proteins were mixed together in solution. The release of ketones in presence of human saliva is lower than in water and slightly higher than in the presence of artificial saliva. Esters are more affected by the presence of human saliva than ketones. This observation is due to an esterase activity of saliva, which increases with the hydrophobicity of esters.

The *in vivo* release of ethyl propanoate and ethyl hexanoate was followed on ten subjects by Atmospheric Pressure Chemical Ionization mass spectrometry (APCI-MS) under different physiological conditions: at rest, after stimulation and after removing the superficial salivary coat. The saliva was characterized for each subject and each physiological condition. Great variations were observed between the subjects on the salivary flow, viscosity, composition and for each subject between the physiological conditions. The differences observed on *in vivo* release parameters are discussed as a function of physiological parameters. We observed that subjects with more viscous saliva present a lower amount of aroma released. The presence of higher amounts of alpha-amylase increased the time needed to release the more hydrophobic compound, ethyl hexanoate. Our results suggest that the retention of hydrophobic aroma compounds by salivary proteins induces a modification of the kinetics of aroma release in real consumption conditions, and could be responsible for aroma persistence.

**Keywords:** aroma, human saliva, alpha-amylase, mucin, hydrophobic effect, *in vivo* release, physiological conditions.

# Symboles et Abréviations

---

### Perception sensorielle

**AMPc** : adénosine mono phosphate cyclique

**ATP** : adénosine tri phosphate

**GMPc** : guanosine mono phosphate cyclique

**GPCR** : récepteur couplé à la protéine G

**GTP** : guanosine tri phosphate

**IP3** : inositol tri phosphate

**OBP**: protéine de liaison des molécules odorantes

**OFC** : cortex orbito frontal

**POC** : cortex olfactif primaire

**VEG-P** : protéines des glandes de von Ebner

### Techniques et appareils de mesure

**APCI** : ionisation chimique à pression atmosphérique

**CD** : dichroïsme circulaire

**CPG-FID** : chromatographie gazeuse couplée à un détecteur à flamme ionisante

**DB-WAX** : colonne polaire avec une phase greffée de polyéthylèneglycol

**DCCLC** : chromatographie liquide dynamique à colonnes couplées

**DH** : analyse dynamique de l'espace de tête

**DSC** : calorimétrie différentielle à balayage

# Symboles et Abréviations

---

**fMRI** : imagerie par résonance magnétique fonctionnelle

**FT-IR** : spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier

**GC-CI-MS** : Spectrométrie de masse à ionisation chimique couplée à la chromatographie en phase gazeuse

**GC-EI-MS** : Spectrométrie de masse à impact électronique couplée à la chromatographie en phase gazeuse

**LC-SH** : calibration liquide par analyse statique de l'espace de tête

**PRV** : variation du ratio de phase

**PTR** : réaction de transfert de protons

**QSAR** : relation quantitative structure-activité

**QSPR** : relation quantitative structure-propriété

**RMN** : résonance magnétique nucléaire

**SHGC** : analyse statique de l'espace de tête par chromatographie en phase gazeuse

**SPME** : micro extraction en phase solide

**VPC** : Calibration en phase vapeur

## Caractérisation des molécules odorantes

**logP** : constante d'hydrophobie correspondant au logarithme du coefficient de partage octanol-eau

**Ir** : Indice de Rétention

**CAS** : numéro de registre de la molécule odorante

**LD50** : dose létale nécessaire pour tuer 50% d'une population (mg de composé actif/kg de l'animal)

## Analyse salivaire

**ELISA** : dosage immuno-enzymatique

**TMB** : tri méthyle borate

# Symboles et Abréviations

---

## Variables de l'étude

**A** : milieu contenant de l'alpha-amylase salivaire diluée dans le tampon salivaire

**AM** : milieu contenant des mucines et alpha-amylase salivaires diluées dans le tampon salivaire

**Amy<sup>f</sup>** : activité amylasique de la salive (kUI/l)

**Amy<sup>Qd</sup>** : quantité d'amylase dans la salive (kUI)

**AUC** : aire totale cumulée sous la courbe de libération (u.a.min)

**B** : milieu tampon salivaire

**Brad<sup>f</sup>** : concentration en protéines totale de la salive (mg/ml)

**Bard<sup>Qd</sup>** : quantité en protéines totales de la salive (mg)

**Flux** : flux salivaire (ml/min)

**HS** : milieu salive humaine

**Hx** : hexanoate d'éthyle

**I<sub>max</sub>** : intensité maximale de libération (u.a)

**Lipocal<sup>f</sup>** : concentration en lipocalines de la salive (ng/ml)

**Lipocal<sup>Qd</sup>** : quantité en lipocalines de la salive (ng)

**M** : milieu contenant des mucines salivaires diluées dans le tampon salivaire

**Pr** : propanoate d'éthyle

**Ti<sub>max</sub>** : temps pour atteindre l'intensité maximale de libération (min)

**T<sub>025</sub>** : temps pour atteindre 25% de la libération totale des molécules odorantes (min)

**T<sub>050</sub>** : temps pour atteindre 50% de la libération totale des molécules odorantes (min)

**T<sub>090</sub>** : temps pour atteindre 90% de la libération totale des molécules odorantes (min)

**V<sub>bucc</sub>** : volume buccal des sujets (cm<sup>3</sup>)

**Visco** : viscosité de la salive (mm<sup>2</sup>/s)

# Symboles et Abréviations

---

**V<sub>max</sub>** : vitesse maximale de libération (u.a/min)

**W** : milieu eau

## Analyses statistiques

**ACP** : analyse en composantes principales

**ANOVA** : analyse de variance

**HSD** : Test post-hoc de comparaison des moyennes

## Table des matières

---

I. Introduction.....	29
II. Etat de l'art.....	30
1. Les molécules odorantes.....	34
1.1. La caractérisation des molécules odorantes.....	34
1.2. La diversité des classes chimiques.....	35
1.3. Les relations 'structure-odeur'.....	38
2. La perception des molécules odorantes.....	39
2.1. Les récepteurs olfactifs.....	40
2.2. La création du signal olfactif.....	41
1.1. Les voies et seuils de perception des molécules odorantes.....	42
1.1.1. Les deux voies de perception des molécules odorantes.....	42
1.1.2. Les seuils de détections des molécules odorantes.....	44
2. Les interactions entre molécules odorantes et matrice alimentaire.....	46
2.1. Les glucides.....	48
2.2. Les lipides.....	48
2.3. Les protéines.....	49
2.4. Autres composés de la matrice alimentaire.....	49
2.5. Les systèmes multiphasiques : exemple des émulsions.....	50
3. La salive.....	51
3.1. La sécrétion de la salive.....	52
3.2. La composition de la salive.....	54
3.3. Les variations de volume salivaire en bouche et les propriétés de la salive.....	57
3.4. Les interactions entre les composés de la salive et les composés de la flaveur : impact sur la perception.....	58
3.4.1. La perception des lipides.....	59

# Table des matières

---

3.4.2.	La perception de l'amertume .....	59
3.4.3.	La perception de l'astringence .....	60
3.4.4.	La perception des molécules odorantes.....	60
4.	Les méthodes de mesure de la libération des molécules odorantes et de leur interaction avec les protéines.....	68
4.1.	La mesure de la libération des molécules odorantes à l'équilibre thermodynamique.....	68
4.2.	La mesure de la libération en mode dynamique.....	70
4.3.	L'étude des interactions entre protéines et molécules odorantes .....	72
5.	Conclusion sur la synthèse bibliographique et techniques choisies .....	74
III.	Matériel et méthode .....	75
Partie 1 :	L'approche <i>in vitro</i> .....	79
1.1.	Les molécules odorantes .....	79
1.2.	Les milieux salivaires.....	80
1.2.1.	Les protéines salivaires .....	80
1.2.2.	Le tampon salivaire.....	80
1.2.3.	La composition des salives artificielles .....	81
1.2.4.	La salive humaine .....	82
1.3.	Les échantillons .....	83
1.3.1.	La préparation des solutions mères .....	83
1.3.2.	La préparation des échantillons .....	83
1.3.2.1.	La méthode de préparation des solutions filles .....	83
1.3.2.2.	L'effet mélange.....	85
1.4.	L'analyse de la phase Gazeuse.....	87
1.4.2.	Mise au point de la méthode.....	88
1.4.2.1.	La détermination du temps d'équilibre.....	88
1.4.3.	La détermination des coefficients de partage.....	89
1.4.3.1.	La méthode PRV.....	90
1.4.3.2.	La méthode par calibration liquide-statique headspace (LC-SH) .....	93

# Table des matières

---

1.4.3.3.	Le choix de la méthode.....	94
1.4.4.	L'étude cinétique.....	94
1.5.	L'étude de la phase liquide.....	95
1.5.1.	La méthode d'extraction.....	95
1.5.2.	L'identification par spectrométrie de masse.....	96
1.5.2.1.	L'ionisation par impact électronique.....	96
1.5.2.2.	L'ionisation par ionisation chimique.....	97
Partie 2 : L'approche <i>in vivo</i> .....		100
2.1.	Le choix des molécules odorantes.....	100
2.2.	Les échantillons.....	100
2.2.1.	Les mises au point de la méthode.....	100
2.2.1.1.	Le choix du volume de l'échantillon à consommer.....	100
2.2.1.2.	Le choix de la concentration des molécules odorantes.....	100
2.2.1.3.	Le choix du contenant de l'échantillon.....	101
2.2.2.	La préparation des solutions mères.....	102
2.2.3.	La préparation des échantillons.....	102
2.3.	L'étude de la libération des molécules odorantes.....	102
2.3.1.	Le choix du temps de maintien de l'échantillon en bouche.....	102
2.3.2.	Les états physiologiques.....	103
2.3.3.	Le déroulement des analyses.....	104
2.3.3.1.	Le principe.....	104
2.3.3.2.	Les consignes.....	104
2.3.3.3.	La séance d'entraînement.....	105
2.3.3.4.	L'analyse en état de repos.....	105
2.3.3.5.	L'analyse en mode rinçage.....	106
2.3.3.6.	L'analyse en état stimulé.....	106
2.3.4.	L'analyse par APCI-MS.....	106
2.3.4.1.	Le principe de l'APCI-MS.....	106



# Table des matières

---

2.3.4.2.	Le casque et le capillaire.....	109
2.3.4.3.	Le suivi des molécules d'intérêt .....	110
2.3.5.	Le traitement des courbes de libération .....	110
2.3.5.1.	La caractérisation des courbes de libération.....	110
2.4.	La caractérisation des sujets.....	113
2.4.1.	Les sujets.....	113
2.4.2.	La mesure du flux salivaire .....	113
2.4.3.	La mesure de la viscosité des salives.....	113
2.4.3.1.	Le principe .....	113
2.4.3.2.	La vérification préliminaire.....	114
2.4.4.	L'analyse de la composition salivaire .....	116
2.4.4.1.	Les protéines totales.....	116
2.4.4.2.	L'activité amylasique .....	116
2.4.4.3.	Les lipocalines.....	117
2.4.4.4.	Le calcul des quantités de protéines salivaires.....	118
2.4.5.	La mesure du volume buccal .....	119
2.4.5.1.	Le Rhino-Pharyngomètre.....	119
2.4.5.2.	L'interprétation des données .....	119
2.4.5.3.	La méthode de mesure.....	120
Partie 3 :	Les traitements statistiques .....	122
3.1.	L'analyse de la variance à plusieurs facteurs.....	122
3.2.	Le test post-hoc .....	122
3.3.	Le calcul des coefficients de corrélation.....	122
3.4.	L'analyse en composante principale .....	122
IV.	Résultats.....	127
Partie 1 :	L'approche <i>in vitro</i> .....	127
Chapitre I :	L'impact respectif des protéines salivaires, mucines et alpha-amylase sur la libération des molécules odorantes .....	127

# Table des matières

---

1. Introduction.....	127
2. Etude de l'effet respectif des protéines salivaires, de la mucine et de l'alpha-amylase sur la libération des molécules odorantes.....	128
Publication 1: Respective impact of the salivary proteins, mucin and $\alpha$ -amylase, on aroma release..	128
2.1. Introduction.....	130
2.2. Matériels and methods.....	131
2.3. Results and discussion.....	135
2.4. Conclusions.....	144
Chapitre II: L'identification des produits issus de la dégradation des esters par la salive humaine.....	146
1. Introduction.....	146
2. Identification des molécules issues de la dégradation des esters en présence de salive humaine..	146
3. Conclusion.....	152
Partie 2 : L'approche <i>in vivo</i> .....	153
Chapitre I : La caractérisation des sujets par leur salive.....	153
1. L'analyse des paramètres salivaires.....	153
1.1. Le flux salivaire.....	153
1.2. La viscosité salivaire.....	154
1.3. La composition salivaire.....	154
2. L'analyse de la variance des paramètres salivaires.....	156
2.1. L'effet sujet.....	157
2.2. L'effet de l'état physiologique.....	158
2.3. L'effet jour.....	159
2.4. L'effet répétition.....	159
2.5. Les interactions.....	160
3. L'analyse des corrélations entre les paramètres salivaires.....	161
4. L'analyse en composantes principales des paramètres salivaires.....	162
5. Conclusion sur les paramètres salivaires.....	166
Chapitre II : La libération des molécules d'intérêt par voie rétronasale.....	167

## Liste des tableaux

---

1. L'analyse des courbes de libération obtenues par APCI-MS .....	167
2. L'analyse de la variance des paramètres de libération .....	169
2.1. L'effet sujet .....	169
2.2. L'effet de l'état physiologique .....	172
2.3. L'effet molécule .....	173
2.4. L'effet répétition .....	173
2.5. Les interactions .....	173
3. L'analyse des corrélations entre les paramètres de libération .....	174
4. L'analyse en composantes principales des paramètres de libération .....	176
5. Conclusion sur les paramètres de libération .....	180
Chapitre III : L'explication des paramètres salivaires et des paramètres de libération .....	181
1. L'analyse des corrélations entre les paramètres salivaires et de libération .....	181
2. L'analyse en composantes principales des paramètres salivaires et de libération .....	183
3. L'importance des propriétés de la molécule odorante sur sa libération .....	187
4. L'effet du volume buccal sur la libération des molécules odorantes .....	190
5. Conclusion .....	194
V. Discussion et conclusion .....	198
Bibliographie .....	207
Annexes .....	222

---

## Liste des tableaux

## Liste des tableaux

---

**Tableau II.1 :** Définition et structure des molécules odorantes par classe chimique.

**Tableau II.2 :** Seuil de détection orthonasal et rétronasal de différentes cétones et esters dans l'eau à 25°C.

**Tableau II.3 :** Coefficient de partage vapeur/matrice (K) de l'hexanoate d'éthyle dans des matrices de différentes compositions.

**Tableau II.4 :** Coefficient de partage vapeur/matrice (K) du diacétyl dans des matrices de différentes compositions.

**Tableau II.5 :** Proportion de salive sécrétée en fonction de la glande salivaire et de l'état physiologique.

**Tableau II.6 :** Valeur des flux salivaires au repos et au cours d'une stimulation mécanique.

**Table II.7 :** Concentration d'une partie des composés de la salive au repos.

**Tableau II.8 :** Volumes de salive en bouche avant, après déglutition et épaisseur du film salivaire.

**Tableau II.9 :** Comparaison des résultats de libération des molécules odorantes de salives artificielles contenant des mucines pancréatiques porcines, issus des articles de Friel *et al* (Friel, et al., 2001) et Van Ruth *et al* (van Ruth, et al., 2001a).

**Tableau II.10 :** Variation des coefficients de partage pour le milieu eau pure, selon la méthode utilisée.

**Tableau III.1 :** Caractérisation des dix molécules odorantes choisies pour l'approche *in vitro*.

**Tableau III.2 :** Compositions de tampons salivaires utilisés dans diverses études.

**Tableau III.3 :** Composition des différentes salives artificielles étudiées.

**Tableau III.4 :** Valeur des pentes des courbes de calibration ( $f_i$ ) et des coefficients de corrélation associés ( $R^2$ ).

**Tableau III.5 :** Températures du four et temps d'acquisition des analyses en GC FID des dix molécules odorantes.

**Tableau III.6 :** Exemple de composés pouvant être obtenus par ionisation d'une molécule M par le méthane et l'ammoniac.

**Tableau III.7 :** Molécules d'intérêts et ions spécifiques associés.

**Tableau IV.1 :** List of aroma compounds with their molecular weight in g.mol<sup>-1</sup> 483 (Mw), hydrophobic constant (log P), Solubility in water at 25 °C in mol.L<sup>-1</sup> (Sol).

## Liste des figures

---

**Tableau IV.2:** Résultats de l'identification des masses moléculaires des composés U1 et U2 par ionisation chimique par ammoniac et méthane.

**Tableau IV.3:** Calcul de la contribution isotopique de la formule C<sub>10</sub>H<sub>6</sub>O<sub>3</sub>. Les valeurs des probabilités d'obtention de l'isotope de chaque atome sont extraites de l'ouvrage de McLafferty.

**Tableau IV.4:** Formules brutes des composés isomères U1 et U2 déterminées par calcul isotopique pour les cinq esters.

**Tableau IV.5:** Identification des composés U1 et U2 issus de la dégradation des cinq esters par la salive humaine.

**Tableau IV.6:** Valeurs des p values de l'analyse de variance pour les variables flux salivaire (Flux), viscosité salivaire (Visco), concentration en protéines totales (Brad<sup>C</sup>), activité amylasique (Amy<sup>C</sup>) et concentration en lipocaline (Lipo<sup>C</sup>).

**Tableau IV.7:** Résultats du test HSD pour les paramètres salivaires. Une lettre différente représente une différence significative entre les sujets.

**Tableau IV.8:** Matrice des corrélations entre les variables flux salivaire (Flux), viscosité salivaire (Visco), concentration en protéines totales (Brad<sup>C</sup>), activité amylasique (Amy<sup>C</sup>) et concentration en lipocaline (Lipo<sup>C</sup>).

**Tableau IV.9:** Résultats des analyses de la variance pour les paramètres extraits des courbes obtenues par analyse APCI-MS.

**Tableau IV.10:** Résultat du test HSD pour les paramètres de libération. Une différence de lettre indique une différence significative entre les sujets.

**Tableau IV.11:** Matrice des corrélations entre les variables LogP, I<sub>max</sub>, Ti<sub>max</sub>, AUC, V<sub>max</sub>, T<sub>025</sub>, T<sub>050</sub> et T<sub>090</sub>.

**Tableau IV.12:** Matrice des corrélations entre les variables I<sub>max</sub>, Ti<sub>max</sub>, AUC, V<sub>max</sub>, T<sub>025</sub>, T<sub>050</sub>, T<sub>090</sub>, Flux, Brad<sup>Qd</sup>, Lipocal<sup>Qd</sup>, Amy<sup>Qd</sup> et Visco.

**Tableau IV.13:** Corrélations entre les variables I<sub>max</sub>, Ti<sub>max</sub>, AUC, V<sub>max</sub>, T<sub>025</sub>, T<sub>050</sub>, T<sub>090</sub>, Flux, Brad<sup>Qd</sup>, Lipocal<sup>Qd</sup>, Amy<sup>Qd</sup>, Visco et Vbucc.

---

## Liste des figures

## Liste des figures

---

**Figure II.1 :** Anatomie de la cavité buccale et nasale chez l'homme.

**Figure II.2 :** Création du message nerveux au niveau d'un récepteur olfactif.

**Figure II.3 :** Anatomie du système olfactif des cils olfactifs au bulbe olfactif.

**Figure II.4 :** Valeurs des volumes de la cavité nasale, buccale et du pharynx. Les volumes de la cavité buccale et du pharynx ont été mesurés par rhino-pharyngomètre à ondes acoustiques.

**Figure II.5 :** Représentation des glandes de Von Ebner's de la langue.

**Figure II.6:** Structure primaire simplifiée d'une mucine salivaire humaine, adapté de Wu *et al.* (1994).

**Figure II.7:** Structures et associations des mucines salivaires en fonction du pH du milieu et de la concentration en mucines, adapté de *Bansil et al.* (2006).

**Figure II.8:** Structure tertiaire de l'alpha amylase salivaire humaine.

**Figure III.1 :** Méthodes de préparation des échantillons pour les milieux salivaires artificiels.

**Figure III.2:** Aires moyennes sous les courbes de libération du pentanoate d'éthyle et de la 2 octanone du milieu avec mucines (M) pour les des trois répétitions et les trois méthodes de préparation.

**Figure III.3 :** Analyse de l'aire sous les courbes de libération du pentanoate d'éthyle et de la 2-nonanone seule et en mélange avec dix autres molécules, pour le milieu eau (W).

**Figure III.4 :** Schématisation du principe de l'analyse par chromatographie en phase gazeuse.

**Figure III.6 :** Variation de l'aire sous courbe au cours du temps pour la libération du pentanoate d'éthyle et de la 2-octanone dans le milieu avec mucines (M).

**Figure III.7 :** Variation de l'aire sous les pics du pentanoate d'éthyle et de la 2-nonanone en fonction de la variation de volume du milieu tampon (B) de l'échantillon.

**Figure III.8:** Représentation du principe d'extraction au dichlorométhane.

**Figure III.9:** Justification de l'organisation de la séance d'analyse.

**Figure III.10 :** Constitution de l'entrée de l'APCI-MS et de sa source d'ionisation.

**Figure III.11 :** Cascade réactionnelle se produisant dans la source d'ionisation.

**Figure III.12 :** Constitution de l'analyseur à trappe ionique de l'APCI-MS.

## Liste des figures

---

**Figure III.13 :** Illustration d'un sujet relié à l'APCI-MS en condition de test.

**Figure III.14 :** Montage de la lunette et description du casque.

**Figure III.15 :** Représentation des paramètres extraits des courbes de libération des molécules d'intérêt. Libération du propanoate d'éthyle au cours du temps pour un sujet durant l'étape de rinçage et de l'acétone.

**Figure III.16 :** Représentation d'une partie des paramètres extraits des courbes des aires cumulées sous courbe (exemple du propanoate d'éthyle pour un sujet au cours de l'étape de rinçage).

**Figure III.17:** Microviscosimètre (A = zone de dépôt de l'échantillon, B = zone de mesure, C = emplacement de la pompe à crémaillère, L1 = ligne de départ de chronométrage, L2 = ligne de fin de chronométrage).

**Figure III.18:** Box plot représentant la dispersion des valeurs des viscosités en mm<sup>2</sup>/s pour les trois sujets sur les deux jours (C = aliquot de salive congelé, B = aliquot de salive non congelés).

**Figure III.19:** Courbe de la surface de la bouche d'un sujet (sujet 9) en fonction de la distance aux deux microphones détecteurs obtenue par le Rhino-Pharyngomètre versus sections buccales du sujet.

**Figure IV.1:** Air/liquid partition coefficients (K) of aroma compounds for (A) ketones and (B) esters in presence of water (K<sub>w</sub>), mucin in buffer (K<sub>m</sub>), mucin and  $\alpha$ -amylase in buffer (K<sub>ma</sub>),  $\alpha$ -amylase in buffer (K<sub>a</sub>), and human saliva (K<sub>hs</sub>).

**Figure IV.2:** Relationship between hydrophobicity (log P value) of aroma compounds and their air/liquid partition coefficient in presence of (A) mucin (K<sub>m</sub>/K<sub>w</sub>) and (B)  $\alpha$ -amylase (K<sub>a</sub>/K<sub>w</sub>) relative to water.

**Figure IV.3:** Relationship between hydrophobicity (log P value) of aroma compounds and their relative air/liquid partition coefficient (K) between mucin and  $\alpha$ -amylase and (A) water (K<sub>ma</sub>/K<sub>w</sub>), or (B) mucin (K<sub>ma</sub>/K<sub>m</sub>) or (C)  $\alpha$ -amylase (K<sub>ma</sub>/K<sub>a</sub>).

**Figure IV.4:** (A) Relationship between hydrophobicity (log P value) of aroma compounds and their relative air/liquid partition coefficient (K) between human saliva and water (K<sub>hs</sub>/K<sub>w</sub>). (B) Concentration of ester in air as a function of time. (C) Relationship between the speed of ester degradation and hydrophobicity (log P value).

**Figure IV.5:** Chromatogrammes du courant ionique total superposés résultant de l'analyse par GC-MS des extraits des phases liquides des échantillons 'salive humaine + esters' après 200 minutes d'incubation à 30°C.

## Liste des figures

---

**Figure IV.6:** Spectre de masse de l'inconnu U1 issu de la dégradation de l'hexanoate d'éthyle par la salive humaine, obtenus par ionisation chimique par méthane à gauche et par ammoniac à droite.

**Figure IV.7:** Contribution isotopique observée pour l'ionisation chimique à l'ammoniac du composé U1 issu de la dégradation de l'hexanoate d'éthyle par la salive.

**Figure IV.8 :** Explication des fragments observés sur les spectres des composés U1 et U2 issus de la dégradation de l'hexanoate d'éthyle par la salive humaine après 200 minutes d'incubation à 30°C. Les 'fragments moléculaires' sont représentés au-dessus de chaque 'fragment de masse m/z' correspondant.

**Figure IV.9:** Box plot représentant de gauche à droite la dispersion des valeurs de flux salivaire, viscosité salivaire et concentration en protéines totales pour les dix sujets au repos au cours de la première séance d'analyse.

**Figure IV.10:** Box plot représentant la dispersion des valeurs du flux salivaire (à gauche) et de la concentration en protéines totales (à droite) pour le sujet 7, en état de repos (en rose) et en état stimulé (en bleu).

**Figure IV.11 :** Box plot représentant la dispersion des valeurs du flux salivaire pour les dix sujets, en état de repos (en rose) et en état stimulé (en bleu).

**Figure IV.12:** Représentation ACP de la moyenne des variables salivaires Flux, Brad<sup>C</sup>, Lipo<sup>C</sup>, Amy<sup>C</sup>, Visco.

**Figure IV.13:** Représentation des individus par ACP et de leurs ellipses de confiance à 95% selon les deux premières composantes (à gauche) et les composantes 1, 3 (à droite) pour l'analyse des variables salivaires Flux, Visco, Amy<sup>C</sup>, Brad<sup>C</sup>, Lipo<sup>C</sup>.

**Figure IV.14:** Représentation ACP des individus et des ellipses de confiance à 95% des états de repos et stimulé pour les deux premières composantes (à gauche) et les composantes 1,3 (à droite) pour l'analyse des variables salivaires Flux, Visco, Amy<sup>C</sup>, Brad<sup>C</sup>, Lipo<sup>C</sup>.

**Figure IV.15 :** Exemple de courbe de libération en fonction du temps de l'hexanoate d'éthyle (courbe bleue, m/z 145), du propanoate d'éthyle (courbe rose, m/z 103) et les courbes de libération de l'acétone correspondantes (courbes vertes, m/z 59) obtenues pour le sujet 4 après stimulation.

**Figure IV.16:** Box plot représentant la dispersion des valeurs AUC (à gauche) et I<sub>max</sub> (à droite). Valeurs représentées pour les trois états physiologiques et les deux molécules odorantes.

**Figure IV.17:** Box plot représentant la dispersion des valeurs de T<sub>090</sub> (gauche) et V<sub>max</sub> (droite) pour les dix sujets dans les états stimuli (vert), après rinçage (bleu) et au repos (rose).



## Liste des figures

---

**Figure IV.18:** Représentation ACP de la moyenne des variables de libération  $\text{LogP}$ ,  $I_{\text{max}}$ ,  $Ti_{\text{max}}$ ,  $\text{AUC}$ ,  $V_{\text{max}}$ ,  $T_{025}$ ,  $T_{050}$  et  $T_{090}$ .

**Figure IV.19:** Représentation des individus par ACP et de leurs ellipses de confiance à 95% selon les deux premières composantes (à gauche) et les composantes 1, 3 (à droite) pour l'analyse des moyennes des variables de libération  $I_{\text{max}}$ ,  $Ti_{\text{max}}$ ,  $\text{AUC}$ ,  $V_{\text{max}}$ ,  $T_{025}$ ,  $T_{050}$  et  $T_{090}$ .

**Figure IV.20 :** Représentation des individus par ACP et des ellipses de confiance à 95% des trois états physiologiques selon les deux premières composantes (à gauche) et les composantes 1, 3 (à droite) pour l'analyse des moyennes des variables de libération  $I_{\text{max}}$ ,  $Ti_{\text{max}}$ ,  $\text{AUC}$ ,  $V_{\text{max}}$ ,  $T_{025}$ ,  $T_{050}$  et  $T_{090}$ .

**Figure IV.21 :** Représentation des individus par ACP et des ellipses de confiance des deux molécules odorantes étudiées selon les deux premières composantes (à gauche) et les composantes 1, 3 (à droite) pour l'analyse des moyennes des variables de libération  $I_{\text{max}}$ ,  $Ti_{\text{max}}$ ,  $\text{AUC}$ ,  $V_{\text{max}}$ ,  $T_{025}$ ,  $T_{050}$  et  $T_{090}$ .

**Figure IV.22 :** Représentation ACP de la moyenne des variables  $I_{\text{max}}$ ,  $Ti_{\text{max}}$ ,  $\text{AUC}$ ,  $V_{\text{max}}$ ,  $T_{025}$ ,  $T_{050}$ ,  $T_{090}$ ,  $\text{Flux}$ ,  $\text{Brad}^{\text{Qd}}$ ,  $\text{Lipocal}^{\text{Qd}}$ ,  $\text{Amy}^{\text{Qd}}$  et  $\text{Visco}$ .

**Figure IV.23 :** Représentation des individus par ACP et de leurs ellipses de confiance à 95% selon les deux premières composantes (à gauche) et les composantes 1, 3 (à droite) pour l'analyse des moyennes des variables  $I_{\text{max}}$ ,  $Ti_{\text{max}}$ ,  $\text{AUC}$ ,  $V_{\text{max}}$ ,  $T_{025}$ ,  $T_{050}$ ,  $T_{090}$ ,  $\text{Flux}$ ,  $\text{Brad}^{\text{Qd}}$ ,  $\text{Lipocal}^{\text{Qd}}$ ,  $\text{Amy}^{\text{Qd}}$  et  $\text{Visco}$ .

**Figure IV.24:** Représentation des individus par ACP et des ellipses de confiance des trois états physiologiques selon les deux premières composantes (à gauche) et les composantes 1, 3 (à droite) pour l'analyse des moyennes des variables de libération  $I_{\text{max}}$ ,  $Ti_{\text{max}}$ ,  $\text{AUC}$ ,  $V_{\text{max}}$ ,  $T_{025}$ ,  $T_{050}$ ,  $T_{090}$ ,  $\text{Flux}$ ,  $\text{Brad}^{\text{Qd}}$ ,  $\text{Lipocal}^{\text{Qd}}$ ,  $\text{Amy}^{\text{Qd}}$  et  $\text{Visco}$ .

**Figure IV.25 :** Représentation des individus par ACP et des ellipses de confiance à 95% des deux molécules odorantes étudiées selon les deux premières composantes (à gauche) et les composantes 1, 3 (à droite) pour l'analyse des moyennes des variables  $I_{\text{max}}$ ,  $Ti_{\text{max}}$ ,  $\text{AUC}$ ,  $V_{\text{max}}$ ,  $T_{025}$ ,  $T_{050}$ ,  $T_{090}$ ,  $\text{Flux}$ ,  $\text{Brad}^{\text{Qd}}$ ,  $\text{Lipocal}^{\text{Qd}}$ ,  $\text{Amy}^{\text{Qd}}$  et  $\text{Visco}$ .

**Figure IV.26 :** Représentation ACP de la moyenne des variables  $I_{\text{max}}$ ,  $Ti_{\text{max}}$ ,  $\text{AUC}$ ,  $V_{\text{max}}$ ,  $T_{025}$ ,  $T_{050}$ ,  $T_{090}$ ,  $\text{Flux}$ ,  $\text{Brad}^{\text{Qd}}$ ,  $\text{Lipocal}^{\text{Qd}}$ ,  $\text{Amy}^{\text{Qd}}$  et  $\text{Visco}$ , selon les deux premières composantes pour l'hexanoate d'éthyle (à gauche) et le propanoate d'éthyle (à droite).

**Figure IV.27 :** Box plot représentant la dispersion des valeurs des volumes buccaux. Valeurs représentées pour les quatre répétitions.

## Liste des figures

---

**Figure IV.28 :** Représentation ACP de la moyenne des variables  $I_{max}$ ,  $Ti_{max}$ , AUC,  $V_{max}$ ,  $T_{o25}$ ,  $T_{o50}$ ,  $T_{o90}$ , Flux,  $Brad^{Qd}$ ,  $Lipocal^{Qd}$ ,  $Amy^{Qd}$ , Visco selon les deux premières composantes avec la variable Vbucc (à gauche) et sans la variable Vbucc (à droite).

**Figure V.1:** Hypothèses sur les interactions ‘protéines-molécules odorantes’ (a, b) et ‘protéines-protéines’ (c) dans la salive ( $K_a$ ,  $K_m$ ,  $K_{am}$ , les coefficients de partage respectifs des milieux A, M et AM).

# Liste des annexes

---

**Annexes n°1** : Rôle des constituants de la salive.

**Annexes n°2** : Tableau des 70 molécules réparties en 6 mélanges et méthodes de température utilisées en chromatographie gazeuse.

**Annexes n°3** : Scripts Matlab utilisés pour calculer les coefficients de partage par la méthode PRV.

**Annexes n°4** : Scripts R utilisés dans les analyses statistiques.

**Annexes n°5** : Matrice des corrélations entre les variables de libération et salivaires.



# *Introduction*



# I. Introduction

---

Avant même la mise en bouche, l'aspect et l'odeur d'un aliment vont déterminer son acceptabilité par le consommateur. L'odeur perçue d'un aliment est souvent due à un mélange plus ou moins complexe de molécules odorantes. Ces molécules n'ont aucune qualité nutritive, mais sont essentielles dans l'acceptabilité de l'aliment par le consommateur. Une fois l'aliment en bouche, les molécules odorantes sont libérées au cours de la mastication et perçues par voie rétronasale, on parle d'arôme.

Au cours de la mastication, l'aliment est déstructuré et hydraté par la salive pour former le bol alimentaire avant déglutition. Au cours de cette étape une partie des molécules odorantes se répartissent entre la matrice alimentaire, la salive et l'air en fonction de leur affinité respective pour ces deux milieux. Une fraction des molécules odorantes est transférée dans l'air de la cavité buccale avant d'être perçue par les récepteurs olfactifs situés dans la cavité nasale. Cet échange se fait à l'interface entre le bol alimentaire et l'air de cette cavité. Ces molécules odorantes sont ensuite entraînées de la cavité buccale vers la cavité nasale grâce aux échanges respiratoires entre ces deux cavités (Halpern, 2009).

La libération des molécules odorantes est fortement influencée par la composition de la matrice alimentaire (Guichard, 2002). De nombreuses études ont mis en évidence la présence d'interaction entre les molécules odorantes et les composants couramment retrouvés dans les matrices alimentaires comme les protéines (Tromelin, *et al.*, 2006), les lipides (Van Ruth, *et al.*, 2002a), le sel, ou les sucres, tel que l'amidon (Tietz, *et al.*, 2008). D'autres études ont aussi mis en évidence que la composition en molécules odorantes libérées dans la salive est liée à la texture de la matrice alimentaire (Deleris, *et al.*, 2011).

L'imprégnation de la matrice alimentaire par la salive lors de la mastication peut modifier les interactions entre les molécules odorantes et la matrice alimentaire (van Ruth, *et al.*, 2000). Dans certains cas, la salive peut influencer la libération des molécules odorantes par modification de la structure de la matrice alimentaire par humidification ou 'prédigestion'. Ce phénomène a notamment été étudié dans des matrices modèles contenant des glucides (Ferry, *et al.*, 2006a). La salive est un fluide complexe composé à 99% d'eau contenant un grand nombre de protéines différentes (Amerongen, *et al.*, 2002b). Ces protéines sont également susceptibles de modifier la libération des molécules odorantes (van Ruth, *et al.*, 2001a). La sécrétion et la composition de la salive est très variable d'un individu à l'autre, ainsi que pour un même individu en fonction de son état physiologique (Neyraud, *et al.*, 2009a). Ainsi, les interactions engendrées

# I. Introduction

---

par les composants de la salive avec les molécules odorantes sont susceptibles d'être différentes selon l'individu et son état physiologique.

L'objectif de cette étude est de mettre en évidence l'impact de la salive sur la libération des molécules odorantes. Pour cela deux approches ont été mises en place. Une approche *in vitro* par une analyse « headspace » de la libération des molécules odorantes en chromatographie gazeuse propose d'étudier l'impact de deux protéines majoritaires de la salive humaine sur la libération de dix molécules odorantes. Une approche *in vivo* par spectrométrie de masse propose d'étudier l'impact de la composition salivaire de différents sujets humains et des conditions physiologiques de consommations d'eaux aromatisées sur la libération de deux molécules odorantes par voie rétronasale.

Une première partie fait l'état de l'art des connaissances sur la perception des odeurs, les molécules odorantes, la salive et les méthodes de d'analyse de libération des molécules odorantes, ainsi que des techniques mesurant les interactions entre protéines et molécules odorantes. Une deuxième partie présente les différents modèles et techniques d'étude utilisés. Les principaux résultats sont présentés dans une troisième partie selon l'approche *in vitro* et l'approche *in vivo*. Ces résultats sont ensuite discutés dans une dernière partie présentant également les perspectives de l'étude.





*Etat de l'art*



# II. Etat de l'art

---

## 1. Les molécules odorantes

Les molécules odorantes souvent désignées par le terme arôme sont des molécules organiques de faible poids moléculaire généralement inférieur à 400 g/mol. Leur pression de vapeur saturante à la pression atmosphérique et température ambiante est suffisamment élevée pour que ces molécules diffusent de la matrice dans laquelle elles se trouvent vers la phase gazeuse. De cette façon ces molécules odorantes peuvent rejoindre la muqueuse olfactive, être détectées et déclencher un stimulus olfactif.

Les molécules odorantes n'ont aucune qualité nutritive et ne représentent qu'une part infime de l'aliment, mais sont essentielles à l'appréciation d'un aliment. L'arôme d'un aliment est constitué de plusieurs centaines de molécules odorantes différentes. Parmi ces molécules seul un petit nombre de type de molécules odorantes sont typiques de l'aliment. Par exemple, l'arôme de fraise qui est composé de plus de 150 molécules odorantes différentes (McFadden, *et al.*, 1965) peut être caractérisé par une unique molécule odorante, l'hexanoate d'éthyle.

Ces molécules sont parfois sensibles à la chaleur ou la lumière, Il est de ce fait parfois nécessaire de conserver l'aliment à l'abri de la lumière et l'humidité pour en garder ses qualités organoleptiques.

Les molécules odorantes peuvent appartenir à différentes classes chimiques, allant du plus simple hydrocarbure au composé polyfonctionnel le plus complexe. Ces différentes molécules odorantes sont décrites dans la suite du développement dans la diversité des classes chimiques.

### 1.1. La caractérisation des molécules odorantes

Les molécules odorantes peuvent être caractérisées par différents paramètres comme leur hydrophobicité, leur masse molaire, leur température d'ébullition, leur pression de vapeur saturante et bien entendu par leur volatilité. Chacun de ces paramètres a son importance dans la détermination du comportement de la molécule odorante. Par exemple, les molécules hydrophiles ont une plus forte affinité pour la phase aqueuse que les molécules hydrophobes et ont donc tendance à être moins libérés d'une phase aqueuse. Le coefficient de partage entre l'eau et le n-octanol ( $\log P$ ) est souvent utilisé pour évaluer

## II. Etat de l'art

---

le caractère hydrophobe d'une molécule (Banerjee, *et al.*, 1980). Les molécules odorantes possédant une valeur de  $\log P$  inférieure à 0 sont plus solubles dans l'eau que dans les solvants organiques et sont donc considérées comme polaires.

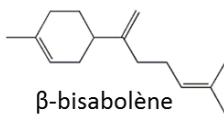
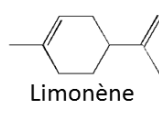
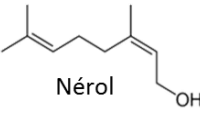
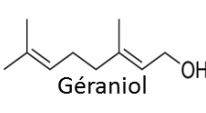
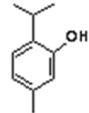
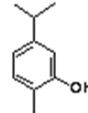
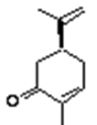
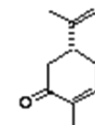
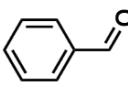
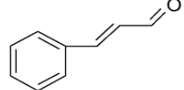
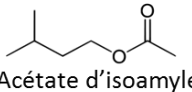
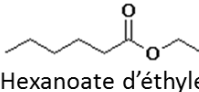
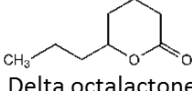
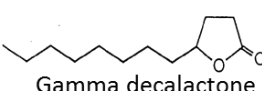
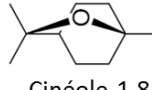
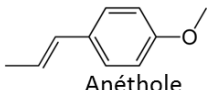
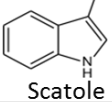
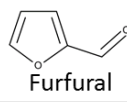
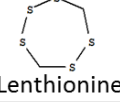


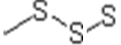
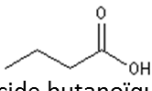
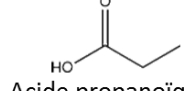
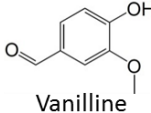
Les molécules odorantes peuvent évidemment aussi être caractérisées en fonction de leurs qualités sensorielles (note aromatique, intensité...). Ce qui permet au consommateur d'identifier l'aliment par son arôme, en plus de son visuel et sa texture.

### 1.2. La diversité des classes chimiques

Les classes chimiques représentées par les molécules odorantes sont essentiellement les hydrocarbures, les alcools, les phénols, les cétones, les aldéhydes, les esters, les lactones, les éthers, les composés hétérocycliques, les amines, les composés soufrés et les acides carboxyliques (Richard, *et al.*, 1992).

## II. Etat de l'art

Tableau II.1 : Définition et structure des molécules odorantes par classe chimique.

Nom de la fonction	Description de la fonction	Exemple de molécules odorantes
Hydrocarbure	Molécule uniquement composée de carbones et hydrogènes.	 β-bisabolène  Limonène
Alcool	Chaîne aliphatique composée de carbones et hydrogènes, dont un carbone au moins est relié à une fonction 'OH'.	 Nérol  Géranol
Phénol	Cycle aromatique de 6 carbones et 3 insaturations relié au moins à une fonction alcool et dans certains cas à des chaînes plus ou moins courtes composées de carbones et hydrogènes.	 Thymol  Carvacrol
Cétone	Chaîne aliphatique composée de carbones et hydrogènes, dont un carbone est relié à un oxygène par une double liaison.	 (-) Carvone  (+) Carvone
Aldéhyde	Chaîne aliphatique composée de carbones et hydrogènes, se terminant à une extrémité par un carbone relié à un oxygène par une double liaison.	 Benzaldéhyde  Cinnamaldéhyde
Ester	Chaîne aliphatique composée de carbones et d'hydrogènes, contenant un oxygène. Le carbone lié à l'oxygène de la chaîne est lié à un autre oxygène par une double liaison.	 Acétate d'isoamyle  Hexanoate d'éthyle
Lactone	Ester cyclique (fonction ester présente dans un cycle).	 Delta octalactone  Gamma decalactone
Ethers	Chaîne aliphatique composée de carbones, d'hydrogènes et d'un oxygène relié à deux carbones.	 Cinéole 1,8  Anéthole
Composé hétérocyclique	Cycle contenant au moins un hétéroatome (oxygène, azote, phosphore, soufre).	 Scatole  Furfural  Lenthionine
Amines	Composé dans lequel au moins un carbone d'une fonction carbonyle est lié par une simple liaison à un atome d'azote.	 Triméthylamine
Composé soufré	Chaîne aliphatique contenant un atome de soufre.	 Disulfure de méthyle  Trisulfure de méthyle
Acide carboxylique	Chaîne aliphatique composée de carbones et d'hydrogènes se terminant à une extrémité par un carbone lié à un oxygène par une double liaison et une fonction alcool.	 Acide butanoïque  Acide propanoïque
Composé mixte	Composés possédant plusieurs fonctions chimiques à la fois	 Vanilline

## II. Etat de l'art

---

Les hydrocarbures sont des composés organiques constitués exclusivement de carbone © et d'hydrogène (H). Ils sont généralement sensibles à la chaleur et aux phénomènes d'oxydation. Dans de nombreux cas, les hydrocarbures ne participent que très peu aux notes aromatiques de l'aliment, mais sont indispensables à cette dernière. Par exemple, l' $\alpha$ -curcumène, le  $\beta$ -bisabolène (Tableau II.1), le (-) zingibérène et le  $\beta$ -sesquiphellandrène sont des molécules capitales pour l'arôme gingembre.

Les alcools, caractérisés par leur groupement hydroxyle lié à un atome de carbone, peuvent être odorants sous forme aliphatique et cyclique, saturée et insaturée, de nature terpénique ou non. Ils sont à l'origine d'une grande diversité de notes olfactives comme les notes fruitées (1-hexanol), citronnées (nérol) (Tableau II.1), herbacées (3-octanol), florales (linalol), boisée (3-7-Dimethyl-1-octanol), mentholée (menthol), champignon (oct-1-ène-3-ol) ou encore moisie (géosmine).

Les phénols représentent une classe particulière des alcools avec un cycle aromatique. Les deux phénols les plus rencontrés dans les herbes aromatiques sont le thymol et le carvacrol (Tableau II.1) qui sont caractéristiques des odeurs d'huiles essentielles de thym, sarriette, origan et serpolet.

Les cétones et aldéhydes font partie de la grande famille des composés carbonylés et sont aussi connus pour leurs propriétés odorantes très variées. Un exemple typique est la note amande amère du benzaldéhyde ou encore la note cannelle du cinnamaldéhyde (Tableau II.1).

Les esters représentent aussi une part importante des molécules odorantes. Ils sont le plus souvent porteurs de notes fruitées. Un exemple typique est la note fraise de l'hexanoate d'éthyle, ou encore la note banane de l'acétate d'isoamyle (Tableau II.1). Une sous-famille des esters composée de lactones renferment leur fonction ester dans un cycle. Parmi les différentes lactones, on peut citer la delta-octalactone, qui est à l'origine de la note noix de coco et la gamma-decalactone de la note pêche (Tableau II.1).

Parmi les éthers les plus répandus, nous pouvons trouver le cinéole-1,8 qui est le composé majoritaire de l'eucalyptus donnant sa note de fraîcheur, ou encore l'anéthole qui porte la note typique de l'anis (Tableau II.1).

La classe chimique des composés hétérocycliques représente une grande partie des molécules odorantes identifiées dans les aliments. Ces hétérocycles peuvent comporter différents hétéroatomes, comme l'azote (odeur fécale portée par le scatole), l'oxygène (odeur caramel portée par le furfural), le soufre (odeur champignon portée par la lenthionine) (Tableau II.1), ou plusieurs différents hétéroatomes en même temps (note bacon portée par le butyl-5-oxazole). Les composés hétérocycliques ont le plus souvent des seuils de perception très bas (de l'ordre du ppb). Ces composés sont le plus souvent générés

## II. Etat de l'art

---

lors de réactions thermiques entre un composé de nature glucidique réducteur et un acide aminé (réaction de Maillard), donnant lieu à des notes aromatiques type 'cuites', comme la note brûlée (méthylpyrazine) ou encore croûte de pain (acétyl-2-pyridine). Ces composés sont de ce fait rarement présents initialement dans les aliments bruts, mais apparaissent lors de procédés de transformation de l'aliment, comme par exemple lors de la torréfaction du cacao où le scatole est formé. Certaines notes de type fruité ou légume peuvent aussi être portées par des composés hétérocycliques, comme par exemple la note tomate (isobutyl-2-thiazole) ou encore celle de fruits tropicaux (méthyl-2-propyl-4-oxathiane-1,3).

Des molécules odorantes sont aussi trouvées dans la classe des amines. Ces molécules ont des notes très marquées et sont souvent synonyme de 'mauvaises odeurs' à forte concentration. La triméthylamine caractérisée par son odeur de poisson en donne un bon exemple (Tableau II.1).

Les composés soufrés sont très présents dans les arômes de légumes de la famille des Alliées (oignon, poireau...etc), ou des Crucifères (choux, brocoli...etc.), sous forme de disulfure de méthyle (odeur de choux et brocoli) et trisulfure de diméthyle (odeur de choux) (Tableau II.1).

La classe chimique des acides carboxyliques est peu représentée en raison de leur forte polarité, qui les rend peu volatils. Cette classe chimique reste tout de même importante, puisque dans certains cas ces acides sont suffisamment légers pour être volatils à température ambiante. Ces derniers sont notamment caractéristiques de certains produits laitiers comme le beurre (acide butanoïque) ou le fromage (acide propionique) (Tableau II.1). Dans le cas du fromage, ces molécules sont produites par les microorganismes au cours de l'affinage.

Il arrive parfois que des molécules odorantes possèdent plusieurs fonctions chimiques différentes à la fois. C'est par exemple le cas de la vanilline qui renferme trois fonctions : éther, alcool et aldéhyde à la fois (Tableau II.1). La complexité de cette molécule et la nomenclature de la chimie organique fait que la vanilline peut être classée indépendamment dans différentes classes chimiques.

### 1.3. Les relations 'structure-odeur'

Bien que certaines classes chimiques peuvent être associées à un type de note aromatique (note fruitée des esters, note cuite des hétérocycles obtenus par réaction thermique), il est difficile de prévoir cette note à partir de la structure de la molécule odorante. En effet, dans de nombreux cas, une différence de structure qui peut paraître insignifiante (ajout d'une double liaison, composés énantiomères) peut engendrer une grande variation de la note et de l'intensité aromatique. Par exemple le nérol (note citron) et le géranol (note géranium), qui ont des notes odorantes différentes sont des diastéréoisomères qui ne



## II. Etat de l'art

différent que par la stéréoisomérisation d'une seule liaison (Z pour le nérol et E pour géraniol) (Tableau II.1). Dans les cétones, nous pouvons aussi trouver l'exemple de la carvone qui possède un carbone asymétrique qui dans sa forme (D) porte l'odeur de menthe et dans sa forme (L) la note carvi.

De même, des composés de note odorante proche peuvent avoir des structures très différentes, comme il est observé par exemple pour le nérol (note citron) et le limonène (note agrume). Le nérol étant un alcool ramifié sans cycle et le limonène un hydrocarbure comportant un cycle avec une double liaison (Tableau II.1).

### 2. La perception des molécules odorantes

Dans la vie de tous les jours, le consommateur ne fait pas de différence entre saveurs, sens trigéminal et odeur, il utilise le terme global de 'goût' qui englobe ces trois perceptions en même temps. L'odorat qui nous permet de percevoir les odeurs ne prend en compte que la partie volatile de l'aliment, les molécules odorantes. Les organes responsables de cette perception sont les récepteurs et nerfs olfactifs situés au niveau des fosses nasales (Figure II.1). Afin d'être perçues, les molécules odorantes doivent donc arriver au niveau de ces fosses nasales.

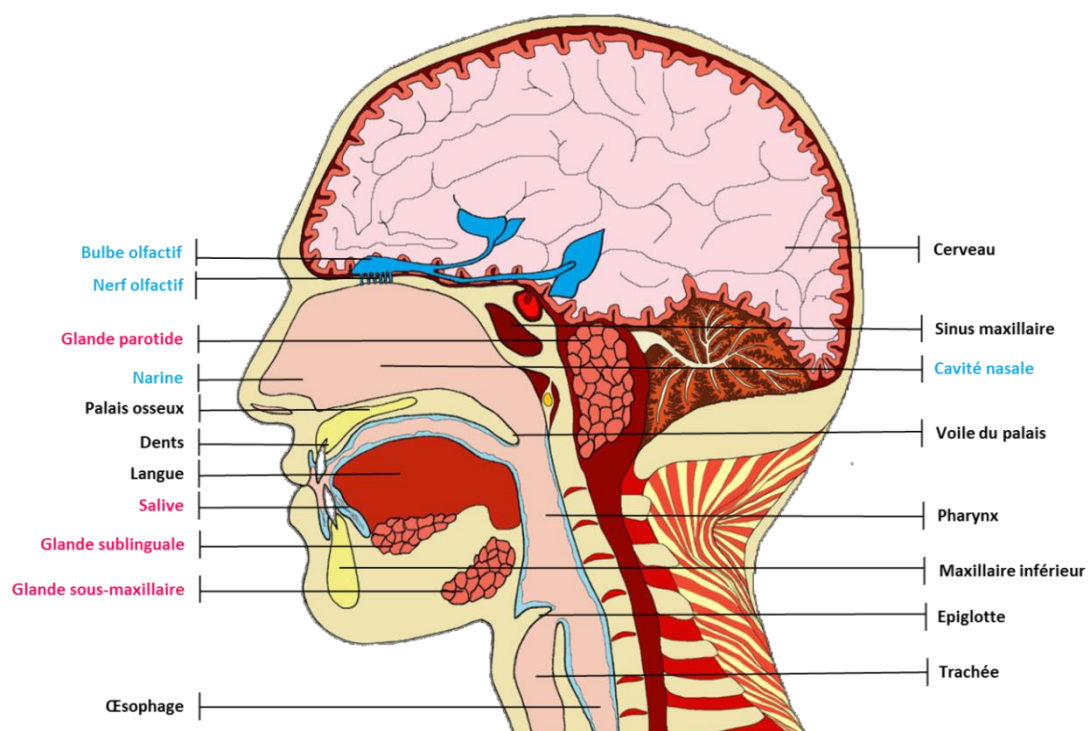


Figure II.1 : Anatomie de la cavité buccale et nasale chez l'homme (légendes en bleu : système olfactif, en rose : système salivaire).

## II. Etat de l'art

---

La Figure II.1 présente l'anatomie de la cavité buccale et nasale chez l'homme et permet de situer les différentes étapes de la perception des molécules odorantes.

### 2.1. Les récepteurs olfactifs

L'épithélium olfactif de l'homme représente près de 10% de la surface de la cavité nasale totale. Il compte environ 6 millions de neurones olfactifs qui s'y terminent par d'étroits appendices appelés cils. Ces cils sont protégés de la déshydratation et des infections bactériennes par un mucus produit au niveau de l'épithélium olfactif par les cellules de soutien et les glandes de Bowman (Douek, *et al.*, 1975). Ils contiennent dans leur membrane les récepteurs olfactifs (Figure II.2), découverts en 1990 par Buck et Axel (Buck, *et al.*, 1991).

Afin d'être perçues, les molécules odorantes présentes dans les cavités nasales doivent traverser le mucus nasal et atteindre les récepteurs olfactifs. Ce mucus est de nature aqueuse, ce qui constitue une barrière pour les molécules odorantes qui sont majoritairement hydrophobes. La solubilisation des molécules odorantes et leur temps de diffusion au travers de celui-ci dépend alors de leur solubilité dans l'eau (Linthorpe, *et al.*, 2002). Cette observation suggère aussi qu'il puisse exister de grandes variations entre la composition en molécules odorantes dans l'air de la cavité nasale et celle dans le mucus au niveau des terminaisons nerveuses olfactives.

La diffusion dans le mucus nasal des molécules odorantes est facilitée par l'action de protéines solubles présentes dans ce dernier, les 'odorant binding proteins' (OBP) (Steinbrecht, 1998). Elles font partie de la grande famille des lipocalines (Flower, 1996) et sont produites par les glandes de Bowman de l'épithélium olfactif (Pevsner, *et al.*, 1986). Les OBP se lient de façon réversible aux molécules odorantes de façon à les libérer au niveau de l'épithélium olfactif. Cette libération serait due à un changement de conformation de la structure de l'OBP en raison d'une diminution de pH du mucus nasal au niveau de l'épithélium olfactif. Mais ce phénomène n'a pas été clairement démontré à ce jour. Les molécules odorantes libérées au niveau des cellules sensorielles de l'épithélium olfactif se fixent aux récepteurs olfactifs présents dans la membrane de ces dernières, de façon réversible.

Les récepteurs olfactifs font partie de la grande famille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG). Les RCPG ont une structure générale similaire composée de 7 régions hydrophobes transmembranaires structurées en hélices (Mombaerts, 1999) (Figure II.2) et sont plus ou moins spécifiques d'une molécule odorante. En raison de la grande diversité des molécules odorantes, il est probable qu'il n'existe pas un récepteur olfactif spécifique à chacune d'elle.

## II. Etat de l'art

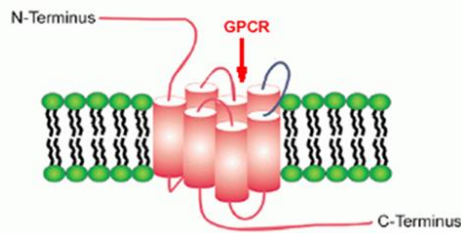


Figure II.2 : Représentation schématique de la structure tridimensionnelle GPCR.

### 2.2. La création du signal olfactif

La liaison d'une molécule odorante à un récepteur olfactif induit une cascade de transduction qui implique un ensemble de réactions complexes, commun à l'ensemble des RCPG, que l'on peut résumer sommairement par l'activation initiale de la protéine G (Firestein, 2001) conduisant à la production finale d'AMP cyclique. Cette cascade de transduction provoque des changements dans le potentiel de membrane des neurones, ce qui produit un signal électrique qui est transmis par les axones au bulbe olfactif. Chaque neurone olfactif projette un seul axone sur le même glomérule et les neurones olfactifs qui expriment le même récepteur olfactif convergent sur le même glomérule à la surface du bulbe olfactif (Figure II.3) (Firestein, 2001).

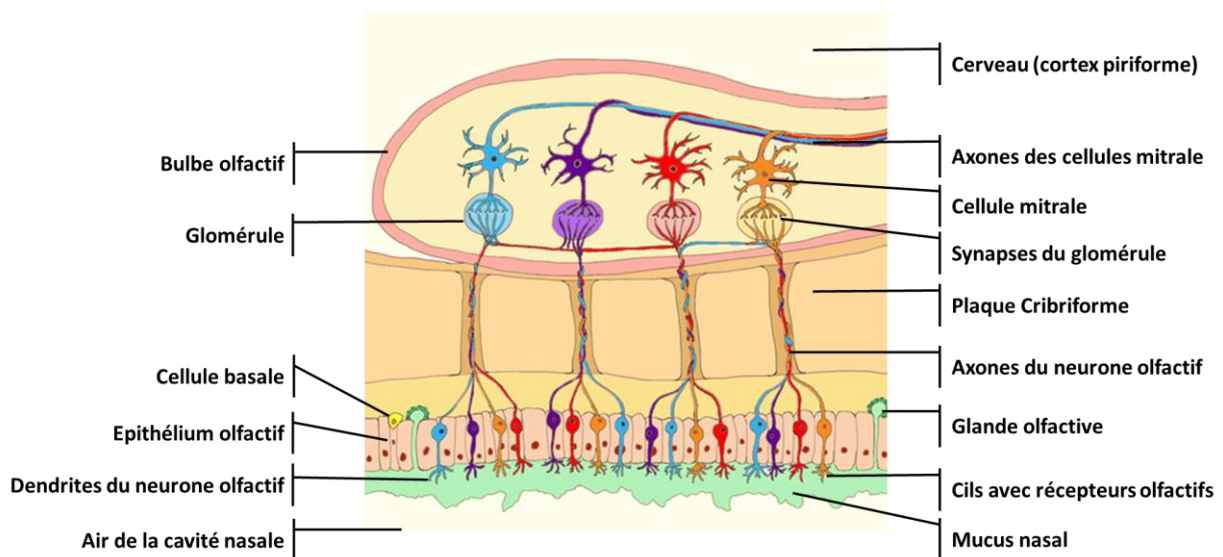


Figure II.3 : Représentation schématique de la transmission du signal olfactif du neurone olfactif de l'épithélium olfactif au bulbe olfactif

La transmission du signal olfactif du bulbe olfactif vers le cerveau est assurée en grande partie par les cellules mitrales dont les axones se projettent dans le cortex piriforme (cortex olfactif) (Isaacson, *et al.*, 1998) (Rochel, *et al.*, 1982).

## II. Etat de l'art

---

### 1.1. Les voies et seuils de perception des molécules odorantes

La perception des molécules odorantes nécessite leur présence au niveau des récepteurs olfactifs dans les fosses nasales. Le transport de ces molécules odorantes vers les fosses nasales peut être effectué de deux façons.

#### 1.1.1. Les deux voies de perception des molécules odorantes

Les molécules odorantes peuvent être perçues au niveau des récepteurs olfactifs par voie directe orthonasale lors de l'inspiration. Les molécules odorantes peuvent également être perçues par la voie indirecte rétronasale au moment de la consommation de l'aliment. En bouche, l'aliment subit de nombreux changements qui contribuent à la formation du bol alimentaire (température, dilution, fragmentation, insalivation). Le bol ainsi formé pourra ensuite être dégluti lorsqu'il aura atteint un niveau de fragmentation et de lubrification suffisant (Salles, *et al.*, 2011). Cette déstructuration de l'aliment est à l'origine de la libération des molécules odorantes dans la salive puis dans l'air de la cavité buccale. La mastication ainsi que l'imprégnation par la salive de l'aliment peuvent entraîner des changements significatifs de l'aliment au niveau de sa surface d'échange, de son hydratation et de son temps de maintien en bouche. Pionnier *et al* (Pionnier, *et al.*, 2004a) ont mis en évidence que la libération des molécules odorantes (heptan-2-one et hexanoate d'éthyle) pour des matrices fromagères peut être expliquée par deux mécanismes physiologiques différents. Une libération importante a été mise en relation avec un flux respiratoire élevé, qui entraîne une plus grande quantité de molécules odorantes vers les fosses nasales. Une libération importante a été mise en relation avec un nombre de coup de dents et une activité des muscles de la mâchoire élevés, qui conduisent à une augmentation de la surface d'échange entre l'aliment et la phase vapeur.

La déglutition du bol alimentaire est aussi une étape importante de la libération des molécules odorantes par voie rétronasale. Le passage du bol alimentaire dans le pharynx au moment de la déglutition va laisser un dépôt de produit contenant des molécules odorantes, au niveau des muqueuses buccales et pharyngées (Deleris, *et al.*, 2011). Ces molécules sont ensuite libérées progressivement dans l'air de la cavité pharyngée et entraînées vers la cavité nasale par expiration. Sans nouvelles déglutitions ou consommation de l'aliment, le film salivaire tapissant les muqueuses buccales et pharyngées s'épuise en molécules odorantes à chaque expiration, jusqu'à disparition totale de ces molécules.

Le transfert des molécules odorantes de la cavité buccale vers la cavité nasale est contrôlé par l'ouverture/fermeture du voile du palais, dont l'amplitude et la fréquence d'ouverture dépendent de l'individu et de l'aliment consommé (Buettner, *et al.*, 2001b). Une étude de suivi de libération de la

## II. Etat de l'art

---

menthone au cours de la consommation d'une pastille de menthe a montré que certains individus libèrent la menthone en continu dès la mise en bouche, que d'autres ne libèrent la menthone que pendant les déglutitions et qu'un troisième groupe d'individus libère également la menthone pendant les mouvements de langue et de mâchoire (Repoux, *et al.*, 2012c). Ces résultats confirment l'importance des mouvements du velum dans la dynamique de libération des molécules odorantes dans la cavité nasale des individus en condition de consommation.

D'autres études ont montré que le volume de la cavité buccale ainsi que ses variations lors des mouvements de la langue pouvaient influencer la quantité de molécules odorantes libérées dans la cavité nasale. Les individus qui ont un volume buccal constant pendant la consommation libèrent les molécules odorantes en continu et en plus grande quantité que les individus qui ont un volume buccal faible à la mise en bouche et qui augmente lors de la déglutition (Mishellany-Dutour, *et al.*, 2012a). Cette observation laisse supposer que des différences de physiologie orale peuvent engendrer des différences de quantité de molécules odorantes libérées.

Les données de la Figure II.4 montrent de grandes variations dans les volumes de cavité nasale, buccale et pharyngée entre les individus. Par exemple, le volume de la cavité nasale varie globalement entre 6 et 30 cm<sup>3</sup>, celui de la cavité buccale entre 34 et 160 cm<sup>3</sup> et celui de la cavité pharyngée entre 26 et 57 cm<sup>3</sup>. Le débit d'air arrivant dans la cavité nasale pour un individu au repos est compris entre 200 et 500 cm<sup>3</sup>/s (Zhao, *et al.*, 2004).

## II. Etat de l'art

Volumes de la cavité nasale	Méthodes	Nombre de Sujets	Références
$11 \pm 0,4 \text{ cm}^3$	Rhino-pharyngomètre (ondes acoustiques)	5	a
$6.47 \pm 1,83 \text{ cm}^3$	Imagerie par Résonance Magnétique (MRI)	10	b
$20,0 \pm 4,4 \text{ cm}^3$	Rhino-pharyngomètre (ondes acoustiques)	10	c
$27,15 \pm 1,19 \text{ cm}^3$	Acoustique rhinométrie (ondes acoustiques)	21	d

Volumes buccaux	Nombre de Sujets	Références
$37 \pm 8 \text{ cm}^3$	5	a
$34,76 \pm 3,6 \text{ cm}^3$	120	e

Volumes pharyngés	Nombre de Sujets	Références
$29 \pm 9 \text{ cm}^3$	5	a
$26,46 \pm 6,9 \text{ cm}^3$ (F) $29,65 \pm 6,1 \text{ cm}^3$ (H)	12	e
$56,9 \pm 8,3 \text{ cm}^3$	16	f

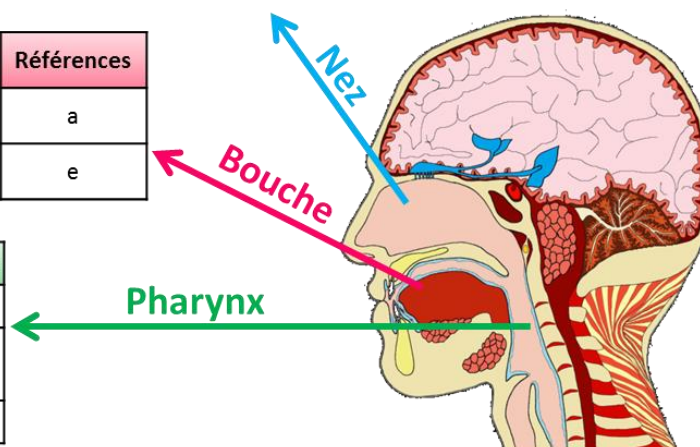


Figure II.4 : Valeurs des volumes de la cavité nasale, buccale et du pharynx. Les volumes de la cavité buccale et du pharynx ont été mesurés par rhino-pharyngomètre à ondes acoustiques sauf pour la référence (f) où les volumes oraux ont été mesurés par imagerie en résonance magnétique. Les références utilisées pour réaliser cette figure sont données ci-dessous.

(a) (Doyennette, et al., 2011)

(b) (Hilberg, et al., 1993)

(c) (Cankurtaran.M, 2007)

(d) (Grymer, et al., 1989)

(e) (Xue, et al., 2006)

(f) (Eckmann, et al., 1996)

Il est alors intéressant de prendre en compte ces paramètres physiologiques dans l'interprétation des résultats issus de l'analyse de libération *in vivo* des molécules odorantes pendant la consommation des aliments.

### 1.1.2. Les seuils de détections des molécules odorantes

Le seuil de détection d'une molécule odorante correspond à la concentration la plus faible à laquelle elle est perçue par un individu, sans forcément être identifiée. Le seuil de reconnaissance d'une molécule correspond à la concentration minimale permettant l'identification de cette dernière. Cette concentration étant supérieure au seuil de détection.

Les seuils de détection et de reconnaissance varient considérablement entre individus selon la sensibilité olfactive de celui-ci. Ces deux seuils peuvent varier en fonction de la matrice alimentaire dans

## II. Etat de l'art

laquelle se trouve la molécule odorante cible, en raison des interactions pouvant exister entre la molécule odorante et les composés de la matrice.

Le Tableau II.2 présente les seuils de détection de différentes molécules odorantes suivant la voie de détection ortho ou rétronasale (cf paragraphe 2.1.4.).

Tableau II.2 : Seuil de détection orthonasale et rétronasale de différentes cétones et esters dans l'eau à 25°C.

Molécules	Seuil de détection orthonasal	Seuil de détection rétronasal	Références
Propanoate d'éthyle	13,3 µg/l	4,9 µg/l	(Plotto, <i>et al.</i> , 2008)
	9,9 g/l	4,9 µg/l	(Ahmed, <i>et al.</i> , 1978)
	10 µg/l		(Takeoka, 1989)
	20 µg/l		(Schnabel, <i>et al.</i> , 1988)
Butanoate d'éthyle	1 µg/l	0,1µg/l	(Buettner, <i>et al.</i> , 2001c)
	1 µg/l		(Curioni, <i>et al.</i> , 2002)
Pentanoate d'éthyle	8,7-109,3 µg/l		(Schnabel, <i>et al.</i> , 1988)
Hexanoate d'éthyle	2,63 µg/l	0,5 µg/l	(Plotto, <i>et al.</i> , 2008)
	5 µg/l	0,5µg/l	(Buettner, <i>et al.</i> , 2001c)
	1 µg/l		(Curioni, <i>et al.</i> , 2002)
Pentan-2-one	1640-4050 µg/l		(Schnabel, <i>et al.</i> , 1988)
Heptan-2-one	9 µg/l		(Curioni, <i>et al.</i> , 2002)
	370 µg/l		(Pyysalo, <i>et al.</i> , 1977)
	41,1-91,4 µg/l		(Schnabel, <i>et al.</i> , 1988)
Octan-2-one	39,7-61-5 µg/l		(Schnabel, <i>et al.</i> , 1988)
Nonan-2-one	20 µg/l		(Curioni, <i>et al.</i> , 2002)
	41,2-79,6 µg/l		(Schnabel, <i>et al.</i> , 1988)

Les seuils de détection déterminés par voie rétronasale sont plus faibles que ceux déterminés par voie orthonasale. Nous pouvons remarquer que les seuils de détection par voie orthonasale des esters sont plus faibles que ceux des cétones. Le Tableau II.2 montre aussi que les seuils de détections par voie orthonasale diminuent avec la longueur de chaîne aliphatique pour les esters. Ces deux dernières observations peuvent s'expliquer par la volatilité des molécules odorantes, sachant que les esters sont plus volatils que les cétones pour un même nombre de carbones dans leur chaîne aliphatique et que la volatilité des esters augmente avec la longueur de chaîne pour une même classe chimique.

Le Tableau II.2 met en avant de grandes différences entre les valeurs des seuils de détection selon les auteurs. Par exemple pour la heptan-2-one, Pyysalo et ses collaborateurs (Pyysalo, *et al.*, 1977) rapporte une valeur de seuil de détection presque dix fois élevé que celle trouvée par le groupe de recherche de Schnabel *et al* (1988) et quarante fois plus élevée que celle du groupe de Curioni et Bosset (2002). Ces différences peuvent être expliquées par une grande variabilité interindividuelle de la sensibilité olfactive (panel différent entre auteurs).

## II. Etat de l'art

Ainsi, la perception des molécules odorantes dépend de nombreux paramètres liés à l'individu (la mastication, la salivation, la respiration, la déglutition, le volume buccal) et à la voie de perception (orthonasale ou rétronasale). Lors de la consommation d'un aliment, il est également important de prendre en compte l'effet de la matrice alimentaire sur la libération des molécules odorantes dans la phase vapeur.

### 2. Les interactions entre molécules odorantes et matrice alimentaire

Les aliments sont des matrices complexes pouvant contenir différents composés comme des lipides, protéines, glucides, eau, minéraux, ainsi que des molécules odorantes et sapides. Tous ces éléments contribuent à la perception de la texture et de la flaveur (arôme + saveur) de l'aliment. La libération d'une molécule odorante de sa matrice vers la phase vapeur est couramment caractérisée par le coefficient de partage vapeur/matrice qui correspond au rapport des concentrations de la molécule odorante entre la phase vapeur et la matrice.

Les Tableaux II.3 et II.4, présentent respectivement des valeurs de coefficients de partage vapeur/matrice (K) pour une molécule odorante hydrophobe (hexanoate d'éthyle) et pour une molécule odorante hydrophile (diacétyl) pour des matrices aqueuses simplifiées de différentes compositions. Ces deux tableaux montrent que la composition de la matrice (protéines, lipides et glucides) peut influencer le coefficient de partage des molécules odorantes. Ces deux tableaux mettent aussi en avant que l'effet de la composition de la matrice dépend de la nature de la molécule odorante.

Tableau II.3 : Coefficient de partage vapeur/matrice (K) de l'hexanoate d'éthyle dans des matrices différentes compositions ( $\log P$  de l'hexanoate d'éthyle: 2.83)

Matrice	Température (°C)	K	Référence
Eau	22°C	$4,0 \cdot 10^{-2}$	(Doyen, <i>et al.</i> , 2001)
huile	22°C	$9,5 \cdot 10^{-5}$	(Doyen, <i>et al.</i> , 2001)
Eau + 0,1% de NaCl	30°C	$1,06 \pm 0,96 \cdot 10^{-2}$	(Juteau, <i>et al.</i> , 2004)
Eau +0,5% de NaCl	30°C	$1,38 \pm 0,61 \cdot 10^{-2}$	(Juteau, <i>et al.</i> , 2004)
Eau +0,5% de NaCl + 1% de iota-caraghénane	30°C	$5,62 \pm 0,29 \cdot 10^{-3}$	(Juteau, <i>et al.</i> , 2004)
Eau	37°C	$6,2 \cdot 10^{-2}$	Bylaite <i>et al.</i> , 2004
Eau + 0,5% lambda carrégenane	37°C	$7,31 \cdot 10^{-2}$	Bylaite <i>et al.</i> , 2004



## II. Etat de l'art

Tableau II.4 : Coefficient de partage vapeur/matrice (K) du diacétyle dans des matrices de différentes compositions (logP du diacétyle: -1,34)

Matrice	Température (°C)	K	Référence
Eau	25°C	$4,5 \pm 0,2 \cdot 10^{-4}$	(Salvador, <i>et al.</i> , 1994)
Huile de tournesol	25°C	$6,30 \pm 0,2 \cdot 10^{-4}$	(Salvador, <i>et al.</i> , 1994)
Emulsion huile dans eau (huile de tournesol)	25°C	$6,40 \pm 0,2 \cdot 10^{-4}$	(Salvador, <i>et al.</i> , 1994)
Emulsion eau dans huile (huile de tournesol)	25°C	$7,40 \pm 0,2 \cdot 10^{-4}$	(Salvador, <i>et al.</i> , 1994)
Eau	37°C	$1,7 \cdot 10^{-3}$	Bylaite <i>et al.</i> , 2004
Eau + 0,5% lambda carrégenane	37°C	$3,3 \cdot 10^{-3}$	Bylaite <i>et al.</i> , 2004
Gel de gélatine	37°C	$2,9 \cdot 10^{-3}$	(Boland, <i>et al.</i> , 2004)
Gel d'amidon	37°C	$1,6 \cdot 10^{-3}$	(Boland, <i>et al.</i> , 2004)
Gel de pectine	37°C	$2,8 \cdot 10^{-3}$	(Boland, <i>et al.</i> , 2004)

Nous pouvons observer que dans des conditions identiques d'analyse, à savoir les valeurs obtenues par Bylaite *et al.*, (2004) à 37°C, la valeur des coefficients de partage de l'hexanoate d'éthyle est plus élevée que celle du diacétyle pour le milieu eau. L'hexanoate d'éthyle étant plus hydrophobe le diacétyle, cette molécule a moins d'affinité avec l'eau, ce qui entraîne une libération plus importante de cette molécule vers la phase vapeur. Le caractère hydrophobe de l'hexanoate d'éthyle explique qu'il soit plus libéré d'un milieu « eau » que d'un milieu « huile » (Doyen *et al.*, 2001).

L'ajout à l'eau de composés, comme des glucides ou des protéines entraîne des modifications d'interaction et d'équilibre entre la phase vapeur et la matrice, modifiant donc les valeurs des coefficients de partage, ce qui est observé sur les Tableaux II.3 et II.4. Nous pouvons observer notamment que l'hexanoate d'éthyle est moins libéré en présence de lambda carrégenane par rapport à l'eau. En revanche un ajout de sel (NaCl) entraîne une augmentation de la libération de l'hexanoate d'éthyle.

Dans le cas du diacétyle, un ajout d'huile de tournesol sous forme d'émulsion entraîne une augmentation de sa libération, l'émulsion eau dans huile entraînant l'augmentation de libération la plus importante. La comparaison des effets de l'ajout de gélatine, amidon et pectine sous forme de gel sur la libération du diacétyle par Boland *et al* (Boland, *et al.*, 2004) montre qu'il n'y a pas de grande différence de libération du diacétyle d'un gel de gélatine ou de pectine et qu'il existe une rétention plus importante de cette molécule par un gel d'amidon.

Les parties suivantes décrivent l'impact des principaux éléments de la matrice alimentaire sur la libération des molécules odorantes.

## II. Etat de l'art

---

### 2.1. Les glucides

Dans l'alimentation il est possible de trouver trois catégories de glucides différenciées par leur masse moléculaire : les sucres à courte chaîne (mono et disaccharides) comme le glucose ou saccharose, les oligosaccharides comme l'oligofructose et les polysaccharides comme l'amidon ou la cellulose. Bien que de nombreux travaux aient étudié l'impact des glucides sur la libération des molécules odorantes dans des solutions modèles, il est difficile de conclure sur la nature des interactions mises en jeu avec les glucides. En effet, les variations de concentration et de nature du glucide modifient également la viscosité de la matrice. Les effets observés peuvent alors provenir à la fois d'interactions moléculaires et/ou de modifications de la diffusion des petites molécules à travers le réseau polysaccharidique par encombrement stérique.

Concernant les interactions moléculaires, elles peuvent impliquer des effets hydrophobes, des liaisons hydrogènes ou encore des interactions de Van der Waals (Goubet, *et al.*, 1998; Tromelin, *et al.*, 2010b). La rétention des molécules odorantes par les polysaccharides dépend alors à la fois de la nature du polysaccharide et de la nature de la molécule odorante. Par exemple, Le Than *et al* (Le Thanh, *et al.*, 1992) ont mis en évidence dans l'eau, une rétention plus importante du benzaldéhyde que de l'acétone par les maltodextrines, alors que l'inverse est observé avec l'amidon ou la bêta-cyclodextrine. Baines et Morris (Baines, *et al.*, 1987) ont montré que des molécules odorantes hydrophiles sont moins retenues par des gels de pectines modèles que des molécules odorantes hydrophobes et ont observé l'inverse pour des gels à base d'amidon. Ces résultats suggèrent des modes d'interactions différents en fonction de la nature du polysaccharide.

L'ajout de polysaccharides entraîne également une augmentation de la viscosité ou une gélification de la matrice. Baines et Morris (Baines, *et al.*, 1987) ont pris en compte cette augmentation de viscosité et précisent qu'en dessous une certaine concentration de polysaccharide, la viscosité perçue augmente faiblement et la perception de l'arôme reste constante, mais passé cette concentration critique, la perception de la viscosité augmente et celle de l'arôme diminue (Baines, *et al.*, 1987).

De plus, la présence en solution aqueuse de mono et disaccharides peut être à l'origine d'un effet 'salting out' induisant une augmentation de la libération des molécules odorantes (Hansson, *et al.*, 2001).

### 2.2. Les lipides

La solubilité des molécules odorantes dans les lipides dépend de leur hydrophobicité. Des auteurs comme Forss (Forss, 1969) et Haahr *et al* (Haahr, *et al.*, 2000) ont mis en évidence l'importance des lipides dans la libération/rétention des molécules odorantes. La plus grande affinité des molécules odorantes

## II. Etat de l'art

---

hydrophobes pour les lipides que pour les phases aqueuses, induit une diminution de libération de celles-ci avec une augmentation de la quantité de lipides dans le milieu (Bayarri, *et al.*, 2006).

La solubilité des molécules odorantes dans les lipides varie en fonction de la nature chimique des lipides (composition en acide gras, longueur de chaîne, insaturations) et de leurs propriétés physiques (viscosité, densité ou taux de solide à une température donnée).

### 2.3. Les protéines

Les protéines, en fonction de leurs caractéristiques physico-chimiques, peuvent également interagir avec les molécules odorantes, entraînant une perte d'arôme pour le consommateur (Guichard, 2002).

Les interactions entre les protéines laitières, comme la caséine ou encore la beta-lactoglobuline connue pour ses propriétés émulsifiantes, ont été particulièrement étudiées. Landy *et al* (Landy, *et al.*, 1995; Landy, *et al.*, 1997) ont mis en évidence que la rétention des esters par la caséine augmente avec leur hydrophobicité. Il a aussi été montré que la beta-lactoglobuline interagit avec de nombreuses molécules odorantes comme les aldéhydes, les cétones, les ionones et les esters (Guichard, *et al.*, 2000).

Dans la plupart des cas, les molécules odorantes se lient aux protéines par des liaisons faibles et réversibles de type hydrogène, ou par des interactions de type van der Waals ou hydrophobes (Lubbers, *et al.*, 1998). Par exemple, les interactions entre la vanilline et les caséines font intervenir des liaisons de type hydrogène, alors qu'elles impliquent des effets hydrophobes dans le cas de l'albumine de sérum bovin (Chobpattana, *et al.*, 2002). Ces interactions peuvent être spécifiques ou non spécifiques. Lorsque la liaison est spécifique, il existe un ou plusieurs sites de fixation précis sur la protéine comme dans le cas de la beta-lactoglobuline, qui présente deux sites de fixation principaux aux molécules odorantes de nature hydrophobe (Tavel, *et al.*, 2008a).

De plus, il peut également s'établir des liaisons covalentes entre les protéines et les molécules d'arôme en fonction de la réactivité de ces dernières. Ainsi, certains aldéhydes peuvent se lier de façon irréversible aux protéines par des liaisons covalentes en créant des bases de Schiff, comme par exemple entre l'heptanal et la caséine (Fischer, *et al.*, 1997).

### 2.4. Autres composés de la matrice alimentaire

D'autres composés de la matrice alimentaire peuvent influencer la libération des molécules odorantes, comme par exemple les tanins ou le sel.

## II. Etat de l'art

---

Les tanins sont présents dans les produits d'origine végétale. Mitropoulou et ses collaborateurs (Mitropoulou, *et al.*, 2011) ont mis en évidence que la présence de tanins dans des vins modèles, augmente la libération de l'acide octanoïque et de l'alcool 2-phényléthylrique.

Le sel a souvent été utilisé en tant qu'exhausteur de goût. Il a été montré que l'effet exhausteur de goût du sel provient d'un effet 'salting out', conduisant à une augmentation de la libération des molécules odorantes hydrophobes, comme il est observé dans le Tableau II.3 pour l'hexanoate d'éthyle. Cet effet a notamment été montré dans des modèles fromagers (Lauverjat, *et al.*, 2009).

### 2.5. Les systèmes multiphasiques : exemple des émulsions

Les aliments ne sont généralement pas constitués d'une seule phase, c'est pourquoi nous présenterons brièvement dans cette partie les interactions entre molécules odorantes et macromolécules dans des systèmes émulsionnés.

Une émulsion est un arrangement binaire entre deux phases fluides non miscibles. Ces deux phases sont distribuées de façon à former un seul système. Une phase est dispersée (phase dispersée) dans l'autre (phase continue). Le système est thermodynamiquement instable et peut être stabilisé par l'ajout de surfactants ou émulsifiants qui sont des composés possédant une partie hydrophile et une partie hydrophobe à la fois. Parmi les surfactants les plus couramment utilisés, on trouve certaines protéines. Ces dernières se placent aux interfaces huile/eau de la phase dispersée, créant des structures sphériques appelées gouttelettes. Il est courant de retrouver ce type de structure dans les aliments, notamment dans les produits laitiers, comme le lait, ou la crème fraîche qui sont des émulsions huile dans eau ou dans les condiments alimentaires comme la mayonnaise, ou la vinaigrette qui sont des émulsions eau dans huile.

Dans un système émulsionné, les molécules odorantes sont partagées entre les phases eau et huile (Rabe, *et al.*, 2004). Les propriétés de rétention des molécules odorantes par un tel système dépendent de nombreux paramètres, notamment du type d'émulsion, de la protéine stabilisant l'émulsion, ainsi que de la nature de la matière grasse (animale, végétale, poids moléculaire) présents dans celle-ci.

De nombreuses études ont montré les propriétés de rétention des émulsions 'huile dans eau' (Guichard, 2002; Seuvre, *et al.*, 2000; Van Ruth, *et al.*, 2002a). Salvatore *et al* (Salvador, *et al.*, 1994) ont montré que la vitesse de libération du diacétyle d'une émulsion 'huile dans eau' vers la phase vapeur est supérieure à sa vitesse de libération d'une émulsion 'eau dans huile', sachant que le diacétyle est hydrophile. Pour des molécules odorantes hydrophobes, l'inverse est observé, du fait de leur plus grande affinité pour la phase lipidique.

## II. Etat de l'art

---

Dans une émulsion, le diamètre des gouttelettes peut jouer un rôle important dans la libération des molécules odorantes, étant donné qu'une diminution du diamètre des gouttelettes induit une augmentation du nombre de gouttelettes et par conséquent une augmentation de la surface totale d'échange de l'ensemble des gouttelettes. Ce paramètre a notamment été étudié par Charles *et al* (Charles, *et al.*, 2000b) dans des émulsions 'huile/eau' qui ont mis en évidence une diminution de la libération vers la phase gazeuse des molécules hydrophiles comme le diacétyl ( $\log P -1,34$ ) ou le 1-propanol ( $\log P 0,25$ ) avec une diminution du diamètre des gouttelettes. L'inverse est observé pour le benzaldéhyde ( $\log P 1,48$ ) qui est plus hydrophobe.

Au niveau des surfactant de type protéine, Charles *et al* (Charles, *et al.*, 2000a) ont montré que l'hexanoate d'éthyle était significativement plus libéré d'une émulsion réalisée avec de l'alpha-lactalbumine (protéine avec une faible affinité pour les molécules odorantes) que d'une émulsion réalisée avec de la bêta-lactoglobuline. Ce phénomène peut s'expliquer par le fait que les molécules odorantes sont moins retenues par l'alpha-lactalbumine que par la bêta-lactoglobuline au moment de leur passage de la phase huile à la phase eau.

Au cours de la consommation, l'émulsion va subir différents changements, qui vont modifier ses propriétés de rétention des molécules odorantes. Par exemple la mise en bouche d'une émulsion huile dans eau entraîne la dilution par la salive de sa phase aqueuse (phase continue), impliquant une diminution de la concentration des molécules odorantes dans cette phase et induisant un déplacement des molécules odorantes de la phase huile vers la phase aqueuse pour atteindre un nouvel équilibre thermodynamique. La mastication va également entraîner une modification de la structure de l'émulsion en diminuant de taille des gouttelettes, entraînant une libération plus rapide de la pentan-2-one et une perception plus intense et persistante (Haring, 1992).

Lors de la consommation, l'aliment va également entrer en contact avec les constituants de la salive.

### 3. La salive

La salive est un liquide biologique complexe. La salive est sécrétée par les glandes salivaires et possède de nombreuses fonctions de protection et humidification. Sa composition et sa sécrétion peuvent varier entre les individus et pour un même individu selon son état physiologique. Certaines pathologies ou traitement médicamenteux peuvent aussi modifier sa composition et sa sécrétion (asialie, hypersialorrhée)(Proulx, *et al.*, 2005).

## II. Etat de l'art

### 3.1. La sécrétion de la salive

La salive est majoritairement produite par trois glandes salivaires : les parotides, les sublinguales et les sous-maxillaires (Pedersen, *et al.*, 2002). En plus de ces trois glandes majeures, il existe des glandes dites mineures, localisées dans les muqueuses orales de la langue, des joues, des lèvres et du palais. Parmi ces glandes mineures, les glandes de von Ebner sont les plus étudiées, puisqu'en raison de leur proximité avec les bourgeons du goût (Figure II.5), elles peuvent influencer la perception des saveurs (Kock, *et al.*, 1992; Spielman, 1990; Spielman, *et al.*, 1993).

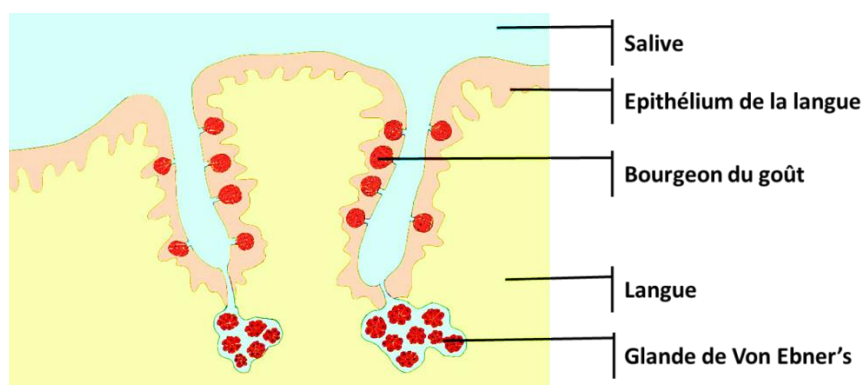


Figure II.5 : Représentation des glandes de Von Ebner's de la langue.

Les glandes salivaires sont innervées par les noyaux salivaires inférieurs et supérieurs. Le contrôle de la sécrétion de salive est assuré par voie réflexe. Cette sécrétion peut être modifiée notamment par stimulation gustative (acide citrique), tactile (aliment mis en bouche), ou odorante (molécules odorantes). Le stimulus odorant stimule plus spécifiquement la sécrétion des glandes sous-maxillaires. La simple présence d'un aliment en bouche est un puissant stimulus à la fois mécanique et chimique de l'activité salivaire (Mackie, *et al.*, 1990). Le Tableau II.5 présente la proportion de salive sécrétée par les différentes glandes salivaires en fonction de l'état physiologique de l'individu.

Tableau II.5 : Proportion de salive secrété en fonction de la glande salivaire et de l'état physiologique (Aps, *et al.*, 2005a)

Glande	Sommeil	Repos	Stimulation mécanique	Stimulation par acide citrique
Parotide	0 %	21 %	58 %	45 %
Sous-maxillaire	72 %	70 %	33 %	45 %
Sublinguale	14 %	2 %	2 %	2 %
Glandes mineurs	14 %	7 %	7 %	8 %

Le Tableau II.5 indique que les glandes parotides produisent 21% du volume de salive au repos, et jusqu'à 58% lors d'une stimulation mécanique. Les glandes sous maxillaires sécrètent 70% du volume total

## II. Etat de l'art

de salive en bouche au repos. Les glandes sublinguales ne sécrètent qu'une petite proportion de salive au cours de la journée (2%), même durant les phases de stimulation. Leur sécrétion est plus importante durant la phase de sommeil (14%). La sécrétion des glandes mineures ne représente pas plus de 14% du volume salivaire total et leur sécrétion ne semble pas être influencée par la stimulation mécanique et très peu par la stimulation à l'acide citrique. Chaque glande salivaire sécrète une salive de composition particulière, donc selon le stimulus, la composition de la salive totale sera différente.

L'homme produit en moyenne 750 ml de salive quotidiennement, mais ce volume reste très variable, étant donné que le flux salivaire peut être différent selon l'individu et peut être modulé par l'état physiologique de ce dernier (activité sportive, sommeil, maladies, infections) et les stimuli de son environnement (odeurs, vision, mastication, saveurs). Il a notamment été montré que le flux salivaire d'un individu peut varier en fonction de son degré d'hydratation (Ship, *et al.*, 1997), son état de stimulation (Mackie, *et al.*, 1990), son état de santé et de médication (Wu, *et al.*, 1993), ses habitudes (cigarette(Bergdahl, 2000), alcool (Enberg, *et al.*, 2001)...etc), son âge (Percival, *et al.*, 1994).

Le Tableau II.6 présente des valeurs de flux salivaires en état de repos et stimulé qui ont été obtenues dans différentes études.

**Tableau II.6: Valeur des flux salivaires au repos et au cours d'une stimulation**

Flux au repos	Flux stimulé	Stimulation	Nombre de Sujets	Références
0,72 ± 0,28 ml/min	4,35 ± 1,92 ml/min	52 mmol/l d'acide citrique	32	a
	7,07 ± 2,16 ml/min	260 mmol/l d'acide citrique		
	3,15 ± 1,48 ml/min	58 g de riz		
	4,76 ± 1,53 ml/min	85 d de pomme		
0,45 ± 0,25 ml/min	1,25 ± 0,67 ml/min	Mastication de parafilm	266	b
0,64 ± 0,40 ml/min	1,84 ± 0,69 ml/min	Mastication de parafilm le matin (5 min)	13	c
0,1 - 1,2 ml/min	0,7 – 5,3 ml/min	Mastication de parafilm (1min)	68	d
0,57 ± 0,18 ml/min	1,76 ± 0,49 ml/min	Mastication de parafilm (4min)	5	e

(a) (Watanabe, *et al.*, 1988)

(b) (Engelen, *et al.*, 2003b)

(c) (Neyraud, *et al.*, 2012a)

(d) (Repoux, *et al.*, 2012d)

(e) (Drago, *et al.*, 2011)

Le Tableau II.6 indique des variations entre les résultats selon les études pour les flux salivaires mesurés au repos ou après stimulation mécanique par mastication de morceau de parafilm, ce qui met en avant les

## II. Etat de l'art

différences interindividuelles étant donné que les panels de chacune des études ne sont pas constitués des mêmes sujets. Le flux salivaire dépend de l'individu.

Le Tableau II.6 montre aussi qu'une stimulation mécanique par mastication d'un morceau de parafilm, induit un flux salivaire plus élevé que celui du repos (environ trois fois plus élevé). La stimulation mécanique par mastication d'un aliment comme le riz ou la pomme (Tableau II.6) entraîne une augmentation du flux salivaire plus importante que la mastication d'un morceau de parafilm, par rapport au flux de repos (plus de quatre fois plus élevé pour le riz et sept fois plus pour la pomme).

La stimulation par un pH acide induit également une forte augmentation du flux salivaire (Engelen, *et al.*, 2003b). Watanabe *et al* (Watanabe, *et al.*, 1988) ont notamment montré que ce flux salivaire pouvait passer d'une valeur moyenne au repos de 0,72 ml/min à une valeur de 4,35 ml/min après stimulation à l'acide citrique et que cette hausse augmente avec la concentration en acide citrique. Les autres composés de la saveur ont aussi un effet significatif sur le flux salivaire, mais moins important que l'acide citrique (Neyraud, *et al.*, 2009b).

L'intensité et l'origine de la sécrétion de la salive dépendent de l'individu et de son état physiologique. De plus, chaque glande salivaire a une composition spécifique qui sera plus ou moins affectée par les différents types de stimulation.

### 3.2. La composition de la salive

La salive est globalement composée de 99% d'eau, de protéines et de substances inorganiques comme des électrolytes (sodium, potassium, calcium...) ou des bicarbonates qui ont un pouvoir tampon (Dawes, 1972a). Le Tableau II.7 recense une partie des constituants de la salive au repos.

Table II.7 : Concentration d'une partie des composés de la salive au repos (\*cité par Feron dans Structure des aliments et effets nutritionnels, chapitre 2 : rôle de la sphère orale).

Composés	Concentration	Référence	Origine
<b>Electrolytes</b>			
Na <sup>+</sup>	140 - 275 µg/ml*	(Delwiche, <i>et al.</i> , 1996)	
	140 ± 20.34 µg/ml*	(Dawes, 1972b)	
	5 mmol/l	(Aps, <i>et al.</i> , 2005a)	
Ca <sup>2+</sup>	34 ± 18 µg/ml*	(Larsen, <i>et al.</i> , 2003)	
	44 ± 8 µg/ml*	(Larsen & Pearce, 2003)	
	22,6 - 1800 µg/ml*	(Spielman, 1990)	
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	5 mmol/l	(Aps, <i>et al.</i> , 2005a)	Parotide (Taylor, <i>et al.</i> , 2004)
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	6 mmol/l	(Aps, <i>et al.</i> , 2005a)	
<b>Protéines</b>			
Protéines	1,09 ± 0,1 mg/ml*	(Repoux, <i>et al.</i> , 2012d)	Parotide



## II. Etat de l'art

	2,25 ± 1,2 mg/ml*	(Neyraud, <i>et al.</i> , 2012a)	Sous-maxillaire Sublinguale
	1,76 ± 0,58 mg/ml*	(Drago, <i>et al.</i> , 2011)	
	3 mg/ml	(Aps, <i>et al.</i> , 2005a)	
<b>Amylase</b>	16 - 419 U/ml*	(Voho, <i>et al.</i> , 2006)	Parotide Sous-maxillaire Sublinguale
	11 - 81 U/ml*	(Neyraud, <i>et al.</i> , 2012a)	
	38 - 1325 U/ml*	(Ferry, <i>et al.</i> , 2006b)	
	163 ± 77 U/ml*	(Enberg, <i>et al.</i> , 2001)	
	380 - 500 µg/ml	(Aguirre, <i>et al.</i> , 1987)	
<b>Mucine</b>	366±166 µg/ml (tot)* 233±146 µg/ml (MG1)* 133±116 µg/ml (MG2)*	(Rayment, <i>et al.</i> , 2000)	Sous-maxillaire Sublinguale (pour Mucine 7)
	80 - 500 µg/ml (MG1)	(Oppenheim, <i>et al.</i> , 2007)	
	10 - 200 µg/ml (MG2)	(Aguirre, <i>et al.</i> , 1993)	
<b>Lipocaline</b>	1,02±0,75 eq en LCN1/ml*	(Neyraud, <i>et al.</i> , 2012a)	Glandes de Von Ebner (van't Hof, <i>et al.</i> , 1997)
	134,4 ± 84,4 ng/ml*	(Poette, <i>et al.</i> , 2014)	
<b>Immunoglobuline</b>	0,4-14,4 µg/ml	(Cole, <i>et al.</i> , 1978)	Parotide Sous-maxillaire Sublinguale
<b>PRP</b>	0,7 à 2,45 mg/ml (valeur pour la salive de la parotide)	(Bennick, 1982b) (Schenkels, <i>et al.</i> , 1995a)	Parotide
<b>Lactoferrine</b>	194 µg/ml	(Mandel, 1980)	Glandes mineures
<b>Lactotransferrine</b>			
<b>Peroxydase</b>	12 mU/ml*	(Lee, <i>et al.</i> , 2007)	
	5,04 ± 3,05 µg/ml*	(Rudney, 1989)	
	50 - 160 mU/ml*	(Gorelik, <i>et al.</i> , 2007)	
	283,9 ± 20 mU/ml*	(Nagler, <i>et al.</i> , 2002)	
	260 ± 110 mU/ml (valeur estimée)*	(Kanehira, <i>et al.</i> , 2006)	
<b>Anhydrase carbonique</b>			Parotide Sous-maxillaire Sublinguale
<b>Enzyme d'oxydation des lipides</b>	165 ± 260 ng/ml (valeur estimée)*	(Kanehira, <i>et al.</i> , 2006)	
	790 ± 110 mU/ml*	(Nagler, <i>et al.</i> , 2002)	
<b>Lipase</b>	0 - 12 mU/ml*	(Stewart, <i>et al.</i> , 2010)	Von'Ebner (glandes mineures de la langue) (Taylor, <i>et al.</i> , 2004)
	0 - 335 mu/ml*	(Neyraud, <i>et al.</i> , 2012a)	
	37- 874 mU/ml*	(Voho, <i>et al.</i> , 2006)	
	0 - 28 mU/ml*	(Chauncey, <i>et al.</i> , 1954)	
<b>Estérase</b>	0 - 78 mU/ml*	(Chauncey, <i>et al.</i> , 1954)	
<b>Lysozyme</b>	173-1600 U/ml*	(Neyraud, <i>et al.</i> , 2012a)	
	0-649 U/ml*	(Chauncey, <i>et al.</i> , 1954)	
	268±67 U/ml*	(Drago, <i>et al.</i> , 2011)	
	1603±797 U/ml*	(Lee, <i>et al.</i> , 2007)	
	3,94±5.35 mg/l*	(Rudney, 1989)	
<b>Albumine</b>	29-238 µg/ml	(Mandel, 1980)	
<b>Calgranuline</b>			Glandes mineures
<b>Prolactine</b>			Sous-maxillaire Sublinguale
<b>Lacto-peroxydase</b>			Parotide
<b>Enzymes protéolytiques</b>	210±80 mU/ml*	(Drago, <i>et al.</i> , 2011)	Flore buccale
	0,8±0,1 mU/ml*	(Helmerhorst, 2007)	
	29-290 mU/ml*	(Neyraud, <i>et al.</i> , 2012a)	
<b>Peptides</b>			
<b>Peptides</b>	1-70 nmol/l (estimée)*	(Perinpanayagam, <i>et al.</i> , 1995)	Sous-maxillaire Sublinguale
<b>Cystatine</b>	240-280 µg/ml	(Aguirre, <i>et al.</i> , 1992)	Sous-maxillaire

## II. Etat de l'art

			Sublinguale
<b>Histatines</b>	2-30 µg/ml	(MacKay, <i>et al.</i> , 1984)	Sous-maxillaire Sublinguale
<b>Statherines</b>	2-12 µg/ml	(Hay, <i>et al.</i> , 1984)	
<b>Lipides</b>			
<b>Acides gras liés aux protéines</b>	13,6 µg/ml (tot)	(Larsson, <i>et al.</i> , 1996)	Production par les enzymes salivaires
	5,3±2,1 µg/ml (tot)	(Feron, <i>et al.</i> , 2013)	
	2,9 µg/ml (tri-glycérides)	(Larsson, <i>et al.</i> , 1996)	
	2,6 µg/ml (di-glycérides)	(Larsson, <i>et al.</i> , 1996)	
	1 µg/ml (mono-glycérides)	(Larsson, <i>et al.</i> , 1996)	
	1 µg/ml (acides gras libres)	(Larsson, <i>et al.</i> , 1996)	
<b>Acides</b>			
<b>Acide urique</b>	2,52-9,24 µg/ml	(Gorelik, <i>et al.</i> , 2007)	
	50,7±24µg/ml	(Neyraud, <i>et al.</i> , 2012a)	
	28,7±5 µg/ml	(Nagler, <i>et al.</i> , 2002)	
	51,7±13 µg/ml	(Liskmann, <i>et al.</i> , 2007)	

Le Tableau II.7 met en évidence la complexité de la composition salivaire, notamment au niveau de la composition en protéines. Les deux protéines les plus abondantes de la salive sont l'amylase et les mucines. Il existe de nombreuses mucines qui se différencient par leur structure. Dans la salive les mucines majoritairement rencontrées sont la mucine MUC5B, de haut poids moléculaire, et la mucine MUC7 de plus faible poids moléculaire (Payment, *et al.*, 2000).

La diversité de la composition de la salive lui confère de nombreuses propriétés, qui sont abordées dans la partie suivante. Ses différents composés sont sécrétés par les différentes glandes salivaires (Huq, *et al.*, 2007; Walz, *et al.*, 2006). Par exemple, les parotides sécrètent une salive dépourvue de mucines, mais riche en amylase, en protéines riches en prolines (PRP) et en ions bicarbonates, contrairement aux glandes sublinguales et mineures qui sécrètent l'essentiel des mucines (Huq, *et al.*, 2007). Les glandes sous-maxillaires sécrètent une salive de composition intermédiaire. Pour les glandes mineures, les glandes de von Ebner sécrètent en particulier la lipocaline salivaire (LCN1) également appelée protéine des glandes de von Ebner (VEG-P).

Finalement, en comparant les observations du Tableau II.7 et du Tableau II.5 de la partie précédente, nous pouvons dire que l'état physiologique de l'individu modifie les proportions de salive sécrétée par chaque glande salivaire et comme celles-ci sécrètent des salives de composition spécifique, la composition finale de la salive globale fluctue donc en fonction de l'état physiologique de l'individu. Par exemple, dans le cas d'une stimulation par l'acide citrique, les parotides vont passer d'une sécrétion de salive de 21% au repos, à 45%. La salive globale ainsi sécrétée par cette stimulation aura une concentration plus faible en mucines et plus élevée en PRP.

## II. Etat de l'art

### 3.3. Les variations de volume salivaire en bouche et les propriétés de la salive

La salive a de nombreuses fonctions, de protection, lubrification des muqueuses, protection de l'émail des dents, ainsi qu'un pouvoir antibactérien. La fonction majeure de la salive est l'humidification et la lubrification des aliments pour former un bol alimentaire qui sera dégluti facilement. La viscosité de la salive lui permet d'adhérer aux parois orales, formant alors un film protecteur des muqueuses orales. L'épaisseur de ce film salivaire est de l'ordre de la dizaine de micromètres (Tableau II.8).

Tableau II.8 : Volumes de salive en bouche avant, après déglutition et épaisseur du film salivaire (H : homme, et F : femme)

Avant déglutition	Après déglutition	Volume dégluti	Epaisseur du film salivaire	Références
1,07 ml (calculé par addition)	0,77 ml	0,30 ml		a
1,19 ml (H) 0,96 ml (F)	0,87 ml (H, déglutition normale) 0,66 ml (F, déglutition normale) 0,82 ml (H déglutition forcée) 0,60 ml (F déglutition forcée)	0,32 ml (H, déglutition normale) 0,30 ml (F, déglutition normale) 0,37 ml (H déglutition forcée) 0,36 ml (F déglutition forcée) (calculé par soustraction)		b
1,07 ml	0,77 ml	0,30 ml	70 à 100 µm	c
1,1 ml	0,8 ml	0,30 ml		d
			5 à 15 µm	e

(a) (Rudney, et al., 1995)

(b) (Lagerlof, et al., 1984)

(c) (Collins, et al., 1987)

(d) (Dawes, 2008)

(e) (de Loubens, et al., 2011)

Le volume de salive en bouche peut varier entre 1,19 ml et 0,6 ml, respectivement avant et après déglutition (Tableau II.8). Le Tableau II.8 montre que le volume de salive déglutie est de l'ordre de 0,3 ml pour une déglutition standard et que ce volume est plus important pour une déglutition forcée. Nous pouvons aussi remarquer que les hommes déglutissent des volumes plus importants que les femmes, que ce soit pour une déglutition forcée ou standard. Ce volume correspond au volume de salive libre en bouche qui peut être utilisé pour humidifier un aliment et former un bol alimentaire facile à déglutir.

## II. Etat de l'art

---

La salive joue notamment un rôle fondamental dans la perception des molécules de la saveur, puisque ces dernières diffusent de l'aliment vers la salive, pour être perçues au niveau des bourgeons du goût (Figure II.5).

La salive joue aussi un rôle de protection des muqueuses et des dents par contrôle du pH buccal principalement dû à ses composés inorganiques. En effet, lors de la consommation d'un aliment acide, ou lors de la production d'acide par les bactéries anaérobies de la plaque dentaire, le stimulus acide stimule la sécrétion de salive de la parotide (Tableau II.5), celle-ci étant riche en ions bicarbonate. La concentration de la salive totale en ces ions va alors tamponner le pH de celle-ci permettant d'éviter que le pH buccal descende en dessous de la valeur 3,5 qui est la limite où commence la déminéralisation de l'émail des dents (Mizrahi, 1982).

Les protéines salivaires, quant à elles, sont très diversifiées et ont des rôles bien particuliers dans des domaines variés comme la 'prédigestion', le transport, la protection, ou encore la lubrification des muqueuses orales.

Par exemple les mucines salivaires sont des glycoprotéines qui ont un rôle de lubrification et de protection des muqueuses de la cavité orale contre la déshydratation et les infections (Amerongen, *et al.*, 2002a). Les mucines ont aussi un rôle dans la lubrification et la cohésion du bol alimentaire pour faciliter sa déglutition. Ces protéines peuvent modifier la perception de la texture des aliments, notamment dans le cas des émulsions (Vingerhoeds, *et al.*, 2005).

Une présentation plus détaillée des rôles des constituants de la salive est présentée dans le Tableau en Annexe n°1.

### **3.4. Les interactions entre les composés de la salive et les composés de la flaveur : impact sur la perception.**

Au moment de la consommation d'un aliment, la salive est le premier élément en contact avec ce dernier. La salive est de ce fait un intermédiaire entre l'aliment et les muqueuses orales où se situent les récepteurs gustatifs et trigéminaux, ainsi qu'entre l'aliment et la phase gazeuse orale. Matsuo *et al* (Matsuo, 2000) ont mis en évidence l'importance de la salive dans le transport de molécules sapides (HCl, NaCl, KCl, KHCO<sub>3</sub>...) de l'aliment vers les récepteurs gustatifs.

## II. Etat de l'art

---

### 3.4.1. La perception des lipides

Ce n'est que depuis peu que les lipides (acides gras libres) sont considérés comme faisant partie des molécules de la saveur. Chalé-Rush *et al* (Chalé-Rush, *et al.*, 2007) font partie des premiers auteurs à avoir mis en évidence que les acides gras libres sont détectés pas les récepteurs gustatifs des bourgeons du goût. Gilbertson *et al* (Gilbertson, 1998) ont ainsi proposé que la lipocaline salivaire LCN1 intervienne dans la solubilisation et le transport des acides gras libres dans la salive vers les récepteurs aux acides gras.

Si à ce jour aucune étude n'a permis d'identifier avec certitude la présence d'une lipase linguale, des corrélations positives ont été mises en évidence entre l'activité lipolytique de la salive et le seuil de perception de l'acide oléique (Neyraud, *et al.*, 2012c; Poette, *et al.*, 2014). Pepino *et al* (Pepino, *et al.*, 2012) ont par ailleurs mis indirectement en évidence une augmentation du seuil de détection de la trioléine par consommation d'inhibiteurs des enzymes de type lipase.

L'étude de groupes d'individus hypo et hypersensible à la perception du 'gras', menée par Mounayar *et al* (Mounayar, *et al.*, 2013b), a mis en évidence qu'aucune différence significative de la composition salivaire entre ces deux groupes n'était observée au repos. En revanche après une stimulation par l'acide oléique, une nouvelle analyse de la composition des salives a montré une différence significative entre les deux groupes. Les individus hypersensibles (seuil de perception plus faible) ont des activités lipolytiques et antioxydante plus élevées que les individus hyposensibles. De plus, Neyraud *et al* (Neyraud, *et al.*, 2012c) ont observé que quel que soit l'état physiologique de l'individu (au repos ou stimulé par la mastication), l'intensité de la perception du 'gras' est plus importante chez les individus ayant des activités lipolytique, antioxydante et protéolytique élevées. Ils ont également observé que les individus ayant des concentrations en lipocaline et des flux salivaires élevés avaient un seuil de perception du 'gras' plus élevé.

### 3.4.2. La perception de l'amertume

La perception de l'amertume est très variable d'un individu à l'autre, ce qui peut soulever la question du mécanisme lié à cette perception. Bien que de nombreuses recherches aient étudié la perception de l'amertume et mis en évidence la présence de récepteurs spécifiques à cette sensation (Duffy, *et al.*, 2004; Zhang, *et al.*, 2003) l'impact de la salive sur la perception de l'amertume reste à ce jour peu étudié. Shatzman *et al* (Shatzman, *et al.*, 1981) font partie des premiers auteurs à étudier l'importance de la salive dans la perception de l'amertume, par l'étude du rôle des gustines salivaires sur la perception des saveurs.

L'étude de groupes d'individus hypo et hypersensible à l'amertume de la caféine réalisé par Dsamou *et al* (Dsamou, *et al.*, 2012) montre que les sujets hypersensibles ont des concentrations en amylases, immunoglobulines et sérum albumine plus élevées que les sujets hyposensibles. Et à l'inverse les sujets

## II. Etat de l'art

---

hyposensibles ont des concentrations en cystéines et inhibiteur de protéase plus élevé que les sujets hypersensibles.

### 3.4.3. La perception de l'astringence

Les tanins présents dans les produits alimentaires d'origine végétale sont à l'origine de la sensation d'astringence. Des études réalisées chez le rat ont montré que l'introduction d'aliments riche en tanins entraîne une augmentation de la concentration salivaire en PRP (Mehansho, *et al.*, 1983). Jansman *et al* (Jansman, *et al.*, 1994) ont aussi mis en évidence chez le rat qu'un régime enrichi en tanin induisait une augmentation du poids des parotides à l'origine de la sécrétion des PRP. Ainsi, chez les mammifères, le taux de sécrétion des PRP semble lié à la richesse en tanin du régime alimentaire (McArthur, 1995).

Ainsi, il a été proposé que les PRP seraient impliquées dans la sensation d'astringence, suite à leur précipitation par les tanins. La précipitation des agrégats 'PRP-tanins' entraînerait une perte de la capacité de lubrification des PRP ou/et la perception des objets précipités au niveau de la muqueuse orale. Il a été montré que les PRP étaient capables de fixer plusieurs tanins en même temps (Canon, *et al.*, 2013b), via des liaisons hydrogènes (Canon, *et al.*, 2010). L'augmentation de la concentration en tanins conduit à la formation d'agrégats 'PRP-tanins' solubles, qui finissent par précipiter. Il a été déterminé que le seuil d'agrégation correspondait à un nombre moyen de trois tanins par protéine. La diminution de la capacité de lubrification entraînerait une augmentation des frottements entre la langue, les dents et les parois buccales, donnant une sensation de sécheresse et de rugosité au niveau des tissus buccaux (Lu, *et al.*, 1998).

### 3.4.4. La perception des molécules odorantes

Les effets de la salive sur la perception des molécules odorantes n'ont à ce jour pas encore été clairement définis. Les seules études sur l'effet de la salive sur la libération des molécules odorantes ont été réalisées par différentes approches *in vitro*. Ce sont principalement les effets des protéines salivaires sur les molécules odorantes qui ont été étudiées. Van Ruth *et al* (van Ruth, *et al.*, 2001a) et Friel *et al* (Friel, *et al.*, 2001) ont notamment suggéré la présence d'interactions entre les protéines salivaires, comme les mucines, avec les molécules odorantes. Buettner *et al* (Buettner, 2002b) ont aussi montré que les protéines salivaires peuvent agir d'une autre façon sur les molécules odorantes, en les dégradant par réaction enzymatique. De cette façon cette dégradation enzymatique peut entraîner la formation de produits odorants ou non odorants, de qualités et intensités odorantes différentes, modifiant ainsi l'arôme de départ de l'aliment consommé.

## II. Etat de l'art

Dans cette étude, nous nous intéressons plus particulièrement aux mucines, à l'alpha-amylase salivaires qui sont deux protéines majeures de la salive (Tableau II.7), ainsi qu'aux estérases en raison de leur pouvoir de dégradation des esters qui représentent une grande partie des molécules odorantes.

### 3.4.4.1. Les mucines salivaires

Les mucines représentent 16% de la quantité totale des protéines salivaires (Payment, *et al.*, 2000). Il existe environ 19 types de mucines différentes dans la salive, seules trois ont été totalement séquencées (MUC1, MUC2, MUC5B). Ces mucines sont des glycoprotéines extracellulaires, d'un poids moléculaire variant entre 0,5 et 20 MDa.

Les mucines salivaires sont fortement glycosylées (80% de leur masse), ce qui leur confère leur propriété de lubrifiant (Bansil, *et al.*, 2006b). Ces glycosylations sont principalement des N-acétylgalactosamines, N-acétylglucosamines, fucoses, galactoses ou mannoses. Elles sont implantées parallèlement entre-elles et perpendiculairement à la chaîne d'acides aminés formant une structure en écouvillon. La liaison des glycosylations au niveau de la chaîne peptidique se fait via des liaisons O-glucosidiques (et quelques N-glucosidiques) au niveau des terminaisons hydroxyles des bases aminées sérines, thréonines et proline (ces trois acides aminés représentant 60% des acides aminés totaux). D'autres plus petites glycosylations sont implantées dans des régions riches en cystéines. La Figure II.6 donne une idée globale de la structure primaire des mucines (Wu, *et al.*, 1994).

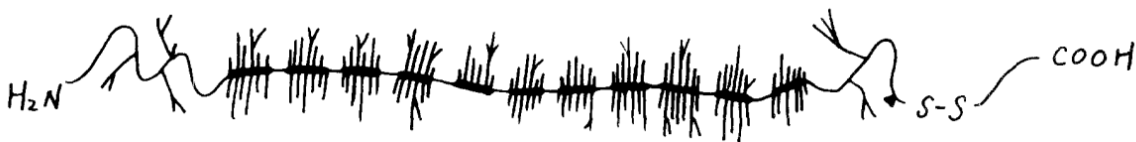


Figure II.6: Structure primaire simplifiée d'une mucine salivaire humaine, adapté de Wu *et al* (Wu, *et al.*, 1994).

Bansil *et al* (Bansil, *et al.*, 2006b) ont analysé la structure secondaire des protéines MUC1 par 'light scattering' et RMN et ont montré la présence de petites hélices alpha et de quelques feuillets bêta répartis aléatoirement dans la chaîne d'acides aminés. La structure tertiaire des mucines est très dépendante du pH et de la force ionique du milieu où elles se trouvent, par exemple à pH acide, les mucines sont sous forme 'dépliée'. En effet, la chaîne d'acides aminés des mucines possède différentes régions hydrophiles et hydrophobes assez flexibles qui leur permettent de changer de structure tertiaire avec les conditions de l'environnement, mais aussi de s'associer à d'autres composés (adhésion aux muqueuses, molécules hydrophobe, ou autres protéines) par des liaisons hydrogènes ou effets hydrophobes (Figure II.7). Au

## II. Etat de l'art

---

niveau de la structure quaternaire, Bansil *et al* (Bansil, *et al.*, 2006b) ont observé que ces mucines étaient capables de s'associer et de former de gros polymères ramifiés.

Gururaja *et al* (Gururaja, *et al.*, 1998) proposent une description de la structure de la mucine salivaire humaine MUC7. Cette mucine présente 5 domaines différents. Un premier domaine riche en histatines, un deuxième riche en sérine et thréonine modérément glycosilé, un troisième avec des répétition d'acides aminés en tandem fortement glycosilé, puis un quatrième peu glycosilé et finalement une domaine en structure hélicoïdale riche en leucines (Gururaja, *et al.*, 1998).

Les mucines pourraient agir de deux façons sur la libération des molécules odorantes. Elles pourraient interagir directement par interactions faibles avec les molécules odorantes, en particulier grâce à leurs domaines hydrophobes (Figure II.7), ou indirectement par augmentation de la viscosité du milieu. En effet, l'addition de mucines en solution à pH neutre augmente la viscosité du milieu (Veerman, *et al.*, 1989). Par une étude la libération de molécules odorantes de yaourts de différente viscosité, Saint-Eve *et al* (Saint-Eve, *et al.*, 2006) ont montré une diminution de la quantité de molécules odorantes libérées avec l'augmentation de la viscosité des yaourts. Néanmoins la viscosité de la salive humaine (0,017 Pa.s, (Hatton, *et al.*, 1987)) est bien inférieure à celle des yaourts (entre 18 et 160 Pa.s), aucune étude à ce jour n'a montré qu'une augmentation de viscosité de la salive puisse modifier la libération des molécules odorantes. La Figure II.7 schématise ces deux phénomènes (Bansil, *et al.*, 2006b).



## II. Etat de l'art

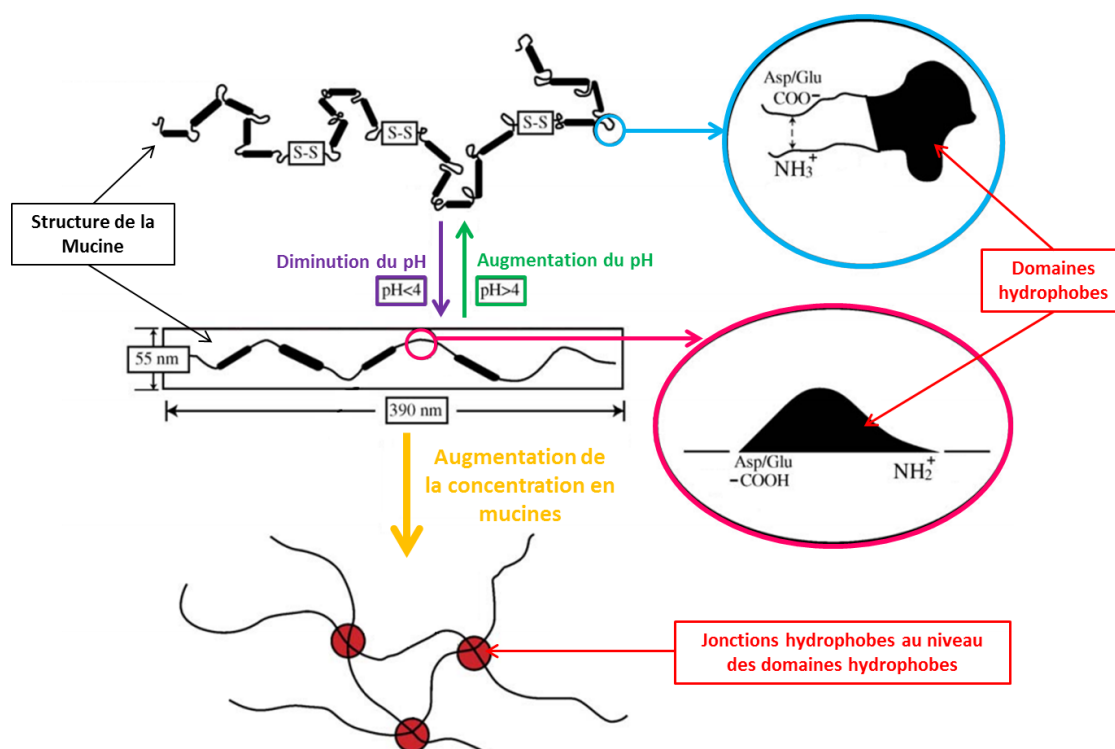


Figure II.7: Structures et associations des mucines salivaires en fonction du pH du milieu et de la concentration en mucines, adapté de Bansil *et al* (Bansil, *et al.*, 2006b).

L'association de mucines génère des zones hydrophobes et une augmentation de la viscosité pouvant influencer la libération des molécules odorantes hydrophobes.

Quelques auteurs, comme Friel *et al* (Friel, *et al.*, 2001) et Van Ruth *et al* (van Ruth, *et al.*, 2001a) ont étudié l'effet des mucines sur les molécules odorantes. Ces derniers ont notamment mis en évidence par analyse de l'espace de tête en mode statique (static headspace) que les mucines interagissent différemment avec les molécules odorantes en fonction de leur classe chimique et leur hydrophobicité (Tableau II.9).

Tableau II.9 : Comparaison des résultats de libération des molécules odorantes de salives artificielles contenant des mucines pancréatiques porcines, issus des articles de Friel *et al* (Friel, *et al.*, 2001) et Van Ruth *et al* (van Ruth, *et al.*, 2001a). Diminution de libération ( $\searrow$ ) ; Augmentation de libération ( $\nearrow$ ) ; Pas d'effet sur la libération ( $\emptyset$ ) ; Effet variable selon l'ajout de solutés aux mucines ( $\neq$ ).

Références	Van Ruth, et al., 2001a			Friel, et al., 2001		
Effet des mucines sur la libération des molécules odorantes	$\nearrow$	$\searrow$	$\emptyset$	$\neq$	$\searrow$	$\emptyset$
Nombres de molécules odorantes concernées	2	9	9	4	4	6
Nombre de molécules odorantes total	20			14		

## II. Etat de l'art

---

Van Ruth *et al* (van Ruth, *et al.*, 2001a) et Friel *et al* (Friel, *et al.*, 2001) ont étudié l'impact de la présence de mucines dans des salives artificielles sur la libération de molécules odorantes. Friel *et al*, ont aussi étudié l'influence de différents solutés (sel et sucre) et du pH sur la viscosité des salives artificielles et la libération des molécules odorantes.

Van Ruth *et al*, ont observé que pour deux de leurs molécules odorantes sur les vingt, ils observaient une augmentation de la libération des de celles-ci en présence de mucines, pour neuf une diminution et pour neuf autres, aucun effet de la présence de mucines. En revanche aucune explication n'est proposée pour ces observations vis-à-vis de la classe chimique ou de l'hydrophobicité des molécules odorantes.

Friel *et al*, ont observé trois comportements différents de libération des molécules odorantes en présence de mucines et de solutés. Pour quatre de leurs molécules odorantes sur les quatorze, il est observé une diminution de la libération de celles-ci en présence de mucines, pour six autres pas d'effet et pour les quatre autres un effet variable de la présence de mucines en fonction de la présence ou non de sel ou sucre. Ces trois comportements différents n'ayant pas de lien avec la classe chimique des molécules odorantes.

### 3.4.4.2. L'alpha-amylase salivaire

L'alpha-amylase salivaire provient de la transcription du gène AMY1 et est sécrétée principalement par les parotides. Des études menées notamment par Perry *et al* (Perry, *et al.*, 2007a) ont mis en avant le fait que des populations à régime alimentaire riche en amidon possèdent plus de copie de gène de l'alpha-amylase salivaires (AMY1) que des populations à régime pauvre en amidon. Par conséquent ces différences peuvent être à l'origine de variations dans la dégradation et donc la perception de l'aliment (texture, flaveur).

L'alpha-amylase est une protéine globulaire, composée d'une simple chaîne de polypeptides de 496 acides aminés, majoritairement composée de glycine, asparagine et valine, d'une masse d'environ 56 kDa (Ramasubbu, *et al.*, 1996b). Ramasubbu *et al* (Ramasubbu, *et al.*, 1996b), ou encore Rangunath *et al* (Rangunath, *et al.*, 2008) ont mis en évidence le repliement de la chaîne d'acides aminés de l'alpha-amylase en trois grands domaines (Figure II.8).

## II. Etat de l'art

---

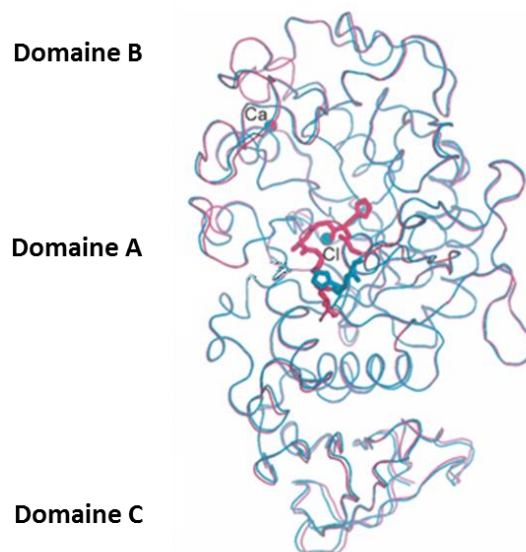


Figure II.8: Structure tertiaire de l'alpha-amylase salivaire humaine (Ramasubbu, *et al.*, 2003).

Cette structure de l'alpha-amylase reste stable pour des valeurs de pH comprises entre 4 et 8, pour des températures allant de 22 à 37°C (Rohleder, *et al.*, 2009).

Le domaine A de l'alpha-amylase est composé des acides aminés 1 à 99 et 170 à 404. Son domaine B correspond aux acides aminés 100 à 169 majoritairement organisés en hélices alpha (Ragunath, *et al.*, 2008). Ce domaine présente un site de fixation au calcium. Ce calcium joue par ailleurs un rôle important dans la formation du complexe entre l'alpha-amylase et son substrat (Ramasubbu, *et al.*, 1996b). Le domaine C est composé des acides aminés 405 à 496. Il possède deux résidus aromatiques tryptophanes qui peuvent potentiellement avoir un rôle de fixation de l'amidon et par extension dans l'activité enzymatique de l'alpha-amylase (Ragunath, Manuel, Venkataraman, Sait, Kasinathan, & Ramasubbu, 2008).

Ramasubbu *et al* (Ramasubbu, *et al.*, 1996b) ont observé que le domaine C de l'amylase possède une cavité en forme de 'Greek-key'. Quelques années plus tard Ragunath *et al* (Ragunath, Manuel, Venkataraman, Sait, Kasinathan, & Ramasubbu, 2008) précisent que ce site de fixation de l'amidon se trouve en réalité entre les domaines A et C de la protéine. L'interface des domaines A et C est notamment riche en résidus hydrophobes et stabilisée par des interactions de type pont salin, ce qui peut favoriser la fixation de ligands hydrophobes à cet endroit (Ramasubbu, *et al.*, 1996b). Kandra *et al* (Kandra, *et al.*, 2004) ont par ailleurs mis en évidence la fixation de l'amidon à cet interface, par des liaisons hydrogènes impliquant les groupements OH de l'amidon et trois acides aminés tryptophanes de la chaîne de peptidique de l'alpha-amylase (Trp59, Trp62 et Trp151). Ces mêmes auteurs ont aussi montré une inhibition des fonctions de l'alpha-amylase par la présence de tanins, ce qui suggère une fixation du tanin à la place de

## II. Etat de l'art

---

l'amidon et par la même occasion la possibilité de l'alpha-amylase d'interagir avec d'autres ligands que l'amidon.

L'alpha-amylase salivaire est aussi une enzyme qui a une action très spécifique. Elle a pour action principale de dégrader la liaison alpha 1-4 entre l'amylose et l'amylopectine de l'amidon des aliments au cours de leur consommation. Cette dégradation modifie alors la structure de l'aliment, entraînant souvent une diminution de viscosité de l'aliment, facilitant sa déglutition. Cette modification de structure est aussi à l'origine d'un phénomène appelé 'fat surfacing' par lequel la perte de structure du bol alimentaire permet une migration des gouttelettes lipidiques contenant les molécules odorantes à la surface du bol alimentaire, favorisant ainsi la libération des molécules odorantes (De Wijk, *et al.*, 2006).

L'alpha-amylase salivaire est donc connue pour son action directe sur l'amidon et par conséquent son action indirecte dans la modification de la diffusion des molécules odorantes dans des matrices alimentaires amyliées par changement de viscosité de celle-ci. Ferry *et al* (Ferry, *et al.*, 2004) ont aussi étudié cet effet indirect de l'alpha-amylase salivaire sur les molécules odorantes au travers l'étude de l'impact de cette protéine sur la viscosité de leurs matrices amidonnées et ont mis en évidence qu'une diminution de la viscosité de leurs matrices en présence d'alpha-amylase, entraîne une libération de molécules odorantes plus rapide en début de libération, mais ne parlent pas d'interaction moléculaire entre l'alpha-amylase et les molécules odorantes.

L'action directe de l'alpha-amylase sur la libération des molécules odorantes n'a pas encore été étudiée à ce jour. Van Ruth *et al* (van Ruth, *et al.*, 1995a) n'ont étudié l'alpha-amylase qu'en présence de mucines. N'ayant pas observé d'impact de l'addition d'alpha-amylase aux mucines, ils ont conclu que l'alpha-amylase n'avait pas d'influence sur la libération des molécules odorantes. Une étude de l'action directe sur la libération de molécules odorantes de l'alpha-amylase seule en solution et en présence de mucines, fait alors l'intérêt de cette étude, afin de s'affranchir de l'effet des mucines susceptibles d'interférer avec l'alpha-amylase.

### 3.4.4.3. Les estérases

Les estérases salivaires représentent une famille relativement hétérogène, de par leur structure, leur origine et leurs propriétés. Une partie des estérases salivaires peut notamment provenir des bactéries présentes dans la salive (Lindqvist, *et al.*, 1976). Ce sont généralement des hydrolases et leur propriété commune est de dégrader les fonctions esters et thiols.

## II. Etat de l'art

---

Parmi les estérases, l'anhydrase carbonique intervient dans l'hydratation réversible du dioxyde de carbone ( $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$ ) (Lindskog, 1997).

L'effet des estérases sur les molécules odorantes est encore peu étudié à ce jour. La dégradation des molécules odorantes peut être à l'origine de deux phénomènes : une perte d'arôme, lorsque les produits de la dégradation ne sont pas des molécules odorantes, ou l'apparition d'un nouvel arôme, lorsque les produits issus de cette dégradation sont des molécules odorantes. Dans ce dernier cas, les produits odorants peuvent avoir une intensité odorante inférieure ou supérieure à la molécule odorante de départ et une note aromatique totalement différente. Buettner *et al* (Buettner, 2002b) ont notamment mis en évidence une perte de molécules odorantes (thiols et esters) dans la cavité nasale après 1 min de contact avec la salive en bouche. En présence de salive humaine, il a aussi été observé une dégradation enzymatique des esters et thiols après 10 min de contact (Buettner, 2002b; Hussein, *et al.*, 1983). Ces mêmes auteurs précisent qu'après un traitement thermique de la salive humaine cette conversion enzymatique n'est plus observée. Buettner *et al* (Buettner, 2002b) ont aussi pu observer que les molécules odorantes rapidement dégradées sont perçues *in vivo* sur de courtes périodes, alors que les molécules odorantes peu dégradées peuvent rester absorbées dans le film salivaire de la cavité orale sans modification de leurs propriétés et être perçues sur une plus longue durée.

Malgré quelques études sur les interactions entre les protéines salivaires et les molécules odorantes, peu de données sur l'action directe des protéines sur la libération des molécules odorantes sont présentes dans la littérature à ce jour. Les mucines font partie des protéines salivaires les plus étudiées, puisqu'elles font partie des protéines les plus abondantes dans la salive. En revanche, l'action directe de l'alpha-amylase salivaire n'est pas clairement définie, bien que cette protéine soit aussi très abondante dans la salive. De même l'étude de l'impact des interactions entre les différentes protéines dans la salive sur la libération des molécules odorantes n'a que très peu été étudié à ce jour (van Ruth, Grossmann, Geary, & Delahunty, 2001) et ne permet pas d'avoir une idée précise des phénomènes se produisant lors de la consommation d'un aliment.

Nous venons de voir que les protéines salivaires peuvent interagir avec les molécules odorantes, modifiant de ce fait la perception de la saveur de ce dernier. La partie suivante présente alors différentes méthodes permettant de mettre en évidence ces interactions entre les molécules odorantes et les protéines salivaires.

## II. Etat de l'art

---

### 4. Les méthodes de mesure de la libération des molécules odorantes et de leur interaction avec les protéines

La libération des molécules odorantes de la matrice alimentaire lors de sa consommation dépend de nombreux facteurs, comme le type de molécules odorantes (propriété thermodynamiques et cinétiques), la nature de la matrice alimentaire (solide, liquide, émulsion, température), mais aussi des conditions physiologiques présentes dans les cavités buccales et nasales (volume buccal, volume nasal, quantité de salive, température).

L'étude de la libération des molécules odorantes peut être réalisée par approche *in vitro* dans des modèles plus ou moins complexes, en mode statique à l'équilibre thermodynamique dans des systèmes fermés ou en mode dynamique dans des systèmes ouverts.

La libération des molécules odorantes peut aussi être suivie en condition réelle de libération par des approches *in vivo*.

Après avoir présenté ces différentes techniques, nous présenterons quelques méthodes d'étude des interactions entre protéines et molécules odorantes.

#### 4.1. La mesure de la libération des molécules odorantes à l'équilibre thermodynamique

Dans un système fermé, une partie des molécules volatiles présentes dans l'échantillon est libérée progressivement dans la phase vapeur jusqu'à atteindre l'équilibre thermodynamique. Lorsque cet équilibre est atteint les concentrations relatives de chaque molécule dans les phases aqueuse et vapeur sont déterminées par le coefficient de partage qui dépend de la température et de la pression (Ettre, *et al.*, 1993; Nawar, 1971).

La concentration en molécules odorantes dans la phase vapeur peut être déterminée par l'analyse de la phase gazeuse présente au-dessus de l'échantillon par chromatographie en phase gazeuse (Andriot, *et al.*, 2000).

Le coefficient de partage peut être calculé à partir des concentrations massiques, des concentrations molaires ou des fractions molaires. La comparaison des valeurs des coefficients de partage obtenues dans différentes unités nécessite une conversion d'unité (Kopjar, *et al.*, 2010).

Afin de déterminer ce coefficient de partage, plusieurs méthodes peuvent être utilisées. Une de ces méthodes mise en place est celle de 'Phase Ratio Variation' (PRV) qui permet de s'affranchir de

## II. Etat de l'art

l'étalonnage et limite ainsi les sources d'erreur dans la détermination des coefficients de partage (Ettre, *et al.*, 1993). Bien qu'elle soit très utilisée et reste simple à mettre en œuvre, elle est peu sensible et détecte difficilement les composés de faible volatilité.

Une autre méthode, la calibration en phase liquide (LC-SH), nécessite la réalisation de courbes de calibration, mais donne de meilleurs résultats que la méthode PRV pour les molécules peu volatiles.

La comparaison des valeurs de coefficient de partage n'est pas toujours évidente, car ce paramètre est très dépendant des conditions expérimentales (concentration de la molécule odorante, composition de l'échantillon, pression, ou température), comme le montre le Tableau II.10.

**Tableau II.10 : Variation des coefficients de partage pour le milieu eau pure (K) selon la méthode utilisée et écarts-types (ET), lorsqu'ils sont donnés dans l'article (les abréviations de méthodes sont décrites dans la partie abréviations).**

Méthode	Température	Coefficient de partage (molécules/K/ET)	Référence
PRV	37°C	Butanoate d'éthyle $2,99.10^{-2}$ Pentanoate d'éthyle $3,90.10^{-2}$ Hexanoate d'éthyle $6,20.10^{-2}$ Heptanoate d'éthyle $1,47.10^{-1}$ Hexan-2-one $9,60.10^{-3}$ Heptan-2-one $1,41.10^{-2}$ Octan-2-one $2,39.10^{-2}$ Nonan-2-one $4,34.10^{-2}$	(Bylaite, <i>et al.</i> , 2004)
SHGC	37°C	Butanoate d'éthyle $2,50.10^{-2}$ Heptan-2-one $1,56.10^{-2}$ Octan-2-one $2,18.10^{-2}$	(Van Ruth, <i>et al.</i> , 2001b)
LC-SH	37°C	Butanoate d'éthyle $1,89.10^{-2}$ (pH 3) Heptan-2-one $9,38.10^{-3}$ (pH 3) Octan-2-one $1,24.10^{-2}$ (pH 3)	(van Ruth, <i>et al.</i> , 2002b)
		Butanoate d'éthyle $2,02.10^{-2}$ (pH 6) Heptan-2-one $9,08.10^{-3}$ (pH 6) Octan-2-one $1,25.10^{-2}$ (pH 6)	
		Butanoate d'éthyle $1,90.10^{-2}$ (pH 9) Heptan-2-one $9,33.10^{-3}$ (pH 6) Octan-2-one $1,25.10^{-2}$ (pH 6)	
SHGC	37°C	Butanoate d'éthyle $1,81.10^{-2}$ Heptan-2-one $1,01.10^{-2}$ Octan-2-one $1,36.10^{-2}$	(Van Ruth, <i>et al.</i> , 2002a)
DCCLC	20°C	Hexanoate d'éthyle $1,46.10^{+3}$ Heptan-2-one $2,88.10^{+2}$ Octan-2-one $5,50.10^{+2}$ Nonan-2-one $1,21.10^{+3}$	(Jouenne, <i>et al.</i> , 1997)

## II. Etat de l'art

<b>LC-SH</b>	37°C	Hexan-2-one $5,30.10^{-3}$ Heptan-2-one $6,20.10^{-3}$ Octan-2-one $7,30.10^{-3}$ Nonan-2-one $1,00.10^{-2}$	(Nawar, 1971)
<b>GC</b>	25°C	Heptan-2-one $5,90.10^{-3}/0,6$ Octan-2-one $7,70.10^{-3}/0,4$ Nonan-2-one $1,50.10^{-2}/0,8$	(Buttery, <i>et al.</i> , 1969a)
<b>PRV</b>	25°C	Hexanoate d'éthyle (seul) $3,62.10^{+1}/3,01$ Hexanoate d'éthyle (en mélange) $4,01.10^{+1}/1,85$	(Athès, <i>et al.</i> , 2004)
<b>VPC</b>		Hexanoate d'éthyle (seul) $3,59.10^{+1}/0,99$ Hexanoate d'éthyle (en mélange) $4,38.10^{+1}/5,89$	
<b>LC-SH</b>		Hexanoate d'éthyle (seul) $1,62.10^{+1}/0,39$ Hexanoate d'éthyle (en mélange) $1,52.10^{+1}/1,91$	

Par exemple nous pouvons observer une surestimation des résultats par les méthodes de chromatographie liquide dynamique couplée à une colonne (DCCLC) par rapport aux autres méthodes présentées dans le Tableau II.10. Nous pouvons aussi observer que même pour une même méthode et une même température, les valeurs de coefficient de partages peuvent varier. Par exemple la méthode d'analyse de l'espace de tête en mode statique par chromatographie gazeuse (SHGC) utilisée par Van Ruth *et al* donne des résultats supérieurs pour l'étude réalisée en 2001, que celle réalisée en 2002.

L'étude d'Athès *et al* donne des valeurs de coefficients de partage de l'hexanoate d'éthyle seul ou en mélange alors que les autres études présentées dans le Tableau II.10 n'ont pas étudié les molécules odorantes seules. Cette étude montre qu'en mélange la méthode la plus répétable pour analyser la libération des molécules odorantes serait la méthode PRV, alors qu'en analyse molécules par molécule, la méthode la plus répétable serait la LC-SH.

### 4.2. La mesure de la libération en mode dynamique

Pour mieux prendre en compte la cinétique de libération des molécules odorantes et se rapprocher des conditions réelles de libération des molécules odorantes au cours de la consommation d'un aliment, des méthodes dynamiques de l'analyse de l'espace de tête ont été mises en place dans les années 1990. Le principe de ces méthodes est de suivre l'évolution de la concentration en molécules odorantes dans l'espace de tête au-dessus de l'échantillon en présence d'un balayage gazeux.



## II. Etat de l'art

---

Les méthodes de mesure dynamiques peuvent être utilisées aussi bien en approche *in vitro* qu'en approche *in vivo*.

Les analyses dynamiques *in vitro* sont généralement utilisées pour mesurer l'évolution de la composition en molécules odorantes d'un espace de tête présent au-dessus d'un échantillon dans un système ouvert. En analyse dynamique, un flux de gaz traverse l'espace de tête du système, diluant ce dernier, l'équilibre thermodynamique entre l'échantillon et l'espace de tête n'est donc jamais atteint (Marin, *et al.*, 1999).

Afin d'analyser la composition de la phase gazeuse en molécules odorantes le plus près des récepteurs olfactifs, des techniques d'analyse de l'air expiré par les narines d'un sujet ont été développées. Une des premières méthodes mise en place consiste à établir un profil de libération par piégeage séquentiel des composés volatils de l'air expiré sur un piège contenant un adsorbant, mais ce procédé est relativement long (Ingham, *et al.*, 1995).

D'autres méthodes d'analyse plus rapides ont ensuite été développées. Les deux techniques les plus couramment utilisées aujourd'hui sont l'analyse par spectrométrie de masse en mode ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI-MS) et l'analyse par spectrométrie de masse à transfert de protons (PTR-MS). La méthode de mesure par APCI-MS a été mise en place par Benoit *et al* (Benoit, 1983) et optimisée par Taylor *et al* (Taylor, *et al.*, 2000). De leur côté, Lindinger *et al* (Lindinger, *et al.*, 1998) ont mis en place la méthode de mesure par PTR-MS. Ces deux types de méthodes ont ensuite été associés à des systèmes de prélèvement en temps réel de l'air expiré au niveau de la cavité nasale au cours de la consommation d'aliments.

Afin de mieux comprendre le lien entre la libération des molécules odorantes et la perception de l'odeur, les mesures obtenues par analyse *in vivo* dynamiques sont souvent associées en parallèle à des mesures sensorielles (Deleris, *et al.*, 2011). Différents paramètres physiologiques peuvent également être suivis en même temps (mastication, salivation, déglutition, respiration), afin d'évaluer leur impact sur la libération des molécules odorantes et leur perception (Repoux, *et al.*, 2012a)

Bien que les deux techniques APCI et PTR présentent beaucoup d'avantages pour la compréhension de la libération *in vivo* des molécules odorantes, il arrive que leur sensibilité ne soit pas assez élevée pour détecter des molécules odorantes en faible concentration. Seules les molécules odorantes avec un poids moléculaire et masse d'ion entre 42 et 200 Da, sont détectables, avec un seuil de détection de l'ordre du ppb, bien que certains composés peuvent être suivis jusqu'à 100 ppt. Le choix de l'analyseur et détecteur associés aux méthodes APCI et PTR est aussi très important au niveau de l'identification des molécules odorantes, puisque la composition en molécules odorantes des aliments est très complexe et comporte

## II. Etat de l'art

---

souvent des molécules odorantes différentes mais de masses molaires proches. Il est donc nécessaire que le complexe 'analyseur-détecteur' soit suffisamment performant. Ces techniques peuvent être améliorées en les couplant à un spectromètre de masse dans lequel les molécules odorantes sont fragmentées afin d'avoir plus d'information sur leur structure pour mieux les identifier. Cette technique offre un moyen sûr d'identifier des composés, sauf si ces composés possèdent des fragments identiques, comme dans le cas des terpènes.

Un avantage de ces méthodes, est de permettre l'analyse de la variabilité interindividuelle, due à des différences de comportements masticatoires et physiologies, créant de grandes différences au niveau des profils de libération. Néanmoins, dans des conditions standardisées, les profils de libération obtenus avec un même sujet sont relativement similaires (Haring, 1990; Ingham, *et al.*, 1995).

Certains chercheurs se sont focalisés sur la libération de molécules odorantes dans la bouche pour voir plus précisément l'effet de la mastication et de la salive sur cette libération. En effet, Buettner *et al* (Buettner, *et al.*, 2000) ont développé la technique du 'exhaled odorant measurement' (EXOM) pour mesurer la quantité de molécules odorantes exhalées après la consommation d'un aliment. Cette technique donne alors une information supplémentaire en permettant de connaître les molécules odorantes libérées en bouche, car cette composition peut être différente de celle retrouvée dans les fosses nasales en fonctions de la physiologie orale du sujet (volume oral, déglutition, épaisseur du film salivaire). Dans notre étude nous souhaitons connaître la composition de l'air dans la cavité nasale, cette méthode ne sera pas envisagée.

L'ensemble de ces méthodes d'analyse en mode dynamique permet de suivre la libération des molécules odorantes au cours du temps et d'approcher la quantité de molécule arrivant à proximité des récepteurs odorants. Ces méthodes permettent aussi de prendre en compte les variabilités interindividuelles, ce qui est l'objectif de notre étude.

### 4.3. L'étude des interactions entre protéines et molécules odorantes

Lorsque l'interaction protéine-molécule odorante est réversible, les méthodes de chromatographie liquide, d'affinité, d'exclusion, ou de dialyse à l'équilibre peuvent être utilisées. La chromatographie liquide dynamique couplée à une colonne (DCCLC) mise en place par May *et al* (May, *et al.*, 1978) a notamment été utilisée pour déterminer la constante d'affinité de l'ensemble bêta-lactoglobuline et molécules odorantes (Jouenne, *et al.*, 2000). La chromatographie par affinité permet de mettre en évidence l'affinité d'une protéine immobilisée sur un support pour des molécules odorantes en solution. Cependant en utilisant cette méthode, certains sites d'interaction des protéines avec les molécules odorantes peuvent être

## II. Etat de l'art

---

affectés par la fixation de la protéine sur le support comme il a été suggéré avec l'acétate d'isoamyle (Pelletier, *et al.*, 1998). La chromatographie par exclusion permet l'étude de liaisons réversibles entre des macromolécules et molécules odorantes (Pelletier, *et al.*, 1998). La technique de dialyse à l'équilibre est utilisée en phase liquide pour des interactions faibles entre molécules (Jasinski, *et al.*, 1985).

D'autres méthodes d'analyse des interactions protéine-molécules odorantes ont été mises en place, notamment par calorimétrie, spectrométrie, fluorescence, cristallographie et résonance magnétique nucléaire. La méthode par titration calorimétrique isotherme (ITC) mesure l'énergie nécessaire pour maintenir une température constante pour l'échantillon étudié en comparaison à une référence inerte. Le dichroïsme circulaire (CD) est une technique qui mesure les différences d'absorption de lumière polarisée à gauche versus lumière polarisée à droite dont l'origine est une asymétrie de la structure de la molécule observée. Le rôle de départ de cette méthode est d'analyser les changements de structure des protéines tel que des changements de conformation induits chez les protéines par la fixation d'un ligand, comme une molécule odorante (Clark, *et al.*, 1989; Zsila, 2003).

La méthode par fluorescence couplée à une technique d'analyse des changements de structure, comme celle du dichroïsme circulaire (CD) et de l'infrarouge (FT-IR), permet de mettre en évidence les liaisons entre molécules odorantes et protéines (Damodaran, *et al.*, 1980; Dufour, *et al.*, 1990). En revanche la méthode par fluorescence donne souvent une surestimation de la constante de liaison par rapport à d'autres techniques comme celle de dialyse à l'équilibre en milieu liquide (Muresan, *et al.*, 2001). La fluorescence correspond à l'absorption de lumière à une certaine longueur d'onde par une molécule, suivie d'une réémission de lumière à une longueur d'onde plus élevée. Le spectre de réémission est caractéristique de la structure de la molécule qui l'émet. Or les protéines contiennent 3 acides aminés aromatiques capables de contribuer à cette fluorescence (tryptophane, tyrosine et phenylalanine). Etant donné que la longueur d'onde réémise par l'acide aminé est différente selon que celui-ci soit lié ou non à un ligand, la longueur d'onde réémise par ces acides aminés donne une indication sur leur environnement proche, et donc sur la présence éventuelle d'un ligand, tel qu'une molécule odorante. Dans le cas de protéines présentant une cavité hydrophobe, des expériences de compétitions peuvent être menées en utilisant des sondes fluorescentes.

La technique par cristallographie par rayon X est une des techniques les plus utilisées pour déterminer la structure d'une protéine ou d'un complexe protéine-ligand (Hodgkin, 1950). Cette méthode ne peut pas être appliquée à toutes les protéines, car certaines d'entre elles, comme la caséine ne sont pas cristallisables (SWAISGOOD, 1993). Cette méthode consiste à envoyer des rayons X sur une structure cristallisée (protéines ou complexe protéine-ligand). Quand ces rayons X rencontrent la molécule ou complexe cristallisé, ils sont diffractés. Cette diffraction est spécifique de la molécule ou du complexe

## II. Etat de l'art

---

étudié et l'analyse du modèle de diffraction obtenu permet de déterminer la structure 3D de ces dernières (Adachi, *et al.*, 2001).

Comme la méthode par cristallographie aux rayons X, la technique par résonance magnétique nucléaire (RMN) est très utilisée en biologie pour déterminer la structure des protéines (Wuthrich 1994), ainsi que la liaison avec d'éventuels ligands. Cette technique est une alternative à celle par rayon X pour les molécules non cristallisables, bien qu'elle ne soit applicable qu'à des molécules de petite taille inférieure à 30 kD. La méthode par RMN permet aussi de déterminer la localisation des sites de fixation sur les protéines (Lübke, *et al.*, 2002).

### 5. Conclusion sur la synthèse bibliographique et techniques choisies

La synthèse bibliographique précédente met en évidence que la libération et la perception des molécules odorantes lors de la consommation d'un aliment, sont très dépendantes des propriétés de la molécule odorante et de ses interactions avec la matrice alimentaire dans laquelle elle se trouve. Cette synthèse montre aussi l'importance des caractéristiques physiologiques du consommateur sur la libération et la perception des molécules odorantes, notamment au niveau de la composition salivaire et de la sensibilité olfactive de ce dernier, entraînant de grandes variations interindividuelles.

La synthèse bibliographique permet aussi de présenter différentes techniques de mesure *in vitro* et *in vivo* de la libération et de la rétention des molécules odorantes de la matrice dans laquelle elles se trouvent.

Jusqu'à ce jour, peu d'informations sur l'impact de la composition salivaire sur la libération/rétention des molécules odorantes sont présentes dans la littérature. L'intérêt de ce projet de thèse est d'approfondir l'impact de la composition salivaire sur la libération des molécules odorantes et de mettre en évidence des interactions protéines salivaire-molécules odorantes, jusqu'alors non démontrées.

Notre approche est basée sur trois grandes hypothèses.

Notre première hypothèse est que la présence de protéines salivaires dans un milieu modifie la libération des molécules odorantes de ce milieu vers l'espace de tête.

Notre deuxième hypothèse est que des sujets ayant des compositions salivaires différentes ont des libérations de molécules odorantes par voie rétronasale différentes.

Notre troisième hypothèse est que les variations de la composition salivaire avec la condition physiologique du sujet modifient sa libération de molécules odorantes par voie rétronasale.

## II. Etat de l'art

---

Pour réaliser ce travail, des salives artificielles modèles et des collectes de salive humaine ont été réalisées.

Dans un premier temps, afin d'évaluer l'impact des mucines salivaires, de l'alpha-amylase salivaire et de la salive humaine sur la libération de molécules odorantes, une approche *in vitro* a été réalisée. Dans cette approche les milieux étudiés sont des salives artificielles modèles et des pools de salive humaine. L'analyse de cet impact est réalisée molécule odorante par molécule odorante, par l'analyse de l'espace de tête en mode statique. Nous avons choisi de déterminer les coefficients de partage vapeur/liquide à l'équilibre, en testant les techniques PRV et LC-SH, afin de choisir la méthode la plus appropriée à notre étude.

Dans un second temps, une analyse de la libération des molécules odorantes *in vivo* est réalisée afin d'évaluer l'impact de la composition salivaire des sujets dans différentes conditions physiologiques sur la libération rétronasale de ces molécules odorantes. Afin de caractériser cette libération, la quantité de molécules odorantes présentes dans l'air expiré des sujets est mesurée par APCI-MS.



# *Matériel et méthode*





## III. Matériel et méthode

### Partie 1 : L'approche *in vitro*

#### 1.1. Les molécules odorantes

Des travaux préliminaires effectués sur un ensemble de 70 molécules odorantes précédemment étudiées au sein de l'équipe (Merabtine, *et al.*, 2010; Tromelin, *et al.*, 2010b) ont permis de retenir une série de 10 molécules (Sigma Aldrich, St Quentin Fallavier, France), cinq cétones méthyliques linéaires et cinq esters d'éthyle linéaires dont les principales caractéristiques sont présentés dans le Tableau III.1. La pureté des molécules odorantes étudiées a été contrôlée par GC-FID, et est supérieure à 95% pour toutes les molécules.

Ces dix molécules sont choisies de façon à observer l'effet de la fonction chimique (cétones versus esters) et de l'augmentation de la chaîne carbonée, c'est-à-dire de l'hydrophobicité, sur leur libération de divers milieux aqueux.

Tableau III.1 : Caractérisation des dix molécules odorantes choisies pour l'approche *in vitro* (IR : indice linéaire de rétention sur colonne DB-WAX calculé, NbC : nombre de carbone de la chaîne aliphatique, Mw : masse molaire en g/mol, Sol : solubilité dans l'eau à 25°C en g/l). Les paramètres LogP et Sol sont calculés à l'aide du logiciel EPISuite® et les descripteurs aromatiques de chaque molécule odorante proviennent de Fenaroli's handbook of flavor ingredients. vol.II. 3 ème édition (Burdock, 1995) .

Molécule odorante	Classe	CAS	IR	NbC	Mw	LogP	Sol	Odeur
Propanoate d'éthyle	ESTER	105-37-3	976	5	102,13	1,21	19,20	éther, fruité, rhum, vineux
Butanoate d'éthyle		105-54-4	1044	6	116,16	1,85	4,90	éther, fruit mûre, cognac
Pentanoate d'éthyle		539-82-2	1160	7	130,18	2,34	0,93	Fruité (baies)
Hexanoate d'éthyle		123-66-0	1245	8	144,21	2,83	0,31	fruité, vin, cire
Heptanoate d'éthyle		106-30-9	1344	9	158,24	3,32	0,03	fruité, vin, cognac, huile
2-Propanone	CETONE	67-64-1	814	3	58,08	-0,16	219,90	Ether, pomme, poire
2-Hexanone		591-78-6	1082	6	100,16	1,38	17,50	éther
2-Heptanone		110-43-0	1192	7	114,19	1,73	2,15	fruité, fromage, épicé, crème
2-Octanone		111-13-7	1268	8	128,21	2,5	0,90	terre, herbacé, bois, fromage
2-Nonanone		821-55-6	1390	9	142,24	3,03	0,17	frais, doux, vert

Au sein d'une même classe chimique, plus la longueur de chaîne augmente, plus la molécule est hydrophobe et plus elle a un indice de rétention élevé, pour une même phase. En comparant la série des

### III. Matériel et méthode

esters et celle des cétones, pour un même nombre d'atome de carbone, l'hydrophobicité est plus forte et l'indice linéaire de rétention sur une colonne polaire (DB-Wax) est plus faible pour l'ester.

#### 1.2. Les milieux salivaires

##### 1.2.1. Les protéines salivaires

L'alpha-amylase et la mucine sont deux protéines majoritaires de la salive. Considérant leur abondance dans la salive, il est important de déterminer le rôle de ces protéines dans la libération des composés d'arôme. L'alpha-amylase issue de salive humaine (lyophilisat de salive humaine sans mucines, majoritairement composé d'alpha-amylase) et la mucine de glandes salivaires sous-maxillaire bovines (pureté donnée par Sigma Aldrich 100%) ont été fournies par Sigma Aldrich (Sigma Aldrich, St Quentin Fallavier, France).

##### 1.2.2. Le tampon salivaire

En vue de reproduire l'effet des protéines salivaires sur la libération des molécules odorantes qui se produit en bouche, la mise en place d'un milieu salivaire proche de celui de la salive humaine est essentielle. L'utilisation de ce tampon permet de s'assurer que les protéines salivaires ont la même structure dans la salive et dans les conditions expérimentales, sachant qu'une modification de structure des protéines peut modifier leur capacité à interagir avec les molécules odorantes.

Les compositions de tampons salivaires utilisés dans diverses études sont répertoriées dans le Tableau III.2.

Tableau III.2 : Composition de tampons salivaires utilisés dans diverses études (références des études en gras)

Composants	(van Ruth, <i>et al.</i> , 2001a)	(Johansson, <i>et al.</i> , 1989)	(Soderholm, <i>et al.</i> , 1996)	(Christersson, <i>et al.</i> , 2000)
NaCl	0,873 g/l	0,400 g/l	5,844 g/l	2,922 g/l
NaHCO <sub>3</sub>	5,203 g/l			
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 2H <sub>2</sub> O		0,780 g/l	3,744 g/l	1,560 g/l
Na <sub>2</sub> S, 9H <sub>2</sub> O		0,005 g/l		
NaN <sub>3</sub>	0,500 g/l			
KCl	0,477 g/l	0,400 g/l		
KHCO <sub>3</sub>			15,017 g/l	
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 3H <sub>2</sub> O			5,706 g/l	
CaCl <sub>2</sub> , 2H <sub>2</sub> O	0,441 g/l	0,795 g/l	2,205 g/l	
MgCl <sub>2</sub>			0,143 g/l	
CH <sub>4</sub> N <sub>2</sub> O		1,000 g/l		

### III. Matériel et méthode

Le tampon salivaire utilisé par Van Ruth durant son doctorat a été repris dans de nombreux articles étudiant la libération des molécules odorantes (Boland, *et al.*, 2004; Genovese, *et al.*, 2009; Hutteau, *et al.*, 1998). Le tampon salivaire utilisé par Soderholm *et al* (Soderholm, *et al.*, 1996) se distingue des autres tampons en raison de ses concentrations en ions presque 10 fois plus élevées et par conséquent ne reflète pas les concentrations trouvées dans la salive humaine (Tableau II.6). Le tampon salivaire mis en place par Johansson *et al* (Johansson, *et al.*, 1989) possède des ions à concentrations légèrement plus élevées que celles trouvées dans la salive, mais restant du même ordre de grandeur. En revanche ce tampon ne contient pas d'ion  $\text{HCO}_3^-$ , qui est un ion important dans le maintien du pH de la salive. Le tampon utilisé par Christersson *et al* (Christersson, *et al.*, 2000) est incomplet et n'est pas représentatif de la composition ionique de la salive humaine. La composition du tampon salivaire de Van Ruth *et al* (van Ruth, *et al.*, 2001a) reste avec des concentrations ioniques légèrement plus élevées que celles retrouvées dans la salive humaine, mais de même ordre de grandeur et les proportions entre les différents ions sont respectées, bien qu'il y ait certains manques comme l'ion  $\text{PO}_4^{3-}$ . La composition de ce tampon salivaire est donc proche de celle de la salive et permet de comparer les résultats obtenus à ceux des études précédentes.

#### 1.2.3. La composition des salives artificielles

L'effet de l'alpha-amylase et de la mucine sur la libération des molécules odorantes est étudié individuellement et en mélange.

Les concentrations de mucines et d'alpha-amylase utilisées sont les même que celle utilisées par Van Ruth durant son doctorat. L'effet de la mucine est étudié à 2,160 g/l et celui de l'alpha-amylase à 200 000 UI/l. Les différents milieux salivaires étudiés sont présentés dans le Tableau III.3.

**Tableau III.3 : La composition des différentes salives artificielles étudiées (W : milieu eau, B: milieu tampon, A: milieu tampon avec alpha-amylase, M: milieu tampon avec mucines, AM : milieu tampon avec les deux protéines). Les croix correspondent à la présence du composant dans le milieu salivaire artificiel.**

Composants	W	B	A	M	AM
Eau MilliQ	X	X	X	X	X
Tampon salivaire		X	X	X	X
Alpha-amylase			X		X
Mucine				X	X

Les milieux eau et tampon salivaire sont les milieux témoins.

Le pH des différentes salives artificielles est ajusté à  $8,3 \pm 0,01$  (PH mètre HANNA HI 2210), qui est le pH du pool de salive humaine mesuré après décongélation.

### III. Matériel et méthode

---

Les viscosités des salives artificielles sont mesurées à 20,7°C, à une vitesse de rotation de 1500 tours/min, sur une période de 30 secondes. Elles sont comprises entre 6,6 et 7,0 mPa.s (rhéomètre-viscosimètre RM200, Lamy Rheology). Une analyse de la variance ne montre pas de différence significative entre les différents milieux bien que les salives artificielles contenant des mucines aient tendance à être plus visqueuses.

Les salives artificielles préparées sont conservées maximum une semaine à 4°C en attendant leur utilisation.

#### 1.2.4. La salive humaine

Deux collectes de salives ont été nécessaires au cours de cette approche *in vitro*. Lors de ces deux collectes, la sécrétion de salive est stimulée par mastication d'un morceau de Parafilm. Les sujets sont des volontaires internes de L'INRA en bonne santé. Ces derniers ne doivent ni manger, ni boire, ni fumer au minimum une heure avant la collecte et s'être rincé la bouche.

La première collecte est effectuée afin de mettre en évidence l'effet de la salive humaine sur la libération des molécules odorantes. Ce milieu salivaire est nommé par la suite 'HS'. Ses effets sur la libération des molécules odorantes sont comparés aux effets entraînés par les salives artificielles. La salive collectée provient de 15 volontaires (6 femmes et 9 hommes) âgés entre 24 et 60 ans. Toutes les salives sont collectées le même jour et regroupées en un pool de 800 ml. Ce pool est ensuite divisé en 40 aliquots de 20 ml et conservé à -20°C jusqu'à utilisation.

La seconde collecte est réalisée afin de mettre en évidence le rôle de la salive humaine dans la dégradation des esters. La salive provient de 15 volontaires (7 femmes et 8 hommes) âgés entre 20 et 60 ans. Toutes les salives sont collectées le même jour et rassemblées en un pool de 900 ml. Ce pool est divisé en 12 aliquots de 60 ml et 9 aliquots de 20 ml. Ces derniers sont congelés à l'azote liquide pour une congélation rapide et une dénaturation des enzymes salivaires minimale (formation des cristaux de glace assez rapide pour que la structure de la protéine n'ait pas le temps d'être modifiée). Les aliquots congelés sont conservés à -80°C jusqu'à utilisation.

Pour les deux collectes, les aliquots sont décongelés à 30°C avant utilisation.

## III. Matériel et méthode

### 1.3. Les échantillons

#### 1.3.1. La préparation des solutions mères

Les dix molécules odorantes étudiées dans cette approche (2-propanone, 2-hexanone, 2-heptanone, 2-octanone, 2-nonanone, propanoate d'éthyle, butanoate d'éthyle, pentanoate d'éthyle, hexanoate d'éthyle, heptanoate d'éthyle) sont diluées dans du propylène glycol à une concentration de 0,1 mol/l. Les solutions mères ainsi obtenues sont conservées à 4°C avant leur dilution pour obtenir la concentration fixée pour les échantillons de l'approche *in vitro*.

#### 1.3.2. La préparation des échantillons

##### 1.3.2.1. La méthode de préparation des solutions filles

La préparation des échantillons comprend la dilution des solutions mères dans un des milieux salivaires étudiés. Trois méthodes de préparations sont testées (Figure III.1).

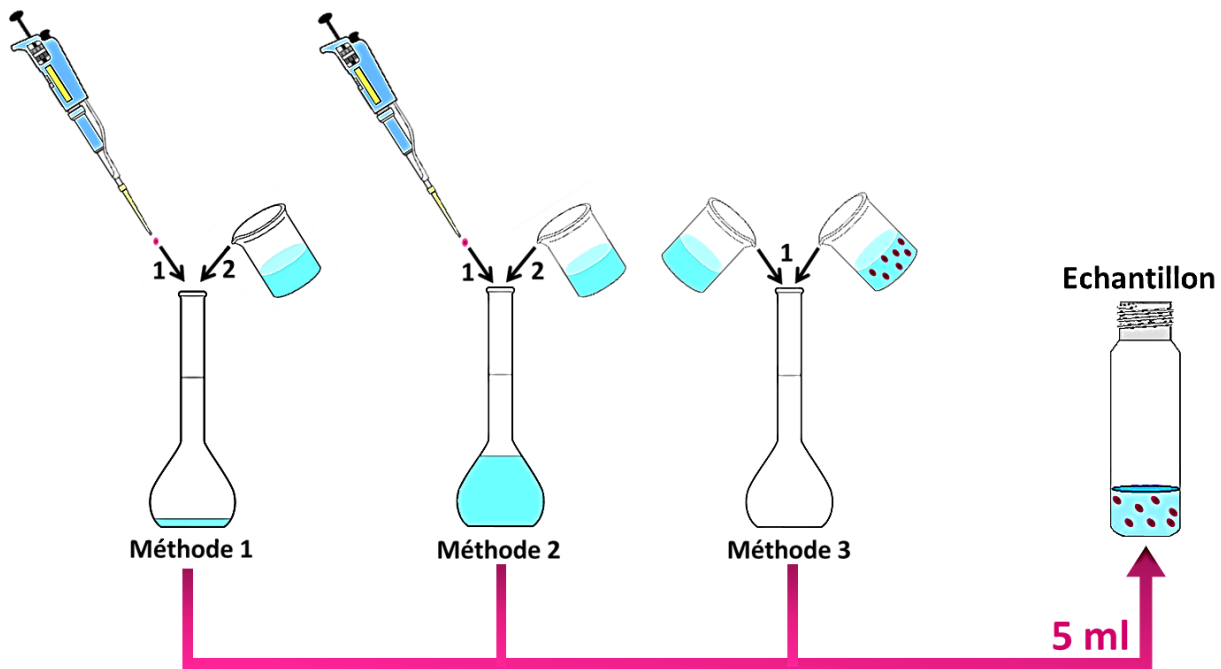


Figure III.1 : Méthodes de préparation des échantillons pour les milieux salivaires artificiels (les chiffres donnent l'ordre d'ajout des éléments).

La méthode 1 testée consiste à mettre un fond du milieu salivaire étudié dans la fiole jaugée, d'y ajouter les molécules odorantes, puis de compléter par le milieu salivaire et d'homogénéiser.

La méthode 2 consiste à remplir la fiole jaugée aux trois-quarts avec le milieu salivaire étudié, d'y ajouter les molécules odorantes, puis de compléter par le milieu salivaire et d'homogénéiser.

### III. Matériel et méthode

La méthode 3 consiste à préparer séparément la solution de molécules odorantes diluées dans le tampon salivaire et la solution de protéines salivaires diluées dans le tampon salivaire. Ces deux dernières solutions sont préparées à une concentration en molécules odorantes et protéines deux fois plus élevée et un volume deux fois plus petit que ceux qui sont attendus au final. Ces deux solutions sont ensuite additionnées et homogénéisées. Cette méthode n'est de ce fait pas utilisable dans le cas de la salive humaine.

L'impact de ses trois méthodes de préparation est observé pour dix molécules odorantes de divers propriétés physico-chimique et les trois milieux salivaires artificiels contenant des protéines. Trois répétitions sont réalisées. Les dix molécules odorantes sont analysées en mélange. Les mesures sont réalisées par GC-FID (méthode décrite dans la suite du matériel et méthode), dans les mêmes conditions pour milieux étudiés ( $1.10^{-4}$  mol/l, 5 ml par échantillon, temps d'équilibre de 40 min, 30°C, même jour).

Les résultats présentés par la Figure III.2, pour deux molécules odorantes dans le milieu avec mucines (M), sont représentatifs des résultats observés pour les autres milieux et autres molécules odorantes testées. L'aire sous courbe est proportionnelle à la quantité de molécules odorantes libérées du milieu salivaire étudié.

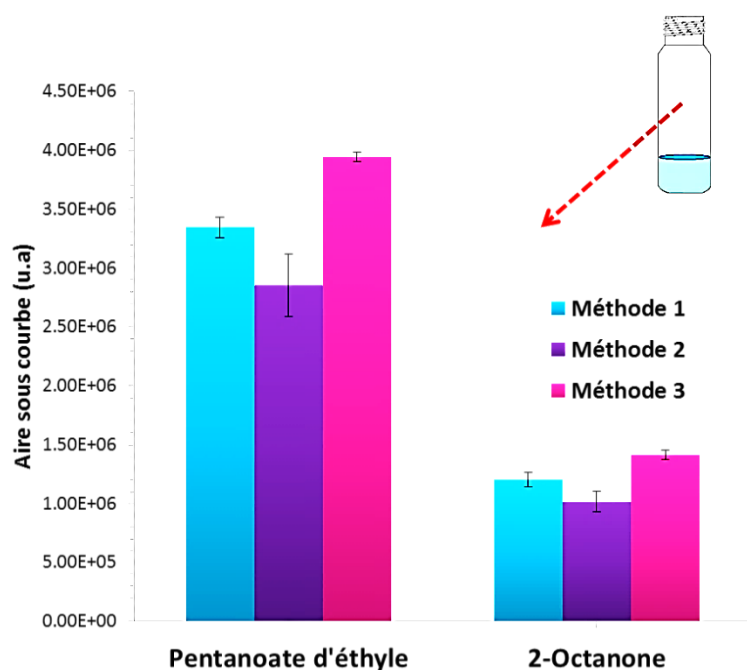


Figure III.2: Aires moyennes sous les courbes de libération du pentanoate d'éthyle et de la 2-octanone du milieu avec mucines (M) pour les des trois répétitions et les trois méthodes de préparation. Les barres d'erreur représentent les écart-types.

### III. Matériel et méthode

---

Comme l'indique la Figure III.2, la méthode 3 donne des aires sous courbe plus importantes que les deux autres méthodes, la méthode 2 étant celle qui donne les aires les plus faibles. Ces observations suggèrent qu'une perte de molécules odorantes est entraînée par les méthodes 1 et 2 lors de la préparation des échantillons. De même, au vu des écart-types, les méthodes 1 et 2 donnent des résultats moins répétables que la méthode 3.

Ainsi, les échantillons sont préparés selon la méthode 3 lorsque cela est possible, c'est-à-dire pour les milieux salivaires artificiels avec protéines (A, M, AM). Dans ce cas, les protéines et solutions mères sont diluées séparément dans un volume identique de tampon salivaire aux concentrations de 400 000 U/l pour l'alpha-amylase, 4,32 g/l pour la mucine et  $2 \cdot 10^{-4}$  mol/l pour les solutions mères. Ces deux mélanges sont ensuite additionnés et homogénéisés.

Dans les cas où la méthode 3 n'est pas applicable (milieux W, B, HS), la méthode 1 est utilisée. Les solutions mères sont directement diluées dans le milieu à  $1 \cdot 10^{-4}$  mol/l.

#### 1.3.2.2. L'effet mélange

L'effet mélange prend en considération les interactions possibles entre plusieurs molécules odorantes ou compétitions entre molécule pour interagir avec une protéine. Cet effet n'est pas toujours étudié ni mentionné dans les publications. Nous avons analysé cet effet mélange sur la libération des 10 molécules de l'étude dans les milieux eau (W), tampon salivaire (B) et mucines (M) par GC-FID. Trois répétitions sont réalisées pour chaque échantillon. Tous les échantillons sont réalisés et analysés dans les mêmes conditions ( $1 \cdot 10^{-4}$  mol/l, 5 ml par échantillon, 40min d'équilibre, méthode 2 de préparation, 30°C, même jour).

La Figure III.3 présente les résultats pour deux des molécules odorantes testées dans le milieu eau (W). Cet exemple de résultat est représentatif des résultats observés pour les deux autres milieux et autres molécules odorantes testées. L'aire sous courbe est proportionnelle à la quantité de molécules odorantes libérées du milieu salivaire étudié.

### III. Matériel et méthode

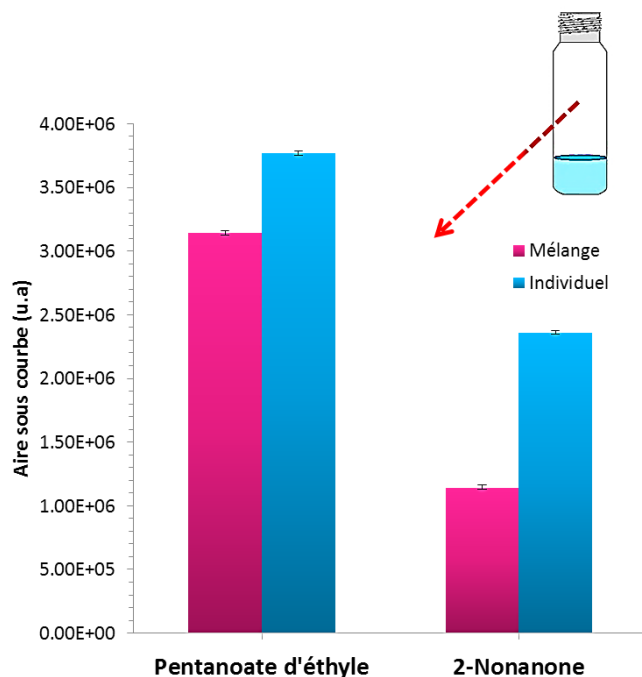


Figure III.3 : Analyse de l'aire sous les courbes de libération du pentanoate d'éthyle et de la 2-Nonanone seule et en mélange avec dix autres molécules, pour le milieu eau (W). Les barres d'erreur représentent les écart-types.

La Figure III.3 montre que l'aire sous courbe du pentanoate d'éthyle et celle de la 2-nonanone sont plus élevées lorsque ces molécules sont analysées individuellement. Ce résultat est observé pour les autres molécules odorantes et les deux autres milieux testés. La quantité de molécules odorantes libérées est donc plus importante quand celle-ci est analysée individuellement. La mise en mélange de molécules odorantes augmente la concentration totale en molécules odorantes de la phase liquide. La pression totale en molécules odorantes dans l'espace de tête atteint un maximum à l'équilibre. La pression totale est égale à la somme des pressions partielles des différentes molécules odorantes. Cette constatation explique la diminution de la concentration en chacune des molécules odorantes dans l'espace de tête lorsque celles-ci sont en mélange.

**La mise en évidence d'un effet mélange nous a conduit à analyser les molécules individuellement**



## III. Matériel et méthode

---

### 1.4. L'analyse de la phase Gazeuse

#### 1.4.1. La chromatographie en phase gazeuse à détection par ionisation de flamme (GC-FID)

Le principe de la chromatographie repose sur le partage des composés de l'échantillon entre une phase stationnaire et une phase mobile. En phase gazeuse, il s'agit d'un gaz inerte qui permet le transport des composés, préalablement vaporisés, à travers la colonne plus ou moins rapidement en fonction de leurs affinités pour la phase stationnaire. La GC s'applique donc préférentiellement aux composés volatils, facilement vaporisables et non thermosensibles. La colonne, élément clé de la séparation, est associée à un détecteur et un système informatique pour l'enregistrement du signal et l'établissement des chromatogrammes.

Après injection de l'échantillon, les différents composés présents dans ce dernier sont séparés les uns des autres en fonction de leur point d'ébullition et de leur affinité avec la phase stationnaire de la colonne. Plus un composé a d'affinité avec la phase stationnaire, plus sa rétention est importante et plus son temps de parcours de la colonne est long. Ce temps de parcours, appelé temps de rétention dépend aussi de la température du four où se trouve la colonne. Les composés élués de la colonne arrivent dans le détecteur où ils traversent une flamme qui les ionise (flamme ionisante). Une tension est maintenue entre la buse de la flamme et une électrode entourant cette-dernière. Lorsqu'un composé est ionisé, un courant électrique est créé entre l'électrode et la buse. Ce dernier est ensuite amplifié. L'intensité de ce courant est proportionnelle à la quantité massique de la molécule ionisée. Le détecteur envoie un signal électronique vers un ordinateur qui enregistre les variations de courants et les transcrit en un ensemble de pics appelé chromatogramme. L'aire sous chacun de ces pics est donc proportionnelle à la quantité massique de molécules présentes dans le prélèvement injecté.

La Figure III.4 résume le principe de la GC-FID.

### III. Matériel et méthode

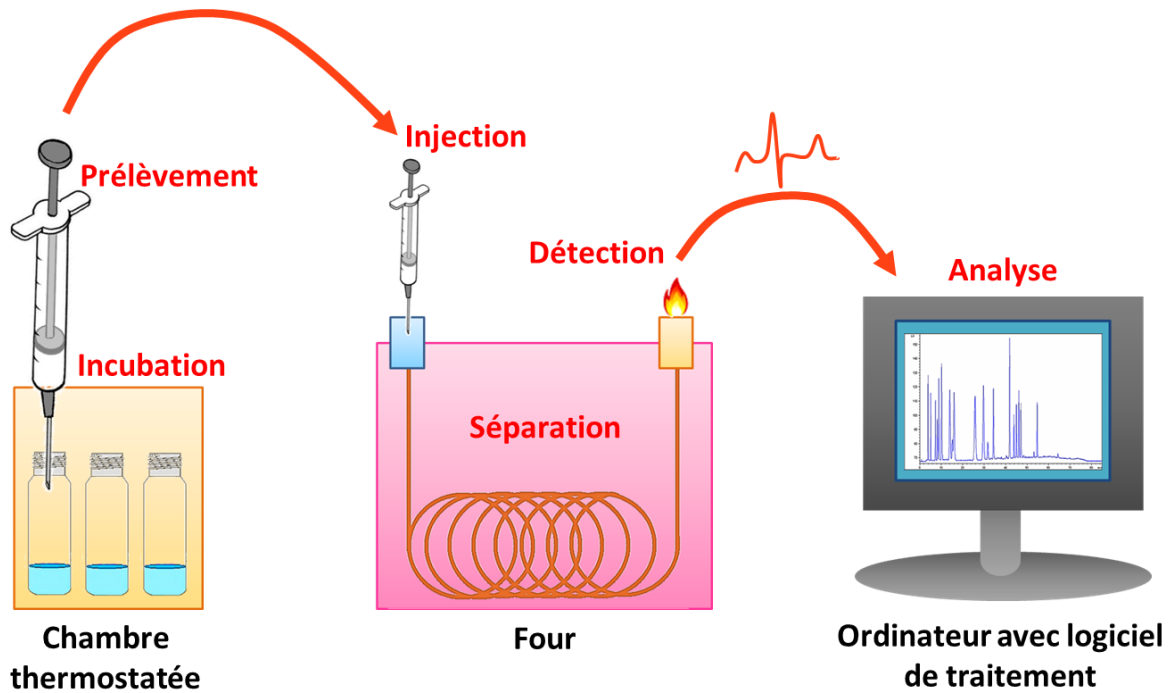


Figure III.4 : Schématisation du principe de l'analyse par chromatographie en phase gazeuse.

Les chromatogrammes obtenus par analyse GC FID sont traités à l'aide du logiciel EZChrom (EZChrom Elite System Component, 2008, Santa Clara, USA). Les paramètres extraits de ces derniers sont l'aire sous les pics de chaque composé ainsi que le temps auquel ces pics sont observés. Le temps de rétention, pour des conditions d'analyse données, est caractéristique de l'affinité d'une molécule pour la colonne et permet de l'identifier.

#### 1.4.2. Mise au point de la méthode

##### 1.4.2.1. La détermination du temps d'équilibre

Afin de connaître le temps auquel l'équilibre thermodynamique entre la phase liquide (milieu salivaire avec molécules odorantes) et la phase gazeuse de l'échantillon est atteint, l'analyse de la composition de cette dernière est réalisée au cours du temps sur une période de 180 minutes. Ce temps d'équilibre est déterminé pour les 10 molécules et les trois milieux salivaires. Trois répétitions sont réalisées. Tous les échantillons sont réalisés et analysés dans les mêmes conditions ( $1.10^{-4}$  mol/l, 5 ml par échantillon, méthode 1 de préparation, 30°C, même jour). L'incubation des échantillons est réalisée à 30°C de façon à se rapprocher de la température moyenne que l'on peut trouver en bouche lors de la consommation d'un aliment à température ambiante.

### III. Matériel et méthode

La Figure III.6 présente les résultats pour deux des molécules odorantes testées dans le milieu avec mucines (M). Cet exemple de résultat est représentatif des résultats observés pour les autres milieux et autres molécules odorantes testées. L'aire sous courbe est proportionnelle à la quantité de molécules odorantes libérées du milieu salivaire étudié.

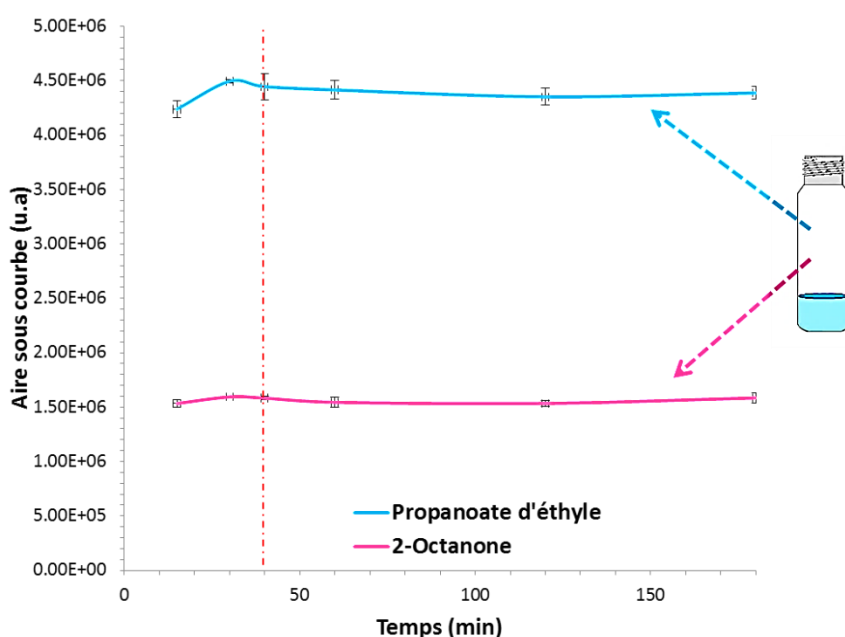


Figure III.6 : Variation de l'aire sous courbe au cours du temps pour la libération du propanoate d'éthyle et de la 2-octanone dans le milieu avec mucines (M). Les barres d'erreur représentent les écart-types.

La Figure III.6 indique qu'à partir de 40 minutes, les aires sous les courbes de libération sont constantes. L'analyse des résultats pour les autres milieux et molécules odorantes donne la même conclusion.

#### 1.4.3. La détermination des coefficients de partage

La capacité des molécules odorantes à être libérées dans la phase gazeuse peut être caractérisée par le coefficient de partage gaz/liquide à l'équilibre. Ce coefficient correspond au rapport de la concentration de la molécule odorante dans la phase gazeuse sur sa concentration dans la phase liquide à l'équilibre. Deux méthodes de calcul des coefficients de partage sont testées pour cette approche *in vitro*: la méthode d'analyse par variation du volume de phase ou 'Phase Ratio Variation' (PRV) et la méthode de calibration par injection liquide ou 'Liquid Calibration-Static Headspace' (LC-SH).

### III. Matériel et méthode

#### 1.4.3.1. La méthode PRV

La méthode PRV est réalisée sur les 70 molécules odorantes de départ pour cinq milieux salivaires artificiels (W, B, A, M, AM). Ces molécules sont étudiées dans six mélanges différents, établis de façon à éviter les coélutions entre ces dernières (Annexes n°2). La méthode PRV basée sur la loi de Henry a été mise en place par Ettré en 1993 (Ettré, *et al.*, 1993). Celle-ci a subi de nombreuses évolutions de sa création à aujourd'hui (Atlan, *et al.*, 2006; Tromelin, *et al.*, 2012).

L'équation classiquement utilisée en PRV est basée sur les quatre égalités suivantes :

$$\begin{aligned}(1) \quad K &= \frac{Cg}{Cl} \\(2) \quad n0 &= ng + nl \\(3) \quad \beta &= \frac{Vg}{Vl} \\(4) \quad A &= Cg * Vp * fi\end{aligned}$$

*K = coefficient de partage.*

*Cg = concentration de la molécule odorante dans la phase vapeur à l'équilibre.*

*Cl = concentration de la molécule odorante dans la phase liquide à l'équilibre.*

*n0 = nombre de mole de la molécule odorante à l'état initial dans la phase liquide.*

*ng = nombre de mole de la molécule odorante dans la phase vapeur à l'équilibre.*

*nl = nombre de mole de la molécule odorante dans la phase liquide à l'équilibre.*

*\beta = rapport du volume de la phase vapeur sur celui de la phase liquide.*

*Vg = volume de la phase vapeur (constant).*

*Vl = volume de la phase liquide (constant).*

*A = aire sous pic de la molécule odorante observée sur chromatogramme obtenu par analyse chromatographique.*

*Vp = volume du prélèvement de la phase vapeur analysé par chromatographie gazeuse (égale à 1 ml).*

*fi = réponse du détecteur associé à la chromatographie gazeuse (valeur constante pour une molécule odorante).*

L'ensemble de ces égalités permet de relier l'air sous pic (A) au rapport de volumes ( $\beta$ ) par la relation suivante (5) :

$$(5) \quad A = fi * \left( \frac{C0}{\left(\frac{1}{K}\right) + \beta} \right)$$

*C0 = concentration de la molécule odorante à l'état initial dans la phase liquide.*

*Vp = 1 ml, l'unité des volumes étant le ml, ce paramètre est éliminé pour simplifier l'égalité.*

L'équation (5) est plus généralement utilisée sous sa forme inverse (6) permettant une analyse des résultats par simple régression linéaire de type ' $\frac{1}{A} = a + b\beta$ ' :

$$(6) \quad \frac{1}{A} = \left( \frac{1}{K * fi * C0} \right) + \left( \left( \frac{1}{fi * C0} \right) * \beta \right)$$

L'équation (5) correspond à l'équation classiquement utilisée en PRV. Dans cette dernière, la quantité de molécules odorantes passées dans la phase vapeur est couramment négligée ( $Cg \ll Cl$ ) de façon à

### III. Matériel et méthode

considérer la concentration de la molécule odorante dans la phase liquide est constante ( $Cl \approx C_0$ ) et que le départ de matière de la phase liquide à la phase gazeuse n'entraîne pas de variation de volume de ces deux phases. Ces approximations peuvent être justifiées pour des molécules odorantes peu volatiles, ou pour des échantillons avec des rapports de volumes  $\beta$  de faible valeur. En revanche, ces approximations sont difficilement justifiables pour des molécules très volatiles ou pour des échantillons ayant des valeurs de  $\beta$  élevées, ce pourquoi cette équation a subi plusieurs modifications au cours des années.

Ne considérant plus ces approximations, l'équation (6) devient la suivante (7) en réintroduisant la variable  $Cl$  à la place de la constante  $C_0$ , pour prendre en compte les variations de du ratio de volume  $\beta$  au cours de l'équilibration. L'équation (8) est une autre façon d'exprimer l'équation (7) qui nous servira dans la suite du développement.

$$(7) \frac{1}{A} = \left( \left( \frac{1}{fi*Cl} \right) * \left( \frac{Cl}{Cg} \right) \right) + \left( \left( \frac{1}{fi*Cl} \right) * \left( \frac{Vg}{Vl} \right) \right)$$

$$(8) \frac{1}{Cg'} = \left( \left( \frac{1}{Cl} \right) * \left( \frac{Cl}{Cg} \right) \right) + \left( \left( \frac{1}{Cl} \right) * \left( \frac{Vg}{Vl} \right) \right)$$

$Cg'$  = concentration de la molécule odorante dans la phase vapeur, ne considérant plus la concentration  $Cl$  constante.

Or prenant en considération les équations (1), (4) et (5), nous pouvons donner l'égalité suivante (8):

$$(9) Cl = \frac{C_0}{1+(K*\beta)}$$

Il a été observé expérimentalement que la libération des molécules odorantes se rapproche plus d'une fonction polynomiale que d'une fonction linéaire. En remplaçant la variable  $Cl$  dans l'équation (8) par l'égalité (9), nous obtenons l'équation (10) qui donne une fonction polynomiale de second degré adaptée à tout type de libération quelles que soient les valeurs de  $\beta$  et la volatilité des molécules odorantes (Tromelin, *et al.*, 2012):

$$(10) \frac{1}{Cg'} = \left( \frac{1}{K*C_0} \right) + \left( \left( \frac{2}{C_0} \right) * \beta \right) + \left( \left( \frac{K}{C_0} \right) * \beta^2 \right)$$

L'équation (10) peut aussi être exprimée en fonction de l'aire sous pic  $A$ , donnant l'équation (11) ou son inverse (12) :

$$(11) \frac{1}{A} = \left( \frac{1}{fi*K*C_0} \right) + \left( \left( \frac{2}{fi*C_0} \right) * \beta \right) + \left( \left( \frac{K}{fi*C_0} \right) * \beta^2 \right)$$

$$(12) A = \frac{fi*C_0}{\left( \frac{1}{K} \right) + (2*\beta) + (K*\beta^2)}$$

La composition de la phase gazeuse est mesurée pour des échantillons de 150, 200, 300, 400, 500, 750, 1000, 1500  $\mu$ l. Chaque molécule odorante à une concentration de  $1.10^{-4}$  mol/l. Les échantillons sont

### III. Matériel et méthode

conservés sur un portoir réfrigéré à 6°C jusqu'à leur analyse. Un passeur automatique (MultiPurpose Sampler, MPS2-Twister Gerstel, Mülheim an der Ruhr, Germany) déplace au fur et à mesure les échantillons du portoir vers un agitateur/incubateur à prélèvement automatique (GERSTEL MPS 2, Gerstel Inc., Mülheim an der Ruhr, Germany), dont la température est réglée à 30°C.

Après 40 min d'équilibration, un prélèvement de 1 ml est réalisé automatiquement à l'aide d'une seringue de 2,5 ml préchauffée à 35°C (Gerstel, manufactured by SGE, Victoria, Australia). Ce prélèvement est analysé par chromatographie en phase gazeuse associée à un détecteur à flamme ionisante (TRACE GC Ultra, Thermo Electron, Milan, Italy). La température de l'injecteur est fixée à 240°C et celle du détecteur à 250°C. Le capillaire utilisé est une colonne DB-WAX (30 m, 0.32 mm i.d., 0.5  $\mu$ m; Agilent J&W Scientific, Folsom, CA, USA). Le gaz vecteur utilisé est l'hydrogène, à une vitesse de 1,8 ml/min en mode 'split' (1/10). La température du four est ajustée à chaque mélange afin d'éviter les coélutions des molécules (méthodes de montée en température reportées en Annexe n°2). Trois répétitions sont réalisées.

La Figure III.7 présente un exemple de résultats obtenus dans le cas du pentanoate d'éthyle et de la 2-nonanone pour le milieu Tampon (B).

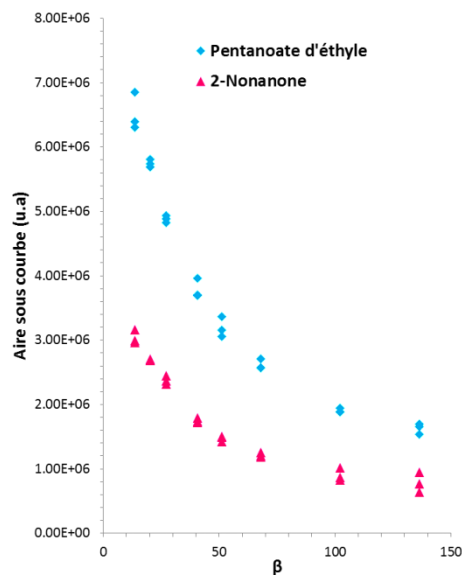


Figure III.7 : Variation de l'aire sous les pics du pentanoate d'éthyle et de la 2-Nonanone en fonction de la variation de volume du milieu tampon ( $\beta$ ) de l'échantillon ( $\beta$  : rapport du volume de la phase gazeuse sur celui de la phase liquide).

La Figure III.7 montre que la représentation de l'aire sous courbe des pics du pentanoate d'éthyle et de la 2-Nonanone en fonction du rapport de volumes  $\beta$  (volume de la phase gazeuse sur celui de la phase liquide) se présente sous la forme d'une fonction polynomiale. Cette observation est valable pour les autres molécules et les autres milieux salivaires artificiels testés, bien que les résultats pour certaines molécules peu volatiles ne soient pas aussi répétables, notamment aux volumes les plus bas.

### III. Matériel et méthode

Connaissant les valeurs de A, C0 et  $\beta$ , il est possible de déterminer la valeur de K (scripte Matlab® en Annexe n°3).

#### 1.4.3.2. La méthode par calibration liquide-statique headspace (LC-SH)

La méthode LC-SH est réalisée pour les dix molécules odorantes choisies pour l'approche *in vitro*. Cette méthode consiste à établir une courbe de calibration pour chaque molécule odorante diluée dans du dichlorométhane (gamme de concentrations en  $1.10^{-5}$  mol/l et  $1.10^{-2}$  mol/l). Les courbes de calibration obtenues sont ensuite utilisées pour déterminer la concentration des molécules odorantes présentes dans la phase gazeuse (Tableau III.4).

Tableau III.4: Valeur des pentes des courbes de calibration ( $f_i$ ) et des coefficients de corrélation associés ( $R^2$ )

Molécules odorantes	$f_i$	$R^2$
Propanoate d'éthyle	$1,23.10^{+14}$	0,966
Butanoate d'éthyle	$1,57.10^{+14}$	0,981
Pentanoate d'éthyle	$1,49.10^{+14}$	0,982
Hexanoate d'éthyle	$1,55.10^{+14}$	0,981
Heptanoate d'éthyle	$1,56.10^{+14}$	0,981
2-Propanone	$9,46.10^{+13}$	0,980
2-Hexanone	$1,95.10^{+14}$	0,984
2-Heptanone	$2,10.10^{+14}$	0,984
2-Octanone	$2,14.10^{+14}$	0,983
2-Nonanone	$2,20.10^{+14}$	0,982

Pour l'analyse de la phase gazeuse par la méthode LC-SH, un volume de 5 ml d'échantillon est placé dans un flacon type 'headspace' de 20,46 ml,. Nous avons préalablement testé différents volumes d'échantillon de 0,1 à 5 ml. Le volume de 5 ml retenu permet d'avoir une surface de pic chromatographique plus importante ainsi que la meilleure répétabilité. Les conditions d'analyse chromatographique sont les mêmes que pour la méthode PRV, en mode isotherme, la température du four pour chaque molécule odorante a été déterminée, afin d'obtenir un temps de rétention compris entre 2 et 5 minutes pour chaque molécule (Tableau III.5). Trois répétitions sont effectuées et tous les milieux pour une même molécule sont analysés le même jour. La concentration des molécules dans la phase gazeuse est déterminé à l'aide des courbes de calibration.

Le coefficient de partage Kim peut ensuite être calculé :

$$Kim = \frac{C_{i\text{vap}}}{C_{im}}$$

### III. Matériel et méthode

Le paramètre  $K_{im}$  est le coefficient de partage de la molécule  $i$  pour le milieu  $m$ ,  $C_{ivap}$  est la concentration molaire (mol/l) de la molécule  $i$  dans la phase gazeuse à l'équilibre et  $C_{im}$  est la concentration de la molécule  $i$  dans le milieu  $m$  à l'équilibre. Comme  $C_{ivap}$  a une valeur très inférieure à  $C_{im}$ , le paramètre  $C_{im}$  est considéré égal à la concentration initiale de la molécule  $i$  dans le milieu  $m$ .

Tableau III.5 : Températures du four et temps d'acquisition des analyses en GC-FID des dix molécules odorantes.

Esters	Température / Temps	Cétones	Température / Temps
Propanoate d'éthyle	60°C, 6min	2-Propanone	3°C/min de 40 à 60°C
Butanoate d'éthyle	70°C, 6min	2-Hexanone	80°C, 6min
Pentanoate d'éthyle	90°C, 6min	2-Heptanone	95°C, 6min
Hexanoate d'éthyle	95°C, 8min	2-Octanone	100°C, 8min
Heptanoate d'éthyle	110°C, 8min	2-Nonanone	125°C, 6min

#### 1.4.3.3. Le choix de la méthode

La méthode PRV a l'avantage de permettre la mesure du coefficient de partage sans nécessité de réaliser une courbe de calibration. En revanche cette méthode nécessite l'analyse de huit volumes d'échantillon différents pour déterminer la valeur d'un coefficient de partage (soit avec trois répétitions,  $8 \times 3 = 24$  échantillons), contrairement à la méthode par calibration pour laquelle un seul volume d'échantillon est suffisant (soit 3 pour 3 répétitions).

La température, humidité et pression de la salle de préparation des échantillons peuvent varier au cours de jours, modifiant les propriétés de partage des molécules odorantes entre la phase liquide et la phase gazeuse. Afin de limiter cet effet jour, nous choisissons d'analyser les six différents milieux (W, B, M, A, MA, HS) le même jour pour une même molécule odorante. La méthode PRV n'est donc pas applicable dans notre cas, puisqu'elle demande l'analyse d'un trop grand nombre d'échantillons qui prendrait plus d'une journée pour l'analyse de tous les milieux pour une molécule odorante.

De plus la comparaison de méthode réalisée par Athès *et al* (Athès, *et al.*, 2004), montre une meilleure répétabilité des résultats par LC-SH pour l'analyse de la libération de molécules odorantes étudiées séparément, par rapport à la PRV.

La méthode d'analyse par calibration (LC-SH) est alors retenue pour le reste des analyses de l'approche *in vitro*.

#### 1.4.4. L'étude cinétique

En vue d'étudier la dégradation des cinq esters étudiés par la salive humaine (HS), une étude cinétique de la composition de la phase vapeur est réalisée sur une période de temps plus longue que précédemment



### III. Matériel et méthode

---

(20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180 et 200 minutes), dans l'eau (W) et en présence de salive humaine (HS).

Après le prélèvement de phase vapeur pour une injection en GC-FID, les échantillons sont récupérés et conservés à -20°C, afin d'arrêter la dégradation de l'ester avant d'analyser la composition de la phase liquide. Trois répétitions sont effectuées pour chaque temps d'incubation et chaque molécule odorante.

**Nous avons retenu la méthode LC-SH pour calculer les coefficients de partage vapeur/liquide, après un temps d'équilibre de 40 minutes à 30°C.**

#### 1.5. L'étude de la phase liquide

L'analyse de la phase liquide est réalisée sur les échantillons de salive humaine (HS) de l'étude cinétique, en vue d'étudier les mécanismes enzymatiques pouvant dégrader les esters en particulier. La salive contient des estérases pouvant hydrolyser les esters étudiés (Ester d'éthyle) en éthanol et en acide carboxylique

##### 1.5.1. La méthode d'extraction

Afin d'étudier les molécules présentes en solutions, les phases liquides des échantillons de salive humaine (5 ml) sont extraites au dichlorométhane (3 fois 1 ml). L'extrait est ensuite séché sur du sulfate de sodium anhydre puis concentré avec le système Kuderna Danish (Figure III.11). Nous avons préalablement testé l'effet du pH et de l'ajout du chlorure de sodium sur l'extraction de l'acide heptanoïque (produit de la dégradation de l'heptanoate d'éthyle). L'ajustement du pH des échantillons est réalisé à l'aide d'une solution d'acide chlorhydrique (HCl à 0,1 mol/l dans de l'eau MilliQ).

Afin d'optimiser la méthode, nous avons retenu une extraction à pH 2 après acidification par ajout d'acide chlorhydrique. L'ajout de sel n'a pas d'effet sur le rendement d'extraction.

Les échantillons tests de volume 5 ml, sont extraits par trois volumes successifs de dichlorométhane de 1 ml. Les extraits obtenus sont séchés au sulfate de sodium anhydre, puis concentrés au Kuderna Danish (Figure III.11).

### III. Matériel et méthode

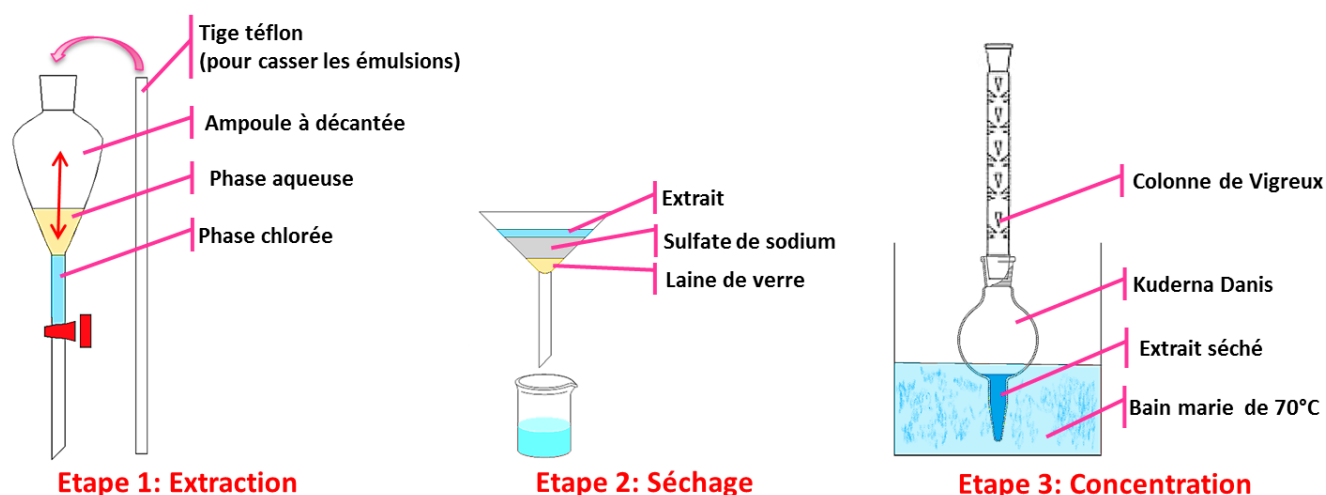


Figure III.8: Représentation du principe d'extraction au dichlorométhane.

#### 1.5.2. L'identification par spectrométrie de masse

Afin d'identifier les composés de dégradation des esters, les extraits sont injectés en mode liquide en chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS). La phase stationnaire utilisée est une FFAP (30 m, 0,32 mm, 0,5  $\mu\text{m}$ ; Agilent J&W Scientific, Folsom, CA, USA) qui permet une meilleure détection des acides qu'une colonne DB-WAX. Pour l'analyse en masse, deux techniques d'ionisation sont utilisées : l'impact électronique (EI) et l'ionisation chimique (CI). Lors de l'ionisation des molécules, des fragmentations se produisent. Elles complexifient l'identification de l'ion moléculaire mais apportent des informations complémentaires sur la structure des molécules à identifier.

##### 1.5.2.1. L'ionisation par impact électronique

La source à impact électronique a été inventée par Dempster en 1907 et perfectionnée au cours du temps (Bleakney en 1929, puis Nier en 1947). Cette technique d'ionisation fait partie des méthodes d'ionisation à énergie élevée, donnant lieu à une fragmentation intense. Cette fragmentation est assez importante pour que dans certains cas l'ion moléculaire ne soit pas observé (composé de départ ionisé non fragmenté).

En sortie de colonne chromatographique, les composés entrent dans une source d'ionisation constituée d'un filament chauffé qui émet des électrons qui sont accélérés vers une anode placée à l'opposé du filament dans la source. Les électrons traversent la chambre d'ionisation en coupant perpendiculairement le flux d'analytes sortant de la colonne. Les électrons formés rencontrent de cette façon les analytes et des échanges d'énergie se produisent. En effet, chaque électron se comporte

### III. Matériel et méthode

---

également comme une onde dont la longueur d'onde  $\lambda$  est associée à sa masse  $m$ , à sa vitesse  $v$  et à la constante de Planck  $h$ , par la relation:  $\lambda = h/(m \cdot v)$ .

Lorsqu'un électron possédant une énergie ( $h \cdot v$ ) suffisante pour éjecter l'électron occupant la plus haute orbite moléculaire de la molécule  $M$  entre en collision avec celle-ci, un transfert d'énergie se produit, conduisant à l'éjection de l'électron de la molécule  $M$ . La molécule  $M$  est alors ionisée et appelée l'ion moléculaire noté  $M^{+\bullet}$  ( $M + e^- \rightarrow M^{+\bullet} + 2 e^-$ ). Pour que l'ionisation se produise, il est essentiel que l'énergie cinétique des électrons qui sont bombardés soit supérieure à l'énergie d'ionisation de la molécule  $M$ . Ainsi, des faisceaux d'électrons ayant une énergie cinétique de 70eV sont couramment utilisés. L'accès d'énergie transmise à la molécule bombardée par rapport à son énergie d'ionisation lors de la collision entraîne généralement la fragmentation de cette dernière.

Les ions fragment générés apportent des informations structurales sur la molécule  $M$ . Ces derniers sont séparés par un analyseur en masse puis décelés par un détecteurs et enregistrés sous forme d'un graphique appelé spectre de masse. Ce spectre de masse est spécifique à la molécule  $M$ , ce qui permet de l'identifier à l'aide d'une base de données. L'identification de la molécule  $M$  se fait par comparaison de son spectre avec les spectres de la base de données. Lorsqu'un spectre de cette dernière est trouvé similaire à celui de la molécule  $M$ , et que l'indice linéaire de rétention correspond à celui de la molécule pure injectée dans les mêmes conditions, la molécule est identifiée avec certitude.

#### 1.5.2.2. L'ionisation par ionisation chimique

L'ionisation chimique est un mode d'ionisation moins énergétique, qui a été découvert par Munson et Field (Munson, *et al.*, 1966). Contrairement à l'impact électronique, cette technique a l'avantage de fournir un spectre présentant peu de fragments, où l'ion moléculaire est présent en grande abondance. Cette technique est complémentaire de l'impact électronique.

La source d'ionisation est composée d'une chambre d'ionisation où la pression favorise les collisions entre les composés présents dans celle-ci. Dans cette chambre deux orifices latéraux permettent le passage d'électrons et le passage des ions formés. Un tube amenant le gaz réactif est connecté à cette chambre.

Au sein de la chambre d'ionisation, la fraction de l'échantillon est faible par rapport à la fraction du gaz réactif. Ainsi un électron entrant dans la chambre a plus de chance d'entrer en contact avec une molécule du gaz réactif et donc d'ioniser celle-ci par impact électronique. L'ion ainsi produit entre en collision avec d'autres molécules du gaz réactif, formant ainsi par une série de réactions le plasma d'ionisation. Différentes réactions chimiques s'opèrent entre les ions du plasma et les analytes  $M$  contenus dans l'échantillon, produisant des ions positifs  $M^{+\bullet}$  ou négatifs  $M^{-\bullet}$ . Ces réactions chimiques donnent lieu à des

### III. Matériel et méthode

transferts de protons ( $MH^+$ ), des abstractions d'hydrure ( $M-H_2O$ ), des formations d'adduits, des transferts de charges, etc. Les ions issus d'un analyte par l'abstraction d'un proton ou d'un hydrure, ou par l'addition d'un proton sont appelés « ions de l'espèce moléculaire » ou « ions pseudomoléculaires ». Ces ions permettent de déterminer la masse moléculaire des analytes de l'échantillon.

L'observation d'un ion moléculaire protoné  $MH^+$  implique que la molécule M ait une affinité protonique beaucoup plus forte que celle du gaz ionisant. Dans le cas contraire le transfert de proton du gaz ionisant à l'analyte M n'intervient pas et l'ion moléculaire protoné  $MH^+$  n'est pas observé. Le gaz ionisant est alors choisi en fonction de l'analyte M à protoner.

Les gaz d'ionisation les plus courants sont le méthane, l'isobutane, et l'ammoniac. L'isobutane et l'ammoniac sont plus sélectifs et limitent plus la fragmentation que le méthane (spectre présentant souvent uniquement l'ion moléculaire protoné). Le choix du gaz d'ionisation est donc important, puisque selon leur sélectivité ils ne réagissent pas avec tous les analytes. Dans notre cas deux gaz d'ionisation ont été testés, le méthane et l'ammoniac. La sélectivité de l'ammoniac est telle qu'il ne réagit pas avec des analytes de types hydrocarbures, alcanes, aromatiques, éthers, composés nitrés. Avec ce gaz, les molécules basiques s'ionisent par transfert de protons, celles polaires forment principalement des liaisons hydrogènes et celles peu ou pas basiques forment des adduits. L'adduit est composé de l'analyte M (ou parfois fragment de M) associé à un ion du plasma par une liaison hydrogène. Ces adduits sont utiles pour confirmer la masse moléculaire de l'analyte.

L'analyse des échantillons est réalisée à l'aide des gaz ionisants méthane et ammoniac. Le Tableau III.6 présente des exemples de composés qui peuvent être obtenus par ionisation chimique avec ces deux gaz pour une molécule M.

Tableau III.6 : Exemple de composés pouvant être obtenus par ionisation d'une molécule M par le méthane et l'ammoniac.

Gaz ionisant	Type de composés	Formule brute	Variation de masse par rapport à M
<b>Méthane (CH<sub>4</sub>)</b>	Abstraction d'hydrure	$MH^+ - H_2O$	- 17
	Analyte protoné	$MH^+$	+ 1
	Adduit 1	$M + C_2H_5^+$	+ 29
	Adduit 2	$M + C_3H_5^+$	+ 41
<b>Ammoniac (NH<sub>3</sub>)</b>	Abstraction d'hydrure	$MH^+ - H_2O$	- 17
	Analyte protoné	$MH^+$	+ 1
	Adduit 1	$M + NH_4^+$	+ 18
	Adduit 2	$M + N_2H_7^+$	+ 35

### III. Matériel et méthode

---

L'extraction de la phase liquide a été réalisée après acidification à pH 2 des phases aqueuses par ajout d'acide chlorhydrique.

L'identification des composés a été réalisée par spectrométrie de masse en mode ionisation chimique.

### Partie 2 : L'approche *in vivo*

#### 2.1. Le choix des molécules odorantes

Nous avons retenu pour cette étude deux esters parmi les cinq esters étudiés dans l'approche *in vitro*, le propanoate d'éthyle qui est le moins hydrophobe ( $\log P = 1,21$ ) et l'hexanoate d'éthyle qui est le second ester le plus hydrophobe ( $\log P = 2,83$ ) (Sigma Aldrich, St Quentin Fallavier, France).

Ces deux molécules odorantes sont de qualité 'Food Grade', c'est-à-dire adaptées à la consommation alimentaire (Sigma Aldrich, St Quentin Fallavier, France). Leur pureté a été vérifiée par GC-FID et est supérieure à 99%.

#### 2.2. Les échantillons

##### 2.2.1. Les mises au point de la méthode

###### 2.2.1.1. Le choix du volume de l'échantillon à consommer

Afin de limiter les variations entre les sujets, nous souhaitons que la totalité de l'échantillon soit dégluti en une seule fois. L'échantillon doit alors avoir un volume inférieur au volume maximum d'une déglutition. Différents articles indiquent que le volume moyen d'une déglutition est situé entre 20 et 25 ml pour un individu adulte et sain, prenant en compte le genre et l'âge de la personne (Lawless, *et al.*, 2003; Nilsson, *et al.*, 1996).

Afin d'observer l'impact des composés de la salive sur la libération des molécules odorantes, nous souhaitons limiter la dilution de la salive des sujets par consommation d'échantillons de volume proche de celui de leur salive en bouche, sachant que le volume de salive en bouche d'un individu adulte et sain varie entre 1 et 2 ml en moyenne (Collins, *et al.*, 1987; Lagerlof, *et al.*, 1984).

Afin que l'échantillon puisse être dégluti en une seule fois, de limiter la dilution de la salive des sujets et après plusieurs essais *in vivo* (1ml, 2ml, 3ml, 5ml, 10ml) un volume de 3ml est retenu. Les essais sur les volumes inférieurs à 3ml ont montré une faible répétabilité. Les volumes de 5 et 10 ml ne sont pas retenus en raison de leur volume relativement élevés par rapport à celui de la salive.

###### 2.2.1.2. Le choix de la concentration des molécules odorantes

Le choix de la concentration des molécules odorantes doit prendre en compte plusieurs paramètres les limites de quantification de l'appareil de mesure, la toxicité de la molécule odorante. La concentration du

### III. Matériel et méthode

---

propanoate d'éthyle utilisée dans les échantillons est bien inférieure à la LD50 (dose létale nécessaire pour tuer 50% des d'un lot) par voie orale pour le rat (3500 mg/kg). La concentration d'hexanoate d'éthyle utilisée dans les échantillons est en-dessous de celles communément retrouvées dans les bonbons (170 mg/kg) et les chewing-gums (128 mg/kg) à base de cette molécule odorante (Burdock, 1995). Nous n'avons pas trouvé de données sur la toxicité de cette dernière molécule.

Les seuils de perception par voie rétronasale de l'hexanoate d'éthyle et du propanoate d'éthyle sont respectivement de 0,5 µg/l et 4,9 µg/l (Buettner, *et al.*, 2001c; Plotto, *et al.*, 2008).

En vue de comparer les libérations par voie rétronasale de ces deux molécules odorantes, celles-ci sont étudiées à la même concentration molaire. Différentes concentrations inférieures au seuil de solubilité dans l'eau (Tableau III.1) ont été testées (0,005 mmol/l ; 0,011 mmol/l ; 0,022 mmol/l ; 0,111 mmol/l) afin d'obtenir une quantité de molécules odorantes libérées par voie rétronasale comprise dans la gamme de linéarité de l'appareil APCI-MS (entre  $1.10^{-6}$  mol/l et  $1.10^{-2}$  mol/l). La concentration qui a été retenue est celle de 0,111 mmol/l qui correspond à 16 mg/l pour l'hexanoate d'éthyle et 12 mg/l pour le propanoate d'éthyle. Les concentrations inférieures à celles-ci n'ont pas donné de résultats répétables.

#### 2.2.1.3. Le choix du contenant de l'échantillon

Une étape importante de l'approche *in vivo* est le mode de présentation et d'ingestion de l'échantillon. Le contenant de l'échantillon doit respecter différents critères. Il doit limiter les pertes de molécules odorantes par évaporation entre le moment où l'échantillon est préparé et sa consommation. Il doit permettre une consommation facile de la totalité de l'échantillon en une fois, sachant que les mouvements du sujet sont limités à cause du casque et du capillaire le reliant à l'appareil de mesure (cf paragraphe 2.3.4.2). Il doit aussi permettre au sujet de consommer l'échantillon en limitant l'aspiration d'air et l'ouverture de sa bouche toujours dans l'objectif d'avoir une perte de molécules odorantes minimale.

Différents ustensiles sont testés (gobelet avec et sans couvercle, gobelet avec paille, coupelles en plastique, seringue en plastique sans aiguille). Le meilleur compromis observé est la seringue en plastique. La seringue présente les meilleures qualités pour limiter l'évaporation des molécules odorantes, restreindre l'aspiration d'air par le sujet et son ouverture de bouche au moment de la consommation de l'échantillon. Les 3 ml d'échantillons d'eau aromatisées sont présentés aux sujets dans des seringues en plastiques de 5ml avec piston.

## III. Matériel et méthode

---

### 2.2.2. La préparation des solutions mères

Le propanoate d'éthyle et l'hexanoate d'éthyle sont étudiés séparément. Les solutions mères correspondent à 100ml d'eau minérale (Evian, France) additionnée des molécules odorantes dans les concentrations massiques de 250 mg/l pour l'hexanoate d'éthyle et 500 mg/l pour le propanoate d'éthyle. Ces concentrations sont inférieures au seuil de solubilité dans l'eau à 25°C pour les deux molécules.

Une fois les solutions mères homogénéisées, celles-ci sont mise dans des flacons en verre de 100ml et sont placées en chambre froide à 4°C jusqu'à leur utilisation. Celles-ci ne sont pas conservées plus de 4 jours.

Les deux solutions mères sont diluées par la suite pour obtenir les solutions filles à la concentration finale retenue pour les deux molécules odorantes. Afin d'éviter tout risque sanitaire, les solutions mères et filles sont préparées dans un laboratoire adapté destiné à l'alimentaire, suivant les normes HACCP.

### 2.2.3. La préparation des échantillons

Un volume de chaque solution mère est dilué dans de l'eau minérale (Evian, France) afin d'atteindre les concentrations de 16 mg/l pour l'hexanoate d'éthyle et 12 mg/l pour le propanoate d'éthyle. Ces solutions filles servent ensuite à la confection des échantillons.

Dans l'optique de limiter les risques sanitaires, ainsi que de limiter les pertes de molécules odorantes, il est préparé une solution fille pour chaque molécule odorante par jour d'analyse. Les solutions filles sont conservées à 4°C, sur deux jours maximum (jour 1 : la préparation et jour 2 : l'utilisation, si la préparation n'est pas fait le jour même de l'analyse).

Les deux solutions filles sont mises à température ambiante 1h avant leur utilisation. Les échantillons de 3 ml de solution fille sont prélevés à l'aide des seringues en plastique, juste avant chaque séance d'analyse. Un morceau de parafilm est ajouté à l'extrémité ouverte des seringues pour éviter tout risque d'évaporation et de contamination microbienne.

## 2.3. L'étude de la libération des molécules odorantes

### 2.3.1. Le choix du temps de maintien de l'échantillon en bouche

Chaque individu a sa propre façon de consommer les aliments. Il est alors nécessaire dans notre étude de fixer un maximum de paramètres pour que les résultats d'un sujet à l'autre soient comparables. Un



### III. Matériel et méthode

---

paramètre important qui peut influencer la libération des molécules odorantes par voie rétronasale est le temps de séjour de l'aliment en bouche.

Différents temps de séjour de l'échantillon en bouche ont été testés (0, 3, 5, 8 et 10 secondes). L'objectif de cette étape est que le temps de séjour de l'échantillon en bouche soit à la fois identique entre les sujets et proche des temps de séjour en bouche dans des conditions de consommation « normale ».

Afin que la molécule odorante ne soit libérée qu'à partir de la première déglutition, les sujets restent en apnée durant le maintien de l'échantillon en bouche.

Une durée de 8 secondes est retenue. Les temps de séjour testés de durée inférieure à 8 secondes ont fourni des résultats de moins bonne répétabilité.

#### 2.3.2. Les états physiologiques

Cette approche *in vivo* a pour objectif d'étudier l'effet de trois états physiologiques salivaires sur la libération de deux molécules odorantes par voie rétronasale : l'état de repos, l'état après rinçage de la bouche à l'eau et l'état stimulé (Figure III.9).

Les trois états physiologiques sont testés dans une même séance pour une molécule odorante, puis pour l'autre molécule. Il est alors nécessaire de déterminer un ordre d'étude des différents états physiologiques en vue de limiter les effets d'un état physiologique sur l'autre. L'ordre d'analyse le plus adapté à l'étude est présenté dans la Figure III.9.

### III. Matériel et méthode

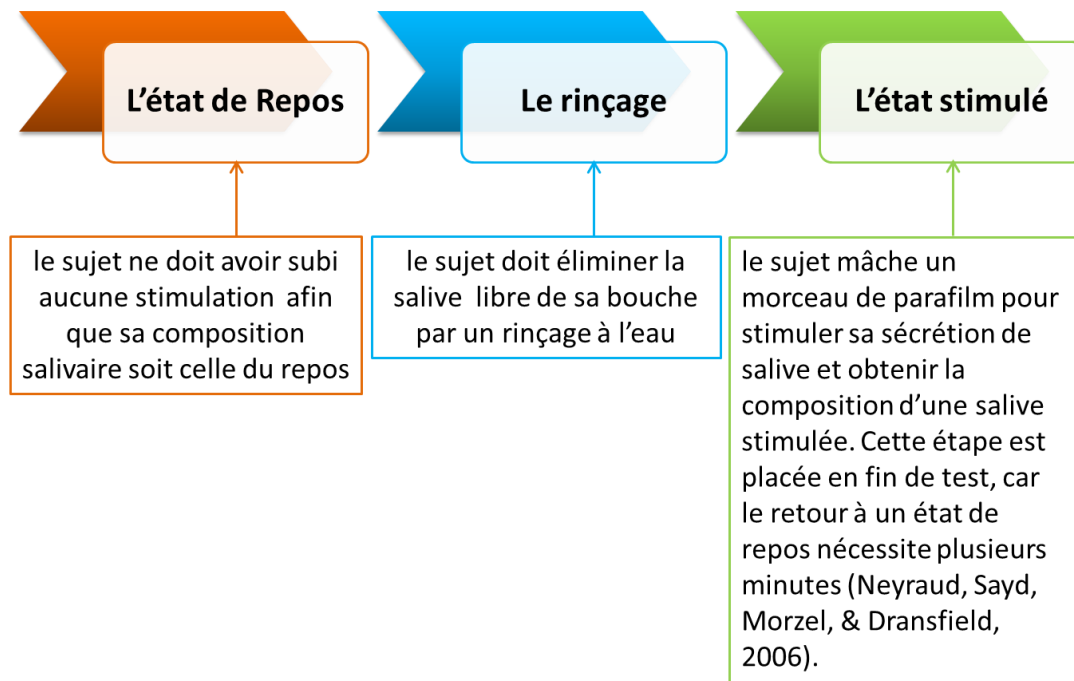


Figure III.9: Justification de l'organisation de la séance d'analyse.

Une pause de 30min est réalisée entre les deux molécules odorantes de façon à ce que l'effet de la stimulation disparaisse avant la deuxième série d'analyses. L'absence de différence significative entre la composition des salives collectées au cours des deux analyses au repos lors d'une même séance valide le retour à l'état de repos du sujet après la pose de 30 minutes. L'ordre de passage des molécules odorantes est randomisé d'une séance à l'autre pour chaque sujet.

#### 2.3.3. Le déroulement des analyses

##### 2.3.3.1. Le principe

Les différentes séances sont réalisées sur des jours différents, mais à la même heure du jour pour chaque sujet, afin d'éviter les variations de composition salivaires dues au rythme circadien du sujet. L'ordre d'analyse des deux molécules odorantes sur les différentes séances est randomisé entre les différents sujets, afin de gommer les éventuels effets d'ordre.

##### 2.3.3.2. Les consignes

Afin de standardiser dans la mesure du possible la consommation de l'échantillon, différentes consignes sont données aux sujets de l'étude :

### III. Matériel et méthode

---

- Garder la bouche fermée et respirer uniquement par le nez, normalement et régulièrement.
- Ne pas aspirer d'air au moment de la mise en bouche de l'échantillon.
- Garder l'échantillon en bouche 8 secondes sans respirer avant de déglutir.
- Déglutir la totalité de l'échantillon en une fois et respirer normalement et régulièrement.

Un rappel de ces consignes et des étapes du test décrit ci-dessous est fait autant de fois qu'il est nécessaire au bon déroulement de la séance.

#### 2.3.3.3. La séance d'entraînement

Une séance d'entraînement individuelle est réalisée avant les séances d'analyse. Cette séance se déroule en deux parties.

Dans la première partie le sujet s'entraîne à consommer des échantillons dans les conditions réelles de l'analyse (maintien en bouche de l'échantillon 8 secondes sans respirer, déglutition en une fois de la totalité de l'échantillon) sur quatre répétitions. Si au bout des 4 répétitions le sujet a toujours des difficultés, des répétitions supplémentaires de cette étape sont réalisées.

Dans la seconde partie le sujet réalise une série d'analyses des trois états physiologiques pour une molécule odorante.

#### 2.3.3.4. L'analyse en état de repos

Une fois le sujet installé, il commence une collecte de salive au repos sur 5min, afin d'obtenir une quantité de salive suffisamment importante pour l'analyse de sa composition. L'acquisition du signal APCI-MS débute à 4min de collecte de salive. Une pause de 30 secondes est réalisée entre la fin de collecte et la mise en bouche de l'échantillon afin que le sujet récupère une quantité normale de salive en bouche (Collins, *et al.*, 1987).

Le sujet met ensuite la totalité de l'échantillon en bouche sans respirer. Il garde 8 secondes l'échantillon en bouche sans respirer avant de le déglutir en une fois. L'acquisition du signal APCI-MS est maintenue jusqu'à ce qu'il ne soit plus observé de libération de molécules odorante (maintien entre 2 et 5 minutes). Avant l'arrêt de l'acquisition, il est demandé au sujet de déglutir plusieurs fois afin de vérifier qu'il n'a plus de molécule odorante en bouche.

## III. Matériel et méthode

---

### 2.3.3.5. L'analyse en mode rinçage

Le sujet se rince la bouche pendant 1 minute avec au minimum 3 volumes d'eau minérale (Evian). Le sujet met ensuite l'échantillon en bouche et procède aux mêmes étapes que dans l'analyse au repos. Le sujet se rince une dernière fois la bouche avant de passer à la dernière analyse de la série.

### 2.3.3.6. L'analyse en état stimulé

Le sujet réalise une collecte de salive stimulée sur 5 minutes avec mastication du Parafilm, après une minute de mastication sans prélèvement, afin d'éliminer la salive déjà présente en bouche et ne collecter que de la salive sécrétée en état stimulée. En 1 minute les sujets ont donné assez de coup de dents pour stimuler leur sécrétion de salive (Neyraud, *et al.*, 2009a). Une pause de 15 secondes est réalisée entre la fin de la collecte et la consommation de l'échantillon pour que le sujet récupère un volume normal de salive en bouche. Dans ce cas le temps de pause est plus court que dans le cas du repos, car le flux salivaire en état stimulé est plus important qu'en état de repos (Engelen, *et al.*, 2003b).

Une nouvelle acquisition est démarrée après 5 minutes de collecte de salive. A la fin des 6 minutes de collecte, le sujet continue de mastiquer encore 15 secondes, retire le morceau de parafilm et met rapidement l'échantillon en bouche. Le sujet réalise les mêmes étapes que dans l'analyse au repos.

## 2.3.4. L'analyse par APCI-MS

### 2.3.4.1. Le principe de l'APCI-MS

La libération *in vivo* par voie rétronasale des molécules odorantes est suivie en temps réel par spectrométrie de masse à pression atmosphérique (APCI-MS). Pour cela, les sujets sont reliés à l'appareil APCI-MS par un capillaire (capillaire placé à la sortie des narines des sujets). L'air expiré par les sujets est aspiré dans le capillaire par un effet Venturi produit à l'entrée de l'appareil. Ce débit d'aspiration est vérifié à l'aide d'un manomètre avant chaque séance d'analyse, il doit être de 65 ml/min. Cet effet Venturi est créé par une arrivée d'azote au niveau d'une pièce de restriction en silice fondue (Figure III.10).

### III. Matériel et méthode

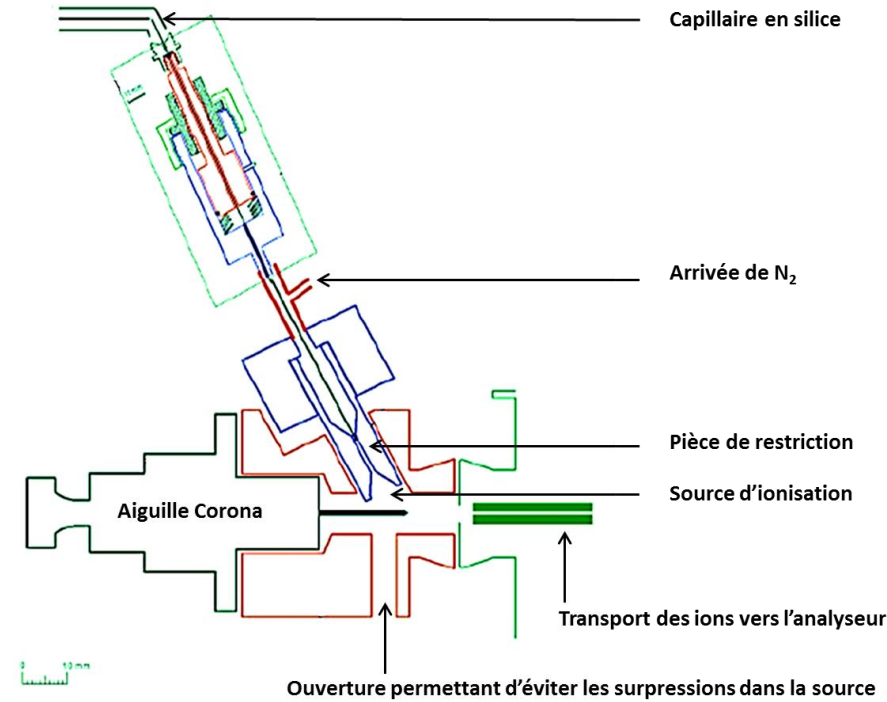


Figure III.10 : Constitution de l'entrée de l'APCI-MS et de sa source d'ionisation.

L'air aspiré dans le capillaire par effet Venturi arrive au niveau de la source d'ionisation d'un volume de 3,5 ml (Esquire-LC, Bruker Daltonique, Wissenbourg, France). Celle-ci est à pression atmosphérique, d'où le nom de l'appareil (APCI = Atmospheric Pressure Chemical Ionisation). Le gaz nébulisant utilisé est le diazote (N<sub>2</sub>). L'ionisation des molécules de N<sub>2</sub> est réalisée par application d'une tension positive de 5kV à l'aiguille Corona de la source. Les molécules de N<sub>2</sub> ionisées vont ensuite réagir avec les molécules d'eau présentes dans l'air de la source pour enfin ioniser les molécules d'intérêt présentes dans l'air expiré du sujet (cascade réactionnelle présentée en Figure III.11).

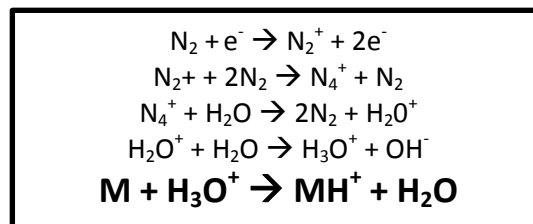


Figure III.11 : Cascade réactionnelle se produisant dans la source d'ionisation (M=molécule d'intérêt présente dans l'air aspiré). La fragmentation de la molécule M est possible, mais reste limitée (méthode d'ionisation 'douce').

Le transport des molécules ionisées vers l'analyseur est assuré par un champ électrique. De cette façon, seule les molécules chargées c'est-à-dire les ions sont déplacés. L'entrée dans l'analyseur des ions se fait par un capillaire de 15 cm de long et 0,3 mm de diamètre. Dans ce capillaire, les ions subissent un passage sous vide progressif, l'analyseur étant sous vide (1.10<sup>-6</sup> mbar).

### III. Matériel et méthode

L'analyseur est une trappe ionique qui sépare les ions en fonction de leur rapport  $m/z$  (masse de l'ion sur sa charge). Celui-ci est composé d'une trappe ionique comprenant une électrode anneau en métal et deux électrodes chapeau (Figure III.12).

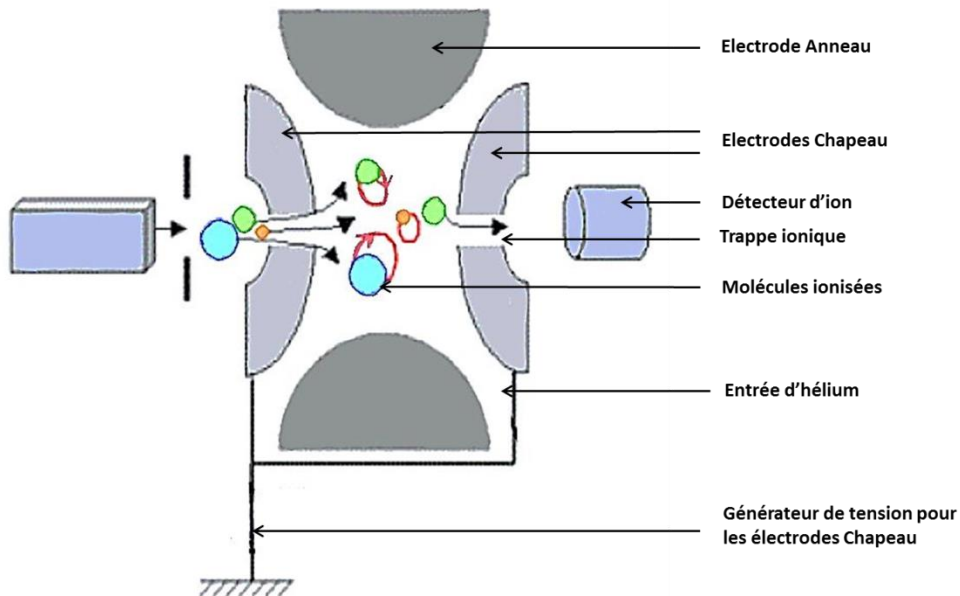


Figure III.12 : Constitution de l'analyseur à trappe ionique de l'APCI-MS

Le remplissage de la trappe ionique est constant en fonction du temps. Les ions qui arrivent dans la trappe ionique subissent tout d'abord une étape de stabilisation, puis une étape d'éjection.

Durant l'étape de stabilisation, les ions  $MH^+$  sont soumis à un champ quadripolaire appliqué par l'électrode anneau en vue de piéger les ions dans la trappe. Un flux continu d'hélium est envoyé dans la trappe ionique de façon à confiner les ions au centre de la trappe et optimiser la résolution des résultats.

Dans l'étape d'éjection, les ions sont soumis à un balayage croissant de tensions engendrées par les électrodes chapeau. Selon l'équation de Matthieu, chaque tension engendrée correspond à une fréquence de résonance d'un ion. Les ions entrés en résonance sont ensuite éjectés de la trappe. L'ordre d'éjection de ces ions dépend de leur rapport  $m/z$  et se fait par ordre croissant de ce rapport.

### III. Matériel et méthode

#### 2.3.4.2. Le casque et le capillaire

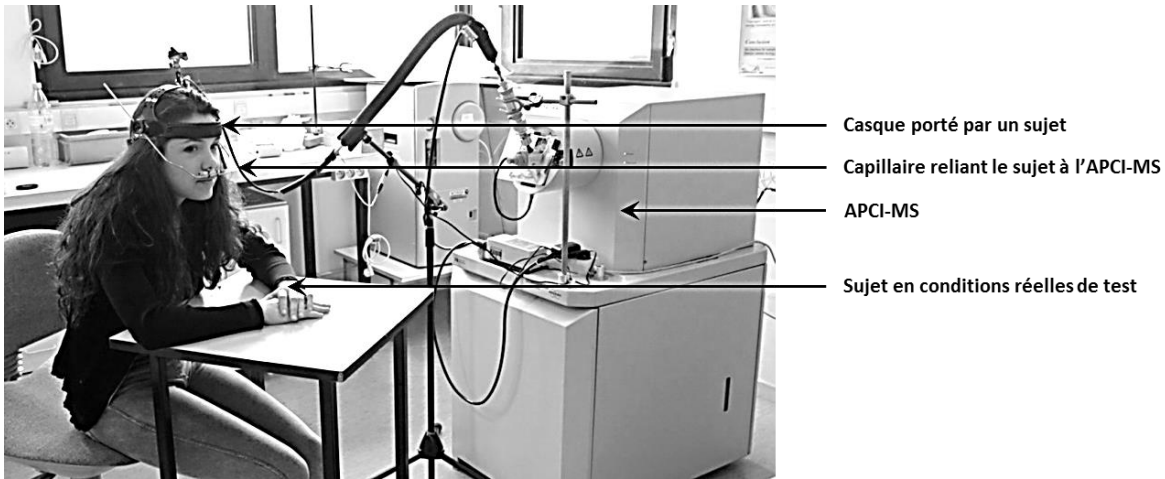


Figure III.13 : Illustration d'un sujet relié à l'APCI-MS en condition de test.

Un capillaire en silice assure le transfert des composés volatils présents dans l'air expiré du sujet vers le spectromètre de masse (APCI-MS) par aspiration. Ce capillaire est maintenu en place à l'aide d'un casque placé sur la tête des sujets (Figure III.13). Le capillaire possède un diamètre externe de 0,8 cm et un diamètre interne de 0,5 cm. Sa longueur est de 90 cm (Figure III.14). Ce capillaire est maintenu à 100°C à l'aide d'une gaine chauffante de façon à limiter les phénomènes de condensation dus à la différence de température entre l'haleine du sujet et l'appareillage utilisé. Cette condensation pourrait biaiser la détection des molécules odorantes en limitant leur transport.

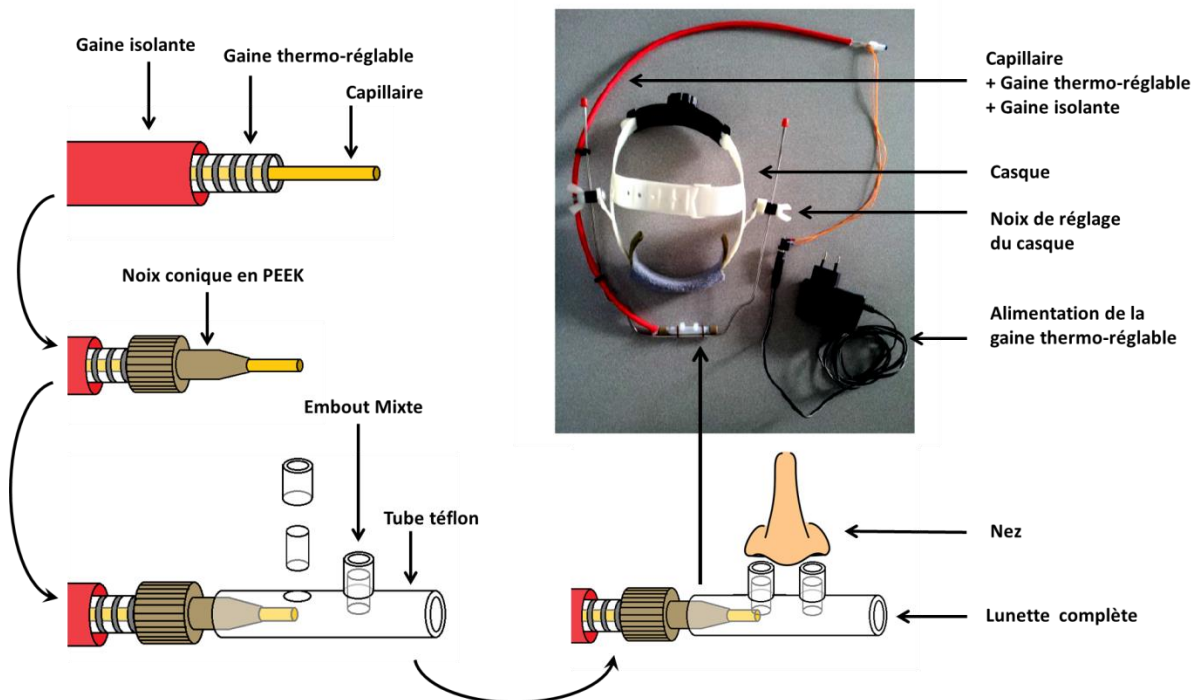


Figure III.14 : Montage de la lunette et description du casque.

### III. Matériel et méthode

---

L'extrémité du capillaire du côté sujet est reliée à une 'lunette' composée d'un tube téflon et de deux embouts mixtes en téflon et silicone (Figure III.14). Les embouts mixtes doivent être placés dans les narines sans toucher la cloison nasale.

Au début de chaque séance le casque est réglé pour s'adapter à la physionomie du sujet à l'aide des différentes mollettes (Figure III.14).

Les embouts mixtes sont à usage unique, alors que le tube téflon doit être nettoyé après chaque utilisation.

#### 2.3.4.3. Le suivi des molécules d'intérêt

Les molécules d'intérêts dans notre étude sont l'hexanoate d'éthyle, le propanoate d'éthyle, ainsi que l'acétone qui est une molécule naturellement présente dans l'haleine des sujets et qui nous permet de suivre sa respiration. Les rapports  $m/z$  des ions correspondant à ces molécules sont présentés dans le tableau ci-dessous.

Tableau III.7: Molécules d'intérêts et ions spécifiques associés.

Molécules d'intérêt	Masse molaire	Ions $MH^+$ suivi (valeur $m/z$ )
Propanoate d'éthyle	102 g/mol	103
Hexanoate d'éthyle	144 g/mol	145
Acétone	58 g/mol	59

Les concentrations de ces ions dans l'air expiré sont mesurées au cours du temps.

#### 2.3.5. Le traitement des courbes de libération

##### 2.3.5.1. La caractérisation des courbes de libération

Une courbe de libération est acquise par séance d'analyse (quatre séances), par sujet (dix sujets), par état physiologique (trois états) et par molécule odorantes (deux molécules). Un total de 240 courbes de libération est recensé ( $4 \times 10 \times 3 \times 2 = 240$ ).

Afin de caractériser chacune des courbes de libération obtenues, différents paramètres sont extraits de ces courbes. Ces paramètres sont représentés et décrit ci-dessous (Figure III.15).



### III. Matériel et méthode

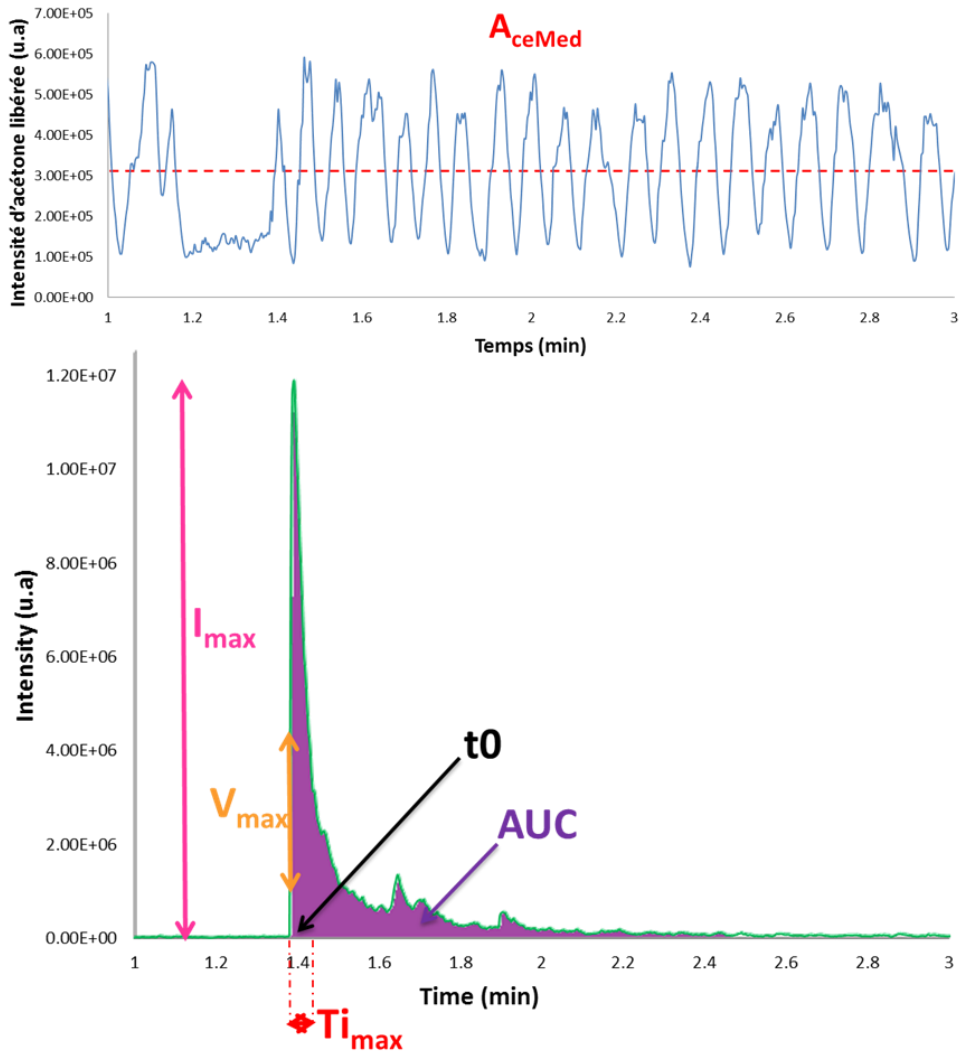


Figure III.15 : Représentation des paramètres extraits des courbes de libération des molécules d'intérêt. Libération du propanoate d'éthyle au cours du temps pour un sujet durant l'étape de rinçage (courbe verte) et de l'acétone (courbe bleue).

Les paramètres tirés directement des courbes de libérations sont :

- $t_0$  : temps de la première déglutition.
- $I_{max}$  : intensité maximale de la courbe de libération.
- $Ti_{max}$  : temps mis pour atteindre  $I_{max}$  après  $t_0$ .
- $V_{max}$  : vitesse maximale de libération de la molécule odorante, correspondant à la valeur positive maximale de la dérivée de la courbe de libération.
- AUC : l'aire totale sous courbe.

La libération d'acétone nous permet de contrôler la respiration des sujets. Il peut être intéressant de caractériser cette libération, sachant que la libération de molécules odorantes par voie rétronasale est

### III. Matériel et méthode

dépendante de la respiration des sujets (Hodgson, *et al.*, 2003). Nous avons choisie de suivre la valeur médiane des intensités des courbes de libération de l'acétone :

- $A_{ceMed}$  : médiane de l'intensité de la courbe de libération de l'acétone.

Nous avons également représenté l'aire cumulée sous les courbes de libération en fonction du temps (Figure III.16).

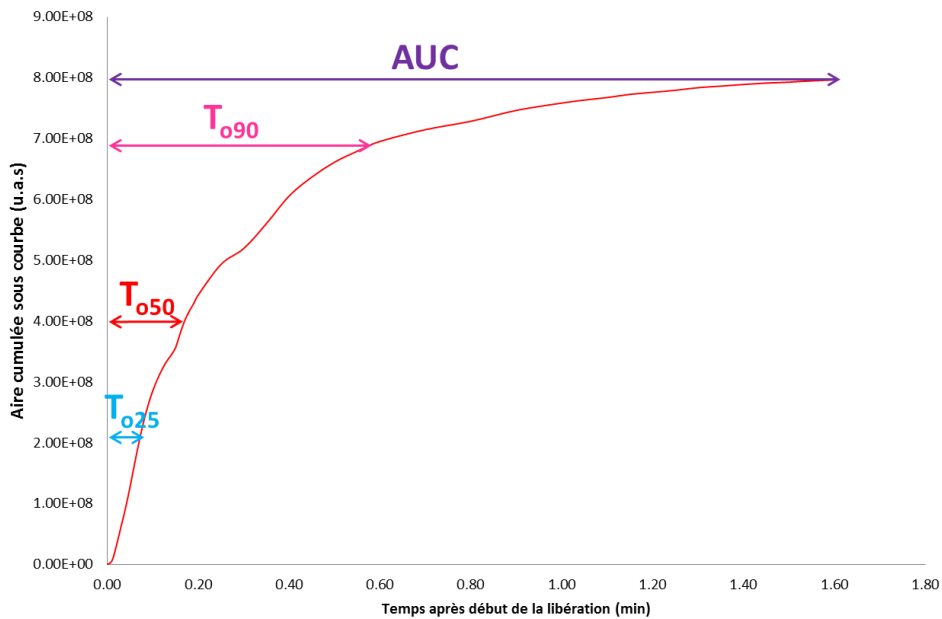


Figure III.16 : Représentation d'une partie des paramètres extraits des courbes des aires cumulées sous courbe (exemple du propanoate d'éthyle pour un sujet au cours de l'étape de rinçage).

Un second ensemble de paramètres est alors extrait de cette représentation : les temps correspondants à différents pourcentage d'aire cumulée sous courbe, sachant que 100% de l'aire cumulée correspond à l'aire totale cumulée (AUC). Ces temps sont relevés pour les pourcentages 25, 50 et 90 (Figure III.20).

La totalité des paramètres de libération est extraite des courbes à l'aide du logiciel Igor (Igor Pro 6.22A, Wavemetrics, USA).

L'analyse de la libération de molécules odorantes in vivo est suivie par APCI-MS dans trois conditions physiologiques.

Les variables de libération retenues sont les suivantes :  $I_{max}$ ,  $Ti_{max}$ ,  $V_{max}$ , AUC,  $A_{ceMed}$ ,  $T_{025}$ ,  $T_{050}$ ,  $T_{090}$ .

## III. Matériel et méthode

---

### 2.4. La caractérisation des sujets

#### 2.4.1. Les sujets

Dix sujets sains internes à l'INRA de Dijon ont participé à l'étude *in vivo* (sept femmes et trois hommes). Chaque sujet a participé à une séance d'entraînement individuelle de 45 minutes et quatre séances d'analyse individuelles de deux fois 15 minutes. Les séances d'analyse pour chaque sujet ont eu lieu à la même heure de la journée. Il a été demandé aux sujets de ne pas manger, de ne pas boire et de ne pas fumer au moins une heure avant ces séances d'analyse. Une mesure de leur volume buccal a été réalisée lors d'une séance supplémentaire d'une durée de cinq minutes.

#### 2.4.2. La mesure du flux salivaire

Le flux salivaire est mesuré sur les quatre séances d'analyse, pour les dix sujets dans les états physiologiques au repos et stimulé. Ce flux est donc mesuré huit fois par état physiologique pour chaque sujet.

La salive des sujets est récoltée sur une durée de 5 minutes dans des pots de prélèvement pré-pesés. A la fin des 5 minutes, les pots contenant la salive sont de nouveau pesés. La différence de masse avant des pots vides et après collecte correspond à la masse de salive récupérée sur 5 minutes.

La division de la masse de la salive par le temps de collecte (5 minutes) donne la valeur du flux salivaire.

#### 2.4.3. La mesure de la viscosité des salives

##### 2.4.3.1. Le principe

La mesure de la viscosité salivaire est réalisée à 20°C sur les échantillons de salive des dix sujets prélevés durant leur séance d'entraînement. L'appareil de mesure utilisé est un microviscosimètre (2ml App.Nr..1011 577) schématisé ci-dessous en Figure III.17.

### III. Matériel et méthode

---

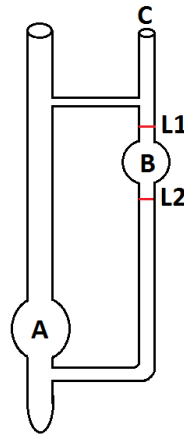


Figure III.17: Microviscosimètre (A = zone de dépôt de l'échantillon, B = zone de mesure, C = emplacement de la pompe à crémaillère, L1 = ligne de départ de chronométrage, L2 = ligne de fin de chronométrage).

Un volume de 2ml de salive est prélevé par échantillon et placé dans la zone A du microviscosimètre (Figure III.17). A l'aide d'une pompe à crémaillère placée en C, le volume de salive est aspiré de la zone A vers la zone B de façon à ce que le ménisque inférieur de l'échantillon soit au-dessus de la ligne 1 (L1 sur la Figure III.17).

Le temps de parcours du ménisque inférieur de l'échantillon de la ligne 1 et la ligne 2 (respectivement L1 et L2 sur la Figure III.17) est mesuré à l'aide d'un chronomètre. La mesure est répétée quatre fois par échantillon de salive. Ce temps de parcours permet de calculer la viscosité cinématique de l'échantillon de salive par la formule suivante :

$$V = K * t$$

Avec V la viscosité cinématique en  $\text{mm}^2/\text{s}$ , K la constante de mesure de l'instrument en  $\text{mm}^2/\text{s}^2$  et t le temps de parcours en s. La constante de mesure K dépend de la température de l'échantillon, à 20°C elle est égale à  $1.174 \text{ mm}^2/\text{s}^2$ . La valeur de K a été déterminée par des mesures de comparaison avec des viscosimètres étalons dont les constantes ont été déterminées par la Physikalisch-Technischen Bundesanstalt.

#### 2.4.3.2. La vérification préliminaire

Les mesures de viscosité des échantillons de salive n'ont matériellement pas pu être réalisées en même temps que les prélèvements, ce pourquoi cette mesure est réalisée sur des échantillons conservés à -80°C. Il est donc nécessaire de vérifier l'impact de la congélation sur la viscosité des échantillons de salive.

### III. Matériel et méthode

Deux prélèvements salivaires au repos sont réalisés pour trois des sujets de l'étude ayant des profils salivaires variés (sujets 7, 9 et 10). Ces deux prélèvements sont collectés sur deux jours différents à la même heure de la journée. Pour les trois sujets, chaque prélèvement est séparé en deux. Les aliquots 1 sont congelés à  $-80^{\circ}\text{C}$  pour une durée de 5 jours, puis leur viscosité est mesurée. La viscosité des aliquots 2 est mesurée directement.

Une analyse de la variance est réalisée sur les valeurs de viscosité, afin de déterminer l'impact du sujet, de la congélation, du jour de mesure, de la répétition des mesures, ainsi que des interactions 'Sujet\*Congélation', 'Sujet\*Jour', 'Sujet\*Répétition'.

Cette analyse de la variance met en évidence un effet significatif du sujet ( $p\text{-value} = 1,26.E-10$ ), ainsi qu'un effet significatif de la congélation ( $p\text{-value} = 0,02$ ). En revanche aucun effet significatif du jour, ni de la répétition des mesures n'est mis en évidence. La Figure III.18 illustre ces résultats.

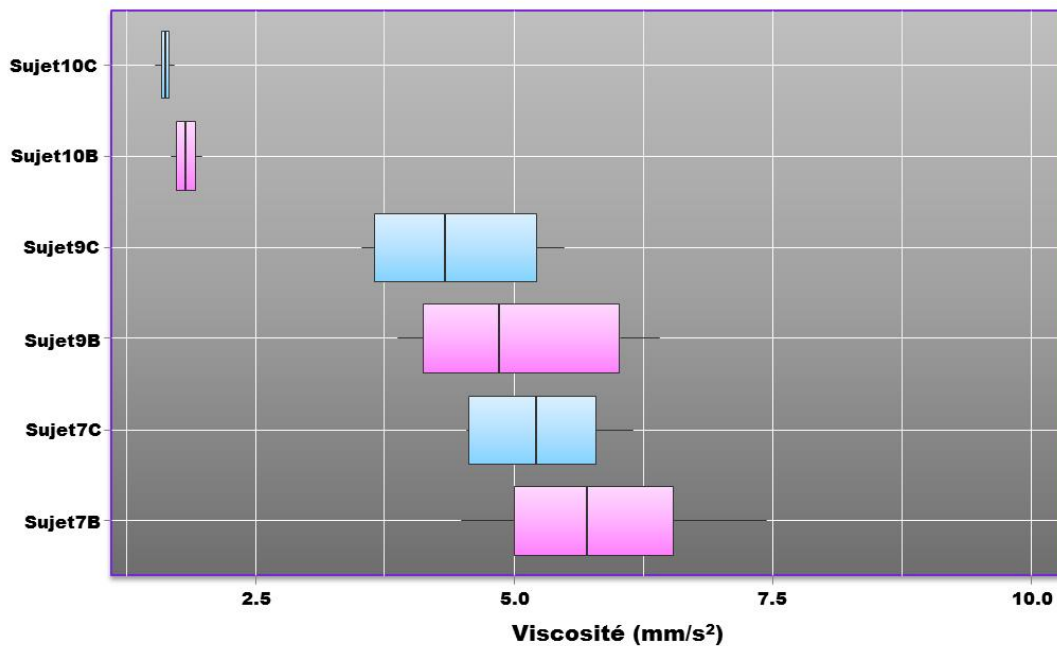


Figure III.18: Box plot représentant la dispersion des valeurs des viscosités en  $\text{mm}^2/\text{s}$  pour les trois sujets sur les deux jours (C et bleu = aliquot de salive congelé, B et rose = aliquot de salive non congelés). Les lignes supérieures et inférieures de la 'box' correspondent respectivement aux quartiles supérieurs et inférieurs. Les barres d'erreur correspondent aux valeurs extrêmes mesurées. La ligne horizontale en gras correspond à la médiane.

La Figure III.18 montre que la congélation à  $-80^{\circ}\text{C}$  diminue la viscosité des échantillons de salive. En revanche nous pouvons observer que l'effet 'Sujet' présent pour les salives non-congelées est conservé après congélation.

### III. Matériel et méthode

---

#### 2.4.4. L'analyse de la composition salivaire

Chaque analyse de la composition salivaire est réalisée sur les échantillons de salive des dix sujets en état de repos et stimulé sur les quatre séances (160 échantillons). Ces échantillons ont préalablement été clarifiés par centrifugation (15 min, 15000 g).

##### 2.4.4.1. Les protéines totales

La méthode de Bradford est utilisée pour déterminer la concentration des protéines en solution dans les 160 échantillons de salive. La réaction est basée sur la formation d'un complexe entre le colorant bleu brillant G et les protéines en solution. Le complexe protéine-colorant formé entre les groupements  $\text{NH}_3^+$  des protéines et ce réactif provoque un déplacement du maximum d'absorbance du colorant de 465 à 595 nm.

Les échantillons de salive sont dilués deux fois. Une gamme d'étalonnage de six points (0,8 mg/ml ; 0,6 mg/ml ; 0,4 mg/ml ; 0,3 mg/ml ; 0,2 mg/ml ; 0,1 mg/ml) est réalisée. Il s'agit d'une gamme de BSA (Sigma Aldrich, St Quentin Fallavier, France). Des volumes de 5  $\mu\text{l}$  de chaque concentration de la gamme et de chaque échantillon sont introduits dans différents puits de deux microplaques. Des volumes de 250  $\mu\text{l}$  de réactif de Bradford (Quick Start™ Bradford Reagent 1X Bio-Rad) sont ensuite ajoutés aux échantillons dilués et à la gamme d'étalonnage.

Après une incubation de 15 minutes à température ambiante, l'absorbance est mesurée à 595nm à l'aide d'un lecteur de microplaques VICTOR équipé de la barrette de filtres A, à température ambiante. L'absorbance mesurée est proportionnelle à la quantité de protéines présentes. Le calcul de la concentration en protéines totales est réalisé à partir des résultats de la gamme d'étalonnage prenant en compte le facteur de dilution des échantillons.

##### 2.4.4.2. L'activité amylasique

L'activité amylasique est mesurée dans les 160 échantillons de salive à l'aide du kit enzymatique CNPG3 (BIOLABO, Maizy, France). La dégradation du 2-chloro-p-nitrophenyl- $\alpha$ -D-maltotrioside (CNPG3) par l'activité amylasique forme comme produit le 2-chloronitrophenol (CNP). La concentration en CNP est directement proportionnelle à l'activité amylasique. La concentration en CNP est déterminée par une mesure d'absorbance à 405 nm.

Les échantillons de salive sont dilués 4000 fois par une solution de NaCl concentrée à 9g/l. Une gamme d'étalonnage de dix points (105 U/l ; 52,5 U/l ; 26,25 U/l ; 13,13 U/l ; 6,56 U/l ; 3,28 U/l ; 1,64 U/l ; 0,82 U/l ; 0,41 U/l ; 0 U/l) est établie à partir d'un sérum contenant de l'amylase (Exatrol-N, BIOLABO, Maizy, France).

### III. Matériel et méthode

---

Des volumes de 20 µl de chaque solution de la gamme et de chaque échantillon sont placés dans différents puits de deux microplaques. Des volumes de 200 µl de réactif de 2-chloro-p-nitrophenyl- $\alpha$ -D-maltotrioside (CNP3) concentré à  $2.25 \cdot 10^{-3}$  mol/l sont ajoutés aux échantillons dilués et à la gamme d'étalonnage.

Après 1 minute, la mesure de l'absorbance est réalisée à 405 nm et 37°C par un lecteur de microplaques VICTOR équipé de la barrette de filtres A. La mesure de l'absorbance de chaque puits est réalisée toutes les minutes durant 30 minutes.

Le calcul de l'activité amylasique est réalisé à partir des résultats de la gamme d'étalonnage prenant en compte le facteur de dilution des échantillons.

L'activité amylasique est exprimée en unité internationale d'activité enzymatique par litre (U/l). Une unité d'activité enzymatique (1 U) correspond à la quantité d'enzyme nécessaire pour catalyser la transformation de 1 µmol de substrat par minute.

#### 2.4.4.3. Les lipocalines

La concentration en lipocaline est mesurée dans les 160 échantillons de salive à l'aide du kit ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) LCN1 (USCNK Life Science Inc., Houston, USA). Ce kit permet de quantifier les lipocalines par un dosage immuno enzymatique sur support solide.

Les échantillons de salive sont dilués 100 fois. Une gamme d'étalonnage de 7 points (625 pg/ml ; 312 pg/ml ; 156 pg/ml ; 78 pg/ml ; 5,00 pg/ml ; 2,50 pg/ml ; 1,25 pg/ml ; 0 pg/ml) est réalisée à partir de dilutions du standard du kit composé de lipocalines lyophilisées. Des volumes de 100 µl de chaque concentration de la gamme et de chaque échantillon sont répartis dans différents puits des microplaques fournies par le kit. Les puits de ces microplaques sont revêtus d'anticorps monoclonal spécifiques à la lipocaline. Un volume de 100 µl d'une solution de biotine conjuguée à un anticorps monoclonal spécifique de la lipocaline est ajouté aux échantillons et à la gamme. Après une incubation d'une heure à 37°C, les puits sont lavés trois fois avec la solution de rinçage fournie par le kit ('Wash Buffer' dilué dans de l'eau MilliQ). Un volume de 100 µl de peroxydase de raifort (HRP) conjuguée à de l'avidine est ensuite ajouté à chaque puits. Après de nouveau une heure d'incubation à 37°C, les puits sont lavés cinq fois avec la solution de rinçage. Ensuite, 90 µl d'une solution de substrat tri méthyle borate (TMB) est ajoutée aux différents puits. La biotine conjuguée à l'anticorps et l'enzyme conjuguée à l'avidine présentent un changement de couleur. Après une dernière incubation à 37°C de 15 à 25 minutes (temps dépendant de la vitesse de coloration des puits en bleu), 50 µl d'une solution d'acide sulfurique fournie par le kit ('Stop Solution') sont ajoutés au puits afin d'arrêter la réaction de coloration (la couleur des puits vire au jaune).

### III. Matériel et méthode

---

L'absorbance des puits est finalement mesurée à 450 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques VICTOR équipé de la barrette de filtres A, à température ambiante. La concentration en lipocaline des échantillons est ensuite déterminée en comparant les absorbances des échantillons à la courbe de la gamme d'étalonnage, tenant compte du facteur de dilution des échantillons.

#### 2.4.4.4. Le calcul des quantités de protéines salivaires

Une des limites de notre étude *in vivo* est l'absence de donnée de variables salivaires pour la condition rinçage, due à l'absence de collecte de salive dans cette condition. Par conséquent, l'interprétation des résultats issus de l'analyse de la libération des molécules odorantes par voie rétronasale n'est pas possible pour la condition rinçage.

Afin de pouvoir prendre en compte cette condition dans nos interprétations, nous décidons de remplacer les données salivaires manquantes par des données théoriques calculées à partir des données obtenues pour les conditions repos et stimulée.

Ces données théoriques correspondent à la quantité de protéines salivaires en bouche au moment de la déglutition de l'échantillon. Notre hypothèse est que le rinçage à l'eau n'entraîne pas de stimulation de la sécrétion de salive. Nous prenons alors comme données pour le flux et la composition salivaire après rinçage, les mêmes données que celles de la condition au repos.

Nous pouvons ensuite déterminer la quantité de protéines salivaires présentes en bouche au moment de la déglutition de l'échantillon, par le calcul suivant :

$$Q_{dip} = C_p * Flux_p * t_p$$

***Q<sub>dip</sub>*** : quantité de la protéine salivaire *i* en bouche au moment de la déglutition de l'échantillon dans la condition physiologique *p*.

***C<sub>p</sub>*** : concentration de la protéine salivaire *i* en condition physiologique *p*.

***Flux<sub>p</sub>*** : flux salivaire dans la condition physiologique *p*.

***t<sub>p</sub>*** : intervalle de temps entre la dernière déglutition, ou la dernière expectation du sujet et la déglutition de l'échantillon pour la condition physiologique *p* (38 secondes dans la condition repos, 2 secondes dans la condition rinçage, 23 secondes dans la condition stimulée).

Les quantités de protéines en bouche au moment de la déglutition de l'échantillon, sont calculées pour les trois états physiologiques, en vue d'établir des corrélations entre l'ensemble des variables salivaires et de libération.



## III. Matériel et méthode

---

### 2.4.5. La mesure du volume buccal

#### 2.4.5.1. Le Rhino-Pharyngomètre

Le volume buccal est mesuré quatre fois pour chacun des dix sujets à l'aide d'un Rhino-Pharyngomètre An Eccovision® acoustic pharyngometer 182 (Hood Laboratories, USA). Cette méthode de mesure par ultrason est couramment utilisée (Xue, *et al.*, 2006). Une onde acoustique est générée durant un court instant et dirigée dans un cylindre appelé 'tube d'ondes' (Figure III.19). Le rôle de ce tube est de créer un 'mur d'ondes' à partir de l'onde acoustique générée (Figure III.19). Le 'tube d'ondes' est connecté à la bouche du sujet via un embout buccal (Figure III.19).

Le 'mur d'ondes' sortant du tube parcourt la bouche du sujet jusqu'à ce que toutes les ondes soient réfléchies par rencontre d'un obstacle (palais, intérieur de la joue, fond de la bouche, etc...). Les ondes réfléchies au cours du parcours de la bouche retournent vers le tube d'onde où deux microphones les enregistrent au cours du temps. Le signal sortant des deux microphones est converti en un signal analogique numérique vers l'interface de l'ordinateur. Ce signal est ensuite analysé par le logiciel associé à l'appareil.

#### 2.4.5.2. L'interprétation des données

Une fois l'acquisition de la mesure terminée, le logiciel associé au Rhino-Pharyngomètre analyse les données récoltées sous forme d'un graphique type représentant les variations d'aire du 'mur d'ondes' en fonction de la distance parcourue dans la bouche du sujet par rapport aux deux microphones. La distance parcourue est calculée en tenant compte de la vitesse de propagation de l'ultrason dans l'air.

### III. Matériel et méthode

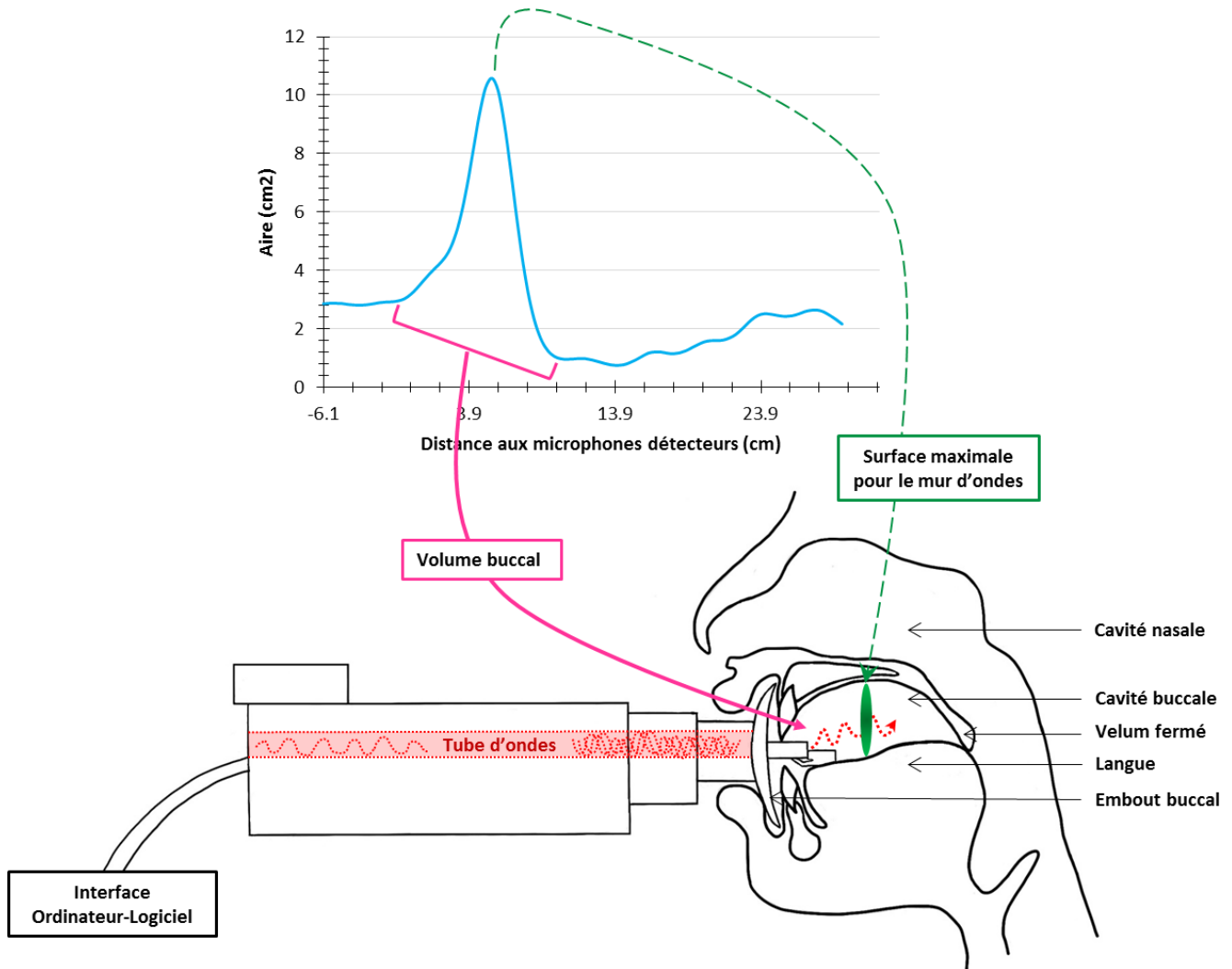


Figure III.19: Courbe de la surface de la bouche d'un sujet (sujet 9) en fonction de la distance aux deux microphones détecteurs obtenue par le Rhino-Pharyngomètre versus sections buccales du sujet.

La courbe de la Figure III.19 présente un pic entre -1,41 cm et 7,16 cm. Ce pic correspond à la section buccale du sujet. La coordonnée -1,41 correspond à l'arrière des dents du sujet et celle 7,16 correspond au fond de la bouche du sujet. L'intégration de l'aire sous ce pic donne le volume buccal du sujet (pour cet exemple 55,9 cm<sup>2</sup>).

#### 2.4.5.3. La méthode de mesure

Le sujet met en bouche l'embout buccal de façon à ce qu'il place sa langue en-dessous de l'embout, ses lèvres par-dessus celui-ci et que le support contenant le 'tube d'onde' soit maintenue horizontalement (voir Figure III.19). Le sujet ne doit pas serrer les dents, afin que les ondes acoustiques puissent parcourir sa bouche et ne soient pas réfléchies directement sur ses dents. Le sujet doit respirer par le nez durant la

### III. Matériel et méthode

---

mesure de façon à garder son vélum fermé. Si le sujet respire par la bouche durant la mesure, le volume qui sera mesuré correspondra à celui de sa bouche et de son pharynx.

**Les variables physiologiques retenues sont les suivantes: Volume buccal, viscosité des salives, flux salivaire, concentration en protéines totales, concentration en lipocalines et activité amylasique.**

### Partie 3 : Les traitements statistiques

L'ensemble des traitements statistiques suivants sont réalisés à l'aide du logiciel R<sup>®</sup> (R 2.14.1, Vienne, Autriche).

#### 3.1. L'analyse de la variance à plusieurs facteurs

Afin d'évaluer l'effet des facteurs testés au cours de l'approche *in vivo* et *in vitro*, des analyses de la variance à plusieurs facteurs sont réalisées sur chacune des variables mesurées. L'impact des facteurs et de leurs interactions sur les différentes réponses mesurées est estimé à l'aide de la p-value issue de ce test statistique. En effet cette valeur mesure le risque d'erreur de première espèce, c'est-à-dire le risque de rejeter l'hypothèse nulle ( $H_0$  = non significativité du facteur) sachant que celle-ci est vraie. Une analyse de la variance à plusieurs facteurs est réalisée sur ces facteurs. En effet, dans ces conditions ce test permet de réduire considérablement le risque d'erreur de seconde espèce, c'est-à-dire le risque d'accepter l'hypothèse nulle alors qu'elle est fausse.

#### 3.2. Le test post-hoc

A l'issue de l'analyse de variance, lorsqu'un effet est significatif et qu'il y a plus de 2 niveaux, afin de comparer les différentes moyennes entre elles, un test post-hoc est utilisé. Dans notre étude nous avons choisi d'utiliser le test HSD (Honestly Significant Difference) de Tukey à une p-value inférieure à 5%. Ce test présente moins de risque d'erreur de seconde espèce (accepter  $H_0$ , alors que  $H_1$  est vraie) que le test SNK (test de Newman-Keuls) (Anthony Hilton, 2006).

#### 3.3. Le calcul des coefficients de corrélation

Afin de mettre en évidence des corrélations entre les différentes réponses mesurées, des coefficients de corrélation de Pearson sont calculés sur leurs valeurs centrées réduites. En plus d'une valeur de corrélation comprise entre -1 et 1, la p-value pour chacune de ces corrélations est calculée, permettant d'évaluer la significativité de ces dernières.

#### 3.4. L'analyse en composante principale

L'analyse en composante principale (ACP) est une technique multivariée qui facilite l'analyse d'un tableau de données dans lequel des observations sont décrites par plusieurs variables quantitatives inter-corrélées (Abdi, *et al.*, 2010).

### III. Matériel et méthode

---

Son objectif est d'extraire les informations importantes du tableau de données afin de le représenter sous forme d'un ensemble de nouvelles variables orthogonales appelées composantes principales. Les contributions et coefficients calculés au cours de cette analyse permettent d'établir un modèle de similarité entre les observations et entre les variables sous forme de points sur une carte.

Au vu du nombre élevé d'observations dans ces tableaux, le calcul d'ellipses de confiance est réalisé (Husson, *et al.*, 2005). Ces ellipses de confiance sont construites à partir de l'équation suivante :

$$\left(\frac{x}{\sigma_x}\right)^2 + \left(\frac{y}{\sigma_y}\right)^2 = 5,991$$

$x$  est la coordonnée de l'ellipse sur l'axe des abscisses

$y$  est la coordonnée de l'ellipse sur l'axe des ordonnées

$\sigma_x$  est l'écart-type de l'abscisse des points

$\sigma_y$  est l'écart-type de l'ordonnée des points

**5,991** est une valeur de la table du Chi2 (pour un degré de liberté de 2 et un risque de première espèce de 0,05) qui répond à l'équation  $P(s < 5,991) = 1 - 0,05 = 0,95$ , avec  $s$  qui définit l'échelle de l'ellipse, dont la valeur doit être choisie en fonction du niveau de confiance voulu (95% dans notre cas).

Ceci nous permet de voir comment les différentes catégories d'observations (Sujets, Molécules, Etats physiologiques) se répartissent sur la carte du modèle.



# *Résultats*





# IV. Résultats

---

## Partie 1 : L'approche *in vitro*

### Chapitre I: L'impact respectif des protéines salivaires, mucines et alpha-amylase sur la libération des molécules odorantes

#### 1. Introduction

Différentes études ont reporté une différence entre la perception ortho et rétronasale de la même molécule, indiquant un effet des processus oraux (Burdach, *et al.*, 1984; Kuo, *et al.*, 1993; Voirol, *et al.*, 1986). Parmi les différents facteurs oraux, l'impact de la salive sur la libération des arômes a été mis en évidence par des expériences *in vitro*. De plus, différentes études sur la perception de la flaveur ont expliqué la variabilité interindividuelle de perception par les variations de compositions en protéines salivaires. En effet, près de 1200 protéines salivaires ont été identifiées avec de fortes variations de concentration selon les individus (Denny, *et al.*, 2008). Cependant, les articles de la littérature suggèrent que les effets de la salive sur la libération des molécules odorantes se limitent aux seuls effets de la mucine (van Ruth, *et al.*, 2001a). Des études récentes ont montré que la concentration en alpha-amylase, une des protéines les plus abondantes dans la salive diffère selon les individus, ce qui pourrait impacter la libération et la perception des arômes (Perry, *et al.*, 2007b). Néanmoins le rôle de cette protéine sur la libération des arômes n'a pas encore été étudié. Afin de mieux comprendre, l'effet de l'alpha-amylase sur la libération des molécules odorantes en comparaison avec celui de la mucine et de la salive humaine, une première approche *in vitro* a été mise en place. Cette approche a consisté à étudier l'effet de rétention de la salive humaine sur la libération des molécules odorantes en considérant la contribution respective de la mucine et de l'alpha-amylase salivaire. Deux séries de cinq molécules odorantes avec une augmentation de la longueur de la chaîne aliphatique ont été retenues pour cette étude : 5 esters et 5 cétones. Cette étude a fait l'objet d'une publication dans la revue internationale à comité de lecture *Food Research International* (publication n°1). Un complément à cette publication a été réalisé afin de présenter l'identification des produits issus de la réaction entre la salive et les molécules odorantes, à l'aide de différentes techniques.

## IV. Résultats

---

### 2. Etude de l'effet respectif des protéines salivaires, de la mucine et de l'alpha-amylase sur la libération des molécules odorantes

#### **Publication 1: Respective impact of the salivary proteins, mucin and $\alpha$ -amylase, on aroma release**

Sandy Pagès-Hélary<sup>1,2,3</sup>, Isabelle Andriot<sup>1,2,3</sup>, Elisabeth Guichard<sup>1,2,3</sup>, Francis Canon<sup>1,2,3</sup>

*1 INRA, UMR1324 Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation, F-21000 Dijon, France*

*2 CNRS, UMR6265 Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation, F-21000 Dijon, France*

*3 Université de Bourgogne, UMR Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation, F-21000 Dijon, France*

#### **Keywords**

Saliva; mucin;  $\alpha$ -amylase; aroma; air/liquid partition coefficient; hydrophobic effect.

## IV. Résultats

---

### Abstract

As great differences were observed in the amount of  $\alpha$ -amylase in human saliva, there is a need to better understand the effect of this protein alone or in mixture with mucin on aroma compounds partitioning. We report the respective role of mucin and  $\alpha$ -amylase on the air/liquid partition coefficients of two series of 5 methyl-ketones and 5 ethyl-esters. We confirm that mucin affects the release of aroma compounds and, for the first time, we demonstrate the ability of  $\alpha$ -amylase to decrease the release of aroma compounds. For both proteins, we report the involvement of hydrophobic effects. Interestingly, no cumulative effect was observed when both proteins were mixed together in solution. We hypothesize that protein-protein interactions occur between the two proteins and decrease the total number of available binding sites for aroma compounds. The effect of human saliva is also investigated and compared to the one of artificial salivas. In presence of human saliva the release of ketones is lower than in water and slightly higher than in the presence of artificial saliva composed of  $\alpha$ -amylase and/or mucin. Esters are more affected by the presence of human saliva than ketones. This observation is due to the presence of an esterase activity in saliva, which activity increases with the hydrophobicity of esters. The difference observed in aroma release between artificial and human salivas could be explained by the presence of other salivary proteins in human saliva.

## IV. Résultats

---

### 2.1. Introduction

Flavour is one of the most important organoleptic properties of food regarding consumer acceptability. Therefore, the mechanisms involved in the release of flavour compounds during food consumption are a particular subject of interest. Regarding the release of aroma compounds, the global mechanism could be divided in three steps. During the first step, aroma compounds are released from food to saliva during food breakdown in the mouth. Then, they are partitioned between saliva and the air phase in the oral cavity. The intermittent aperture of the velum allows the transfer of aromatized air from the oral to the nasal cavity (Buettner, *et al.*, 2001a), mostly during masticatory activity and swallowing events (Repoux, *et al.*, 2012b). Finally, they reach the olfactory mucosa, where they bind to the olfactory receptors (Gaillard, *et al.*, 2004).

Several studies have reported a difference between retronasal and orthonasal perception of the same odorant molecule, indicating an influence of the oral processing and physiology on aroma perception (Burdach, *et al.*, 1984; Kuo, *et al.*, 1993; Linforth, *et al.*, 2002; Voirol, *et al.*, 1986). Among the different factors influencing the release of volatile compounds, the impacts of saliva (Genovese, *et al.*, 2009) and of oral volume (Mishellany-Dutour, *et al.*, 2012c) were evidenced. Saliva, which results of blood filtration, is composed at 99% of water, but it also contains numerous inorganic salts and organic compounds such as proteins (Humphrey, *et al.*, 2001). The total protein concentration ranged between 1 and 3.5 mg.mL<sup>-1</sup> (Bennick, 1982a; Neyraud, *et al.*, 2009b), although higher concentrations have been reported (Ferguson, 1999). The proteomic analyses of saliva have identified 1166 proteins (Denny, *et al.*, 2008). Some of these proteins are able to interact with food molecules and play a role in flavour. For example, proline rich-proteins are involved in astringency as these proteins can bind and aggregate tannins, which are at the origin of this sensation (Canon, *et al.*, 2013a; Canon, *et al.*, 2013b). Therefore, different investigations on flavor perception have evoked the variation in salivary protein composition to explain inter-individual variability in flavor perception (Dsamou, *et al.*, 2012; Mounayar, *et al.*, 2013a; Poette, *et al.*, 2013). Regarding aroma release from food matrices, a lot of studies have demonstrated that proteins can interact and bind to aroma compounds and that the nature and strength of the interactions depend on both the type of macromolecules and aroma compounds (Guichard, 2006; Lorrain, *et al.*, 2013; Mitropoulou, *et al.*, 2011; Rodriguez-Bencomo, *et al.*, 2011; Villamor, *et al.*, 2013). The effect of saliva addition to model wine modified the release of aroma compounds in the vapour phase (Mitropoulou, *et al.*, 2011). This effect depends on the type of wine and differs between human and artificial saliva suggesting that other salivary proteins than mucin can affect the release of aroma compounds (Genovese, *et al.*, 2009). Moreover, there is an important variability in saliva composition between individuals (Quintana, *et al.*, 2009). For example, Perry *et al.* (Perry, *et al.*, 2007b) have reported great differences in the amounts of  $\alpha$ -amylase in saliva through the study of different populations. In addition, the composition of the salivary peptidome is modified with the age of the subject and with his diet (Morzel, *et al.*, 2012). Therefore, it has been

## IV. Résultats

---

suggested that differences in salivary protein composition could be at the origin of inter-individual variation in aroma release (Piombino, *et al.*, 2014; Repoux, *et al.*, 2012d). As different proteins can interact with aroma compounds and as there is an important variability in protein saliva composition, it is of interest to understand if the protein composition of saliva impacts the release of aroma compounds. Surprisingly, previous investigations in simple model systems have reported no significant difference between human saliva and artificial saliva containing only mucin on aroma release (Benjamin, *et al.*, 2012; van Ruth, *et al.*, 2001a). These results suggest that the effect of salivary proteins on aroma release can be assimilated to the effect of one protein: mucin. Among the few results on the effect of other salivary proteins on aroma compounds partitioning, it has been reported that the addition of  $\alpha$ -amylase to an artificial saliva containing mucin does not significantly affect aroma release (van Ruth, *et al.*, 1995b). To our knowledge, beside this study, the effect of  $\alpha$ -amylase on aroma release has never been clearly investigated, despite the fact that  $\alpha$ -amylase is one of the most abundant proteins in saliva (Schenkels, *et al.*, 1995b). Therefore, to address the lack of clear information on the effect of  $\alpha$ -amylase, we have investigated the effect of this protein alone or in mixture with mucin on the air/liquid partitioning of aroma compounds. As hydrophobic effects are generally the main non-covalent interactions driving the binding of aroma compounds onto proteins (Damodaran, *et al.*, 1980, 1981; Guichard, 2006; Tavel, *et al.*, 2008b), two series of linear aliphatic volatile compounds, five methyl ketones and five ethyl esters, were chosen in order to determine the role of these aroma-protein interactions on aroma compounds partitioning. These molecules cover a wide-range of hydrophobicity, characterized by the  $\log P$  value (octanol-water partition coefficient). Their air/liquid partition coefficients were determined in water, in buffer solution, in human saliva and in three artificial salivas containing mucin,  $\alpha$ -amylase or a mixture of mucin and  $\alpha$ -amylase.

### 2.2. Matériels and methods

#### 2.2.1. Human saliva

Human saliva (hs) was constituted by a pool of stimulated saliva coming from 15 volunteers (6 females and 9 males, aged 24-60). The subjects were asked to avoid eating or drinking (although water was allowed) for at least 1 h before saliva collection. Stimulated saliva was collected by asking the subjects to chew a piece of Parafilm (American National Can, Chicago, IL) and then to spit out their saliva at regular intervals (Neyraud, *et al.*, 2012b). Two saliva collections were organized the same day: one in the morning and one in the afternoon. All saliva samples were immediately stored at 4°C after each individual collection and then pooled, the same day as the collection, to obtain a total volume of 800 mL. This pool was divided in aliquots of 20 mL stored at -20 °C until use and for a maximal time of two weeks. Before freezing and after defrost of the saliva, the pH was  $8.3 \pm 0.01$  and the viscosity was 6.9 mPas at 20.7 °C, 1500 s<sup>-1</sup>, 30 s.

## IV. Résultats

---

Usually, the pH of human saliva is comprised between 5.56 and 7.41, but pH values up to 8.5 have been reported (Neyraud, *et al.*, 2009b). Variation in pH can affect the charge of proteins and therefore their conformation (Canon, *et al.*, 2011 ; Giuliani, *et al.*, 2012). However, Friel *et al.* did not find any significant difference on the retention of aroma compounds by mucin for pH values comprised between 6.5 and 8.5. The basicity of the saliva observed here is probably due to the fact that bicarbonate is the main buffer of saliva and could be converted into CO<sub>2</sub> by anhydrase carbonic. As the partial pressure of CO<sub>2</sub> is higher in saliva than in air, the loss of CO<sub>2</sub> leads to a decrease in bicarbonate and therefore an increase in pH (Bardow, *et al.*, 2000). Regarding the effect of the storage on saliva, we verified that the retention of ethyl heptanoate and 2-heptanone by human saliva was not modified after storage at -20°C.

The protocol for saliva collection was submitted to an Ethics Committee and was approved on 17<sup>th</sup> April of 2008 by the Comité de Protection des Personnes Est-1 (N°2008/15) and on 8<sup>th</sup> August of 2008 by the Direction Générale de la Santé - France (N° DGS2008-0196).

### 2.2.2. Preparation of artificial salivas

Water solution (w) was deionized MilliQ water (18.2 mΩ.cm<sup>-1</sup>, Millipore Corporation Billerica, MA, USA). A buffer solution was made-up using the following components: NaHCO<sub>3</sub> (5.208 g.L<sup>-1</sup>), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 3H<sub>2</sub>O (1.369 g.L<sup>-1</sup>), NaCl (0.877 g.L<sup>-1</sup>), KCl (0.477 g.L<sup>-1</sup>), and CaCl<sub>2</sub>, 2H<sub>2</sub>O (0.441 g.L<sup>-1</sup>) (van Ruth, *et al.*, 2001a). Three artificial salivas were constituted by addition in the buffer solution of mucin (2.16 g.L<sup>-1</sup>) for the mucin artificial saliva (m), α-amylase (200000 U.L<sup>-1</sup>) for the α-amylase artificial saliva (a) and α-amylase (200000 U.L<sup>-1</sup>) with mucin (2.16 g.L<sup>-1</sup>) for the artificial saliva composed of mucin and α-amylase (ma) in the concentrations used by Van Ruth *et al.* (van Ruth, *et al.*, 2001a). Mucin from bovine submaxillary salivary glands and human α-amylase were purchased from Sigma Aldrich (Sigma Aldrich, St Quentin Fallavier, France). Before each experiment, fresh artificial salivas were prepared, therefore NaN<sub>3</sub>, usually used as bacterial growth inhibitor, was not added to the solution in order to avoid any effect of this molecule on aroma release (direct interactions or modifications of the protein structure).

The pH of the artificial saliva and buffer solution was adjusted using sodium hydroxide NaOH to 8.3±0.01, which was the pH of the defrosted human saliva. The viscosity of artificial saliva solutions was comprised between 6.6 and 7 mPa.s (20.7 °C, 1500 s<sup>-1</sup>, 30 s).

### 2.2.3. α-amylase activity

The α-amylase activity was measured in human and artificial saliva containing α-amylase using the amylase CNPG3 assay kit (BIOLABO, Maizy, France), in order to compare the amount of α-amylase in all

## IV. Résultats

saliva samples. After addition of a solution of 2-chloro-p-nitrophenyl- $\alpha$ -D-maltotrioxide (CNPG3) at  $2.25 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ , the tested solution was diluted 4,000-fold in NaCl solution at 9g/L. The degradation of CNPG3 by  $\alpha$ -amylase activity is directly proportional to 2-chloro-4-nitrophenol (CNP) concentration, which can be determined by absorbance measurement at 405 nm. A standard curve was established with six different concentrations using a serum containing  $\alpha$ -amylase with an activity comprised between  $2.25 \text{ U.mL}^{-1}$  and  $42 \text{ U.mL}^{-1}$  (Exatrol-N, BIOLABO, Maizy, France). The  $\alpha$ -amylase activity was expressed in International Enzyme Unit Activity (U) per L. One U is defined as the amount of the enzyme that catalyses the conversion of  $1 \mu\text{mol}$  of substrate per minute.

### 2.2.4. Aroma compounds

Aroma compounds were purchased from Sigma Aldrich (Sigma Aldrich, St Quentin Fallavier, France): 2-propanone, 2-hexanone, 2-heptanone, 2-octanone, 2-nonanone, ethyl propanoate, ethyl butanoate, ethyl pentanoate, ethyl hexanoate, ethyl heptanoate (Table IV.1). A gas chromatography - flame ionization detector (GC-FID) analysis confirmed the purity of all aroma compounds (>99%).

Stock solutions of aroma compounds were prepared in propylene glycol at a concentration of  $0.1 \text{ mol.L}^{-1}$  and stored at  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Tableau IV.1: List of aroma compounds with their molecular weight in  $\text{g.mol}^{-1}$  (Mw), hydrophobic constant (log P), Solubility in water at  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  in  $\text{mol.L}^{-1}$  (Sol).

Aroma Compound	Mw*	logP*	Sol*	$\Delta\text{vapH}^{*a}$	GC oven temperature
<b>Methyl ketones</b>					
2-propanone	58	-0.24	$3.79 \cdot 10^{+00}$	31	$45^\circ\text{C}$
2-hexanone	100	1.24	$7.75 \cdot 10^{-02}$	43	$80^\circ\text{C}$
2-heptanone	114	1.73	$1.88 \cdot 10^{-02}$	47.2	$95^\circ\text{C}$
2-octanone	128	2.22	$6.91 \cdot 10^{-03}$	39.8	$100^\circ\text{C}$
2-nonanone	142	2.71	$1.20 \cdot 10^{-03}$	56.4	$125^\circ\text{C}$
<b>Ethyl esters</b>					
Ethyl propanoate	102	1.36	$1.05 \cdot 10^{-01}$	39.1	$60^\circ\text{C}$
Ethyl butanoate	116	1.85	$2.37 \cdot 10^{-02}$	42	$70^\circ\text{C}$
Ethyl pentanoate	130	2.34	$7.12 \cdot 10^{-03}$	46.1	$90^\circ\text{C}$
Ethyl hexanoate	144	2.83	$2.14 \cdot 10^{-03}$	51.7	$95^\circ\text{C}$
Ethyl heptanoate	158	3.32	$6.45 \cdot 10^{-04}$	55.8	$110^\circ\text{C}$

\*Values calculated by EPISUITE 4.00 software (US Environmental Protection Agency)

a <http://webbook.nist.gov/chemistry>.

## IV. Résultats

---

### 2.2.5. Static Equilibrium Headspace Analysis

Stock solutions of aroma compounds were further diluted into water, buffer, artificial saliva solutions and human to obtain a final aroma compounds concentration of  $1.10^{-4}$  mol.L<sup>-1</sup>, which is below the solubility threshold of the tested compounds in water. The final pH was  $8.3 \pm 0.01$  for all solutions. In order to avoid any aroma competition for protein binding sites, we chose to analyse aroma compounds one by one. The final solutions (5 mL) were put into 20.46 mL headspace vials (Supelco, Bellefonte, PA, USA). The headspace vials were immediately sealed with silicone septa in magnetic caps (Supelco). The experiments were performed at a temperature of 30°C, which is in the range of the temperature measured in the mouth when consuming cold beverages (between 22 and 33°C) (Engelen, *et al.*, 2003a). Moreover many air/liquid partition coefficients are available at this temperature. The time needed to reach the static equilibrium was determined in all artificial saliva during preliminary experiments with a mixture of aroma compounds from different chemical classes and log *P* values, including ethyl propanoate, octan-2-one and nonan-2-one. The headspace vials were placed in the incubator of an automatic headspace sampler (GERSTEL MPS 2, Gerstel Inc., Mülheim an der Ruhr, Germany) and equilibrated at 30°C until a static equilibrium was attained (40 min). One mL sample of headspace was taken automatically using a preheated (35 °C) 2.5 mL gas-tight syringe (Gerstel, manufactured by SGE, Victoria, Australia) and analysed by gas chromatography (TRACE GC Ultra, Thermo Electron, Milan, Italy). The injector temperature was set at 240 °C. A capillary DB-Wax column (30 m, 0.32 mm i.d., 0.5 µm; Agilent J&W Scientific, Folsom, CA, USA) and a flame ionisation detector set at 250 °C were used. The carrier gas was hydrogen at a velocity of 0.03 cm<sup>3</sup>.s<sup>-1</sup> in split mode (1/10). For each aroma compound, an oven isothermal temperature was preliminary determined in order to obtain a retention time comprised between 2 and 5 minutes and used during the present experiments (Table IV.1). All experiments were performed in triplicate. In order to compare the effect of saliva composition on aroma release and to avoid day-to-day variations, for each aroma compound, all the studied media were analysed the same day.

### 2.2.6. Calculation of air/liquid partition coefficient

For each aroma compound, a calibration curve was established by GC/FID in the same analytical conditions reported above and using a liquid injection (1µL) of a solution of aroma compounds in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> ( $10^{-5}$  to  $10^{-2}$  mol.L<sup>-1</sup>). The calibration curves were used to determine the concentration of each aroma compound in the gas phase (Chana *et al.*, 2006). Then, the partition coefficient of compound *i* in medium *m*,  $K_{im} = C_{ivap}/C_{im}$ , where  $C_{ivap}$  is the molar concentration of compound *i* in the gas phase and  $C_{im}$  is the molar concentration of compound *i* in the medium, was calculated. As  $C_{ivap} \ll C_{im}$ ,  $C_{im}$  can be approximated by the initial concentration in the medium.



## IV. Résultats

---

### 2.2.7. Analysis of ester degradation in human saliva

To test the hypothesis that esters are transformed into acid due to the presence of an esterase activity in the human saliva, the concentration of esters was measured in the headspace at 30°C at different times (20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200 minutes).

Simultaneously, the production of acid from the degradation of esters was quantified in the liquid phase after dichloromethane extraction. Human saliva samples containing ester were thawed and extracted three times with 1 mL CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> under stirring during 15 min. After extraction, the 3 mL of CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> were pooled and concentrated with a 5 mL Kuderna Danish apparatus to obtain a final volume of 300 µL. Extracts were then analysed by GC/EI-MS (Agilent Technologies, 78 90A GC system, Les Ulis, France). The injector temperature was set at 240°C and a capillary FFAP column (30 m, 0.32 mm, 0.5 µm; Agilent J&W Scientific, Folsom, CA, USA) was used. The carrier gas was helium at a flow rate of 0.03 cm<sup>3</sup>.s<sup>-1</sup> in splitless mode. The GC oven temperature started at 40°C and was increased to 120°C at a rate of 6°C.min<sup>-1</sup> then to 140°C at a rate of 1°C.min<sup>-1</sup>, maintained 10 min at 140°C, then increased to 160°C at a rate of 4°C.min<sup>-1</sup>, then to 240°C at a rate of 6°C.min<sup>-1</sup>.

A calibration curve of heptanoic acid ( $1.58 \cdot 10^{-10}$  to  $7.00 \cdot 10^{-9}$  mol acid in 1 µl CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, R<sup>2</sup> = 0.993) was used to calculate the amount of acid produced by the ethyl heptanoate degradation.

### 2.2.8. Data analyses

Air/liquid partition coefficient calculated in the various media that were studied were submitted to univariate analysis of variance (ANOVA), followed by a mean comparison test (Neuman-Keuls test, 5%), by using R® Software (Version 2.14.1.Ink, Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria).

The ratios of the partition coefficient saliva/water were calculated and then plotted against the log *P* value of aroma compounds. The resulting curves were then fitted using the line curve fitting function in Igor Pro (Version 6.22A, WaveMetrics, Portland, USA).

## 2.3. Results and discussion

### 2.3.1. Air/liquid partition coefficients of ketones and esters in artificial and human saliva

Air/liquid partition coefficients (*K*) are reported in Figure IV.1.A for ketones and Figure IV.1.B for esters.

## IV. Résultats

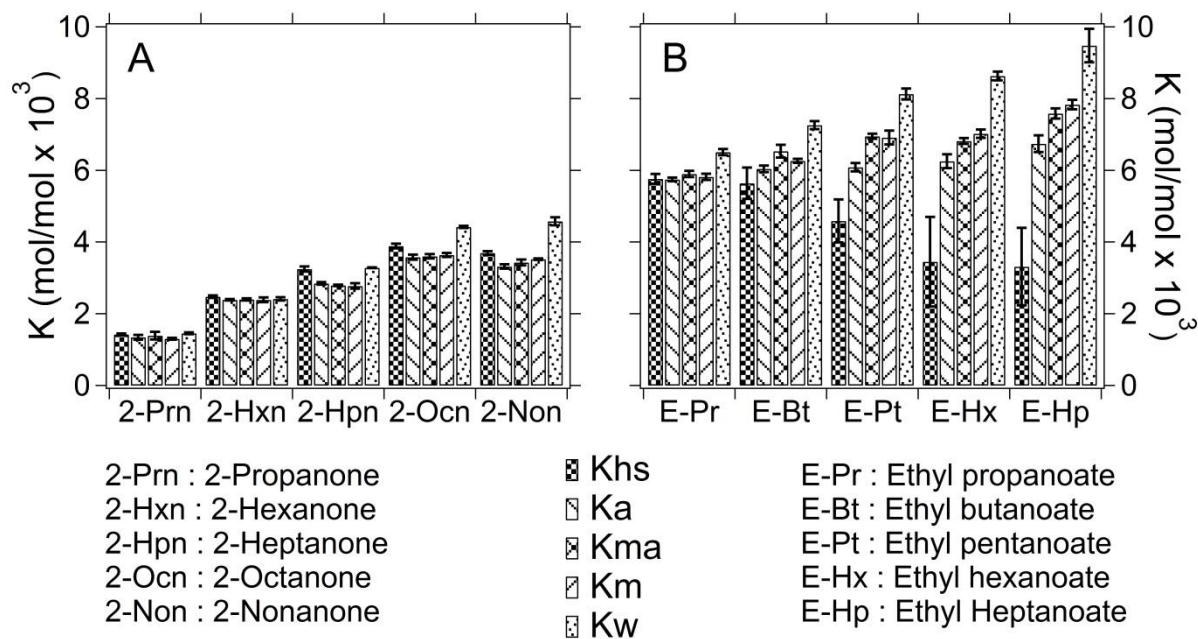


Figure IV.1: Air/liquid partition coefficients (K) of aroma compounds for (A) ketones and (B) esters in presence of water (Kw), mucin in buffer (Km), mucin and α-amylase in buffer (Kma), α-amylase in buffer (Ka), and human saliva (Khs).

As expected, no significant difference was observed between the air/water (Kw) and air/buffer (Kb) partition coefficients for all molecules (data not shown), thus only Kw values are reported and water constitutes the reference medium. For ketones, Figure IV.1.A shows an increase in the air/liquid partition coefficients as a function of ketone aliphatic chain length for all studied media. This increase in air/liquid partition coefficients in function of log *P* value for homologous series of aroma compounds has already been established at a temperature of 25°C by Buttery (Buttery, *et al.*, 1969b) and at 30°C by Merabtine *et al.* (Merabtine, *et al.*, 2010). No significant difference was observed between all media for 2-propanone (*P* value > 0.06) and 2-hexanone (*P* value > 0.1). For the other ketones, 2-heptanone, 2-octanone and 2-nonanone, the air/mucin (Km), air/α-amylase (Ka) and air/(mucin + α-amylase) (Kma) partition coefficients are not significantly different from each other, while Km, Ka and Kma are significantly lower than both Kw and air/human saliva partition coefficient (Khs) (*P* values < 0.001) and Khs is significantly lower than Kw (*P* value < 0.001). In Figure IV.1.B in water and artificial salivas, the air/liquid partition coefficients of esters increase also as a function of ester hydrophobicity, whereas the opposite trend is observed in presence of human saliva. As for ketones, the air/liquid partition coefficients of esters in artificial salivas (Km, Ka and Kma) are not significantly different from each other and significantly lower than air/water partition coefficient (Kw) (*P* value < 0.001). But contrary to ketones, air/human saliva partition coefficients (Khs) of all the esters are significantly lower than air/liquid partition coefficients in other media (*P* value < 0.001). Results obtained in artificial salivas suggest that the salivary proteins mucin and α-amylase are both able to

## IV. Résultats

---

retain methyl ketones and ethyl esters and that these interactions are not specific to a family of proteins as previously observed for several proteins in food matrices (Guichard, 2006). The present observation of the retention of aroma compounds in a solution containing only  $\alpha$ -amylase seems in contradiction with the previous data reported by van Ruth *et al.* (van Ruth, *et al.*, 1995b). Moreover, while previous investigations suggest that artificial saliva containing mucin only and human saliva have similar effects on the behaviour of aroma compounds (van Ruth, *et al.*, 2000), our results show significant differences between artificial and human saliva in function of the protein composition and the nature of aroma compound. Therefore, in the following parts, we will both compare the effect of proteins alone in solution, proteins in mixture and total salivary proteins on aroma partitioning.

### 2.3.2. *Effect of artificial saliva composition on aroma compound release*

In order to gain a deeper understanding on the protein-aroma interactions and the role of hydrophobic effects in such interactions, the relative partition coefficients between saliva media (m, ma, a and hs) and water (w) were calculated for molecules whose the partition coefficients are significantly affected by artificial or human salivas and, then, plotted as a function of the hydrophobicity ( $\log P$  value) of the compounds. The relative partition coefficients give a direct access to the effect of proteins on aroma release.

#### 2.3.2.1. *Effect of artificial saliva composition on aroma compound release*

The ratio between air/mucin and air/water partition coefficients ( $K_m/K_w$ ) is plotted for esters and ketones as a function of their  $\log P$  value on Figure IV.2.A.

## IV. Résultats

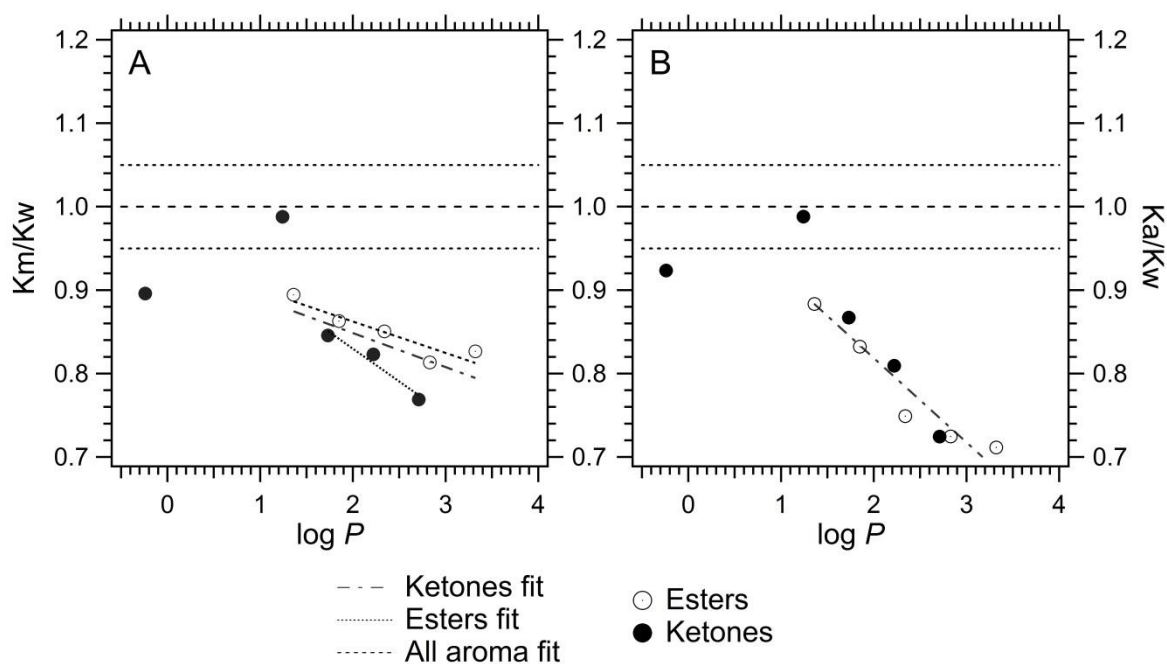


Figure IV.2: Relationship between hydrophobicity ( $\log P$  value) of aroma compounds and their air/liquid partition coefficient in presence of (A) mucin ( $K_m/K_w$ ) and (B)  $\alpha$ -amylase ( $K_a/K_w$ ) relative to water.

All ratios are lower than 1, which indicates that mucin has a retention effect on all aroma compounds. A linear fit function was used to correlate the relative partition coefficients  $K_m/K_w$  with the corresponding  $\log P$  value, for aroma compounds which were significantly affected by the presence of salivary protein (i.e. aroma compounds presenting a  $\log P$  values above 1.3). The slope of the linear correlation is  $-0.041 \pm 0.017$  and its y-intercept is  $0.930 \pm 0.034$ . The correlation coefficient ( $r$ ) is  $-0.71$  and the coefficient of determination ( $r^2$ ) is 0.50. This negative correlation indicates an increase in the retention of aroma compounds by mucin as a function of their hydrophobicity suggesting that aroma molecules interact with mucin mainly due to hydrophobic effects. Mucins have molecular weights ranging from 0.5 to 20 MDa (Bansil, *et al.*, 2006a). They are composed of a long polypeptidic chain highly glycosylated in the central region. This structure presents hydrophobic domains (Bansil, *et al.*, 2006a), which could constitute binding sites of small molecules such as aroma compounds. Van Ruth *et al.* also reported a higher retention of the more hydrophobic aroma compounds by salivary proteins at 37°C (van Ruth, *et al.*, 2001a). However, it should be noticed that the hydrophobic effect does not explain all the variability of our results because the coefficient of determination  $r^2$  is only of 0.50. Therefore, other non-covalent interactions such as electrostatic interactions could be also involved between aroma compounds and the mucin glycosylations (Tromelin, *et al.*, 2010a). Indeed, for a similar  $\log P$  value methyl-ketones exhibit a higher dipole-moment than ethyl-ester, which could be in favor of electrostatic interactions in addition to hydrophobic effects. In their investigation on the effect of mucin on aroma partitioning from solution adjusted at pH 7.0, at 25°C,

## IV. Résultats

---

Friel and Taylor (Friel, *et al.*, 2001) did not observe such correlation between the relative concentration of aroma compounds from different chemical classes in air and the corresponding log *P* value. This suggests that this relation is only valid within homologous series and that other type of interactions could be involved.

For similar log *P* value, ketones seem slightly more retained than esters. For example, 2-nonanone is significantly more retained by mucin than ethyl heptanoate (p value < 0.05). Separated analysis of the correlation between the relative partition coefficients  $K_m/K_w$  of ester with their log *P* value gives a better negative correlation:  $y = -0.037x (\pm 0.0091) + 0.0937 (\pm 0.022)$  ( $r = -0.92$  and  $r^2 = 0.85$ ). For ketones, it is too speculative to discuss the negative correlation obtained, as only three molecules are significantly affected and studied in this analysis.

Figure IV.2.B presents the ratio of *K* values between  $\alpha$ -amylase medium (a) and water (w) as a function of aroma log *P* value. As for mucin, an increase of the aroma retention is observed with the log *P* value for all the esters and for ketones with log *P* values higher than 1.3. Therefore, a linear fit function was used to correlate the relative partition coefficients  $K_a/K_w$  of compounds with their corresponding log *P* value (in the range from 1.3 to 3.5). The slope of the curve is  $-0.101 \pm 0.013$  and the y-intercept is  $1.02 \pm 0.032$  ( $r = -0.95$  and  $r^2 = 0.90$ ). This negative correlation can explain almost all the variability observed, which clearly indicates the involvement of hydrophobic effects in the retention of aroma compounds with linear hydrophobic chain by  $\alpha$ -amylase. Regarding the structure of the proteins,  $\alpha$ -amylase is a globular protein with a well-defined three-dimensional structure (Kandra, *et al.*, 2000; Ramasubbu, *et al.*, 1996a) contrary to mucin. Our results suggest that one or several hydrophobic domain(s) in the  $\alpha$ -amylase structure are available for the binding of hydrophobic molecules such as aroma compounds. The correlations observed for mucin and  $\alpha$ -amylase with the log *P* value of molecules suggest that aroma compounds with a log *P* value higher than 1.5 are more affected by  $\alpha$ -amylase than by mucin. By using a mouth model system under a nitrogen gas flow, Van Ruth (van Ruth, *et al.*, 1995b) did not observe any significant effect of the addition of  $\alpha$ -amylase to artificial saliva containing mucin. However these authors observed different trends according to their experimental conditions. It appears thus necessary to analyse the results obtained with artificial saliva containing both mucin and  $\alpha$ -amylase.

### 2.3.2.2. Effect of mixed mucin and $\alpha$ amylase on aroma release

We thus investigated the effect of mucin and  $\alpha$ -amylase mixed together in solution on the release of aroma compounds. Figure IV.3.A presents the relative partition coefficient between the medium containing both mucin and  $\alpha$ -amylase (ma) and water (w).

## IV. Résultats

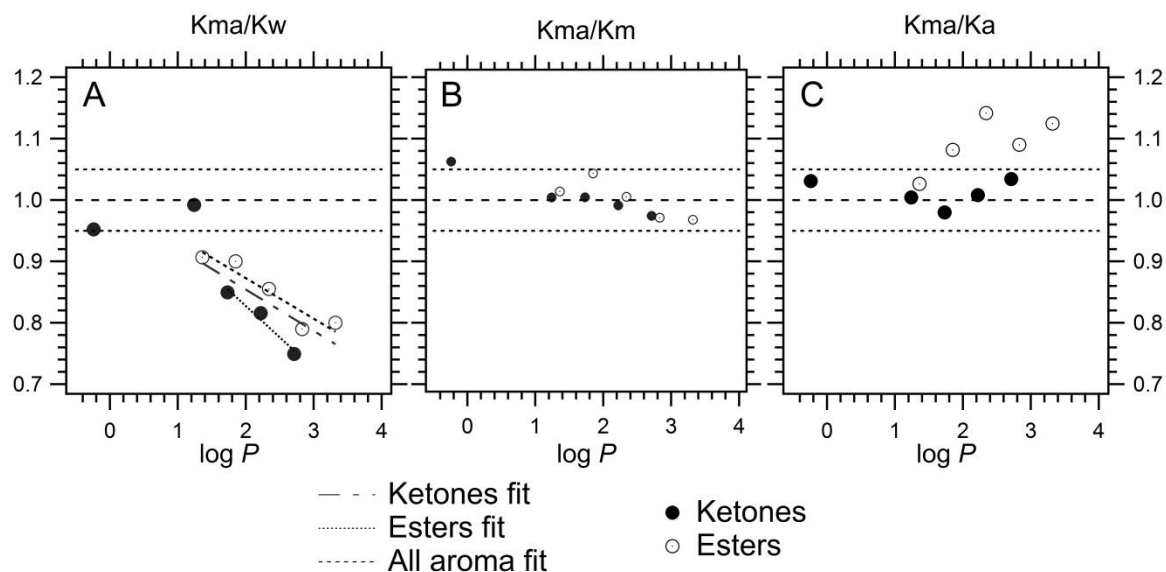


Figure IV.3: Relationship between hydrophobicity ( $\log P$  value) of aroma compounds and their relative air/liquid partition coefficient ( $K$ ) between mucin and  $\alpha$ -amylase and (A) water ( $K_{ma}/K_w$ ), or (B) mucin ( $K_{ma}/K_m$ ) or (C)  $\alpha$ -amylase ( $K_{ma}/K_a$ ).

As for isolated proteins, a decrease in the  $K_{ma}/K_w$  ratio as a function of aroma compound hydrophobicity is observed. The application of a linear fit function gives:  $y = -0.067x(\pm 0.021) + 0.0989(\pm 0.050)$  ( $r = -0.80$  and  $r^2 = 0.63$ ). The slope obtained with the mixture of the two proteins is intermediate between the ones obtained for isolated mucin or  $\alpha$ -amylase. It indicates that the retention of aroma compounds by artificial saliva containing  $\alpha$ -amylase and mucin is not the sum of the effects of isolated proteins. Figure IV.3.B presents the evolution of the relative partition coefficient between the medium containing both mucin and  $\alpha$ -amylase and mucin ( $K_{ma}/K_m$ ) as a function of molecule hydrophobicity ( $\log P$  value), which brings information on the effect of the addition of  $\alpha$ -amylase to a mucin solution on the release of aroma compounds. Almost all ratio values are comprised between 0.95 and 1.05 indicating that the addition of  $\alpha$ -amylase to mucin does not change the retention of aroma compounds. This observation is in agreement with the result obtained by van Ruth (van Ruth, *et al.*, 1995b). Figure IV.3.C shows the evolution of the relative partition coefficient between the medium containing both mucin and  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -amylase ( $K_{ma}/K_a$ ) as a function of molecule hydrophobicity ( $\log P$  value) and highlights the effect of the addition of mucin to artificial saliva containing only  $\alpha$ -amylase. It appears that the addition of mucin does not affect the retention of ketones but reduces the retention of esters. Mucin has the ability to interact with other proteins and to form supramolecular edifices (Soares, *et al.*, 2004). Interestingly, interactions between mucin and  $\alpha$ -amylase have been previously reported in saliva (Iontcheva, *et al.*, 1997). Therefore, protein-protein interactions could be at the origin of our results, as they can modify the protein properties and the ability of each individual protein to interact with other

## IV. Résultats

---

molecules such as aroma compounds. The number of available binding sites of aroma compounds can decrease and consequently affect the retention of aroma compounds by proteins. In the same time, in the presence of mucin in artificial saliva containing  $\alpha$ -amylase the retention of esters is decreased while no effect is observed for ketones.

### 2.3.2.3. Effect of human saliva on aroma compounds partitioning

In order to compare the effects of artificial salivas and human saliva on aroma retention, the partition coefficient ratios between human saliva and water ( $K_{hs}/K_w$ ) were also determined. They are reported as a function of the molecule hydrophobicity ( $\log P$  value) in Figure IV.4. Ketones and esters seem to be differently affected by human saliva.

## IV. Résultats

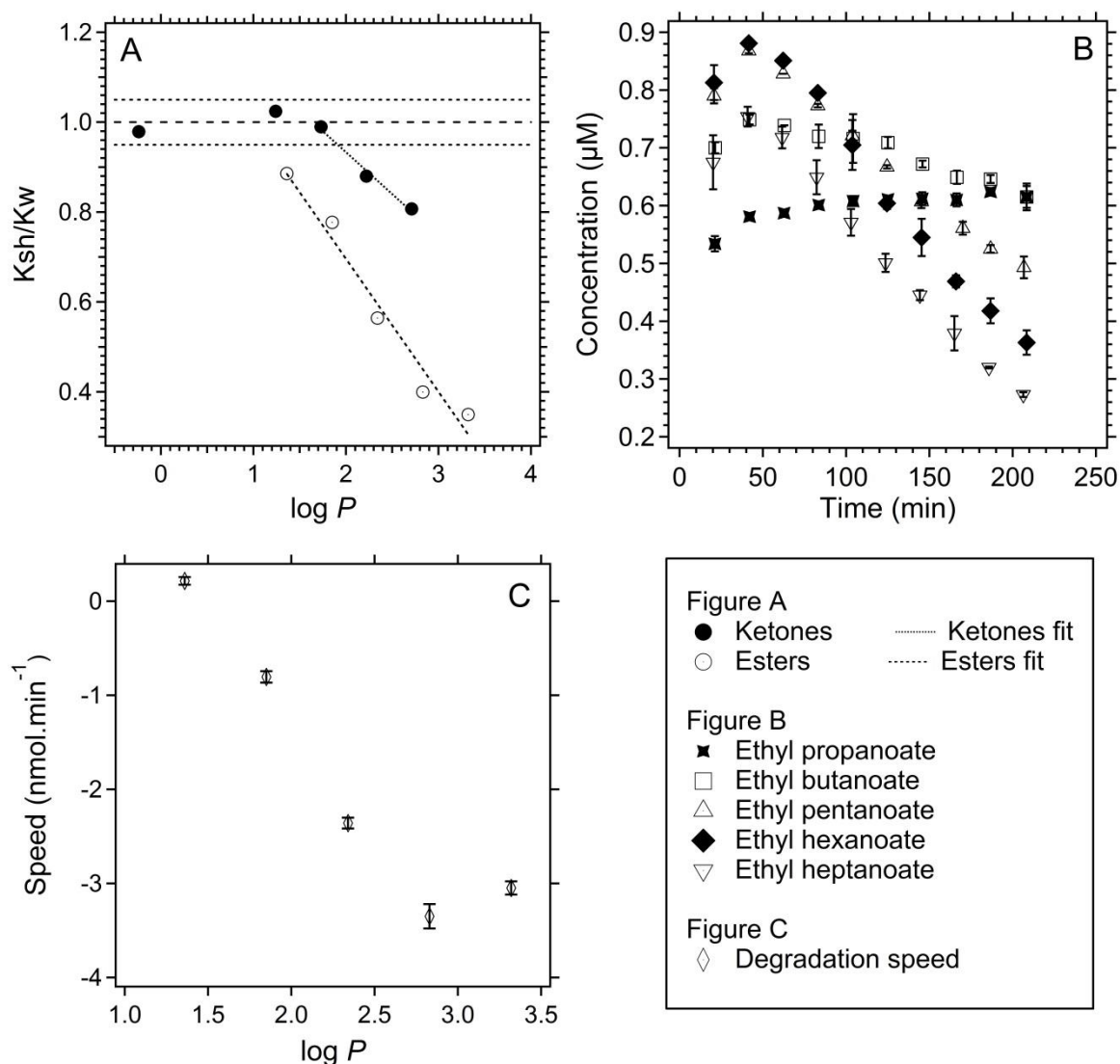


Figure IV.4: (A) Relationship between hydrophobicity ( $\log P$  value) of aroma compounds and their relative air/liquid partition coefficient ( $K$ ) between human saliva and water ( $K_{hs}/K_w$ ). (B) Concentration of ester in air as a function of time. (C) Relationship between the speed of ester degradation and hydrophobicity ( $\log P$  value).

For ketones, the effect of human saliva on air/liquid partition coefficient is only significant (Figure VI.1) for 2-octanone and 2-nonanone, which have  $\log P$  values higher than 2. The comparison between the 2 molecules shows that 2-nonanone, which has the highest hydrophobicity, is more retained by human saliva than 2-octanone. The effect of human saliva on ketone release is probably due to a retention by salivary proteins. The  $K_{hs}$  values of all ketones are higher than their  $K_a$ ,  $K_m$  or  $K_{ma}$ . Therefore, ketones are less retained by human saliva than artificial saliva. This difference could be due to different amount of proteins between artificial and human saliva. However, the concentrations in mucin in the artificial salivary media correspond to those typically observed in human saliva. The activity of  $\alpha$ -amylase was  $180 \pm 3 \text{ UI}\cdot\text{mL}^{-1}$  in



## IV. Résultats

---

human saliva and  $144 \pm 2 \text{ UI.mL}^{-1}$  in artificial saliva. Therefore, the amount of  $\alpha$ -amylase is probably higher in human saliva and could not explain the lower retention of ketones in human saliva than that in artificial salivas. As hypothesized in the case of the artificial saliva containing a mixture of mucin and  $\alpha$ -amylase, this observation could be explained by protein-protein interactions. Such interactions could decrease the amount of available binding sites for aroma compounds onto proteins. In agreement with this hypothesis, the presence of heterogeneous protein supramolecular edifices in saliva has been previously described (Soares, *et al.*, 2004).

For all the studied esters, their air/liquid partition coefficient in presence of human saliva ( $K_{hs}$ ) is lower than the one obtained in presence of water ( $K_w$ ) (Figure IV.1). The Figure VI.4 shows a decrease of the  $K_{sh}/K_w$  ratio of ester as function of their  $\log P$  value. A linear relation was found between the  $K_{hs}/K_w$  ratio and  $\log P$  values (Figure IV.4) which has for equation:  $y = -0.296x (\pm 0.031) + 1.28 (\pm 0.075)$  ( $r = -0.98$  and  $r^2 = 0.97$ ). This negative correlation indicates that an increase in molecule hydrophobicity induces a decrease in the amount of aroma compounds release in the air phase in presence of human saliva.

The comparison between esters and ketones indicates that esters exhibit a lower  $K_{sh}/K_w$  value than ketones for similar  $\log P$  value. The difference of behaviour between esters and ketones in presence of human saliva could be due to strongest interactions between esters and salivary proteins, involving other types of non-covalent interaction in addition to hydrophobic effects, or to esters degradation by human saliva. Indeed, Buettner *et al.* have previously reported an esterase activity of saliva (Buettner, 2002a), corresponding to the hydrolysis of ester into the corresponding acid and alcohol. To confirm this hypothesis, we have recorded the concentration of esters in the air phase as a function of time (Figure VI.5.A). This figure reveals that the ester concentration increases from 5 to 40 minutes, which is the required time to get the thermodynamic equilibrium. From 40 minutes, except for ethyl propanoate, the ester concentration decreases as a function of time. It confirms that in presence of human saliva there is a degradation of esters as a function of time. The composition of the liquid phase was followed through the GC-MS analysis of a dichloromethane extract. This analysis reveals a decrease in ester concentration and the apparition of the corresponding acid (data not shown). The decrease in ester concentrations in the headspace as a function of time and the identification of the corresponding acid in the aqueous phase confirm the hypothesis of an esterase activity in human saliva.

Taking ethyl heptanoate as an example we then calculated the amount of acid produced by the degradation of the ester after 180 minutes. The initial amount of ethyl heptanoate in the 5 mL human saliva sample was of  $5.5 \cdot 10^{-7}$  mole. The production of heptanoic acid was calculated from the calibration curve. A total of  $1.85 \cdot 10^{-7}$  mole of heptanoic acid was produced in the 5 mL sample after 180 minutes, which corresponded to the loss of  $3.11 \cdot 10^{-7}$  mole of ethyl heptanoate at the same time, calculated from the

## IV. Résultats

---

GC data. We checked that no acid was produced from the ester solution without addition of human saliva and that the incubation of human saliva without ethyl heptanoate did not produce the acid. This result confirms the production of heptanoic acid by enzymatic hydrolysis of ethyl heptanoate in presence of human saliva.

From Figure IV.5.A, the rate of ester degradation was determined for each ester by determining the slope value of the concentration curve between 40 and 200 min. The rates of ester degradation are reported in Figure IV.5.B. as a function of ester log  $P$  value. It shows a linear correlation between the rate of ester degradation and their log  $P$  value. The maximal rate of degradation is reached at a log  $P$  value of three. It should be noticed that the log  $P$  value is linearly correlated with the carbon number of the ester aliphatic chain. Therefore, the enzymatic activity is also correlated to the length of the aliphatic chain. This observation is in agreement with the study performed by Buettner on the influence of saliva enzymes on esters (Buettner, 2002a). As the  $K_{hs}/K_w$  ratio of ethyl heptanoate is lower than the one of ethyl hexanoate, we cannot exclude an additional effect of aroma compounds retention by other proteins involving hydrophobic effects. Even if the hydrolysis of esters in our conditions is relatively slow in comparison with real times of consumption, which can vary from a few seconds to a few minutes, this decrease in the amount of esters can impact aroma persistence. During cheese consumption, the analysis of the expired air has revealed a lower persistence of ethyl propanoate than 2-nonanone (Repoux, *et al.*, 2012d). The persistence of 2-nonanone in the expired air could be due to its retention by oral, pharyngeal and/or nasal lubricated mucosa, as observed previously (Doyennette, *et al.*, 2014) and suggested by Normand *et al.* (Normand, *et al.*, 2004) and Buettner and Beauchamp (Buettner, *et al.*, 2010). Until now no experimental results have been obtained on *in vivo* persistence of esters. We could suppose that aroma persistence of esters could be also modified due to their degradation by salivary esterases present in the salivary film.

### 2.4. Conclusions

This investigation highlights the effect of salivary proteins on aroma release and more particularly on ketone and ester release. For the first time, it is clearly demonstrated that both mucin and  $\alpha$ -amylase have the ability to retain aroma molecules. In both case, hydrophobic effects are involved in these aroma-protein interactions. Regarding the effect of  $\alpha$ -amylase on aroma release, the inter-individual variation of  $\alpha$ -amylase concentration in saliva (Perry, *et al.*, 2007b) could be at the origin of variations in aroma release between individuals (Piombino, *et al.*, 2014; Repoux, *et al.*, 2012d). As hydrophobic effects seem mainly at the origin of these protein effects, the differences in the perception of aroma during food consumption by different subjects are more likely to occur for the most hydrophobic molecules. However, the interactions that can occur between mucin and  $\alpha$ -amylase could decrease the total number of available binding sites for

## IV. Résultats

---

aroma compounds on proteins. This study shows also that human saliva has the ability to influence the release of volatile molecules and this effect cannot be totally resumed by using artificial saliva containing only mucin and  $\alpha$ -amylase. It appears important in the future to have a better understanding of both the protein binding sites involved in the retention of aroma compounds and the protein-protein interactions occurring in saliva. Indeed, the difference observed between artificial and human saliva could be explained by the interactions with both mucin and  $\alpha$ -amylase, but also by the presence of other salivary proteins, which could impact the release of specific aroma compounds.

### Chapitre II: L'identification des produits issus de la dégradation des esters par la salive humaine

#### 1. Introduction

L'étude précédente a montré une diminution au cours du temps de la concentration en ester au niveau de la phase gazeuse en présence de salive humaine. Ce phénomène a pu être attribué à une activité estérasique de la salive humaine après analyse de la phase liquide. En effet, cette analyse a révélé la diminution de la concentration des esters étudiés dans la phase liquide ainsi que l'apparition des acides correspondants au cours du temps. Durant cette étude, il a également été mis en évidence l'apparition d'autres produits issus de la dégradation des esters par la salive au cours du temps. Une approche expérimentale basée sur la spectrométrie de masse a permis d'identifier ces composés inconnus, après avoir vérifié que ces derniers n'étaient formés qu'en présence de salive humaine.

#### 2. Identification des molécules issues de la dégradation des esters en présence de salive humaine.

La dégradation de chacun des cinq esters de l'étude précédente a été étudiée séparément. Après une incubation de 200 min à 30°C des esters en présence de salive humaine, les composés inconnus ont été extraits de la salive par une extraction liquide/liquide à l'aide de dichlorométhane. Ces extraits ont ensuite été analysés par GC-EI-MS. Les chromatogrammes du courant ionique total sont présentés dans la Figure IV.5. Les différents chromatogrammes ont été superposés afin de mieux les comparer. Cette figure révèle l'apparition de deux produits de dégradation (U1 & U2) pour chacun des esters dont le temps de rétention augmente avec la masse moléculaire de l'ester étudié. Pour chaque ester, le composé formé U1 est plus abondant que U2.

## IV. Résultats

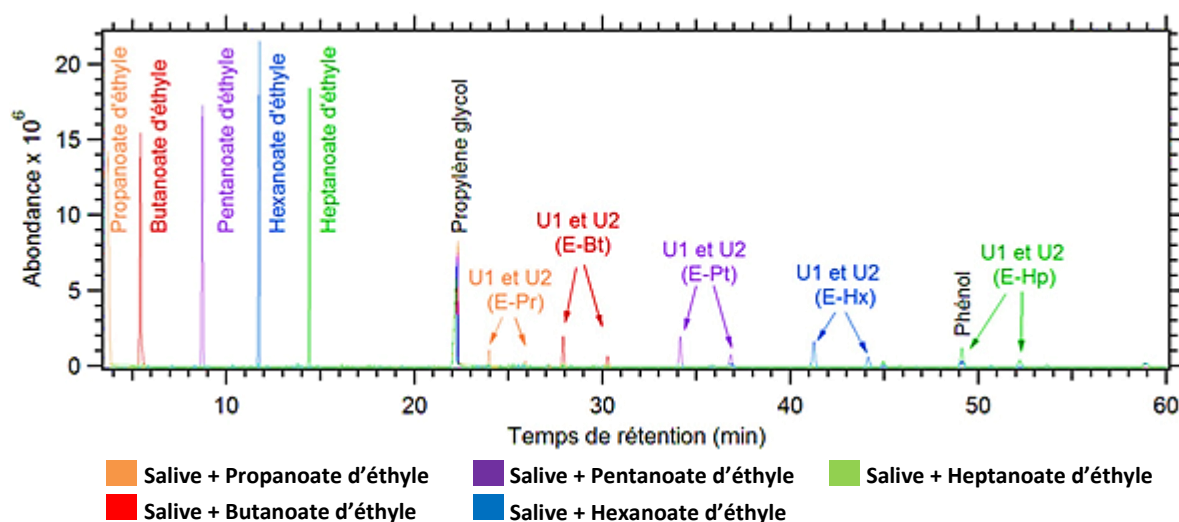


Figure IV.5: Chromatogrammes du courant ionique total superposés résultant de l'analyse par GC-MS des extraits des phases liquides des échantillons 'salive humaine + esters' après 200 minutes d'incubation à 30°C (E-Pr : propanoate d'éthyle, E-Bt : butanoate d'éthyle, E-Pt : pentanoate d'éthyle, E-Hx : hexanoate d'éthyle, E-Hp : heptanoate d'éthyle, U1 : premier nouveau composé, U2 : second nouveau composé).

La présence des pics correspondant aux esters, montre que ces derniers n'ont pas totalement été dégradés par la salive humaine. Les pics des acides issus de cette dégradation ne sont pas observables sur la Figure IV.5, car les échantillons n'ont pas été acidifiés avant extraction, limitant l'extraction de ces acides et favorisant l'extraction des composés U1 et U2. L'intervalle entre les temps de rétention des deux composés inconnus est identique pour les cinq esters. Pour l'heptanoate d'éthyle, le composé U1 est coélué avec le phénol présent dans la salive.

Les spectres de masse correspondant au pic d'élution des composés inconnus ont été comparés aux spectres de fragmentation par impact électronique de composés connus, référencés dans la base de données utilisée au laboratoire (NIST Research sous Agilent). L'interrogation de cette base de données n'a pas permis d'identifier les molécules inconnues.

Afin d'identifier, les composés inconnus la stratégie suivante a été mise en œuvre :

- 1- Identification de la masse moléculaire des composés inconnus par « Gas Chromatography - Chemical Ionization - Mass Spectrometry » (GC-CI-MS).
- 2- Interprétation des spectres de fragmentation obtenus par EI-MS.

Cette démarche est illustrée dans le cas de l'identification des inconnus issus de la dégradation de l'hexanoate d'éthyle.

## IV. Résultats

L'analyse par GC-Cl-MS a été réalisée en utilisant deux gaz ionisants différents : le méthane ( $\text{CH}_4$ ) et l'ammoniac ( $\text{NH}_3$ ). Les spectres de masses obtenus pour l'inconnu U1 dans le cas de l'hexanoate d'éthyle sont présentés en Figure IV.6.

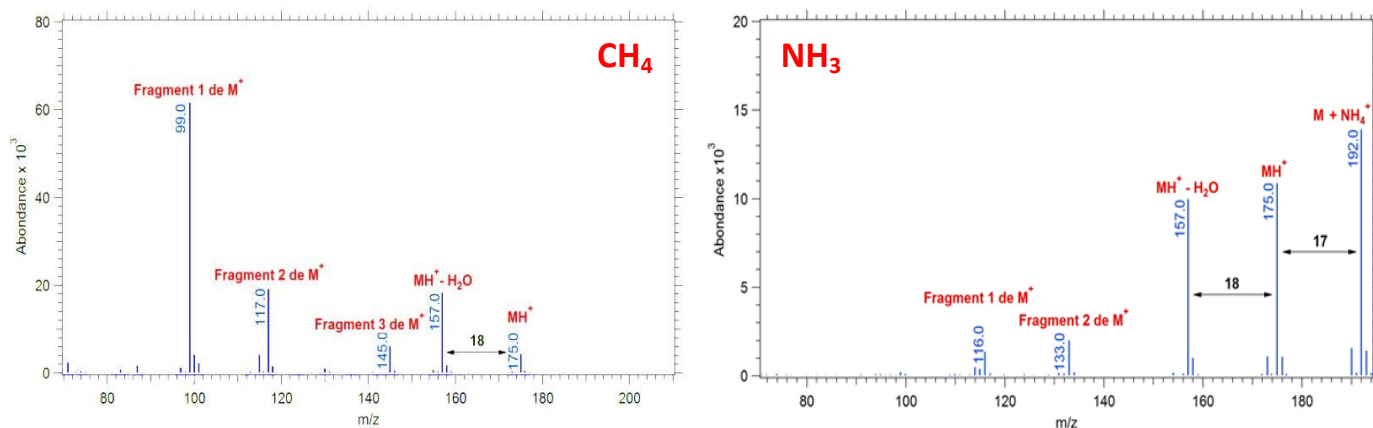


Figure IV.6: Spectre de masse de l'inconnu U1 issu de la dégradation de l'hexanoate d'éthyle par la salive humaine, obtenus par ionisation chimique par méthane à gauche et par ammoniac à droite (M : composé U1 ionisé non fragmenté).

Les pics observés sur ces spectres de masse correspondent tous à des ions mono-chargés facilitant la lecture de ces spectres de masse. L'interprétation de ces spectres indique la présence de l'ion moléculaire ( $\text{MH}^+$ ) à un rapport  $m/z$  de 175. Ces spectres montrent également des pertes de  $\text{H}_2\text{O}$  ainsi que la formation de différents fragments non identifiés. Le spectre obtenu par ionisation chimique en présence d'ammoniac montre la présence d'adduits ( $\text{M} + \text{NH}_4^+$ ) confirmant l'interprétation de l'ion moléculaire. Ainsi, le composé U1 issu de la dégradation de l'hexanoate d'éthyle a une masse moléculaire de 174 g/mol. Une identification similaire réalisée pour les composés U1 et U2 des cinq esters donne les résultats présentés dans le Tableau IV.2.

Tableau IV.2.: Résultats de l'identification des masses moléculaires des composés U1 et U2 par ionisation chimique par ammoniac et méthane.

Esters	Masse moléculaire de U1 et U2 (g/mol)
Propanoate d'éthyle	132
Butanoate d'éthyle	146
Pentanoate d'éthyle	160
Hexanoate d'éthyle	174
Heptanoate d'éthyle	188

Les composés U1 et U2 présentent des spectres Cl-MS similaires. U1 et U2 ont donc la même masse moléculaire. Nous pouvons supposer que ces deux molécules sont des isomères.

## IV. Résultats

L'analyse des formules brutes pouvant correspondre à une masse de 174 g/mol et correspondant à une molécule issue de la dégradation de l'hexanoate d'éthyle donne les possibilités suivantes :

1)  $C_{10}H_6O_3$  2)  $C_{10}H_{22}O_2$  3)  $C_9H_{18}O_3$  4)  $C_8H_{14}O_4$  5)  $C_{12}H_{14}O$

Il s'agit maintenant de déterminer quelle formule brute est la plus probable. Un calcul appelé calcul de contribution isotopique permet de calculer cette probabilité par rapport aux isotopes de chaque atome qui compose les ions observés sur le spectre de masse (McLafferty, 1993). L'abondance théorique calculée et l'abondance expérimentale observée sur le spectre sont ensuite comparées. La formule brute donnant le calcul d'abondance isotopique la plus proche de l'abondance observée sur le spectre de l'inconnu correspond à la formule brute la plus vraisemblable de la molécule à identifier.

Le calcul de la contribution isotopique des différentes possibilités de formule brute a été comparé aux abondances relatives observées sur le spectre de masse obtenu en ionisation chimique avec l'ammoniac. La Figure IV.7 donne l'exemple de la contribution isotopique observée pour l'ionisation chimique à ammoniac du composé U1-Hx. Les mêmes calculs ont été réalisés pour les autres spectres.

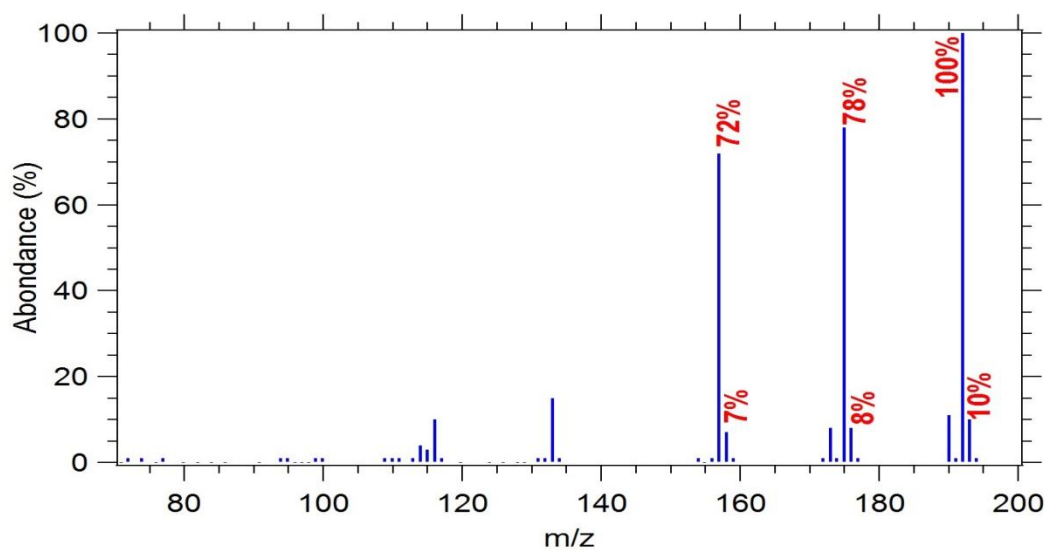


Figure IV.7: Contribution isotopique observée pour l'ionisation chimique à l'ammoniac du composé U1 issu de la dégradation de l'hexanoate d'éthyle par la salive. Calcul réalisé à l'aide du logiciel MSD ChemStation Data Analysis Application.

Le Tableau IV.3 donne un exemple de détail de calcul de la contribution isotopique pour la formule  $C_{10}H_6O_3$ . Les mêmes calculs sont réalisés pour les quatre autres formules.

## IV. Résultats

Tableau IV.3: Calcul de la contribution isotopique de la formule  $C_{10}H_6O_3$ . Les valeurs des probabilités d'obtention de l'isotope de chaque atome sont extraits de l'ouvrage de McLafferty (McLafferty, 1993).

$C_{10}H_6O_3$		
Forme ionique	Formule brute	Contribution isotopique
$MH^+ - H_2O$	$C_{10}H_5O_2$	$(10 \times 1.1) + (5 \times 0.015) + (2 \times 0.04) = 11.155\%$
$MH^+$	$C_{10}H_7O_3$	$(10 \times 1.1) + (7 \times 0.015) + (3 \times 0.04) = 11.225\%$
$M + NH_4^+$	$C_{10}H_{10}NO_3$	$(10 \times 1.1) + (10 \times 0.015) + (3 \times 0.04) + (0.37) = 11.64\%$

La comparaison des données obtenues par ionisation chimique à l'ammoniac et au méthane, aux calculs des contributions isotopiques des différentes formules brutes a permis de retenir la formule brute  $C_9H_{18}O_3$  dans le cas de l'hexanoate d'éthyle. Les mêmes calculs et interprétations ont été réalisés pour les quatre autres esters. Le Tableau IV.4 donne les formules brutes des composés U1 et U2 les plus probables pour les cinq esters.

Tableau IV.4.: Formules brutes des composés isomères U1 et U2 déterminé par calcul isotopique pour les cinq esters.

Esters	Formule brute de U1 et U2
Propanoate d'éthyle	$C_6H_{12}O_3$
Butanoate d'éthyle	$C_7H_{14}O_3$
Pentanoate d'éthyle	$C_8H_{16}O_3$
Hexanoate d'éthyle	$C_9H_{18}O_3$
Heptanoate d'éthyle	$C_{10}H_{20}O_3$

L'étape suivante consiste à interpréter les spectres de fragmentation obtenus par EI-MS sur la base des formules brutes déterminées afin d'identifier la structure des composés inconnus. La Figure IV.8 présente l'interprétation des spectres EI-MS des composés U1 et U2 pour l'hexanoate d'éthyle.



## IV. Résultats

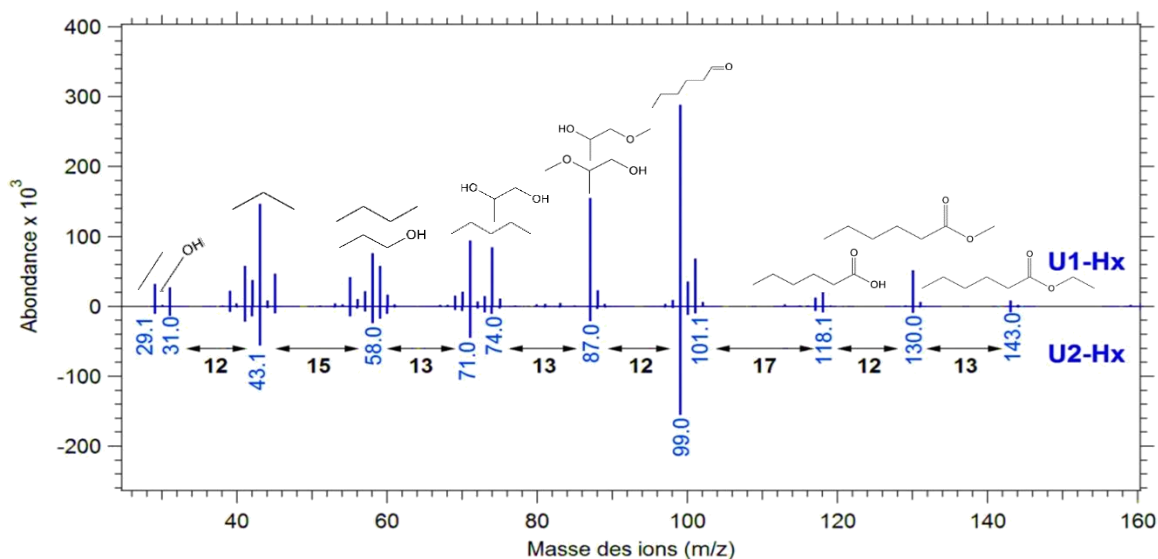
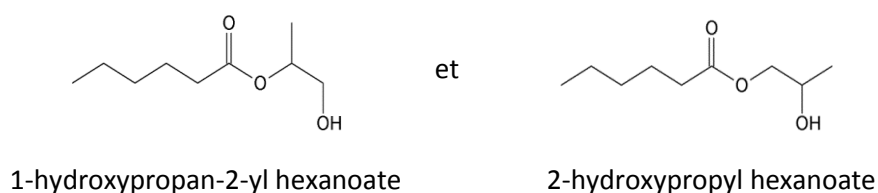
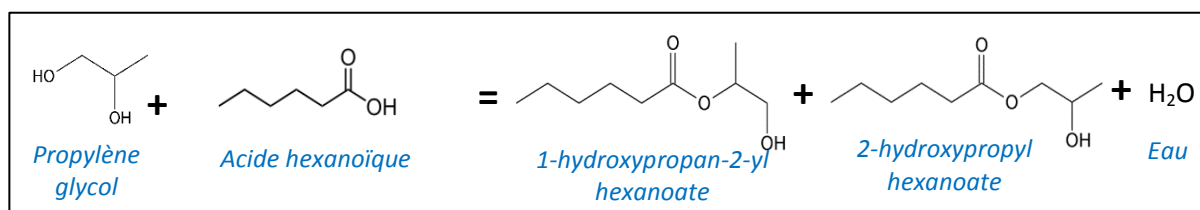


Figure IV.8 : Explication des fragments observés sur les spectres des composés U1 et U2 issus de la dégradation de l'hexanoate d'éthyle par la salive humaine après 200 minutes d'incubation à 30°C. Les 'fragments moléculaires' sont représentés au-dessus de chaque 'fragment de masse m/z' correspondant.

Ainsi, les inconnus U1 et U2 auraient les structures chimiques suivantes :



Après avoir pris en compte les différentes données collectées sur les inconnus U1 et U2 de l'hexanoate d'éthyle, nous supposons que l'apparition des inconnus U1 et U2 proviendrait d'une réaction entre l'acide issu de la dégradation de l'ester et le propylène glycol utilisé pour solubiliser nos molécules odorantes (réaction présentée ci-dessous pour l'hexanoate d'éthyle).



Dans cette réaction la fonction acide carboxylique R-COOH des acides issus de la dégradation des esters, réagit avec une des fonctions alcool OH du propylène glycol. Or, le propylène glycol compte deux fonctions alcool ce qui peut expliquer la production des deux isomères le 1-hydroxypropan-2-yl hexanoate et le 2-hydroxypropyl hexanoate. La correspondance entre ces deux molécules et U1, U2 dépend de l'accessibilité et de la réactivité des deux fonctions hydroxyles du propylène glycol. La fonction la plus accessible et la plus réactive formerait un plus grand nombre d'isomères, expliquant que le composé U1

## IV. Résultats

soit plus abondant que U2. Ces observations sont valables pour les cinq esters. L'identification des composés U1 et U2 pour les cinq esters est présentée dans le Tableaux IV.5. Une analyse par GC-MS de l'extrait organique d'une solution aqueuse contenant un acide carboxylique (acide heptanoïque) et du propylène glycol a permis de confirmer la formation des composés U1 et U2 en présence de ces deux molécules de départ.

Tableau IV.5: Identification des composés U1 et U2 issus de la dégradation des cinq esters par la salive humaine.

Esters	Molécules correspondantes à U1 et U2
Propanoate d'éthyle	1-hydroxypropan-2-yl propanoate 2-hydroxypropyl propanoate
Butanoate d'éthyle	1-hydroxypropan-2-yl butanoate 2-hydroxypropyl butanoate
Pentanoate d'éthyle	1-hydroxypropan-2-yl pentanoate 2-hydroxypropyl pentanoate
Hexanoate d'éthyle	1-hydroxypropan-2-yl hexanoate 2-hydroxypropyl hexanoate
Heptanoate d'éthyle	1-hydroxypropan-2-yl heptanoate 2-hydroxypropyl heptanoate

### 3. Conclusion

L'utilisation d'une approche basée sur la chromatographie en phase gazeuse et la spectrométrie de masse a permis d'identifier les composés inconnus U1 et U2 formés en présence de salive humaine. Les composés U1 et U2 proviendraient d'une réaction entre le propylène glycol des solutions de molécules odorantes de départ et les acides issus de la dégradation des esters. Ces deux composés ne proviennent donc pas d'une réaction directe avec les constituants de la salive. Ce résultat est important et doit être pris en compte, car le propylène glycol est souvent utilisé comme solvant de molécules hydrophobes, comme les molécules odorantes et peut par conséquent, avoir un impact dans certaines expérimentations en présence de molécules réactives telles que les acides carboxyliques.

## IV. Résultats

---

### Partie 2 : L'approche *in vivo*

L'approche *in vitro* présentée dans le chapitre 1 montre que les protéines salivaires (mucine et alpha-amylase) affectent la libération des molécules odorantes en fonction de leur hydrophobicité. La littérature indique également que la composition salivaire en protéines varie selon l'individu et son état physiologique (Neyraud, *et al.*, 2009a; Neyraud, *et al.*, 2012c). Ainsi, nous posons l'hypothèse que la composition salivaire modifie la quantité de molécules odorantes libérées dans la cavité nasale en fonction de l'hydrophobicité de ces dernières. Afin, de vérifier cette hypothèse nous avons mis en place une étude *in vivo* du suivi de la libération de deux molécules odorantes ayant une hydrophobicité contrastée chez 10 sujets dans trois conditions physiologiques.

### Chapitre I : La caractérisation des sujets par leur salive

Ce chapitre aborde l'analyse des paramètres salivaires de 10 sujets en fonction de leur état physiologique, à savoir dans les conditions de repos et après stimulation. Après rinçage de la bouche avec de l'eau, il n'y a par définition pas de salive en bouche pour permettre un prélèvement, Une analyse de la variance est ensuite réalisée prenant en compte les effets 'Sujet', 'Etat physiologique', 'Jour', 'Répétition' et les interactions 'Sujet\*Etat physiologique', 'Sujet\*Jour', 'Sujet\*Répétition'. Le calcul et l'interprétation des coefficients de corrélations entre ces paramètres salivaires sont ensuite effectués. Ce chapitre se termine par une analyse en composantes principales des paramètres salivaires.

#### 1. L'analyse des paramètres salivaires

##### 1.1. Le flux salivaire

Les valeurs des flux salivaires mesurés au repos varient entre 0,35 et 2,18 ml/min avec une moyenne de 0,74 ml/min et ceux mesurés en état stimulé sont compris entre 0,75 et 3,26 ml/min avec une moyenne de 1,68 ml/min. La moyenne globale des flux est de 1,20 ml/min. Ces valeurs sont en accord avec celles de la littérature qui montrent que le flux salivaire est un paramètre dépendant de l'individu et de son état physiologique (Engelen, *et al.*, 2003b; Neyraud.E, 2011). Le flux salivaire va influencer le volume de salive en bouche. Or la quantité de salive en bouche peut influencer la libération des molécules odorantes par voie rétronasale en diluant plus ou moins l'aliment consommé (Genovese, *et al.*, 2014).

## IV. Résultats

---

### 1.2. La viscosité salivaire

Les valeurs de viscosité des salives collectées au repos varient entre 1,6 et 6,06 mm<sup>2</sup>/s avec une moyenne de 3,08 mm<sup>2</sup>/s. Ces valeurs sont du même ordre de grandeur que les valeurs de viscosité rapportées dans la littérature, comprises entre 1.09 et 3.98 mm<sup>2</sup>/s (Sajewicz, 2009).

Les valeurs pour les salives collectées en état stimulé sont comprises entre 1,48 et 2,54 mm<sup>2</sup>/s, avec une moyenne de 1,80 mm<sup>2</sup>/s. Ces valeurs sont du même ordre de grandeur que celles trouvées dans la littérature. Par exemple Christersson *et al* (Christersson, *et al.*, 2000) ont mesuré en état de stimulation une viscosité moyenne de 1,9 mm<sup>2</sup>/s pour un écart-type de 0,2 mm<sup>2</sup>/s.

Les différences de viscosité entre les salives des sujets au repos sont plus importantes qu'après stimulation. La variation de la viscosité de la salive dépend de l'état physiologique du sujet, la moyenne globale des viscosités étant de 2,436 mm<sup>2</sup>/s.

### 1.3. La composition salivaire

La composition salivaire est analysée en mesurant trois paramètres différents : la concentration en protéines totales, l'activité amylasique et la concentration en lipocaline. Ces deux dernières protéines ont été plus particulièrement suivies en raison de leur potentielle capacité à interagir avec les molécules odorantes. En effet, nous avons montré au cours de l'étude *in vitro* de ce travail de thèse que l'alpha-amylase peut modifier la libération des molécules odorantes. Les lipocalines sont des protéines faisant partie de la famille des 'Odorant Binding Proteins' (OBP) connues pour leurs interactions avec les molécules odorantes (Patel, *et al.*, 1997) et sont donc susceptibles d'interagir avec les molécules odorantes.

#### 1.3.1. La concentration en protéines totales

La concentration en protéines totales est mesurée en utilisant la méthode de Bradford pour chacune des salives collectées.

Les valeurs des concentrations en protéines totales varient entre 0,08 mg/ml et 1,97 mg/ml, avec une moyenne de 0,87 mg/ml pour les salives au repos. Les salives collectées en état stimulé ont des concentrations protéiques entre 0,35 mg/ml et 1,22 mg/ml, avec une moyenne de 0,63 mg/ml. La moyenne globale de la concentration en protéines totales des salives est de 0,750 mg/ml. Ces concentrations sont légèrement plus faibles que celles trouvées dans la littérature, mais restent du même ordre de grandeur. Nous pouvons par exemple citer Drago *et al* (Drago, *et al.*, 2011) qui ont mesuré des concentrations

## IV. Résultats

---

moyennes en protéines totale de  $1,76 \pm 0,58$  mg/ml ou encore Aps et Martens (Aps, *et al.*, 2005b) qui ont mesuré des valeurs plus élevées atteignant les 3 mg/ml.

### 1.3.2. L'activité amylasique

L'activité enzymatique d'une protéine est liée à sa concentration. Afin, de comparer les concentrations relatives en alpha-amylase des différentes salives nous mesurons l'activité amylasique en utilisant un kit enzymatique. Il doit être souligné que l'activité d'une protéine est susceptible de varier en fonction des variations structurales de cette dernière pouvant être dues à des variations interindividuelles. L'estimation de la quantité d'alpha-amylase sur la base de la mesure de sa concentration doit donc être prise avec précaution.

Les valeurs de l'activité amylasique des salives sont comprises entre 0,45 kUI/l et 55,84 kUI/l, avec une moyenne de 9,91 kUI/l pour l'état de repos. En état stimulé, les salives collectées ont une activité amylasique comprise entre 0,093 kUI/l et 52,21 kUI/l, avec une moyenne de 7,14 kUI/l. La moyenne globale de l'activité amylasique est de 8,00 kUI/l. Les valeurs d'activités amylasiques salivaires trouvées dans la littérature sont très variables d'un article à l'autre. Bien que nos activités amylasiques mesurées soient légèrement basses, nos résultats restent du même ordre de grandeur que ceux trouvés dans la littérature. A titre d'exemple, Neyraud *et al* (Neyraud, *et al.*, 2012d) ont mesuré des valeurs d'activité relativement faibles (11 à 81 KU/l), alors que Tsutsumi *et al* (Tsutsumi, *et al.*, 1991) ont mesuré des activités atteignant  $249 \pm 95,6$  KU/l.

### 1.3.3. Les lipocalines

La concentration en lipocaline est mesurée dans la salive à l'aide d'un kit ELISA spécifique. Les valeurs de concentration en lipocalines des différentes salives varient entre 2,52 ng/ml et 12,82 ng/ml, avec une moyenne de 6,88 ng/ml en état de repos. Les salives collectées en état stimulé ont des concentrations en lipocalines comprises entre 1,47 ng/ml et 10,99 ng/ml, avec une moyenne de 5,22 ng/ml. La moyenne globale de la concentration en lipocaline sur l'ensemble des salives est de 6,10 ng/ml. Les valeurs de concentration en lipocaline trouvées dans la littérature sont très variables d'une étude à l'autre. Nos valeurs mesurées sont comprises dans cette gamme des concentrations trouvées ( $1,02 \pm 0,75$  équivalent LCN1/ml (Neyraud, *et al.*, 2012d) et  $134,4 \pm 84,4$  ng/ml (Feron, *et al.*, 2013)).

## IV. Résultats

Paramètres	Moyenne du repos	Moyenne stimulé	Moyenne globale
Flux	0,74 ml/min	1,68 ml/min	1,21 ml/min
Viscosité	3,08 mm <sup>2</sup> /s	1,79 mm <sup>2</sup> /s	2,43 mm <sup>2</sup> /s
Protéines totales	0,87 mg/ml	0,63 mg/ml	0,75 mg/ml
Lipocalines	6,88 ng/ml	5,22 ng/ml	6,10 ng/ml
Amylase	9,91 kUI/l	7,14 kUI/l	8,50 kUI/l

### 2. L'analyse de la variance des paramètres salivaires

Afin d'étudier les variations des paramètres salivaires en fonction des effets 'Sujet', 'Etat physiologique', 'Jour', 'Répétition' et les interactions 'Sujet\*Etat physiologique', 'Sujet\*Jour', 'Sujet\*Répétition', une analyse de la variance est réalisée. Les variables prises en compte sont le flux, la viscosité, la concentration en protéines totales, l'activité amylasique et la concentration en lipocalines, pour les salives des dix sujets en état de repos et stimulé, ainsi que pour les deux répétitions des quatre séances (une séance par jour). Pour la variable viscosité l'effet jour n'a pas pu être calculé, car la quantité de salive nécessaire pour cette mesure n'a été collectée qu'un seul jour (séance d'entraînement). Les calculs pour cette variable sont effectués sur quatre répétitions de mesures.

Tableau IV.6: Valeurs des p-values de l'analyse de variance pour les variables flux salivaire (Flux), viscosité salivaire (Visco), concentration en protéines totales (Brad<sup>c</sup>), activité amylasique (Amy<sup>c</sup>) et concentration en lipocaline (Lipo<sup>c</sup>). Les p-values significatives sont en rouge (significativité: '\*\*\*'=p-value<0,001 ; '\*\*'=p-value< 0,01 ; '\*'=p-value< 0,05).

Variables	Flux	Visco	Brad <sup>c</sup>	Amy <sup>c</sup>	Lipo <sup>c</sup>
Sujet	< 2,20.10 <sup>-16</sup> ***	< 2,20.10 <sup>-16</sup> ***	< 2,20.10 <sup>-16</sup> ***	< 2,20.10 <sup>-16</sup> ***	< 2,20.10 <sup>-16</sup> ***
Etat physiologique	< 2,20.10 <sup>-16</sup> ***	< 2,20.10 <sup>-16</sup> ***	7,33.10 <sup>-13</sup> ***	1,19.10 <sup>-2</sup> *	8,86.10 <sup>-15</sup> ***
Jour	3,93.10 <sup>-4</sup> ***		0,64	4,32.10 <sup>-2</sup> *	1,38.10 <sup>-3</sup> **
Répétition	0,32	0,72	1,00	0,19	0,98
Sujet* Etat physiologique	< 2,20.10 <sup>-16</sup> ***	< 2,20.10 <sup>-16</sup> ***	2,31.10 <sup>-10</sup> ***	1,60.10 <sup>-6</sup> ***	7,65.10 <sup>-4</sup> ***
Sujet*Jour	4,60.10 <sup>-7</sup> ***		3,90.10 <sup>-2</sup> *	1,62.10 <sup>-10</sup> ***	5,15.10 <sup>-15</sup> ***
Sujet*Répétition	7,42.10 <sup>-2</sup>	0,52	1,12.10 <sup>-5</sup> ***	4,88.10 <sup>-3</sup> **	0,19

## IV. Résultats

Le tableau IV.6 présente les résultats de ces analyses de la variance et est discuté ci-dessous par effet et interaction.

### 2.1. L'effet sujet

Un effet significatif 'Sujet' est observé pour l'ensemble des variables ( $p$ -values  $< 0,001$ ). Ceci signifie que pour chacune des variables salivaires étudiées, au moins un sujet est significativement différent des autres. Un test de comparaison de moyennes (« Tukey's honestly significant difference » (HSD)) présenté dans le Tableau IV.7 est réalisé pour déterminer les moyennes significativement différentes les unes des autres.

Tableau IV.7: Résultats du test HSD pour les paramètres salivaires. Une lettre différente représente une différence significative entre les sujets ( $p$ -value  $< 0,05$ ). Les cases surlignées en rose correspondent aux valeurs des paramètres les plus élevées et en bleu les plus faibles. Les valeurs du tableau correspondent aux moyennes des variables (Flux en ml/min ; Visco en mm<sup>2</sup>/s ; Bradc en mg/ml ; Amyc en kUI/l; Lipoc en ng/ml) et les écart-types pour les états physiologiques repos, stimulé et l'ensemble des séances.

Sujets	Flux	Visco	Brad <sup>c</sup>	Amy <sup>c</sup>	Lipo <sup>c</sup>
Sujet 1	d 0,84 +/-0,060	cd 2,39 +/-0,54	d 0,50 +/-0,024	bc 5,48 +/-1,29	ab 7,44 +/-0,32
Sujet 2	d 0,96 +/-0,076	cd 2,15 +/-0,21	cd 0,59 +/-0,032	c 1,23 +/-0,12	d 4,05 +/-0,23
Sujet 3	cd 1,01 +/-0,14	d 1,66 +/-0,13	a 1,18 +/-0,050	a 23,60 +/-3,38	a 9,22 +/-0,41
Sujet 4	a 1,99 +/-0,24	abc 3,09 +/-1,56	d 0,50 +/-0,038	c 0,94 +/-0,12	cd 4,34 +/-0,62
Sujet 5	d 0,87 +/-0,10	bcd 2,57 +/-0,58	bcd 0,71 +/-0,075	bc 5,26 +/-1,00	bc 6,25 +/-0,53
Sujet 6	ab 1,79 +/-0,22	d 1,67 +/-0,14	bcd 0,76 +/-0,048	ab 15,00 +/-3,30	ab 8,18 +/-0,41
Sujet 7	d 0,92 +/-0,13	ab 3,50 +/-1,38	ab 0,94 +/-0,14	bc 11,20 +/-3,21	cd 5,04 +/-0,62
Sujet 8	d 0,73 +/-0,063	d 1,84 +/-0,33	bc 0,86 +/-0,74	ab 15,80 +/-1,95	ab 7,62 +/-0,38
Sujet 9	bcd 1,25 +/-0,20	a 3,88 +/-2,21	bcd 0,78 +/-0,73	c 3,89 +/- 0,38	cd 4,66 +/-0,27
Sujet 10	abc 1,68 +/-0,15	d 1,61 +/-0,058	bcd 0,68 +/-0,058	c 2,81 +/-0,71	d 3,73 +/-0,32

Le Tableau IV.7 confirme la présence de différences significatives entre les sujets pour l'ensemble des variables salivaires ( $p$ -value  $< 0,05$ ).

Nous pouvons remarquer que les Sujets 1, 2, 5, 7, 8 ont des flux salivaires significativement plus faibles que les Sujets 4, 6, 10 ( $p$ -value  $< 0,05$ ).

## IV. Résultats

Les Sujets 3, 6, 8, 10 ont des viscosités salivaires significativement plus faibles que les Sujets 4, 7, 9 (p-value < 0,05).

Les Sujets 2, 4, 9, 10 ont des concentrations en protéines totales salivaires significativement plus faibles que les Sujets 3, 7 (p-value < 0,05). Nous pouvons aussi remarquer que la composition en protéines de la salive peut significativement varier entre les sujets. Par exemple le Sujet 7 fait partie des sujets qui ont une salive avec une concentration en protéines totale élevée, mais a une salive relativement pauvre en lipocalines, contrairement au Sujet 1.

Prenons l'exemple du flux, de la viscosité et de la concentration en protéines totales des sujets au repos lors de la première séance d'analyse pour mettre en évidence l'effet 'sujet' (Figure IV.9).

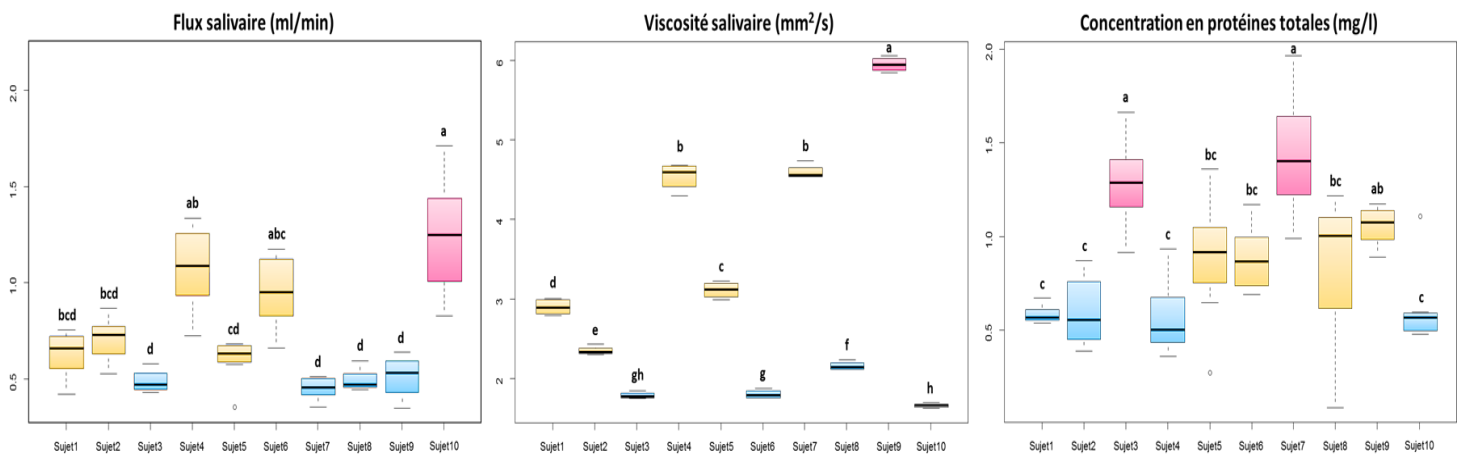


Figure IV.9: Box plot représentant de gauche à droite la dispersion des valeurs de flux salivaire, viscosité salivaire et concentration en protéines totales pour les dix sujets au repos au cours de la première séance d'analyse. Les lignes supérieures et inférieures de la 'box' correspondent respectivement aux quartiles supérieurs et inférieurs. Les barres d'erreur correspondent aux valeurs extrêmes mesurées. La ligne horizontale en gras correspond à la médiane. Les différences significatives entre les sujets sont indiquées par différentes lettres (test HSD, p-value < 0,05).

La Figure IV.9 met en évidence les différences entre les sujets. Nous pouvons observer par exemple, que les Sujets 6, 10 ont un flux salivaire significativement plus élevé, une viscosité salivaire et une concentration en protéines totales significativement plus faible que les Sujets 3, 7 au repos (p-value < 0,05). D'autres sujets ont des salives de propriétés 'intermédiaires' comme dans le cas du Sujet 5. Différents groupes de sujets peuvent alors être formés en fonction de leur propriété salivaires.

### 2.2. L'effet de l'état physiologique

Un effet significatif de l'état physiologique est observé pour l'ensemble des variables (p-values < 0,001 sauf pour l'activité amylasique : p-value < 0,01). Ceci signifie que l'ensemble des paramètres salivaires sont significativement différents en fonction de l'état physiologique des sujets de notre étude (repos ou stimulé). La représentation en box plot de nos données révèle qu'en état stimulé, le flux salivaire est plus



## IV. Résultats

élevé, la viscosité salivaire est plus faible et les trois concentrations protéiques étudiées sont plus faibles. Ces observations sont en accord avec les données trouvées dans la littérature (Neyraud, *et al.*, 2009a; Zussman, *et al.*, 2007).

La Figure IV.10 illustre une partie de ces propos en prenant l'exemple du flux salivaire et de la quantité en protéines totales pour le sujet 7.

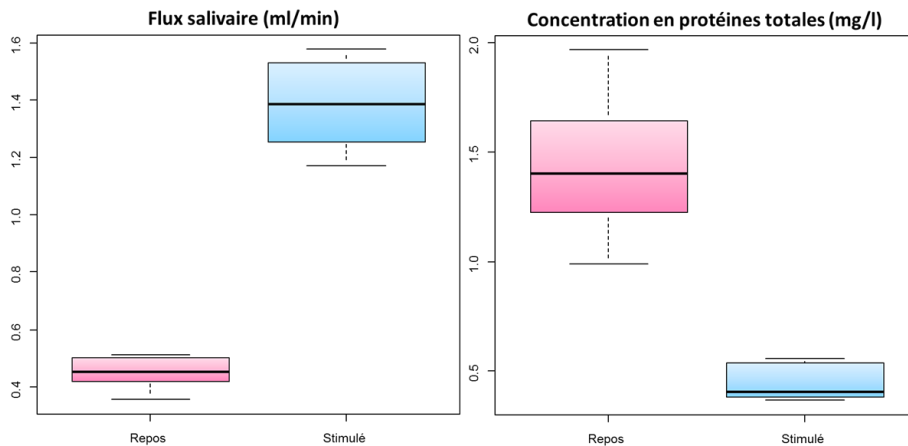


Figure IV.10: Box plot représentant la dispersion des valeurs du flux salivaire (à gauche) et de la concentration en protéines totales (à droite) pour le sujet 7, en état de repos (en rose) et en état stimulé (en bleu). Les lignes supérieures et inférieures de la 'box' correspondent respectivement aux quartiles supérieurs et inférieurs. Les barres d'erreur correspondent aux valeurs extrêmes mesurées. La ligne horizontale en gras correspond à la médiane.

Une analyse de la concentration en protéines totales, en lipocalines et de l'activité amylasique montre que les proportions des différentes protéines dans la salive varient en fonction de l'état physiologique de l'individu, ce qui est en accord avec la littérature (Walz, *et al.*, 2006).

### 2.3. L'effet jour

Un effet 'Jour' significatif est observé pour les variables de flux salivaire, d'activité amylasique et de concentration en lipocaline ( $p$ -value < 0,05), bien que les sujets aient réalisé leurs quatre séances d'analyse à la même heure sur une période de moins de trois semaines. Aucun effet 'Jour' significatif n'est mis en évidence pour la composition en protéines totales des salives. Ceci montre que la concentration en protéines totales de la salive ne varie pas significativement sur plusieurs jours, alors que les rapports protéiques peuvent significativement changer.

### 2.4. L'effet répétition

Aucun effet significatif n'est observé pour les répétitions, sachant qu'un effet 'Jour' significatif est observé pour le flux, l'activité amylasique et la concentration en lipocalines. Ces deux derniers résultats

## IV. Résultats

montrent que le flux, l'activité amylasique et la concentration en lipocaline peuvent significativement varier d'un jour à l'autre, mais ne changent pas significativement au cours d'une séance d'analyse.

### 2.5. Les interactions

Des interactions significatives 'Sujet\*Etat physiologique' et 'Sujet\*Jour' sont observées pour l'ensemble des variables. Ceci montre que les effets significatifs de l'état physiologique et du jour peuvent être différents selon le sujet. La Figures IV.11 illustre un exemple d'interaction 'Sujet\*Etat Physiologique' pour le flux salivaire.

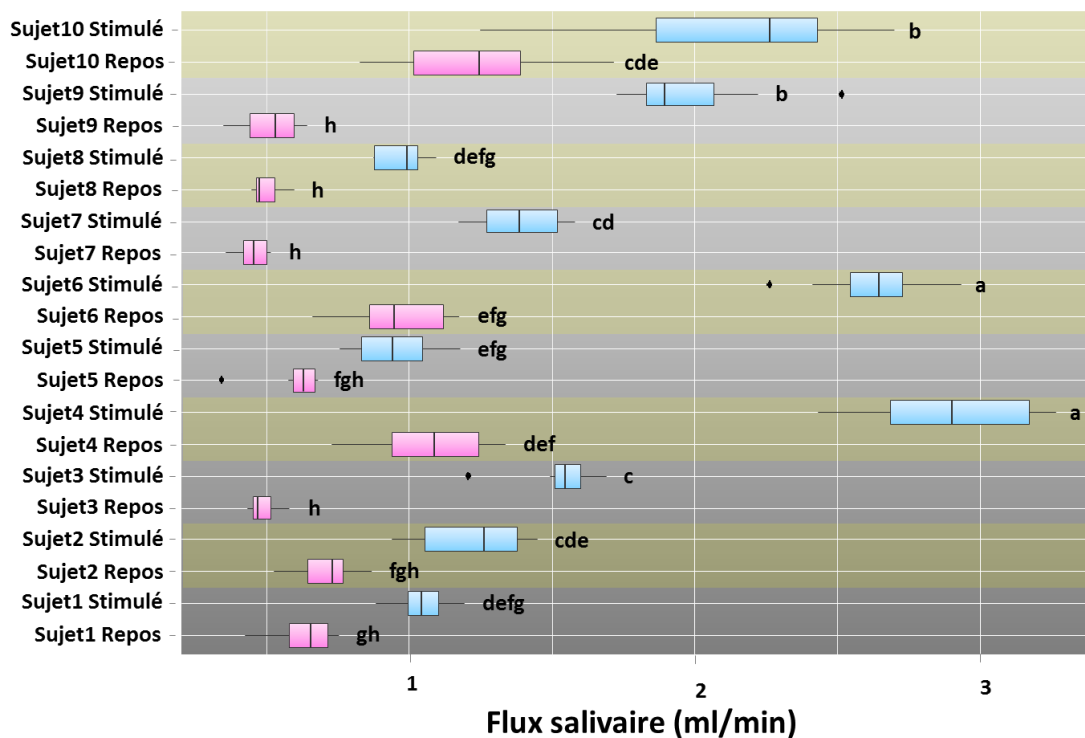


Figure IV.11 : Box plot représentant la dispersion des valeurs du flux salivaire pour les dix sujets, en état de repos (en rose) et en état stimulé (en bleu). Les lignes de droite et gauche des 'box' correspondent respectivement aux quartiles supérieurs et inférieurs. Les barres d'erreur correspondent aux écart-types. La ligne horizontale en gras correspond à la médiane. Les points noirs correspondent aux valeurs extrêmes. Les différences significatives entre les sujets sont indiquées par différentes lettres (test HSD, p-value < 0,05).

La Figure IV.11 montre que tous les sujets ont un flux salivaire plus important en état stimulé qu'en état de repos, en accord avec la littérature (Neyraud, *et al.*, 2009a). Cependant les écarts entre ces deux types de flux varient significativement d'un sujet à l'autre, d'où l'interaction significative 'Sujet\*Etat physiologique' pour le flux salivaire. Par exemple le Sujet 4 montre une différence significative de viscosité entre son état repos et stimulé (1,50 ml/min de différence), par rapport au Sujet 5 où la différence n'est pas significative (écart < 0,5 ml/min).

## IV. Résultats

Nous pouvons aussi observer de façon globale que les sujets qui ont les flux salivaires les plus élevés en état stimulé gardent un flux salivaire plus élevé au repos que les autres sujets, sauf dans le cas du sujet 9.

Une interaction 'Sujet\*Répétition' est constatée pour la concentration en protéines totales et l'activité amylasique, bien qu'aucun effet significatif de la répétition soit constaté pour l'ensemble des variables. Ceci indique que les variations non significatives entre répétitions sont significativement différentes entre les sujets.

**Grande variabilité interindividuelle de la composition salivaire.**

**Variation significative de la composition salivaire avec l'état physiologique.**

**Impact de l'état physiologique sur la composition salivaire différent entre individus.**

### 3. L'analyse des corrélations entre les paramètres salivaires

Afin de mettre en évidence les relations entre les paramètres salivaires étudiés, une matrice des corrélations est réalisée. Les variables prises en comptes sont les mêmes que celles de la partie précédente, pour les dix sujets, les deux états physiologiques et les deux répétitions des quatre séances d'analyse.

Tableau IV.8: Matrice des corrélations entre les variables flux salivaire (Flux), viscosité salivaire (Visco), concentration en protéines totales (Brad<sup>c</sup>), activité amylasique (Amy<sup>c</sup>) et concentration en lipocaline (Lipo<sup>c</sup>). Les corrélations significatives sont en rouge (p-value < 0,05).

Variables	Flux	Brad <sup>c</sup>	Lipo <sup>c</sup>	Amy <sup>c</sup>	Visco
Flux	1	-0,39	-0,35	-0,18	-0,45
Brad <sup>c</sup>	-0,39	1	0,44	0,55	0,29
Lipo <sup>c</sup>	-0,35	0,44	1	0,44	0,01
Amy <sup>c</sup>	-0,18	0,55	0,44	1	-0,03
Visco	-0,45	0,29	0,01	-0,03	1

Des corrélations négatives significatives sont observées dans le Tableau IV.8 entre le flux salivaire et toutes les autres variables (p-values < 0,05). Ce résultat souligne le fait que plus le flux salivaire est élevé, plus les concentrations en protéines salivaires et la viscosité sont faibles. Cette observation serait due à un phénomène de dilution de la salive au moment de la stimulation de la sécrétion de salive. Néanmoins le Tableau IV.7 montre que cela n'est pas vrai pour tous les sujets, par exemple le sujet 8 possède un flux salivaire faible et une viscosité faible.

## IV. Résultats

---

La concentration en protéines totales est significativement positivement corrélée à la concentration en lipocalines, à l'activité amylasique et à la viscosité ( $p$ -values  $< 0,001$ ). Ce résultat met en évidence que plus la concentration en protéines totales est élevée, plus la concentration en lipocalines et l'activité amylasique sont élevées. Ce dernier révèle aussi que plus la concentration en protéines totales est élevée, plus la viscosité des salives est élevée, sauf pour le sujet 8.

Finalement la concentration en lipocalines est significativement positivement corrélée à l'activité amylasique, ce qui signifie que plus la concentration en lipocalines est élevée, plus l'activité amylase l'est aussi ( $p$ -value  $< 0,05$ ).

**Diminution de la concentration en protéines salivaires avec la diminution de la viscosité salivaire et l'augmentation du flux salivaire.**

### 4. L'analyse en composantes principales des paramètres salivaires

Afin de visualiser, dans un espace de dimension réduite, les variables qui permettent de différencier les individus, une analyse en composantes principales est effectuée sur les variables Flux, Brad<sup>C</sup>, Lipo<sup>C</sup>, Amy<sup>C</sup>, Visco pour les dix sujets, les deux états physiologiques et les deux répétitions des séances. Dans un souci de lisibilité et afin de s'affranchir des variations intra-individuelles, l'analyse en composantes principales est réalisée sur les valeurs des moyennes des séances. Néanmoins les résultats obtenus seront interprétés au regard des valeurs de corrélation obtenues sur l'ensemble des données.

Les deux premières composantes représentent 71% de la variabilité totale des données. La troisième composante rend compte de 13% d'information, mais présente un intérêt dans l'analyse de la variable Lipo<sup>C</sup> (Figure IV.12).

## IV. Résultats

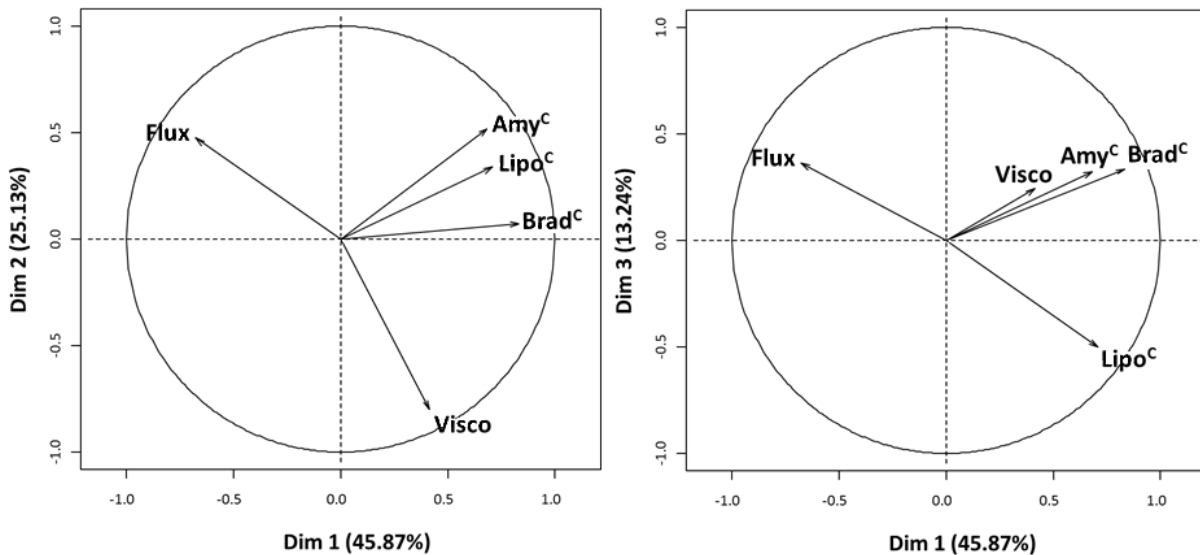


Figure IV.12: Représentation ACP de la moyenne des variables salivaires Flux, Brad<sup>C</sup>, Lipo<sup>C</sup>, Amy<sup>C</sup>, Visco.

La première composante est expliquée négativement par le flux salivaire (valeur de la corrélation < -0,65, p-value < 0,001). Les quatre autres variables expliquent cette première composante positivement (corrélations > 0,42, p-value < 0,001). La deuxième composante est principalement expliquée par la viscosité sur sa partie négative (corrélation < -0,80, p-value < 0,001) et de façon moins importante par l'activité amylasique, la concentration en lipocaline, le flux salivaire sur sa partie positive (corrélations > 0,34, p-value < 0,001). La troisième composante est majoritairement expliquée par la concentration en lipocaline sur sa partie négative (corrélation < -0,50, p-value < 0,001). Les autres variables expliquent positivement la troisième composante (corrélation > 0,24, p-value < 0,001).

Cette ACP illustre l'association positive entre l'activité amylasique, la concentration en lipocalines et en protéines totales sur la composante 1. L'ensemble de ces trois variables est négativement associé au flux salivaire toujours sur la composante 1. L'association négative entre la viscosité et le flux salivaire, ainsi que l'association positive entre la viscosité et l'activité amylase est aussi mise en évidence par la composante 1. La composante 2 souligne l'association négative entre la viscosité et le flux salivaire. La représentation selon les composantes 1 et 3 met en évidence que la concentration en lipocaline est dissociée du groupe formé par l'activité amylasique et la concentration en protéines totales. De plus la composante 3 renforce l'opposition entre la concentration en lipocaline et le flux salivaire et l'association positive entre la viscosité salivaire et la concentration en protéines totales.

La répartition des individus ainsi que leur ellipse de confiance à 95% sont représentée dans les trois premières composantes sur la Figure IV.13.

## IV. Résultats

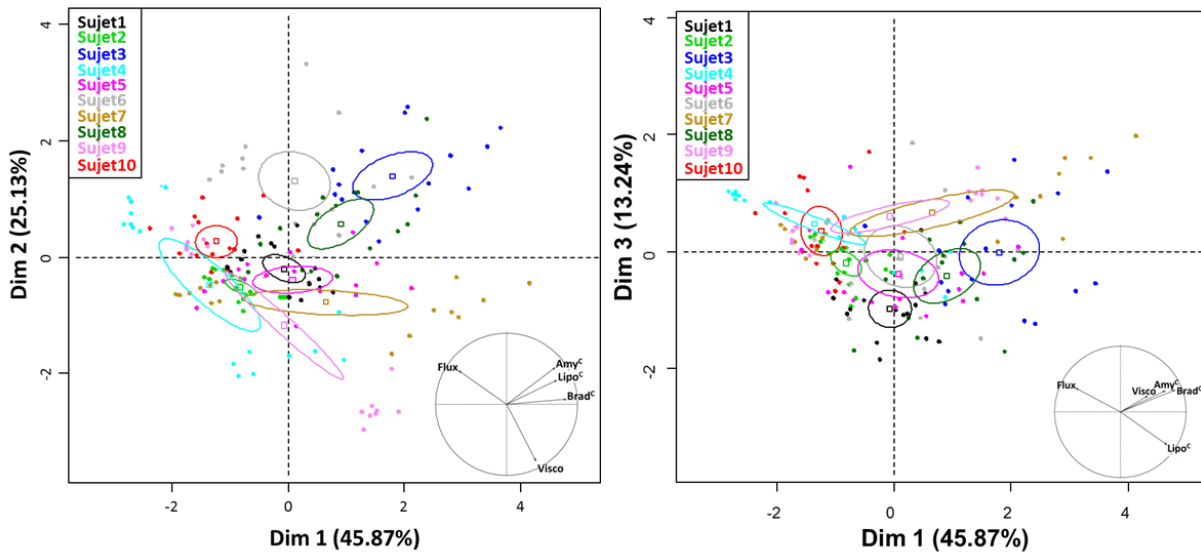


Figure IV.13: Représentation des individus par ACP et de leurs ellipses de confiance à 95% selon les deux premières composantes (à gauche) et les composantes 1, 3 (à droite) pour l'analyse des variables salivaires Flux, Visco, Amy<sup>C</sup>, Brad<sup>C</sup>, Lipo<sup>C</sup>. Une couleur est associée à un individu.

La Figure IV.13 met en évidence que la représentation selon les deux premières composantes permet une meilleure dispersion des individus que celle avec les composantes 1 et 3.

La représentation selon les deux premières composantes montre qu'il se dégage deux groupes de sujets. Les trois sujets 3, 6, 8, qui constituent un premier groupe, se distinguent des autres sur la composante 2, en ayant des salives faiblement visqueuses, à concentration en lipocaline et activité amylasique élevées. Un second groupe est formé des sujets 1, 2, 4, 5, 7, 9, 10 qui ont tendance à avoir des salives plus visqueuses, à concentrations et activité protéiques plus faibles que celles du premier groupe.

En effet, comme nous l'avons vu précédemment avec le test HSD (Tableau IV.7) les sujets 3, 6, 8 ont une viscosité significativement plus faible que les sujets 4, 7, 9 ( $p$ -value < 0,05). Les sujets 3, 6, 8 ont aussi une concentration en lipocalines significativement supérieure aux sujets 2, 4, 7, 9, 10. Ce même test confirme que les sujets 3, 6, 8 ont une activité amylasique significativement supérieure à celle des sujets 2, 4, 9, 10 ( $p$ -value < 0,05).

La représentation des ellipses de confiance à 95% des deux états physiologiques étudiés dans cette partie pour les deux premières composantes est donnée par la Figure IV.14 suivante.

## IV. Résultats

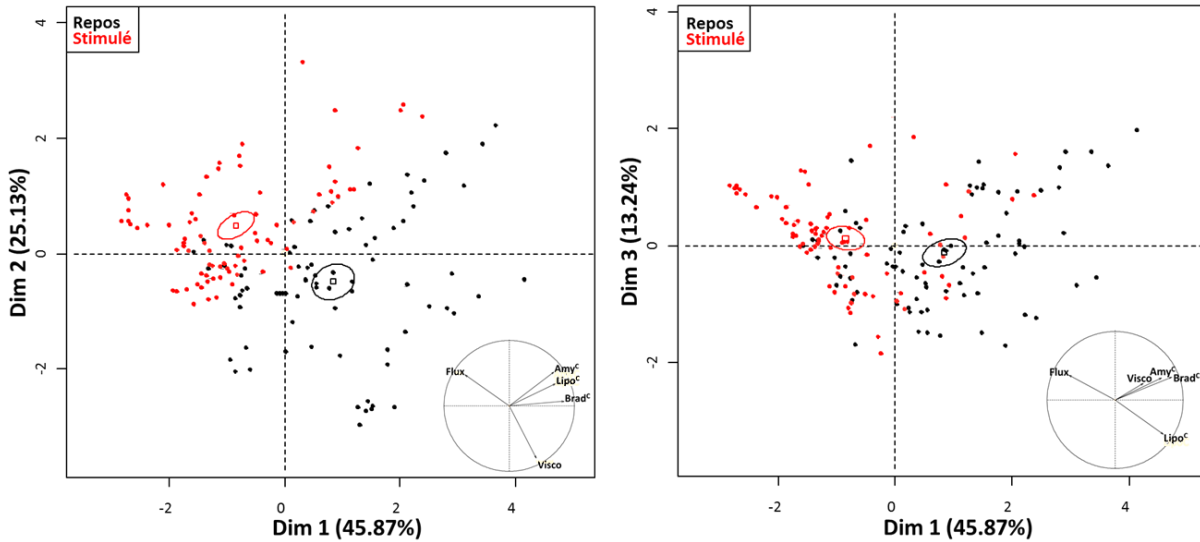


Figure IV.14: Représentation ACP des individus et des ellipses de confiance à 95% des états de repos et stimulé pour les deux premières composantes (à gauche) et les composantes 1,3 (à droite) pour l'analyse des variables salivaires Flux, Visco, Amy<sup>C</sup>, Brad<sup>C</sup>, Lipo<sup>C</sup>. Une couleur est associée à un état physiologique.

La Figure IV.14 montre que les deux états physiologiques sont principalement différenciés par les composantes 1 et 2.. Nous pouvons observer que les deux états physiologiques sont séparés sur l'axes 'Flux  $\leftrightarrow$  Visco'. En état stimulé, le flux et la viscosité salivaire sont respectivement plus élevé et plus faible qu'en état de repos. La composante 3 ne différencie que très légèrement les deux états physiologiques, sachant que celle-ci est essentiellement définie par la concentration en lipocalines. Ces observations suggèrent que les deux états physiologiques sont plus différenciés par la concentration en protéines totales et l'activité amylasique que par la concentration en lipocalines. En état de repos la salive a une concentration en protéines totales et une activité amylasique plus élevé qu'en état stimulé.

Finalement, en état stimulé les sujets ont globalement un flux salivaire plus élevé, une salive moins visqueuse et plus pauvre en protéines qu'en état de repos.

**Augmentation de la viscosité et de la concentration protéique salivaire avec la diminution du flux salivaire.**

**Sujets différenciés par la concentration en lipocalines, l'activité amylasique, le flux et la viscosité salivaires.**

**Etats physiologiques principalement différenciés par le flux et la viscosité salivaire.**

### 5. Conclusion sur les paramètres salivaires

Dans ce chapitre nous avons mis en évidence l'importance du sujet et de l'état physiologique sur les propriétés salivaires, nous avons notamment montré qu'en état de repos le flux salivaire est plus faible qu'à l'état stimulé et que la viscosité salivaire, la concentration en lipocalines et l'activité amylasique sont plus élevées au repos.

Nous allons maintenant voir l'effet des facteurs sujet, état physiologique et molécule odorante sur la libération des molécules odorantes par voie rétronasale, à l'aide d'une analyse des variables extraites des courbes de libération.



## IV. Résultats

---

### Chapitre II : La libération des molécules d'intérêt par voie rétronasale

Ce chapitre aborde l'analyse des paramètres extraits des courbes de libération des molécules odorantes par voie rétronasale en fonction du sujet, de son état physiologique et de la molécule odorante. Il débute par la présentation d'un profil type de courbes de libération des molécules d'intérêt. Dans ce chapitre, les données récoltées permettent l'analyse des trois états physiologiques, contrairement au chapitre précédent où il y avait une absence de données pour la condition rinçage. Les paramètres extraits de ces courbes sont ensuite étudiés par une analyse de la variance portant sur les effets 'Sujet', 'Etat physiologique', 'Répétition' et les interactions 'Sujet\*Etat physiologique', 'Sujet\*Répétition'. Une étude des corrélations entre ces paramètres est ensuite réalisée. Ce chapitre se termine par une analyse en composantes principales des paramètres de libération.

#### 1. L'analyse des courbes de libération obtenues par APCI-MS

Lorsqu'il est relié à un sujet humain au niveau de sa narine, l'APCI-MS permet de suivre la libération des molécules volatiles dans la cavité nasale. L'enregistrement des spectres de masse au cours du temps permet d'établir la courbe de libération d'une molécule volatile pouvant être ionisée par ionisation chimique. Ainsi, nous avons établi les courbes de libération de la molécule odorante présente dans l'échantillon, ainsi que celle de l'ion correspondant à l'acétone. L'acétone est une molécule présente naturellement dans l'haleine. Cette molécule nous permet de suivre la respiration du sujet, de vérifier que l'appareil détecte bien le signal du sujet et que celui-ci respire normalement et régulièrement. Au cours des séances l'acétone permet aussi de contrôler que le sujet reste en apnée durant le temps de séjour de l'échantillon en bouche.

La Figure IV.15 présente un exemple de profil de libération des molécules d'intérêt (intensité de l'ion correspondant à la molécule d'intérêt en fonction du temps).

## IV. Résultats

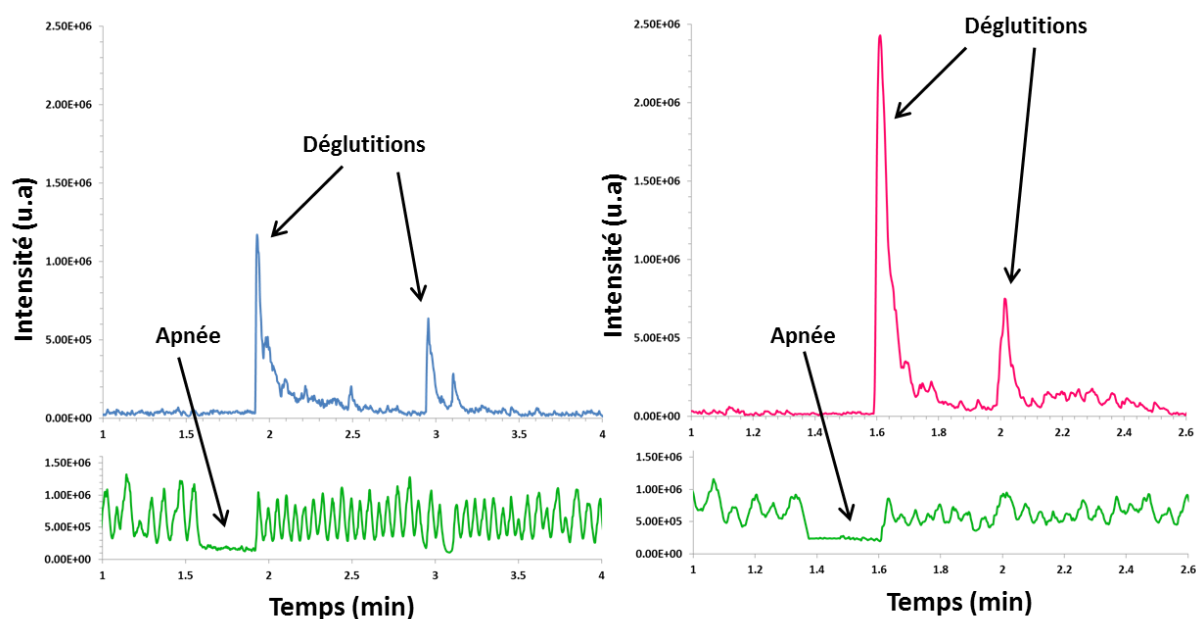


Figure IV.15 : Exemple de courbe de libération en fonction du temps de l'hexanoate d'éthyle (courbe bleue,  $m/z$  145), du propanoate d'éthyle (courbe rose,  $m/z$  103) et les courbes de libération de l'acétone correspondantes (courbes vertes,  $m/z$  59) obtenues pour le sujet 4 après stimulation.

Les courbes vertes représentatives de la concentration en acétone dans la cavité nasale du sujet, montrent une alternance régulière de pente. Une pente positive correspond à une expiration et une pente négative à une inspiration. Une interruption du cycle expiration/inspiration est observée entre 1,6 et 1,8 minute pour l'échantillon contenant de l'hexanoate d'éthyle et entre 1,38 et 1,6 minute pour l'échantillon contenant du propanoate d'éthyle. Elle correspond à l'arrêt de la respiration du sujet au moment du maintien de l'échantillon en bouche avant déglutition ('Apnée').

La déglutition de l'échantillon est matérialisée par la reprise du cycle respiratoire du sujet et l'apparition d'un premier pic au niveau de la courbe de libération de la molécule odorante suivie. Cette première déglutition est réalisée à 1,8 minute pour l'hexanoate d'éthyle et à 1,6 minute pour le propanoate d'éthyle. Des pics supplémentaires peuvent être observés suivant les sujets, ils correspondent vraisemblablement à de nouvelles déglutitions ou à des expirations plus prononcées. Après les pics de déglutition, le signal décroît progressivement correspondant à la rémanence de la molécule odorante suivie. Ce phénomène aurait pour origine l'adsorption puis la désorption des molécules odorantes au niveau de la muqueuse orale et de celle tapissant les parois du pharynx du sujet.

L'acquisition est arrêtée lorsqu'il n'est plus observé de pic de libération de la molécule odorante et que la courbe de détection de l'ion est revenue à la ligne de base (intensité initiale de la molécule odorante).

## IV. Résultats

### 2. L'analyse de la variance des paramètres de libération

Afin d'étudier l'existence d'un effet 'Sujet', 'Etat physiologique', 'Molécule' et/ou 'Répétition' ainsi que les interactions entre ces différents effets 'Sujet\*Etat physiologique', 'Sujet\*Molécule', 'Sujet\*Répétition' sur les paramètres extraits des courbes de libération (paramètres présentés dans le matériel et méthode), une analyse de la variance est réalisée. Les variables prises en compte sont  $I_{\max}$ ,  $Ti_{\max}$ ,  $V_{\max}$ , AUC,  $T_{090}$ ,  $T_{050}$ ,  $T_{025}$ , ainsi que la variable  $A_{ceMed}$ . Cette dernière variable représentative de la respiration des sujets a été choisie afin de vérifier que les différences observées n'étaient pas dues à des variations de la respiration des sujets. L'analyse de ces variables est effectuée pour les dix sujets, les trois états physiologiques (repos, stimulé et rinçage), pour les deux molécules odorantes (hexanoate d'éthyle et propanoate d'éthyle) et les quatre séances d'analyse.

Tableau IV.9: Résultats des analyses de la variance pour les paramètres extraits des courbes obtenues par analyse APCI-MS (Significativité: '\*\*\*'=p value<0,001 ; '\*\*'=p value< 0,01 ; '\*'=p value< 0,05). Sont représentés en rouge les effets significatifs au seuil de 0,05.

Variables	$A_{ceMed}$	$I_{\max}$	$Ti_{\max}$	AUC	$V_{\max}$	$T_{025}$	$T_{050}$	$T_{090}$
Sujet	$2,16.10^{-14}$ ***	$4,15.10^{-12}$ ***	$5,78.10^{-4}$ ***	$2,00.10^{-16}$ ***	$1,69.10^{-9}$ ***	$4,25.10^{-11}$ ***	$4,67.10^{-07}$ ***	$2,28.10^{-11}$ ***
Etat Physiologique	1,00	0,53	0,29	0,73	$3,36.10^{-2}$ *	0,50	0,07	$6,38.10^{-3}$ **
Molécule	0,02 *	0,64	$3,03.10^{-2}$ *	0,02 *	$1,81.10^{-3}$ **	0,28	0,05	$1,67.10^{-7}$ ***
Répétition	$4,90.10^{-6}$ ***	0,14	$4,74.10^{-2}$ *	0,04 *	0,75	0,53	0,03 *	0,24
Sujet*Etat Physiologique	1	0,14	0,43	0,06	0,12	0,22	0,60	0,64
Sujet*Molécule	0,02 *	0,78	0,88	0,41	0,73	0,66	0,63	5,62e-2
Sujet*Répétition	$8,08.10^{-10}$ ***	0,01 *	0,14	0,47	$8,59.10^{-3}$ **	$2,13.10^{-5}$ ***	0,11	0,38

L'interprétation des résultats de ces analyses de la variance est réalisée ci-dessous par effet et interaction.

#### 2.1. L'effet sujet

Un effet 'Sujet' significatif est observé pour l'ensemble des variables (p-values < 0,001), ce qui montre la grande variabilité des profils de libération entre les sujets. Un test HSD met en évidence les moyennes significativement différentes (Tableau IV.10).

## IV. Résultats

Tableau IV.10: Résultat du test HSD pour les paramètres de libération. Une différence de lettre indique une différence significative entre les sujets. Les cases roses correspondent aux valeurs maximales et les bleues aux valeurs minimales des paramètres. Les valeurs du tableau correspondent aux moyennes des variables ( $A_{ceMed}$  et  $I_{max}$  en u.a; AUC en u.a.s ;  $V_{max}$  en u.a/s ;  $Ti_{max}$ ,  $T_{o25}$ ,  $T_{o50}$  et  $T_{o90}$  en min).

Sujets	$A_{ceMed}$	$I_{max}$	$Ti_{max}$	AUC	$V_{max}$	$T_{o25}$	$T_{o50}$	$T_{o90}$
Sujet 1	bc $3,99.10^{+5}$ +/-8745	ab $1,02.10^{+7}$ +/-839255	ab $5,66.10^{-2}$ +/-0,0078	ab $3,99.10^{+8}$ +/-23265285	bc $2,18.10^{+6}$ +/-168468	bc $7,57.10^{-2}$ +/-0,059	bcd $1,74.10^{-1}$ +/-0,011	ab $7,91.10^{-1}$ +/-0,031
Sujet 2	a $6,88.10^{+5}$ +/-32375	ab $1,04.10^{+7}$ +/-1344423	ab $1,18.10^{-1}$ +/-0,036	a $5,07.10^{+8}$ +/-50324536	b $2,30.10^{+6}$ +/-370659	ab $1,05.10^{-1}$ +/-0,0075	abc $2,15.10^{-1}$ +/-0,019	ab $7,23.10^{-1}$ +/-0,029
Sujet 3	a $5,89.10^{+5}$ +/-31992	ab $1,01.10^{+7}$ +/-1233653	ab $8,74.10^{-2}$ +/-0,014	ab $3,91.10^{+8}$ +/-45962530	b $2,38.10^{+6}$ +/-318483	bc $6,93.10^{-2}$ +/-0,0092	bcd $1,80.10^{-1}$ +/-0,022	a $8,80.10^{-1}$ +/-0,042
Sujet 4	b $4,42.10^{+5}$ +/-49493	e $2,66.10^{+6}$ +/-448065	b $2,50.10^{-2}$ +/-0,0057	f $6,84.10^{+7}$ +/-9460843	c $1,05.10^{+6}$ +/-205202	bc $7,50.10^{-2}$ +/-0,010	abc $2,09.10^{-1}$ +/-0,019	a $8,97.10^{-1}$ +/-0,043
Sujet 5	bc $3,06.10^{+5}$ +/-15994	de $4,67.10^{+6}$ +/-666686	b $1,20.10^{-2}$ +/-0,044	ef $1,12.10^{+8}$ +/-13098200	bc $1,63.10^{+6}$ +/-216659	bc $6,77.10^{-2}$ +/-0,015	bcd $1,76.10^{-1}$ +/-0,025	b $6,58.10^{-1}$ +/-0,043
Sujet 6	c $2,96.10^{+5}$ +/-20205	cde $5,83.10^{+6}$ +/-697610	ab $1,14.10^{-1}$ +/-0,019	cd $2,55.10^{+8}$ +/-22613483	bc $1,48.10^{+6}$ +/-166410	a $1,28.10^{-1}$ +/-0,0099	a $2,63.10^{-1}$ +/-0,017	a $8,77.10^{-1}$ +/-0,049
Sujet 7	bc $3,16.10^{+5}$ +/-16972	abcd $7,25.10^{+6}$ +/-678776	a $1,36.10^{-1}$ +/-0,030	bc $2,99.10^{+8}$ +/-18893531	bc $1,57.10^{+6}$ +/-383397	a $1,25.10^{-1}$ +/-0,016	bc $2,22.10^{-1}$ +/-0,023	a $8,83.10^{-1}$ +/-0,035
Sujet 8	bc $3,88.10^{+5}$ +/-47928	abc $9,70.10^{+6}$ +/-893127	ab $4,50.10^{-2}$ +/-0,016	cde $2,29.10^{+8}$ +/-21142139	a $3,81.10^{+6}$ +/-383397	c $5,27.10^{-2}$ +/-0,011	cd $1,33.10^{-1}$ +/-0,015	ab $7,52.10^{-1}$ +/-0,039
Sujet 9	c $2,79.10^{+5}$ +/-33018	bcde $6,48.10^{+6}$ +/-903459	ab $4,91.10^{-2}$ +/-0,0195	def $1,62.10^{+8}$ +/-21449157	b $2,28.10^{+6}$ +/-315386	c $4,85.10^{-2}$ +/-0,0075	d $1,20.10^{-1}$ +/-0,014	b $6,19.10^{-1}$ +/-0,045
Sujet 10	c $2,83.10^{+5}$ +/-22169	a $1,11.10^{+7}$ +/-951705	ab $1,01.10^{-1}$ +/-0,015	a $4,86.10^{+8}$ +/-32664299	bc $2,23.10^{+6}$ +/-267622	abc $9,41.10^{-2}$ +/-0,0056	bcd $1,74.10^{-1}$ +/-0,0094	b $6,52.10^{-1}$ +/-0,037

Le Tableau IV.10 confirme la présence de différences significatives entre les sujets pour toutes les variables de libération (p-value < 0,05).

Nous pouvons remarquer que les Sujets 2 et 3 libèrent significativement plus d'acétone que les autres sujets (p-value < 0,05).

Le Sujet 10 libère les molécules odorantes avec une intensité maximale significativement supérieure aux Sujets 4, 5, 6, 9 et le Sujet 7 met un temps significativement plus long pour atteindre cette intensité maximale que les Sujets 4 et 5 (p-value < 0,05). La Figure IV.16 permet d'illustrer ces observations.

## IV. Résultats

Nous pouvons aussi observer que les Sujets 2 et 10 libèrent significativement plus de molécules odorantes que les Sujets 4, 5, 6, 7, 8 et 9 ( $p$ -value < 0,05). Une illustration de ces observations est proposée par la Figure IV.16.

Le Sujet 8 libère les molécules odorantes avec une vitesse de libération maximale significativement plus élevée que tous les autres sujets et les Sujets 2, 3, 9 présentent de même pour cette variable des valeurs significativement plus élevées que le Sujet 4.

Le Tableau IV.10 nous permet aussi d'observer que le Sujet 6 met significativement plus longtemps à libérer les molécules odorantes par voie rétronasale que le Sujet 9 ( $T_{025}$ ,  $T_{050}$ ,  $T_{090}$ ). Plus précisément, les Sujets 3, 4, 6, 7 mettent significativement plus longtemps à libérer 90% des molécules odorantes que les Sujets 5, 9, 10.

Afin d'illustrer cet effet 'sujet', prenons l'exemple de l'aire sous la courbe (AUC) et l'intensité maximale ( $I_{\max}$ ) des dix sujets (Figure IV.16).

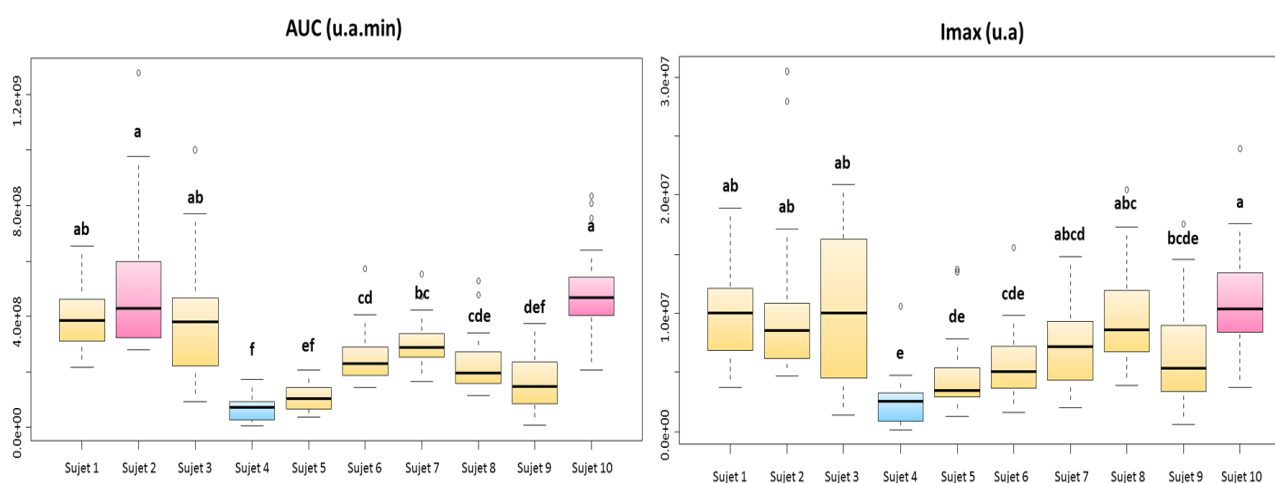


Figure IV.16: Box plot représentant la dispersion des valeurs AUC (à gauche) et  $I_{\max}$  (à droite). Valeurs représentées pour les trois états physiologiques et les deux molécules odorantes. Les lignes supérieures et inférieures de la 'box' correspondent respectivement aux quartiles supérieurs et inférieurs. Les barres d'erreur correspondent aux valeurs extrêmes mesurées. La ligne horizontale en gras correspond à la médiane. Les lettres différentes correspondent à des différences significatives entre les sujets (test HSD,  $p$ -value < 0,05).

Nous pouvons remarquer sur la Figure IV.16 que les Sujets 2 et 10 libèrent significativement plus de molécules odorantes avec une intensité maximale de libération significativement plus importante que les Sujets 4, 5, 6.

## IV. Résultats

### 2.2. L'effet de l'état physiologique

Un effet significatif de 'l'Etat physiologique' est observé pour les variables  $V_{\max}$  et  $T_{090}$  ( $p$ -values  $< 0,05$ ). Cette observation suggère que la vitesse maximale ( $V_{\max}$ ) et le temps pour atteindre 90% de la libération totale sur 1,2 min ( $T_{090}$ ) des molécules odorantes sont dépendants de l'état physiologique du sujet. En effet, après rinçage les sujets ont tendance à avoir des valeurs de  $T_{090}$  plus élevées ( $8,25 \cdot 10^{-1}$  min) que dans les états stimulés ( $7,42 \cdot 10^{-1}$  min) et de repos ( $7,54 \cdot 10^{-1}$  min). De même, en état de repos les sujets ont tendance à avoir des valeurs de  $V_{\max}$  plus importantes ( $2,39 \cdot 10^{+6}$  u.a/min) qu'en état stimulé ( $1,89 \cdot 10^{+6}$  u.a/min).

La Figure IV.17 illustre l'exemple des variables  $T_{090}$  et  $V_{\max}$  pour les dix sujets et les trois états physiologiques testés (valeurs calculées sur les deux molécules odorantes).

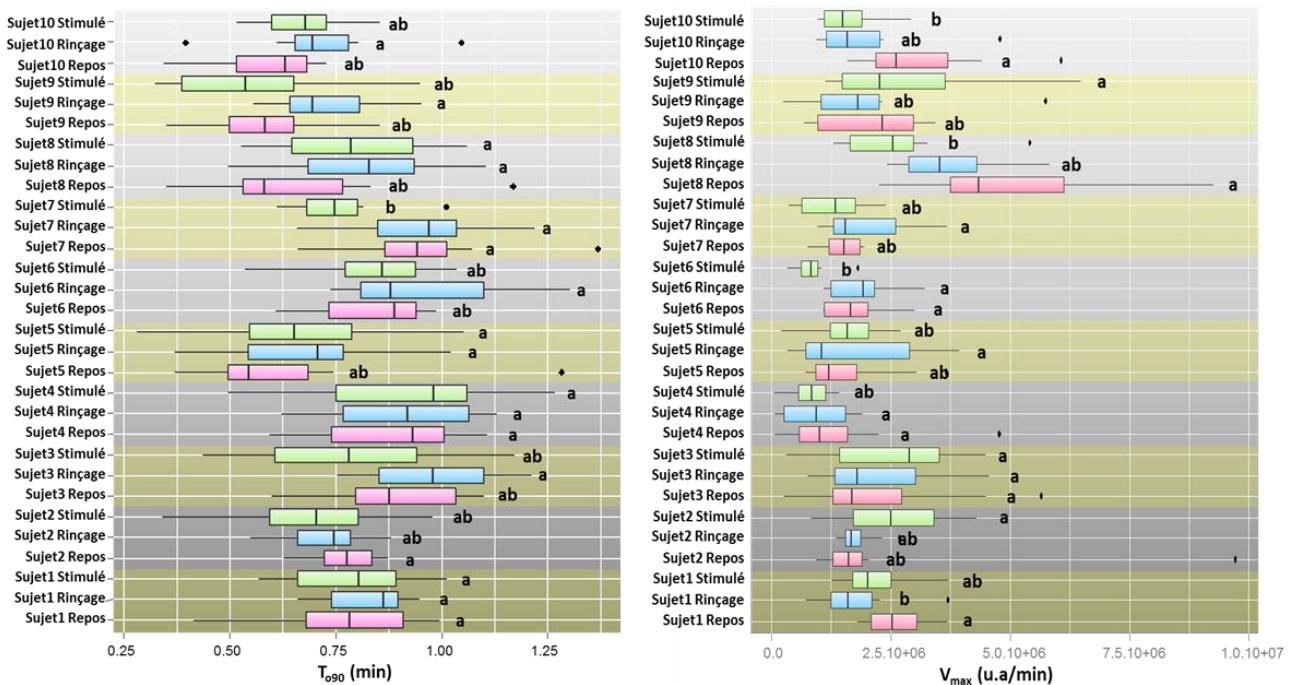


Figure IV.17: Box plot représentant la dispersion des valeurs de  $T_{090}$  (gauche) et  $V_{\max}$  (droite) pour les dix sujets dans les états stimuli (vert), après rinçage (bleu) et au repos (rose). Les valeurs reportées correspondent à celles pour les deux molécules. Les lignes supérieures et inférieures de la 'box' correspondent respectivement aux quartiles supérieurs et inférieurs. Les barres d'erreur correspondent aux valeurs extrêmes mesurées. La ligne horizontale en gras correspond à la médiane. Les lettres différentes correspondent à des différences significatives pour un même sujet (test HSD,  $p$ -value  $< 0,05$ ).

La Figure IV.17 montre que le Sujet 7 met significativement plus longtemps à libérer 90% du total des molécules odorantes au repos et après rinçage qu'en condition stimulée. Les autres sujets ne présentent pas d'effet significatif, mais ont tendance à mettre plus longtemps à libérer 90% du total des molécules odorantes après rinçage que dans les deux autres conditions physiologiques. La Figure IV.17 montre que les Sujets 10, 8, 6 ont une vitesse maximale de libération des molécules odorantes significativement supérieure

## IV. Résultats

---

au repos par rapport à la condition stimulée. Le Sujet 1 a une vitesse maximale de libération significativement plus élevée au repos qu'après rinçage. Les autres sujets ne montrent pas de différence significative, mais ont tendance à avoir une vitesse maximale de libération plus élevée dans la condition repos que dans la condition stimulée.

Aucun effet significatif de l'état physiologique n'est observé pour les variables  $A_{ceMed}$ ,  $I_{max}$ ,  $Ti_{max}$ ,  $T_{025}$  et  $T_{050}$ . Ce dernier résultat reste vrai pour les deux molécules odorantes testées. Le fait qu'aucun effet significatif de l'état physiologique ne soit observé pour la libération d'acétone ( $A_{ceMed}$ ) met en avant que la respiration des sujets n'est pas affectée par l'état physiologique. Cette variable ne sera pas prise en compte dans la suite des analyses.

### 2.3. L'effet molécule

Un effet significatif de la molécule odorante est observé pour les variables  $Ti_{max}$ , AUC,  $V_{max}$  et  $T_{090}$  ( $p$ -value < 0,05). Les variables AUC,  $V_{max}$  et  $T_{090}$  ont des valeurs plus élevées pour la libération de l'hexanoate d'éthyle que pour celle du propanoate d'éthyle. L'inverse est observé pour la variable  $Ti_{max}$ .

Aucun effet significatif de la molécule n'est observé pour les variables  $I_{max}$ ,  $T_{025}$  et  $T_{050}$ . Ces observations restent vraies pour les trois états physiologiques.

### 2.4. L'effet répétition

En dépit des efforts réalisés au cours des séances d'analyse pour standardiser un maximum de paramètres, un effet significatif des répétitions est observé pour les variables  $Ti_{max}$ , AUC et  $T_{050}$  ( $p$ -value < 0,05). Une analyse approfondie des répétitions au cours des séances montre que les valeurs de la variable  $T_{050}$  sont plus élevées pour la première séance d'analyse. Les différences entre les répétitions sont plus faibles et ne varient pas dans le même sens pour les variables AUC et  $Ti_{max}$ . Ces observations sont valables pour les trois états physiologiques et les deux molécules odorantes.

### 2.5. Les interactions

Aucune interaction significative 'Sujet\*Etat physiologique', ni 'Sujet\*molécule' n'est observée sur l'ensemble des variables de la libération ( $p$ -value > 0,05), indiquant que tous les sujets sont affectés de la même façon par les changements d'état physiologique ou par le type de molécule odorante consommée.

## IV. Résultats

Des interactions significatives 'Sujet\*Répétition' sont observées pour les variables  $I_{\max}$ ,  $V_{\max}$  et  $T_{025}$  ( $p$ -value < 0,01), sans que ces variables ne présentent d'effet 'Répétition' significatif. Ceci signifie que pour chaque sujet il n'y a globalement pas de différence significative entre les répétitions, mais que les fluctuations des valeurs de ces dernières variables sont différentes entre les sujets.

**Grande variabilité interindividuelle dans la dynamique de libération *in vivo* des molécules odorantes.**

**L'état physiologique n'influence pas la respiration des sujets.**

**L'état physiologique influence la dynamique de libération *in vivo* des molécules odorantes.**

**Les propriétés physico-chimiques de la molécule odorante interviennent dans la dynamique de libération.**

### 3. L'analyse des corrélations entre les paramètres de libération

Afin de mettre en évidence les relations qui existent entre les paramètres de libération étudiés, une matrice des corrélations est réalisée. Les variables prises en comptes sont :  $\log P$ ,  $I_{\max}$ ,  $Ti_{\max}$ ,  $AUC$ ,  $V_{\max}$ ,  $T_{025}$ ,  $T_{050}$  et  $T_{090}$  pour les dix sujets, les trois états physiologiques, les deux molécules et les quatre séances d'analyse. L'étude des paramètres de libération des molécules odorantes par ANOVA a révélé un effet significatif de la molécule odorante consommée. Les propriétés physico-chimiques des deux molécules étudiées diffèrent principalement par leur d'hydrophobicité. Afin, de prendre en compte le rôle de cette variable, le  $\log P$  des molécules a été introduit dans la matrice des corrélations présentée ci-dessous (Tableau IV.11).



## IV. Résultats

Tableau IV.11: Matrice des corrélations entre les variables  $\text{Log}P$ ,  $I_{\text{max}}$ ,  $T_{i_{\text{max}}}$ , AUC,  $V_{\text{max}}$ ,  $T_{025}$ ,  $T_{050}$  et  $T_{090}$ . Les corrélations significatives sont en rouge (p values < 0,05).

Variables	$\text{Log}P$	$I_{\text{max}}$	$T_{i_{\text{max}}}$	AUC	$V_{\text{max}}$	$T_{025}$	$T_{050}$	$T_{090}$
$\text{Log}P$	1	0,02	-0,13	0,10	0,17	0,06	0,11	0,29
$I_{\text{max}}$	0,02	1	0,03	0,81	0,79	0,01	-0,23	-0,27
$T_{i_{\text{max}}}$	-0,13	0,03	1	0,19	-0,09	0,62	0,51	0,11
AUC	0,10	0,81	0,19	1	0,48	0,19	0,01	-0,11
$V_{\text{max}}$	0,17	0,79	-0,09	0,48	1	-0,10	-0,25	-0,22
$T_{025}$	0,06	0,01	0,62	0,19	-0,10	1	0,71	0,25
$T_{050}$	0,11	-0,23	0,51	0,01	-0,25	0,71	1	0,50
$T_{090}$	0,29	-0,27	0,11	-0,11	-0,22	0,25	0,50	1

Des corrélations positives significatives sont observées entre la variable  $\text{log}P$  et les variables  $V_{\text{max}}$ ,  $T_{090}$  (p-value < 0,05) et une corrélation négative significative entre les variables  $\text{Log}P$  et  $T_{i_{\text{max}}}$  (p-value < 0,05). Ainsi plus la molécule odorante est hydrophobe, plus celle-ci met du temps à être libérée, bien que sa vitesse maximale de libération soit plus élevée. Ce résultat est en accord avec les résultats de l'ANOVA présentée ci-dessus pour les paramètres  $V_{\text{max}}$  et  $T_{090}$ . La variable AUC est elle aussi corrélée positivement au  $\text{log}P$ , mais pas de façon significative.

La variable  $V_{\text{max}}$  est significativement négativement corrélée aux variables  $T_{050}$ ,  $T_{090}$  (p-values < 0,05) et significativement positivement corrélée aux variables  $I_{\text{max}}$  et AUC (p-value < 0,001). Cette observation indique que plus la vitesse maximale de libération ( $V_{\text{max}}$ ) est élevée, plus l'intensité maximale ( $I_{\text{max}}$ ) et la quantité totale de molécules odorantes (AUC) libérées sont importantes et plus le temps de libération des molécules odorantes ( $T_{050}$ ,  $T_{090}$ ) est court.

D'autres corrélations significatives positives sont observées entre la variable AUC et les variables  $I_{\text{max}}$ ,  $T_{i_{\text{max}}}$ ,  $T_{025}$ ,  $V_{\text{max}}$  (p-values < 0,05). Ce résultat suggère que la quantité d'arôme totale libérée sur 1,2 min est liée à une libération intense sur une longue période.

**Une molécule hydrophobe a une libération plus longue qu'une molécule peu hydrophobe.**

## IV. Résultats

### 4. L'analyse en composantes principales des paramètres de libération

Afin de visualiser, dans un espace de dimension réduite, les variables qui permettent de différencier les individus, une analyse en composantes principales est effectuée sur les variables  $I_{max}$ ,  $Ti_{max}$ ,  $AUC$ ,  $V_{max}$ ,  $T_{025}$ ,  $T_{050}$  et  $T_{090}$  pour les dix sujets, les trois états physiologiques et les deux molécules. Dans un souci de lisibilité et afin de s'affranchir des variations intra-individuelles, l'analyse en composantes principales est réalisée sur les valeurs des moyennes des répétitions. Néanmoins les résultats obtenus seront interprétés au regard des valeurs de corrélation obtenues sur l'ensemble des données.

Les deux premières composantes représentent 74 % de la variabilité totale des données (Figure IV.18). La troisième composante rend compte de 13,80 % d'information, mais présente un intérêt dans l'analyse de la variable  $T_{090}$  et la comparaison de la libération des deux molécules odorantes (Figure IV.21).

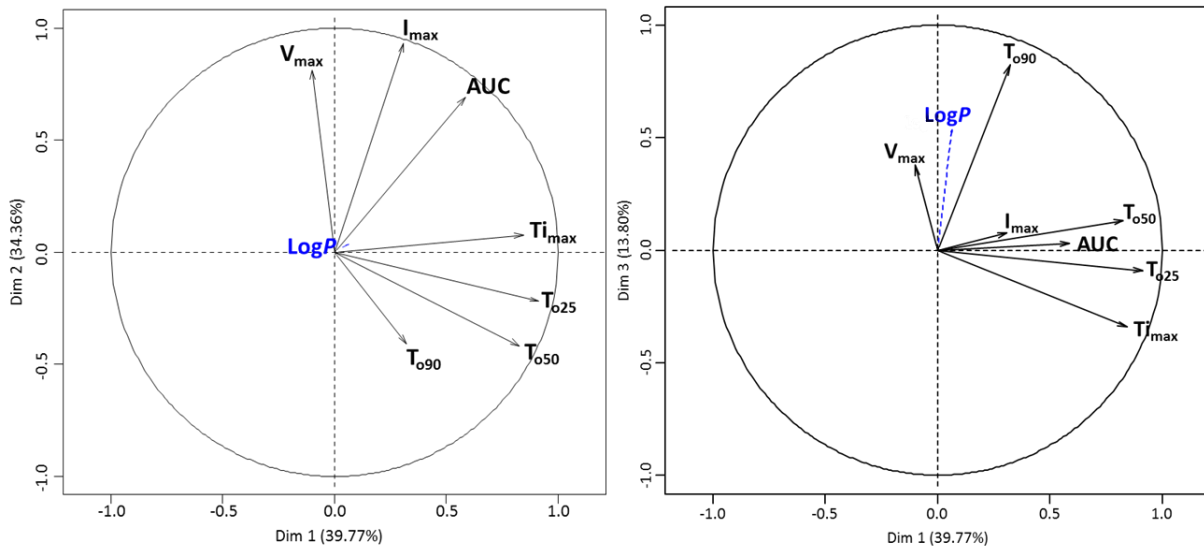


Figure IV.18: Représentation ACP de la moyenne des variables de libération  $\text{Log}P$ ,  $I_{max}$ ,  $Ti_{max}$ ,  $AUC$ ,  $V_{max}$ ,  $T_{025}$ ,  $T_{050}$  et  $T_{090}$ . La variable  $\text{Log}P$  en bleu est représentée graphiquement, mais n'est pas prise en compte dans les calculs de l'ACP.

La première composante est expliquée positivement par la majorité des variables, mais principalement par les variables  $T_{050}$ ,  $T_{025}$ ,  $Ti_{max}$ . La deuxième composante est expliquée sur sa partie positive par les variables  $I_{max}$ ,  $V_{max}$  et  $AUC$  (corrélations  $> 0,70$ ,  $p\text{-value} < 1.e-10$ ). La troisième composante est expliquée sur sa partie positive par la variables  $T_{090}$  (corrélations  $> 0,82$ ,  $p\text{-value} < 1.e-16$ ). La variable  $\text{log}P$  est également projetée sur cette composante.

Cette représentation conforte les corrélations calculées sur l'ensemble des valeurs (Tableau IV.11), à savoir :

## IV. Résultats

- une forte corrélation entre les variables  $T_{050}$ ,  $T_{025}$ ,  $T_{i\max}$ , matérialisée sur la partie positive de la composante 1
- une forte corrélation entre  $I_{\max}$ ,  $V_{\max}$  et AUC matérialisée sur la partie positive de la composante 2
- un comportement particulier de la variable  $T_{090}$  qui est observé sur la partie positive de la composante 3.

La répartition des individus ainsi que leur ellipse de confiance à 95% est représentée dans les trois premières composantes sur la Figure IV.19 (Husson, *et al.*, 2005).

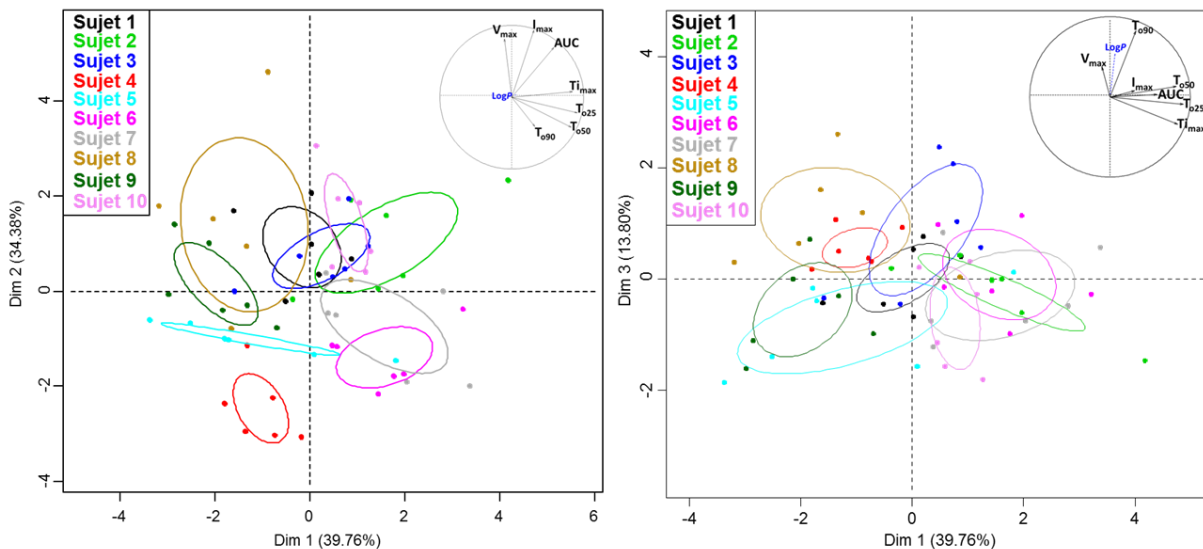


Figure IV.19: Représentation des individus par ACP et de leurs ellipses de confiance à 95% selon les deux premières composantes (à gauche) et les composantes 1, 3 (à droite) pour l'analyse des moyennes des variables de libération  $I_{\max}$ ,  $T_{i\max}$ , AUC,  $V_{\max}$ ,  $T_{025}$ ,  $T_{050}$  et  $T_{090}$ . Une couleur est associée à chaque individu.

La Figure IV.19 montre que les sujets sont mieux différenciés dans le plan des composantes 1 et 2, que dans celui des composantes 1 et 3.

Par exemple, les Sujets 4, 8, 9 sont différenciés des Sujets 2, 6, 7, 10 sur la composante 1, le sujet 4 est différencié des autres sur la composante 2.

En effet, comme nous l'avons vu précédemment, le test HSD indique que les Sujets 6 et 7 ont des temps de libération ( $T_{025}$ ) significativement plus longs que les Sujets 8 et 9 ( $p$ -value < 0,05). Les Sujets 6 et 7 ont une cinétique de libération des molécules odorantes plus lente que les Sujets 8 et 9 ( $p$ -value < 0,05).

## IV. Résultats

Ce même test a aussi montré que le Sujet 4 libère les molécules odorantes avec une intensité significativement plus faible ( $I_{max}$ ), en plus petite quantité (AUC) et sur une plus longue période ( $T_{090}$ ) que le Sujet 10 ( $p$ -value < 0,05).

La représentation des ellipses de confiance à 95% des trois états physiologiques étudiés est donnée par la Figure IV.20 (Husson, *et al.*, 2005).

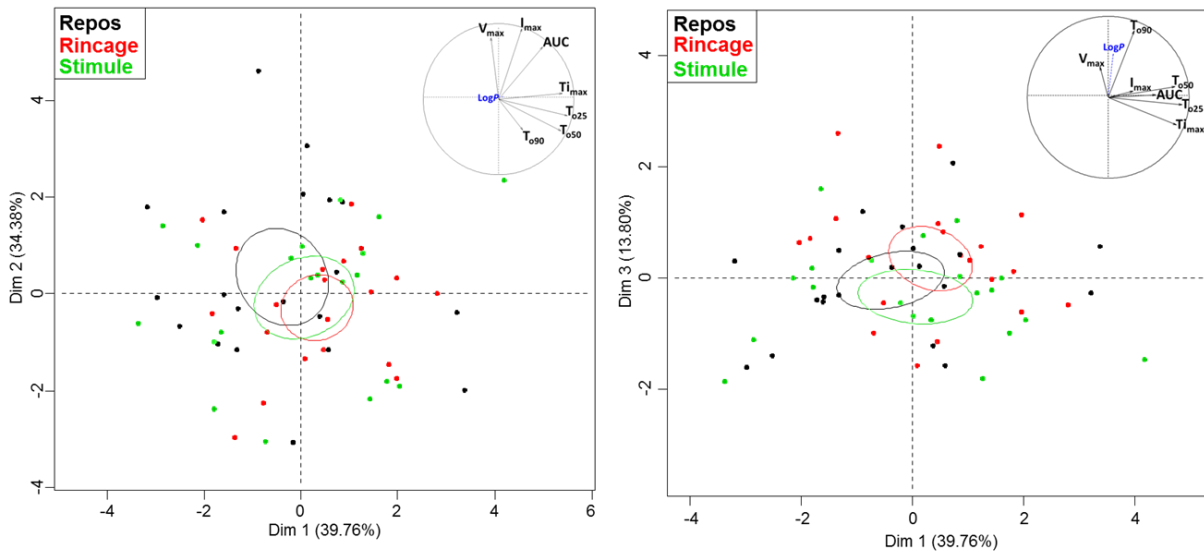


Figure IV.20 : Représentation des individus par ACP et des ellipses de confiance à 95% des trois états physiologiques selon les deux premières composantes (à gauche) et les composantes 1, 3 (à droite) pour l'analyse des moyennes des variables de libération  $I_{max}$ ,  $T_{i_{max}}$ , AUC,  $V_{max}$ ,  $T_{025}$ ,  $T_{050}$  et  $T_{090}$ . Une couleur est associée à un état physiologique.

La Figure IV.20 montre que les états physiologiques ne sont pas clairement différenciés par les trois premières composantes. Nous pouvons tout de même observer une légère séparation des états physiologique sur l'axe ' $V_{max} \leftrightarrow T_{090}$ ', sachant que ces deux variables sont les seules à présenter un effet de l'état physiologique significatif. Après rincage, les temps de libération des molécules odorantes ( $T_{090}$ ) est plus important qu'en état stimulé et au repos, la vitesse maximale de libération ( $V_{max}$ ) est plus élevée qu'en état stimulé.

## IV. Résultats

La représentation des ellipses de confiance à 95% des deux molécules odorantes étudiées est donnée par la Figure IV.21 (Husson, *et al.*, 2005).

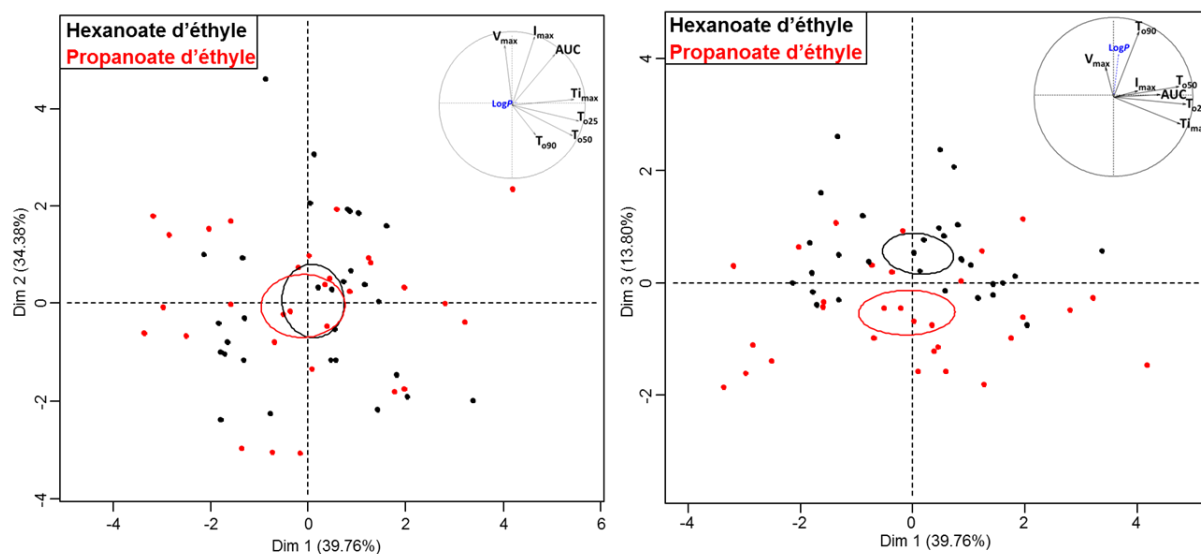


Figure IV.21 : Représentation des individus par ACP et des ellipses de confiance des deux molécules odorantes étudiées selon les deux premières composantes (à gauche) et les composantes 1, 3 (à droite) pour l'analyse des moyennes des variables de libération  $I_{max}$ ,  $T_{i_{max}}$ ,  $AUC$ ,  $V_{max}$ ,  $T_{o25}$ ,  $T_{o50}$  et  $T_{o90}$ . Une couleur est associée à une molécule odorante.

La Figure IV.21 indique que les deux molécules sont majoritairement différenciées sur la composante 3 qui est essentiellement expliquée sur sa partie positive par la variable  $T_{o90}$ . Ceci indique que 90% de la quantité totale de molécules odorantes libérée ( $T_{o90}$ ) est atteinte plus rapidement pour le propanoate d'éthyle que pour l'hexanoate d'éthyle. En effet le Tableau IV.9 montre bien que l'effet molécule est très significatif pour cette variable. Les deux molécules ne sont pas différenciées sur la composante 2, ce qui s'explique par l'absence de différence significative entre les deux molécules pour l'intensité maximale de libération ( $I_{max}$ ). Ces deux molécules ne sont pas non plus discriminées sur la composante 1 ce qui s'explique par l'absence d'effet significatif des autres variables ( $T_{o25}$ ,  $T_{o50}$ ) ou par un effet faiblement significatif ( $T_{i_{max}}$ ).

**Sujets, états physiologiques et molécules odorantes principalement différenciés par le temps pour atteindre 90% de libération de ces dernières ( $T_{o90}$ ).**

## IV. Résultats

---

### 5. Conclusion sur les paramètres de libération

Les interprétations précédentes nous ont permis de mettre en évidence l'importance du sujet, de l'état physiologique et de la molécule odorante sur la libération des molécules odorantes par voie rétronasale. Nous avons notamment pu mettre en évidence l'importance de ces facteurs sur le temps pour atteindre 90% de libération des molécules odorantes ( $T_{0.90}$ ).

Malgré les nombreuses données sur la libération des molécules odorantes, les effets 'conditions physiologiques' et 'molécule' observés sur cette libération restent difficiles à expliquer. Après avoir analysé séparément les variables salivaires et de libération, l'analyse combinée de ces variables fait l'objet du chapitre suivant, en vue d'expliquer ces résultats.

## IV. Résultats

---

### Chapitre III : L'explication des paramètres salivaires et des paramètres de libération

Afin d'expliquer les différents comportements de libération des molécules odorantes par voie rétronasale par des données physiologiques des individus, ce chapitre aborde une analyse simultanée des paramètres extraits des courbes de libération, des paramètres salivaires et du volume buccal pour les dix sujets, les trois états physiologiques et les deux molécules odorantes.

Les études de libération ont été réalisées dans trois conditions physiologiques différentes alors que les prélèvements de salive n'ont été réalisés que pour deux conditions, au repos et après stimulation. Nous avons cherché un moyen d'évaluer les quantités de protéines salivaires présentes pendant la durée de l'analyse de libération dans chaque condition. La condition rinçage ne stimulant pas la sécrétion de salive, les valeurs mesurées de flux, de viscosités et la composition salivaire au repos et après rinçage seront considérées comme identiques. Le volume de salive en bouche a alors pu être calculé au moment de la déglutition de l'échantillon en fonction du flux salivaire et du temps écoulé entre la déglutition de l'échantillon et la déglutition précédente. Puis nous avons calculé les quantités de protéines totales, de lipocaline et d'amylase présentes en bouche au moment de la déglutition de l'échantillon pour la condition rinçage et les deux autres conditions (cf. matériel et méthode, partie II, *in vivo* paragraphe 2.4.4.4.)

Une analyse des corrélations entre les paramètres de libération et les paramètres salivaires est tout d'abord présentée. Différentes analyses en composantes principales sont ensuite reportées afin d'illustrer les corrélations entre les variables salivaires, les variables de libération et le volume buccal.

#### 1. L'analyse des corrélations entre les paramètres salivaires et de libération

Afin de mettre en évidence les relations qui existent entre les paramètres de libération et les paramètres salivaires étudiés, une matrice des corrélations est calculée. Les variables analysées sont :  $I_{\max}$ ,  $Ti_{\max}$ , AUC,  $V_{\max}$ ,  $T_{025}$ ,  $T_{050}$ ,  $T_{090}$ , Flux,  $Brad^{Qd}$ ,  $Lipocal^{Qd}$ ,  $Amy^{Qd}$  et Visco pour les dix sujets, les trois états physiologiques, les deux molécules et les quatre séances d'analyse (Tableau IV.12).

## IV. Résultats

Tableau IV.12: Matrice des corrélations entre les variables  $I_{\max}$ ,  $Ti_{\max}$ , AUC,  $V_{\max}$ ,  $T_{o25}$ ,  $T_{o50}$ ,  $T_{o90}$ , Flux,  $Brad^{Qd}$ ,  $Lipocal^{Qd}$ ,  $Amy^{Qd}$  et Visco. Les corrélations significatives sont en rouge (p values < 0,05). Les cases en bleu correspondent aux corrélations entre les variables de libération et salivaires. Les cases en jaune correspondent aux corrélations significatives entre l'activité amylasique et les variables de libération.

Variables	$I_{\max}$	$Ti_{\max}$	AUC	$V_{\max}$	$T_{o25}$	$T_{o50}$	$T_{o90}$	Flux	$Brad^{Qd}$	$Lipocal^{Qd}$	$Amy^{Qd}$	Visco
$I_{\max}$	1	0,03	0,81	0,79	0,01	-0,23	-0,27	-0,13	-0,02	-0,06	-0,01	-0,26
$Ti_{\max}$	0,03	1	0,19	-0,09	0,62	0,51	0,11	0,05	0,07	0,05	0,12	-0,03
AUC	<b>0,81</b>	<b>0,19</b>	1	0,48	0,19	0,01	-0,11	-0,08	-0,01	-0,07	0	-0,3
$V_{\max}$	<b>0,79</b>	-0,09	<b>0,48</b>	1	-0,1	-0,25	-0,22	-0,22	-0,05	-0,07	-0,03	-0,14
$T_{o25}$	0,01	<b>0,62</b>	<b>0,19</b>	-0,1	1	0,71	0,25	0,07	0,05	0,08	0,15	-0,03
$T_{o50}$	<b>-0,23</b>	<b>0,51</b>	0,01	<b>-0,25</b>	<b>0,71</b>	1	0,5	0,09	0	0,07	0,13	-0,03
$T_{o90}$	<b>-0,27</b>	0,11	-0,11	<b>-0,22</b>	<b>0,25</b>	<b>0,5</b>	1	-0,04	-0,05	-0,01	0,11	0,03
Flux	<b>-0,13</b>	0,05	-0,08	<b>-0,22</b>	0,07	0,09	-0,04	1	0,59	0,54	0,2	-0,42
$Brad^{Qd}$	-0,02	0,07	-0,01	-0,05	0,05	0	-0,05	<b>0,59</b>	1	0,73	0,45	-0,24
$Lipocal^{Qd}$	-0,06	0,05	-0,07	-0,07	0,08	0,07	-0,01	<b>0,54</b>	<b>0,73</b>	1	0,46	-0,3
$Amy^{Qd}$	-0,01	0,12	0	-0,03	<b>0,15</b>	<b>0,13</b>	0,11	<b>0,2</b>	<b>0,45</b>	<b>0,46</b>	1	-0,18
Visco	<b>-0,26</b>	-0,03	<b>-0,3</b>	<b>-0,14</b>	-0,03	-0,03	0,03	<b>-0,42</b>	<b>-0,24</b>	<b>-0,3</b>	<b>-0,18</b>	1

Le Tableau IV.12 montre que le flux salivaire est corrélé significativement et positivement aux trois quantités de protéines salivaires calculées, alors que précédemment ces corrélations étaient significativement négatives. Cette observation s'explique par le fait que les quantités de protéines salivaires sont calculées à partir du flux salivaire.

Le Tableau IV.12 met en évidence sept corrélations significatives entre les paramètres de libération et les paramètres salivaires (p-value < 0,05).

Des corrélations négatives et significatives sont observées entre la variable Visco et les variables  $I_{\max}$ ,  $V_{\max}$  (p-value < 0,05). Une salive plus visqueuse diminue l'intensité et la vitesse maximale de libération des molécules odorantes. Des corrélations négatives significatives sont aussi observées entre la variable Flux et les variables  $I_{\max}$ ,  $V_{\max}$  (p-value < 0,05). Le flux et la viscosité salivaires semblent influencer dans le même sens l'intensité et la vitesse maximale de la libération des molécules odorantes, bien qu'ils soient significativement et négativement corrélés. Nous n'avons pas d'explication pour les corrélations entre le flux salivaire et les paramètres de libération.

Une corrélation significative et négative est observée entre les variables Visco et AUC, signifiant qu'une salive visqueuse libère une quantité moins importante de molécules odorantes qu'une salive peu visqueuse.

Deux corrélations significatives et positives entre les variables  $Amy^{Qd}$  et les variables  $T_{o25}$ ,  $T_{o50}$ , sont aussi observées. Une corrélation positive entre les variables  $Amy^{Qd}$  et  $T_{o90}$  est observée, mais non significative (p-



## IV. Résultats

---

value = 0,09). Ces résultats suggèrent que plus la quantité en amylase dans la salive est importante, plus le temps de libération des molécules odorantes est long. Ce résultat serait la conséquence d'une rétention des molécules odorantes par l'amylase salivaire, cette rétention ayant été démontrée par l'étude *in vitro*.

**Diminution de la quantité de molécules odorantes libérées et de l'intensité de libération des molécules odorantes avec l'augmentation de la viscosité salivaire.**

**Augmentation du temps de libération avec l'augmentation de la quantité en amylase dans la salive.**

### 2. L'analyse en composantes principales des paramètres salivaires et de libération

Afin de visualiser, dans un espace de dimension réduite, les variables qui permettent d'expliquer les différents comportements de libération des molécules odorantes *in vivo*, une analyse en composantes principale est effectuée sur les variables  $I_{\max}$ ,  $T_{i_{\max}}$ , AUC,  $V_{\max}$ ,  $T_{025}$ ,  $T_{050}$ ,  $T_{090}$ , Flux,  $Brad^{Qd}$ ,  $Lipocal^{Qd}$ ,  $Amy^{Qd}$  et Visco pour les dix sujets, les trois états physiologiques et les deux molécules. Afin de s'affranchir des variations intra-individuelles et dans un souci de lisibilité, l'analyse en composantes principales est réalisée sur les valeurs des moyennes des répétitions. Néanmoins les résultats obtenus seront interprétés au regard des valeurs de corrélation obtenues sur l'ensemble des données.

Les deux premières composantes représentent 52 % de la variabilité totale des données (Figure IV.22). La troisième composante rend compte à elle-seule de 20 % de la variabilité totale et présente un intérêt notamment l'analyse de la variable  $T_{090}$  et dans l'analyse de la comparaison de la libération des molécules odorantes selon les trois états physiologiques (Figure IV.24).

## IV. Résultats

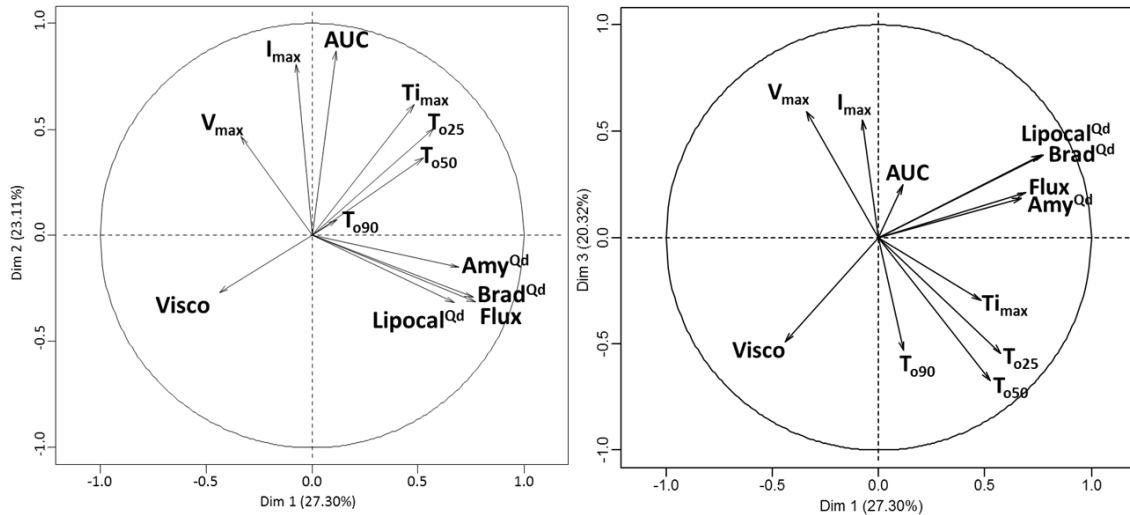


Figure IV.22 : Représentation ACP de la moyenne des variables  $I_{max}$ ,  $Ti_{max}$ ,  $AUC$ ,  $V_{max}$ ,  $T_{o25}$ ,  $T_{o50}$ ,  $T_{o90}$ ,  $Flux$ ,  $Brad^{Qd}$ ,  $Lipocal^{Qd}$ ,  $Amy^{Qd}$  et  $Visco$ .

La première composante est expliquée positivement par les variables  $Lipocal^{Qd}$ ,  $Brad^{Qd}$ ,  $Amy^{Qd}$ ,  $Flux$ ,  $T_{o50}$ ,  $T_{o25}$  et  $Ti_{max}$  (corrélations  $> 0,50$ ,  $p$ -value  $< 1.10^{-4}$ ) et négativement par les variables  $V_{max}$  et  $Visco$  (corrélations  $< -0,30$ ,  $p$ -value  $< 1.10^{-3}$ ). La deuxième composante est expliquée sur sa partie positive par les variables  $I_{max}$ ,  $V_{max}$ ,  $AUC$ ,  $Ti_{max}$ ,  $T_{o25}$ ,  $T_{o50}$  (corrélations  $> 0,36$ ,  $p$ -value  $< 1.10^{-3}$ ) et par les variables  $Visco$ ,  $Brad^{Qd}$ ,  $Lipocal^{Qd}$  et  $Flux$  sur sa partie négative (corrélations  $< -0,26$ ,  $p$ -value  $< 0,01$ ). La troisième composante est expliquée sur sa partie positive par les variables  $V_{max}$ ,  $I_{max}$ ,  $Lipocal^{Qd}$ ,  $Brad^{Qd}$  (corrélations  $> 0,38$ ,  $p$ -value  $< 1.10^{-3}$ ) et sur sa partie négative par les variables  $Ti_{max}$ ,  $Visco$ ,  $T_{o90}$ ,  $T_{o50}$ ,  $T_{o25}$  (corrélations  $< -0,30$ ,  $p$ -value  $< 1.10^{-5}$ ).

Cette représentation conforte les corrélations calculées sur l'ensemble des valeurs (Tableau IV.12).

La composante 1 met en évidence sur sa partie positive les corrélations entre les variables  $Amy^{Qd}$ ,  $Brad^{Qd}$ ,  $Lipocal^{Qd}$ ,  $Flux$ . Cette même composante met en évidence l'opposition des variables  $Visco$  et les variables  $Amy^{Qd}$ ,  $Brad^{Qd}$ ,  $Lipocal^{Qd}$ ,  $Flux$ , ainsi que l'opposition entre la variable  $Flux$  et  $V_{max}$ .

La composante 2 met en évidence la corrélation négative entre la variable  $Visco$  et les variables  $V_{max}$ ,  $I_{max}$ ,  $AUC$ . Cette composante met en avant l'opposition des variables  $I_{max}$ ,  $V_{max}$  et la variable  $Flux$ .

La composante 3 met de nouveau en évidence la corrélation positive entre les variables  $V_{max}$ ,  $I_{max}$  et leur opposition avec les variables  $Visco$ ,  $T_{o90}$ . Elle souligne aussi la corrélation positive entre les variables  $T_{o25}$ ,  $T_{o50}$ ,  $T_{o90}$ .

## IV. Résultats

La répartition des individus ainsi que leur ellipse de confiance à 95% est représentée dans les trois premières composantes sur la Figure IV.23.

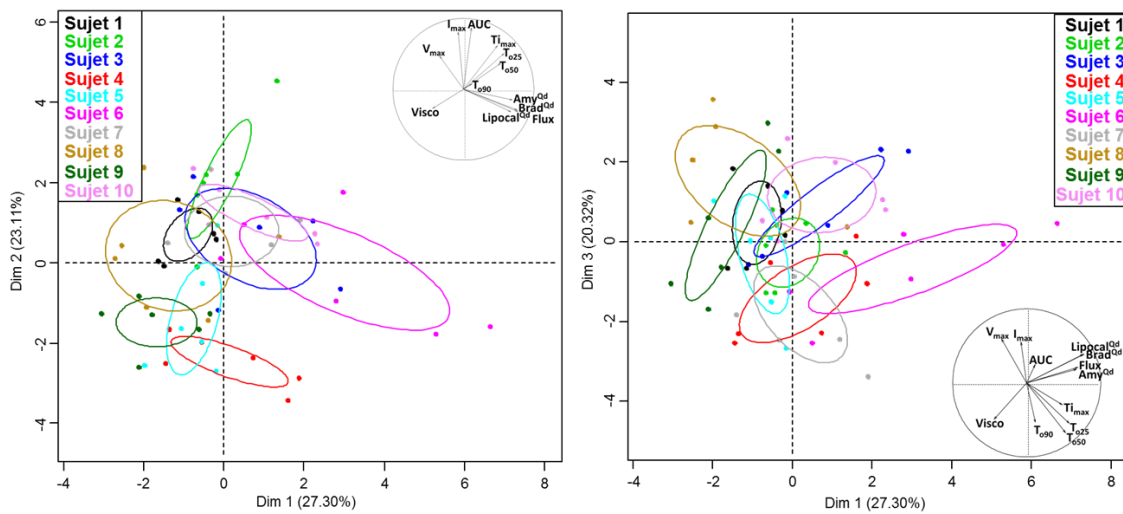


Figure IV.23 :Représentation des individus par ACP et de leurs ellipses de confiance à 95% selon les deux premières composantes (à gauche) et les composantes 1, 3 (à droite) pour l'analyse des moyennes des variables  $I_{max}$ ,  $T_{max}$ , AUC,  $V_{max}$ ,  $T_{0.25}$ ,  $T_{0.50}$ ,  $T_{0.90}$ , Flux,  $Brad^{Qd}$ ,  $Lipocal^{Qd}$ ,  $Amy^{Qd}$  et  $Visco$ . Une couleur est associée à chaque individu.

La Figure IV.23 montre que les sujets sont mieux différenciés sur la composante 2 que sur les composantes 1 et 3.

Par exemple, les Sujets 4, 9 sont différenciés des Sujets 1, 2, 3, 6, 7, 8, 10 sur la composante 2. En effet, comme nous l'avons vu précédemment, les tests HSD (Tableau IV.7 et Tableau IV.10) indiquent que les Sujets 4, 9 ont des valeurs de viscosité significativement supérieure à celle des Sujets 3, 6, 8, 10, une quantité d'amylase significativement inférieure aux Sujets 3, 6, 8, une quantité en protéines totale significativement plus faible que le Sujet 3, une quantité en lipocalines significativement plus faible que les Sujets 1, 3, 6, 8 et une quantité de molécules libérées significativement plus faible que les Sujets 1, 2, 3, 7, 10 ( $p$ -value < 0,05).

La représentation des ellipses de confiance à 95% des trois états physiologiques étudiés est donnée par la Figure IV.24.

## IV. Résultats

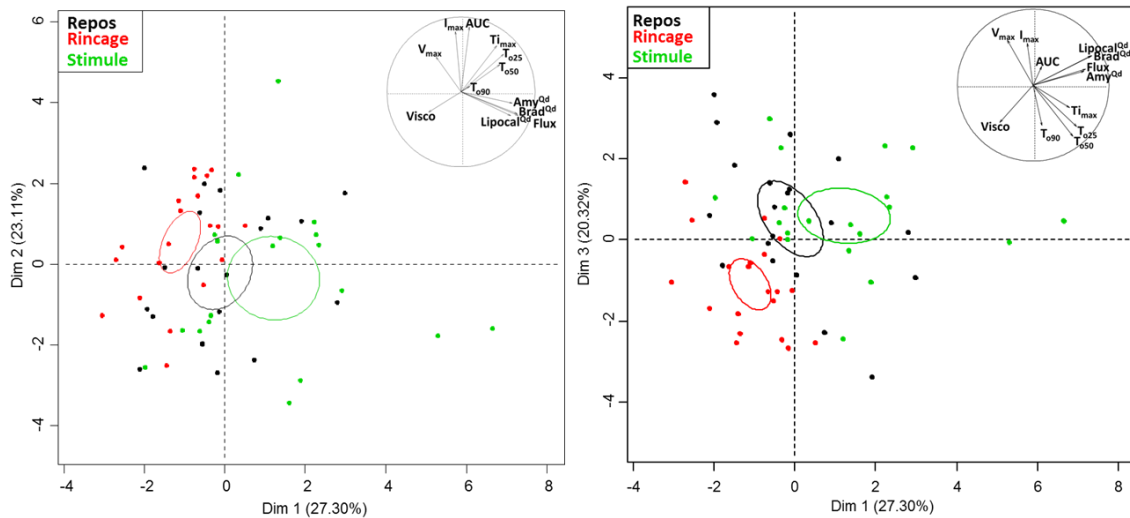


Figure IV.24: Représentation des individus par ACP et des ellipses de confiance des trois états physiologiques selon les deux premières composantes (à gauche) et les composantes 1, 3 (à droite) pour l'analyse des moyennes des variables de libération  $I_{max}$ ,  $T_{i_{max}}$ , AUC,  $V_{max}$ ,  $T_{025}$ ,  $T_{050}$ ,  $T_{090}$ , Flux,  $Brad^{Qd}$ ,  $Lipocal^{Qd}$ ,  $Amy^{Qd}$  et Visco. Une couleur est associée à un état physiologique.

La Figure IV.24 montre que les états physiologiques sont essentiellement différenciés sur les composantes 1 et 3, ces deux composantes étant principalement expliquées par les variables salivaires. Les états physiologiques sont donc essentiellement différenciés par les propriétés salivaires. Nous pouvons néanmoins dire qu'en état stimulé les sujets ont un flux salivaire (Flux) et une quantité de protéines dans la salive ( $Brad^{Qd}$ ,  $Amy^{Qd}$ ,  $Lipo^{Qd}$ ) plus élevés, ainsi qu'un temps de libération des molécules odorante ( $T_{090}$ ) et une viscosité (Visco) plus faible qu'après rinçage. La Figure IV.24 montre aussi qu'en état stimulé, les sujets ont une vitesse maximale de libération ( $V_{max}$ ) plus faibles qu'au repos.

La représentation des ellipses de confiance à 95% des deux molécules odorantes étudiées est donnée par la Figure IV.25.

## IV. Résultats

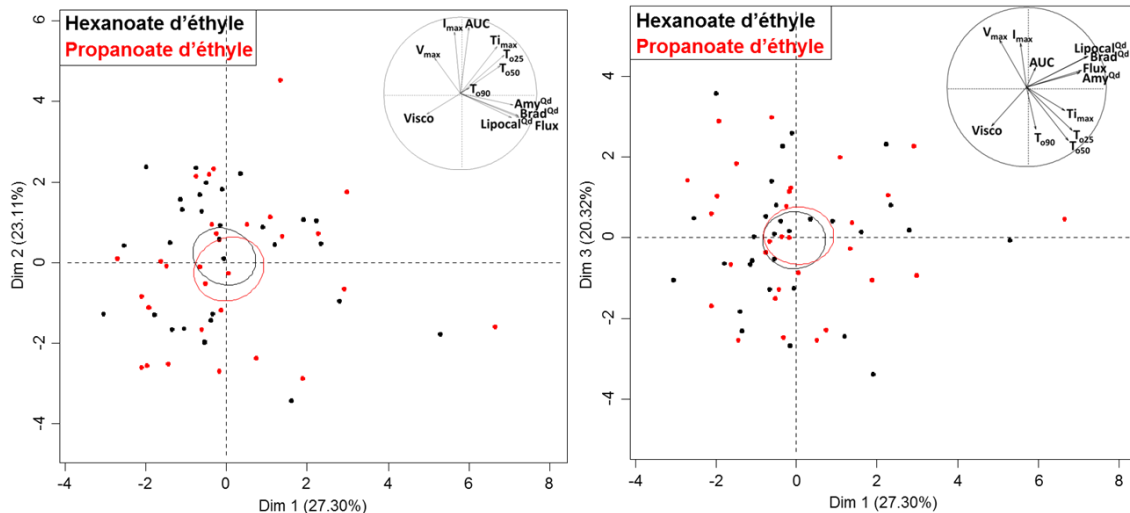


Figure IV.25 : Représentation des individus par ACP et des ellipses de confiance à 95% des deux molécules odorantes étudiées selon les deux premières composantes (à gauche) et les composantes 1, 3 (à droite) pour l'analyse des moyennes des variables  $I_{\max}$ ,  $T_{i\max}$ , AUC,  $V_{\max}$ ,  $T_{025}$ ,  $T_{050}$ ,  $T_{090}$ , Flux, Brad<sup>Qd</sup>, Lipocal<sup>Qd</sup>, Amy<sup>Qd</sup> et Visco. Une couleur est associée à une molécule odorante.

La Figure IV.25 indique que les deux molécules ne sont pas différenciées par les 3 premières composantes. Nous pouvons néanmoins remarquer une légère différenciation de ces deux molécules sur la composante 2. Cette observation suggère que l'hexanoate d'éthyle est libéré en moyenne plus rapidement ( $V_{\max}$ ) et en plus grande quantité (AUC) ( $V_{\max} = 2,33 \cdot 10^{+6}$  u.a./min,  $AUC = 2,70 \cdot 10^{+8}$  u.a.min) que le propanoate d'éthyle ( $V_{\max} = 1,85 \cdot 10^{+6}$  u.a./min,  $AUC = 2,70 \cdot 10^{+8}$  u.a.min), lorsque le sujet a un flux salivaire faible (Flux), une salive peu visqueuse (Visco) et pauvre en protéines (Amy<sup>Qd</sup>, Brad<sup>Qd</sup>, Lipocal<sup>Qd</sup>).

**Des sujets avec des compositions salivaires différentes ont des profils de libération différents.**

**Les conditions physiologiques affectent principalement les variables  $V_{\max}$  et  $T_{090}$ .**

### 3. L'importance des propriétés de la molécule odorante sur sa libération

Les précédents résultats ont montré un effet de la molécule odorante sur les paramètres de libération *in vivo*, c'est pourquoi une analyse complémentaire des corrélations est effectuée en prenant chaque molécule odorante séparément. Les variables prises en compte sont :  $I_{\max}$ ,  $T_{i\max}$ , AUC,  $V_{\max}$ ,  $T_{025}$ ,  $T_{050}$ ,  $T_{090}$ , Flux, Brad<sup>Qd</sup>, Lipocal<sup>Qd</sup>, Amy<sup>Qd</sup> et Visco pour les dix sujets, les trois états physiologiques, les deux molécules et les quatre séances d'analyse (Annexes n°5).

## IV. Résultats

---

Les matrices de corrélations par molécules montrent que la corrélation entre les variables  $T_{025}$  et  $Amy^{Od}$  qui était significative (corrélation = 0,15 p-value = 0,02) est toujours significative dans le cas de l'hexanoate d'éthyle (corrélation = 0,23, p-value = 0,01) mais n'est pas significative pour le propanoate d'éthyle (corrélation = 0,13, p-value = 0,20).

Ces observations suggèrent que le temps de libération des molécules ( $T_{025}$ ) de propanoate d'éthyle est moins affecté par la quantité d'amylase dans la salive que l'hexanoate d'éthyle, c'est-à-dire que la présence d'une grande quantité d'amylase salivaire augmente plus la durée de libération de l'hexanoate d'éthyle que du propanoate d'éthyle. Ce résultat serait dû à une rétention plus importante de l'hexanoate d'éthyle par l'amylase que le propanoate d'éthyle, en raison de l'hydrophobicité plus importante de l'hexanoate d'éthyle (résultat montrés par l'analyse *in vitro*).

Afin de mettre en évidence l'importance des propriétés de la molécule odorante sur sa libération, une analyse en composantes principale sur les variables  $I_{max}$ ,  $Ti_{max}$ , AUC,  $V_{max}$ ,  $T_{025}$ ,  $T_{050}$ ,  $T_{090}$ , Flux,  $Brad^{Od}$ ,  $Lipocal^{Od}$ ,  $Amy^{Od}$  et Visco est effectuée séparément pour les deux molécules odorantes. Dans un souci de lisibilité et afin de s'affranchir des variations intra-individuelles, ces deux analyses en composantes principales sont réalisées sur les moyennes des quatre répétitions pour les dix sujets et les trois états physiologiques. Néanmoins les résultats obtenus seront interprétés au regard des valeurs de corrélation obtenues sur l'ensemble des données.

Les deux premières composantes représentent 52 % et 53 % de la variabilité totale des données respectivement pour l'hexanoate d'éthyle et le propanoate d'éthyle (Figure IV.26). La troisième composante rend compte à elle-seule de 20 % d'information dans les deux cas, mais ne donne pas plus d'information sur la différenciation des deux molécules odorantes, Ainsi elle ne sera pas représentée lors de cette analyse.

## IV. Résultats

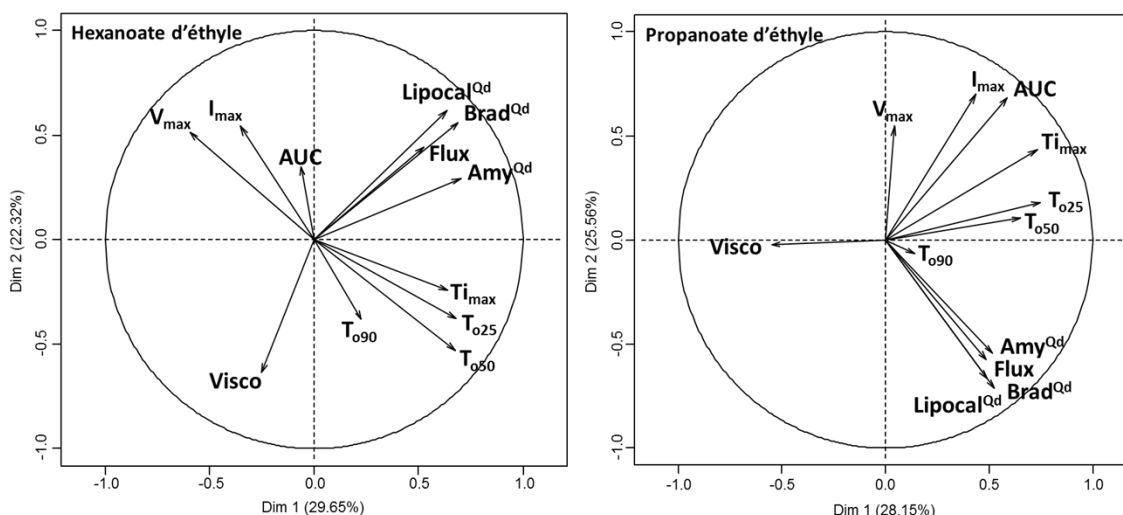


Figure IV.26 : Représentation ACP de la moyenne des variables  $I_{max}$ ,  $T_{i_{max}}$ , AUC,  $V_{max}$ ,  $T_{o25}$ ,  $T_{o50}$ ,  $T_{o90}$ , Flux, Brad<sup>Qd</sup>, Lipocal<sup>Qd</sup>, Amy<sup>Qd</sup> et Visco, selon les deux premières composantes pour l'hexanoate d'éthyle (à gauche) et le propanoate d'éthyle (à droite).

Dans le cas de l'hexanoate d'éthyle, la composante 1 est expliquée sur sa partie positive par les variables Lipocal<sup>Qd</sup>, Brad<sup>Qd</sup>, Amy<sup>Qd</sup>, Flux,  $T_{o50}$ ,  $T_{o25}$ ,  $T_{i_{max}}$  et sur sa partie négative par la variable  $V_{max}$ . La composante 2 est expliquée sur sa partie positive par les variables  $V_{max}$ ,  $I_{max}$ , Lipocal<sup>Qd</sup>, Brad<sup>Qd</sup>, Amy<sup>Qd</sup>, Flux, AUC et sur sa partie négative par les variables Visco,  $T_{o25}$ ,  $T_{o50}$ ,  $T_{o90}$ ,  $T_{i_{max}}$ .

Dans le cas du propanoate d'éthyle, la composante 1 est expliquée sur sa partie négative par la variable Visco et sur partie positive par l'ensemble des autres variables, sauf  $T_{o90}$ ,  $V_{max}$ . La composante 2 est expliquée sur sa partie positive par les variables  $V_{max}$ ,  $I_{max}$ , AUC,  $T_{i_{max}}$  et sur sa partie négative par les variables Amy<sup>Qd</sup>, Flux, Brad<sup>Qd</sup>, Lipocal<sup>Qd</sup>.

La comparaison des résultats obtenus pour les deux molécules odorantes montre que la libération de l'hexanoate d'éthyle est principalement influencée par les variables Visco, Amy<sup>Qd</sup>, alors que la libération du propanoate d'éthyle est principalement influencée par la variable Visco, comme l'illustre la Figure IV.26.

Pour les deux molécules odorantes, plus la salive est visqueuse (Visco), moins leur libération est intense ( $I_{max}$ ) et plus leur quantité libérée est faible (AUC). Dans le cas du propanoate d'éthyle, une viscosité (Visco) élevée diminue significativement aussi la vitesse maximale de libération ( $V_{max}$ ). Dans le cas de l'hexanoate d'éthyle, une quantité importante d'amylase dans la salive (Amy<sup>Qd</sup>) augmente significativement le temps de libération ( $T_{o25}$ ).

## IV. Résultats

---

**Libération du propanoate d'éthyle majoritairement influencée par la viscosité de la salive.**

**Libération de l'hexanoate d'éthyle plus influencée par la présence d'amylase salivaire que celle du propanote d'éthyle.**

### 4. L'effet du volume buccal sur la libération des molécules odorantes

Le volume buccal varie en fonction de l'individu, son âge, sa taille, son poids, ou son genre (Xue, *et al.*, 2006). Les variations de ce volume peuvent influencer la libération de molécules odorantes par voie rétronasale. Ainsi le volume buccal est un paramètre important pouvant influencer considérablement la libération des molécules odorantes (Mishellany-Dutour, *et al.*, 2012b). Il doit donc être pris en compte, afin d'évaluer son impact sur la libération des molécules odorantes.

Les valeurs des volumes buccaux de nos sujets varient entre 25 et 73 cm<sup>3</sup> avec une moyenne de 50 cm<sup>3</sup>. Ces données sont légèrement plus élevées que celles trouvées dans la littérature (entre 30 et 40 cm<sup>3</sup>), mais reste du même ordre de grandeur (Xue, *et al.*, 2006).

Une analyse de la variance sur les valeurs des quatre mesures du volume buccal pour les dix sujets met en évidence une différence significative entre les sujets ( $p$ -value <  $2,2 \cdot 10^{-16}$ ). Cette différence significative est observable sur la Figure IV.27 qui représente les valeurs des volumes buccaux pour les quatre répétitions de mesure des dix sujets.



## IV. Résultats

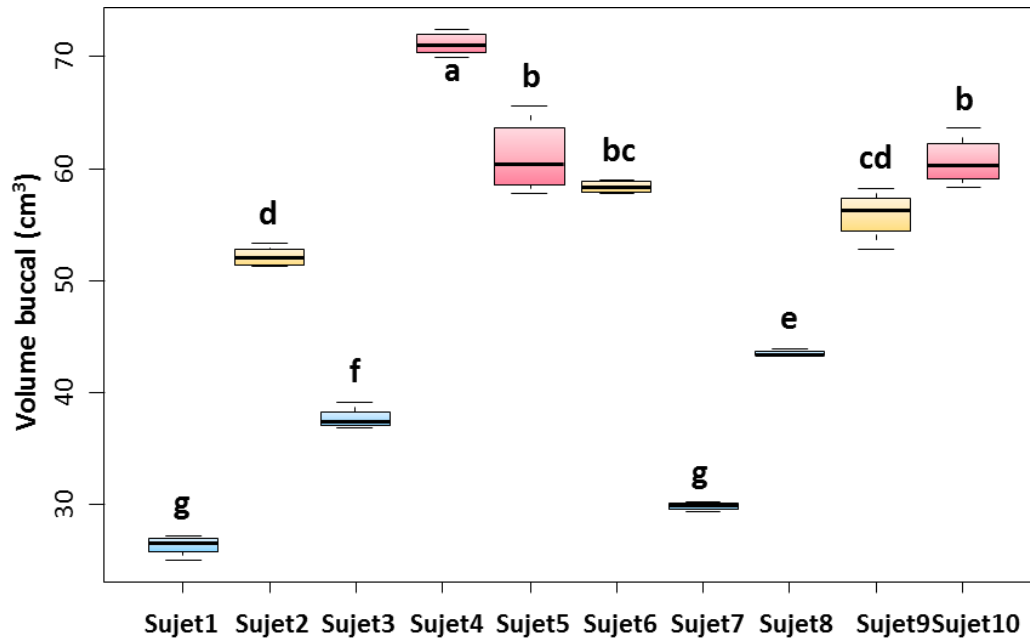


Figure IV.27 : Box plot représentant la dispersion des valeurs des volumes buccaux. Valeurs représentées pour les quatre répétitions. Les lignes supérieures et inférieures de la 'box' correspondent respectivement aux quartiles supérieurs et inférieurs. Les barres d'erreur correspondent aux valeurs extrêmes mesurées. La ligne horizontale en gras correspond à la médiane. Les lettres différentes correspondent à des différences significatives entre les sujets (test HSD, p-value < 0,05).

La Figure IV.27 met en évidence les différences significatives entre les sujets. Les Sujet 1, 7 ont les volumes buccaux les plus faibles et le Sujet 4 le volume le plus élevé.

**Grande variabilité interindividuelle dans le volume buccal.**

Le volume buccal n'a pas encore été pris en compte dans les analyses de données, car celui-ci est constant pour chaque individu et ne varie pas en fonction de l'état physiologique ou de la molécule odorante. En revanche, comme nous l'avons vu, ce paramètre varie significativement entre les sujets et par conséquent peut être déterminant dans la libération des molécules odorantes. La répartition des molécules odorantes entre la salive et l'air de la bouche dépend du volume d'air, donc du volume buccal.

Afin de mettre en évidence les relations qui existent entre le volume buccal (Vbucc), les variables de libération et salivaires étudiés, une matrice des corrélations est réalisée. Les variables prises en comptes sont :  $I_{max}$ ,  $Ti_{max}$ , AUC,  $V_{max}$ ,  $T_{025}$ ,  $T_{050}$ ,  $T_{090}$ , Flux,  $Brad^{Qd}$ ,  $Lipocal^{Qd}$ ,  $Amy^{Qd}$ , Visco pour les dix sujets, les trois états physiologiques, les deux molécules et les quatre séances d'analyse et le Vbucc pour les moyennes des quatre répétitions de mesure.

## IV. Résultats

Tableau IV.13: Corrélations entre les variables  $I_{max}$ ,  $Ti_{max}$ , AUC,  $V_{max}$ ,  $T_{025}$ ,  $T_{050}$ ,  $T_{090}$ , Flux,  $Brad^{Qd}$ ,  $Lipocal^{Qd}$ ,  $Amy^{Qd}$ , Visco et Vbucc. Les corrélations significatives sont en rouge (p values < 0,05).

Variables	$I_{max}$	$Ti_{max}$	AUC	$V_{max}$	$T_{025}$	$T_{050}$	$T_{090}$	Flux	$Brad^{Qd}$	$Lipocal^{Qd}$	$Amy^{Qd}$	Visco
Vbucc	-0,3	-0,11	-0,32	-0,17	-0,04	0,04	-0,13	0,4	0,2	0,14	-0,09	0,03

Le Tableau IV.13 met en évidence des corrélations négatives significatives entre le volume buccal et les variables  $I_{max}$ , AUC,  $V_{max}$  et  $T_{090}$  (p-value < 0,05). Cette observation signifie qu'un sujet avec un grand volume buccal présente une concentration moins importante de molécules odorantes en bouche (AUC) par un effet de dilution, avec une intensité et une vitesse de libération maximales faibles ( $I_{max}$  et  $V_{max}$ ), sur une courte période ( $T_{090}$ ).

Une corrélation positive significative entre le volume buccal et la variable Flux est mise en évidence par le Tableau IV.13 Ceci indique qu'un sujet avec un grand volume buccal possède un flux salivaire élevé.

Le volume buccal n'a pas été pris en compte dans les premières analyses en composantes principales. Afin d'illustrer son importance dans la libération des molécules odorantes, une analyse en composantes principales est effectuée sur les moyennes des quatre répétitions des variables  $I_{max}$ ,  $Ti_{max}$ , AUC,  $V_{max}$ ,  $T_{025}$ ,  $T_{050}$ ,  $T_{090}$ , Flux,  $Brad^{Qd}$ ,  $Lipocal^{Qd}$ ,  $Amy^{Qd}$ , Visco pour les dix sujets, les trois états physiologiques, les deux molécules et le Vbucc pour les moyennes des quatre répétitions de mesure.

Les deux premières composantes représentent 49 % et 51 % de la variabilité totale des données respectivement avec et sans la variable Vbucc (Figure IV.28). La troisième composante rend compte de 19 % et 20% d'information respectivement pour les représentations avec et sans la variable Vbucc. La troisième composante ne donne pas plus d'information sur le volume buccal (composante 3 non expliquée pas la variable Vbucc).

## IV. Résultats

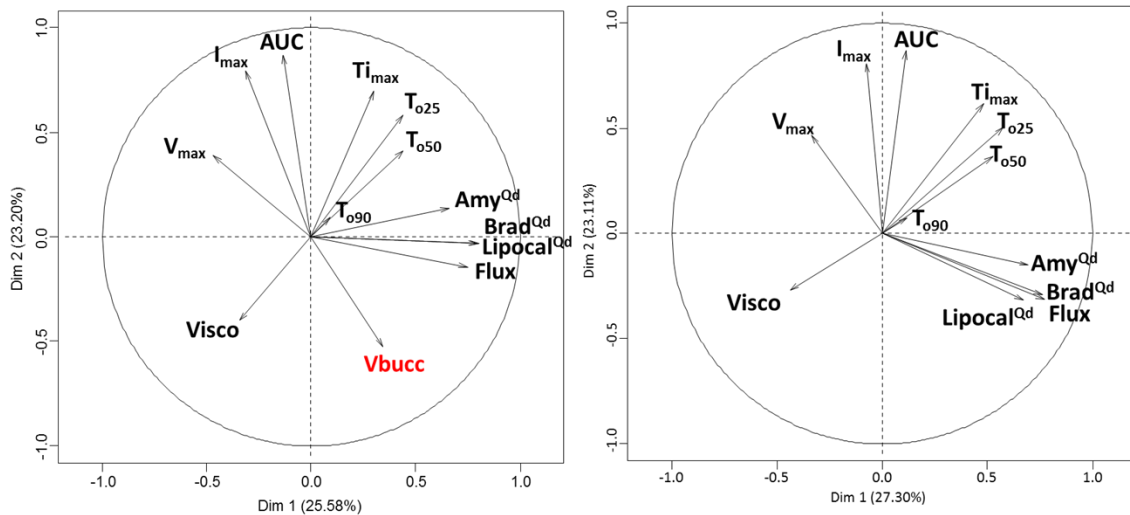


Figure IV.28 : Représentation ACP de la moyenne des variables I<sub>max</sub>, T<sub>i</sub><sub>max</sub>, AUC, V<sub>max</sub>, T<sub>o</sub><sub>25</sub>, T<sub>o</sub><sub>50</sub>, T<sub>o</sub><sub>90</sub>, Flux, Brad<sup>Qd</sup>, Lipocal<sup>Qd</sup>, Amy<sup>Qd</sup>, Visco selon les deux premières composantes avec la variable V<sub>bucc</sub> (à gauche) et sans la variable V<sub>bucc</sub> (à droite).

Pour ces deux représentations ACP, la composante 1 est principalement expliquée sur sa partie positive par les variables Amy<sup>Qd</sup>, Brad<sup>Qd</sup>, Lipocal<sup>Qd</sup>, Flux et expliquée sur sa partie négative par les variables Visco, V<sub>max</sub>. La composante 2 est principalement expliquée sur sa partie positive par les composantes AUC, I<sub>max</sub>, T<sub>i</sub><sub>max</sub>, T<sub>o</sub><sub>25</sub>, T<sub>o</sub><sub>50</sub>, V<sub>max</sub> et expliquée sur sa partie négative par les variables Visco et V<sub>bucc</sub> pour la représentation ACP avec la variable V<sub>bucc</sub>.

Cette représentation conforte les corrélations calculées sur l'ensemble des valeurs (Tableau IV.13).

**Un volume buccal élevé induit un flux salivaire élevé et diminue la quantité de molécules odorantes libérées.**

## IV. Résultats

---

### 5. Conclusion

Les analyses précédentes ont mis en évidence un effet de l'état physiologique sur la composition salivaire des individus et par conséquent sur la libération des molécules odorantes par voie rétronasale. En état stimulé, les sujets ont un flux salivaire plus élevé, une quantité de protéines plus importantes en bouche au moment de la déglutition et un temps de libération des molécules odorantes plus court qu'après rinçage. Ainsi après élimination de la salive en bouche par le rinçage, les molécules odorantes seraient directement en contact avec les protéines salivaires adsorbées sur les muqueuses, entraînant une rétention plus importante des molécules odorantes que par les protéines de la salive non adsorbée aux muqueuses buccale, ralentissant leur libération. En revanche, en état de repos, les sujets ont une vitesse maximale de libération des molécules odorantes ( $V_{\max}$ ) plus importante qu'en état stimulé.

La principale différence observée entre les deux molécules odorantes porte sur le temps de libération ( $T_{090}$ ). Comme nous l'avons vu dans la partie *in vitro*, l'alpha-amylase salivaire modifie la libération des esters en fonction de leur hydrophobicité. En raison de la corrélation positive trouvée entre les variables ( $Amy^{Qd}$ ) et ( $T_{090}$ ) pour l'hexanoate d'éthyle uniquement, nous supposons donc que la modification de la cinétique de libération de l'hexanoate d'éthyle est due à une rétention par l'alpha-amylase.

Finalement la prise en compte du volume buccal dans les analyses ne modifie pas les interprétations des résultats, mais donne de nouvelles précisions. En effet, un sujet qui a un volume buccal élevé, un flux salivaire élevé et une salive riche en protéines ( $Brad^{Qd}$ ,  $Lipocal^{Qd}$ ) libère une plus petite quantité de molécules odorantes (AUC) qu'un sujet avec un petit volume buccal. Ce qui montre de nouveau l'impact des protéines salivaires sur la libération des molécules odorantes et notamment la rétention des molécules odorantes par les protéines salivaires.



*Discussion et conclusion*



# V. Discussion et conclusion

---

L'objectif de cette étude a été d'étudier le rôle joué par la salive dans la libération des molécules odorantes en bouche, par une approche *in vitro* et une approche *in vivo*.

L'approche *in vitro* a reposé sur l'analyse de la composition en molécules odorantes dans la phase vapeur à l'équilibre en présence de salive humaine et de salives artificielles avec des compositions protéiques contrôlées en d'alpha-amylase et en mucine.

L'ajout de mucines salivaires diminue la libération des molécules odorantes par rapport à l'eau pure. Cette diminution s'explique par une rétention des molécules odorantes par les mucines (publication 1). Cet effet a été montré pour la première fois pour des cétones, il avait déjà été observé pour l'hexanoate d'éthyle par Fiel *et al* (Fiel, *et al.*, 2001) et pour les alcools et aldéhydes par Van Ruth *et al* (van Ruth, *et al.*, 2001a).

L'ajout d'alpha-amylase salivaire induit une diminution de la libération des molécules odorantes par rapport à l'eau pure, cette diminution étant plus importante que celle engendrée par les mucines (publication 1). Jusqu'à ce jour, aucun effet de l'alpha-amylase salivaire sur la libération de molécules odorantes n'avait été montré.

Un mélange d'alpha-amylase et de mucine dans de la salive artificielle induit également une diminution dans la libération des molécules odorantes par rapport à l'eau pure (publication 1), ce qui est en accord avec les résultats de l'étude de Van Ruth *et al* (van Ruth, *et al.*, 2001a). Nous avons notamment, observé un effet intermédiaire du mélange de l'alpha-amylase salivaire et des mucines salivaires par rapport aux effets respectifs des deux protéines, sans addition des effets de rétention de ces deux protéines combinées. Van Ruth *et al* (van Ruth, *et al.*, 1995a) n'ont pas analysé l'effet de l'alpha-amylase seule sur la libération des molécules odorantes mais uniquement l'ajout de l'alpha-amylase aux mucines, et ont montré que l'alpha-amylase n'avait pas d'impact additionnel sur la libération des molécules odorantes et que seules les mucines salivaires induisaient une rétention des molécules odorantes.

Deux séries de molécules odorantes présentant une augmentation de la chaîne aliphatique ont été choisies pour étudier le rôle des effets hydrophobes dans ces interactions. Il a ainsi été montré que plus les molécules odorantes sont hydrophobes et plus elles sont retenues en présence des protéines salivaires étudiées. Cette observation suggère que la rétention des molécules odorantes par l'alpha-amylase et les



## V. Discussion et conclusion

---

mucines salivaires serait due à des effets hydrophobes. En présence de mucine, une différence de rétention a été observée en fonction de la classe chimique des molécules odorantes, étant donné qu'à hydrophobie égale, les esters sont moins retenus que les cétones en présence de mucines. Cet effet, n'a pas été observé dans le cas de l'alpha-amylase.

L'étude structurale de l'alpha-amylase salivaire montre la présence de résidus hydrophobes à l'entrée du site catalytique de l'enzyme (Ramasubbu, *et al.*, 1996b). Il est donc possible que ce site puisse être le site d'interaction des molécules odorantes ainsi que celui des mucines salivaires qui présentent elles aussi des régions hydrophobes (Bansil, *et al.*, 2006c). Nous supposons les effets suivants pour chaque milieu étudié :

- Milieu A : les molécules odorantes interagissent avec l'alpha-amylase salivaire via des effets hydrophobes au niveau des résidus hydrophobes présents au niveau du site catalytique de l'enzyme. Ces interactions sont à l'origine de la rétention des molécules odorantes observée. Cette rétention est plus importante qu'en présence de mucine seule et de mucine + alpha-amylase (Figure V.1.a).
- Milieu M : les molécules odorantes interagissent via des effets hydrophobes au niveau des domaines hydrophobes créés par l'association des mucines salivaires. La rétention observée est la moins importante des trois milieux étudiés (Figure V.1.b).
- Milieu AM : les domaines hydrophobes des agrégats de mucines interagissent avec la cavité hydrophobe de l'alpha-amylase. Les mucines et les molécules odorantes entrent en compétition pour interagir avec la cavité hydrophobe de l'alpha-amylase limitant les interactions hydrophobes entre les molécules odorantes et l'alpha-amylase. De ce fait, l'alpha-amylase et les molécules odorantes entrent aussi en compétition pour interagir avec les domaines hydrophobes des agrégats de mucines, diminuant le nombre de ces domaines hydrophobes accessibles par les molécules odorantes (Figure V.1.c). Le nombre de sites d'interaction pour les molécules odorantes est de ce fait inférieur à la somme de la quantité d'alpha-amylase et des domaines hydrophobes des agrégats de mucines.

## V. Discussion et conclusion

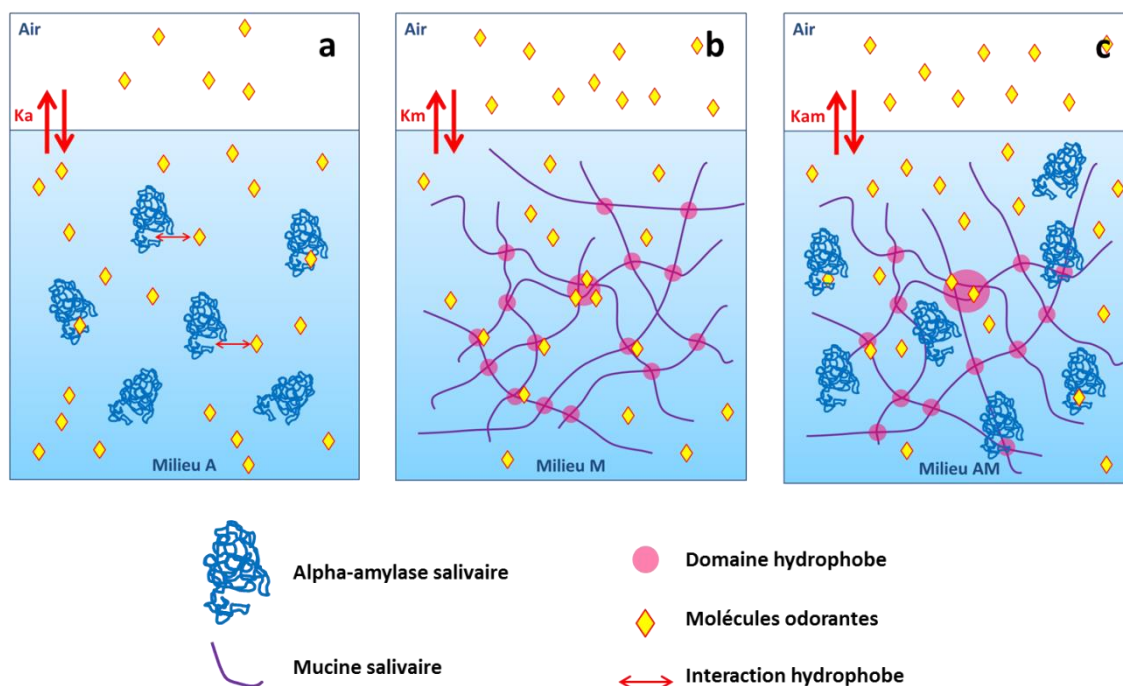


Figure V.1: Hypothèses sur les interactions 'protéines-molécules odorantes' (a, b) et 'protéines-protéines' (c) dans la salive ( $K_a$ ,  $K_m$ ,  $K_{am}$ , les coefficients de partage respectifs des milieux A, M et AM).

Au cours de notre première approche, nous avons pu mettre en évidence une diminution très importante des esters de l'espace de tête au cours du temps en présence de salive humaine, disparition que nous n'avons pas observée pour les cétones. Par une analyse plus approfondie, nous avons réussi à montrer que cette disparition provenait d'une hydrolyse des esters par la salive humaine, ce phénomène ayant aussi été observé par Buettner *et al* (Buettner, 2002b). Une extraction de la phase liquide a montré l'apparition d'acides carboxyliques issus de la dégradation de chaque ester de l'étude. Nous avons aussi mis en évidence pour la première fois une augmentation de la dégradation de ces esters avec leur longueur de chaîne carbonée. Notre hypothèse est que la dégradation des esters dans la salive proviendrait de l'action d'une estérase salivaire, mais une étude approfondie de ce phénomène sera nécessaire pour confirmer cette hypothèse.

Afin de vérifier si les résultats obtenus à l'issue de l'approche *in vitro* pouvaient avoir une incidence sur la libération des molécules odorantes *in vivo*, en condition réelle de consommation, nous avons testé les deux hypothèses suivantes:

- Des sujets ayant des compositions salivaires différentes ont des libérations de molécules odorantes par voie rétronasale différentes.
- Les variations de la composition salivaire avec la condition physiologique du sujet modifient sa libération de molécules odorantes par voie rétronasale.

## V. Discussion et conclusion

---

L'approche *in vivo* par spectrométrie de masse à source à pression atmosphérique a permis de suivre la libération par voie rétronasale de deux molécules odorantes chez dix sujets différents, dans trois conditions physiologiques différentes.

Cette seconde approche a confirmé l'existence de grandes différences interindividuelles entre nos sujets sur les paramètres salivaires mesurés (flux, viscosité, composition), ainsi qu'un effet de la condition physiologique sur ces paramètres. Nos résultats sont en accord avec les nombreuses informations présentes dans la littérature à ce sujet (Mackie, *et al.*, 1990; Neyraud, *et al.*, 2012d; Neyraud, *et al.*, 2006).

Le suivi de la libération des molécules odorantes par voie rétronasale en dynamique représente déjà un sujet très abordé dans la littérature. Certains auteurs ont même couplé cette étude à l'analyse du flux respiratoire, de l'activité masticatoire, ainsi qu'à la variation du volume buccal au cours de la consommation d'un aliment (Mishellany-Dutour, *et al.*, 2012b; Pionnier, *et al.*, 2004b; Repoux, *et al.*, 2012a). En revanche, aucune de ces études n'a pris en compte l'effet de la condition physiologique de consommation sur la libération des molécules odorantes par voie rétronasale, comme proposé dans notre étude.

Cette approche nous a permis de montrer que des sujets avec des paramètres salivaires différents ont des profils de libération des molécules odorantes différents. En particulier, les sujets qui ont des salives plus riches en protéines mettent plus de temps à libérer 90% de la quantité totale d'hexanoate d'éthyle que les autres. Ces résultats peuvent s'expliquer par une rétention de l'hexanoate d'éthyle par les protéines salivaires, qui va avoir pour effet de ralentir la libération de cette molécule hydrophobe dans la cavité nasale.

Cette approche nous a également permis de mettre en avant des différences significatives de libération des molécules odorantes entre les états physiologiques. Nous avons notamment mis en évidence qu'une stimulation par mastication entraîne une augmentation significative du flux salivaire et une diminution de la concentration en protéines dans la salive en bouche ( $p$ -value < 0,05), avec pour conséquence une diminution du temps pour atteindre la quantité maximale de libération des molécules odorantes par voie rétronasale par rapport à la condition « rinçage » de l'étude. Cette observation suggère que la dilution des protéines salivaires par un flux plus important diminue la rétention des molécules odorantes par ces protéines.

Nous avons aussi mis en évidence que la vitesse maximale de libération est plus élevée au repos qu'en état stimulé. Nous supposons que ce phénomène est dû à une quantité moins importante de salive en

## V. Discussion et conclusion

---

bouche au repos qu'en état stimulé, en raison du flux salivaire plus faible. Les molécules odorantes sont ainsi moins diluées dans la salive, ce qui explique la vitesse plus élevée.

Une corrélation positive entre le volume buccal, le flux salivaire et la quantité de protéines salivaires a été mise en évidence dans cette étude. Une corrélation négative a aussi été mise en évidence entre le volume buccal et la quantité de molécules odorantes libérées. Les résultats ont aussi montré qu'un volume buccal élevé est lié à un temps et une intensité de libération faibles. Un volume buccal élevé serait donc lié à une grande surface d'échange entre la salive et la phase vapeur en bouche, permettant une libération des molécules odorantes sur une plus courte période. A même quantité de molécules odorantes libérées dans la phase vapeur, une augmentation du volume buccal entraîne une diminution de la concentration des molécules odorantes dans cette phase, ce qui peut expliquer la diminution de la quantité de molécules odorantes mesurées dans les effluves nasales.

Nous avons donc pu mettre en évidence l'importance de l'état physiologique sur la composition salivaire et par conséquent sur la libération des molécules odorantes par voie rétronasale. Afin de confirmer les hypothèses proposées concernant les interactions entre molécules odorantes et protéines salivaires, une étude des interactions protéines 'salivaires-molécules odorantes' pourrait être mise en place. Cette étude permettrait également de déterminer le nombre de molécules odorantes pouvant interagir par protéine salivaire, la nature spécifique ou non de l'interaction, ainsi que d'identifier les sites d'interaction.

Les interactions 'protéines-molécules odorantes' ont été très étudiées dans le cas des protéines alimentaires, notamment les protéines laitières comme les caséines et beta-lactoglobuline (Chobpattana, *et al.*, 2002; Landy, *et al.*, 1995; Tavel, *et al.*, 2008a). Ainsi, les techniques de biologie structurale utilisées dans ces études pourraient servir à l'analyse des interactions entre les protéines salivaires et les molécules odorantes. Par exemple, la technique de titration calorimétrique isotherme (ITC) peut apporter des informations sur le type de liaisons impliquées dans les interactions entre l'alpha-amylase salivaire et les molécules odorantes (de même pour les mucines salivaires). Une étude par résonance magnétique nucléaire (RMN) de ces interactions pourrait déterminer les sites d'interaction des molécules odorantes sur la protéine.

Il semble également intéressant de corréliser les seuils de détection des molécules odorantes avec la composition salivaire des sujets, afin de montrer un lien avec la perception sensorielle. En effet, dans notre étude aucune donnée sensorielle n'a été prise en compte. Ainsi nous ne savons pas si les interactions 'protéines salivaires-molécules odorantes' ont un impact sur la perception sensorielle. Pour cela, des études sensorielles pourront être réalisées, par exemple en couplant l'étude de libération des molécules odorantes par voie rétronasale au cours du temps (APCI-MS ou PTR-MS) à des tests sensoriels de

## V. Discussion et conclusion

---

dominance temporelle des sensations (DTS), pour des matrices alimentaires plus ou moins complexes. Ce type d'étude pourra permettre de déterminer si les variations de libération des molécules odorantes engendrées par les variations de compositions salivaires des sujets, mesurées mécaniquement sont perceptibles sensoriellement.



# *Bibliographie*





# Bibliographie

---

- Abdi, & Williams. (2010). Principal component analysis. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Statistics*, 2(4), 433-459.
- Adachi, Takenaka, Gidamis, Mikami, & Utsumi. (2001). Crystal structure of soybean proglycinin A1aB1b homotrimer. *Journal of Molecular Biology*, 305(2), 291-305.
- Aguirre, Levine, Cohen, & Tabak. (1987). Immunochemical quantitation of  $\alpha$ -amylase and secretory IgA in parotid saliva from people of various ages. *Archives of Oral Biology*, 32(4), 297-301.
- Aguirre, Testa-Weintraub, Banderas, Dunford, & Levine. (1992). Levels of salivary cystatins in periodontally healthy and diseased older adults. *Archives of Oral Biology*, 37(5), 355-361.
- Aguirre, Testa-Weintraub, Banderas, Haraszthy, Reddy, & Levine. (1993). Sialochemistry: A diagnostic tool? *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 4(3), 343-350.
- Ahmed, Dennison, & Dougherty. (1978). Flavor and odor thresholds in water of selected orange juice components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 26(1), 187-191.
- Amerongen, & Veerman. (2002). Saliva--the defender of the oral cavity. *Oral Diseases*, 8(1), 12-22.
- Andriot, Harrison, Fournier, & Guichard. (2000). Interactions between methyl ketones and  $\beta$ -lactoglobulin: sensory analysis, headspace analysis, and mathematical modeling. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(9), 4246-4251.
- Anthony Hilton. (2006). Stat Note 6 : post hoc ANOVA tests. In *Stat Note 6*, vol. 6 (pp. 34-36).
- Aps, & Martens. (2005). Review: The physiology of saliva and transfer of drugs into saliva. *Forensic Science International*, 150(2-3), 119-131.
- Arvisenet, Voilley, & Cayot. (2002). Retention of aroma compounds in starch matrices: competitions between aroma compounds toward amylose and amylopectin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(25), 7345-7349.
- Athès, Peña y Lillo, Bernard, Pérez-Correa, & Souchon. (2004). Comparison of Experimental Methods for Measuring Infinite Dilution Volatilities of Aroma Compounds in Water/Ethanol Mixtures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(7), 2021-2027.
- Atlan, Trelea, Saint-Eve, Souchon, & Latrille. (2006). Processing gas chromatographic data and confidence interval calculation for partition coefficients determined by the phase ratio variation method. *Journal of Chromatography A*, 1110(1-2), 146-155.
- Baines, & Morris. (1987). Flavour/taste perception in thickened systems : the effect of guar gum above and below c. *Food Hydrocolloids*, 1(3), 197-205.
- Banerjee, Yalkowsky, & Valvani. (1980). Water Solubility and Octanol-Water Partition-Coefficients of Organics - Limitations of the Solubility-Partition Coefficient Correlation. *Environmental Science & Technology*, 14(10), 1227-1229.
- Bansil, & Turner. (2006). Mucin structure, aggregation, physiological functions and biomedical applications. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 11(2-3), 164-170.
- Bardow, Moe, Nyvad, & Nauntofte. (2000). The buffer capacity and buffer systems of human whole saliva measured without loss of CO<sub>2</sub>. *Archives of Oral Biology*, 45, 1-12.
- Bayarri, Taylor, & Hort. (2006). The role of fat in flavor perception: effect of partition and viscosity in model emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(23), 8862-8868.
- Benjamin, Silcock, Beauchamp, Buettner, & Everett. (2012). Tongue pressure and oral conditions affect volatile release from liquid systems in a model mouth. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(39), 9918-9927.
- Bennick. (1982). Salivary proline-rich proteins. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 45(2), 83-99.
- Benoit. (1983). Breath analysis by atmospheric pressure ionization spectrometry. *Analytical Chemistry*, 55, 805-807.

## Bibliographie

---

- Bergdahl. (2000). Salivary flow and oral complaints in adult dental patients. *Community Dentistry and Oral Epidemiology*, 28(1), 59-66.
- Boland, Buhr, Giannouli, & van Ruth. (2004). Influence of gelatin, starch, pectin and artificial saliva on the release of 11 flavour compounds from model gel systems. *Food Chemistry*, 86(3), 401-411.
- Brauss, Linforth, Cayeux, Harvey, & Taylor. (1999). Altering the fat content affects flavor release in a model yogurt system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(5), 2055-2059.
- Buck, & Axel. (1991). A Novel Multigene Family May Encode Odorant Receptors : A Molecular Basis for Odor Recognition. *Cell*, 65, 175-187.
- Buettner. (2002). Influence of human salivary enzymes on odorant concentration changes occurring in vivo. 1. Esters and thiols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(11), 3283-3289.
- Buettner, & Beauchamp. (2010). Chemical input - Sensory output: Diverse modes of physiology-flavour interaction. *Food Quality and Preference*, 21(8), 915-924.
- Buettner, Beer, Hannig, & Settles. (2001). Observation of the swallowing process by application of videofluoroscopy and real-time magnetic resonance imaging—consequences for retronasal aroma stimulation. *Chemical Senses*, 26(9), 1211-1219.
- Buettner, & Schieberle. (2000). Changes in the concentration of key fruit odorants induced by mastication. In D. D. Roberts & A. J. Taylor (Eds.), *Flavor Release*, (pp. 87-98). Washington: American Chemical Society.
- Buettner, & Schieberle. (2001c). Evaluation of key aroma compounds in hand-squeezed grapefruit juice (*Citrus paradisi* Macfayden) by quantitation and flavor reconstitution experiments. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(3), 1358-1363.
- Burdach, Kroeze, & Köster. (1984). Nasal, retronasal, and gustatory perception: An experimental comparison. *Perception & Psychophysics*, 36(3), 205-208.
- Burdock. (1995). *Fenaroli's handbook of flavor ingredients. vol.II. 3 ème édition* (CRC Press ed.). Reston (Virginia) (USA).
- Burova, Grinberg, Grinberg, & Tolstoguzov. (2003). Binding of odorants to individual proteins and their mixtures. Effects of protein denaturation and association. A plasticized globule state. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 213(2-3), 235-244.
- Buttery, Ling, & Guadagni. (1969). Food volatiles. Volatilities of aldehydes, ketones, and esters in dilute water solution. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 17(2), 385-389.
- Bylaite, Ilgūnaitė, Meyer, & Adler-Nissen. (2004). Influence of  $\lambda$ -Carrageenan on the Release of Systematic Series of Volatile Flavor Compounds from Viscous Food Model Systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(11), 3542-3549.
- Cankurtaran.M. (2007). Acoustic rhinometry in healthy humans: accuracy of area estimates and ability to quantify certain anatomic structures in the nasal cavity. *annals of otology, rhinology & Laryngology*, 116(12), 906-916.
- Canon, Ballivian, Chirot, Antoine, Sarni-Manchado, Lemoine, & Dugourd. (2011). Folding of a Salivary Intrinsically Disordered Protein upon Binding to Tannins. *Journal of the American Chemical Society*, 133(20), 7847-7852.
- Canon, Giuliani, Paté, & Sarni-Manchado. (2010). Ability of a salivary intrinsically unstructured protein to bind different tannin targets revealed by mass spectrometry. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 398(2), 815-822.
- Canon, Milosavljević, van der Rest, Réfrégiers, Nahon, Sarni-Manchado, Cheynier, & Giuliani. (2013a). Photodissociation and dissociative photoionization mass spectrometry of proteins and noncovalent protein-ligand complexes. *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, 52(32), 8377-8381.
- Canon, Paté, Cheynier, Sarni-Manchado, Giuliani, Pérez, Durand, Li, & Cabane. (2013b). Aggregation of the Salivary Proline-Rich Protein IB5 in the Presence of the Tannin EgCG. *Langmuir*, 29(6), 1926-1937.
- Carunchia Whetstine, Drake, Nelson, & Barbano. (2006). Flavor profiles of full-fat and reduced-fat cheese and cheese fat made from aged cheddar with the fat removed using a novel process. *Journal of Dairy Science*, 89(2), 505-517.

## Bibliographie

---

- Chalé-Rush, Burgess, & Mattes. (2007). Evidence for human orosensory (taste?) sensitivity to free fatty acids. *Chemical Senses*, 32(5), 423-431.
- Charles, Lambert, Brondeur, Courthaudon, & Guichard. (2000a). Influence of formulation and structure of an oil-in-water emulsion on flavor release. In D. D. Roberts & A. J. Taylor (Eds.), *ACS 218<sup>th</sup> National Meeting*, (pp. 342-354). New Orleans (USA): American Chemical Society, Washington, DC.
- Charles, Rosselin, Beck, Sauvageot, & Guichard. (2000b). Flavor release from salad dressings: Sensory and physicochemical approaches in relation with the structure. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(5), 1810-1816.
- Chauncey, Lionetti, Winer, & Lisanti. (1954). Enzymes of Human Saliva I. the Determination, Distribution, and Origin of whole Saliva Enzymes. *Journal of Dental Research*, 33(3), 321-334.
- Chobpattana, Jeon, Smith, & Loughin. (2002). Mechanisms of interaction between vanillin and milk proteins in model systems. *Journal of Food Science*, 67(3), 973-977.
- Christersson, Lindh, & Arnebrant. (2000). Film-forming properties and viscosities of saliva substitutes and human whole saliva. *European Journal of Oral Sciences*, 108(5), 418-425.
- Clark, & Smith. (1989). Influence of alcohol-containing spreading solvents on the secondary structure of proteins: a circular dichroism investigation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 37(3), 627-633.
- Cole, Bowen, Sierra, Espinal, Aguirra, Kingman, Kemp, Gomez, Reilly, Hsu, Ciardi, & Gillespie. (1978). Immunoglobulins and Antibodies in Plaque Fluid and Saliva in Two Populations with Contrasting Levels of Caries. In J. McGhee, J. Mestecky & J. Babb (Eds.), *Secretory Immunity and Infection*, vol. 107 (pp. 383-392): Springer US.
- Collins, & Dawes. (1987). The Surface Area of the Adult Human Mouth and Thickness of the Salivary Film Covering the Teeth and Oral Mucosa. *Journal of Dental Research*, 66(8), 1300-1302.
- Curioni, & Bosset. (2002). Key odorants in various cheese types as determined by gas chromatography-olfactometry. *International Dairy Journal*, 12(12), 959-984.
- Dal Monte, Andreini, Revoltella, & Pelosi. (1991). Purification and characterization of two odorant-binding proteins from nasal tissue of rabbit and pig. *Comparative biochemistry and physiology. B, Comparative biochemistry*, 99(2), 445.
- Damodaran, & Kinsella. (1980). Flavor protein interactions. Binding of carbonyls to bovine serum albumin: thermodynamic and conformational effects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 28(3), 567-571.
- Damodaran, & Kinsella. (1981). Interaction of carbonyls with soy protein: thermodynamic effects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 29(6), 1249-1253.
- Dawes. (1972). Circadian rhythms in human salivary flow rate and composition. *The Journal of Physiology*, 220(3), 529-545.
- Dawes. (2008). Salivary flow patterns and the health of hard and soft oral tissues. *Journal of the American Dental Association (1939)*, 139 Suppl, 18S-24S.
- de Loubens, Magnin, Doyennette, Trelea, & Souchon. (2011). A biomechanical model of swallowing for understanding the influence of saliva and food bolus viscosity on flavor release. *Journal of Theoretical Biology*, 280(1), 180-188.
- De Wijk, Terpstra, Janssen, & Prinz. (2006). Perceived creaminess of semi-solid foods. *Trends in Food Science & Technology*, 17(8), 412-422.
- Deleris, Saint-Eve, Dakowski, Semon, Le Quere, Guillemin, & Souchon. (2011). The dynamics of aroma release during consumption of candies of different structures, and relationship with temporal perception. *Food Chemistry*, 127(4), 1615-1624.
- Delwiche, & O'mahony. (1996). Changes in secreted salivary sodium are sufficient to alter salt taste sensitivity: use of signal detection measures with continuous monitoring of the oral environment. *Physiology & Behavior*, 59(4), 605-611.
- Denny, Hagen, Hardt, Liao, Yan, Arellano, Bassilian, Bedi, Boontheung, Cociorva, Delahunty, Denny, Dunsmore, Faull, Gilligan, Gonzalez-Begne, Halgand, Hall, Han, Henson, Hewel, Hu, Jeffrey, Jiang, Loo, Loo, Malamud, Melvin, Miroshnychenko, Navazesh, Niles, Park, Prakobphol, Ramachandran,

## Bibliographie

---

- Richert, Robinson, Sondej, Souda, Sullivan, Takashima, Than, Wang, Whitelegge, Witkowska, Wolinsky, Xie, Xu, Yu, Ytterberg, Wong, Yates, & Fisher. (2008). The proteomes of human parotid and submandibular/sublingual gland salivas collected as the ductal secretions. *Journal of Proteome Research*, 7(5), 1994-2006.
- Douek, Bannister, & Dodson. (1975). Recent advances in the pathology of olfaction. *Proceedings of the Royal Society of Medicine*, 68(8), 467.
- Doyen, Carey, Linforth, Marin, & Taylor. (2001). Volatile release from an emulsion: headspace and in-mouth studies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(2), 804-810.
- Doyennette, de Loubens, Deleris, Souchon, & Trelea. (2011). Mechanisms explaining the role of viscosity and post-deglutitive pharyngeal residue on in vivo aroma release: A combined experimental and modeling study. *Food Chemistry*, 128(2), 380-390.
- Doyennette, Deleris, Feron, Guichard, Souchon, & Trelea. (2014). Main individual and product characteristics influencing in-mouth flavour release during eating masticated food products with different textures: mechanistic modelling and experimental validation. *Journal of Theoretical Biology*, 340, 209-221.
- Drago, Panouillé, Saint-Eve, Neyraud, Feron, & Souchon. (2011). Relationships between saliva and food bolus properties from model dairy products. *Food Hydrocolloids*, 25(4), 659-667.
- Dsamou, Palicki, Septier, Chabanet, Lucchi, Ducoroy, Chagnon, & Morzel. (2012). Salivary protein profiles and sensitivity to the bitter taste of caffeine. *Chemical Senses*, 37(1), 87-95.
- Duffy, Davidson, Kidd, Kidd, Speed, Pakstis, Reed, Snyder, & Bartoshuk. (2004). Bitter Receptor Gene (TAS2R38), 6-n-Propylthiouracil (PROP) Bitterness and Alcohol Intake. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 28(11), 1629-1637.
- Dufour, & Haertle. (1990). Binding affinities of beta-ionone and related flavor compounds to beta-lactoglobulin: effects of chemical modifications. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38(8), 1691-1695.
- Eckmann, Glassenberg, & Gavriely. (1996). Acoustic Reflectometry and Endotracheal Intubation. *Anesthesia & Analgesia*, 83(5), 1084-1089.
- Enberg, Alho, Loimaranta, & Lenander-Lumikari. (2001). Saliva flow rate, amylase activity, and protein and electrolyte concentrations in saliva after acute alcohol consumption. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, 92(3), 292-298.
- Engelen, de Wijk, Prinz, Janssen, Weenen, & Bosman. (2003). The effect of oral and product temperature on the perception of flavor and texture attributes of semi-solids. *Appetite*, 41(3), 273-281.
- Ettre, Welter, & Kolb. (1993). Determination of gas-liquid partition coefficients by automatic equilibrium headspace-gas chromatography utilizing the phase ratio variation method. *Chromatographia*, 35(1/2), 73-84.
- Ferguson. (1999). The flow rate and composition of human labial gland saliva. *Archives of Oral Biology*, 44(Suppl 1), S11-S14.
- Feron, & Poette. (2013). In-mouth mechanism leading to the perception of fat in humans: from detection to preferences. The particular role of saliva. *Oléagineux, Corps Gras, Lipides*, 20(2), 102-107.
- Ferry, Hort, Mitchell, Cook, Lagarrigue, & Pamies. (2006a). Viscosity and flavour perception: Why is starch different from hydrocolloids? *Food Hydrocolloids*, 20(6), 855-862.
- Ferry, Hort, Mitchell, Lagarrigue, & Pamies. (2004). Effect of amylase activity on starch paste viscosity and its implications for flavor perception. *Journal of Texture Studies*, 35(5), 511-524.
- Ferry, Mitchell, Hort, Hill, Taylor, Lagarrigue, & Valles-Pamies. (2006b). In-mouth amylase activity can reduce perception of saltiness in starch-thickened foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(23), 8869-8873.
- Firestein. (2001). How the olfactory system makes sense of scents. *Nature*, 413(6852), 211-218.
- Fischer, & Widder. (1997). How proteins influence food flavor: The chemistry of flavor interactions. *Food technology*, 51(1), 68-70.
- Flower. (1996). The lipocalin protein family: structure and function. *Biochem. J*, 318, 1-14.
- Forss. (1969). Role of lipids in flavours. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 17(4), 681-685.

## Bibliographie

---

- Friel, & Taylor. (2001). Effect of Salivary Components on Volatile Partitioning from Solutions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(8), 3898-3905.
- Gaillard, Rouquier, & Giorgi. (2004). Olfactory receptors. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 61(4), 456-469.
- Genovese, Caporaso, Civitella, & Sacchi. (2014). Effect of human saliva and sip volume of coffee brews on the release of key volatile compounds by a retronasal aroma simulator. *Food Research International*, 61(0), 100-111.
- Genovese, Piombino, Gambuti, & Moio. (2009). Simulation of retronasal aroma of white and red wine in a model mouth system. Investigating the influence of saliva on volatile compound concentrations. *Food Chemistry*, 114(1), 100-107.
- Gilbertson. (1998). Gustatory mechanisms for the detection of fat. *Current Opinion in Neurobiology*, 8(4), 447-452.
- Giuliani, Milosavljevic, Hinsén, Canon, Nicolas, Refregiers, & Nahon. (2012). Structure and Charge-State Dependence of the Gas-Phase Ionization Energy of Proteins. *Angewandte Chemie-International Edition*, 51(38), 9552-9556.
- Gorelik, Kohen, Ligumsky, & Kanner. (2007). Saliva plays a dual role in oxidation process in stomach medium. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 458(2), 236-243.
- Goubet, Le Queré, & Voilley. (1998). Retention of aroma compounds by carbohydrates: influence of their physicochemical characteristics and of their physical state. A review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(5), 1981-1990.
- Grymer, Pedersen, Hilberg, & Elbrønd. (1989). Acoustic rhinometry: Evaluation of the nasal cavity with septal deviations, before and after septoplasty. *The Laryngoscope*, 99(11), 1180-1187.
- Guichard. (2002). Interactions between flavor compounds and food ingredients and their influence on flavor perception. *Food Reviews International*, 18(1), 49-70.
- Guichard. (2006). Flavour retention and release from protein solutions. *Biotechnology Advances*, 24(2), 226-229.
- Guichard, & Langourieux. (2000). Interactions between Beta-lactoglobulin and flavour compounds. *Food Chemistry*, 71, 301-308.
- Gururaja, Ramasubbu, Venugopalan, Reddy, Ramalingam, & Levine. (1998). Structural features of the human salivary mucin, MUC7. *Glycoconjugate Journal*, 15(5), 457-467.
- Haahr, Bredie, Stahnke, Jensen, & Refsgaard. (2000). Flavour release of aldehydes and diacetyl in oil/water systems. *Food Chemistry*, 71, 355-362.
- Halpern. (2009). Retronasal olfaction. In L. R. Squire (Ed.), *Encyclopedia of Neuroscience*, (pp. 297-304): Elsevier.
- Hansson, Andersson, & Leufven. (2001). The effect of sugars and pectin on flavour release from a soft drink-related model system. *Food Chemistry*, 72(3), 363-368.
- Haring. (1990). Flavour release: from product to perception. *Flavour science and technology*. Chichester: Wiley, 351-354.
- Haring. (1992). Flavour release: from product to perception. In Y. Bessière & J. A. F. Thomas (Eds.), *Flavour Science and Technology*, (pp. 351-354). New York (USA): John Wiley & Sons.
- Hatton, Levine, Margarone, & Aguirre. (1987). Lubrication and viscosity features of human saliva and commercially available saliva substitutes. *Journal of oral and maxillofacial surgery*, 45(6), 496-499.
- Hay, Smith, Schluckebier, & Moreno. (1984). Basic biological sciences relationship between concentration of human salivary statherin and inhibition of calcium phosphate precipitation in stimulated human parotid saliva. *Journal of Dental Research*, 63(6), 857-863.
- Helmerhorst. (2007). Whole saliva proteolysis. Wealth of information for diagnostic exploitation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1098(1), 454-460.
- Hilberg, Jensen, & Pedersen. (1993). Nasal airway geometry: comparison between acoustic reflections and magnetic resonance scanning. *Journal of Applied Physiology*, 75(6), 2811-2819.
- Hiss, Treole, & Stuart. (2001). Effects of age, gender, bolus volume, and trial on swallowing apnea duration and swallow/respiratory phase relationships of normal adults. *Dysphagia*, 16(2), 128-135.

## Bibliographie

---

- Hodgkin. (1950). X-ray analysis and protein structure. In *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*, vol. 14 (pp. 65-78): Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Hodgson, Linforth, & Taylor. (2003). Simultaneous Real-Time Measurements of Mastication, Swallowing, Nasal Airflow, and Aroma Release. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(17), 5052-5057.
- Humphrey, & Williamson. (2001). A review of saliva: normal composition, flow, and function. *The Journal of Prosthetic Dentistry*, 85(2), 162-169.
- Huq, Cross, Ung, Myroforidis, Veith, Chen, Stanton, He, Ward, & Reynolds. (2007). A review of the salivary proteome and peptidome and saliva-derived peptide therapeutics. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 13(4), 547-564.
- Hussein, Kachikian, & Pidel. (1983). Analysis for Flavor Residuals in the Mouth by Gas Chromatography. *Journal of Food Science*, 48(6), 1884-1885.
- Husson, Lê, & Pagès. (2005). Confidence ellipse for the sensory profiles obtained by principal component analysis. *Food Quality and Preference*, 16(3), 245-250.
- Hutteau, & Mathlouthi. (1998). Physicochemical properties of sweeteners in artificial saliva and determination of a hydrophobicity scale for some sweeteners. *Food Chemistry*, 63(2), 199-206.
- Iida-Kondo, Yoshino, Kurabayashi, Mataka, Hasegawa, & Kurosaki. (2006). Comparison of tongue volume/oral cavity volume ratio between obstructive sleep apnea syndrome patients and normal adults using magnetic resonance imaging. *Journal of medical and dental sciences*, 53(2), 119.
- Ingham, Linforth, & Taylor. (1995). The effect on eating on aroma release from mint-flavoured sweets. *Flavour and Fragrance Journal*, 10, 15-24.
- Iontcheva, Oppenheim, & Troxler. (1997). Human Salivary Mucin MG1 Selectively Forms Heterotypic Complexes with Amylase, Proline-rich Proteins, Statherin, and Histatins supramolecular edifices. *Journal of Dental Research*, 76(3), 734-743.
- Isaacson, & Strowbridge. (1998). Olfactory Reciprocal Synapses: Dendritic Signaling in the CNS. *Neuron*, 20, 749-761.
- Jansman, Frohlich, & Marquardt. (1994). Production of proline-rich proteins by the parotid glands of rats is enhanced by feeding diets containing tannins from faba beans (*Vicia faba* L.). *The Journal of nutrition*, 124(2), 249-258.
- Jasinski, & Kilara. (1985). Flavor binding by whey proteins. *Milchwissenschaft*, 40(10), 596-599.
- Johansson, Lemons, & Hao. (1989). Corrosion of dental copper, nickel, and gold alloys in artificial saliva and saline solutions. *Dental Materials*, 5(5), 324-328.
- Jouenne, & Crouzet. (1997). Measurement of affinity constants by DCCLC. In P. Schieberle (Ed.), *Interaction of food matrix with small ligands influencing flavour and texture*, vol. 3 (pp. 68-71). Garching (D): European Communities.
- Jouenne, & Crouzet. (2000). Determination of apparent binding constants for aroma compounds with beta-lactoglobulin by dynamic coupled column liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(11), 5396-5400.
- Juteau, Doublier, & Guichard. (2004). Flavor release from  $\kappa$ -carrageenan matrices: a kinetic approach. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(6), 1621-1629.
- Kandra, & Gyémánt. (2000). Examination of the active sites of human salivary  $\alpha$ -amylase (HSA). *Carbohydrate Research*, 329(3), 579-585.
- Kandra, Gyémánt, Zajác, & Batta. (2004). Inhibitory effects of tannin on human salivary  $\alpha$ -amylase. *Biochemical and biophysical research communications*, 319(4), 1265-1271.
- Kanehira, Shibata, Kashiwazaki, Inoue, & Morita. (2006). Comparison of antioxidant enzymes in saliva of elderly smokers and non-smokers. *Gerodontology*, 23(1), 38-42.
- Kock, Blaker, & Schmale. (1992). Postnatal development of Von Ebner's Glands - Accumulation of a protein of the lipocalin superfamily in taste papillae of rat tongue. *Cell and Tissue Research*, 267(2), 313-320.
- Kock, Morley, Mullins, & Schmale. (1994). Denatonium bitter tasting among transgenic mice expressing rat von Ebner's gland protein. *Physiology & Behavior*, 56(6), 1173-1177.

## Bibliographie

---

- Kopjar, Andriot, Saint-Eve, Souchon, & Guichard. (2010). Retention of aroma compounds: an interlaboratory study on the effect of the composition of food matrices on thermodynamic parameters in comparison with water. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(8), 1285-1292.
- Kuo, Pangborn, & Noble. (1993). Temporal patterns of nasal, oral, and retronasal perception of citral and vanillin and interaction of these odourants with selected tastants. *Int J Food Sci Technol*, 28(2), 127-137.
- Lagerlof, & Dawes. (1984). The Volume of Saliva in the Mouth Before and After Swallowing. *Journal of Dental Research*, 63(5), 618-621.
- Landy, Druaux, & Voilley. (1995). Retention of aroma compounds by proteins in aqueous solution. *Food Chemistry*, 54(4), 387-392.
- Landy, Farès, Lorient, & Voilley. (1997). Effect of chemical modification of sodium caseinate on diffusivity of aroma compounds in aqueous solutions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(7), 2649-2653.
- Larsen, & Pearce. (2003). Saturation of human saliva with respect to calcium salts. *Archives of Oral Biology*, 48(4), 317-332.
- Larsson, Olivecrona, & Ericson. (1996). Lipids in human saliva. *Archives of Oral Biology*, 41(1), 105-110.
- Lauverjat, Délérès, Tréléa, Salles, & Souchon. (2009). Salt and aroma compound release in model cheeses in relation to their mobility. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(21), 9878-9887.
- Lawless, Bender, Oman, & Pelletier. (2003). Gender, Age, Vessel Size, Cup vs. Straw Sipping, and Sequence Effects on Sip Volume. *Dysphagia*, 18(3), 196-202.
- Le Thanh, Thibeau, Thibaut, & Voilley. (1992). Interactions between volatile and non-volatile compounds in the presence of water. *Food Chemistry*, 43(2), 129-135.
- Lee, Chung, Kim, Chung, & Kho. (2007). Comparison of the composition of oral mucosal residual saliva with whole saliva. *Oral Diseases*, 13(6), 550-554.
- Leonardos, Kendall, & Barnard. (1969). Odor threshold determinations of 53 odorant chemicals. *Journal of the Air Pollution Control Association*, 19(2), 91-95.
- Lindinger, Hansel, & Jordan. (1998). On-line monitoring of volatile organic compounds at pptv levels by means of proton-transfer-reaction mass spectrometry (PTR-MS) Medical applications, food control and environmental research. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes*, 173, 191-241.
- Lindqvist, Nord, & Soder. (1976). Origin of esterases in human whole saliva. *Enzyme*, 22(3), 166-175.
- Lindskog. (1997). Structure and mechanism of carbonic anhydrase. *Pharmacology & therapeutics*, 74(1), 1-20.
- Linforth, Martin, Carey, Davidson, & Taylor. (2002). Retronasal Transport of Aroma Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(5), 1111-1117.
- Linforth, & Taylor. (2000). Persistence of volatile compounds in the breath after their consumption in aqueous solutions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(11), 5419-5423.
- Liskmann, Vihalemm, Salum, Zilmer, Fischer, & Zilmer. (2007). Characterization of the antioxidant profile of human saliva in peri-implant health and disease. *Clinical oral implants research*, 18(1), 27-33.
- Lorrain, Tempere, Iturmendi, Moine, de Revel, & Teissedre. (2013). Influence of phenolic compounds on the sensorial perception and volatility of red wine esters in model solution: An insight at the molecular level. *Food Chemistry*, 140(1-2), 76-82.
- Lowe, & Gold. (1993). Nonlinear amplification by calcium-dependent chloride channels in olfactory receptor cells.
- Lu, & Bennick. (1998). Interaction of tannin with human salivary proline-rich proteins. *Archives of Oral Biology*, 43(9), 717-728.
- Lubbers, Landy, & Voilley. (1998). Retention and release of aroma compounds. *Food technology*, 52(5), 68, 70, 72, 74, 208, 210, 212, 214.

## Bibliographie

---

- Lübke, Guichard, Tromelin, & Le Quéré. (2002). Nuclear magnetic resonance spectroscopic study of  $\beta$ -lactoglobulin interactions with two flavor compounds,  $\gamma$ -decalactone and  $\beta$ -ionone. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(24), 7094-7099.
- MacKay, Pollock, Iacono, & Baum. (1984). Isolation of milligram quantities of a group of histidine-rich polypeptides from human parotid saliva. *Infection and immunity*, 44(3), 688-694.
- Mackie, & Pangborn. (1990). Mastication and its influence on human salivary flow and alpha-amylase secretion. *Physiology & Behavior*, 47(3), 593-595.
- Mandel. (1980). Sialochemistry in diseases and clinical situations affecting salivary glands. *Critical reviews in clinical laboratory sciences*, 12(4), 321-366.
- Marchese, Pes, Scaloni, Carbone, & Pelosi. (1998). Lipocalins of boar salivary glands binding odours and pheromones. *European Journal of Biochemistry*, 252(3), 563-568.
- Marin, Baek, & Taylor. (1999). Volatile release from aqueous solutions under dynamic headspace dilution conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(11), 4750-4755.
- Matsuo. (2000). Role of saliva in the maintenance of taste sensitivity. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 11(2), 216-229.
- May, Wasik, & Freeman. (1978). Determination of the aqueous solubility of polynuclear aromatic hydrocarbons by a coupled column liquid chromatographic technique. *Analytical Chemistry*, 50(1), 175-179.
- McFadden, Teranishi, Corse, Black, & Mon. (1965). Volatiles from strawberries : II. Combined mass spectrometry and gas chromatography on complex mixtures. *Journal of Chromatography A*, 18(0), 10-19.
- McLafferty. (1993). *Interpretation of mass spectra ; 4 th edition* (University Science Books ed.). Mill Valley (USA).
- Mehansho, Hagerman, Clements, Butler, Rogler, & Carlson. (1983). Modulation of proline-rich protein biosynthesis in rat parotid glands by sorghums with high tannin levels. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 80(13), 3948-3952.
- Merabtine, Lubbers, Andriot, Tromelin, & Guichard. (2010). Retention/release equilibrium of aroma compounds in fat-free dairy gels. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(9), 1403-1409.
- Mishellany-Dutour, Woda, Laboure, Bourdiol, Lachaze, Guichard, & Feron. (2012). Retro-Nasal Aroma Release Is Correlated with Variations in the In-Mouth Air Cavity Volume after Empty Deglutition. *PLoS ONE*, 7(7), 8.
- Mitropoulou, Hatzidimitriou, & Paraskevopoulou. (2011). Aroma release of a model wine solution as influenced by the presence of non-volatile components. Effect of commercial tannin extracts, polysaccharides and artificial saliva. *Food Research International*, 44(5), 1561-1570.
- Mizrahi. (1982). Enamel demineralization following orthodontic treatment. *American Journal of Orthodontics*, 82(1), 62-67.
- Mombaerts. (1999). Seven-transmembrane proteins as odorant and chemosensory receptors. *Science*, 286(5440), 707-711.
- Morzel, Jeannin, Lucchi, Truntzer, Pecqueur, Nicklaus, Chambon, & Ducoroy. (2012). Human infant saliva peptidome is modified with age and diet transition. *Journal of Proteomics*, 75(12), 3665-3673.
- Mounayar, Morzel, Brignot, Tremblay-Franco, Canlet, Lucchi, Ducoroy, Feron, & Neyraud. (2013a). Salivary markers of taste sensitivity to oleic acid: a combined proteomics and metabolomics approach. *Metabolomics*.
- Mounayar, Septier, Chabanet, Feron, & Neyraud. (2013b). Oral fat sensitivity in humans: links to saliva composition before and after stimulation by oleic acid. *Chemosensory Perception*, 6(3), 118-126.
- Munson, & Field. (1966). Chemical ionization mass spectrometry. II. Esters. *Journal of the American Chemical Society*, 88(19), 4337-4345.
- Muresan, van der Bent, & de Wolf. (2001). Interaction of beta-lactoglobulin with small hydrophobic ligands as monitored by fluorimetry and equilibrium dialysis: nonlinear quenching effects related to protein-protein association. *Journal of Agricultural Food of Chemistry*, 49, 2609-2618.



## Bibliographie

---

- Nagler, Klein, Zarzhevsky, Drigues, & Reznick. (2002). Characterization of the differentiated antioxidant profile of human saliva. *Free Radical Biology and Medicine*, 32(3), 268-277.
- Nawar. (1971). Some variables affecting composition of headspace aroma. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 19(6), 1057-1059.
- Neyraud, Bult, & Dransfield. (2009a). Continuous analysis of parotid saliva during resting and short-duration simulated chewing. *Archives of Oral Biology*, 54(5), 449-456.
- Neyraud, Heinzerling, Bult, Mesmin, & Dransfield. (2009b). Effects of Different Tastants on Parotid Saliva Flow and Composition. *Chemosensory Perception*, 2(2), 108-116.
- Neyraud, Palicki, Schwartz, Nicklaus, & Feron. (2012a). Variability of human saliva composition: Possible relationships with fat perception and liking. *Archives of Oral Biology*, 57(5), 556-566.
- Neyraud, Sayd, Morzel, & Dransfield. (2006). Proteomic analysis of human whole and parotid salivas following stimulation by different tastes. *Journal of Proteome Research*, 5(9), 2474-2480.
- Neyraud.E. (2011). Variability of human saliva composition: Possible relationships with fat perception and liking. *Elsevier*, 2683, 11.
- Nilsson, Ekberg, Olsson, Kjellin, & Hindfelt. (1996). Quantitative assessment of swallowing in healthy adults. *Dysphagia*, 11(2), 110-116.
- Noé, Tareilus, Boekhoff, & Breer. (1997). Sodium/calcium exchanger in rat olfactory neurons. *Neurochemistry international*, 30(6), 523-531.
- Normand, Avison, & Parker. (2004). Modeling the kinetics of flavour release during drinking. *Chemical Senses*, 29(3), 235-245.
- Oppenheim, Salih, Siqueira, Zhang, & Helmershorst. (2007). Salivary proteome and its genetic polymorphisms. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1098, 22-50.
- Patel, Lange, McConathy, Patel, & Patel. (1997). Probing the structure of the ligand binding cavity of lipocalins by fluorescence spectroscopy. *Protein Engineering*, 10(6), 621-625.
- Payment, Liu, Offner, Oppenheim, & Troxler. (2000). Immunoquantification of human salivary mucins MG1 and MG2 in stimulated whole saliva: factors influencing mucin levels. *Journal of Dental Research*, 79(10), 1765-1772.
- Pedersen, Bardow, Jensen, & Nauntofte. (2002). Saliva and gastrointestinal functions of taste, mastication, swallowing and digestion. *Oral Diseases*, 8(3), 117-129.
- Pelletier, Sostmann, & Guichard. (1998). Measurement of interactions between beta-lactoglobulin and flavor compounds (esters, acids and pyrazines) by affinity and exclusion size chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(4), 1506 - 1509.
- Pelosi, Baldaccini, & Pisanelli. (1982). Identification of a specific olfactory receptor for 2-isobutyl-3-methoxypyrazine. *Biochemical Journal*, 201(1), 245.
- Pepino, Love-Gregory, Klein, & Abumrad. (2012). The fatty acid translocase gene CD36 and lingual lipase influence oral sensitivity to fat in obese subjects. *Journal of lipid research*, 53(3), 561-566.
- Percival, Challacombe, & Marsh. (1994). Flow Rates of Resting Whole and Stimulated Parotid Saliva in Relation to Age and Gender. *Journal of Dental Research*, 73(8), 1416-1420.
- Perinpanayagam, Vanwuyckhuysse, Ji, & Tabak. (1995). Characterization of low-molecular-weight peptides in Human parotid saliva. *Journal of Dental Research*, 74(1), 345-350.
- Perry, Dominy, Claw, Lee, Fiegler, Redon, Werner, Villanea, Mountain, Misra, Carter, Lee, & Stone. (2007). Diet and the evolution of human amylase gene copy number variation. *Nature Genetics*, 39(10), 1256-1260.
- Pevsner, Sklar, & Snyder. (1986). Odorant-binding protein: localization to nasal glands and secretions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83(13), 4942-4946.
- Piombino, Genovese, Esposito, Moio, Cutolo, Chambery, Severino, Moneta, Smith, Owens, Gilbert, & Ercolini. (2014). Saliva from obese individuals suppresses the release of aroma compounds from wine. *PLoS ONE*, 9(1), e85611.
- Pionnier, Chabanet, Mioche, Le Quere, & Salles. (2004). 1. In vivo aroma release during eating of a model cheese: relationships with oral parameters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(3), 557-564.

## Bibliographie

---

- Plotto, Margaría, Goodner, & Baldwin. (2008). Odour and flavour thresholds for key aroma components in an orange juice matrix: esters and miscellaneous compounds. *Flavour and Fragrance Journal*, 23(6), 398-406.
- Poette, Mekoué, Neyraud, Berdeaux, Renault, Guichard, Genot, & Feron. (2014). Fat sensitivity in humans: oleic acid detection threshold is linked to saliva composition and oral volume. *Flavour and Fragrance Journal*, 29(1), 39-49.
- Proulx, De Courval, Wiseman, & Panisset. (2005). Salivary production in Parkinson's disease. *Movement Disorders*, 20(2), 204-207.
- Pyysalo, Suiko, & Honkanen. (1977). Odour Thresholds of the Major Volatiles Identified in Cloudberry (*Rubus chamaemorus* L.) and Arctic Bramble (*Rubus arcticus* L.). *Lebensmittel -Wissenschaft & Technologie*, 10, 36-39.
- Quintana, Palicki, Lucchi, Ducoroy, Chambon, Salles, & Morzel. (2009). Inter-individual variability of protein patterns in saliva of healthy adults. *Journal of Proteomics*, 72(5), 822-830.
- Rabe, Krings, & Berger. (2004). Dynamic flavour release from miglyol/water emulsions: modelling and validation. *Food Chemistry*, 84(1), 117-125.
- Ragunath, Manuel, Venkataraman, Sait, Kasinathan, & Ramasubbu. (2008). Probing the role of aromatic residues at the secondary saccharide-binding sites of human salivary  $\alpha$ -amylase in substrate hydrolysis and bacterial binding. *Journal of Molecular Biology*, 384(5), 1232-1248.
- Ramasubbu, Paloth, Luo, Brayer, & Levine. (1996). Structure of Human Salivary [alpha]-Amylase at 1.6 Å Resolution: Implications for its Role in the Oral Cavity. *Acta Crystallographica Section D*, 52(3), 435-446.
- Ramasubbu, Ragunath, & Mishra. (2003). Probing the Role of a Mobile Loop in Substrate Binding and Enzyme Activity of Human Salivary Amylase. *Journal of Molecular Biology*, 325(5), 1061-1076.
- Rayment, Liu, Offner, Oppenheim, & Troxler. (2000). Immunoquantification of human salivary mucins MG1 and MG2 in stimulated whole saliva: factors influencing mucin levels. *Journal of Dental Research*, 79(10), 1765-1772.
- Repoux, Laboure, Courcoux, Andriot, Semon, Yven, Feron, & Guichard. (2012). Combined effect of cheese characteristics and food oral processing on in vivo aroma release. *Flavour and Fragrance Journal*, 27(6), 414-423.
- Repoux, Semon, Feron, Guichard, & Laboure. (2012). Inter-individual variability in aroma release during sweet mint consumption. *Flavour and Fragrance Journal*, 27(1), 40-46.
- Richard, & Multon. (1992). *Les arômes alimentaires* (Tec & Doc-Lavoisier ed.). Paris (FRA): TEC et DOC.
- Rochel, & Margolis. (1982). Carnosine Release from Olfactory Bulb Synaptosomes Is Calcium-Dependent and Depolarization-Stimulated. *Journal of Neurochemistry*, 38(6), 1505-1514.
- Rodriguez-Bencomo, Munoz-Gonzalez, Andujar-Ortiz, Martin-Alvarez, Moreno-Arribas, & Pozo-Bayon. (2011). Assessment of the effect of the non-volatile wine matrix on the volatility of typical wine aroma compounds by headspace solid phase microextraction/gas chromatography analysis. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91(13), 2484-2494.
- Rohleder, & Nater. (2009). Determinants of salivary  $\alpha$ -amylase in humans and methodological considerations. *Psychoneuroendocrinology*, 34(4), 469-485.
- Rudney. (1989). Relationships between human parotid saliva lysozyme lactoferrin, salivary peroxidase and secretory immunoglobulin A in a large sample population. *Archives of Oral Biology*, 34(7), 499-506.
- Rudney, Ji, & Larson. (1995). The prediction of saliva swallowing frequency in humans from estimates of salivary flow rate and the volume of saliva swallowed. *Archives of Oral Biology*, 40(6), 507-512.
- Saint-Eve, Martin, Guillemin, Sémon, Guichard, & Souchon. (2006). Flavored Yogurt Complex Viscosity Influences Real-Time Aroma Release in the Mouth and Sensory Properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(20), 7794-7803.
- Sajewicz. (2009). Effect of saliva viscosity on tribological behaviour of tooth enamel. *Tribology International*, 42(2), 327-332.

## Bibliographie

---

- Salles, Chagnon, Feron, Guichard, Laboure, Morzel, Semon, Tarrega, & Yven. (2011). In-Mouth Mechanisms Leading to Flavor Release and Perception. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51(1), 67-90.
- Salvador, Bakker, Langley, Potjewijd, Martin, & Elmore. (1994). Flavour release of diacetyl from water, sunflower oil and emulsions in model systems. *Food Quality and Preference*, 5(1), 103-107.
- Schenkels, Veerman, & Amerongen. (1995). Biochemical composition of human saliva in relation to other mucosal fluids. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 6(2), 161-175.
- Schnabel, Belitz, & Ranson. (1988). [Studies on the structure-activity relationships of odour compounds. I. Detection thresholds and odour characteristics of saturated aliphatic and alicyclic compounds with oxygen-containing functions.] Untersuchungen zur Struktur-Aktivitäts-Beziehung bei Geruchsstoffen. I. Wahrnehmungsschwellenwerte und Geruchsqualitäten von gesättigten aliphatischen und alicyclischen Verbindungen mit Sauerstoff-Funktion. *Zeitschrift fuer Lebensmittel Untersuchung und Forschung*, 187(3), 215-223.
- Seuvre, Diaz, & Voilley. (2000). Influence of the food matrix structure on the retention of aroma compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(9), 4296-4300.
- Shatzman, & Henkin. (1981). Gustin Concentration Changes Relative to Salivary Zinc and Taste in Humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 78(6), 3867-3871.
- Ship, & Fischer. (1997). The Relationship Between Dehydration and Parotid Salivary Gland Function in Young and Older Healthy Adults. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, 52A(5), M310-M319.
- Soares, Lin, Siqueira, Bruno, Li, Oppenheim, Offner, & Troxler. (2004). Salivary micelles: identification of complexes containing MG2, sIgA, lactoferrin, amylase, glycosylated proline-rich protein and lysozyme. *Archives of Oral Biology*, 49(5), 337-343.
- Soderholm, Mukherjee, & Longmate. (1996). Filler Leachability of Composites Stored in Distilled Water or Artificial Saliva. *Journal of Dental Research*, 75(9), 1692-1699.
- Spielman. (1990). Interaction of saliva and taste. *Journal of Dental Research*, 69(3), 838-843.
- Spielman, D'Abundo, Field, & Schmale. (1993). Protein analysis of human von Ebner saliva and a method for its collection from the foliate papillae. *Journal of Dental Research*, 72(9), 1331-1335.
- Steinbrecht. (1998). Odorant-binding proteins : expression and function. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 855, 323-332.
- Stewart, Feinle-Bisset, Golding, Delahunty, Clifton, & Keast. (2010). Oral sensitivity to fatty acids, food consumption and BMI in human subjects. *British journal of nutrition*, 104(01), 145-152.
- SWAISGOOD. (1993). SYMPOSIUM: GENETIC PERSPECTIVES ON MILK PROTEINS: COMPARATIVE STUDIES AND NOMENCLATURE. *Journal of Dairy Science*, 76(10), 3054-3061.
- Takeoka. (1989). Volatile Constituents of Pineapple. In S. editors (Ed.), *Volatile Constituents of Pineapple" in Flavor Chemistry: Trends and Developments*, (pp. pp. 221-237).
- Tavel, Andriot, Moreau, & Guichard. (2008). Interactions between beta-Lactoglobulin and Aroma Compounds: Different Binding Behaviors as a Function of Ligand Structure. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(21), 10208-10217.
- Taylor, Linforth, Harvey, & Blake. (2000). Atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometry for in vivo analysis of volatile flavour release. *Food Chemistry*, 71(3), 327-338.
- Taylor, & Roberts. (2004). Flavour perception. In, (pp. 283). Oxford: Blackwell Publishing.
- Thatcher, Doherty, Orvisky, Martin, & Henkin. (1998). Gustin from Human Parotid Saliva Is Carbonic Anhydrase VI. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 250(3), 635-641.
- Tietz, Buettner, & Conde-Petit. (2008). Interaction between starch and aroma compounds as measured by proton transfer reaction mass spectrometry (PTR-MS). *Food Chemistry*, 108(4), 1192-1199.
- Tromelin, Andriot, & Guichard. (2006). Protein-flavour interactions. In A. Voilley & P. Etiévant (Eds.), *Flavour in food* CRC Press ed., vol. Part 2 Flavour retention and release from the food matrix (pp. 172-207). Cambridge, CB1 6AH, UK: Woodhead Publishing Limited.

## Bibliographie

---

- Tromelin, Ayed, Lubbers, Pagès-Hélary, Andriot, & Guichard. (2012). Proposed alternative phase ratio variation method for the calculation of liquid–vapour partition coefficients of volatiles. *Journal of Chromatography A*, 1263(0), 158-168.
- Tromelin, Merabte, & Andriot. (2010). Retention–release equilibrium of aroma compounds in polysaccharide gels: study by quantitative structure–activity/property relationships approach. *Flavour and Fragrance Journal*, 25(6), 431-442.
- Tsutsumi, Higashide, Mizuno, Tamaki, & Katsumata. (1991). Identification of saliva stains by determination of the specific activity of amylase. *Forensic Science International*, 50(1), 37-42.
- van't Hof, Blankenvoorde, Veerman, & Nieuw Amerongen. (1997). The salivary lipocalin Von Ebner's gland protein is a cysteine proteinase inhibitor. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, 272(3), 1837-1841.
- Van Ruth, De Vries, Geary, & Giannouli. (2002a). Influence of composition and structure of oil-in-water emulsions on retention of aroma compounds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82, 1028-1035.
- van Ruth, Grossmann, Geary, & Delahunty. (2001a). Interactions between Artificial Saliva and 20 Aroma Compounds in Water and Oil Model Systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(5), 2409-2413.
- Van Ruth, & O'Connor. (2001b). Evaluation of three gas chromatography-olfactometry methods: comparison of odour intensity-concentration relationships of eight volatils compounds with sensory headspace data. *Food Chemistry*, 74, 341-347.
- van Ruth, & Roozen. (2000). Influence of mastication and saliva on aroma release in a model mouth system. *Food Chemistry*, 71(3), 339-345.
- van Ruth, Roozen, & Cozijnsen. (1995). Changes in flavour release from rehydrated diced bell peppers (*capsicum annum*) by artificial saliva components in three mouth model systems. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 67, 189-196.
- van Ruth, & Villeneuve. (2002b). Influence of beta-lactoglobulin, pH and presence of other aroma compounds on the air/liquid partition coefficients of 20 aroma compounds varying in functional group and chain length. *Food Chemistry*, 79(2), 157-164.
- Veerman, Valentijn-Benz, & Nieuw Amerongen. (1989). Viscosity of human salivary mucins: effect of pH and ionic strength and role of sialic acid. *Journal de biologie buccale*, 17(4), 297-306.
- Villamor, Evans, Mattinson, & Ross. (2013). Effects of ethanol, tannin and fructose on the headspace concentration and potential sensory significance of odorants in a model wine. *Food Research International*, 50(1), 38-45.
- Vingerhoeds, Blijdenstein, Zoet, & van Aken. (2005). Emulsion flocculation induced by saliva and mucin. *Food Hydrocolloids*, 19(5), 915-922.
- Voho, Chen, Kumar, Rao, & Wetmur. (2006). Lipase expression and activity in saliva in a healthy population. *Epidemiology*, 17(6), S336.
- Voirol, & Daget. (1986). Comparative study of nasal and retronasal olfactory perception. *Food Science and Technology - Lebensmittel - Wissenschaft & Technologie*, 19, 316-319.
- Walz, Stühler, Wattenberg, Hawranke, Meyer, Schmalz, Blüggel, & Ruhl. (2006). Proteome analysis of glandular parotid and submandibular-sublingual saliva in comparison to whole human saliva by two-dimensional gel electrophoresis. *Proteomics*, 6(5), 1631-1639.
- Watanabe, & Dawes. (1988). The effects of different foods and concentrations of citric acid on the flow rate of whole saliva in man. *Archives of Oral Biology*, 33(1), 1-5.
- Wu, Csako, & Herp. (1994). Structure, biosynthesis, and function of salivary mucins. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 137(1), 39-55.
- Wu, & Ship. (1993). A characterization of major salivary gland flow rates in the presence of medications and systemic diseases. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology*, 76(3), 301-306.
- Xue, & Hao. (2006). Normative Standards for Vocal Tract Dimensions by Race as Measured by Acoustic Pharyngometry. *Journal of Voice*, 20(3), 391-400.

## Bibliographie

---

- Zhang, Hoon, Chandrashekar, Mueller, Cook, Wu, Zuker, & Ryba. (2003). Coding of Sweet, Bitter, and Umami Tastes: Different Receptor Cells Sharing Similar Signaling Pathways. *Cell*, 112(3), 293-301.
- Zhao, Scherer, Hajiloo, & Dalton. (2004). Effect of anatomy on human nasal air flow and odorant transport patterns: implications for olfaction. *Chemical Senses*, 29(5), 365-379.
- Zsila. (2003). A new ligand for an old lipocalin: induced circular dichroism spectra reveal binding of bilirubin to bovine beta-lactoglobulin. *Febs Letters*, 539(1-3), 85-90.
- Zussman, Yarin, & Nagler. (2007). Age-and flow-dependency of salivary viscoelasticity. *Journal of Dental Research*, 86(3), 281-285.

# *Annexes*



## Annexes

## Annexes n°1 : Rôle des constituants de la salive

Composés	Rôle	Référence
<b>Eau et électrolytes</b>		
Eau	Influence la perception du goût des aliments. A un rôle dans la formation du bol alimentaire, et son humidification.	a, b, c, d
Na <sup>+</sup>	Rôle dans la force ionique de la salive.	b, c, d, e
Ca <sup>2+</sup>	Rôle dans la force ionique de la salive et dans la protection de la dent contre la déminéralisation, et dans la reminéralisations de la dent.	
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Bicarbonate : Rôle de tampon pH pour les dents et contrôle de la force ionique de la salive.	
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	Phosphate : Rôle de tampon, de protection contre la déminéralisation de la dent, ainsi que pour sa reminéralisations. Rôle dans la force ionique de la salive.	
Zn <sup>2+</sup>	Rôle dans la force ionique de la salive et dans la perception du goût	
<b>Protéines</b>		
Protéines	Défensine(Huq.2007), phospholipase, phosphodiesterase, cytokératine, thymosine, superoxyde dismutase, microglobuline, énalase, thioredoxine, Histidine-rich Peptide (HRP)...	b, c, d
Amylase	Hydrolase. Prédigestion de l'amidon (coupe en alpha 1-4 entre l'amylose et amylopectine (formation d'acides). Influence la sensation de fusion des semi-solides, la perception de l'acidité et du sel. Rôle dans la colonisation et le métabolisme des streptocoques, et donc dans la formation de la plaque dentaire et caries.	b, c, d, f, g, h
Mucine	Glycoprotéine. Présente dans le mucus, protection de la cavité orale contre la déshydratation, pathogènes, et permet la lubrification. Aide à la lubrification du bol alimentaire pour faciliter la déglutition (création de lien entre les particules de l'aliment pour former un ensemble cohérent et lisse). Rôle dans la perception des attributs de texture des aliments, notamment dans les émulsions. Protège les dents contre la déminéralisation, ainsi que contre la contamination par des virus.	b, c, d, i, j
Lipocaline	Molécule de transport. Capables de lier des ligands hydrophobes. Possible action dans la perception de l'amertume en transportant les composés amers jusqu'au récepteurs gustatifs. Peut lier des acides gras volatiles (chaîne<8C).	b, c, d, k, l, m
Immunoglobuline	Anticorps. Action antimicrobienne, antifongique, antivirale.	b, c, d, j
PRP	Proline-Rich Protein (petite protéine). Rôle dans la sensation astringente par association avec les tanins en s'associant avec des phénols de poids<500Da. Aide à la lubrification du bol alimentaire pour faciliter la déglutition. Possible responsable de l'arrière-goût amer/métallique, avec la saccharine. Rôle dans la reminéralisations des dents et leur lubrification.	b, c, d, j, n
PIP	Protéine prolactine inducing-protein. Capable de lier de l'actine.	b, c, d
Kallikrein	Hydrolase Activité catalytique et rôle dans la liaison avec le calcium.	b, c, d, o
Lactoferrine	Hydrolase.	b, c, d, j



## Annexes

	Rôle immunitaire, production modifiée lors d'inflammation de la parotide. Rôle antimicrobien et antibactérien	
<b>Lactotransferrine</b>	Transferase. Rôle dans le transport du fer sous forme Fe <sup>3+</sup> .	
<b>Peroxydase</b>	Oxydoréductase. Très importante, car participent à la détoxification des espèces oxygénée réactives (ROS), générées en bouche durant la mastication, et qui participent à l'oxydation des composés des aliments (acides aminées, acides gras...). Or la réaction oxydative est à l'origine de la création de goûts métalliques. Possible action dans l'oxydation de l'acide linoléic.	b, c, d
<b>Anhydrase carbonique</b>	Catalyse la conversion de CO <sub>2</sub> en acide carbonique par un mécanisme d'hydratation. Réaction essentielle dans la sensation trigéminal durant la consommation et protection des récepteurs gustatifs. Rôle dans le transport des ions métalliques type zinc.	
<b>Maltase</b>	Hydrolase. Rôle dans la dégradation du maltose issu de la dégradation de l'amidon (maltose=dimère de glucose)	b, c, d, p
<b>Urease</b>	Hydrolase. Rôle dans la plaque dentaire et la formation des caries, par régulation du pH (par activité catalytique).	b, c, d, q
<b>Enzyme d'oxydation des lipides</b>	Oxydase, avec notamment la superoxyde Dismutase (SOD). Rôle dans l'oxydation des AG pour former des alcools et aldéhydes. Rôle dans la perception des saveurs, notamment métallique.	b, c, d, p
<b>Lipase</b>	Estérase particulière. Activation par la présence de matières grasses, possible rôle dans la perception du gras (hydrolyse des triglycérides pour libérer les acides gras). Rôle dans la libération d'acides gras issus des aliments.	b, c, d, l
<b>Estérase</b>	Hydrolase. Même activité catalytique que les lipases, mais sur des molécules plus petites d'AG ou esters (catalyse les Triglycérides et acides gras à courte chaîne). Influence dans l'altération de la flaveur.	b, c, d, p
<b>Phosphatase</b>	Enzyme de transfert. Ajout de groupements phosphates.	b, c, d
<b>Lysozyme</b>	Enzyme. Rôle dans la stabilité des émulsions. Favorise la perception de la « saveur » du gras. Rôle antibactérien en s'attaquant aux parois des bactéries.	b, c, d, j, l, r
<b>Hyaluronidase</b>	Hydrolase. Catalyse de réaction d'hydrolyse de façon aléatoire.	b, c, d, p
<b>Gustine</b>	Isoforme de l'anhydrase carbonique. Rôle important dans la perception du goût.	b, c, d
<b>Apolipoprotéine</b>	Capable de se lier à de petites molécules (petit AG, métaux...).	b, c, d, k
<b>Albumine</b>	Provient du plasma (régulation de la pression osmotique du sang). Capable de lier : Ca <sup>2+</sup> , Na <sup>2+</sup> , K <sup>+</sup> , AG, zinc, hormones, bilirubine et drogue.	b, c, d
<b>Calgranuline</b>	Rôle dans le processus inflammatoire immunitaire.	b, c, d, s
<b>Prolactine</b>	Hormone. Produit lors de la lactation.	b, c, d, t
<b>Lacto-peroxydase</b>	Oxydase. Action antibactérienne.	b, c, d
<b>Enzymes protéolytiques</b>	En grande partie produite par la flore buccale. Grande importance dans la prédigestion des matrices laitières.	b, c, d, u
<b>Peptides</b>		
<b>Peptides</b>	Défensine(Huq.2007), phospholipase, phosphodiesterase, cytokératine, thymosine, superoxyde dismutase, microglobuline, énalase, thioredoxine, Histidine-rich Peptide (HRP)...	
<b>Cystatine</b>	Capable de se lier aux phénols type tanins pour former des complexes, entraînant la sensation astringente. Rôle antibactérien et antiviral.	b, c, d
<b>Histatines</b>	Peptide riche en histadine. Rôle dans la sensation astringente par association avec les tanins. Grande importance dans la prédigestion des matrices laitières.	

## Annexes

	Rôle d'agent antibactérien, et antifongique (protéine fongicide).	
<b>Statherines</b>	Aide à la lubrification du bol alimentaire pour faciliter la déglutition. Rôle dans la reminéralisations des dents.	
<b>Lipides</b>		
<b>Acides gras liés aux protéines</b>	Possibilité de libération de ces acides gras par l'action des enzymes salivaires.	b, c, d, t
<b>Acides</b>		
<b>Acide urique</b>	Principale antioxydant de la salive.	b, c, d, v
<b>Autres</b>		
<b>Desquamation de l'épithélium buccal</b>	Cellule morte. Entraînant la présence d'actine et myosine dans la salive.	b, c, d, w
<b>Flore : Microorganismes Bactéries</b>	Etres vivants unicellulaires. Production d'une partie des enzymes protéolytiques. Celles-ci ayant une grande importance dans la prédigestion des matrices alimentaires notamment laitières. Ex : production de glycosyltransférase par les streptocoques.	b, c, d, q, u
<b>Résidus d'aliment</b>	Pouvant entraîner l'acidification du milieu buccal.	b, c, d, q
<b>Micelle salivaire</b>	Rôle dans la perception sensorielle, notamment de la texture des aliments.	j, r

- (a) (Chen, 2009)
- (b) (Amerongen & Veerman, 2002)
- (c) (Huq, Cross, Ung, Myroforidis, Veith, Chen, et al., 2007)
- (d) (Huang, 2004)
- (e) (Almståhl & Wikström, 2003)
- (f) (Ferry, Mitchell, Hort, Hill, Taylor, Lagarrigue, et al., 2006)
- (g) (Ferry, Hort, Mitchell, Lagarrigue, & Pamies, 2004)
- (h) (Engelen, van den Keybus, de Wijk, Veerman, Amerongen, Bosman, et al., 2007)
- (i) (Vingerhoeds, Blijdenstein, Zoet, & van Aken, 2005)
- (j) (Soares, Lin, Siqueira, Bruno, Li, Oppenheim, et al., 2004)
- (k) (Sevvana, Ahnstrom, Egerer-Sieber, Lange, Dahlback, & Muller, 2009)
- (l) (Neyraud.E, 2011)
- (m) (Spinelli, Vincent, Pelosi, Tegoni, & Cambillau, 2002)
- (n) (Kallithraka, Bakker, Clifford, & Vallis, 2001)
- (o) (Zheng, Hoffman, McMillan, Kleinman, & O'Connell, 1998)
- (p) (Salles, Chagnon, Feron, Guichard, Laboure, Morzel, et al., 2011)
- (q) (Morou-Bermudez, Elias-Boneta, Billings, Burne, Garcia-Rivas, Brignoni-Nazario, et al., 2011)
- (r) (Silletti, Vingerhoeds, Norde, & van Aken, 2007)
- (s) (Neyraud, Sayd, Morzel, & Dransfield, 2006)
- (t) (Ghafouri, Tagesson, & Lindahl, 2003)
- (u) (Rasiah, Wong, Anderson, & Sissons, 2005)
- (v) (Nagler, Klein, Zarzhevsky, Drigues, & Reznick, 2002)
- (w) (Schipper, Silletti, & Vingerhoeds, 2007)

## Annexes

### Annexes n°2 : Tableau des 70 molécules réparties en 6 mélanges et méthodes de température utilisées en chromatographie gazeuse

Mélanges	Classes Chimiques	Molécules odorantes	CAS	Méthodes Chromatographique	
1	Ester	Ethyl-propanoate	105-37-3	3°C/min de 40°C à 90°C	
	Ester	Ethyl-butanoate	105-54-4		
	Cétone	5-Methylhexan-2-one	110-12-3		
	1	Ester	Ethyl-hexanoate	123-66-0	5°C/min de 90°C à 110°C
		Cétone	Acétoïne	513-86-0	
		Ester	N-Butyl-pentanoate	591-68-4	
	1	Ester	Ethyl-heptanoate	106-30-9	6°C/min de 110°C à 240°C
		Alcool	6-Methyl-5-hepten-2-ol	1569-60-4	
		Alcool	2-Ethyl-1-hexanol	104-76-7	
2	Cétone	4-Methyl-2-pentanone	108-10-1	2°C/min de 40°C à 110°C	
	Aldéhyde	2-Methyl-2-butenal	497-03-0		
	Cétone	4-Methyl-3-penten-2-one	141-79-7		
	Cétone	2-Methylheptan-3-one	13019-20-0		
	2	Aldéhyde	Heptanal	111-71-7	4°C/min de 110°C à 130°C
		Alcool	1-Hexen-3-ol	4798-44-1	
	2	Aldéhyde	2-Isopropyl-5-methyl-2-hexenal	35158-25-9	6°C/min de 130°C à 240°C
		Alcool	3-octanol	589-98-0	
		Alcool	Cis-4-Hexen-1-ol	928-91-6	
		Alcool	Cis-4-Hepten-1-ol	6191-71-5	
		Alcool	1-nonanol	143-08-8	
	3	Aldéhyde	2-ethylbutyraldehyde	97-96-1	2°C/min de 40°C à 53°C
Alcool		3-Methylpentan-3-ol	77-74-7	0,5°C/min de 53°C à 75°C	
Cétone		3-heptanone	106-35-4		
Ester		Ethyl-crotonate	623-70-1	2°C/min de 75°C à 84°C	
Cétone		2-heptanone	110-43-0		
Aldéhyde		Trans-2-Hexenal	6728-26-3	4°C/min de 84°C à 115°C	
Ester		Isopropyl-tiglate	1733-25-1		
Aldéhyde		Octanal	124-13-0	6°C/min de 115°C à 240°C	
Alcool		1-hexanol	111-27-3		
Alcool		Linalool	78-70-6		
4	Aldéhyde	Propanal	123-38-6	3°C/min de 40°C à 150°C	
	Cétone	Diacétyl	431-03-8		
	Cétone	3-hexanone	589-38-8		
	Cétone	Hex-5-en-2-one	109-49-9		
	Cétone	5-Methylheptan-3-one	541-85-5		
	4	Aldéhyde	Cis-4-Heptenal	6728-31-0	6°C/min de 150°C à 240°C
		Ester	Isobutyl-angelate	7779-81-9	
		Cétone	3-nonanone	925-78-0	
		Ester	Isoamyl-tiglate	41519-18-0	

## Annexes

	Ester	Hexyl-tiglate	16930-96-4	
	Alcool	Nerol	106-25-2	
5	Cétone	3-Methylpentan-2-one	565-61-7	1°C/min de 40°C à 90°C
	Aldéhyde	Hexanal	66-25-1	
	Ester	Isoamyl-acetate	123-92-2	
	Ester	Ethyl-pentanoate	539-82-2	
	Ester	2-6-Dimethyl-4-heptanone	108-83-8	
	Ester	Isobutyl-isovalerate	589-59-3	
	Cétone	2-octanone	111-13-7	6°C/min de 90°C à 240°C
	Alcool	2-Methylpentan-1-ol	105-30-6	
	Alcool	2-heptanol	543-49-7	
	Cétone	Nonan-2-one	821-55-6	
	Acide	Acide butanoïque	107-92-6	
6	Cétone	2-propanone	67-64-1	3°C/min de 40°C à 135°C
	Ester	Ethyl-2-methylpropanoate	97-62-1	
	Cétone	2-hexanone	591-78-6	
	Cétone	4-heptanone	123-19-3	
	Aldéhyde	2-Methyl-2-pentenal	623-36-9	
	Aldéhyde	3-5-5-trimethylhexanal	5435-64-3	
	Cétone	3-octanone	106-68-3	6°C/min de 135°C à 240°C
	Ester	2-Methylbutyl-2-methylbutanoate	2445-78-5	
	Ester	Propyl-2-methylbut-2-enoate	61692-83-9	
	Alcool	1-octanol	111-87-5	
	Alcool	3-7-Dimethyl-1-octanol	106-21-8	

### Annexes n°3 : Scriptes Matlab utilisés pour calculer les coefficients de partage par la méthode PRV

#### Programme calculant la valeur du coefficient de partage

```
K0=1e-4;
Fi0=1e+12;
V0=[K0 Fi0];
V1=fminsearch(@Y_detail_fonc,V0);
K=V1(1);
Fi=V1(2);
disp('K Fi: ');
disp(K);
disp(Fi);
[R1]=coef1_fonc(V1);
```

#### Fonction approximant la courbe PRV

```
function[SCE]=Y_detail_fonc(V)
K=V(1);
Fi=V(2);
M=load('C:\Documents and Settings\RMN\Mes
documents\Sandy\PRV_Water_New_Colonne\M5_Water.txt');
X=M(:,1);
Y=M(:,11);
C=9.96e-5;
ecart=(Y-(Fi*C)./((1/K)+2*X+K*X.^2));
SCE=sum(ecart.^2);
Xreg=min(X):1e-1:max(X);
plot(X,Y,'+',Xreg,(Fi*C)./((1/K)+2*Xreg+K*(Xreg.^2)),'r');
pause(0.01);
```

## Annexes n°4 : Scripts R utilisés dans les analyses statistiques

### ANOVA

```
> tab<-read.table("Anova.txt", header=TRUE)
> anova(lm(Variable~Sujet*Cond+Sujet*Rep+Sujet*Mol+Sujet*Rep*Cond+Sujet*Cond*Mol+Sujet*Cond*Rep, data=tab))
```

### Test HSD

```
> library(agricolae)
> tab<-read.table("Hsd.txt", header=TRUE)
> mod<-aov(Variable~Sujet, data=tab)
> print(HSD.test(mod,'Sujet'))
```

### Calcul des coefficients de corrélation et p-values

```
> library(Hmisc)
> tab<-read.table("Matrice.txt", header=TRUE, row.names=1)
> rcorr(as.matrix(tab))
```

### ACP

```
> library(FactoMineR)
> tab<-read.table("ACP.txt", header=TRUE, row.names=1)
> calc<-PCA(tab, scale.unit=TRUE)
> Calc$eig
> res=PCA(tab, scale.unit=TRUE, quali.sup=1, graph=T)
> plot.PCA(res, axes=c(1,2), choix="ind", habillage=1)
> concat=cbind.data.frame(tab[,1], res$ind$coord)
> ellipse=coord.ellipse(concat, bary=T)
> plot.PCA(res,habillage=1, ellipse=ellipse, cex=0.8)
```

## Annexes

### Annexes n°5 : Matrice des corrélations entre les variables de libération et salivaires

#### Matrice de corrélation pour l'hexanoate d'éthyle pour les 10 sujets, les 3 états physiologiques et les 4 répétitions

Corrélations	$I_{max}$	$Ti_{max}$	AUC	$V_{max}$	$T_{o25}$	$T_{o50}$	$T_{o90}$	Flux	Brad <sup>Qd</sup>	Lipocal <sup>Qd</sup>	Amy <sup>Qd</sup>	Visco	Vbucc
$I_{max}$	1	0.05	0.81	0.85	-0.06	-0.34	-0.29	-0.16	-0.04	-0.05	0.06	-0.22	-0.25
$Ti_{max}$	0.05	1	0.22	-0.1	0.73	0.51	0.22	0.01	0.15	0.05	0.17	-0.02	-0.21
AUC	0.81	0.22	1	0.51	0.15	-0.12	-0.13	-0.1	-0.01	-0.07	0.09	-0.31	-0.32
$V_{max}$	0.85	-0.1	0.51	1	-0.18	-0.36	-0.36	-0.21	-0.09	-0.05	0	-0.1	-0.11
$T_{o25}$	-0.06	0.73	0.15	-0.18	1	0.75	0.34	0.04	0.12	0.05	0.23	0.04	-0.13
$T_{o50}$	-0.34	0.51	-0.12	-0.36	0.75	1	0.55	0.03	0.02	0.08	0.12	0.02	-0.06
$T_{o90}$	-0.29	0.22	-0.13	-0.36	0.34	0.55	1	-0.09	-0.04	0.01	0.12	0	-0.27
Flux	-0.16	0.01	-0.1	-0.21	0.04	0.03	-0.09	1	0.6	0.57	0.13	-0.45	0.38
Brad <sup>Qd</sup>	-0.04	0.15	-0.01	-0.09	0.12	0.02	-0.04	0.6	1	0.74	0.58	-0.27	0.18
Lipocal <sup>Qd</sup>	-0.05	0.05	-0.07	-0.05	0.05	0.08	0.01	0.57	0.74	1	0.46	-0.34	0.13
Amy <sup>Qd</sup>	0.06	0.17	0.09	0	0.23	0.12	0.12	0.13	0.58	0.46	1	-0.2	-0.15
Visco	-0.22	-0.02	-0.31	-0.1	0.04	0.02	0	-0.45	-0.27	-0.34	-0.2	1	0.03
Vbucc	-0.25	-0.21	-0.32	-0.11	-0.13	-0.06	-0.27	0.38	0.18	0.13	-0.15	0.03	1

## Annexes

p-values	I <sub>max</sub>	Ti <sub>max</sub>	AUC	V <sub>max</sub>	T <sub>025</sub>	T <sub>050</sub>	T <sub>090</sub>	Flux	Brad <sup>Qd</sup>	Lipocal <sup>Qd</sup>	Amy <sup>Qd</sup>	Visco	Vbucc
I <sub>max</sub>		0.5532	0	0	0.5335	0.0002	0.0012	0.075	0.6889	0.6052	0.4903	0.0157	0.0059
Ti <sub>max</sub>	0.5532		0.0179	0.2598	0	0	0.017	0.9184	0.1007	0.6007	0.0596	0.847	0.023
AUC	0	0.0179		0	0.0976	0.1957	0.1436	0.2643	0.9549	0.4638	0.3526	0.0005	0.0005
V <sub>max</sub>	0	0.2598	0		0.0523	0	0	0.019	0.3412	0.5634	0.9989	0.2905	0.233
T <sub>025</sub>	0.5335	0	0.0976	0.0523		0	0.0001	0.6387	0.1759	0.5555	0.0106	0.644	0.1664
T <sub>050</sub>	0.0002	0	0.1957	0	0		0	0.7838	0.7929	0.3883	0.1924	0.7939	0.544
T <sub>090</sub>	0.0012	0.017	0.1436	0	0.0001	0		0.3549	0.643	0.9488	0.1812	0.9841	0.0028
Flux	0.075	0.9184	0.2643	0.019	0.6387	0.7838	0.3549		0	0	0.1477	0	0
Brad <sup>Qd</sup>	0.6889	0.1007	0.9549	0.3412	0.1759	0.7929	0.643	0		0	0	0.0028	0.0455
Lipocal <sup>Qd</sup>	0.6052	0.6007	0.4638	0.5634	0.5555	0.3883	0.9488	0	0		0	0.0001	0.1618
Amy <sup>Qd</sup>	0.4903	0.0596	0.3526	0.9989	0.0106	0.1924	0.1812	0.1477	0	0		0.0285	0.1064
Visco	0.0157	0.847	0.0005	0.2905	0.644	0.7939	0.9841	0	0.0028	0.0001	0.0285		0.7127
Vbucc	0.0059	0.023	0.0005	0.233	0.1664	0.544	0.0028	0	0.0455	0.1618	0.1064	0.7127	



## Annexes

### Matrice de corrélation pour le propanoate d'éthyle pour les 10 sujets, les 3 états physiologiques et les 4 répétitions

Corrélations	$I_{\max}$	$Ti_{\max}$	AUC	$V_{\max}$	$T_{o25}$	$T_{o50}$	$T_{o90}$	Flux	Brad <sup>Qd</sup>	Lipocal <sup>Qd</sup>	Amy <sup>Qd</sup>	Visco	Vbucc
$I_{\max}$	1	0.03	0.82	0.74	0.08	-0.15	-0.29	-0.09	-0.01	-0.07	-0.06	-0.31	-0.36
$Ti_{\max}$	0.03	1	0.23	-0.06	0.61	0.56	0.14	0.07	0.03	0.06	0.1	-0.04	-0.07
AUC	0.82	0.23	1	0.4	0.23	0.11	-0.16	-0.05	-0.02	-0.07	-0.03	-0.29	-0.32
$V_{\max}$	0.74	-0.06	0.4	1	-0.04	-0.21	-0.22	-0.24	0	-0.1	-0.04	-0.21	-0.28
$T_{o25}$	0.08	0.61	0.23	-0.04	1	0.69	0.17	0.09	-0.02	0.11	0.13	-0.09	0.04
$T_{o50}$	-0.15	0.56	0.11	-0.21	0.69	1	0.45	0.14	-0.01	0.07	0.16	-0.07	0.12
$T_{o90}$	-0.29	0.14	-0.16	-0.22	0.17	0.45	1	0	-0.06	-0.04	0.15	0.06	-0.03
Flux	-0.09	0.07	-0.05	-0.24	0.09	0.14	0	1	0.59	0.51	0.25	-0.39	0.42
Brad <sup>Qd</sup>	-0.01	0.03	-0.02	0	-0.02	-0.01	-0.06	0.59	1	0.73	0.43	-0.21	0.21
Lipocal <sup>Qd</sup>	-0.07	0.06	-0.07	-0.1	0.11	0.07	-0.04	0.51	0.73	1	0.51	-0.25	0.15
Amy <sup>Qd</sup>	-0.06	0.1	-0.03	-0.04	0.13	0.16	0.15	0.25	0.43	0.51	1	-0.19	-0.07
Visco	-0.31	-0.04	-0.29	-0.21	-0.09	-0.07	0.06	-0.39	-0.21	-0.25	-0.19	1	0.03
Vbucc	-0.36	-0.07	-0.32	-0.28	0.04	0.12	-0.03	0.42	0.21	0.15	-0.07	0.03	1

## Annexes

p-values	I <sub>max</sub>	Ti <sub>max</sub>	AUC	V <sub>max</sub>	T <sub>025</sub>	T <sub>050</sub>	T <sub>090</sub>	Flux	Brad <sup>Qd</sup>	Lipocal <sup>Qd</sup>	Amy <sup>Qd</sup>	Visco	Vbucc
I <sub>max</sub>		0.776	0	0	0.3713	0.1047	0.0015	0.3222	0.9287	0.4497	0.5288	0.0005	0
Ti <sub>max</sub>	0.776		0.011	0.5241	0	0	0.1402	0.4276	0.7334	0.5101	0.2903	0.6724	0.4711
AUC	0	0.011		0	0.0125	0.2439	0.0849	0.5632	0.8591	0.422	0.7386	0.0015	0.0003
V <sub>max</sub>	0	0.5241	0		0.6685	0.0215	0.0146	0.0088	0.9813	0.2589	0.6322	0.02	0.0017
T <sub>025</sub>	0.3713	0	0.0125	0.6685		0	0.0579	0.3064	0.8555	0.244	0.1662	0.3556	0.6883
T <sub>050</sub>	0.1047	0	0.2439	0.0215	0		0	0.1371	0.9098	0.462	0.0909	0.4245	0.185
T <sub>090</sub>	0.0015	0.1402	0.0849	0.0146	0.0579	0		0.9785	0.542	0.6924	0.1104	0.5232	0.7693
Flux	0.3222	0.4276	0.5632	0.0088	0.3064	0.1371	0.9785		0	0	0.0055	0	0
Brad <sup>Qd</sup>	0.9287	0.7334	0.8591	0.9813	0.8555	0.9098	0.542	0		0	0	0.0186	0.0211
Lipocal <sup>Qd</sup>	0.4497	0.5101	0.422	0.2589	0.244	0.462	0.6924	0	0		0	0.005	0.0966
Amy <sup>Qd</sup>	0.5288	0.2903	0.7386	0.6322	0.1662	0.0909	0.1104	0.0055	0	0		0.0362	0.4479
Visco	0.0005	0.6724	0.0015	0.02	0.3556	0.4245	0.5232	0	0.0186	0.005	0.0362		0.7127
Vbucc	0	0.4711	0.0003	0.0017	0.6883	0.185	0.7693	0	0.0211	0.0966	0.4479	0.7127	

## Annexes

### Bibliographie des annexes

- Almståhl, A., & Wikström, M. (2003). Electrolytes in stimulated whole saliva in individuals with hyposalivation of different origins. *Archives of Oral Biology*, 48(5), 337-344.
- Amerongen, A. V., & Veerman, E. C. (2002). Saliva--the defender of the oral cavity. *Oral Diseases*, 8(1), 12-22.
- Chen, J. (2009). Food oral processing--A review. *Food Hydrocolloids*, 23(1), 1-25.
- Engelen, L., van den Keybus, P. A. M., de Wijk, R. A., Veerman, E. C. I., Amerongen, A. V. N., Bosman, F., Prinz, J. F., & van der Bilt, A. (2007). The effect of saliva composition on texture perception of semi-solids. *Archives of Oral Biology*, 52(6), 518-525.
- Ferry, A. L., Hort, J., Mitchell, J. R., Lagarrigue, S., & Pamies, B. V. (2004). Effect of amylase activity on starch paste viscosity and its implications for flavor perception. *Journal of Texture Studies*, 35(5), 511-524.
- Ferry, A. L. S., Mitchell, J. R., Hort, J., Hill, S. E., Taylor, A. J., Lagarrigue, S., & Valles-Pamies, B. (2006). In-mouth amylase activity can reduce perception of saltiness in starch-thickened foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(23), 8869-8873.
- Ghafouri, B., Tagesson, C., & Lindahl, M. (2003). Mapping of proteins in human saliva using two-dimensional gel electrophoresis and peptide mass fingerprinting. *Proteomics*, 3(6), 1003-1015.
- Huang, C. M. (2004). Comparative proteomic analysis of human whole saliva. *Archives of Oral Biology*, 49(12), 951-962.
- Huq, N. L., Cross, K. J., Ung, M., Myroforidis, H., Veith, P. D., Chen, D., Stanton, D., He, H., Ward, B. R., & Reynolds, E. C. (2007). A review of the salivary proteome and peptidome and saliva-derived peptide therapeutics. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 13(4), 547-564.
- Kallithraka, S., Bakker, J., Clifford, M. N., & Vallis, L. (2001). Correlations between saliva protein composition and some T-I parameters of astringency. *Food Quality and Preference*, 12(2), 145-152.
- Morou-Bermudez, E., Elias-Boneta, A., Billings, R., Burne, R., Garcia-Rivas, V., Brignoni-Nazario, V., & Suarez-Perez, E. (2011). Urease activity in dental plaque and saliva of children during a three-year study period and its relationship with other caries risk factors. *Archives of Oral Biology*, 56(11), 1282-1289.
- Nagler, R. M., Klein, I., Zarzhevsky, N., Drigues, N., & Reznick, A. Z. (2002). Characterization of the differentiated antioxidant profile of human saliva. *Free Radical Biology and Medicine*, 32(3), 268-277.
- Neyraud, E., Sayd, T., Morzel, M., & Dransfield, E. (2006). Proteomic analysis of human whole and parotid salivas following stimulation by different tastes. *Journal of Proteome Research*, 5(9), 2474-2480.
- Neyraud, E., O. P., Camille Schwartz, Sophie Nicklaus, Gilles Feron. (2011). Variability of human saliva composition: Possible relationships with fat perception and liking. *Elsevier*, 2683, 11.
- Rasiah, I. A., Wong, L., Anderson, S. A., & Sissons, C. H. (2005). Variation in bacterial DGGE patterns from human saliva: over time, between individuals and in corresponding dental plaque microcosms. *Archives of Oral Biology*, 50(9), 779-787.
- Salles, C., Chagnon, M. C., Feron, G., Guichard, E., Laboure, H., Morzel, M., Semon, E., Tarrega, A., & Yven, C. (2011). In-Mouth Mechanisms Leading to Flavor Release and Perception. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51(1), 67-90.
- Schipper, R. G., Silletti, E., & Vingerhoeds, M. H. (2007). Saliva as research material: Biochemical, physicochemical and practical aspects. *Archives of Oral Biology*, 52(12), 1114-1135.

## Annexes

---

- Sevvana, M., Ahnstrom, J., Egerer-Sieber, C., Lange, H. A., Dahlback, B., & Muller, Y. A. (2009). Serendipitous Fatty Acid Binding Reveals the Structural Determinants for Ligand Recognition in Apolipoprotein M. *Journal of Molecular Biology*, 393(4), 920-936.
- Silletti, E., Vingerhoeds, M. H., Norde, W., & van Aken, G. A. (2007). Complex formation in mixtures of lysozyme-stabilized emulsions and human saliva. *Journal of Colloid and Interface Science*, 313(2), 485-493.
- Soares, R. V., Lin, T., Siqueira, C. C., Bruno, L. S., Li, X., Oppenheim, F. G., Offner, G., & Troxler, R. F. (2004). Salivary micelles: identification of complexes containing MG2, sIgA, lactoferrin, amylase, glycosylated proline-rich protein and lysozyme. *Archives of Oral Biology*, 49(5), 337-343.
- Spinelli, S., Vincent, F., Pelosi, P., Tegoni, M., & Cambillau, C. (2002). Boar salivary lipocalin - Three-dimensional X-ray structure and androstenol/androstenone docking simulations. *European Journal of Biochemistry*, 269(10), 2449-2456.
- Vingerhoeds, M. H., Blijdenstein, T. B. J., Zoet, F. D., & van Aken, G. A. (2005). Emulsion flocculation induced by saliva and mucin. *Food Hydrocolloids*, 19(5), 915-922.
- Zheng, C. Y., Hoffman, M. P., McMillan, T., Kleinman, H. K., & O'Connell, B. C. (1998). Growth factor regulation of the amylase promoter in a differentiating salivary acinar cell line. *Journal of Cellular Physiology*, 177(4), 628-635.

