HAL
open science

Etude de l'anthocyanidine synthase de Vitis vinifera : substrats polyphénoliques et mécanismes réactionnels

Jiarong Zhang

To cite this version:

Jiarong Zhang. Etude de l'anthocyanidine synthase de Vitis vinifera : substrats polyphénoliques et mécanismes réactionnels. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université de Bordeaux, 2017. Français. NNT : 2017BORD0867 . tel-01710009

HAL Id: tel-01710009

https://theses.hal.science/tel-01710009v1

Submitted on 15 Feb 2018

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

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

université de BORDEAUX

THÈSE PRÉSENTÉE

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR DE

L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

SPÉCIALITÉ : Biochimie

Par Jiarong ZHANG

Etude de l'anthocyanidine synthase de *Vitis vinifera* : substrats polyphénoliques et mécanismes réactionnels

Sous la direction de : Jean CHAUDIERE

Soutenue le : 15 décembre 2017

Membres du jury :

Jalila SIMAAN	DR, CNRS, Université d'Aix-Marseille	Rapporteur
Véronique CHEYNIER	DR, INRA, Université de Montpellier	Rapporteur
Sandrine BOSCHI	Professeur, Université de Lorraine	Examinateur
Olivier DANGLES	Professeur, Université d'Avignon	Examinateur
Jean-Marie SCHMITTER	Professeur, Université de Bordeaux	Président
Claudine TROSSAT-MAGNIN	MCU, Université de Bordeaux	Invité

REMERCIEMENTS

Ma thèse a été menée sous la direction de Jean CHAUDIERE. Je tiens tout d'abord à lui exprimer mon profond respect et mes remerciements sincères, pour sa grande patience, ses précieux conseils et pour m'avoir fait confiance. Son enseignement et ses encouragements m'accompagneront toujours à l'avenir.

Les travaux de thèse ont été réalisés dans l'équipe de CBMN intitulée "Structure et Activité des Macromoléculaires Biologiques" et dirigée par Xavier SANTARELLI. Je lui exprime toute ma gratitude pour m'avoir soutenu et encouragé au sein de son équipe, et je remercie aussi tous les membres de l'équipe, en particulier Claude MANIGAND pour ses conseils en HPLC, ainsi que pour son soutien et ses encouragements, et bien sûr aussi Béatrice LANGLOIS d'ESTAINTOT, Michel HUGUES et Véronique TREZEGUET, qui ont toujours cherché à répondre efficacement à mes requêtes, parfois très naïves.

Je remercie Jean-Marie SCHMITTER et son équipe, pour leur accueil et leurs conseils avisés en spectrométrie de masse, technique qui s'est avérée si importante dans cette thèse.
Un très grand merci en particulier à Luc NEGRONI pour son infinie patience et sa grande gentillesse. Sans lui, je n'aurais jamais imaginé tout le pouvoir de la spectrométrie de masse. J'ai beaucoup appris à son contact.
Un grand merci aussi à Katell BATHANY qui a pris le relais après son départ à Strasbourg et qui n'a jamais ménagé son temps pour moi.

Je remercie enfin Serge DELROT ainsi que son équipe de l'ISVV pour leur accueil et leurs conseils, en particulier Claudine TROSSAT-MAGNIN, toujours enthousiaste, et qui a produit elle-même avec une efficacité hors pair le plasmide qui nous a permis de produire l'enzyme recombinante sur laquelle tout mon travail a été réalisé !

Je suis aussi reconnaissant à quelques autres personnes de m'avoir permis de réaliser rapidement avec elles quelques expériences préliminaires. Je pense en particulier à Patrick PAUMARD de l'IBGC, Claires STINES du CRPP, et Laëtitia MINDER de l'IECB.

Je tiens à exprimer ma gratitude à ma famille qui m'a toujours encouragé et soutenu. J'adresse en particulier mes tendres remerciements à ma petite amie, Pin-He LIU, pour son attention et tout le bonheur que m'a procuré sa présence en France, même si c'était à Reims !
Ses conseils avisés et souvent professionnels m'ont aussi aidé.
Tout cela nous laissera des souvenirs mémorables !

Enfin, je tiens à remercier chaleureusement Véronique CHEYNIER, Jalila SIMAAN, Jean-Marie SCHMITTER, Olivier DANGLES et Sandrine BOSCHI d'avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse en se déplaçant sur Bordeaux dans une période de l'année toujours très chargée pour des académiques.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE **1**

I. Les flavonoïdes **5**

I.1. Voie commune de biosynthèse des flavonoïdes 6

I.2. Les anthocyanes 9

I.2.1. Localisation subcellulaire de la biosynthèse des anthocyanes 13

I.2.2. Transport des anthocyanes vers la vacuole 14

I.2.3. Fonctions écologiques des anthocyanes 15

I.2.4. Fonctions pharmacologiques des anthocyanes 16

II. Les oxygénases à fer et 2-oxoglutarate **17**

II.1. Les oxygénases apparentées utilisant le 2-oxoglutarate 21

II.2. Les oxygénases apparentées n'utilisant pas le 2-oxoglutarate 23

II.3. Rôle des oxygénases à 2-oxoglutarate dans la réponse à l'hypoxie 24

II.4. Structure 3D des oxygénases à fer et 2-oxoglutarate 25

II.4.1. Généralités 25

II.4.2. Prédiction de la structure 3D de l'anthocyanidine synthase de *Vitis vinifera* 26

II.4.3. Propriétés documentées de l'anthocyanidine synthase (ANS) 27

MATERIELS ET METHODES **29**

I. Expression et purification de la *Vv*ANS **31**

I.1. Expression de la *Vv*ANS chez *E.coli* 31

I.2. Préparation du lysat bactérien 31

I.3. Purification de la protéine recombinante 31

I.3.1. Première chromatographie IMAC 32

I.3.2. Digestion protéolytique par la thrombine 32

I.3.3. Deuxième chromatographie IMAC 32

I.3.4. Elimination de la thrombine 33

I.4. Vérification de la pureté de la protéine 34

I.5. Vérification de l'intégrité de la protéine produite 34

II. Production de leucocyanidine substrat de la *Vv*ANS **35**

II.1. Synthèse enzymatique de la (+)-2,3-trans-3,4-cis-leucocyanidine 35

II.2. Synthèse chimique de la (+)-2,3-trans-3,4-cis-leucocyanidine 36
II.2.1. Production et extraction de la (+)-2,3-trans-3,4-trans-leucocyanidine 36
II.2.2. Purification de la (+)-2,3-trans-3,4-trans-leucocyanidine 37
II.2.3. Production et purification de la 2,3-trans-3,4-cis-leucocyanidine 37
III. Identification, quantification et caractérisation du substrat de la *Vv*ANS 38
III.1. Identification de la leucocyanidine produite par RMN 38
III.2. Quantification de la (+)-2,3-trans-3,4-cis-leucocyanidine produite 38
III.3. Caractérisations des deux stéréoisomères de leucocyanidine par MS et MS/MS 39
IV. Etude enzymatique de la *Vv*ANS 39
IV.1. Méthodes d'apport du fer au site actif de l'enzyme 39
IV.1.1. Préparation d'un milieu réactionnel contenant un sel de Fe(II) en excès 39
IV.1.2. Production du complexe *Vv*ANS-Fe(II) 40
IV.2. Etudes des spécificités des substrats de la *Vv*ANS en présence du sel de fer 41
IV.3. Identifications des produits enzymatiques par spectrométrie de masse (MS) et spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) 42
IV.4. Effets des thiols sur la réaction catalysée par la *Vv*ANS 43

RESULTATS ET DISCUSSIONS 45

Partie 1 Production, purification et mise en évidence de l'intégrité de l'ANS non étiquetée 47

I. Expression 47
II. Purification de la *Vv*ANS étiquetée 48
III. Elimination de l'étiquette His_6-GST et purification IMAC de l'ANS non étiquetée 49
IV. Elimination de la thrombine après digestion 50
V. Vérification de l'intégrité de l'ANS non étiquetée produite 52

Partie 2 Production, caractérisation, quantification et stockage de la leucocyanidine. 55

I. Synthèse enzymatique de la (+)-2,3-trans-3,4-cis-leucocyanidine 56
II. Synthèse chimique de la (+)-2,3-trans-3,4-cis-leucocyanidine 59
III. Identification des deux stéréoisomères de leucocyanidine par RMN 62
IV. Quantification de la leucocyanidine par la LAR 64
V. Vérification de la stabilité des deux stéréoisomères de leucocyanidine 68
VI. Caractérisations des deux stéréoisomères de leucocyanidine par MS et MS/MS 69
VI.1. Analyse MS/MS des deux stéréoisomères de leucocyanidine 70

VI.2. Analyse MS/MS des deux ions de *m/z* 289 obtenus lors de l'analyse MS des deux stéréoisomères de leucocyanidine ... 73

Partie 3 Etude des propriétés catalytiques de l'anthocyanidine synthase de *Vitis vinifera* (*Vv*ANS) ... 77

I. Mise au point des tests d'activité de *Vv*ANS ... 77

II. Identification des différents types de substrats de la *Vv*ANS ... 82

II.1. Test de l'activité de la *Vv*ANS sur différentes familles de polyphénols ... 82

II.1.1. Flavanones ... 82

II.1.2. Dihydroflavonols ... 84

II.1.2.1. Dihydrokaempférol (DHK) ... 84

II.1.2.2. Dihydroquercétine (DHQ) ... 89

II.1.2.3. Dihydromyricétine (DHM) ... 92

II.1.3. Flavan-3-ols ... 95

II.1.3.1. (+)-catéchine ... 95

II.1.3.2. (+)-gallocatéchine ... 100

II.1.3.3. (-)-catéchine ... 103

II.1.3.4. (-)-épicatéchine ... 103

II.1.3.5. (+)-épicatéchine ... 104

II.1.3.6. (+)-afzéléchine ... 105

II.1.4. Flavan-3,4-diols ... 105

II.1.4.1. (+)-2,3-trans-3,4-cis-leucocyanidine ... 106

II.1.4.2. (+)-2,3-trans-3,4-trans-leucocyanidine ... 110

II.1.4.2.1. Confirmation du produit enzymatique considéré comme un stéréoisomère de la (+)-DHQ ... 117

II.1.4.2.2. Structure du produit hydroxylé de 3,4-trans-leucocyanidine ... 122

II.1.5. Conclusions sur les différentes structures polyphénoliques reconnues comme substrats de la *Vv*ANS 131

III. Production du complexe *Vv*ANS-Fe(II) ... 135

IV. Effet du glutathion (GSH) sur la réaction catalysée par la *Vv*ANS ... 138

IV.1. Effet du GSH sur la transformation des substrats de la famille des dihydroflavonols ... 138

IV.2. Effet du GSH sur la transformation des substrats de la famille des flavan-3-ols ... 140

IV.2.1. Effets du GSH sur la transformation enzymatique de la (+)-catéchine ... 140

IV.2.2. Effets du GSH sur la transformation enzymatique de la (+)-gallocatéchine ... 143

IV.3. Effet du GSH sur la transformation des substrats de la famille des flavan-3,4-diols ... 145

IV.4. Conclusions préliminaires sur l'effet de GSH ... 146

IV.5. Stabilité de l'adduit covalent GSH-cyanidine ... 147

V. Suivi par spectrométrie de masse en temps réel de la transformation enzymatique de la (+)-catéchine par la *Vv*ANS en présence et en l'absence de GSH ... 150

V.1. Choix d'un tampon approprié ... 150

V.2. Production du complexe *Vv*ANS-Fe(II) dans le tampon acétate d'ammonium 152
V.3. Monitorage en temps réel de l'évolution du milieu réactionnel contenant l'holoenzyme plus le sel de Fe(II) en présence de GSH 153
V.4. Monitorage en temps réel de l'évolution du milieu réactionnel contenant le complexe *Vv*ANS-Fe(II) sans sel de Fe(II)..... 155
V.4.1. Monitorage de la transformation de catéchine en l'absence de GSH.....155
V.4.2. Monitorage de la transformation de catéchine en présence de GSH 157
VI. Hypothèses sur la formation de l'adduit glutathion-cyanidine 159
VI.1. Mécanisme radicalaire..... 161
VI.2. Addition nucléophile 164
VI.2.1. Effet de la cystéine sur la transformation enzymatique de la (+)-catéchine.....165
VI.2.2. Effet du thiomalate sur la transformation enzymatique de la (+)-catéchine.....172
VI.2.3. Effet de la cystéamine sur la transformation enzymatique de la (+)-catéchine.....178
VII. Effet de la superoxyde dismutase (SOD) sur la transformation de la (+)-catéchine par le complexe *Vv*ANS-Fe(II) 182
VII.1. Test de l'activité de la SOD utilisée 184
VII.2. Test de l'effet de la SOD à pH 7,8 186
VIII. Données complémentaires sur l'effet d'un pH plus alcalin sur les réactions catalysées par la *Vv*ANS.....188
VIII.1. Transformation de la (+)-catéchine 188
VIII.2. Transformations de la 3,4-trans-leucocyanidine et de la (+)-DHQ 189
IX. Rôle essentiel de l'ascorbate 191
X. Comportement cinétique de la *Vv*ANS 195

CONCLUSION ET PERSPECTIVES..... 199

REFERENCES 207

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

Cette introduction comporte deux sections bibliographiques.

Dans la première, nous avons résumé les structures et les voies de biosynthèse des flavonoïdes, puis insisté plus particulièrement sur les propriétés des anthocyanes, leurs voies de biosynthèse et leur transport, puisque l'anthocyanidine synthase qui fait l'objet de ce travail de thèse, est l'enzyme qui produit la structure chromophorique initiale des anthocyanes, sous la forme d'anthocyanidines.

Dans la seconde section, nous proposons un survol des propriétés des oxygénases à Fe(II) et 2-oxoglutarate dont fait partie l'anthocyanidine synthase, puis nous résumons les propriétés documentées de l'anthocyanidine synthase (ANS).

Nous en profitons finalement pour montrer que la structure 3D de l'anthocyanidine synthase de *Vitis vinifera* (*Vv*ANS) telle que prédite par "filetage" (*protein threading* ou alignement d'une séquence sur une structure 3D) se superpose assez fidèlement à celle de l'*At*ANS.

Les figures de cette introduction sont numérotées de **01** à **013**, les figures des parties ultérieures qui correspondent au travail expérimental réalisé dans le cadre de la thèse étant quant à elles numérotées de **1** à **150**.

I. Les flavonoïdes

L'adaptation au monde terrestre des plantes issues des algues vertes aquatiques il y a quelques centaines de millions d'années doit certainement beaucoup à la production massive de "filtres UV" de structures polyphénoliques qui ont joué un rôle majeur dans leur croissance et leur développement, comme dans leurs stratégies de reproduction, de défense et d'interaction avec l'environnement (***Cheynier et coll., 2013***).

Les flavonoïdes sont des métabolites secondaires qui sont ubiquitaires chez les végétaux supérieurs, et font partie de la classe des composés polyphénoliques. Ils possèdent un même squelette tricyclique de base à quinze atomes de carbone de type C_6-C_3-C_6, dans lequel deux cycles benzéniques (A et B) sont reliés par un hétérocycle (C) de type pyrane.

Selon la position du cycle aromatique (B) attaché à la fraction benzopyrane, les flavonoïdes sont divisés en 3 sous-familles de composés (**figure 01**): les flavonoïdes proprement dits (2-phénylchromane), les isoflavonoïdes (3-phénylchromane) et les néoflavonoïdes (4-phénylchromane).

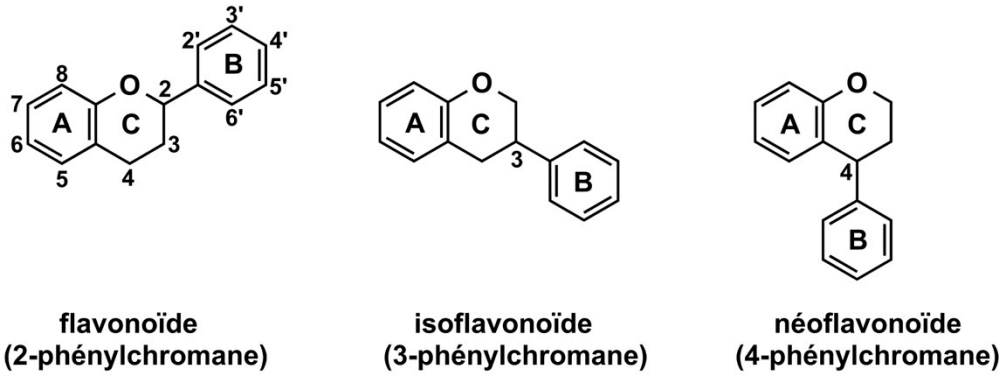


Figure 01. Squelette de base des trois sous-familles de flavonoïdes.

Les composés de la première famille (2-phénylchromane) sont les plus abondants, et selon le degré d'oxydation, d'hydroxylation et d'insaturation de l'hétérocycle central C, ils sont divisés en huit sous-classes que l'on retrouve sur la **figure 02**, et qui incluent les flavanones, les flavones, les dihydroflavonols (ou flavanolols), les flavonols, les flavan-3-ols, les flavan-3,4-diols (ou leucoanthocyanidines), les anthocyanes et les proanthocyanidines (ou tannins condensés, de structures oligomériques).

Les sous-classes majeures des flavonoïdes sont les anthocyanes, les flavonols, les flavanols et les proanthocyanidines.

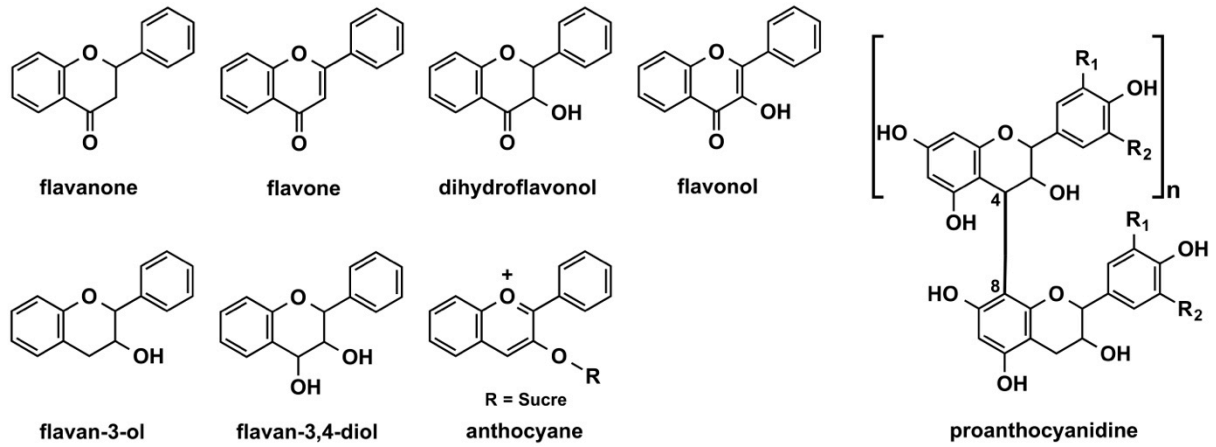


Figure 02. Les principales sous-classes de la famille des flavonoïdes (2-phénylchromane).

Les structures oligomériques des tannins condensés ou proanthocyanidines sont très nombreuses et variées dans le vin, les positions de substitution sur les cycles accolés n'étant certainement pas restreintes à celle de l'adduit générique en C_4-C_8 qui est représenté sur la **figure 02**.

Des expériences réalisées sur un milieu modèle contenant de l'acétaldéhyde (produit par les levures), ainsi qu'un mélange d'épicatéchine et de malvidine-3-O-glucoside (flavanol et anthocyane produits par le raisin) ont permis de mettre en évidence par spectrométrie de masse un grand nombre de nouvelles structures (***Vallverdu et coll., 2017***), ce qui suggère que les structures bien identifiées aujourd'hui ne fournissent qu'une image très incomplète de la réalité.

I.1. Voie commune de biosynthèse des flavonoïdes

La voie de biosynthèse des flavonoïdes est une des voies de biosynthèse des métabolites secondaires des plantes les plus étudiées, et la plupart des gènes codant pour des enzymes impliquées dans cette voie ont été isolés à partir d'un certain nombre d'espèces végétales qui sont bien caractérisées, en particulier chez *Petunia* et *Arabidopsis thaliana*, ainsi que dans le maïs et dans le raisin (*Vitis vinifera L.*) (***Zhang et coll., 2015***).

La régulation génétique de la biosynthèse de flavonoïdes est par conséquent relativement bien connue (**figure 03**).

Le *p*-coumaroyl-CoA est le précurseur commun à tous les flavonoïdes, qui est synthétisé par l'action successive de trois enzymes: la désamination de la phénylalanine par la phénylalanine ammonia lyase (PAL), l'hydroxylation de l'acide cinnamique par la cinnamate 4-hydroxylase (C4H) et la transformation de l'acide *p*-coumarique par la *p*-coumarate CoA ligase (4CL).

La voie qui précède immédiatement la biosynthèse des flavonoïdes permet de former le squelette de base de tous les flavonoïdes, et elle débute par l'action de la chalcone synthase (CHS): la

condensation de trois molécules de malonyl-CoA (qui fourniront chacune deux carbones du cycle A du squelette des flavonoïdes) et d'une molécule de *p*-coumaroyl-CoA (qui permettra la formation des cycles B et C), produisant le précurseur de tous les flavonoïdes: la naringénine chalcone.

Cette molécule est ensuite cyclisée de manière stéréospécifique en 2S-naringénine par la chalcone isomérase (CHI), et le squelette de base des flavonoïdes est maintenant formé. L'hétérocycle central de 2S-naringénine est hydroxylé en C_3 par la flavanone 3-hydroxylase (F3H) pour produire le dihydrokaempférol, qui peut être ensuite hydroxylé sur le carbone $C_{3'}$ ou $C_{5'}$ du cycle B, par la flavonoïde 3'-hydroxylase (F3'H) et la flavonoïde 3',5'-hydroxylase (F3'5'H), produisant respectivement la dihydroquercétine et la dihydromyricétine. La 2S-naringénine peut aussi être hydroxylée directement par la F3'H ou la F3'5'H, donnant respectivement le 2S-éridictyol et la 2S-pentahydroxy-flavanone, qui sont là encore hydroxylés en dihydroquercétine et dihydromyricétine par la F3H.

Enfin, la 2S-naringénine et le 2S-éridictyol peuvent aussi être transformés en flavones par la flavone synthase (FNS).

La F3H, la FLS et la FNS sont des enzymes de la famille des oxygénases à fer et 2-oxoglutarate, alors que la F3'H et la F3'5'H sont des mono-oxygénases à cytochrome P450.

Les dihydroflavonols ainsi synthétisés peuvent être oxydés en flavonols par la flavonol synthase (FLS).

La voie qui précède la biosynthèse des flavonoïdes est séparée en deux voies conduisant à la formation des anthocyanes et des proanthocyanidines à partir des leucoanthocyanidines, qui sont des intermédiaires communs à ces deux voies.

Les leucoanthocyanidines sont formées à partir de la réduction des dihydroflavonols (synthétisés en amont) par la dihydroflavonol réductase (DFR), et cette réaction est en compétition avec l'oxydation des dihydroflavonols en flavonols par la FLS.

Ces leucoanthocyanidines sont ensuite, soit réduites par la leucoanthocyanidine réductase (LAR), première enzyme clef de la voie conduisant aux proanthocyanidines, pour produire les (2R,3S)-flavan-3-ols, telle que la (+)-catéchine, l'unité initiale de la plupart des proanthocyanidines (***Xie et coll., 2003***), soit oxydées par l'anthocyanidine synthase (ANS, ou leucoanthocyanidine dioxygénase, LDOX), première enzyme clef de la voie conduisant aux anthocyanes, et produisant les anthocyanidines.

Ces dernières sont des structures polyphénoliques assez instables qui sont immédiatement glycosylées ou réduites.

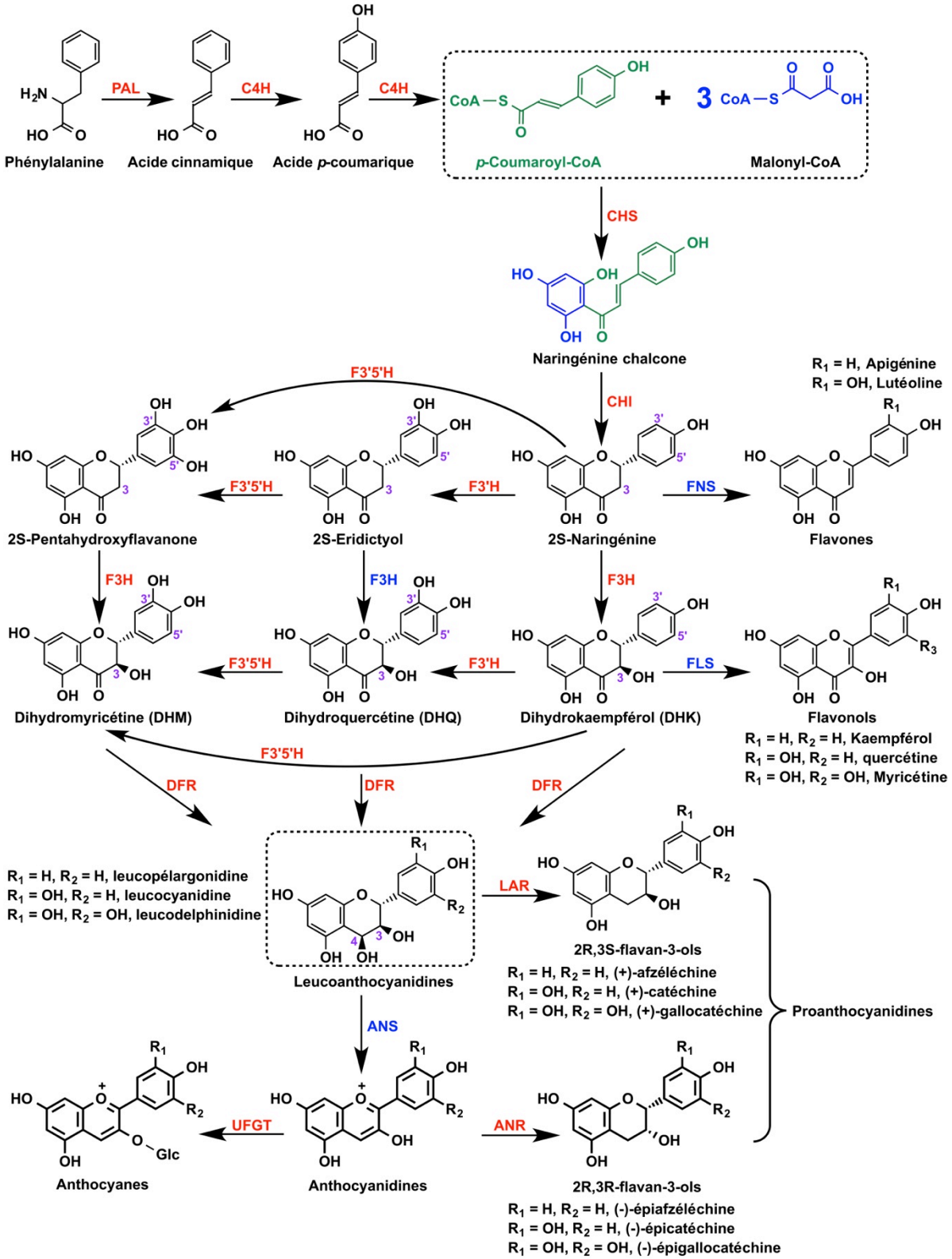


Figure 03. Voie générale de biosynthèse des flavonoïdes.

La glycosylation des anthocyanidines synthétisées par l'ANS est principalement effectuée par l'UDP-glucose: flavonoïde 3-O-glucosyl transférase (UFGT) qui produit des anthocyanes stables, principaux pigments des plantes.

La réduction des anthocyanidines synthétisées par l'ANS est effectuée par l'anthocyanidine réductase (ANR), et l'enzyme d'*Arabidopsis thaliana* produit des 2R,3R-flavan-3-ols, telle que la (-)-épicatéchine, unité d'extension la plus commune des proanthocyanidines.
Les proanthocyanidines sont formées par condensation des flavan-3-ols (synthétisés par la LAR et l'ANR) dans le compartiment vacuolaire (***Petrussa et coll., 2013***), mais leur mécanisme de formation n'est pas démontré.

I.2. Les anthocyanes

Les anthocyanidines sont des dérivés polyhydroxylés et polyméthoxylés de l'ion flavylium ou 2-phényl-benzopyrilium, dont le squelette de base est le noyau flavylium (**figure 04**).
Les plus abondantes sont hydroxylées en C-3,5,7, parmi lesquelles, les six plus fréquentes sont la pélargonidine, la cyanidine, la delphinidine, la malvidine, la péonidine et la pétunidine (**figure 05**), qui diffèrent uniquement par le degré d'hydroxylation et de méthylation du cycle B. Les anthocyanidines libres ne sont pas stables aux pH physiologiques parce qu'elles sont en équilibre entre différents états de protonation dont plusieurs sont assez fortement électrophiles (en particulier la forme cationique flavylium et la forme non chargée). Leurs formes libres sont minoritaires dans la nature.
Comme beaucoup de flavonoïdes, les anthocyanidines sont principalement présentes sous forme d'hétérosides dont elles constituent la portion "aglycone". Ces hétérosides sont ici les anthocyanes, qui sont beaucoup plus stables que les aglycones seuls.

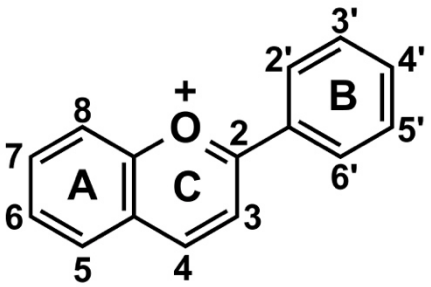


Figure 04. Squelette de base des anthocyanidines (sous la forme flavylium).

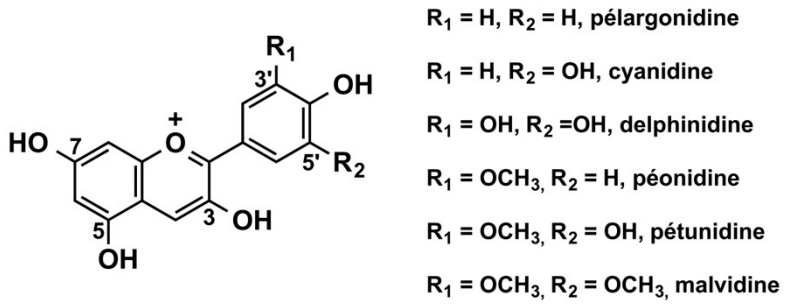


Figure 05. Les six principales anthocyanidines.

Les anthocyanes sont les pigments hydrosolubles les plus importants chez les plantes, et elles sont largement responsables de la couleur de nombreux fruits et légumes, allant du rouge orangé au bleu pourpre. Les anthocyanes sont principalement dérivées des trois anthocyanidines non méthylées les plus fréquentes qui sont la pélargonidine, la cyanidine et la delphinidine, et qui possèdent respectivement un, deux et trois hydroxyles phénoliques sur le cycle B.

Leur glycosylation est effectuée sur le groupement hydroxyle en C_3 par l'anthocyanidine-3-O-glucosyltransférase (3GT), tandis que les groupements hydroxyles phénoliques en $C_{3'}$ et $C_{5'}$ du cycle B peuvent être méthylés par l'anthocyane O-méthyltransférase (AOMT), comme dans la péonidine, la pétunidine et la malvidine (**figure 06**), les anthocyanes les plus communes sont donc les anthocyanidine-3-O-glucosides (***Kong et coll., 2013***).

Enfin, un second sucre est souvent fixé par glycosylation de l'hydroxyle en C_5 à l'aide de l'anthocyanidine 5-O-glucosyltransférase (5GT), ce qui conduit aux anthocyanidine-3,5-O-diglucosides (**figure 07**). Outre le glucose, d'autres sucres comme le rhamnose, le galactose, le xylose et l'arabinose, peuvent aussi être utilisés pour former des anthocyanes (***Francis, 1989***), mais les anthocyanidines glucosides sont plus stables que les autre anthocyanidines glycosides.

La plupart des anthocyanes naturelles sont donc logiquement des 3-O-monoglucosides et des 3,5-O-diglucosides, mais elles peuvent être acylées par l'anthocyane acyltransférase (ACT), pour augmenter d'avantage leur stabilité, leur solubilité et leur capacité d'absorption de la lumière (***Rinaldo et coll., 2015***).

Les anthocyanes synthétisées sont enfin accumulées dans les vacuoles centrales des cellules épidermiques et sous-épidermiques (***Zhang et coll., 2014; Appelhagen et coll., 2011; Abrahams et coll., 2003***), un environnement acide où elles peuvent être stockées sans dégradation importante.

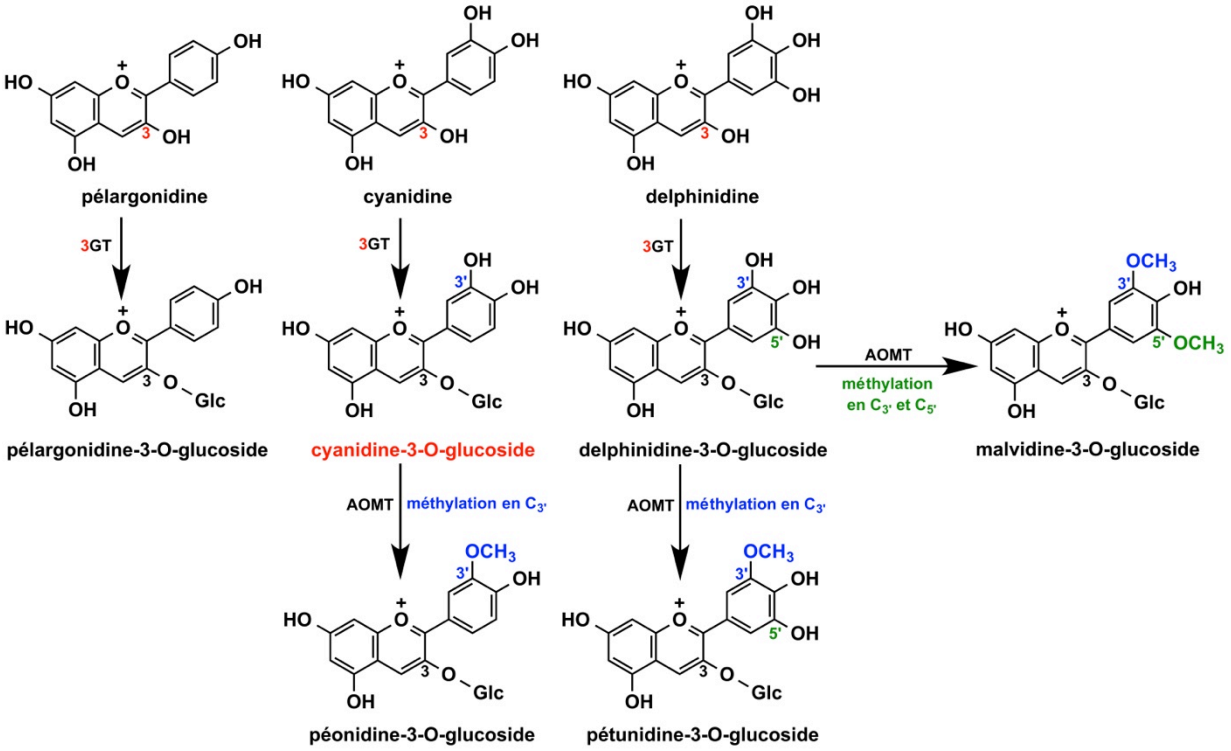


Figure 06. Formation des principales anthocyanes, à partir des six anthocyanidines les plus fréquentes.

3GT: Anthocyanidine-3-O-glucosyltransférase; AOMT: Anthocyane O-méthyltransférase. Seules les formes cationiques (flavylium) sont représentées ici, mais d'autres états de protonation (structures neutres ou anioniques) sont dominants aux pH cytoplasmiques.

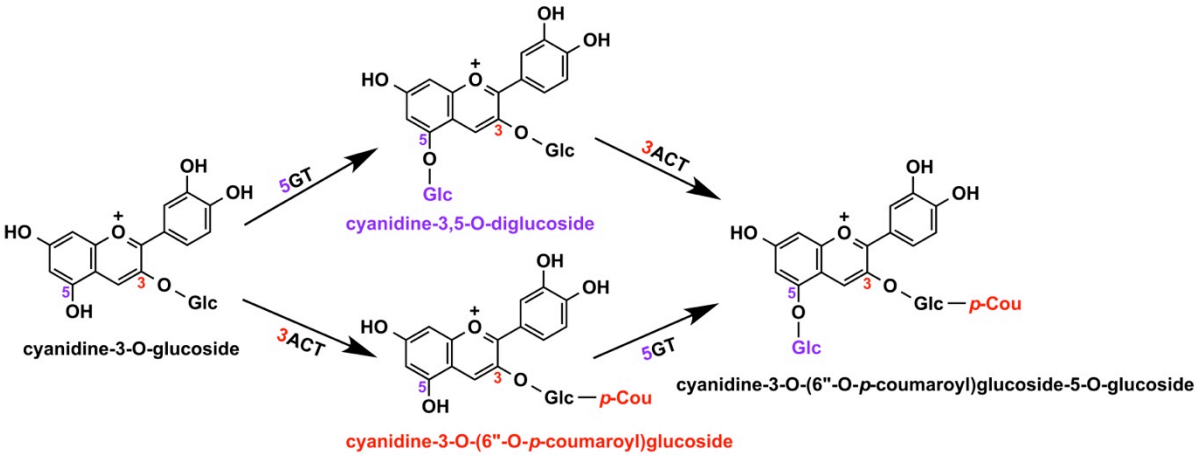


Figure 07. Glycosylation et acylation enzymatiques de la cyanidine-3-O-glucoside.

5GT: Anthocyanidine-5-O-glucosyltransférase; 3ACT: Anthocyane-3-O-glucoside-6″-O-acyltransférase. Seules les formes cationiques (flavylium) sont représentées ici.

La couleur et la structure des anthocyanes en solution aqueuse varient en fonction du pH. En solution aqueuse très acide (pH < 3), le cation flavylium **1** est largement prédominant et contribue à la couleur rouge, et à un pH compris entre 4 et 5, la pseudobase **2** (incolore) apparaît, qui existe

sous la forme chalcone **3** à un pH compris entre 7 et 8. Plusieurs formes coexistent au-dessus de pH 5. Pour un pH compris entre 6 et 7, les bases "quinoniques" **4 et 5** prédominent largement et contribuent à la couleur violette, et elles sont sous la forme anionique **6 et 7** à un pH entre 7-8, avec une couleur tendant vers le bleu (**figure 08**).

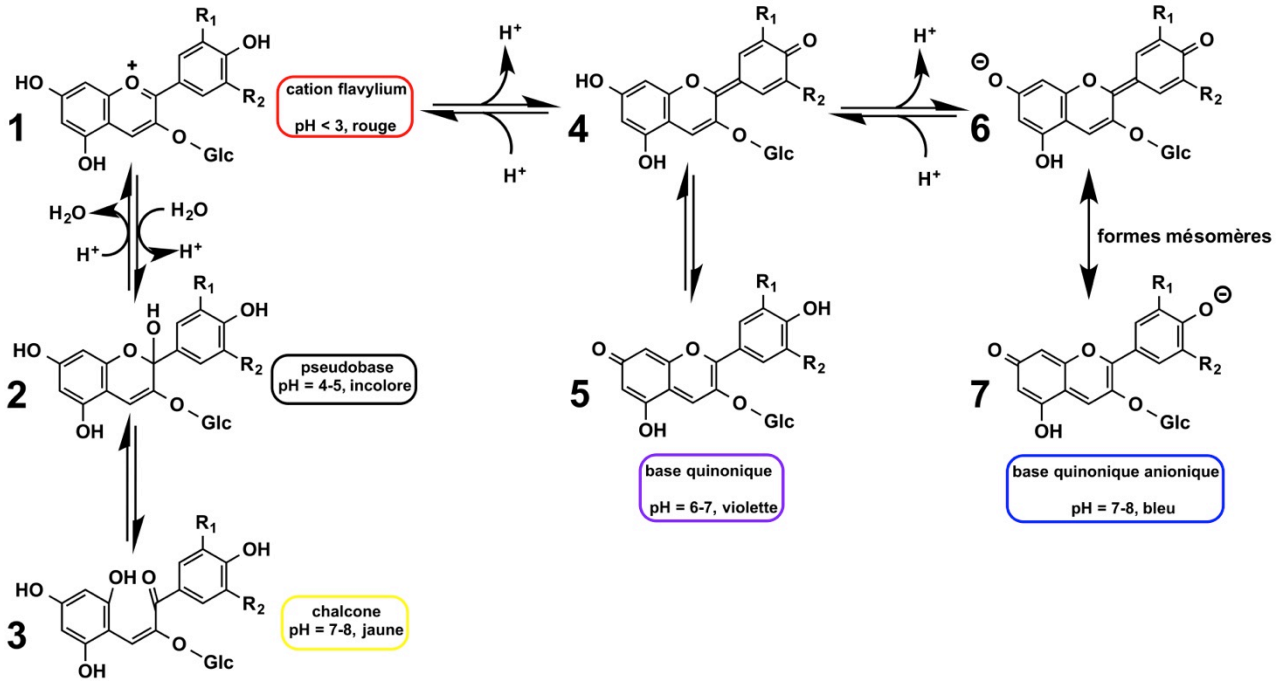


Figure 08. Evolution de la structure des principales anthocyanes en fonction du pH de la solution aqueuse.

La glycosylation a pour conséquence de modifier les propriétés acido-basiques du chromophore initial et d'abaisser sa densité électronique, ce qui modifie fortement la distribution des formes colorées et non colorées en solution aqueuse (***Basilio et coll., 2016***).

Les couleurs observées dans un échantillon biologique riche en anthocyanes sont cependant plus complexes que celles qu'on pourrait attendre d'un mélange des chromophores individuels, car elles sont souvent fortement modifiées par les phénomènes de π-stacking (***Di Meo et coll., 2012***) et plus généralement par la formation de complexes non-covalents (***Trouillas et coll., 2016***).

I.2.1. Localisation subcellulaire de la biosynthèse des anthocyanes

En 1975, ***Fritsch et Grisebach*** (***1975***) trouvent que les enzymes participant à la biosynthèse des anthocyanes de *Haplopappus gracilis Gray* existent principalement dans la vacuole ou sur le tonoplaste, ce qui suggère que les anthocyanes sont peut-être synthétisées dans la vacuole. Peu après, ***Steinitz et Bergfeld*** (***1977***) pensent que la biosynthèse des anthocyanes est associée à la formation de la vacuole centrale, et ils formulent une hypothèse de biosynthèse des anthocyanes dans la vacuole.

L'année d'après, il est démontré que la biosynthèse des anthocyanes ne se fait pas dans la vacuole. ***Hrazdina et coll.*** (***1978***) trouvent en effet que l'anthocyanidine glucosyltransférase du protoplasme de *Tulipa* et *Hippeastrum* est une enzyme cytoplasmique, et ***Blume et coll.*** (***1979***) trouvent que l'anthocyanidine glucosyltransférase du protoplasme de l'orge est aussi une enzyme cytoplasmique. La dernière étape de biosynthèse des anthocyanes étant précisément la glycosylation des anthocyanidines par l'anthocyanidine glucosyltransférase, il est dès lors considéré que la biosynthèse des anthocyanes se déroule en réalité dans le cytoplasme de la cellule végétale. Plus récemment, il a été démontré que l'ANS, enzyme clé de la voie de biosynthèse des anthocyanes, est localisée principalement dans le cytoplasme du raisin (*Cabernet sauvignon*), quels que soient les types de cellules considérés (***Wang et coll., 2011***).

Dès 1974, une hypothèse selon laquelle la majorité des enzymes impliquées dans la voie de biosynthèse des flavonoïdes fonctionnerait comme un complexe multienzymatique avait été proposée par ***Stafford*** (***1974***).

Par la suite, ***Hrazdina et Wagner*** (***1985***) considèrent que la biosynthèse des flavonoïdes est localisée sur le réticulum endoplasmique (RE), où se trouverait le complexe multienzymatique en question, et ils démontrent que la PAL et la flavonoïde glucosyltransférase sont assemblées sur le réticulum endoplasmique lisse, tandis que d'autres enzymes de la voie de biosynthèse y seraient captées (C4H) ou adsorbées en surface. L'hypothèse d'un complexe multienzymatique est ensuite confortée par l'observation d'interactions entre la CHS et la CHI, entre la CHI et la DFR, et enfin entre la CHI et la F3H (***Burbulis et Winkel-Shirley, 1999***).

Il a également été montré que la PAL et la C4H du tabac pouvaient être colocalisées au niveau du réticulum endoplasmique (***Achnine et coll., 2004***).

Toutes ces études montrent que la biosynthèse des anthocyanes est localisée dans le cytoplasme des cellules des végétaux supérieurs, sur la surface externe du RE, et sous contrôle d'un complexe multienzymatique.

I.2.2. Transport des anthocyanes vers la vacuole

Les anthocyanes ont des effets cytotoxiques, ce qui justifie qu'après synthèse et modification (hydroxylation, glycosylation, méthylation et acylation), elles soient immédiatement transportées du cytoplasme à la vacuole, où elles sont stockées et jouent leur rôle (***Hrazdina, 1981; Klein et coll., 1996***). Néanmoins, le mécanisme de transport des anthocyanes entre le cytoplasme et la vacuole reste controversé. Plusieurs hypothèses ont été proposées, qui s'appuient généralement sur l'identification de certaines protéines de transport vacuolaires.

Les plantes - comme d'ailleurs les animaux - peuvent détoxifier des xénobiotiques électrophiles toxiques par conjugaison avec le glutathion (GSH), réaction qui est catalysée par des glutathion S-transférases (GST). Les conjugués formés (GS-X) sont stables et hydrosolubles, et ils sont exportés du milieu intra-cytoplasmique vers la vacuole ou vers le milieu extérieur par des transporteurs transmembranaires ATP-dépendants appelés "pompes à glutathion" (***Zhang et coll., 2006; Li et coll., 1997***). Il semble que ce système de transport serve aussi au transport vacuolaire de produits endogènes tels que les anthocyanes. ***Marrs et coll.*** (***1995***) ont montré que chez le maïs, la *BZ2*, qui est une glutathion S-transférase, reconnaît la cyanidine 3-O-glucoside (C3G). En l'absence de *BZ2*, les anthocyanes sont présentes dans le cytosol où elles sont oxydées en pigment brun, et en présence de *BZ2*, les conjugués GS-C3G sont synthétisés, et les anthocyanes violettes s'accumulent dans la vacuole.

Mueller et coll. (***2000***) ont démontré que chez le Pétunia (*Petunia hybrida*), l'*AN9*, une autre glutathion S-transférase, est nécessaire pour le transport efficace des anthocyanes depuis le cytoplasme vers la vacuole, mais qu'elle ne fonctionnerait qu'en tant que protéine de liaison des flavonoïdes, aucun conjugué anthocyane-GSH n'étant observé *in vitro*. Ils ont donc proposé que l'*AN9* serve de transporteur des flavonoïdes cytoplasmiques. Cette deuxième hypothèse suggère un nouveau type de transport où la GST jouerait seulement le rôle de ligand du flavonoïde, et non de catalyseur. Cette hypothèse a d'ailleurs un précédent dans le monde des cellules animales où les propriétés de ***ligandines*** des GST ont été très tôt identifiées.

La famille MATE (Multidrug And Toxic compound Extrusion, en anglais) est une autre famille de protéines de transport secondaire. Chez les plantes, les transporteurs de type MATE sont localisés au niveau de la vacuole et de la membrane plasmique, et ils sont impliqués dans la détoxification des métabolites secondaires toxiques, incluant les alcaloïdes (***Omote et coll., 2006***). ***Debeaujon et coll.*** (***2001***) ont montré que le gène *Transparent testa 12* (*TT12*), cloné à partir d'un nouveau testa mutant de *Arabidopsis* (*tt12*) qui est dépigmenté, code pour une protéine appartenant à la famille MATE. Leur étude du phénotype de mutant *tt12* et de la nature du gène *TT12* suggère que *TT12* est

nécessaire pour l'accumulation vacuolaire de proanthocyanidines, et aussi d'une petite partie des anthocyanes. Ceci suggère que les protéines de la famille MATE pourraient aussi jouer un rôle de transporteur des anthocyanes.

Zhang et coll. (***2006***) ont étudié la structure et la formation des AVIs (Anthocyanic Vacuolar Inclusions, en anglais) dans les cellules épidermiques des pétales de lisianthus (*Eustoma grandiflorum*). Ils ont montré par microscopie optique et électronique que les AVIs existent sous la forme de vésicules qui se développent parallèlement à l'accumulation des anthocyanes et qui sont contenues dans les compartiments pré-vacuolaires (PVC pour prevacuolar compartments, en anglais) du cytoplasme. Finalement, Les anthocyanes sont transportées dans la vacuole centrale, probablement par fusion des PVC avec cette dernière.

I.2.3. Fonctions écologiques des anthocyanes

Les anthocyanes apparaissent de façon transitoire pendant des étapes spécifiques du développement, et peuvent s'accumuler en réponse à divers facteurs environnementaux, incluant le rayonnement visible et ultraviolet, une chute de température ou un stress hydrique. La production et la localisation des anthocyanes dans la racine, la tige et en particulier la feuille, permettent aux plantes de développer des résistances à un certain nombre de stress environnementaux (***Chalker-Scotte, 1999***).

Il est admis que les anthocyanes constituent un filtre optique dans les tissus végétaux, ce qui leur permet de soutenir la photosynthèse en protégeant le chloroplaste contre de brèves expositions à une lumière intense, et en réduisant la photoinhibition et le photoblanchiment de la chlorophylle sous stress lumineux (***Steyn et coll., 1999; Gould et coll., 2000***).

Les anthocyanes jouent un rôle important dans l'attraction d'espèces animales contribuant à la pollinisation et la dispersion des graines, et ce rôle des anthocyanes dans les interactions plantes-animaux fait sans doute de leur production spécifique l'un des grands facteurs de coévolution (***Kong et coll., 2013***).

Hedin et coll. (***1983***) ont montré que la cyanidine-3-β-glucoside présente dans les feuilles de coton (*Gossypium hisutun L.)* est un facteur important de la résistance à *Heliothis virescens* qui est un insecte ravageur, ce qui suggère fortement que les anthocyanes pourraient participer à la protection des plantes contre les insectes. Par la suite, les anthocyanes isolées à partir de fleurs de pétunia (*Petunia hybrida*) ont été ajoutées au milieu nutritif de *Helicoverpa zea* et *Trichoplusia ni*, pour étudier leur activité insecticide. Ce travail a montré que ces anthocyanes ralentissent le

développement des larves de lépidoptères (***Johnson et coll., 2008***), c'est-à-dire qu'une activité insecticide et/ou répulsive a bien été stimulée.

De plus, le pouvoir antioxydant des anthocyanes dans la photosynthèse lors d'un stress induit par une augmentation de température a été étudié en utilisant trois mutants d'*Arabidopsis* déficients en anthocyanes (*tt3*, *tt4* et *tt3tt4*) et la plante sauvage (***Shao et coll., 2007***). De plus faibles activités superoxyde dismutase (SOD) et ascorbate peroxydase (APX) ont été observées pour les trois mutants sous stress thermique, ainsi qu'une moindre capacité de réduction du radical DPPH et une accumulation de H_2O_2, en particulier pour le mutant *tt3tt4*. Ces effets suggèrent une activité antioxydante des anthocyanes.

Ravindra et Narayan (***2009***) ont ensuite étudié le pouvoir antioxydant des anthocyanes extraites de calus de carotte (*Daucus carota*) et conclu qu'elles constituaient des antioxydants lipidiques plus puissants que l'α-tocophérol.

I.2.4. Fonctions pharmacologiques des anthocyanes

En plus de leurs fonctions écologiques chez les plantes, les anthocyanes possèdent des propriétés pharmacologiques qui font l'objet de nombreuses investigations.

Ces propriétés sont généralement attribuées à des effets pro- ou anti-oxydants, à des effets sur la transduction du signal, ou encore à des modifications épigénétiques (***Chu et coll., 2014***).

Les propriétés antioxydantes des anthocyanes et plus généralement des flavonoïdes peuvent être importantes, mais les propriétés identifiées dépendent à la fois des méthodes d'analyse et des structures considérées (***Goupy et coll., 2009a, 2009b***), et elles ne devraient sans doute pas être décrites comme des propriétés génériques et globalement similaires de l'ensemble d'une famille ou d'une sous-famille de flavonoïdes, lorsqu'il est question du bénéfice d'un apport alimentaire.

Les résultats d'études *in vivo* sur des modèles animaux ont montré que les anthocyanes de nombreux fruits et légumes avaient des activités tumoricides ou cytostatiques permettant de ralentir le développement de divers cancers (***Li et coll., 2017***), incluant le cancer du tractus gastro-intestinal (***Kocic et coll., 2011***), le cancer colorectal (***Hagiwara et coll., 2001***), le cancer de la peau (***Afaq et coll., 2005***), et le cancer du poumon (***Ding et coll., 2006; Chen et coll., 2005***).

Récemment, les propriétés de la cyanidine-3-O-β-glucopyranoside (C3GP), une anthocyane assez abondante dans l'alimentation, ont été étudiées *in vitro* en utilisant des lignées de cellules du cancer de la prostate, et il a été montré que le niveau d'expression d'un suppresseur de tumeur (P75NGFR) était augmenté lors du traitement de ces cellules par C3GP (***Sorrenti et coll., 2015***).

Les anthocyanes ont aussi des propriétés pharmacologiques potentiellement intéressantes dans de nombreux autres domaines physiopathologiques comme les maladies cardiovasculaires ou inflammatoires, et les infections d'origine bactérienne, virale ou fongique.

La cyanidine 3-O-glucoside (C3G), qui est l'anthocyane la plus largement distribuée dans les fruits très pigmentés, possède des propriétés anti-inflammatoires et anti-thrombotiques, joue un rôle protecteur contre l'infection par *Helicobacter pylori*, et ralentirait le développement de maladies cardiovasculaires liées à l'âge, le diabète de type 2, ou encore le "syndrome métabolique" (***Olivas-Aguirre et coll., 2016***).

Les recherches portant sur les propriétés pharmacologiques des anthocyanes ont explosé ces dernières années, et nous n'avons pas l'ambition d'en faire ici une analyse critique.

On peut cependant souligner que le développement actuel des recherches portant sur les anthocyanes et plus généralement sur les flavonoïdes, est largement dû à l'impact espéré dans le domaine de la santé humaine, tant sur le plan des bonnes pratiques alimentaires et de la nutrition préventive, que sur celui des applications pharmaceutiques.

II. Les oxygénases à fer et 2-oxoglutarate

Les oxygénases à fer non héminique qui utilisent le 2-oxoglutarate comme cosubstrat constituent une famille de plus d'une soixantaine d'enzymes chez les animaux et de plus d'une centaine chez les plantes (***Hewitson et coll., 2005***).

Elles sont impliquées dans un grand nombre de réactions d'oxydation, en particulier des réactions d'hydroxylation, chlorination, désaturation, cyclisation, expansion ou contraction de cycle, déméthylation, époxydation ou endoperoxydation. Certaines hydroxylations se font de manière post-traductionnelle sur des protéines, comme le procollagène, les protéines ribosomiales ou encore certains facteurs de transcription.

Elles jouent un rôle important dans le métabolisme lipidique (***Strijbis et coll., 2010; Li et coll., 2016***), la biosynthèse d'antibiotiques, la biosynthèse de phytohormones comme l'éthylène et les gibbérellines, la réparation de l'ADN et de l'ARN.

Elles sont également impliquées dans la réponse à l'hypoxie via l'hydroxylation du facteur de transcription HIF (*Hypoxia Inducible Factor*) qui permet une adaptation physiologique.

Elles jouent donc non seulement un rôle dans l'activation catalytique de l'oxygène à des fins biosynthétiques, mais également dans l'adaptation du métabolisme cellulaire aux concentrations locales d'oxygène.

Les réactions d'hydroxylation ne sont pas les seules à être catalysées par les oxygénases à 2-oxoglutarate, mais elles sont de loin les plus nombreuses.

Comme le montre la **figure 09**, la réaction générique d'hydroxylation par une oxygénase à 2-oxoglutarate est systématiquement associée à la décarboxylation oxydative de l'oxoglutarate en succinate et CO_2.

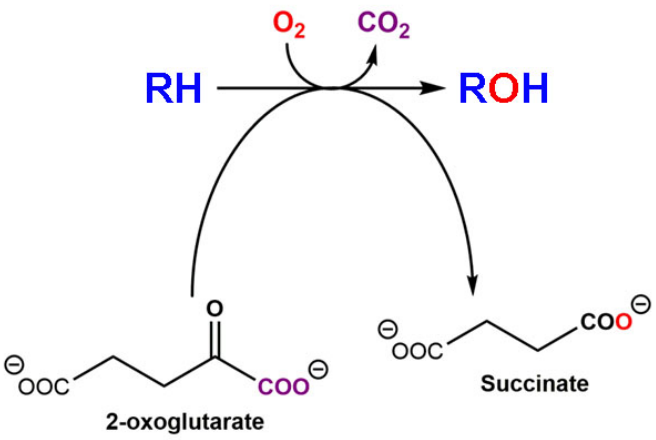


Figure 09. Réaction d'hydroxylation par une oxygénase à 2-oxoglutarate.

Chaque turnover enzymatique est associé à la production d'une molécule de succinate par décarboxylation oxydative de l'α-cétoglutarate. L'un des deux atomes d'oxygène du cosubstrat O_2 se retrouve sur le succinate, et l'autre sur le produit hydroxylé.

A quelques exceptions près, les études de cinétique des oxygénases catalysant l'hydroxylation de petites molécules suggèrent que le 2-oxoglutarate se lie en premier, suivi par le substrat et enfin par le dioxygène O_2.

Le fait que la liaison du dioxygène se fasse après celles du 2-oxoglutarate (ou α-cétoglutarate) et du substrat proprement dit permet vraisemblablement de minimiser les réactions d'inactivation de l'enzyme par des intermédiaires hyper-réactifs qui en dérivent.

Le 2-oxoglutarate est le cosubstrat α-cétoacide exclusivement utilisé par ces oxygénases, mais des expériences de mutagenèse ont permis de modifier ces enzymes de telle manière qu'on puisse le remplacer par d'autres α-cétoacides (***Lee et coll., 2001***), si bien qu'on peut supposer que le choix du 2-oxoglutarate s'est imposé au cours de l'évolution en raison de sa concentration intracellulaire relativement élevée, typiquement de l'ordre du millimolaire (***Huergo et Dixon, 2015***).

Ce sont surtout les études spectroscopiques (***Tarhonskaya et coll., 2014; Martinez et Hausinger, 2015; Proshlyakov et coll., 2017***) et les études cristallographiques qui ont permis d'aboutir à un certain consensus concernant les mécanismes catalytiques des oxygénases à 2-oxoglutarate.

Ces études ont montré qu'en l'absence de substrat, le Fe(II) du site actif au repos adopte une structure stable hexa-coordinée de type octaédrique, alors qu'en présence du substrat, il adopte une structure penta-coordinée à laquelle se lie le dioxygène. Dès que cette liaison est formée, un intermédiaire ferryl (Fe^{IV}=O) est produit grâce à la décarboxylation oxydative du 2-oxoglutarate en CO_2 et succinate.

Le cycle catalytique qui est schématisé sur la **figure 010** met en évidence les principales étapes qui sont généralement proposées aujourd'hui.

La manière dont chaque enzyme exploite et contrôle la réactivité de l'intermédiaire de type ferryl reste aujourd'hui un sujet de réflexion prioritaire, d'autant plus qu'elle pourrait déboucher sur la conception de catalyseurs biomimétiques non protéiques offrant des perspectives fort intéressantes en synthèse organique (***Olivo et coll., 2017***).

Contrairement aux oxygénases à fer héminique telles que les oxygénases à cytochrome P450, il est admis que le fer n'est pas très fortement lié au site actif des oxygénases à fer et 2-oxoglutarate, les constantes de dissociation évoquées se situant dans une fourchette comprise entre 1 et 100 µM.

C'est probablement la raison pour laquelle l'activité catalytique des oxygénase à fer et 2-oxoglutarate est généralement étudiée en présence d'un sel de Fe(II) en concentration relativement élevée, typiquement entre 50 et 100 µM.

Il faut cependant reconnaitre que les constantes de dissociation précitées n'ont souvent pas été mesurées en présence de 2-oxoglutarate.

Si l'affinité de ces enzymes pour le fer est assez faible, une compétition entre le fer et d'autres métaux pourrait être imaginée, et il a par exemple été proposé que l'induction d'une réponse adaptatrice à l'hypoxie par le cobalt puisse être due à la substitution du fer par le cobalt au site actif des HIF hydroxylases (***Yuan et coll., 2003***). Nous n'avons cependant pas connaissance d'une démonstration de ce type de substitution dans des conditions biologiques.

La régénération du Fe(II) à l'issue d'un cycle catalytique est impérative.

Compte tenu de l'oxydation facile du Fe(II) en Fe(III) en présence de dioxygène, les oxygénases à 2-oxoglutarate doivent être conçues pour assurer le maintien du fer à l'état ferreux dans l'enzyme au repos, ce qui est *a priori* en accord avec la difficulté de liaison du dioxygène au Fe(II) du site actif en l'absence de substrat.

Le maintien du Fe(II) est sans doute plus contraignant dans un environnement très oxydant comme le peroxysome qui contient de fortes concentrations de peroxyde d'hydrogène H_2O_2 et certaines oxygénases à 2-oxoglutarate, par exemple la phytanoylCoA hydroxylase (***Schofield et coll., 2007***).

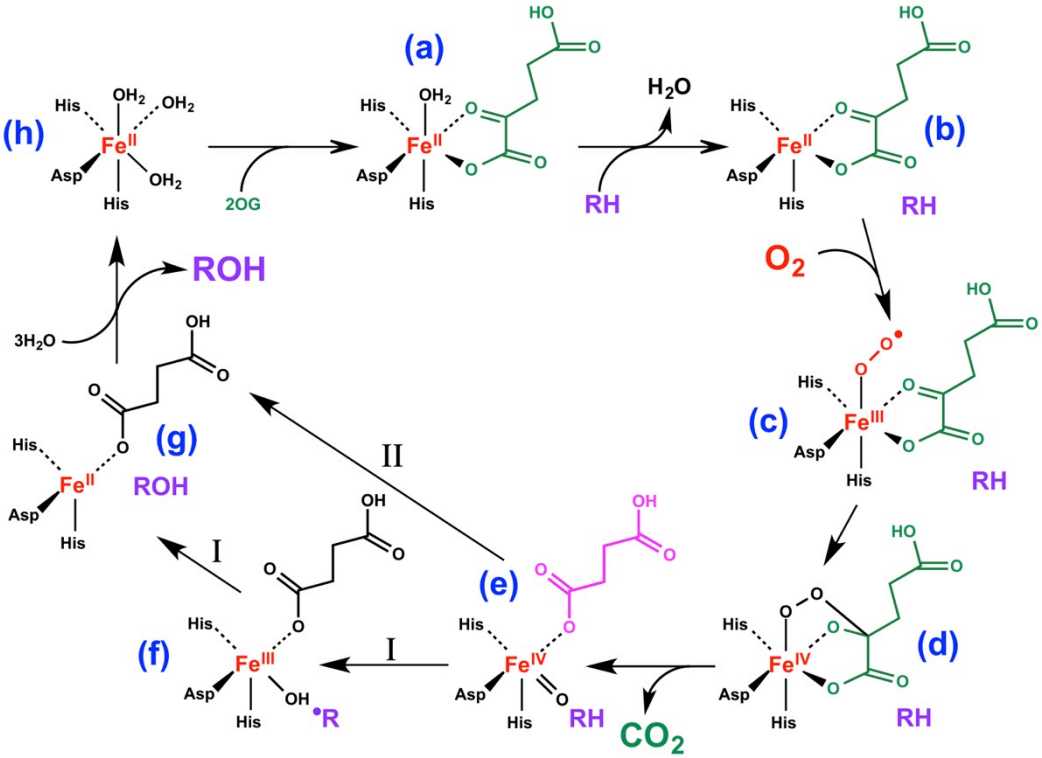


Figure 010. Réaction générique d'hydroxylation par une oxygénase à 2-oxoglutarate.

D'après ***Martinez et Hausinger*** (***2015***). La liaison du substrat RH au complexe enzyme-Fe(II)-oxoglutarate (a) induit le passage transitoire d'une structure hexacoordinée (octaédrique) à une structure pentacoordinée (b) capable de lier le dioxygène; le ligand oxoglutarate de la structure Fe(III) ainsi produite (c) se décarboxyle via un intermédiaire Fe(IV) endoperoxyde (d) pour donner le complexe ferryl enzyme-[Fe(IV)=O]-succinate (e); ce dernier effectue l'hydroxylation du substrat RH en ROH via un intermédiaire enzyme-Fe(III)-OH et un radical $R^{\bullet}$ (f); la libération du succinate à partir de (g) libère en principe une structure hexacoordinée (h) contenant trois ligands H_2O, et deux d'entre eux sont immédiatement déplacés par l'oxoglutarate qui sert de ligand bidentate.

In vitro, en solution aérobie mais en l'absence de substrat, certaines oxygénases à 2-oxoglutarate convertissent en fait le 2-oxoglutarate en CO_2 et succinate à une vitesse qui peut atteindre 1 à 5% de la vitesse de conversion observée en présence de substrat.

La plupart de ces oxygénases requièrent la présence d'ascorbate pour fonctionner de manière optimale, et leur activité est parfois nulle ou négligeable en son absence.

Ces réactions d'oxydation "découplée" (c'est-à-dire découplées de l'oxydation du substrat) peuvent également être observées en présence du substrat sur des mutants enzymatiques.

Dans le cas de la prolyl-4-hydroxylase, la réaction d'oxydation découplée a pu être suivie en l'absence de substrat et d'ascorbate par spectroscopie de RPE (résonance paramagnétique électronique), ce qui a permis de constater que tout le fer lié à l'enzyme avait été oxydé en Fe(III) en

60 à 90 secondes (***De Jong et coll., 1982; De Jong et Kemp, 1984***), l'enzyme étant parallèlement inactivée.

L'oxydation du Fe(II) en Fe(III) n'est pas visualisable en présence d'ascorbate. Il est donc généralement admis que le rôle de l'ascorbate est de maintenir l'enzyme active en réduisant le Fe(III) produit au cours de chaque turnover d'oxydation découplée.

D'une manière générale, on peut supposer que pour les oxygénases à 2-oxoglutarate qui requièrent la présence d'ascorbate, le déshydroascorbate qui est produit en quantités sous-stœchiométriques lors des réactions correspondantes provient de la dismutation du radical semi-déshydroascorbate obtenu par oxydation monoélectronique lors de la réduction du Fe(III) en Fer(II), mais ceci n'a pas été démontré.

Dans les cellules végétales, la concentration d'ascorbate est typiquement comprise entre 2 et 20 mM, alors que dans les cellules de mammifères, elle est typiquement comprise entre 0,5 et 10 mM.

L'ascorbate est une vitamine chez l'homme, et une carence en vitamine C entraine le scorbut qui résulte au moins en partie d'une chute majeure de l'activité de la prolyl-4-hydroxylase, enzyme qui hydroxyle le (pro)collagène et joue ainsi un rôle majeur dans la régénération des tissus conjonctifs.

II.1. Les oxygénases apparentées utilisant le 2-oxoglutarate

Quelques exemples de réactions catalysées par les oxygénases à 2-oxoglutarate sont donnés sur les **figures 011A et 011B**.

Comme on peut le voir sur la **figure 011A**, il n'est pas rare qu'une oxygénase à 2-oxoglutarate catalyse plusieurs étapes distinctes dans une séquence biosynthétique.

Par exemple, la clavaminate synthase (CAS) catalyse trois étapes distinctes de la séquence de biosynthèse de l'acide clavulanique (inhibiteur des β-lactamases): une hydroxylation, puis une cyclisation qui est séparée de l'étape précédente par l'intervention d'une autre enzyme (hydrolase), et enfin une désaturation.

La désacétyl-céphalosporine C synthase (DACS) catalyse quant à elle une expansion de cycle, puis une hydroxylation. Chez les bactéries, ces deux étapes sont catalysées par deux enzymes distinctes.

Enfin, la carbapenem synthase (CarC) catalyse une épimérisation puis une hydroxylation.

Quelques autres réactions catalysées par des oxygénases à 2-oxoglutarate sont représentées sur la **figure 011B**. La taurine dioxygénase catalyse une réaction d'hydroxylation en α du groupement sulfonate.

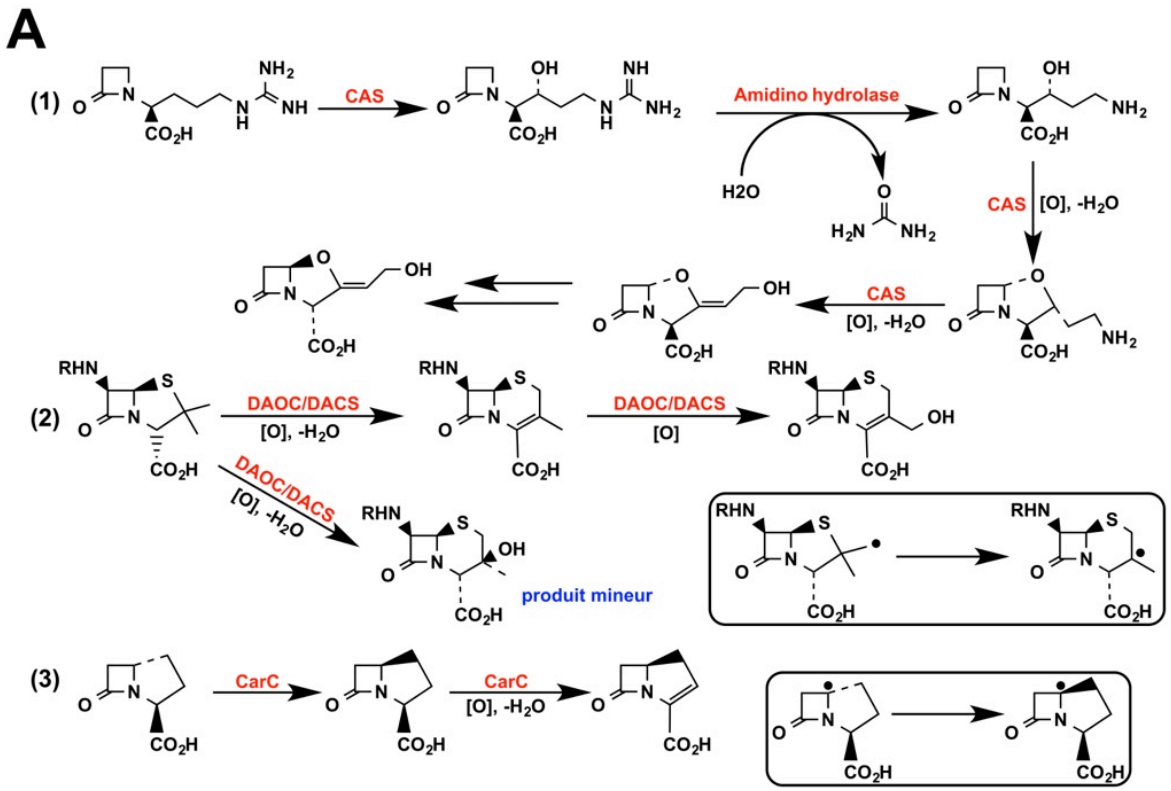


Figure 011A. Quelques réactions de biosynthèse d'antibiotiques catalysées par les oxygénases à 2-oxoglutarate.

D'après ***Hewitson et coll.*** (***2005***). CAS = Clavaminate synthase; DACS = Désacétyl-céphalosporine C synthase (ou Désacétoxycéphalosporine synthase DAOC); CarC = Carabapenem synthase.

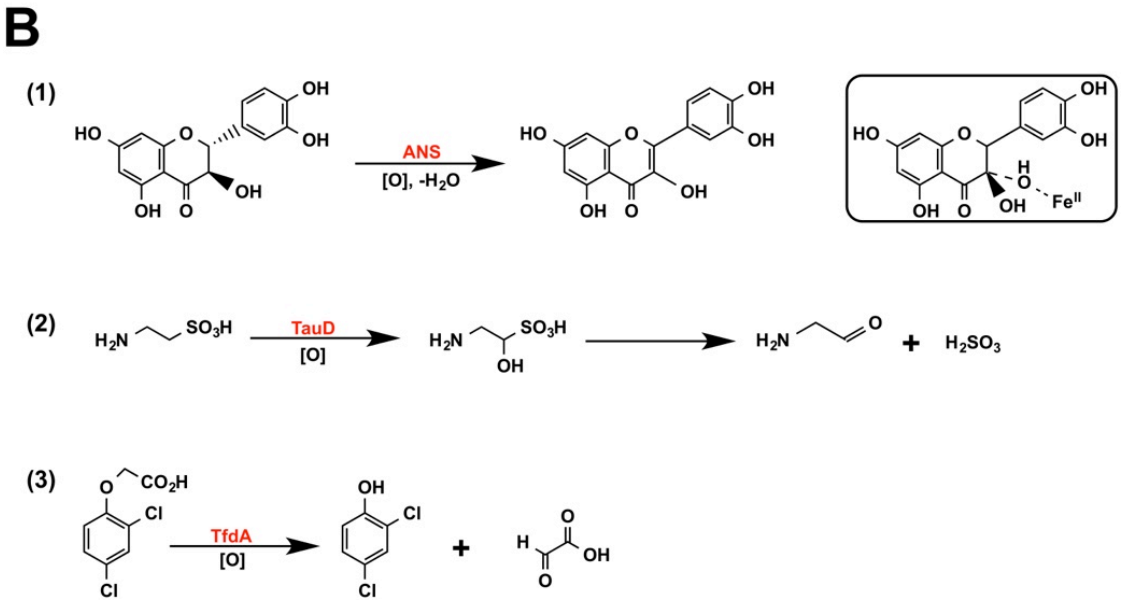


Figure 011B. Quelques autres réactions catalysées par les oxygénases à 2-oxoglutarate.

D'après ***Hewitson et coll.*** (***2005***) et ***Hausinger*** (***2015***). (1) Biosynthèse de la quercétine à partir de la DHQ par l'anthocyanidine synthase (ANS), qui comme son nom l'indique, synthétise aussi les anthocyanidines, mais selon un ou plusieurs mécanismes qui restent à clarifier; (2) Taurine dioxygénase; (3) 2,4-dichlorophenoxyacétate dioxygénase.

II.2. Les oxygénases apparentées n'utilisant pas le 2-oxoglutarate

Il existe quelques oxygénases à fer non héminique qui font partie de la même famille structurale que les oxygénases à 2-oxoglutarate, alors qu'elles n'utilisent pas le 2-oxoglutarate comme cosubstrat.

Dans les réactions correspondantes, le substrat joue lui-même au cours d'une première oxydation biélectronique un rôle équivalent à celui du 2-oxoglutarate, de telle manière qu'un intermédiaire ferryl (Fe^{IV}=O) soit produit au site actif et puisse effectuer une seconde oxydation biélectronique conduisant au produit final.

C'est par exemple le cas de l'isopénicilline synthase (IPNS), de la cystéine dioxygénase et de la 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxydase (ACCO) qui catalysent les réactions qui sont schématisées sur la **figure 012**.

L'IPNS, enzyme clé de la biosynthèse des pénicillines et des céphalosporines (***Schofield et coll., 1997; Hamed et coll., 2013***), effectue une oxydation à 4 électrons de son substrat tripeptidique par O_2.

Le mécanisme catalytique (***Roach et coll., 1997; Schofield et coll., 1997; Burzlaff et coll., 1999***) implique la ligation initiale du soufre du résidu cystéine du substrat tripeptidique au Fe(II) du site actif, puis le dioxygène se lie et un intermédiaire monocyclique se forme ainsi que l'espèce ferryl (Fe^{IV}=O).

Dans la suite de la séquence mécanistique, l'intermédiaire ferryl permet la fermeture oxydative du cycle thiazolidine des pénicillines.

L'isopénicilline N ainsi produite peut être transformée par certains microorganismes en pénicillines, parmi lesquelles la pénicilline N peut être convertie en céphalosporines, en particulier grâce à une expansion de cycle et une hydroxylation qui sont catalysées par des oxygénases à 2-oxoglutarate.

L'ACCO catalyse quant à elle l'oxydation biélectronique du 1-amino-1-cyclopropane-carboxylate (ACC) en éthylène, étape terminale de la biosynthèse de cette phytohormone. Son mécanisme est d'une grande complexité (***Prescott et Lloyd, 2000; Costas et coll., 2004; Brisson, 2010***).

Elle requiert la présence de bicarbonate comme activateur essentiel, ce dernier agissant à la fois en augmentant la constante catalytique k_{cat} et en empêchant l'inactivation oxydative de l'enzyme.

L'ACCO a également la particularité d'utiliser l'ascorbate comme cosubstrat/coenzyme réducteur, c'est-à-dire que l'ascorbate est consommé de manière stœchiométrique.

Là encore, le mécanisme implique la formation d'un intermédiaire ferryl (Fe^{IV}=O), mais l'étape de production d'éthylène libère un complexe de Fe(III) qui est finalement réduit en Fe(II) par l'ascorbate (***Rocklin et coll., 2004***).

Le substrat (ACC) sert de ligand du Fe(II) du site actif (***Rocklin et coll., 1999; Zhou et coll., 2002***) et permet la liaison du dioxygène en modifiant la structure hexa-coordinée du fer en structure penta-coordinée. Des études de modélisation structurale de l'enzyme (***Brisson et coll., 2012***) montrent cependant que l'ion bicarbonate HCO_3^- qui est un cofacteur de l'enzyme est probablement impliqué lui aussi dans la liaison du Fe(II).

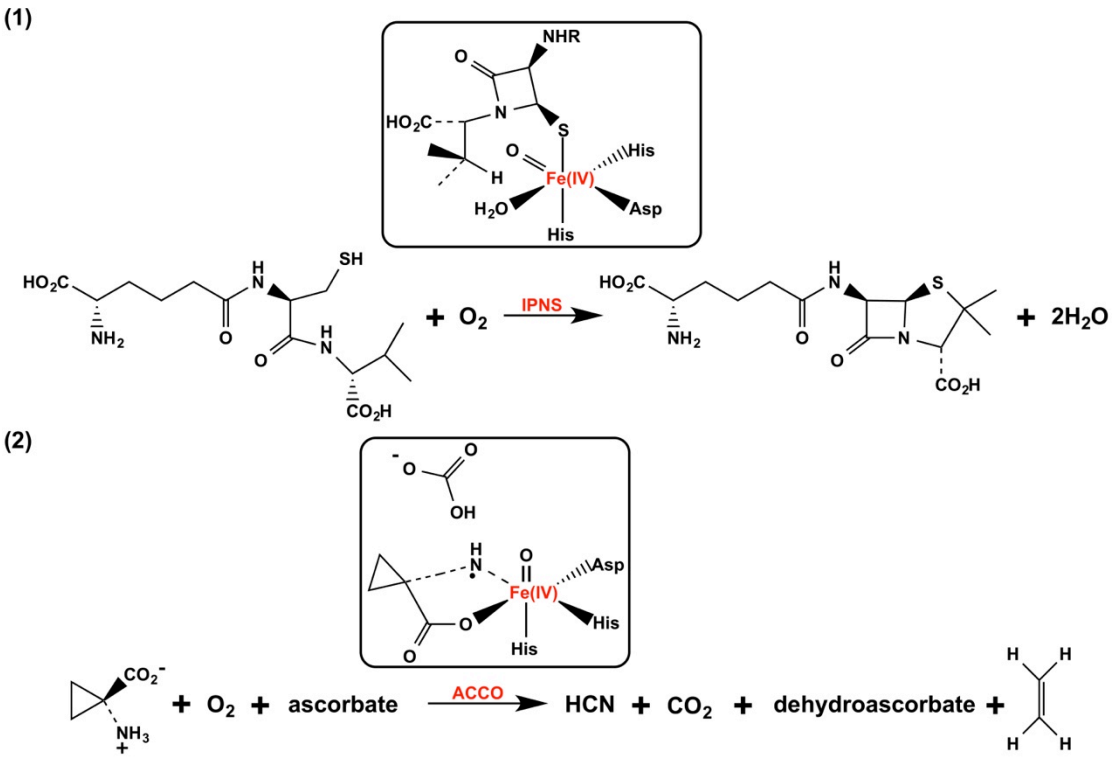


Figure 012. Deux réactions d'oxygénases apparentées n'utilisant pas le 2-oxoglutarate comme cosubstrat.

1) IPNS = Isopenicillin N Synthase; (2) ACCO = Acide 1-aminocyclopropane-1-carboxylique oxydase.

II.3. Rôle des oxygénases à 2-oxoglutarate dans la réponse à l'hypoxie

Chez l'animal, une hypoxie modérée induit la transcription de plusieurs dizaines de gènes, parmi lesquels on peut citer le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) et l'érythropoïétine. Cette réponse adaptatrice est sous contrôle d'un facteur de transcription appelé HIF (Hypoxia Inducible Factor) qui est un hétérodimère αβ. La concentration de HIFα augmente avec l'hypoxie, ce qui entraine sa dimérisation avec HIFβ et déclenche l'activation transcriptionnelle.

L'activité de HIF est régulée par des oxygénases à Fe(II) et 2-oxoglutarate via l'hydroxylation de résidus spécifiques (***Hewitson et coll., 2003; Smirnova et coll., 2012; Pugh et Ratcliffe, 2017***).

Deux types d'hydroxylation enzymatique oxygène-dépendante de la sous-unité HIFα inhibent la réponse transcriptionnelle. La première est la trans-4-hydroxylation de deux résidus proline qui sont conservés, ce qui permet l'association de HIFα à une protéine partenaire, puis son ubiquitinylation induisant sa dégradation par le protéasome (***Bruick et McKnight, 2001***).

La seconde est l'hydroxylation d'un résidu asparagine de la partie C-terminale du domaine de transactivation de HIFα, qui empêche son association avec le coactivateur p300 (***Hewitson et coll., 2002; Lando et coll., 2002***).

Les trois hydroxylations correspondantes sont effectuées par des oxygénases à Fe(II) et 2-oxoglutarate.

II.4. Structure 3D des oxygénases à fer et 2-oxoglutarate

II.4.1. Généralités

Les oxygénases à fer et oxoglutarate appartiennent d'un point de vue structural à la famille des cupines qui se caractérisent par un motif DSBH (pour Double Strand β Helix ou β-jellyroll) qui est un repliement caractéristique de 8 brins β répartis en deux feuillets de quatre brins β qui se font face et constituent une structure en tonneau (***Roach et coll., 1995***).

Cette structure caractéristique est retrouvée dans un certain nombre de protéines qui ont souvent très peu d'homologie de séquence.

Dans l'anthocyanidine synthase, deux brins β supplémentaires permettent d'allonger la structure en tonneau du noyau DSBH.

Le fer du site actif est situé au cœur du noyau DSBH où il est systématiquement lié aux azotes imidazoliques de deux histidines et à l'oxygène d'un carboxylate (en général Asp), ces trois résidus constituant ce qu'on appelle la **triade faciale**, que l'on retrouve dans la plupart des oxygénases à Fe(II) non héminique. Cette triade faciale est associée à tous les intermédiaires catalytiques du Fer, comme le suggérait la **figure 010**.

La liaison bidentate du 2-oxoglutarate se fait par le biais d'un atome d'oxygène du groupement carboxylate et de l'atome d'oxygène du groupement cétonique en α. Elle induit des transferts de charge issus du Fe(II) qui sont matérialisables par une très faible absorption aux alentours de 500 à 530 nm. Cette liaison peut se faire de diverses manières dans la mesure où la triade faciale laisse trois positions vacantes pour compléter la sphère de coordination du Fe(II). En fait, la cétone en C_2

est toujours retrouvée en position trans vis-à-vis de l'aspartate de la triade faciale, alors que carboxylate ligand (en C_1) peut être en position trans vis-à-vis de l'histidine proximale ou bien vis-à-vis de l'histidine distale.

Deux des molécules d'eau qui se lient au Fe(II) sur les trois positions vacantes en l'absence d'oxoglutarate seront ensuite déplacées par ce dernier et une troisième par O_2.

Il est admis que le remplacement de deux molécules d'eau par un ligand anionique comme le 2-oxoglutarate fait chuter le potentiel de réduction du Fe(II) dont l'affinité pour l'oxygène O_2 (parallèlement à sa capacité à l'activer) augmente.

La partie opposée du 2-oxoglutarate porte aussi un groupement carboxylate qui fait l'objet d'une forte interaction électrostatique avec une chaîne latérale cationique de l'enzyme telle qu'une Lys ou Arg. Ce carboxylate distal sert donc de structure d'ancrage et permet de fixer le fer de manière optimale au sein du complexe enzyme-(Fe).

II.4.2. Prédiction de la structure 3D de l'anthocyanidine synthase de Vitis vinifera

Avant le démarrage de ce travail de thèse, une prédiction de structure 3D de la *Vv*ANS avait été réalisée, de manière à vérifier que les informations obtenues avec l'enzyme d'*Arabidopsis thaliana* (principalement dans l'équipe du Pr. Christopher Schofield), pourraient fournir un point d'appui solide concernant les caractéristiques majeures du site actif de la *Vv*ANS.

Cette technique de modélisation par homologie consiste à aligner une séquence de structure 3D inconnue (ici la *Vv*ANS) et des séquences homologues de structures 3D partiellement ou totalement connues pour ensuite prédire par le calcul la structure de la première avec une marge d'erreur qui peut être précisée. Les algorithmes utilisés repèrent les séquences protéiques d'une base de données qui ont le plus d'homologie avec celle de la protéine d'intérêt, puis identifient à partir de ces alignements multiples les motifs secondaires qui permettent de proposer une première structure probable du squelette polypeptidique. La structure 3D est ensuite optimisée de manière itérative au fur et à mesure que les chaînes latérales d'aminoacides sont insérées sur la chaine polypeptidique.

Deux serveurs en libre accès, RaptorX (***Kallberg et coll., 2012***) et Phyre2 (***Kelley et coll., 2015***), ont été utilisés, de manière à vérifier la concordance des résultats obtenus.

Comme le montre la **figure 013**, les deux structures 3D ainsi obtenues pour la *Vv*ANS sont presque identiques, et la superposition s'avère être optimale avec la structure 3D de l'*At*ANS.

Avec les deux outils, la modélisation s'est faite sur la structure 3D publiée de l'ANS d'*Arabidopsis thalaiana* (PDB: 1gp4A) pointée comme la structure homologue optimale.

On reconnait les dix brins β du noyau DSBH étendu que nous avons évoqué plus haut.

Avec RaptorX, 326 résidus, soit 90% de la séquence, ont été modélisés, tandis qu'avec Phyre2, 335 résidus, soit 93% de la séquence, ont été modélisés.

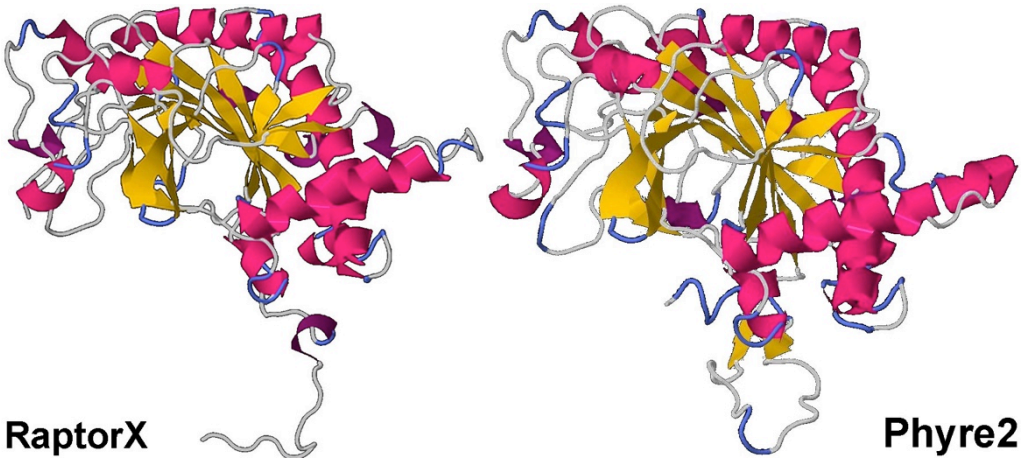


Figure 013. Structures 3D de la *Vv*ANS prédites par RaptorX et par Phyre2.

Les structures sont reproduites à partir des fichiers 3D construits au format pdb. Les hélices α sont en rouge et les feuillets β en jaune. On voit clairement le motif DSBH étendu constitué de dix brins β adoptant une structure en tonneau, à l'intérieur duquel se fixe normalement le fer du site actif.

II.4.3. Propriétés documentées de l'anthocyanidine synthase (ANS)

L'anthocyanidine synthase (ANS; EC 1.14.11.19), également appelée leucoanthocyanidine dioxygénase (LDOX), est une oxygénase à fer et 2-oxoglutarate qui catalyse l'avant-dernière étape de la biosynthèse des anthocyanes.

Il avait été généralement admis (***Cheng et coll., 2014***) qu'elle transformait principalement les leucoanthocyanidines en anthocyanidines, bien qu'il n'ait pas été démontré que les leucoanthocyanidines soient des précurseurs obligatoires des anthocyanidines.

Le premier gène d'ANS a été isolé à partir du maïs (***Menssen et coll., 1990***) mais la première étude enzymatique a été en réalité effectuée presqu'une décennie plus tard grâce à l'expression de l'ANS de *Perilla Frutescens* (***Saito et coll., 1999***), puis des études réalisées *in vitro* sur quelques autres espèces végétales ont confirmé qu'il s'agissait d'une enzyme requérant du 2-oxoglutarate, de l'oxygène, de l'ascorbate et du fer pour fonctionner, et appartenant par conséquent apparemment à la famille des oxygénases à Fe(II) et 2-oxoglutarate.

Ces premières expériences ont conduit à la conclusion que la transformation enzymatique de l'isomère naturel "cis" de leucocyanidine impliquait l'hydroxylation transitoire et stéréospécifique du carbone C_3 du substrat (voir encart de la **figure 011B**), mais il est plus tard apparu (***Turnbull et coll., 2003***) que la cyanidine était en réalité un produit enzymatique mineur, la dihydroquercétine (cis et trans) et la quercétine étant des produits beaucoup plus abondants.

La structure 3D de l'ANS d'*Arabidopsis thaliana* cristallisée (***Turnbull et coll., 2001; Wellford et coll., 2001***) est la première qui ait été obtenue parmi les oxygénases à fer et oxoglutarate des végétaux. Cette structure a dévoilé un site actif contenant le fer lié à une molécule de 2-oxoglutarate et deux molécules de l'analogue de substrat utilisé, la dihydroquercétine. Le 2-oxoglutarate étant assez profondément enfoui dans la structure, il a été proposé que la liaison des substrats à l'enzyme chargée en fer se faisait vraisemblablement dans l'ordre oxoglutarate puis polyphénol puis O_2.

Par la suite, il a été montré sur un complexe ANS-(±naringénine) que l'enzyme effectuait une hydroxylation stéréospécifique en C_3 expliquant la production spécifique de la forme cis du dihydrokaempférol, mais la synthèse ultérieure des deux stéréoisomères en C_2 de la naringénine (***Welford et coll., 2005a***) a montré que l'équilibre entre produit d'hydroxylation en C_3 et produit insaturé en C_2-C_3 était fortement modifié par la stéréochimie en C_2 (initiale).

Des études de marquage isotopiques par $^{18}O_2$ (***Turnbull et coll, 2004***) ont également permis de démontrer que l'échange de ^{18}O avec H_2O ne pouvait avoir lieu qu'après une oxydation du cycle C, vraisemblablement sous la forme d'un intermédiaire du type cétone en C_3/3,3-gem diol.

Des techniques similaires ont aussi permis de démontrer qu'un seul des deux atomes du dioxygène O_2 consommé était incorporé dans le succinate produit (***Welford et al., 2005b***).

Des calculs théoriques (***Nakajima et coll., 2006***) ont montré que les carbones C_3 et C_4 de la leucocyanidine pouvaient tous deux être oxydés par l'enzyme, avec toutefois une préférence pour le C_4. L'oxydation en C_3 exigerait une séquence complexe impliquant 4 étapes, (1) l'interaction d'un intermédiaire Fe(III)-OH avec un radical centré sur le C_3 issu de l'abstraction d'hydrogène $H^{\bullet}$ par une espèce ferryl Fe(IV)=O, (2) la formation d'une cétone en C_3, (3) l'addition de OH^- sur le carbone C_3 cétonique, et (4) l'addition de H^+ conduisant au flavan-3,3,4-triol attendu ici.

MATERIELS ET METHODES

I. Expression et purification de la *Vv*ANS

I.1. Expression de la *Vv*ANS chez *E.coli*

Les bactéries recombinantes (*E.coli* BL21 DE3-pHGGWA-*Vv*ANS) sont mises en culture dans 30 ml de milieu 2XYT contenant 100 µg/ml d'ampicilline, puis incubées à 37°C pendant 18 heures sous agitation (200 rpm). La pré-culture sert ensuite à inoculer 2 L de milieu 2XYL en présence de 100 µg/ml d'ampicilline. Les conditions de culture sont maintenues à 37°C sous agitation jusqu'à l'obtention d'une densité optique à 600 nm de 1,0. La culture est alors refroidie 10 minutes dans la glace et l'expression de la protéine recombinante est induite par l'ajout de 1 mM d'IPTG de manière stérile suivie d'une incubation pendant 16 heures à 30°C, sous agitation (200 rpm).

I.2. Préparation du lysat bactérien

La culture bactérienne (2 L) est centrifugée à 5,000 rpm pendant 30 minutes à 4°C et le culot contenant les bactéries est récolté. Le protocole préconisé par Macherey-Nagel est ensuite suivi. Le culot est remis en suspension dans un tampon (2 ml/g de culot) NaH_2PO_4 50 mM, 300 mM NaCl pH 8,0 additionné de 1 mg/ml de lysozyme de blanc d'œufs de poule (Fluka). Le mélange est agité dans la glace pendant 30 minutes. La lyse bactérienne est achevée par sonication (Branson digital sonifier 250): impulsions d'ultrasons de 15 secondes, à 25% d'amplitude, les pauses entre les impulsions étant de 30 secondes. Le temps total des impulsions peut varier de 5 à 8 minutes en fonction du volume de lyse.

Le lysat brut est obtenu par deux centrifugations à 8,600 × g pendant 60 minutes à 4°C, et le lysat clair est enfin obtenu en filtrant le surnageant cytoplasmique contenant la protéine de fusion His_6-GST-*Vv*ANS par filtres à seringue de 0,45 µm (Whatman™, GE healthcare) permettant de bien séparer la fraction membranaire (culot) de la fraction cytoplasmique.

I.3. Purification de la protéine recombinante

La purification de la protéine de fusion His_6-GST-*Vv*ANS est basée sur l'affinité des ions imidazolium des étiquettes hexahistidines pour les ions nickel (Ni^{2+}). Pour cela on utilise la technique IMAC (Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography) sur une matrice de silice macroporeuse couplée au Tris (carboxyméthyl) éthylènediamine qui est pré-chargée en nickel.

I.3.1. Première chromatographie IMAC

La première purification IMAC a pour but de séparer la protéine de fusion His_6-GST-*Vv*ANS des autres protéines présentes dans le lysat bactérien. Une colonne (Protino® columns 14 ml) remplie de la résine Protino® Ni-TED (Macherey-Nagel) est équilibrée avec 4 volumes de tampon LEW (Lysis-Equilibration-Wash): 50 mM NaH_2PO_4, 300 mM NaCl, pH 8,0. La totalité du lysat clair est chargée sur la colonne qui est ensuite lavée avec 4 volumes de tampon LEW, afin d'éliminer toutes les protéines ne possédant pas d'affinité particulière pour le nickel. Enfin, la protéine de fusion His_6-GST-*Vv*ANS accrochée sur la colonne est éluée par 3 volumes de tampon d'élution contenant une forte concentration d'imidazole: 50 mM NaH_2PO_4, 300 mM NaCl, 250 mM imidazole, pH 8,0. L'éluat récupéré est immédiatement concentré à 4°C par ultrafiltration sur un filtre Amicon® Ultra-15 ml avec une membrane ayant un poids moléculaire seuil de 30,000 Da (Millipore). Le tampon de l'éluat concentré est ensuite échangé par gel filtration sur une colonne de dessalage PD-10 (GE Healthcare) en suivant le protocole préconisé par le fournisseur. La colonne PD-10 est équilibrée avec 25 ml de tampon PBS 1x (pH 7,3), et la protéine de fusion est ensuite éluée avec ce même tampon, puis collectée et conservée à 4°C jusqu'à l'étape suivante de clivage de l'étiquette His_6-GST par la protéase thrombine.
La protéine recombinante est quantifiée par la méthode de Bradford.

I.3.2. Digestion protéolytique par la thrombine

La digestion par la thrombine permet le clivage entre la *Vv*ANS et ses étiquettes (His_6-GST). Elle est effectuée à 22°C pendant 16 heures dans le tampon PBS 1x (pH 7,3), sous agitation (160 rpm). 7,5 unités de thrombine (GE healthcare) sont utilisées pour 1 mg de protéines de fusion purifiées. La concentration de la protéine de fusion purifiée est diluée à 2 mg/ml avec tampon PBS 1x (pH 7,3) avant l'addition de thrombine.

I.3.3. Deuxième chromatographie IMAC

Cette deuxième étape IMAC a pour but de séparer la *Vv*ANS digérée et la protéase thrombine de l'étiquette His_6-GST. Une nouvelle colonne Nickel est préparée pour éviter l'éventuelle contamination croisée. La deuxième colonne diffère de la précédente par la quantité en résine. Les tampons sont les mêmes que ceux utilisés dans la première purification IMAC. 1,5 volumes de tampon PBS 1x (pH 7,3) sont passés sur la colonne équilibrée avec 4 volumes du tampon LEW 1x pour éviter la contamination du tampon PBS par le tampon LEW 1x. La colonne est ensuite chargée

avec la totalité du produit de digestion, lavée avec 1 volume de tampon PBS 1x puis 4 volumes de tampon LEW 1x, et enfin 3 volumes de tampon d'élution permettent le décrochage de l'étiquette His_6-GST.

La fraction contenant la *Vv*ANS et la thrombine est récupérée lors du chargement de l'échantillon et du lavage de la colonne avec le tampon PBS 1x, puis conservée à 4°C jusqu'à l'étape suivante d'élimination de la thrombine.

La fraction contenant l'étiquette His_6-GST est récupérée lors du passage du tampon d'élution, puis est concentrée immédiatement par ultrafiltration sur un filtre Vivaspin™ 20 avec deux membranes verticales ayant un poids moléculaire seuil de 10,000 Da (Sartorius). L'échange de tampon de l'échantillon concentré est réalisé par gel filtration sur une colonne de dessalage PD-10 (GE Healthcare). La colonne PD-10 est équilibrée avec 25 ml du tampon d'élution (20 mM MES, 50 mM NaCl, pH 6,5) et l'étiquette His_6-GST est éluée avec ce même tampon. On ajoute finalement 20% Glycérol (v/v) à la solution d''étiquette His_6-GST récupérée après PD-10, puis elle est stockée à 4°C.

La quantification de l'étiquette His_6-GST est faite par la méthode de Bradford.

I.3.4. Elimination de la thrombine

La thrombine possède une affinité spécifique pour la p-Aminobenzamidine. La résine p-aminobenzamidine-agarose est donc utilisée pour éliminer la thrombine présente dans l'échantillon de *Vv*ANS après la deuxième purification IMAC. L'élimination de la thrombine est réalisée par addition de 200 µl de suspension de p-Aminobenzamidine-agarose (Sigma Aldrich) pour 50 unités de thrombine présente dans l'échantillon. La fixation de la thrombine sur la résine est réalisée à 22°C (ou à température ambiante) pendant 30 minutes, sous agitation douce. L'élimination de la résine sur laquelle est fixée la thrombine est réalisée par filtration sur une colonne vide avec un filtre pré-inséré (Protino® columns 14 ml). Le filtrat contenant la *Vv*ANS est collecté.

Cette solution de *Vv*ANS est concentrée immédiatement par ultrafiltration sur un filtre Vivaspin™ 20 (10,000 Da, Sartorius). Une colonne de dessalage PD-10 est ensuite utilisée pour échanger le tampon de l'échantillon concentré contre un tampon MES 20 mM, 500 mM NaCl, pH 6,5.

La concentration de protéine obtenue après PD-10 est quantifiée par la méthode de Bradford. Après addition de 10% glycérol (v/v), cette solution mère de *Vv*ANS est pour partie stockée à 4°C, et pour partie stockée en plusieurs aliquotes congelées à -20°C.

I.4. Vérification de la pureté de la protéine

L'électrophorèse monodimensionnelle est réalisée en conditions dénaturantes en présence du Sodium Dodécyl-Sulfate sur gel de polyacrylamide (de type SDS-PAGE). Les échantillons à analyser sont dilués par 2 fois avec un tampon de charge composé de 65,8 mM Tris-HCl pH 6,8, 26,3% Glycérol (v/v), 2,1% (m/v) SDS, 0,01% (m/v) bleu de bromophénol (2x Laemmli sample buffer, Bio-Rad) et de 5% (v/v) β-mercaptoéthanol (Sigma). Ces mélanges sont incubés à 90°C pendant 5 minutes pour dénaturer et réduire les protéines.

Les standards de poids moléculaire (Precision Plus Protein™ All Blue Standards, Bio-Rad) et les échantillons de protéines dénaturantes et réduites sont ensuite déposés sur un gel vertical de 10% de polyacrylamide composé d'un gel de concentration [10% (m/v) acrylamide/bis-acrylamide (37,5/1), 0,375 M Tris-HCl pH 6,8, 0,1% (m/v) SDS, 0,1% (m/v) persulfate d'ammonium, 0,1% (m/v) TEMED] et d'un gel de séparation [10% (m/v) acrylamide/bis-acrylamide (37,5/1), 0,125 M Tris-HCl pH 8,8, 0,1% (m/v) SDS, 0,1% (m/v) persulfate d'ammonium, 0,1% (m/v) TEMED].

Le tampon de migration (TGS, Bio-Rad) est composé de 25 mM Tris, 192 mM Glycine, et 0,1% (m/v) SDS, pH 8,3. La migration des protéines est effectuée avec un courant électrique de 35 mA pendant 40 minutes.

La révélation des protéines est effectuée par la coloration des gels au bleu de Coomassie. Les gels sont incubés à température ambiante durant 1 heure dans 50 ml de solution de coloration (Bio-Safe™ Coomassie (G-250) Stain, Bio-Rad), sous agitation douce. La décoloration des gels est enfin réalisée à température ambiante dans H_2O pendant 30 minutes, sous agitation douce.

I.5. Vérification de l'intégrité de la protéine produite

La vérification de la séquence protéique obtenue est effectuée à l'aide d'un spectromètre de masse (Q-Tof Premier, Waters) équipé d'une source d'ionisation du type électro-nébuliseur et d'un analyseur à temps de vol opérant en mode positif. La température de la source est maintenue à 100°C. La tension capillaire est fixée à 3 kV. L'azote est employé comme gaz de nébulisation et désolvatation à une température de 100°C et à un débit de 100 litres/h. La gamme des *m/z* mesurés est de 300 à 1800 Da.

500 µl de stock de la protéine purifiée à une concentration de 0,985 mg/ml (dans le tampon MES 20 mM, 500 mM NaCl, et 10% glycérol, pH 6,5) sont concentrés à 100 µl à 4°C par ultrafiltration sur un filtre Amicon® Ultra-0,5 ml (10,000 Da, Millipore). L'échantillon de protéine concentrée est injecté immédiatement dans une cassette de dialyse Slide-A-Lyzer™ de 0,5 ml avec deux membranes ayant un poids moléculaire seuil de 7,000 Da (ThermoFisher), puis est dialysé à 4°C

pendant 40 minutes contre 1 litre de tampon acétate d'ammonium 20 mM, pH 6,5. L'échantillon de protéine récupéré après dialyse est injecté immédiatement dans la source du spectromètre de masse à un débit de 5 µl/min (à 24°C).

II. Production de leucocyanidine substrat de la *Vv*ANS

La leucocyanidine n'est pas commercialement disponible. Or, une quantité suffisante de leucocyanidine pure et stable est indispensable pour étudier sa transformation par la *Vv*ANS. Nous avons essayé de la produire de deux manières différentes: synthèse enzymatique et synthèse chimique.

II.1. Synthèse enzymatique de la (+)-2,3-trans-3,4-cis-leucocyanidine

Nous avons d'abord essayé de produire la (+)-2,3-trans-3,4-cis-leucocyanidine par réduction de la (+)-dihydroquercétine (DHQ) par la dihydroflavonol réductase de *Vitis vinifera* (*VvDFR*).
Cette *Vv*DFR recombinante a été produite selon le protocole de ***Pierre Petit (2007)***, et son activité a été vérifiée en utilisant la (+)-DHQ commercialisée par Sigma (85% pure) comme substrat.
Pour ce faire, la réaction est réalisée dans un tampon Bis-Tris 50 mM, 50 mM Tricine, 50 mM NaCl, pH 6,5, en présence de 200 µM NADPH, 60 nM *Vv*DFR et 30 µM (+)-DHQ. Le milieu réactionnel (1,0 ml au total) contenant NADPH et *Vv*DFR est pré-incubé à 30°C pendant 3 min, puis la réaction est déclenchée par l'addition de 30 µM de (+)-DHQ. Après 5 min d'incubation à 30°C, 100 µl de milieu réactionnel sont injectés sous un débit de 1ml/min sur colonne Atlantis C18, 5 µm, 4,6 × 250 mm (Waters) thermostatée à 30°C. Le gradient d'élution appliqué est présenté dans le **tableau 1** ci-dessous. Enfin, l'absorbance de (+)-DHQ résiduelle à 280 nm (détecteur UV-Visible Waters™ 486) est utilisée pour estimer l'activité de la *Vv*DFR. La dégradation non enzymatique de (+)-DHQ observée dans le même milieu (sans *Vv*DFR) sert de témoin négatif.
Après vérification de l'activité de la *Vv*DFR, la 3,4-cis-leucocyanidine est produite à plus grande échelle, dans 15 ml de milieu réactionnel contenant 200 µM NADPH, 100 nM *Vv*DFR dans un tampon Bis-Tris 50 mM, 50 mM Tricine, 50 mM NaCl, pH 6,5. La réaction est déclenchée par l'addition de 30 µM (+)-DHQ à 30°C. Après cinq minutes de réaction, les polyphénols sont extraits dans l'acétate d'éthyle selon le protocole défini par ***Maugé*** (***2010***). L'échantillon sec obtenu après évaporation est remis en solution dans 1 ml de méthanol pur, la production est vérifiée par HPLC sur colonne Nova-Pak C18, 4 µm, 3,9 mm × 150 mm (Waters) sous un débit de 1ml/min, et la 3,4-cis-leucocyanidine est détectée à 280 nm (aire sous la courbe comprise entre 2% et 10% acide

acétique, cf. **tableau 1** comme préconisé par ***Tanner et Kristiansen*** (***1993***). La (+)-2,3-trans-3,4-cis-leucocyanidine ainsi obtenue est stockée à -20°C dans le méthanol pur.

Tableau 1. **Variations de la composition de l'éluant en fonction du temps sur colonne Atlantis C18 et colonne Nova-Pak C18.**

Atlantis C18	H_2O + 0,1% TFA	MetOH + 0,1% TFA	**Nova-Pak C18**	Acide acétique 2%	Acide acétique 10%
t = 0 min	80%	20%	t = 0 min	100%	0
t = 25 min	10%	90%	t = 15 min	0	100%
t = 30 min	10%	90%	t = 25 min	0	100%

II.2. Synthèse chimique de la (+)-2,3-trans-3,4-cis-leucocyanidine

Compte tenu des faibles rendements de production enzymatique de la 2,3-trans-3,4-cis-leucocyanidine nous avons décidé de la produire en exploitant la réduction purement chimique de (+)-dihydroquercétine (DHQ) par le borohydrure de sodium ($NaBH_4$, Sigma).

II.2.1. Production et extraction de la (+)-2,3-trans-3,4-trans-leucocyanidine

La production et l'extraction de la 2,3-trans-3,4-trans-leucocyanidine sont faites en s'inspirant du protocole décrit par ***Stafford et coll.*** (***1985***), avec quelques modifications. Ainsi, la réduction de 10 mg de (+)-DHQ (ChemFaces, Chine) dissous dans 1 ml d'éthanol absolu est déclenchée par addition de 5 mg de $NaBH_4$ en une seule fois. L'incubation est conduite à température ambiante pendant 2 heures, sous agitation. Après incubation, 10 ml d'eau pure sont immédiatement ajoutés à l'éthanol contenant leucocyanidine, (+)-DHQ et $NaBH_4$. Le $NaBH_4$ résiduel dans le mélange est ensuite éliminé par acidification avec une solution aqueuse d'acide acétique à 20%. La 2,3-trans-3,4-trans leucocyanidine est extraite par 3 portions de 5 ml d'acétate d'éthyle. Après centrifugation à 8,600 × g pendant 5 min à 4°C, la phase organique est récupérée (près de 15 ml). L'extrait d'acétate d'éthyle brut est lavé avec 0,4 ml de tampon phosphate de sodium (0,5 M, pH 8,0) par 3 fois. Après centrifugation à 8,600 × g pendant 5 min à 4°C, l'extrait d'acétate d'éthyle lavé est récupéré puis stocké à 4°C. Les extraits d'acétate d'éthyle ainsi obtenus à partir de 9 échantillons identiques sont mélangés, et le mélange (environ 120 ml) est ensuite évaporé par évaporateur rotatif (Vv micro, Heidolph) dans un bain-marie à 15°C jusqu'à 30 ml. Après addition de 37,5 ml de tampon phosphate de sodium (0,01 M, pH 6,8), la totalité de l'acétate d'éthyle résiduel est évaporée, et le tampon contenant principalement de la 2,3-trans-3,4-trans-leucocyanidine est immédiatement congelé dans l'azote liquide, puis lyophilisé (Corrosion resistant freeze dryer, FTS Systems Inc).

II.2.2. Purification de la (+)-2,3-trans-3,4-trans-leucocyanidine

La 2,3-trans-3,4-trans-leucocyanidine produite est purifiée par HPLC en suivant une élution isocratique décrite par ***Kristiansen*** (***1986***).

Après lyophilisation, un mélange de méthanol/H_2O à 50/50 (v/v) (7,0 ml au total) est utilisé pour dissoudre le lyophilisat, et cette solution est immédiatement stockée à -20°C. La purification est effectuée à température ambiante sur colonne µBondapak phényle, 10 µm, 3,9 mm × 300 mm (Waters) qui permet de n'utiliser que l'eau comme éluant. La 2,3-trans-3,4-trans-leucocyanidine est détectée à 280 nm et finalement éluée avec H_2O sous un débit de 2 ml/min. Le pic de 2,3-trans-3,4-trans-leucocyanidine est collecté dans H_2O puis stocké à -20°C. L'ensemble de la production ainsi obtenue est lyophilisé.

II.2.3. Production et purification de la 2,3-trans-3,4-cis-leucocyanidine

La 2,3-trans-3,4-cis-leucocyanidine est finalement produite par épimérisation de la 2,3-trans-3,4-trans-leucocyanidine dans H_2O en présence de 0,1% (v/v) d'acide acétique en s'inspirant du protocole décrit par ***Kristiansen*** (***1986***). Après lyophilisation, la poudre de 2,3-trans-3,4-trans-leucocyanidine est redissoute dans 2,0 ml de méthanol pur, et cette solution est immédiatement ajoutée dans 50 ml d'eau contenant 0,1% (v/v) d'acide acétique préalablement incubés à 40°C pendant 30 minutes (pH égal à 3,2 à 40°C). Une réaction d'épimérisation acide est ainsi déclenchée, et elle est maintenue pendant 80 minutes, à 40°C et sous agitation (100 rpm). L'épimérisation est suivie par HPLC en monitorant la diminution de 2,3-trans-3,4-trans-leucocyanidine et l'augmentation de 2,3-trans-3,4-cis-leucocyanidine simultanément à 280 nm. 100 µl d'échantillon sont prélevées respectivement à 0, 40 et 80 min, et ils sont immédiatement injectés à température ambiante sur colonne µBondapak C18, 10 µm, 3,9 mm × 300 mm (Waters) sous un débit de 2 ml/min en utilisant le gradient d'élution linéaire (**tableau 2**) décrit par ***Kristiansen*** (***1986***). Après 80 min de réaction, la totalité de la solution contenant un mélange des deux isomères de leucocyanidine est congelée dans l'azote liquide pour terminer l'épimérisation, puis lyophilisée.

Après lyophilisation, le lyophilisat est remis en solution dans 50% méthanol/H_2O (v/v), et la solution est stockée à -20°C. La séparation de la 2,3-trans-3,4-trans-leucocyanidine et de la 2,3-trans-3,4-cis-leucocyanidine est effectuée à température ambiante par HPLC sur colonne µBondapak phényle (Matériels et Méthodes, II.2.2). Les pics d'isomères 3,4-cis et 3,4-trans sont collectés puis stockés à -20°C jusqu'à la fin de la purification, pour être finalement lyophilisés. Les lyophilisats sont pesés, puis conservés à -80°C.

Tableau 2. Variations de la composition de l'éluant en fonction du temps sur colonne µBondapak C18.

	2% acide acétique	10% acide acétique
t = 0 min	100%	0
t = 30 min	0	100%

III. Identification, quantification et caractérisation du substrat de la *Vv*ANS

III.1. Identification de la leucocyanidine produite par RMN

L'identification des deux isomères de leucocyanidine produits est faite par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN). 1,3 mg de poudre de la 2,3-trans-3,4-trans-leucocyanidine et de la 2,3-trans-3,4-cis-leucocyanidine stockées à -80°C sont respectivement remises en solution dans 0,5 ml d'acétone deutérée. On rajoute ensuite à chaque échantillon 1,1 µl de TSP (acide triméthylsilylpropanoïque) à 45 mM dans D_2O. La concentration finale du TSP dans l'échantillon est égale à 100 µM, et il sert de référence interne pour l'étalonnage du déplacement chimique qui sera observé en RMN. L'échantillon est ensuite transféré dans un tube RMN de 5 mm de diamètre, puis incubé à 25°C pendant 10 minutes dans le spectromètre de RMN avant toute mesure. La mesure est effectuée à 400 MHz (à 25°C) en utilisant un spectromètre de RMN (Bruker AVANCE III NANOBAY) équipé d'une sonde de mesure de 5 mm (BBFO SmartProbe) avec gradients de champs Z. Les spectres de 2D [^{1}H, ^{1}H]-TOCSY et de 2D [^{1}H, ^{13}C]-HSQC sont utilisés pour confirmer l'attribution des pics sur le spectre de RMN 1D ^{1}H.

III.2. Quantification de la (+)-2,3-trans-3,4-cis-leucocyanidine produite

La 2,3-trans-3,4-cis-leucocyanidine produite est quantifiée à l'aide d'un dosage enzymatique exploitant la réaction catalysée par la *Vv*LAR, dans laquelle cet isomère 3,4-cis est réduit en catéchine par un équivalent de NADPH:

$$\text{Leucocyanidine} + \text{NADPH} \longrightarrow \text{Catéchine} + \text{NADP}^+$$

Le protocole est celui qui a été décrit par ***Maugé (2010***). Une cuve spectrophotométrique de 1 cm de trajet optique en Quartez Suprasil (Hellma®QS) est utilisée sous agitation magnétique. La consommation enzymatique de NADPH est suivie par mesure d'absorbance à 340 nm en mode cinétique sur un spectrophotomètre SAFAS D.E.S (SAFAS Monaco) pendant 30 minutes à 30°C, sous agitation (600 rpm). L'échantillon initialement introduit dans la cuve spectrophotométrique est composé de 1 ml de milieu réactionnel contenant 150 µM NADPH et 10 µl de la solution mère de

(+)-2,3-trans-3,4-cis-leucocyanidine dans un tampon HEPES 50 mM, pH 7,5. Il est pré-incubé à 30°C sous agitation pendant 5 minutes, et la réaction de réduction enzymatique est ensuite déclenchée par l'addition de 100 nM de la LAR (1,45 µl de stock de la LAR à 3,124 mg/ml) après une minute de suivi initial à 340 nm. La vitesse de dégradation non-enzymatique du NADPH dans le milieu réactionnel est obtenue en remplaçant l'échantillon de solution mère de LAR par un volume identique du tampon dans lequel se trouve l'enzyme. La réduction enzymatique du NADPH est complète en moins de 30 min (vitesse de consommation totale égale à la vitesse non-enzymatique), si bien que la concentration de NADPH consommé est estimée grâce aux absorbances observées à t_0 et à t_{30min} en utilisant un coefficient d'extinction de 6220 $M^{-1}.cm^{-1}$ et l'équation ci-dessous:

$$(NADPH)_{consommé} = [(Abs_{t_0}-Abs_{t30min})_{enzyme} - (Abs_{t_0}-Abs_{t30min})_{blanc}]/6220\ M^{-1}.cm^{-1}$$

La concentration de la (+)-2,3-trans-3,4-cis-leucocyanidine produite est enfin obtenue à l'aide de la relation: $(leucocyanidine)_{initiale} = (NADPH)_{consommé} \times (Volume_{final}/Volume_{initial})$.

III.3. Caractérisations des deux stéréoisomères de leucocyanidine par MS et MS/MS

Chacun des deux stéréoisomères de leucocyanidine a été analysé par spectrométrie de masse (MS) et spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) sur le spectromètre de masse précédemment décrit (Matériels et Méthodes, I.5). La température de la source est maintenue à 100°C. La tension capillaire est fixée à 3 kV. L'azote est employé comme gaz de nébulisation et désolvatation à une température de 100°C et à un débit de 100 l/h. La gamme des *m/z* mesurés est de 100 à 1000 Da. L'analyse MS/MS est effectuée avec l'argon comme gaz de collision en utilisant une énergie de collision variant de 3 à 10 eV, et la gamme des *m/z* mesurées est de 100 à 500 Da.

IV. Etude enzymatique de la *Vv*ANS

IV.1. Méthodes d'apport du fer au site actif de l'enzyme

IV.1.1. Préparation d'un milieu réactionnel contenant un sel de Fe(II) en excès

Le site actif d'une oxygénase à Fer/Oxoglutarate ne peut être fonctionnel que si un atome de Fe(II) y est intégré comme ligand stœchiométrique. Si l'enzyme qui est introduite dans le milieu réactionnel n'est pas un complexe enzyme-fer préformé, il faut donc l'incuber dans le milieu réactionnel en présence d'une source de Fe(II) et non seulement en présence de ses substrats (oxoglutarate, polyphénol, O_2) et de son cofacteur (ascorbate).

Ce cas de figure reste aujourd'hui le plus classique, et il s'applique aux premières expériences que nous avons réalisées avec l'ANS de *Vitis vinifera*.

Dans ce cas, le milieu réactionnel (volume final 20 ml) est composé de 2,35 mM d'ascorbate ((+)-sodium L-ascorbate, Sigma), 1,18 mM d'α-cétoglutarate (2OG) (α-ketoglutaric acid, Sigma), 0,012 mM (ou 12 µM) de sel de sulfate ferreux (Iron (II) sulfate heptahydrate, Sigma) et 0,12 mg/ml de catalase (catalase from bovine liver, Sigma) dans un tampon MES 20 mM, pH 6,5. Après ajustement du pH à 6,3 (à 35°C) par une solution d'hydroxyde d'ammonium diluée, le milieu réactionnel est filtré sur un filtre à seringue de 0,45 µm, puis stocké à 4°C. Il faut noter que ce milieu réactionnel est préparé extemporanément, c'est-à-dire juste avant les expériences réalisées dans une même journée. De plus, quelle que soit la dilution du milieu réactionnel due à l'addition de solution mère de *Vv*ANS, de substrat polyphénolique ou de tout autre cofacteur ou effecteur potentiel, les plans d'expérience sont conçus pour que les concentrations finales de Fe^{2+}, 2OG, ascorbate et catalase restent respectivement égales à 10 µM, 1 mM, 2 mM et 0,1 mg/ml.

Etant donné qu'il s'agit d'un réducteur monoélectronique des sels de Fe(III), la présence d'un très large excès d'ascorbate assure quant à elle le maintien de la forme Fe(II) requise, sans toutefois garantir le contrôle de la concentration d'oxygène O_2 dissout (typiquement de l'ordre de 230 µM à PO_2 ambiante en l'absence de sel ferreux) s'il est consommé dans des réactions d'autoxydation du Fe(II) du sel ferreux. Ce point devra être pris en compte dans l'analyse des résultats obtenus dans cette configuration expérimentale.

IV.1.2. Production du complexe VvANS-Fe(II)

Le complexe *Vv*ANS-Fe(II) est produit par incubation de l'enzyme dans un milieu réactionnel contenant un large excès de sel ferreux, c'est-à-dire au moins 30 fois la concentration de protéine enzymatique, de telle manière que la probabilité de saturer son actif en Fe(II) ou de s'approcher de cette saturation soit élevée.

Le milieu de complexation (2,25 ml) est ici composé de 2,22 mM d'ascorbate, 1,11 mM de 2OG, 0,11 mg/ml de catalase et 33,3 µM de sel de fer dans un tampon MES 20 mM, pH 6,5. Après ajustement du pH à 6,3 (à 35°C) avec une solution d'hydroxyde de sodium (10 mM), le milieu de complexation est complété à 2,5 ml avec 0,106 ml de solution mère de *Vv*ANS à 0,985 mg/ml (10^{-6} M) et 0,144 ml de tampon MES 20 mM. Après incubation à 35°C pendant 30 min, ce mélange (2,5 ml) est chargé sur une colonne de dessalage par gel filtration (PD-10), afin d'éliminer le fer de petit poids moléculaire non complexé à l'enzyme.

Le complexe *Vv*ANS-Fe(II) restant dans la colonne est finalement élué avec 3,5 ml de tampon d'élution (MES 20 mM, pH 6,3, 35°C, contenant 2 mM ascorbate, 1 mM 2OG, 0,1 mg/ml catalase, avec ou sans GSH). Ce complexe est concentré par ultrafiltration sur un filtre Amicon® Ultra-0,5 ml (10,000 Da, Millipore), et le volume d'échantillon concentré est enfin ajusté à 2,375 ml avec le tampon d'élution, ce qui conduit finalement à une concentration de complexe *Vv*ANS-Fe(II) de l'ordre de 10^{-6} M. Après une pré-incubation à 35°C pendant 5 min, la réaction est déclenchée par l'addition de 125 µl de solution mère du substrat polyphénolique (2 mM dans le méthanol).

Il faut souligner d'une part, que la colonne PD-10 utilisée est pré-équilibrée avec 25 ml de tampon d'élution sans addition du sel de Fe(II), et d'autre part, que le milieu de complexation (2,25 ml) sera dilué par l'addition de solution mère de *Vv*ANS et de tampon MES 20 mM (0,25 ml au total) ce qui conduit bien à des concentrations finales de fer, 2OG, ascorbate et catalase qui sont respectivement 30 µM, 1 mM, 2 mM et 0,1 mg/ml.

IV.2. Etudes des spécificités des substrats de la *Vv*ANS en présence du sel de fer

L'activité de la *Vv*ANS sur plusieurs types de polyphénols a été testée en monitorant la concentration du substrat potentiel ou de ses produits éventuels par HPLC sur colonne Atlantis C18. Nous avons vu précédemment que les deux stéréoisomères (3,4-cis et 3,4-trans) de leucocyanidine (famille des leucoanthocyanidines ou flavan-3,4-diols) synthétisés au laboratoire étaient stockés à -20°C en milieu aqueux (Matériels et Méthodes, II.2.3), et ce sont donc leurs solutions aqueuses extemporanément décongelées qui ont été utilisées pour tester l'activité de la *Vv*ANS.

Dix autres polyphénols appartenant à trois autres familles (dihydroflavonols, flavan-3-ols et flavanones) ont été testés, dont neuf sont disponibles dans le commerce. La (+)-épicatéchine (flavan-3-ol) n'est pas disponible commercialement aujourd'hui, et elle a été produite dans notre laboratoire par ***Mahmoud Gargouri***. Les solutions mères de chacun de ces dix polyphénols (2 mM) sont préparées dans le méthanol pur et stockées à 4°C.

Pour chaque test, le mélange réactionnel final (volume final 2 ml) est composé de 82 µl de solution mère de *Vv*ANS à 0,985 mg/ml, 118 µl de tampon acétate d'ammonium 20 mM sans sel, 100 µl de solution mère du polyphénol à tester et 1,7 ml de milieu réactionnel en présence du sel de fer (Matériels et Méthodes, IV.1.1), et les concentrations finale de *Vv*ANS et de polyphénol sont respectivement 10^{-6} M et 100 µM. La préparation du mélange de réaction est faite comme décrit ci-dessous. Après l'addition de 82 µl de solution mère de *Vv*ANS et 118 µl de tampon acétate d'ammonium 20 mM sans sel dans 1,7 ml de milieu réactionnel (Matériels et Méthodes, VI.1.1), ce mélange réactionnel (1,9 ml) est incubé à 35°C pendant 5 min, puis complété à 2 ml avec 100 µl de

solution mère de polyphénol. La réaction est déclenchée par l'addition de polyphénol. Après 30 min d'incubation à 35°C, 100 µl d'échantillon sont injectés directement sur la colonne Atlantis C18. La dégradation non-enzymatique du polyphénol éventuellement observée dans le mélange réactionnel sans *Vv*ANS sert de témoin négatif de la réaction enzymatique, ce qui permet de repérer d'éventuels produits en réalité non-enzymatiques.

Il faut noter que le milieu réactionnel (1,7 ml) contient initialement 12 µM de fer, 1,18 mM de 2OG, 2,35 mM d'ascorbate et 0,12 mg/ml de catalase. Après dilution avec la solution mère de *Vv*ANS, le tampon acétate d'ammonium 20 mM et la solution mère de polyphénol (0,3 ml au total), leurs concentrations finales dans le mélange de réaction (2 ml) sont respectivement 10 µM, 1 mM, 2 mM et 0,1 mg/ml. Ainsi, toute réaction enzymatique est effectuée dans le tampon acétate d'ammonium 20 mM (pH 6,3) en présence de 10^{-6} M de *Vv*ANS, 10 µM de fer, 1 mM de 2OG, 2 mM d'ascorbate, 0,1 mg/ml de catalase et 100 µM de polyphénol, ainsi que 5% de méthanol introduit lors de l'addition de polyphénol (sauf pour la leucocyanidine).

IV.3. Identifications des produits enzymatiques par spectrométrie de masse (MS) et spectrométrie de masse en tandem (MS/MS)

L'identification des produits enzymatiques est d'abord réalisée par HPLC, puis confirmée par MS et MS/MS à l'aide du spectromètre de masse précédemment décrit (Matériels et Méthodes, I.5). La température de la source est maintenue à 100°C. La tension capillaire est fixée à 3 kV. L'azote est employé comme gaz de nébulisation et désolvatation à une température de 120°C et à un débit de 100 l/h. La gamme des *m/z* mesurés est de 100 à 1000 Da. L'analyse de MS/MS est effectuée avec l'argon comme gaz de collision en utilisant une énergie de collision variant de 10 à 40 eV, et la gamme des *m/z* mesurées est de 100 à 1000 Da. Les produits enzymatiques obtenus à partir des différents substrats potentiels de la *Vv*ANS sont purifiés et collectés par HPLC sur colonne Atlantis C18 (Matériels et Méthodes, II.1). Les produits collectés sont stockés à -20°C dans un mélange de méthanol/H_2O plus 0,1% de TFA jusqu'au moment de l'analyse.

Dans un premier temps, les produits enzymatiques sont identifiés en comparant leurs temps de rétention avec celui des standards des produits envisagés. Après l'analyse par HPLC, les produits enzymatiques identifiés sont dans la mesure du possible confirmés en comparant leurs spectres MS et MS/MS avec ceux des standards, et l'on s'efforce de recueillir un maximum d'informations sur les produits encore inconnus par MS et MS/MS.

En amont des tests enzymatiques, la pureté des standards polyphénoliques commerciaux a été analysée par HPLC sur colonne Atlantis C18, et les principaux contaminants contenus dans les

standards ont été collectés puis identifiés par MS et MS/MS, pour éviter des erreurs d'interprétation sur les tests ultérieurement réalisés.

IV.4. Effets des thiols sur la réaction catalysée par la *Vv*ANS

L'effet de différents thiols sur la réaction catalysée par *Vv*ANS a été étudié, d'une part en utilisant l'holoenzyme dans un milieu réactionnel contenant 10 µM de Fe(II) et 1 mM du thiol à tester (Matériels et Méthodes, IV.1.1), et d'autre part en utilisant le complexe *Vv*ANS-Fe(II) obtenu dans un tampon d'élution contenant 1 mM du thiol à tester (Matériels et Méthodes, IV.1.2). La réaction est étudiée à 35°C pendant 30 min dans le 1er cas, et pendant 15 min dans le second cas.

Les produits obtenus en présence du thiol sont analysés par HPLC sur colonne Atlantis C18, puis par spectrométrie de masse. Les quatre thiols testés sont présentés sur la **figure 1**.

Thiol	Masse moléculaire	pKa (-SH)	Structure
L-Glutathion réduit	307,32 g/mol	9	
L-Cystéine	121,16 g/mol	8,33	
Thiomalate	150,15 g/mol	10,02	
Cystéamine	77,15 g/mol	8,21	

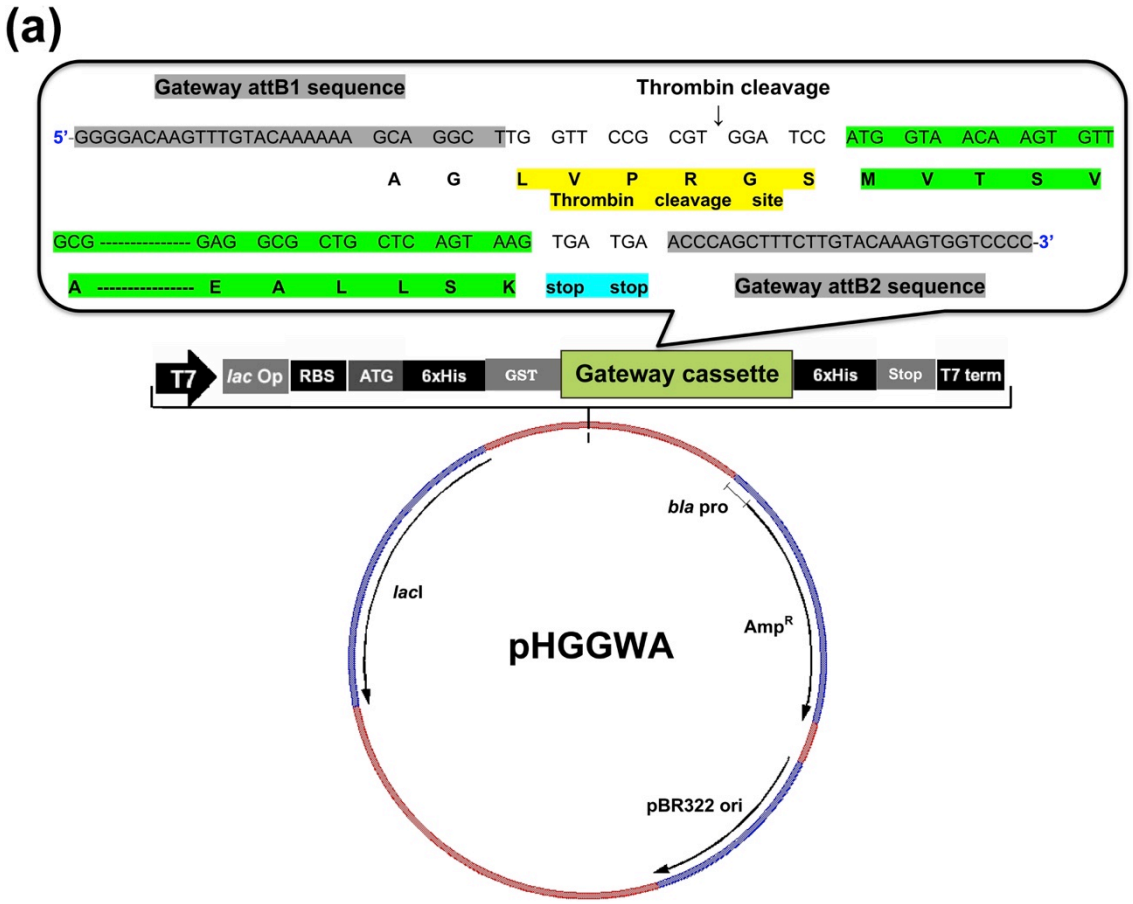
Figure 1. Structures et propriétés des thiols utilisés.

RESULTATS ET DISCUSSIONS

Partie 1 Production, purification et mise en évidence de l'intégrité de l'ANS non étiquetée

I. Expression

Le plasmide d'expression pHGGWA (**figure 2a)** est construit en utilisant la technologie GATEWAY. Ce plasmide est constitué par la succession des domaines suivants: une étiquette hexa-histidine N-terminale suivie du gène de la GST (glutathion-S-transférase), un site de clivage par la thrombine, et enfin le gène codant pour la *Vv*ANS (**figure 2b**). En raison de la présence initiale d'une autre étiquette polyhistidine en position C-terminale sur ce plasmide, deux codons stop (TGA) ont été ajoutés à la fin de la séquence codant pour la *Vv*ANS, afin d'éviter l'introduction d'une étiquette supplémentaire à l'extrémité C-terminale de la *Vv*ANS surexprimée.



(b)

```
                10         20         30         40         50         60
  1 MVTSVAPRVE SLSSSGIQSI PKEYIRPQEE LTSIGNVFEE EKKDEGPQVP TIDLKDIESE

                70         80         90        100        110        120
 61 DEVVRERCRE ELKKAAMEWG VMHLVNHGIS DDLINRVKVA GETFFNLPME EKEKYANDQA

               130        140        150        160        170        180
121 SGKIAGYGSK LANNASGQLE WEDYFFHLIF PEDKRDMTIW PKTPSDYVPA TCEYSVKLRS

               190        200        210        220        230        240
181 LATKILSVLS LGLGLEEGRL EKEVGGMEEL LLQKKINYYP KCPQPELALG VEAHTDVSAL

               250        260        270        280        290        300
241 TFILHNMVPG LQLFYEGKWV TAKCVPNSII MHIGDTIEIL SNGKYKSILH RGLVNKEKVR

               310        320        330        340        350
301 ISWAVFCEPP KEKIILKPLP ETVSETEPPL FPPRTFSQHI QHKLFRKTQE ALLSK
```

Figure 2. Plasmide d'expression et séquence protéique de la *Vv*ANS.

(a) Plasmide d'expression protéique pHGGWA; (b) Séquence protéique de la *Vv*ANS. Cépage *Cabernet Sauvignon*. Compte tenu du site de reconnaissance de la thrombine qui est exploité pour éliminer la double étiquette His_6-GST, la protéine finalement produite contiendra deux résidus supplémentaires (glycine et sérine) en amont de la première méthionine.

II. Purification de la *Vv*ANS étiquetée

Après une étape de lyse de paroi bactérienne par le lysozyme et de destruction physique par sonication, le lysat protéique clair est récupéré par centrifugation (8,600 rpm) suivie d'une filtration utilisant des seringues à filtre. Les fractions collectées lors de la purification IMAC de l'ANS étiquetée sont visualisées sur un gel SDS-PAGE (**figure 3**).

Après le passage de lysat brut sur la colonne Nickel, seule une faible bande correspondant au poids moléculaire de l'ANS étiquetée (double flèche jaune) est observée dans la fraction des protéines non retenues sur la colonne (piste 3). Ceci indique qu'une majeure partie de l'ANS étiquetée s'est fixée sur la colonne Nickel. De plus, aucune bande n'est observée dans le second rinçage (piste 5), ce qui signifie que toutes les protéines non retenues sur la colonne ont bien été éliminées à l'issue de ce deuxième rinçage avec le tampon LEW 1x. La majorité de l'ANS étiquetée retenue sur la colonne (environ 95%) est enfin récupérée dès la première élution avec le tampon imidazole 250 mM. La quantité de protéine de fusion obtenue à partir de 2L de culture bactérienne est de l'ordre de 30 à 50 mg.

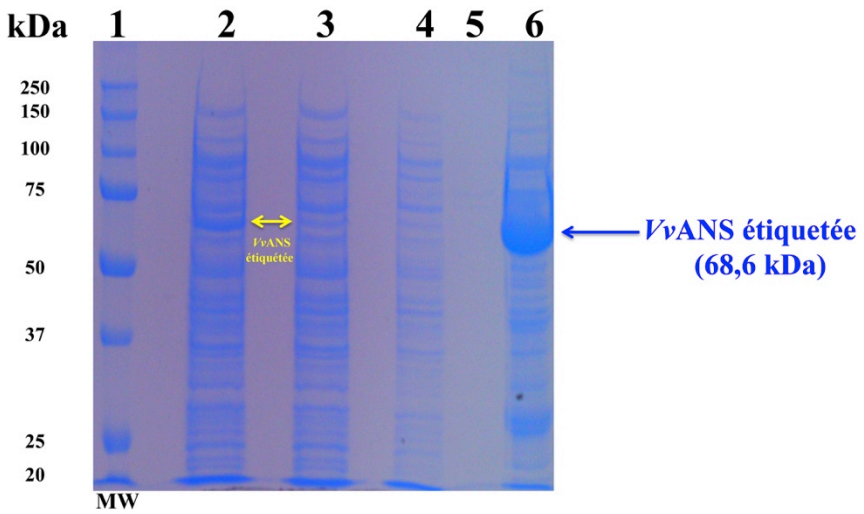


Figure 3. Gel SDS-PAGE à 10% d'acrylamide montrant les produits d'élution obtenus lors de la purification IMAC de l'ANS étiquetée.

1: Marqueurs de poids moléculaire; 2: Lysat brut obtenu après centrifugation et filtration; 3: Protéines non accrochées sur la colonne; 4: 1er rinçage; 5: Second rinçage; 6: Première élution de l'ANS étiquetée avec le tampon imidazole 250 mM. 10 µl de marqueurs de poids moléculaire sont chargés dans le puits numéro 1, et 20 µl d'échantillon sont chargés dans les autres puits.

III. Elimination de l'étiquette His_6-GST et purification IMAC de l'ANS non étiquetée

L'étiquette His_6-GST est liée à l'ANS en position N-terminale par un site de clivage par la thrombine. Ce site de reconnaissance est une séquence LVPRGS, clivée par la thrombine entre les acides aminés R (arginine) et G (glycine), ce qui laissera deux acides aminés supplémentaires (glycine et sérine) dans la région N-terminale de l'ANS non étiquetée, avant la première méthionine (**figure 2a**).

Un gel SDS-PAGE du produit de digestion par la thrombine de l'ANS étiquetée et la purification IMAC de l'ANS non étiquetée est présenté sur la **figure 4**. Une seule bande de forte intensité correspondant à l'ANS étiquetée (PM théorique de 68,6 kDa) est observée sur le gel (piste 2) avant l'addition de thrombine, et seulement deux nouvelles bandes sont apparues après 16 heures d'incubation en présence de thrombine à 22°C (piste 3), qui correspondent aux deux protéines attendues: l'ANS non étiquetée (PM théorique de 40.3 kDa) et l'étiquette His_6-GST (PM théorique de 28,3 kDa). Sur la piste 3, la disparition complète de la bande de l'ANS étiquetée indique que toute l'ANS étiquetée a bien été digérée par la thrombine, et il n'y a pas d'autre produit observé sur le gel.

Après digestion, le milieu réactionnel contenant l'ANS non étiquetée, la thrombine et l'étiquette His_6-GST est chargé immédiatement sur une nouvelle colonne Nickel, afin de séparer l'ANS non étiquetée et la thrombine de l'étiquette His_6-GST. L'ANS non étiquetée et la thrombine ne sont pas retenues par la colonne Nickel, contrairement à l'étiquette His_6-GST, ce qui permet de les séparer. On

notera que la fraction obtenue lors du premier rinçage de la colonne avec le tampon LEW 1x montre une bande de faible intensité (dilution de l'échantillon dans un grand volume correspondant à l'ANS non étiquetée (piste 5, **figure 4**). Ceci indique qu'il reste encore une quantité substantielle d'ANS non étiquetée qui ne s'est pas fixée sur la colonne, et il faut bien rincer la colonne pour récupérer toute l'ANS non étiquetée. Le même tampon que le milieu réactionnel (PBS 1x) devra être utilisé pour éviter de contaminer l'échantillon par un autre tampon (LEW 1x). Donc, une étape supplémentaire de rinçage avec 6 ml de tampon PBS 1x est effectuée avant le premier rinçage avec le tampon LEW 1x.
L'étiquette His_6-GST collectée lors de la première élution avec le tampon imidazole est purifiée et conservée dans 20 mM MES (pH 6,5) additionné de 50 mM NaCl et 10% de glycérol, et l'analyse par SDS-PAGE montre que l'étiquette His_6-GST purifiée est assez pure (piste 8, **figure 4**). Cette étiquette His_6-GST précipite après plusieurs heures de stockage à 4°C, ce qui signifie qu'elle est instable, au moins dans les conditions utilisées.

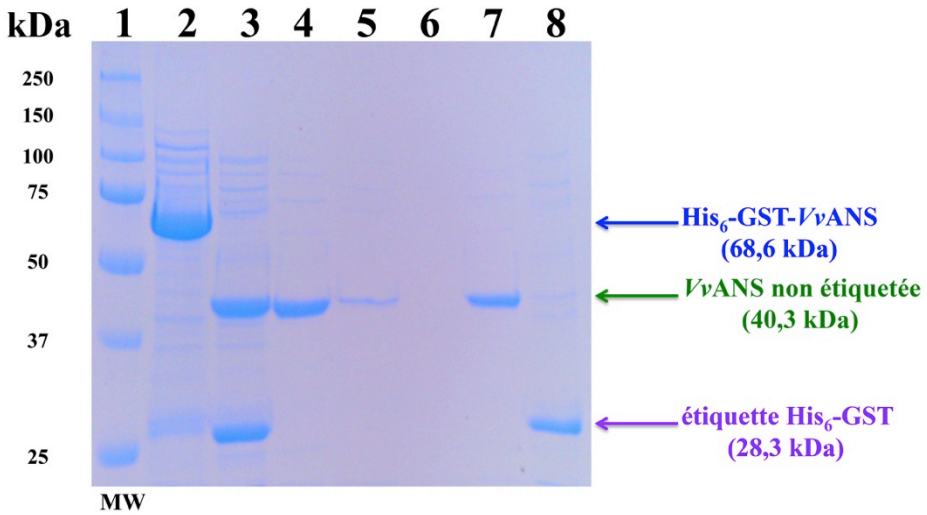


Figure 4. Gel SDS-PAGE (10% d'acrylamide) montrant la digestion de l'ANS étiquetée par la thrombine et les produits d'élution obtenus lors de la purification IMAC de l'ANS non étiquetée.

1: Marqueurs de poids moléculaire; 2: ANS étiquetée avant clivage; 3: ANS étiquetée après clivage; 4: ANS sans étiquette non retenue sur la colonne (dans tampon PBS 1x); 5: 1er rinçage; 6: Second rinçage; 7: Stock d'ANS non étiquetée, dans un tampon MES (20 mM, pH 6,5, avec 500 mM NaCl) plus 10% glycérol, sans thrombine; 8: Première élution de l'étiquette His_6-GST avec le tampon imidazole 250 mM. 10 µl de marqueurs de poids moléculaire sont chargés dans le puits numéro 1, et 20 µl d'échantillons sont chargés dans les autres puits.

IV. Elimination de la thrombine après digestion

L'effet de la résine p-aminobenzamidine-agarose sur l'élimination de la thrombine est d'abord testé en utilisant de la thrombine pure. 50 unités de thrombine (50 µl) et 100 µl de suspension de résine

sont ainsi ajoutées dans 1,0 ml de tampon PBS 1x, et ce mélange est ensuite incubé à 22°C pendant 30 min, sous agitation douce. La résine fixant la thrombine est éliminée en chargeant le milieu sur une petite colonne sous vide équipée d'un filtre, puis en la rinçant avec 500 µl de tampon PBS 1x.

Le mélange des fractions collectées lors du passage d'échantillon et de tampon PBS 1x contient seulement l'ANS non étiquetée, et il est enfin concentré à 40 µl par ultrafiltration sur un filtre Amicon® Ultra-0,5 ml (10,000 Da). Cet échantillon concentré est utilisé pour vérifier l'élimination de la thrombine par SDS-PAGE, 10 unités de thrombine pure servant de témoin.

On voit que les 12,5 unités de thrombine donnent après traitement par la résine (piste 3, **figure 5**) une bande de thrombine résiduelle beaucoup plus faible que la bande observée avec les 10 unités de thrombine non traitées (piste 2, **figure 5**), ce qui confirme que la résine fonctionne.

Sur la base de ces résultats, nous avons utilisé 200 µl de suspension de p-aminobenzamidine-agarose, pour assurer l'élimination de 50 unités de thrombine.

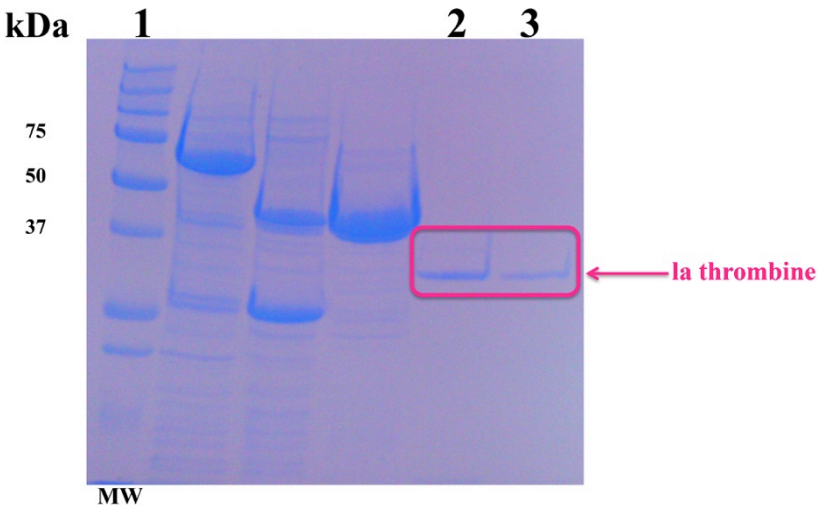


Figure 5. Gel SDS-PAGE (12% d'acrylamide) montrant l'élimination de la thrombine par la résine p-aminobenzamidine-agarose.

1: Marqueurs de poids moléculaire; 2: 10 unités de thrombine (témoin); 3: 12,5 unités de thrombine après incubation avec la résine p-aminobenzamidine-agarose.

Après l'élimination de thrombine, l'échantillon d'ANS non étiquetée est passé sur une colonne de dessalage (PD-10) pour échanger le tampon contre un tampon MES 20 mM, 500 mM NaCl, pH 6,5. Cet échantillon ajusté à 10% de glycérol constituera notre solution mère d'ANS pure non étiquetée. La pureté de cette solution mère est vérifiée par SDS-PAGE, et comme le montre la **figure 4** ci-dessus, une seule bande correspondant au poids moléculaire de l'ANS non étiquetée est observée sur la piste 7. Le rendement final d'ANS non étiquetée est de l'ordre de 10 à 15 mg pour deux litres de culture bactérienne.

Il faut noter que l'ANS étiquetée n'est pas très stable dans un tampon MES 20 mM, pH 6,5 puisqu'elle commence à précipiter après une semaine de conservation à 4°C, même en présence d'une forte concentration (500 mM) de sel. En revanche, ce tampon MES contenant 500 mM NaCl et de 10% de glycérol permet de conserver l'ANS non étiquetée sans perte significative pendant un mois à 4°C, et sur plusieurs mois à -20°C. L'élimination de l'étiquette His_6-GST augmente donc considérablement la stabilité de l'ANS et les temps de stockage envisageables sans perte significative dans un tampon enrichi en sel et en glycérol. Compte tenu de l'instabilité déjà décrite de l'étiquette His_6-GST, il est vraisemblable que cette dernière facilite l'agrégation de l'enzyme et sa précipitation.

V. Vérification de l'intégrité de l'ANS non étiquetée produite

L'analyse de l'ANS non étiquetée par spectrométrie de masse est effectuée pour vérifier son intégrité. Le spectre MS de l'ANS non étiquetée (**figure 6a**) est déconvolué pour obtenir la masse moléculaire de la protéine en utilisant un logiciel de déconvolution intégré dans MassLynx (MaxEnt). La déconvolution du spectre MS de l'ANS non étiquetée montre que la protéine entière (masse moyenne observée = 40338,0 Da; masse moyenne attendue = 40337,38 Da) est très majoritairement présente dans l'échantillon. Ces chiffres montrent en particulier qu'il n'y a vraisemblablement pas de perte d'aminoacide ni d'autoprotolyse sur notre échantillon d'ANS purifiée. Par ailleurs, l'échantillon semble très propre au vu de la **figure 6b** où l'ion majoritaire (monocation) de *m/z* égal à 40338 correspond à z = 1, et les deux autres à z =2 et z = 3 (dication et trication).

Il faut noter que les masses moléculaires observée (40338,0 Da) et attendue (40337,38 Da) de l'ANS non étiquetée comprennent la masse des deux acides aminés supplémentaires (glycine et sérine).

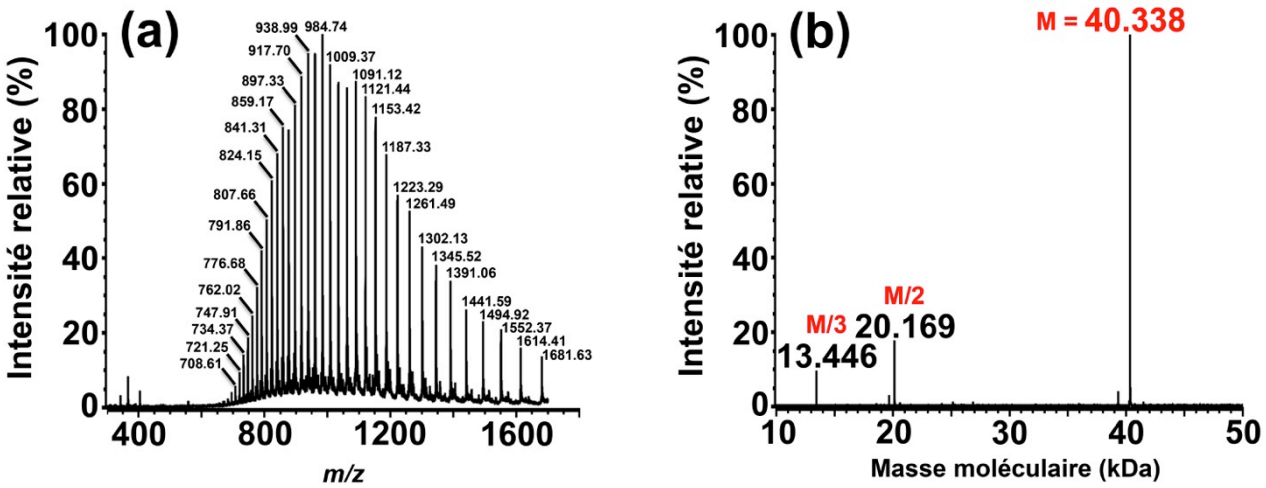


Figure 6. Spectre MS de l'ANS non étiquetée.

Le pic principal a un *m/z* qui correspond à z = 1 (monocation), alors que les deux pics de moindre intensité correspondent exactement à la moitié et au tiers de cette valeur, c'est-à-dire qu'il s'agit respectivement du dication (z = 2) et du trication (z = 3) moins abondants, mais qui se rapportent à la même masse molaire de protéine et non à des contaminants.
(a) Spectre MS initial de l'ANS non étiquetée; (b) Spectre de déconvolution du spectre initial de l'ANS non étiquetée.

Partie 2 Production, caractérisation, quantification et stockage de la leucocyanidine

Il est généralement admis que la (+)-2,3-trans-3,4-cis-leucocyanidine, stéréoisomère naturel produit par la dihydroflavonol réductase, est un substrat naturel de l'ANS, contrairement à l'isomère 3,4-trans, et sa transformation oxydative par l'ANS est considérée comme la principale source de cyanidine *in vivo*. Par ailleurs, la transformation du stéréoisomère non naturel de leucocyanidine [(+)-2,3-trans-3,4-trans-leucocyanidine] par l'ANS d'*Arabidopsis thaliana* a été démontrée (***Turnbull et coll., 2004***). Les deux stéréoisomères de leucocyanidine sont donc nécessaires pour étudier leur transformation par l'ANS *in vitro*, ainsi que la voie de biosynthèse des anthocyanidines via l'ANS *in vivo*, et la possibilité d'utiliser chacun des deux stéréoisomères purs de leucocyanidine est un prérequis de toute étude enzymatique détaillée. Or la leucocyanidine et *a fortiori* ses deux isomères 3,4-cis et 3,4-trans ne sont pas commercialement disponibles. Un travail réalisé il y a quelques années par ***Chloé Maugé*** au laboratoire (thèse de doctorat, 2010) avait montré que l'isomère 3,4-cis produit par la dihydroflavonol réductase était sans doute moins instable en milieu aqueux que ce qui était généralement admis.

Nous avons donc décidé de synthétiser chacun des deux isomères en espérant que des conditions de stockage appropriées pourraient être trouvées.

Comme le montre la **figure 7**, nous avons testé deux méthodes de conversion de la (+)-DHQ en leucocyanidine, l'une reposant sur sa réduction enzymatique par la dihydroflavonol réductase, et l'autre reposant sur sa réduction purement chimique par le borohydrure de sodium.

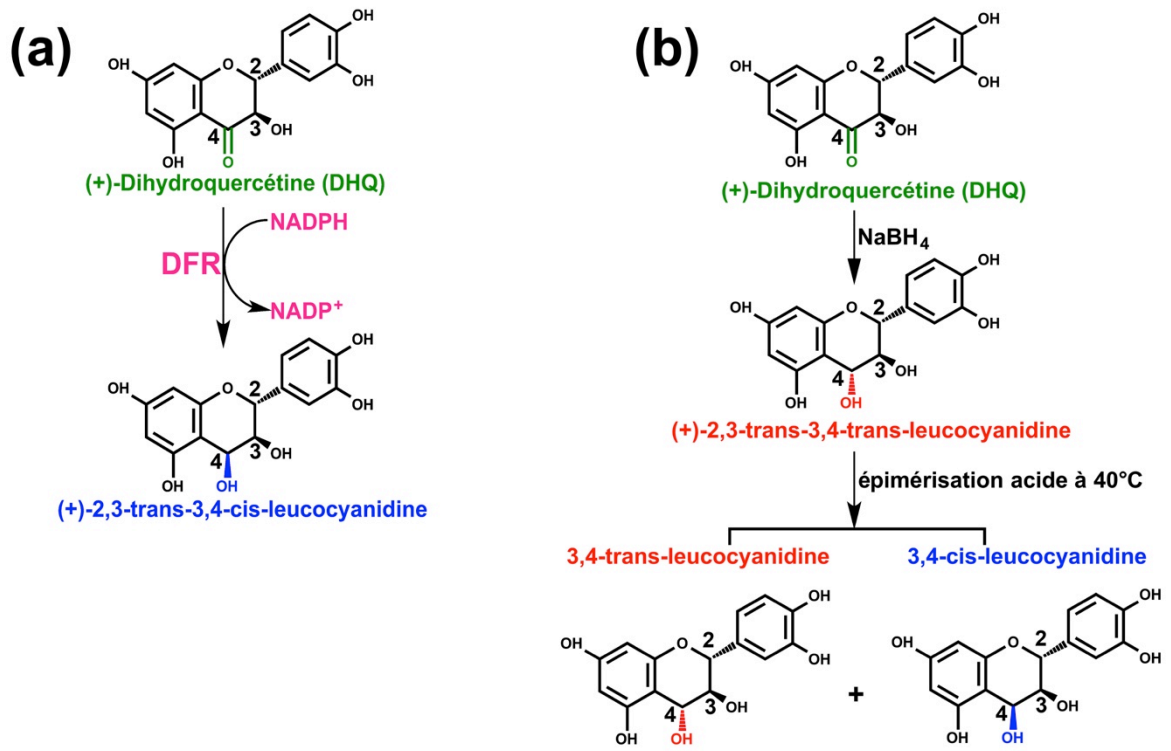


Figure 7. Synthèse enzymatique et synthèse chimique de la leucocyanidine.

(a) Synthèse enzymatique de la (+)-2,3-trans-3,4-cis-leucocyanidine (stéréoisomère naturel) par la dihydroflavonol réductase; (b) Synthèse chimique des deux stéréoisomères 3,4-cis et 3,4-trans de leucocyanidine à partir du produit de réduction de la (+)-DHQ par le borohydrure de sodium $NaBH_4$.

I. Synthèse enzymatique de la (+)-2,3-trans-3,4-cis-leucocyanidine

La dihydroflavonol réductase (DFR) catalyse la réduction de la (+)-DHQ en (+)-2,3-trans-3,4-cis-leucocyanidine spécifiquement, en présence de NADPH (**figure 7a**).

La DFR de *Vitis vinifera* (*Vv*DFR) a été produite et étudiée à plusieurs reprises au laboratoire ces dernières années, puisque deux thèses portant sur la structure et sur les mécanismes catalytiques de cette enzyme ont été soutenues (***Petit, 2007; Trabelsi, 2011***), ainsi qu'une thèse portant sur la leucoanthocyanidine réductase de *Vitis vinifera* (*Vv*LAR), dont le substrat était produit grâce à la *Vv*DFR (***Maugé, 2010***). Il était donc logique de privilégier tout d'abord la synthèse enzymatique de la 3,4-cis leucocyanidine grâce à la *Vv*DFR.

Nous avons utilisé les conditions de fonctionnement optimal (tampon, sel, pH, température) de la *Vv*DFR telles que déterminées par ***Trabelsi*** (***2011***), dans un premier temps pour tester l'activité de l'enzyme et repérer son produit par chromatographie analytique, et dans un deuxième temps pour produire quantitativement la 3,4-cis-leucocyanidine dans un milieu réactionnel de plus grand volume.

Comme le montre la **figure 8**, les chromatogrammes obtenus en phase inverse montre que la (+)-DHQ est bien consommée par la *Vv*DFR (**figure 8**). Le petit pic bleu encadré (13,5 min) est la (+)-DHQ résiduelle après la réaction enzymatique, et environ 90% de (+)-DHQ sont transformés par la *Vv*DFR sur la base du pic 1 de (+)-DHQ résiduelle observé en l'absence d'enzyme (témoin négatif). On notera que le petit pic 2 (15,5 min) est un contaminant présent dans le standard commercial de (+)-DHQ.

La *Vv*DFR produite au laboratoire est donc bien active. La concentration finale de la *Vv*DFR lors de la production de 3,4-cis-leucocyanidine dans un volume de 15 ml a été fixée à 100 nM.

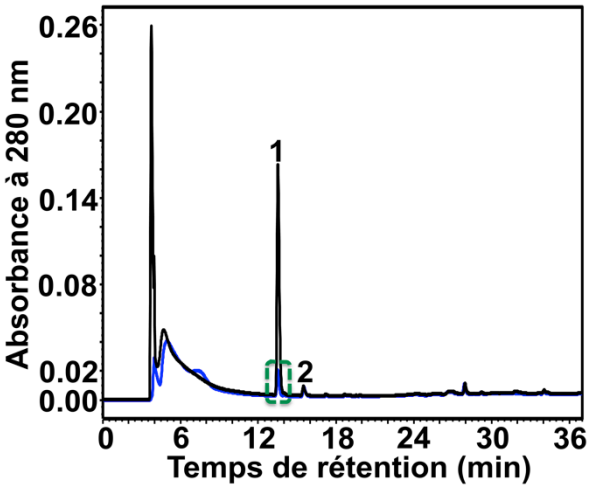


Figure 8. Visualisation de la dégradation enzymatique de (+)-DHQ par HPLC en phase inverse sur colonne Atlantis C18.

Le chromatogramme obtenu après action de la *VvDFR* est représenté en bleu, et celui du témoin négatif est représenté en noir.

On voit que la dégradation enzymatique de la DHQ n'entraine l'apparition d'aucun nouveau pic sur le chromatogramme de la **figure 8**, ce qui signifie que le produit enzymatique (3,4-cis-leucocyanidine) n'est pas observé avec la colonne Atlantis C18. Une autre colonne HPLC, Nova-Pak C18, a donc été utilisée à la place de la colonne Atlantis C18.

Comme le montre la **figure 9a**, le temps de rétention d'un standard commercial de (+)-DHQ injecté sur la colonne Nova-Pak C18 est de 7,2 min, et il s'agit bien d'un pic unique.

La composition du milieu obtenu après action de la *Vv*DFR a été ensuite analysée dans les mêmes conditions. Pour ce faire, nous en avons extrait les polyphénols par l'acétate d'éthyle puis évaporé l'extrait pour le re-solubiliser dans le solvant MetOH/H_2O (10/90, v/v) avant de l'injecter sur la colonne Nova-Pak C18.

Comme le montre **la figure 9b**, aucun pic n'est observé à 7,2 min, ce qui confirme que toute la (+)-DHQ ajoutée dans le milieu réactionnel (30 µM) a été transformée par la *Vv*DFR. En revanche, deux pics (1 et 2) sont observés avant 4 min, mais ils ne peuvent être d'emblée assignés.

On notera que la forte absorbance comprise entre 10 et 30 min est due au gradient d'acide acétique, et que son intensité n'est en fait pas différente en (a) et en (b). Il ne peut donc s'agir d'un signal dû à des produits.

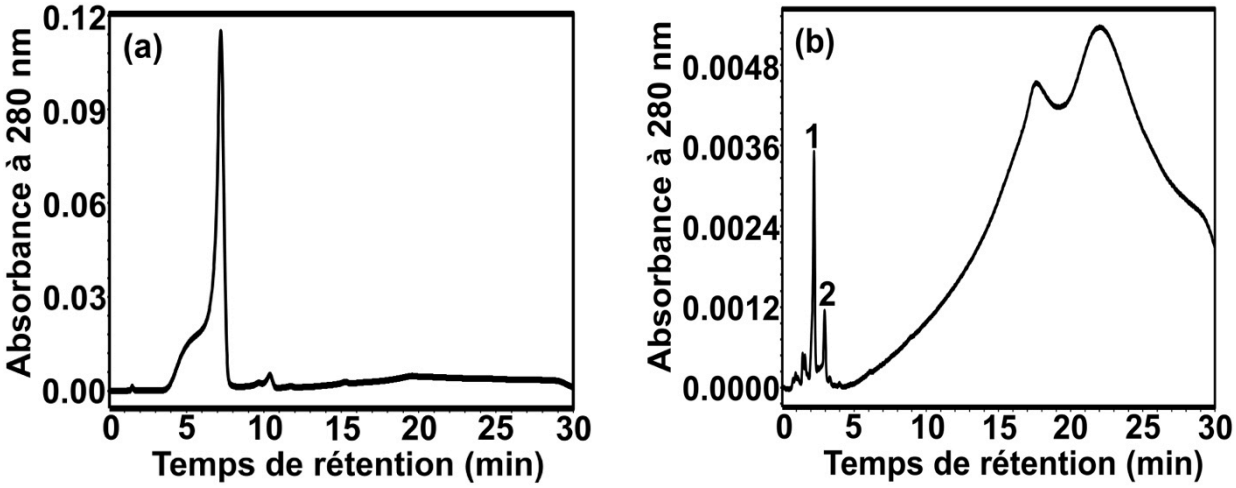


Figure 9. Chromatogrammes HPLC sur colonne Nova-Pak C18 du produit de réduction enzymatique de la (+)-DHQ.

(a) Echantillon (30 µl) du standard commercial de (+)-DHQ; (b) Extrait du milieu réactionnel obtenu par réduction enzymatique de la (+)-DHQ.

La séparation des deux stéréoisomères de leucocyanidine sur colonne Nova-Pak C18 a été décrite par ***Tanner et Kristiansen*** lors de la synthèse de standards tritiés (***1993***), et bien que les temps de rétention ne soient pas exactement les mêmes que dans notre cas, ils correspondraient aux pics 1 et 2 de la **figure 9b**.

Par ailleurs, étant donné que le seul produit de réduction de la (+)-DHQ par la *Vv*DFR est la 3,4-cis-leucocyanidine, il doit s'agir du pic majoritaire, et nous confirmerons plus loin qu'il s'agit bien du pic 1 (**figure 9b**).

Cela dit, la production enzymatique de l'isomère 3,4-cis s'est vite avérée lourde et trop coûteuse en raison de la forte inhibition de la *Vv*DFR par excès de substrat (***Trabelsi et coll., 2011***). Nous avons confirmé cette inhibition pour des concentrations de (+)-DHQ supérieures à 30 µM, et constaté que le rendement de production de la 3,4-cis-leucocyanidine s'en trouvait fortement réduit, si bien que même en utilisant de grandes quantités de *Vv*DFR et de NADPH, nous aurions dû revoir à la baisse les quantités de leucocyanidine que nous avions envisagé de produire. Nous avons donc décidé d'explorer les avantages possibles d'une synthèse purement chimique de la 3,4-cis-leucocyanidine.

II. Synthèse chimique de la (+)-2,3-trans-3,4-cis-leucocyanidine

Le premier essai sur la synthèse de 3,4-trans-leucocyanidine a été fait en s'inspirant du protocole décrit par ***Porter et Foo*** (***1982***), avec les modifications suivantes. La réduction de (+)-DHQ (10 mg) est réalisée dans 2 ml d'éthanol absolu, et la réaction est déclenchée par l'addition de 5 mg de $NaBH_4$ en une seule fois. 10 ml de 0,01% acide acétique sont ajoutés immédiatement après 2h d'incubation à la température ambiante (sous agitation forte), et la solution aqueuse est extraite par l'acétate d'éthyle (3 × 30 ml). L'extrait d'acétate d'éthyle est récupéré après 5 min de centrifugation à 8,600 × g à 4°C puis asséché par évaporateur rotatif à 15°C. Le résidu est remis en solution dans 1,0 ml de méthanol pur. 10 µl d'échantillon méthanolique sont dilués 20 fois avec de l'eau pure, et 100 µl de cette solution sont injectés sur colonne Nova-Pak C18. Comme le montre la **figure 10a**, l'analyse HPLC révèle la présence de deux pics (noir) majeurs. Le pic 3 (7,4 min) est attribué à la (+)-DHQ résiduelle (voir standard commercial, **figure 9a**). L'échantillon méthanolique doit contenir la 3,4-trans-leucocyanidine en majorité, il est donc probable que le pic 2 (2,8 min) corresponde à la 3,4-trans-leucocyanidine.

Nous avons donc testé l'épimérisation acide de la 3,4-trans-leucocyanidine dans les conditions déterminées par ***Kristiansen*** (***1986***). Cette épimérisation est déclenchée par l'addition de 990 µl d'échantillon méthanolique dans 50 ml d'acide acétique 0,1% préincubés à 40°C pendant 30 min. Après 100 min d'incubation à 40°C sous agitation (100 rpm), 100 µl d'échantillon aqueux sont injectés sur la colonne Nova-Pak C18. Le résultat de l'échantillon traité (représenté en bleu sur la **figure 10a**) est comparé avec celui de l'échantillon non traité (représenté en noir sur la **figure 10a**). On observe d'une part, une forte diminution de la 3,4-trans-leucocyanidine (pic 2 et pic 2', 2,8 min et 2,7 min, respectivement), et d'autre part, l'apparition d'un seul nouveau pic (pic 1, 2,0 min). Le pic 1 est donc le produit d'épimérisation du pic 2. Le rapport des surfaces du pic 1 et du pic 2' est très proche de 3:2, ce qui correspond au rapport des stéréoisomères 3,4-cis et 3,4-trans obtenu par ***Kristiansen*** (***1986***) après épimérisation. Les pics 1 et 2 peuvent donc être assignés respectivement aux stéréoisomères 3,4-cis et 3,4-trans de leucocyanidine.

Les deux produits initialement inconnus de la réduction de (+)-DHQ par la *Vv*DFR (pics 1 et 2, **figure 9b**) peuvent maintenant être assignés grâce aux temps de rétention observés sur la **figure 10**. Le grand pic 1 correspond à l'isomère 3,4-cis de leucocyanidine, et le petit pic 2 à l'isomère 3,4-trans.

Ces résultats montrent donc que dans nos conditions (réaction, extraction, analyse), les deux stéréoisomères de leucocyanidine sont observés comme produits de la réaction catalysée par la *Vv*DFR en présence de (+)-DHQ, même si le stéréoisomère 3,4-cis est majoritaire.

Il nous semble probable que la 3,4-cis-leucocyanidine soit le seul produit enzymatique de *Vv*DFR et que la 3,4-trans-leucocyanidine ait en réalité été obtenue par épimérisation ou racémisation spontanée de la 3,4-cis-leucocyanidine dans nos conditions, bien que nous n'en n'ayons pas la preuve.

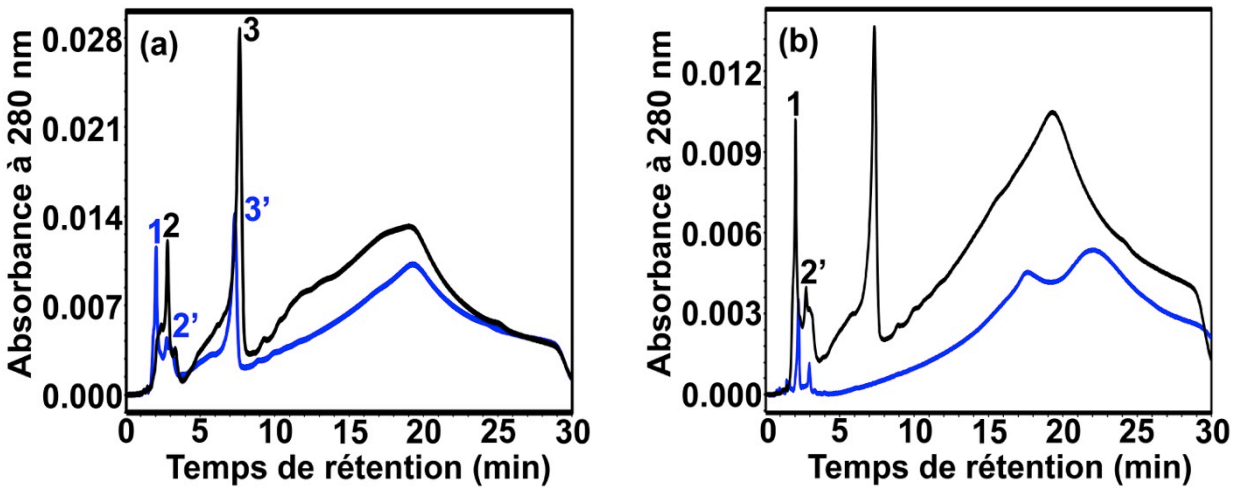


Figure 10. Chromatogrammes HPLC sur colonne Nova-Pak C18 montrant les produits obtenus lors de la réduction purement chimique de la (+)-DHQ.

(a) Produits obtenus après la réduction de (+)-DHQ par $NaBH_4$ (noir) et produits obtenus après l'épimérisation acide (bleu); (b) Comparaison entre les produits obtenus par synthèse enzymatique grâce à la *Vv*DFR (bleu) et ceux obtenus par synthèse purement chimique de 3,4-cis-leucocyanidine via l'épimérisation acide de l'isomère 3,4-trans initialement obtenu par réduction (noir).

Les deux stéréoisomères de leucocyanidine sont acido-labiles, et une polymérisation importante de leucocyanidine a été attribuée à l'acide acétique résiduel produit lors de l'évaporation directe d'acétate d'éthyle à sec (***Porter et Foo, 1982; Stafford et coll., 1985***).

Notre premier protocole de production chimique de 3,4-trans-leucocyanidine a donc été modifié en s'inspirant du protocole déterminé par ***Stafford et coll. (1985)***, afin de produire plus de monomères de leucocyanidine que de polymères. Par ailleurs, les temps de rétention des deux stéréoisomères de leucocyanidine sur colonne Nova-Pak sont très courts et très proches (**figure 10**), d'où une séparation insatisfaisante à des fins de production. Une autre colonne µBondapak C18 a donc été utilisée à la place de la colonne Nova-Pak C18 dans le protocole final de production de 3,4-cis-leucocyanidine qui est décrit dans la section II.2 du chapitre Matériels et Méthodes.

Après lyophilisation, le lyophilisat contenant principalement la 3,4-trans-leucocyanidine et le sel de phosphate de sodium est remis en solution dans 7,0 ml de MetOH/H_2O (50/50, v/v), et nous avons noté qu'il était impératif de conserver cet échantillon brut de 3,4-trans-leucocyanidine à -20°C pour éviter la dégradation de 3,4-trans-leucocyanidine. Ensuite, la 3,4-trans-leucocyanidine est purifiée

par HPLC sur colonne µBondapak phényle, et l'analyse HPLC de l'échantillon brut de 3,4-trans-leucocyanidine révèle seulement deux produits. Comme le montre la **figure 11a**, le pic majeur observé à 21,0 min (pic 2) correspond à la 3,4-trans-leucocyanidine, produit majeur de la réduction de (+)-DHQ par $NaBH_4$, et le pic mineur observé à 12,5 min correspond à la 3,4-cis leucocyanidine (pic 1), qui représente moins de 2% du total.

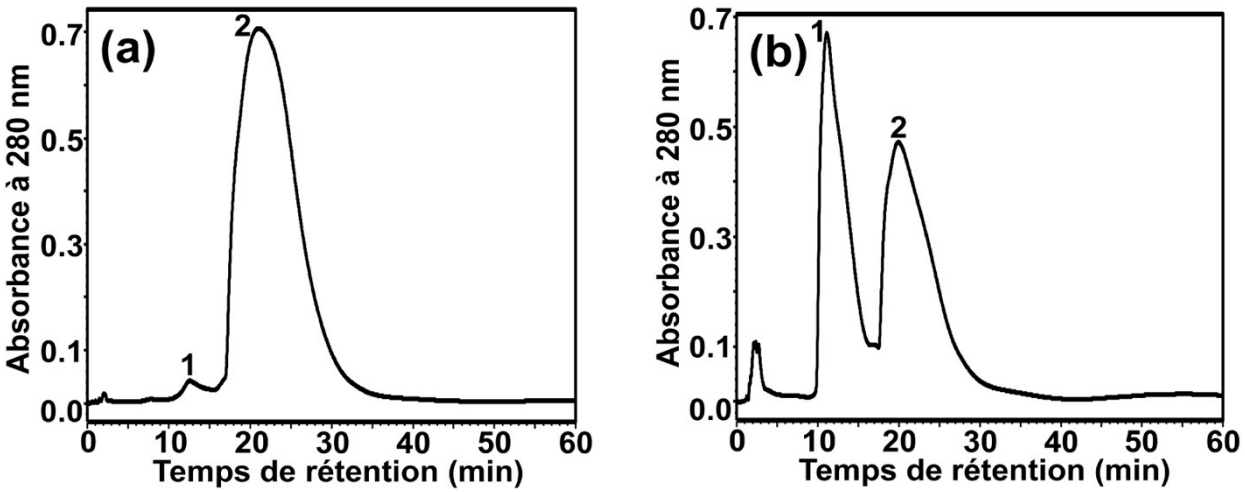


Figure 11. Séparation des stéréoisomères 3,4-cis et 3,4-trans de la leucocyanidine par HPLC sur colonne µBondapak phényle.

(a) Après réduction de (+)-DHQ par $NaBH_4$; (b) Après épimérisation acide de la 3,4-trans-leucocyanidine.

Durant l'épimérisation de la 3,4-trans leucocyanidine dans 0,1% (v/v) d'acide acétique à 40°C, 100 µl de milieu réactionnel sont prélevés à 0, 40 et 80 min, respectivement, et analysés immédiatement par HPLC sur colonne µBondapak C18, afin de bien suivre le processus d'épimérisation (**figure 12**). La quantité de 3,4-trans leucocyanidine (pic 2, 10,6 min) baisse pendant que celle de 3,4-cis leucocyanidine (pic 1, 7,0 min) augmente. Après 80 min d'incubation, les concentrations de 3,4-cis- et 3,4-trans-leucocyanidine sont à peu près les mêmes. Au-delà, ces concentrations chutent, vraisemblablement en raison des phénomènes de polymérisation.

Enfin, les deux stéréoisomères de leucocyanidine sont bien séparés et purifiés par HPLC sur colonne µBondapak phényle (**figure 11b**).

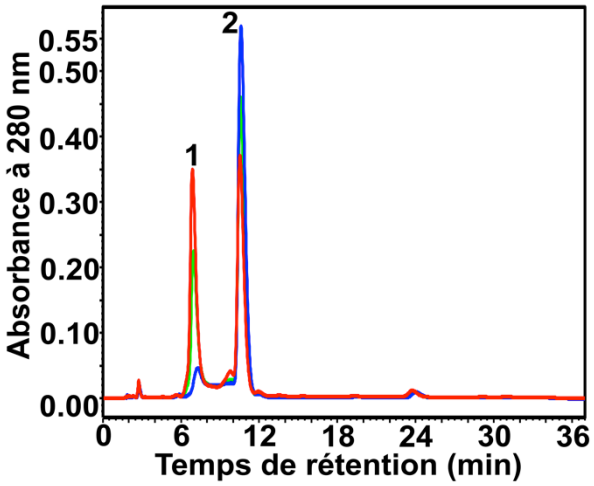


Figure 12. Suivi de l'épimérisation acide de 3,4-trans leucocyanidine par HPLC sur colonne µBondapak C18.

Les échantillons prélevés à 0, 40 et 80 min sont respectivement représentés en bleu, vert et rouge.

Comme on peut le voir sur la **figure 12**, la séparation des deux stéréoisomères de leucocyanidine (pics 1 et 2) sur colonne µBondapak C18 est bien meilleure que sur colonne Nova-Pak C18 (**figure 10**).

III. Identification des deux stéréoisomères de leucocyanidine par RMN

Après la production chimique des deux stéréoisomères de leucocyanidine, leurs structures sont identifiées par RMN. Le spectre RMN 1D ^{1}H de la 3,4-cis-leucocyanidine est présenté sur la **figure 13** (bleu).

Il est très similaire au spectre antérieurement publié par ***Kristiansen*** (***1986***), même si les attributions des déplacements chimiques du ^{1}H qui avaient été proposées à l'époque étaient incorrectes pour les protons H2', H5' et H6' du noyau aromatique B. De plus, les constantes de couplage $J_{2,3}$ et $J_{3,4}$ (**tableau 3**) sont en parfait accord avec une configuration 2,3-trans-3,4-cis, comme indiqué précédemment (***Kristiansen, 1993; Baig et coll., 1969***).

Le spectre RMN de la 3,4-trans-leucocyanidine (**figure 13**, rouge) est assez similaire à celui de l'isomère 3,4-cis, mais les déplacements chimiques de H2 (blindage) et H4 (déblindage) sont très différents. Ces déplacements chimiques distincts sont attendus puisque dans la configuration 2,3-trans-3,4-trans, la distance plus grande entre H2 et O4 ainsi que la proximité augmentée entre H4 et O3 vont induire blindage et déblindage, respectivement. La constante de couplage $J_{3,4}$ (3,4-trans) augmentée (**tableau 4**) indique aussi une configuration 2,3-trans-3,4-trans, comme publié précédemment (***Kristiansen, 1984***). La stéréochimie de chaque composé est étudiée plus en détail

en utilisant le spectre 1D ^{1}H gradient sélectif NOESY (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy), où les différences des intensités du signal sont en accord avec les proximités relatives prévues de H3 à H2 et H4 pour chaque configuration (**figure 14**). En effet, lorsque la région H3 du spectre 1D ^{1}H est sélectivement irradiée, on n'observe pas de pic NOE spécifique pour la configuration 3,4-trans (on observe à la fois des pics phasés positivement et négativement), c'est-à-dire qu'il n'y a apparemment pas de différence de proximité entre H3-H2 et H3-H4. Pour la configuration 3,4-cis, la proximité H3-H4 ne donne que des pics NOE phasés négativement, ce qui indique que la distance H3-H4 est plus courte que la distance H3-H2 (qui montre au moins un pic positif comme pour la molécule 3,4-trans).

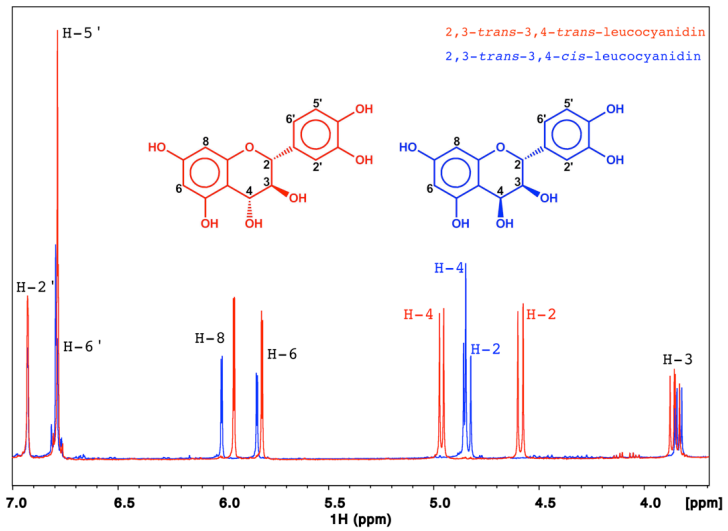


Figure 13. Spectres RMN 1D ^{1}H des stéréoisomères 3,4-cis et 3,4-trans de la leucocyanidine.

3,4-cis-leucocyanidine (bleu) et 3,4-trans-leucocyanidine (rouge) à la concentration de 2,3 mg/ml dans l'acétone d6-deutérée. Acquisition en 32 scans à 400 MHz.

Tableau 3. Déplacements chimiques et constantes de couplage de la 3,4-cis-leucocyanidine.

Position	Déplacements chimiques ^{1}H / ^{13}C (δ, ppm)*	^{1}H Constantes de couplage (J, Hz)**
H/C-2	4.82 / 79.43	9.60 (d)
H/C-3	3.84 / 73.10	3.84, 9.28 (dd)
H/C-4	4.85 / 64.43	4.04 (d)
H/C-6	5.84 / 96.92	2.24 (d)
H/C-8	6.01 / 98.05	2.28 (d)
H/C-2’	6.93 / 117.40	1.60 (d)
H/C-5’	6.79 / 117.32	-
H/C-6’	6.79 / 122.23	-

* Les déplacements chimiques de ^{1}H et ^{13}C sont exprimés par rapport à l'acétone solvant.
** d = doublet, dd = doublet dédoublé.

Tableau 4. Déplacements chimiques et constantes de couplage de la 3,4-trans-leucocyanidine.

Position	Déplacements chimiques ^{1}H / ^{13}C (δ, ppm)*	^{1}H Constantes de couplage (J, Hz)**
H/C-2	4.59 / 83.78	10.00 (d)
H/C-3	3.85 / 75.80	8.00, 9.96 (dd)
H/C-4	4.96 / 74.63	7.96 (d)
H/C-6	5.82 / 97.24	2.28 (d)
H/C-8	5.95 / 99.02	2.32 (d)
H/C-2'	6.93 / 117.56	1.00 (d)
H/C-5'	6.79 / 117.40	-
H/C-6'	6.79 / 122.48	-

* Les déplacements chimiques de ^{1}H et ^{13}C sont exprimés par rapport à l'acétone solvant.
** d = doublet, dd = doublet dédoublé.

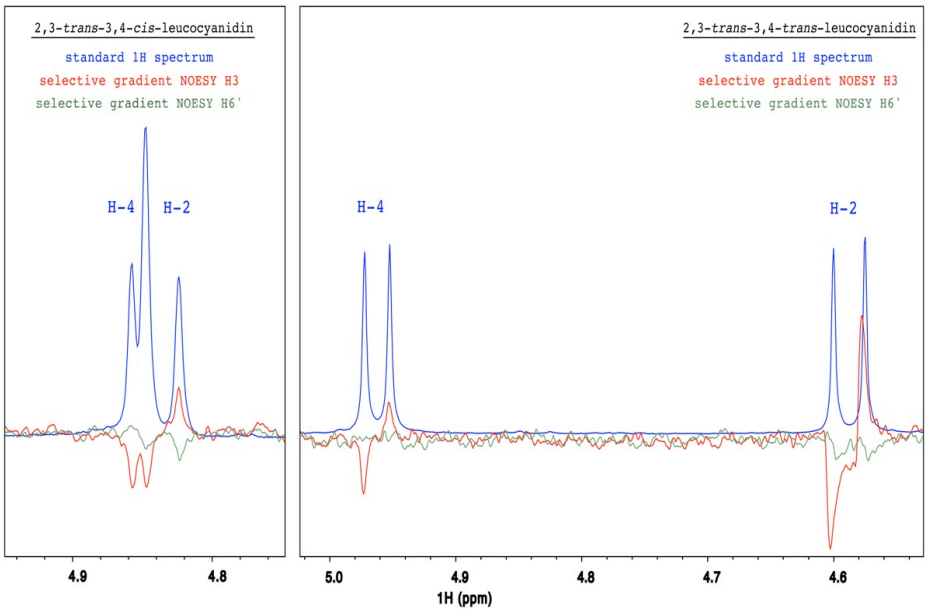


Figure 14. Spectres 1D ^{1}H gradient sélectif NOESY de 3,4-cis-leucocyanidine et de la 3,4-trans-leucocyanidine.

Le spectre RMN 1D ^{1}H est représenté en bleu, et les spectres 1D ^{1}H sélectif NOESY de H3 et H6' sont respectivement représentés en rouge et vert.

IV. Quantification de la leucocyanidine par la LAR

Après l'analyse par RMN, le reste de poudres de 3,4-cis et 3,4-trans isomères obtenues lors de la lyophilisation sont remises respectivement en solution dans 2,0 et 9,0 ml H_2O, et stockées à -20°C en plusieurs aliquotes. La pureté de ces deux solutions aqueuses est ensuite vérifiée par HPLC sur colonne µBondapak C18. Comme le montre la **figure 15**, la préparation finale de 3,4-cis-leucocyanidine (**figure 15a**) contient environ 5% d'isomère 3,4-trans (pic 2) contaminant, et la

préparation finale de 3,4-trans-leucocyanidine (**figure 15b**) contient environ 13% d'isomère 3,4-cis (pic 1) contaminant.

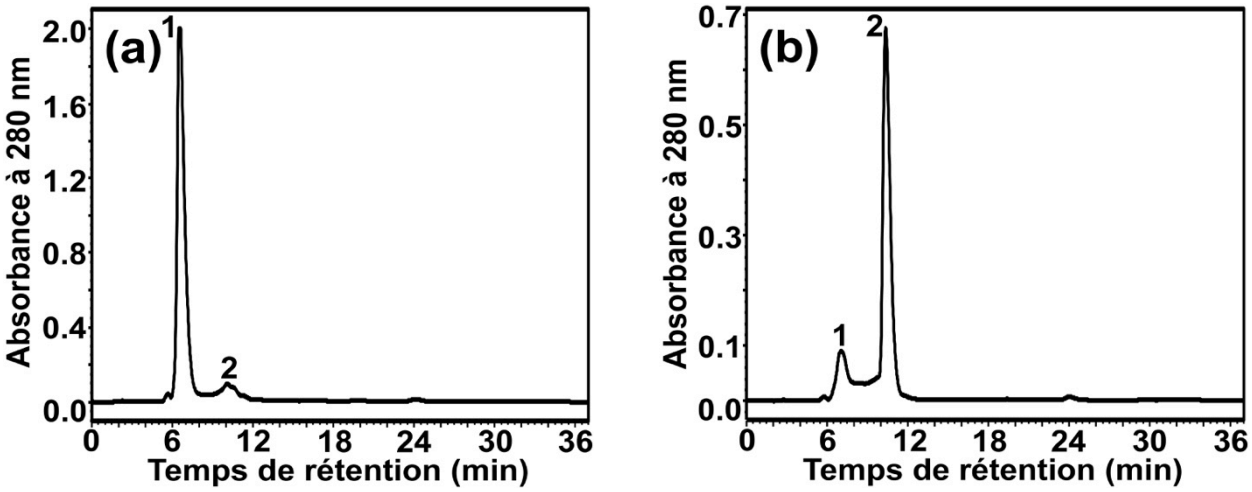


Figure 15. Pureté des isomères 3,4-cis et 3,4-trans finalement produits.

Chromatogrammes HPLC sur colonne µBondapak C18. (a) 3,4-cis-leucocyanidine purifiée; (b) 3,4-trans-leucocyanidine purifiée. Les deux pics 1 correspondent à l'isomère 3,4-cis et les deux pics 2 correspondent à l'isomère 3,4-trans.

La LAR catalyse la transformation réductrice de 3,4-cis-leucocyanidine en (+)-catéchine en présence de NADPH, et dans cette réaction, un équivalent de NADPH est consommé pour chaque 3,4-cis-leucocyanidine transformée, ce qui permet de doser très précisément la 3,4-cis-leucocyanidine, y compris dans un milieu contenant l'isomère 3,4-trans. Avant la quantification enzymatique de 3,4-cis-leucocyanidine, l'activité de la LAR recombinante est tout d'abord testée en utilisant les deux stéréoisomères de leucocyanidine comme substrats. Le milieu réactionnel (1,0 ml au total) contient 150 µM NADPH et une concentration inconnue de 3,4-cis-leucocyanidine ou d'isomère 3,4-trans (10 µl de solution de stockage) dans le tampon HEPES 50 mM, NaCl 10 mM, pH 6,5. La réaction est déclenchée par l'addition de 100 nM LAR. Après 30 min d'incubation à 30°C, 100 µl de milieu réactionnel sont prélevés puis analysés par HPLC sur colonne Atlantis C18 (Matériels et Méthodes, II.1), et 100 µM de (+)-catéchine (standard commercial) dans le tampon précité sont injectés comme un standard externe de l'analyse HPLC. Pour l'utilisation de 3,4-cis-leucocyanidine comme substrat (**figure 16a**), un seul produit (pic 1' rouge, 10,3 min) est observé, et il est ensuite attribué à la (+)-catéchine en utilisant un standard commercial (pic 1 bleu, 10,1 min). La réaction effectuée avec la 3,4-cis-leucocyanidine en l'absence de LAR (**figure 16b**) sert de témoin négatif. Le pic 1 rouge (9,1 min) est la 3,4-cis-leucocyanidine, et aucun pic n'est observé au temps de rétention du standard commercial de (+)-catéchine (pic 2 bleu, 10,1 min), ce qui indique que la (+)-catéchine (pic 1' rouge, **figure 16a**) est un produit exclusivement obtenu en présence de

LAR, et nous apporte au passage une preuve supplémentaire de la présence de 3,4-cis-leucocyanidine. De plus, aucune 3,4-cis-leucocyanidine résiduelle n'est observée sur la **figure 16a**, ce qui indique que toute la 3,4-cis-leucocyanidine a été transformée par la LAR.

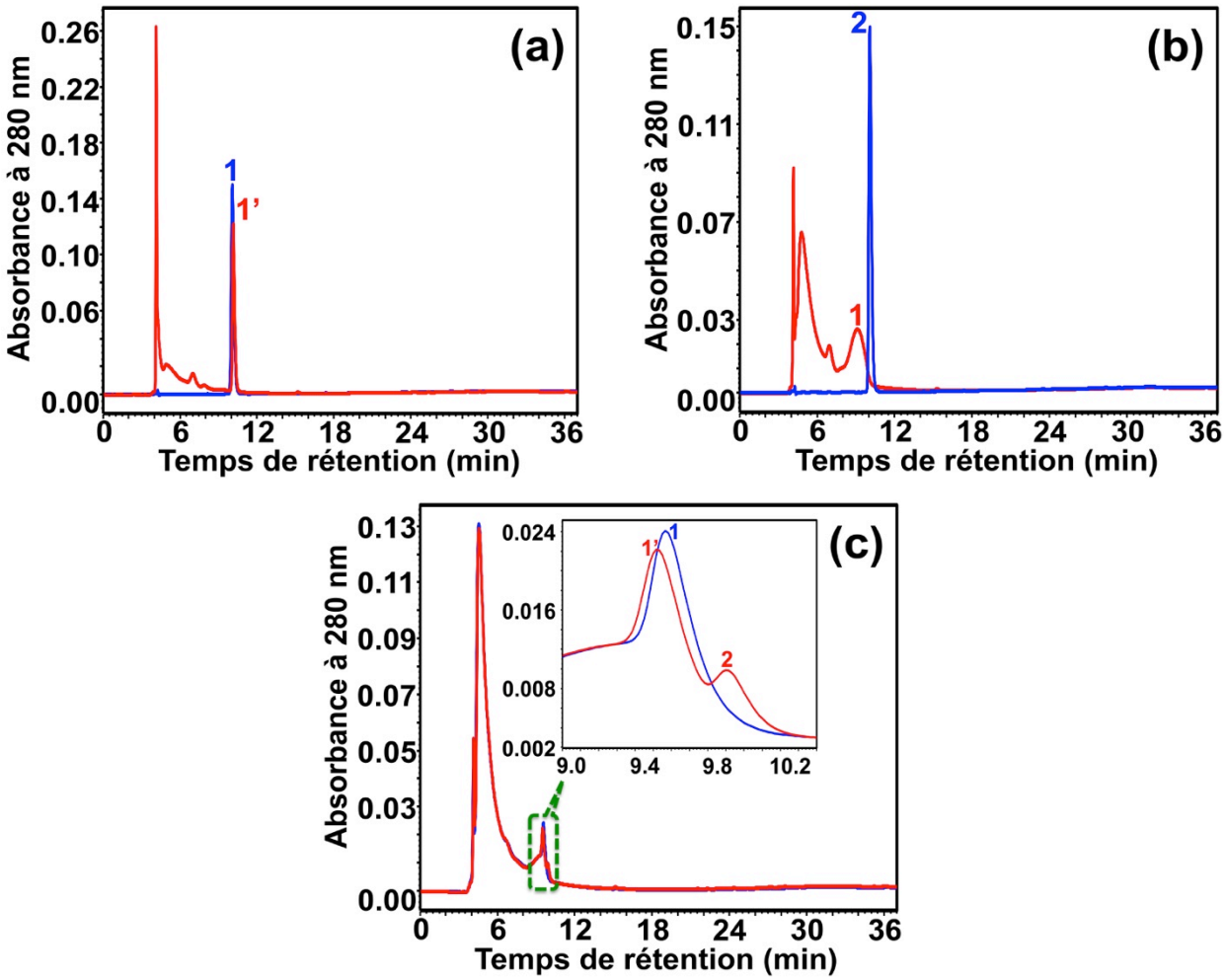


Figure 16. Visualisation chromatographique du produit de réduction par la LAR de la leucocyanidine.

Chromatogrammes HPLC sur colonne Atlantis C18. (a) Le substrat testé est la 3,4-cis-leucocyanidine; (b) Idem mais en l'absence de LAR; (c) Le substrat testé est la 3,4-trans-leucocyanidine.

La **figure 16c** montre la réaction enzymatique effectuée avec la 3,4-trans-leucocyanidine en présence de LAR (rouge) et son témoin négatif réalisé en absence de LAR (bleu), dans laquelle le pic 1' rouge et le pic 1 bleu correspondent tous les deux à la 3,4-trans-leucocyanidine. La légère diminution de 3,4-trans-leucocyanidine qui est observée, peut-être due à sa dégradation à 30°C pendant 30 min, et le pic 2 rouge (9,9 min) est en principe de la (+)-catéchine, qui est issue des petites quantités de 3,4-cis-leucocyanidine (13%) présente dans l'échantillon d'isomère de 3,4-trans

purifié (**figure 15b**). Aucune transformation de la 3,4-trans-leucocyanidine n'est observée avec la LAR, ce qui démontre qu'elle n'est pas acceptée comme substrat.

Nos données chromatographiques ayant confirmé que la LAR est active et spécifique de la 3,4-cis-leucocyanidine, le dosage enzymatique de cette 3,4-cis-leucocyannidine peut donc être effectué en point final en enregistrant la chute d'absorbance à 340 nm qui reflète la consommation de NADPH. Comme le montre la **figure 17**, une chute d'absorbance est observée immédiatement après l'addition de LAR, et cette absorbance se stabilise au bout de 15 min, ce qui indique que la réaction est terminée et que la 3,4-cis-leucocyanidine a été entièrement transformée par la LAR. La chute totale d'absorbance étant égale à 0,48, et celle du témoin étant égale à 0,08, la concentration initiale de 3,4-cis-leucocyanidine est égale à :

$[(0{,}48-0{,}08)/6220] \times (1020\ \mu l/10\ \mu l) = 6{,}5$ mM.

La quantité totale de 3,4-cis-leucocyanidine présente dans la solution de stockage est donc égale à $6{,}5 \times 10^{-3}$ mol/L $\times 2 \times 10^{-3}$ L $\times$ 306,26 g/mol = 3,98 mg.

Finalement, nous avons produit 5,28 mg (3,98 mg + 1,3 mg pour l'analyse RMN) de 3,4-cis-leucocyanidine au total, à partir de 90 mg de (+)-DHQ, et le rendement de production est donc seulement de l'ordre de 6%.

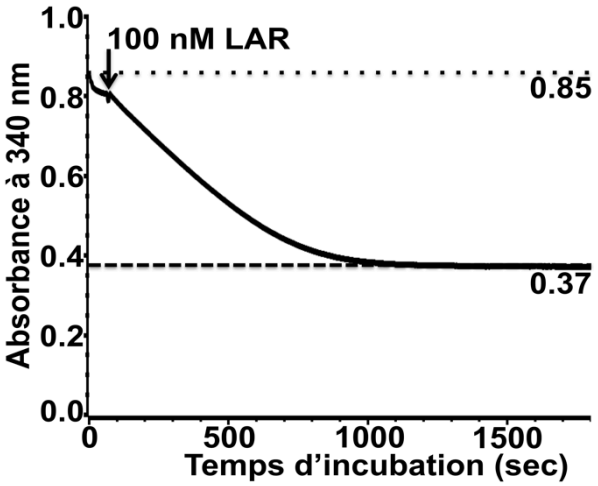


Figure 17. Dosage en point final de la 3,4-cis-leucocyanidine en présence de LAR.
Voir description dans le texte.

V. Vérification de la stabilité des deux stéréoisomères de leucocyanidine

Après 70 jours de stockage à -20°C dans H_2O, la stabilité des deux isomères 3,4-cis- et 3,4-trans-leucocyanidine est vérifiée par HPLC sur colonne µBondapak C18, et la concentration de 3,4-cis-leucocyanidine est mesurée à nouveau en utilisant la LAR, afin de calculer sa perte précise pendant 70 jours. L'analyse HPLC (**figure 18**) montre qu'il n'y a pas de différence importante de l'absorbance à 280 nm pour les deux isomères. Par ailleurs, les pertes de l'isomère 3,4-cis (pic 1, **figure 18a**) et de l'isomère 3,4-trans (pic 2, **figure 18b**) pendant 70 jours de conservation à -20°C, calculées à partir de la surface des pics chromatographiques, sont respectivement 5,8% et 3,8%. La concentration de 3,4-cis-leucocyanidine mesurée par dosage enzymatique LAR après conservation est égale à 6,14 mM, donc sa perte précise en pourcentage pendant 70 jours est [(6,5 mM-6,14 mM)/6,5 mM] × 100% = 5,5%, et cette valeur est très proche de celle obtenue par l'analyse HPLC (5,8%). Ceci suggère que l'analyse HPLC est fiable. Par conséquent, pour la 3,4-trans-leucocyanidine, qui ne peut pas être quantifiée par la LAR, la perte de 3,8% basée sur l'analyse HPLC est probablement assez fiable, même si nous n'avons pas pu obtenir de statistiques. En conclusion, nos données indiquent que les deux stéréoisomères de leucocyanidine sont assez stables dans un milieu aqueux congelé à -20°, et il est possible que l'isomère 3,4-trans soit légèrement plus stable que l'isomère 3,4-cis.

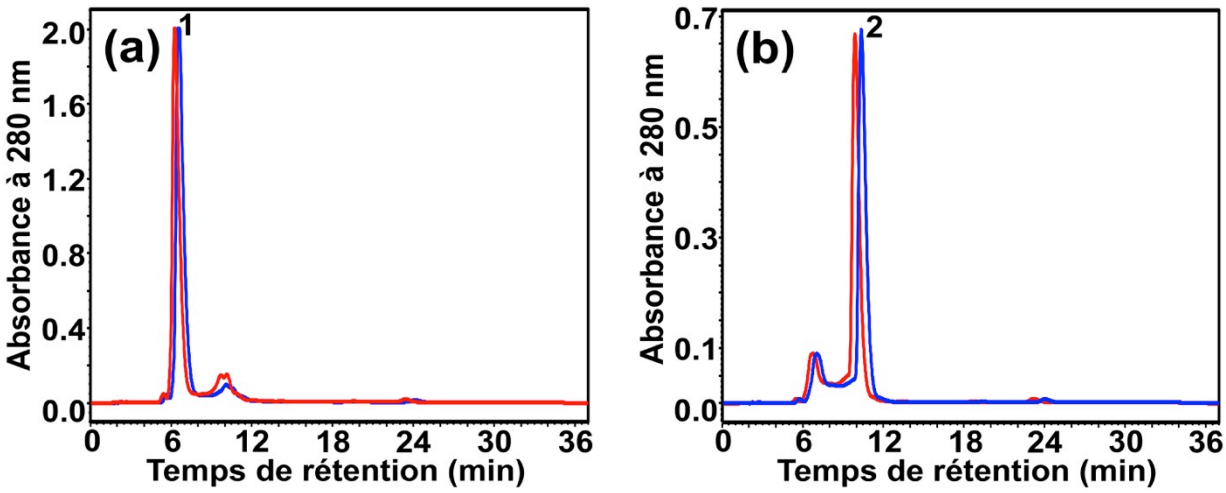


Figure 18. Analyse HPLC de la stabilité des isomères 3,4-cis- et 3,4-trans-leucocyanidine.

Colonne µBondapak C18. (a) Isomère 3,4-cis; (b) Isomère 3,4-trans. Les chromatogrammes des échantillons sans conservation sont montrés en bleu, et ceux des échantillons après 70 jours de conservation à -20°C sont montrés en rouge.

VI. Caractérisations des deux stéréoisomères de leucocyanidine par MS et MS/MS

Finalement, les deux stéréoisomères de leucocyanidine ont été caractérisés par MS et MS/MS. L'analyse MS de 3,4-cis-leucocyanidine a d'abord été effectuée, comme montré sur la **figure 19a**, quatre ions de *m/z* 289, 307, 329 et 345 sont observés dont l'un de *m/z* 307 correspond à l'ion $[M+H]^+$ de 3,4-cis-leucocyanidine, ceux de *m/z* 329 et 345 correspondent respectivement à l'ion $[M+Na]^+$ et $[M+K]^+$ de la 3,4-cis-leucocyanidine, celui de *m/z* 289 étant inconnu.

Ces quatre ions ont aussi été observés lors de l'analyse MS de la 3,4-trans-leucocyanidine (**figure 19b**), mais une plus faible intensité de signal de l'ion de *m/z* 289 a été observée, ainsi qu'une plus forte intensité de signal de l'ion de *m/z* 307 correspondant à l'ion $[M+H]^+$ de 3,4-trans-leucocyanidine. D'après ces résultats, il semble que la 3,4-trans-leucocyanidine soit plus stable que le 3,4-cis isomère dans nos conditions d'ionisation positive.

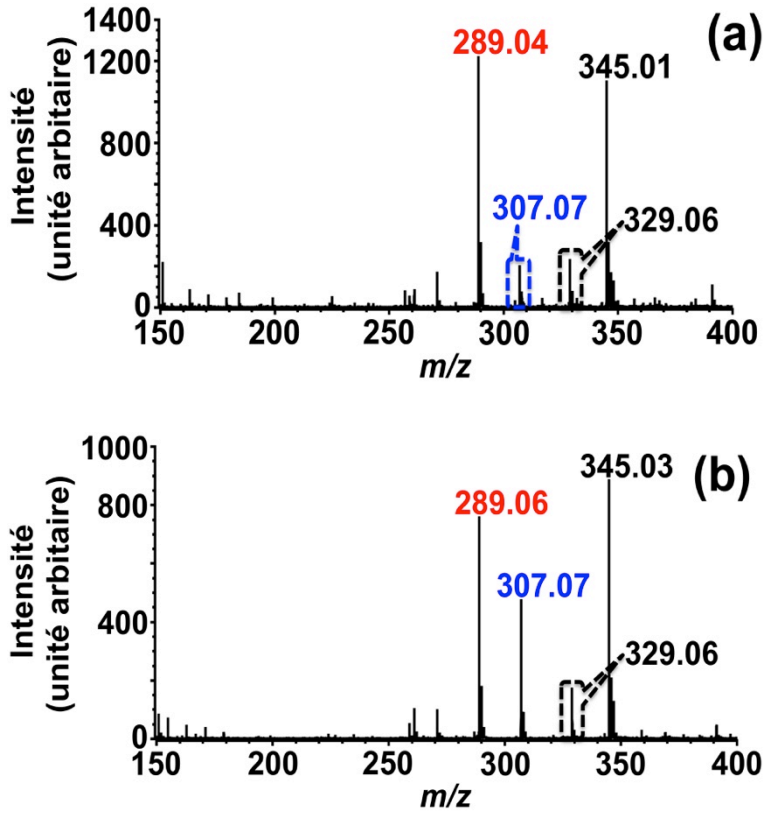


Figure 19. Analyse MS des deux stéréoisomères de leucocyanidine.

(a) 3,4-cis-leucocyanidine; (b) 3,4-trans-leucocyanidine.

VI.1. Analyse MS/MS des deux stéréoisomères de leucocyanidine

L'analyse MS/MS des deux ions de *m/z* 307 correspondant aux ions $[M+H]^+$ de 3,4-cis- et 3,4-trans-leucocyanidine (**figure 19**) a d'abord été effectuée. La fragmentation MS/MS de l'ion $[M+H]^+$ avec *m/z* 307 dérivé de 3,4-cis-leucocyanidine a produit 6 ions fragments majeurs de *m/z* 127, 139, 155, 163, 271 et 289 (**figure 20a**), alors que la fragmentation MS/MS de l'ion $[M+H]^+$ de *m/z* 307 dérivé de 3,4-trans-leucocyanidine a produit 5 ions fragment majeurs de *m/z* 127, 155, 163, 271 et 289 (**figure 20b**). Nous pouvons voir qu'il y a deux différences majeures entre le spectre MS/MS des deux stéréoisomères: l'observation de l'ion fragment de *m/z* 139 uniquement sur le spectre MS/MS de la 3,4-cis-leucocyanidine et l'inversion du rapport d'intensité du signal entre les ions fragments de *m/z* 155 et 163. Ces résultats indiquent que les deux stéréoisomères ont des voies de fragmentation distinctes qui n'ont jamais été décrites précédemment. De plus, il est clair que l'ion de *m/z* 327 observé sur les spectres de la **figure 20** n'est pas un ion fragment dérivé de la fragmentation MS/MS de l'ion $[M+H]^+$ de la leucocyanidine (*m/z* 307), et il est fort probable qu'il correspond à l'ion d'un adduit de potassium ayant une seule charge, qui s'est vraisemblablement formé par déplacement d'un proton sur l'ion fragment de *m/z* 289.

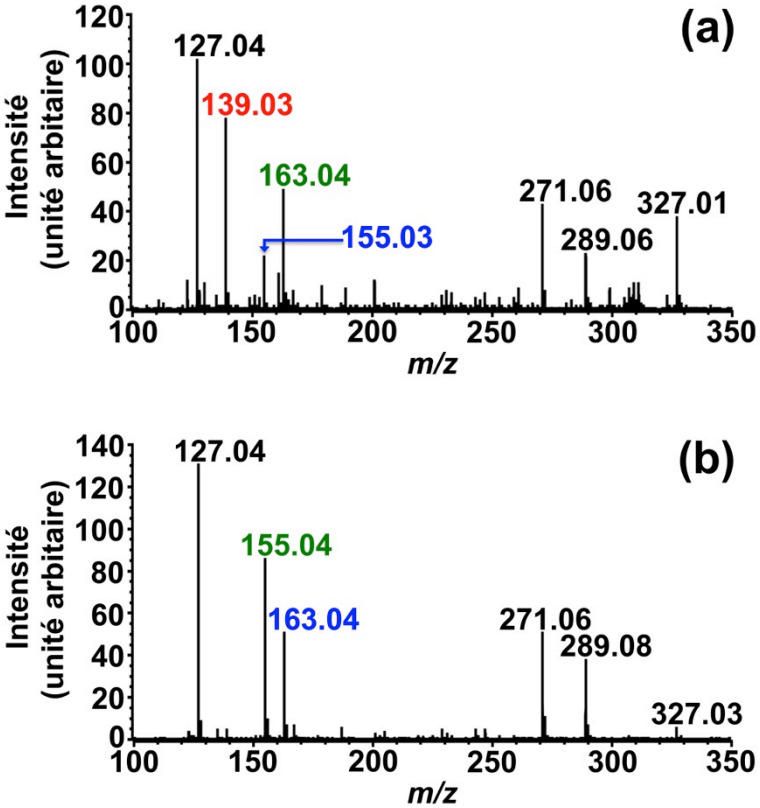


Figure 20. Analyse MS/MS de l'ion $[M+H]^+$ de *m/z* 307 dérivé des stéréoisomères 3,4-cis et 3,4-trans de la leucocyanidine.

(a) 3,4-cis-leucocyanidine; (b) 3,4-trans-leucocyanidine.

Les voies de fragmentation MS/MS de (+)-catéchine basées sur les ions de fragment dérivés de la fission Retro-Diels-Alder (RDA), du processus de fission hétérocyclique (Heterocyclic Ring Fission ou HRF en anglais) et du processus de formation de benzofurane (Benzofuran Forming ou BFF en anglais) ont été détaillées par ***Li et Deinzer*** (***2007***). Par analogie avec leur analyse, les voies de fragmentation MS/MS des deux stéréoisomères de leucocyanidine ont été établies à partir d'une combinaison de trois modèles de fragmentation distincts, incluant RDA, HRF et un processus supplémentaire de formation de méthylène quinone (quinone methide ou QM en anglais). Trois types différents d'élimination d'eau ont été envisagés, basés sur deux positions de protonation différentes de chacun des deux stéréoisomères de leucocyanidine (**figure 21**), et nous avons supposé que le mode de fragmentation MS/MS qui n'est observé qu'avec la 3,4-cis-leucocyanidine était dû à l'élimination d'eau en C_3-C_4 par perte du groupement hydroxyle en C_4 (**figure 21a**). L'élimination d'eau par formation de méthylène quinone (QM) ne peut en effet avoir lieu qu'avec la 3,4-cis-leucocyanidine **1** protonée sur son groupement hydroxyle en C_4, et l'ion fragment **1.1** de *m/z* 289 serait la seule source de l'ion fragment **1.2** de *m/z* 271. Comme le montre la partie droite de la **figure 21a**, la 3,4-cis-leucocyanidine **2** protonée sur l'atome d'oxygène du cycle C pourrait ne faire l'objet que des fissions RDA et HRF. L'ion fragment **2.1** de *m/z* 155 pourrait résulter directement de la fission RDA (307-152Da). L'élimination d'eau peut aussi avoir lieu sur l'ion précurseur **2** de *m/z* 307, via l'élimination du groupement hydroxyle en C_3 ou C_4. L'élimination d'eau en C_3-C_4 par perte du groupement hydroxyle en C_3 pourrait produire l'ion fragment **2.2** de *m/z* 289, à partir duquel l'ion fragment **2.4** de *m/z* 163 peut être formé par fission HRF (289-126Da), alors que l'élimination d'eau en C_3-C_4 par perte du groupement hydroxyle en C_4 pourrait produire l'ion fragment **2.5** de *m/z* 289, qui est la seule source de l'ion fragment **2.7** de *m/z* 139.

Quant à la voie de fragmentation MS/MS de 3,4-trans-leucocyanidine (**figure 21b**), tous les ions fragments de *m/z* 289 ont été obtenus par élimination d'eau, soit par formation de QM **1.1** issu de la 3,4-trans-leucocyanidine **1** protonée sur le groupement hydroxyle en C_4, soit par extrusion du groupement hydroxyle en C_3 à partir de la 3,4-trans-leucocyanidine **2** protonée sur l'atome d'oxygène du cycle C, mais aucune élimination d'eau par perte du groupement hydroxyle en C_4 n'a été observée.

D'après les spectres MS/MS de la **figure 20**, les différences majeures entre les spectres des deux stéréoisomères portent sur deux ions fragments de *m/z* 139 et *m/z* 155. L'ion fragment de *m/z* 139 observé uniquement sur le spectre MS/MS de 3,4-cis-leucocyanidine a été enregistré comme un ion fragment majeur, ce qui indique que la 3,4-cis-leucocyanidine est préférentiellement protonée sur l'atome d'oxygène du cycle C (**2**, **figure 21a**), et c'est cette 3,4-cis-leucocyanidine protonée qui fait

l'objet d'une élimination d'eau par extrusion du groupement hydroxyle en C_4 (**2**, **figure 21a**), formant un ion fragment de *m/z* 289 qui est abondant (**2.5**, **figure 21a**) et qui donne finalement l'ion fragment de *m/z* 139 (**2.7**, **figure 21a**). D'autre part, la forte intensité du signal de l'ion de *m/z* 155 observé avec la 3,4-trans-leucocyanidine indique que la 3,4-trans-leucocyanidine est elle aussi préférentiellement protonée sur l'atome d'oxygène du cycle C (**2**, **figure 21b**), mais l'ion $[M+H]^+$ correspondant se fragmente principalement par fission RDA sans élimination d'eau, ce qui produit un abondant ion fragment de *m/z* 155 (**2.1**, **figure 21b**).

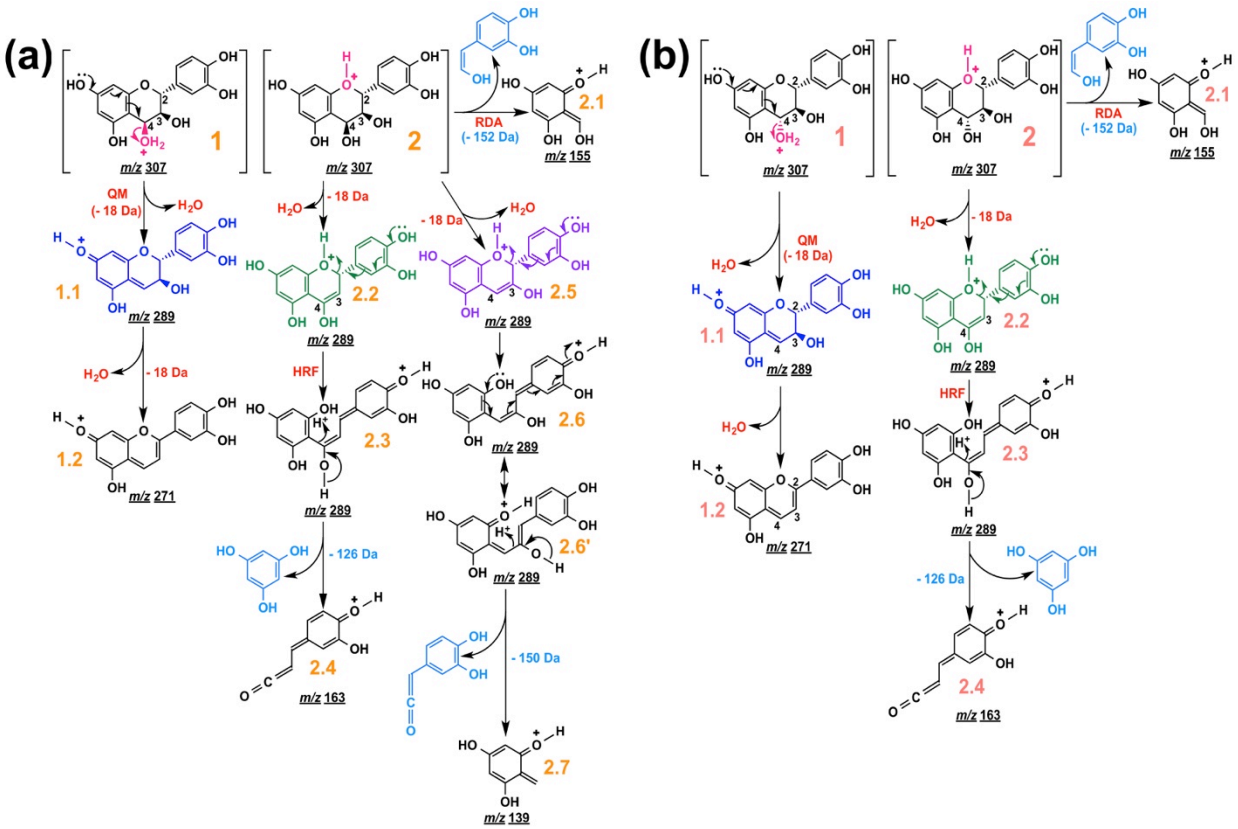


Figure 21. Voies de fragmentation MS/MS proposées pour la 3,4-cis-leucocyanidine et la 3,4-trans-leucocyanidine.
Trois modes de fragmentation distincts sont envisagés: RDA, HRF et QM.
(a) 3,4-cis-leucocyanidine; (b) 3,4-trans-leucocyanidine.

Un commentaire final peut être fait sur l'ion de *m/z* 327 (**figure 20**) qui est supposé être un adduit potassium de l'ion fragment de *m/z* 289. L'intensité du signal de l'ion de *m/z* 327 qui est observée avec l'isomère 3,4-cis est effectivement plus forte que celle observée avec l'isomère 3,4-trans, ce qui suggère que sensiblement plus d'ion fragment de *m/z* 289 a été produit avec le premier. Ceci est en accord avec l'existence de deux voies de déshydratation en C_3-C_4 pour l'isomère 3,4-cis (perte de OH en C_3 ou C_4) par rapport à une seule pour le 3,4-trans isomère (perte de OH en C_3).

Les voies de fragmentation MS/MS des deux stéréoisomères de leucocyanidine que nous proposons sur la **figure 21** restent inévitablement hypothétiques. Une analyse MS^3 supplémentaire des ions fragment de *m/z* 289 observés lors de l'analyse MS/MS des deux stéréoisomères de leucocyanidine (**figure 20**) pourrait selon nous lever toute incertitude, sous réserve que la sensibilité des signaux obtenus soit suffisante.

VI.2. Analyse MS/MS des deux ions de *m/z* 289 obtenus lors de l'analyse MS des deux stéréoisomères de leucocyanidine

Lors de l'analyse MS/MS des ions $[M+H]^+$ de *m/z* 307 dérivés des deux stéréoisomères de leucocyanidine, deux ions fragments de *m/z* 289 ont été observés (**figure 20**), et ils sont formés par élimination d'eau sur les deux stéréoisomères protonés (**figure 21**). De plus, d'après nos résultats d'HPLC précédents (**figure 15**), il est clair que les échantillons des deux stéréoisomères sont très purs, et il n'est pas possible que l'ion de *m/z* 289 (**figure 19**) correspond à l'ion $[M+H]^+$ du contaminant inconnu présent dans les échantillons. Donc, il est certain que les deux ions de *m/z* 289 (**figure 19**) sont eux aussi formés par élimination d'eau sur les deux stéréoisomères protonés.

Afin de bien comprendre le type d'élimination d'eau conduisant à la formation des deux ions de *m/z* 289, l'analyse MS/MS de ces deux ions a été réalisée. Comme le montre la **figure 22**, les ions fragments MS/MS des deux ions de *m/z* 289 sont identiques, ne présentant que certaines différences sur l'intensité de signal, ce qui indique que ces deux ions de *m/z* 289 sont formés à partir d'un même ion précurseur, ou éventuellement identiques. De plus, aucun ion fragment de *m/z* 123, 135, 151 ou 259 (**figure 22**) ne peut être formé à partir des trois ions fragments **1.1**, **2.2** et **2.5** de *m/z* 289 présentés sur la **figure 21**, ce qui implique que l'ion de *m/z* 289 observé sur la **figure 19** est différent de ces trois ions fragments.

Etant donné que l'ion fragment de *m/z* 139 n'est observé que sur le spectre MS/MS de la 3,4-cis-leucocyanidine (**figure 20**), il est certain que la stéréochimie de la leucocyanidine sur le carbone C_4 influence fortement la fragmentation MS/MS. Néanmoins, comme le montre la **figure 22**, la fragmentation MS/MS des deux ions de *m/z* 289 (**figure 19**) est la même, quelle que soit son origine (3,4-cis- ou 3,4-trans-leucocyanidine), ce qui indique que l'effet de la stéréochimie en C_4 a été éliminé lors de la formation de ces deux ions. Donc, la seule explication possible est que l'élimination d'eau est réalisée par perte du groupement hydroxyle en C_4 lors de l'analyse MS, pour la 3,4-cis- comme pour la 3,4-trans-leucocyanidine, ce qui implique *a priori* une protonation du groupement hydroxyle en C_4, comme le montre la **figure 23a**. En mode MS, les deux ions de *m/z*

289 peuvent ensuite être formés à partir du produit déshydraté (méthylène quinone) par protonation de la cétone de son cycle A (**1**, **figure 23**) ou de l'atome d'oxygène du cycle C (**2**, **figure 23**).

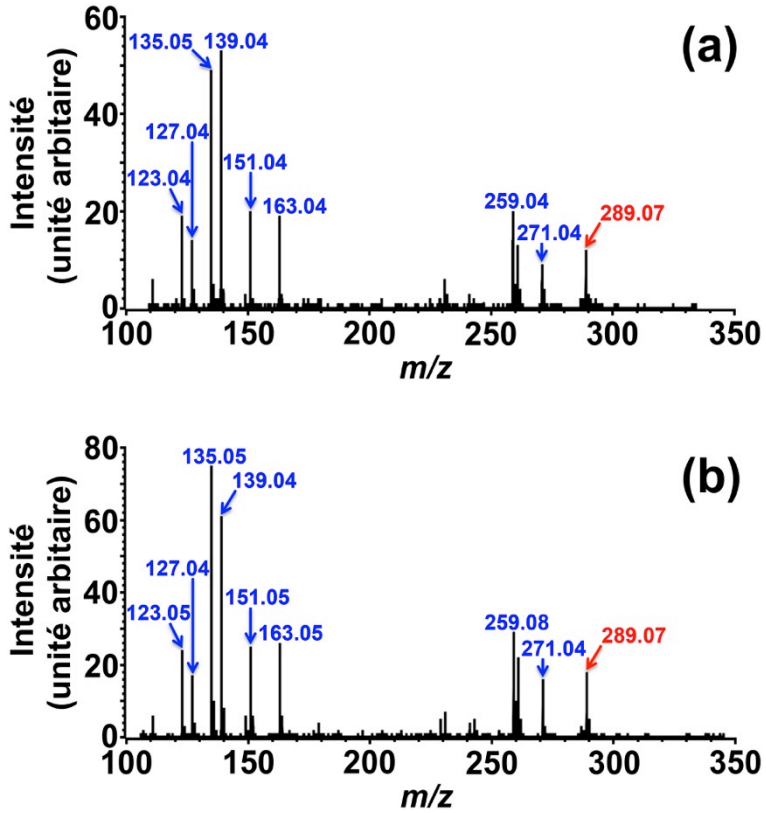
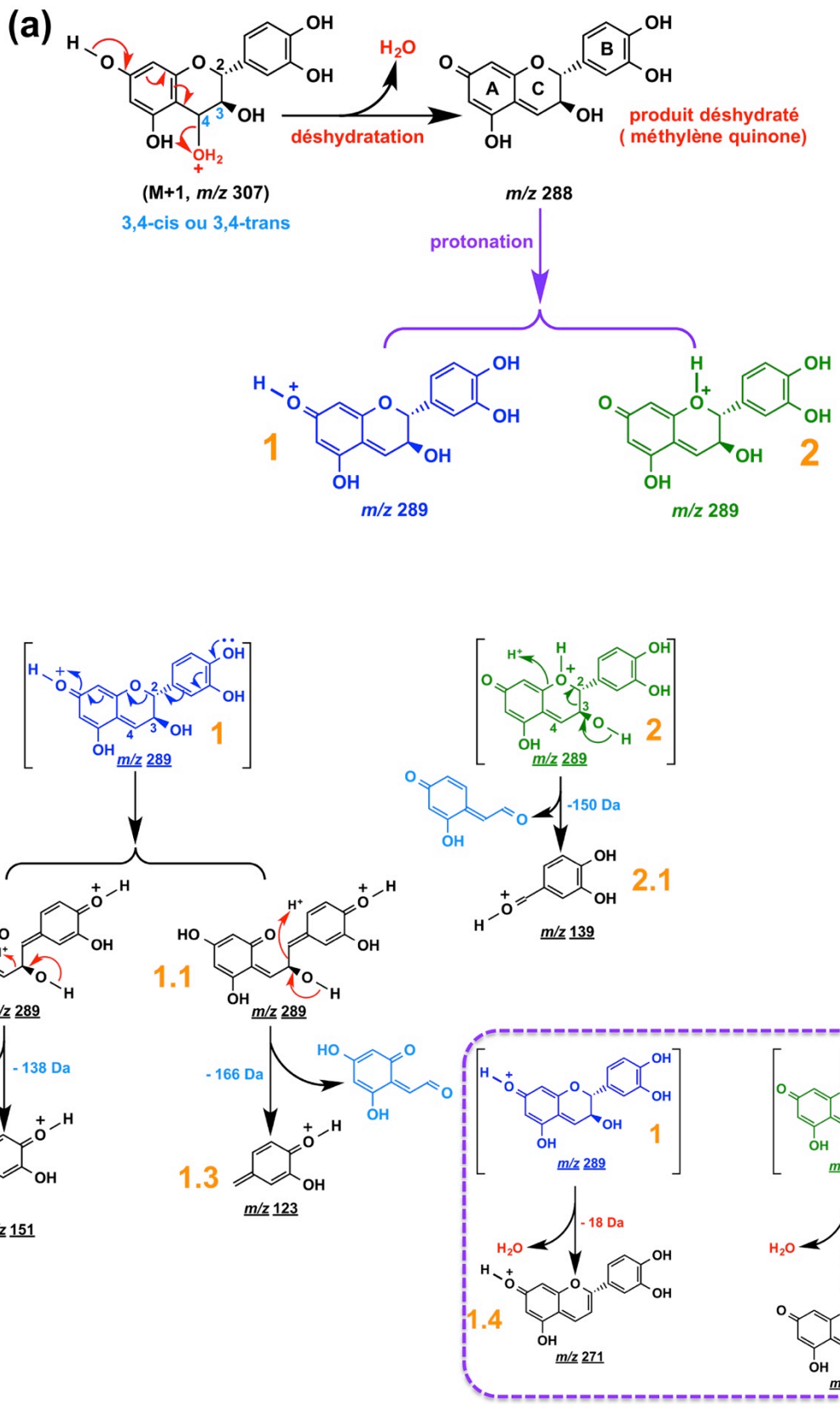


Figure 22. Analyse MS/MS de l'ion de *m/z* 289 observé lors de l'analyse MS des deux stéréoisomères de leucocyanidine.

(a) 3,4-cis-leucocyanidine; (b) 3,4-trans-leucocyanidine.

Sur la base de nos voies de fragmentation MS/MS des deux stéréoisomères de leucocyanidine (**figure 21**), les voies de fragmentation MS/MS des deux ions de *m/z* 289 (**figure 23**) ont été établies. Comme le montre la **figure 23**, l'ion fragment **1.2** de *m/z* 151 pourrait être formé à partir de l'ion **1** de *m/z* 289 par déprotonation (289-138Da), ainsi que l'ion de fragment **1.3** de *m/z* 123 (289-166Da). L'ion **2** de *m/z* 289 est la seule source de l'ion fragment **2.1** de *m/z* 139 (289-150Da). Par ailleurs, l'élimination d'eau pourrait aussi avoir lieu avec l'ion **1** de *m/z* 289 et l'ion **2** de *m/z* 289, formant respectivement l'ion fragment **1.4** de *m/z* 271 et l'ion fragment **2.2** de *m/z* 271.


(a)
H2O
déshydratation
produit déshydraté
(méthylène quinone)
(M+1, m/z 307)
3,4-cis ou 3,4-trans
m/z 288
protonation
1
2
m/z 289
m/z 289
(b)
1
2
m/z 289
m/z 289
-150 Da
2.1
m/z 139
1.1
1.1
m/z 289
m/z 289
- 138 Da
- 166 Da
1.2
1.3
m/z 151
m/z 123
1
2
m/z 289
m/z 289
- 18 Da
- 18 Da
1.4
2.2
m/z 271
m/z 271

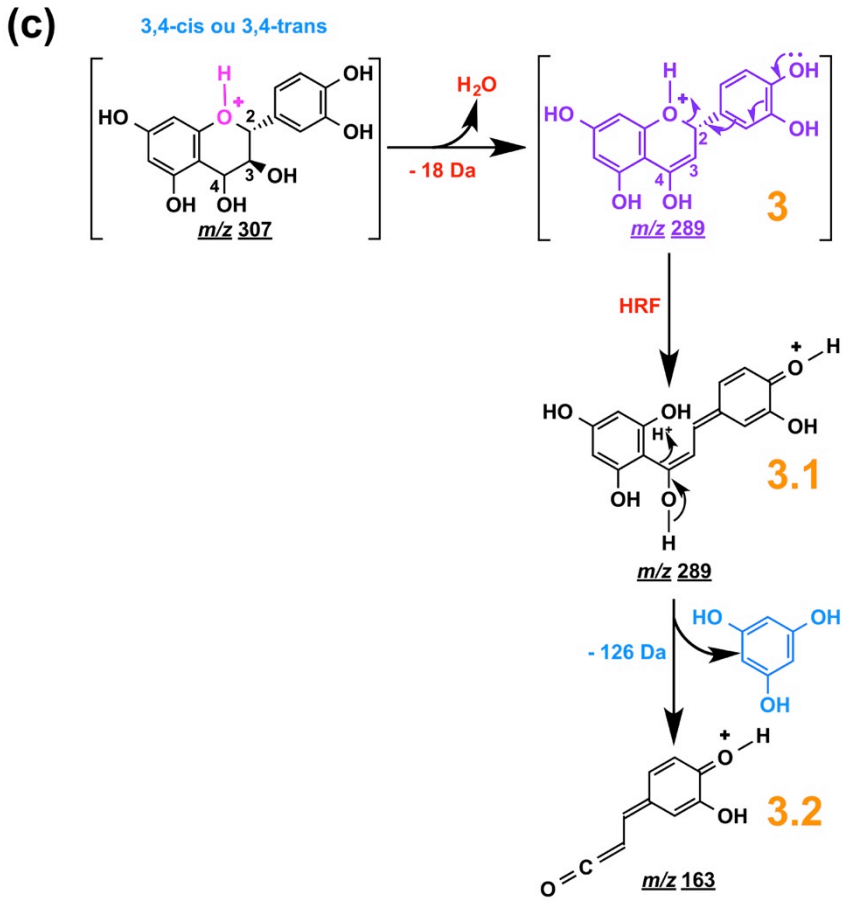


Figure 23. Hypothèse de formation et décomposition des ions de *m/z* 289.

(a) Formation lors de l'analyse MS des deux stéréoisomères de leucocyanidine formés; (b et c) Voies de fragmentation MS/MS proposées pour les ions de *m/z* 289.

Par ailleurs, comme le montre la **figure 23c**, la leucocyanidine pourrait aussi être protonée sur l'atome d'oxygène du cycle C, formant l'ion de *m/z* 307. L'élimination d'eau par perte du groupement hydroxyle en C_4 pourrait avoir lieu avec cet ion de *m/z* 307, pour donner l'ion fragment **3** de *m/z* 289, à partir duquel l'ion fragment **3.2** de *m/z* 163 pourrait être formé par fission HRF.

D'après les spectres MS/MS de la **figure 22**, la forte intensité du signal de l'ion fragment de *m/z* 139 indique que le produit déshydraté sous forme méthylène quinone (**figure 23a**) a été principalement protoné sur l'atome d'oxygène du cycle C (**2**, **figure 23**), donnant un abondant ion fragment **2.1** de *m/z* 139 (**figure 23b**).

Enfin, la voie de formation des ions fragments de *m/z* 135 et 259 (**figure 22**) n'est quant à elle pas totalement claire, et une analyse MS^3 supplémentaire nous donnerait peut-être la réponse.

Partie 3 Etude des propriétés catalytiques de l'anthocyanidine synthase de *Vitis vinifera* (*Vv*ANS)

I. Mise au point des tests d'activité de *Vv*ANS

Les premiers tests d'activité de la *Vv*ANS ont été faits dans un tampon MES 20 mM, pH 6,5. Le mélange de réaction (2 ml) contient 10^{-7} M de *Vv*ANS non étiquetée, 100 µM de substrat polyphénolique, 2 mM d'ascorbate, 1 mM de 2OG, 0,1 mM de $FeSO_4$ et 0,1 mg/ml de catalase dans le tampon précité, et la réaction est déclenchée par l'addition du substrat. Après 30 min d'incubation à 30°C sous agitation douce, l'activité de la *Vv*ANS est analysée par HPLC sur colonne Atlantis C18.

Turnbull et coll. (***2004***) ont montré que la dihydroquercétine (+)-DHQ était transformée par l'ANS d'*Arabidopsis thaliana* en un seul produit, la quercétine. C'est pourquoi nous avons réalisé les premiers tests d'activité en utilisant ce substrat probable. Comme le montre la **figure 24a**, le chromatogramme HPLC de 100 µM de standard commercial de (+)-DHQ dans le mélange réactionnel sans ANS met en évidence deux pics. Le pic 1 (14,3 min) est la (+)-DHQ, et le pic 2 (16,3 min) est un contaminant du standard commercial. Comme le montre la **figure 24b**, ces deux pics sont à nouveau observés sur le chromatogramme HPLC de la réaction réalisée avec (+)-DHQ en présence de 10^{-7} M de *Vv*ANS, mais aucun nouveau pic n'est observé.

Nous avons donc augmenté la concentration d'enzyme, et comme le montre la **figure 24c**, pour une concentration de *Vv*ANS égale à 10^{-6} M, un nouveau pic (pic 3 bleu, 20,6 min) est observé, qui correspond à la quercétine, d'après le temps de rétention d'un standard commercial (pic 3' rouge, 20,2 min).

Ces résultats démontrent que la *Vv*ANS que nous avons produite est active, et que la (+)-DHQ est reconnue comme substrat. En revanche, on observe une concentration importante de (+)-DHQ résiduelle (pic 1 bleu, **figure 24c**) après 30 min de réaction en présence de 10^{-6} M de *Vv*ANS, ce qui suggère que l'activité est faible ou que l'enzyme est assez fortement inhibée par la quercétine produite. C'est pourquoi nous avons souhaité tester rapidement un autre substrat potentiel, la catéchine.

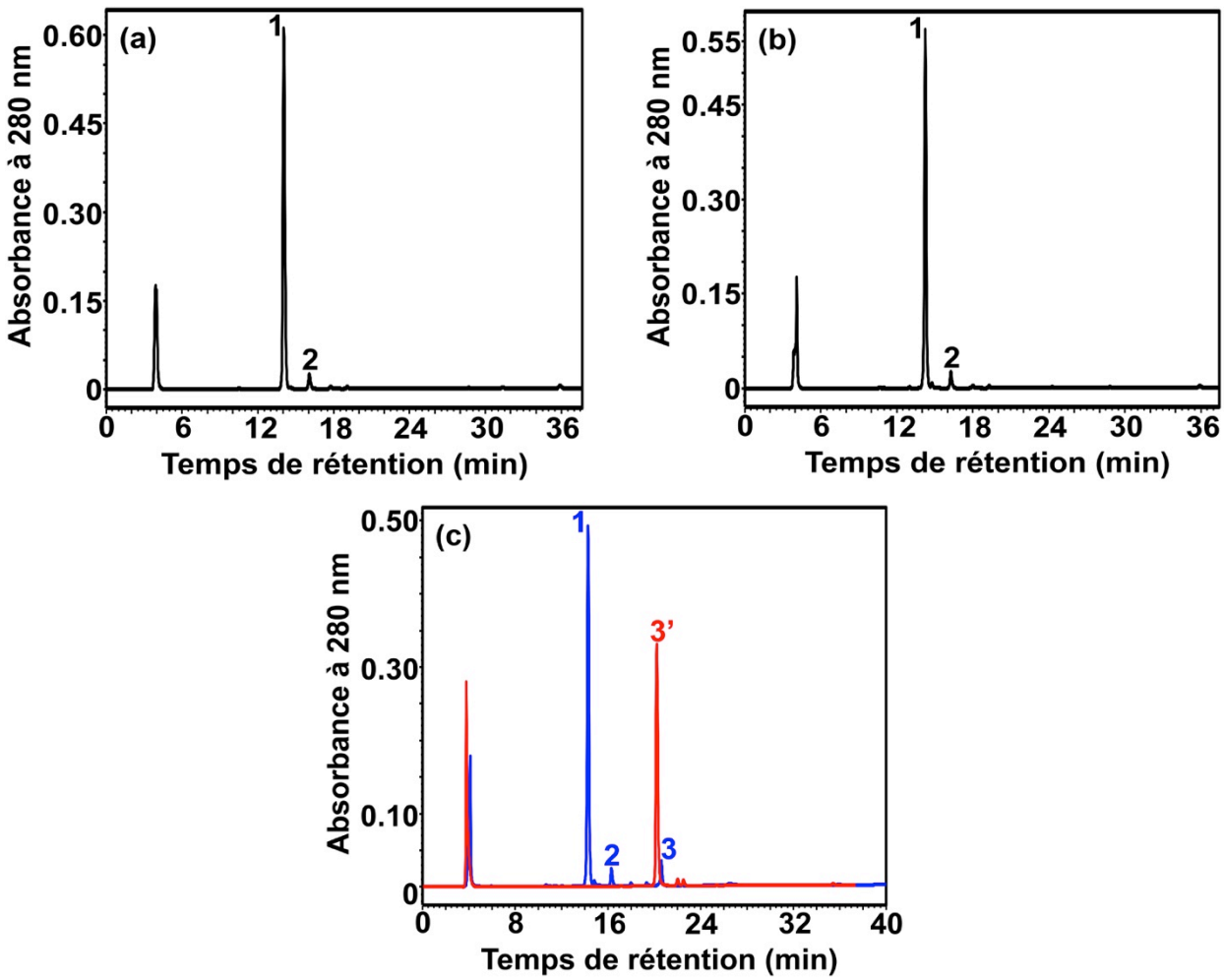


Figure 24. Analyse chromatographique de la transformation enzymatique de la dihydroquercétine en quercétine par la *Vv*ANS.

Chromatogrammes HPLC sur colonne Atlantis C18. (a) Echantillon de standard commercial de (+)-DHQ; (b) Extrait du milieu réactionnel contenant 10^{-7} M de *Vv*ANS, 30 min après introduction d'une concentration initiale de 100 µM de (+)-DHQ; (c) Echantillon de 100 µM de standard commercial de quercétine (en rouge).

Wellmann et coll. (***2006***) avaient en effet montré que la (+)-catéchine était un substrat de l'ANS de *Gerbera hybrida*. La dégradation non-enzymatique de la (+)-catéchine dans le mélange réactionnel sans *Vv*ANS nous a servi de témoin négatif. Comme le montre la **figure 25** (en bleu), un seul pic (pic 2', 9 min) est observé sur le chromatogramme HPLC de ce témoin négatif, qui correspond à la (+)-catéchine, et aucun nouveau produit n'a été observé. Le chromatogramme HPLC de la réaction enzymatique révèle quatre pics majeurs (**figure 25**, en rouge). Le pic 2 rouge est la (+)-catéchine résiduelle, et les trois autres pics correspondent *a priori* à de nouveaux produits enzymatiques. La concentration de (+)-catéchine résiduelle est très faible après la réaction enzymatique, c'est-à-dire qu'environ 85% de la (+)-catéchine ont été transformés par la *Vv*ANS. L'enzyme est par conséquent beaucoup plus active sur la (+)-catéchine que sur la dihydroquercétine.

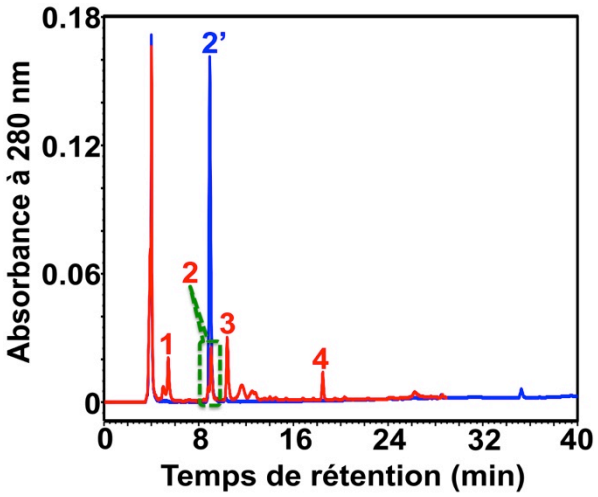


Figure 25. Analyse chromatographique de la transformation enzymatique de la (+)-catéchine par la *Vv*ANS.

Chromatogrammes HPLC sur colonne Atlantis C18. En rouge: Extrait du milieu réactionnel contenant 10^{-6} M de *Vv*ANS, 30 min après introduction d'une concentration initiale de 100 µM de (+)-catéchine; en bleu: témoin négatif en l'absence d'enzyme.

Ces résultats démontrent que la *Vv*ANS produite est bien active, mais que la (+)-DHQ n'est pas un bon substrat de la *Vv*ANS. En revanche, l'activité observée sur la (+)-catéchine est assez forte, si bien que nous avons décidé d'utiliser la (+)-catéchine pour vérifier l'activité de la *Vv*ANS après chaque production d'enzyme.

L'oxygène est un cosubstrat et le Fe(II) est un cofacteur essentiel de l'ANS. Leur présence dans le milieu réactionnel est nécessaire pour que l'on puisse observer une activité enzymatique, mais l'incubation de l'enzyme en présence d'un sel de Fe(II) pose un problème de contrôle de l'oxygène dissout. L'oxygène dissout dans le milieu réactionnel est en effet inévitablement consommé sans intervention de l'enzyme, par réaction avec le sel de Fe(II), laquelle est d'ailleurs *a priori* suivie d'une réaction de Fenton avec le peroxyde d'hydrogène qui est produit dans la solution aqueuse. Comme le montre la **figure 26**, l'excès d'ascorbate devrait maintenir l'essentiel du sel de fer sous la forme Fe(II), mais la concentration d'oxygène dissout doit chuter et n'atteint pas forcément une valeur stationnaire. Il est probable qu'elle soit à la fois très inférieure aux 200-300 µM typiquement observés dans un milieu aqueux contenant un peu de méthanol équilibré à PO_2 ambiante, et de toute façon peu stable. Il y a donc là un facteur limitant probable de l'activité enzymatique et une difficulté potentielle de non reproductibilité des résultats.

Par ailleurs, le radical hydroxyle ($OH^{\bullet}$) formé lors de la réaction de Fenton peut inactiver l'ANS et induire une dégradation non-enzymatique des substrats polyphénoliques dans le milieu réactionnel.

Dans un premier temps, faute de disposer d'une méthode de production du complexe enzyme-Fer, nous avons dû conserver l'introduction du sel de Fe(II) dans le milieu réactionnel, mais nous avons essayé de diminuer autant que possible sa concentration afin d'éviter les problèmes précités et leurs conséquences délétères sur l'analyse quantitative et précise de la réaction enzymatique.

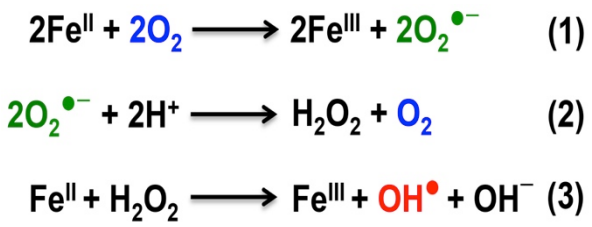


Figure 26. Réaction du sel de Fe(II) avec l'oxygène O_2 et le peroxyde d'hydrogène H_2O_2.

(1) Réduction de l'oxygène en anion superoxyde; (2) Dismutation spontanée du superoxyde en oxygène et peroxyde d'hydrogène, processus relativement favorable à pH 6-7; (3) Réaction de Fenton, source de radical hydroxyle extrêmement réactif, en particulier sur les polyphénols.
Le recyclage du Fe(II) à partir du Fe(III) est assuré par l'ascorbate en excès, mais la concentration d'oxygène dissout chute inévitablement et de manière incontrôlée.

Nous avons ainsi pu diminuer la concentration de Fe(II) jusqu'à une valeur dix fois inférieure, soit 10 µM dans le mélange réactionnel contenant 10^{-6} M de *Vv*ANS. Le chromatogramme HPLC du milieu de réaction enzymatique montre encore quatre pics majeurs (**figure 27a**), et comme le montre la **figure 27b**, ces quatre pics (en rouge) sont identiques aux quatre pics observés (en bleu), lors de la réaction enzymatique réalisée avec 10^{-6} M de *Vv*ANS en présence de 100 µM de Fe(II). La *Vv*ANS fonctionne donc au moins aussi bien que précédemment en présence de seulement 10 µM de Fe(II). Une concentration de 10 µM de Fe(II) a donc été utilisée par la suite.

Les tests d'activité décrits ci-dessus ont été faits à la fin du mois de juillet 2015. Cependant, quand nous avons répété l'expérience réalisée avec la (+) catéchine en présence de 10 µM de Fe(II) au début du mois de septembre 2015, l'activité *Vv*ANS observée s'est avérée beaucoup plus faible.
Nous avons estimé *a posteriori* que le problème était très certainement dû à un mauvais contrôle de la température en raison d'un dysfonctionnement non détecté à temps de notre système de thermostatation par bain à circulation.

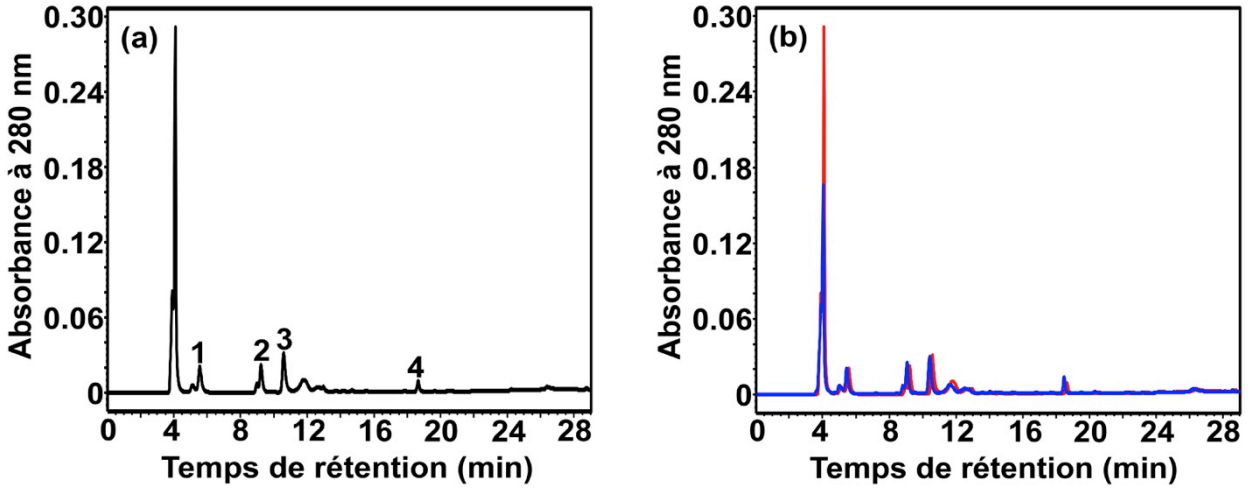


Figure 27. Analyse chromatographique de la transformation enzymatique de la (+)-catéchine par la *Vv*ANS en présence de 100 ou 10 µM de Fe(II).

Chromatogrammes HPLC sur colonne Atlantis C18. Extrait du milieu réactionnel contenant 10^{-6} M de *Vv*ANS après addition d'une concentration initiale de (+)-catéchine égale à 100 µM. (a) Le milieu contient 10 µM de Fe(II); (b) Le milieu contient 100 µM de Fe(II) (tracé en bleu) et le tracé obtenu en (a) a été reproduit en rouge.

Ces observations nous ont cependant conduits à tester avec soin différentes températures et à privilégier une température légèrement plus élevée qu'auparavant.

Comme le montre la **figure 28**, nous avons retrouvé à 33°C une activité enzymatique très proche de celle observée à une température supposée égale à 30°C en juillet.

Nous avons finalement décidé d'effectuer par la suite toutes nos mesures d'activité enzymatique à 35°C, température fournissant encore un meilleur compromis entre temps de réaction et absence de dénaturation thermique de l'enzyme (données non montrées).

L'effet du pH sur l'activité de la *Vv*ANS n'a pas été étudié en détail, car il nous a semblé indispensable de ne pas dépasser un pH égal à 6,5 dans un milieu contenant un sel de Fe(II) libre, de manière à éviter les réactions non-enzymatiques d'oxydation monoélectronique des formes mono-déprotonées (phénolate) de nos substrats polyphénoliques.

Nous avons toutefois trouvé que l'activité de la *Vv*ANS à pH 6,3 était un peu plus élevée qu'à pH 6,5 (données non montrées), et nous avons donc décidé de travailler à pH 6,3.

En conclusion, nous avons finalement fixé les conditions de réaction enzymatique suivantes:

Incubation de 30 min à 35°C dans un mélange réactionnel contenant 10^{-6} M de *Vv*ANS, 100 µM de substrat polyphénolique, 2 mM d'ascorbate, 1 mM de 2OG, 10 µM de $FeSO_4$, 0,1 mg/ml de catalase et 5% de méthanol (v/v) dans un tampon MES 20 mM, pH 6,3, la réaction étant déclenchée par l'addition du substrat.

Compte tenu de la présence de NaCl 500 mM dans la solution mère d'enzyme, on notera que la concentration finale de NaCl dans le milieu réactionnel est égale à 20 mM.

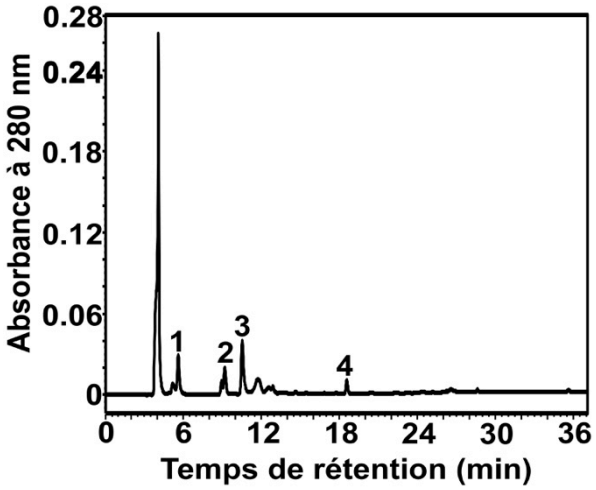


Figure 28. Analyse chromatographique de la transformation enzymatique de la (+)-catéchine par la *Vv*ANS à 33°C.

Chromatogrammes HPLC sur colonne Atlantis C18. Les concentrations et le temps d'incubation sont les mêmes que sur la **figure 27**, mais cette expérience a été réalisée de manière certaine à 33°C en septembre 2015, alors que la température de 30°C indiquée sur la **figure 27** était peut être imprécise.

II. Identification des différents types de substrats de la *Vv*ANS

II.1. Test de l'activité de la *Vv*ANS sur différentes familles de polyphénols

Turnbull et coll. (***2001***, ***2003***, et ***2004***) ont montré que l'ANS d'*Arabidopsis thaliana* (*At*ANS) catalysait la transformation de différents substrats polyphénoliques en plusieurs produits. Dans un premier temps, il nous a donc semblé pertinent d'étudier les mêmes familles de substrats potentiels avec la *Vv*ANS.

Douze polyphénols de quatre familles différentes (flavanone, dihydroflavonol, flavan-3-ol et flavan-3,4-diol) ont ainsi été testés. L'activité de la *Vv*ANS sur ces polyphénols a été analysée par HPLC en phase inverse sur colonne Atlantis C18. Nous nous sommes efforcés d'utiliser des standards commerciaux pour identifier les produits enzymatiques des polyphénols se comportant comme des substrats de la *Vv*ANS.

II.1.1. Flavanones

La naringénine est un polyphénol de la sous-famille des flavanones au sein des flavonoïdes. Comme il a été mentionné précédemment (***Welford et coll.***, ***2005b***), les deux stéréoisomères de naringénine

(2S- et 2R-naringénine) sont substrats de l'ANS d'*Arabidopis thaliana*. La 2S-naringénine est transformée par l'*At*ANS en un produit majeur qui est le (-)-épidihydrokaempférol (épiDHK), comme le montre la **figure 29a**, et la 2R-naringénine est transformée par l'*At*ANS en un autre produit majeur qui est l'apigénine, comme le montre la **figure 29b**. La naringénine a donc été testée comme substrat potentiel de la *Vv*ANS, mais nous avons utilisé la naringénine racémique ((±)-naringénine) du commerce, les standards des deux stéréoisomères de naringénine n'étant pas commercialisés.

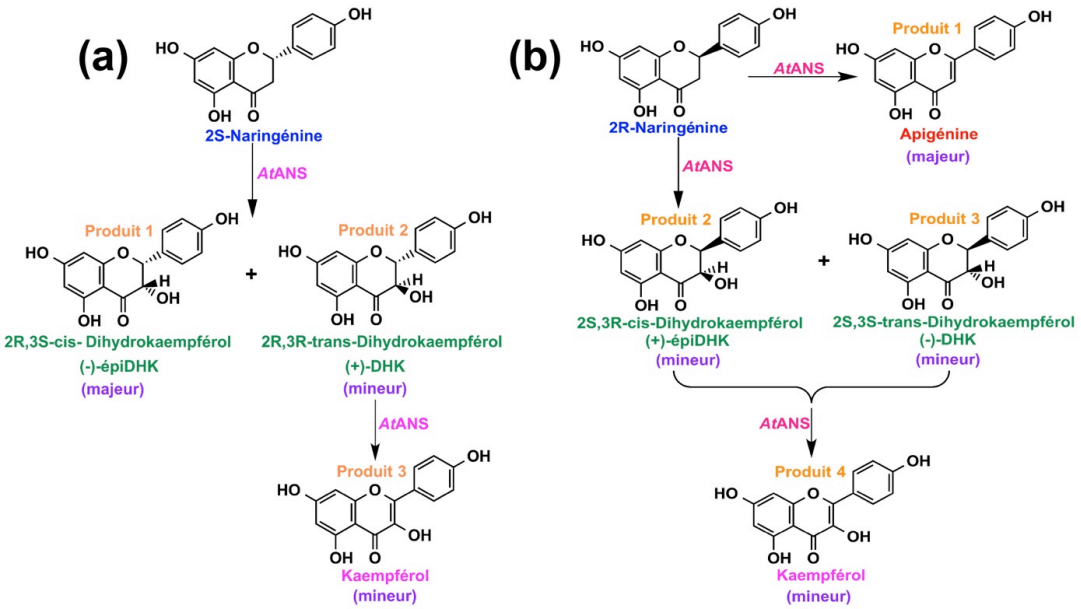


Figure 29. Transformations de la naringénine par l'anthocyanidine synthase d'*Arabidopsis thaliana* (*At*ANS).

(a) 2S-naringénine; (b) 2R-naringénine. D'après ***Welford et coll.*** (***2005b***)

Pour une concentration initiale de 100 µM de (±)-naringénine en l'absence de *Vv*ANS, on observe un seul grand pic sur le chromatogramme HPLC (**figure 30a**), qui correspond à la naringénine (pic 2, 19,9 min), le pic 1 (15,9 min) étant un contaminant inconnu du produit commercial racémique. Comme le montre la **figure 30b**, ces deux pics sont retrouvés à l'identique en présence de 10^{-6} M de *Vv*ANS et 100 µM de (±)-naringénine, et aucun produit n'est observé. La naringénine n'est donc pas substrat de la *Vv*ANS, contrairement à ce qui est observé avec l'enzyme d'*Arabidopsis thaliana*.

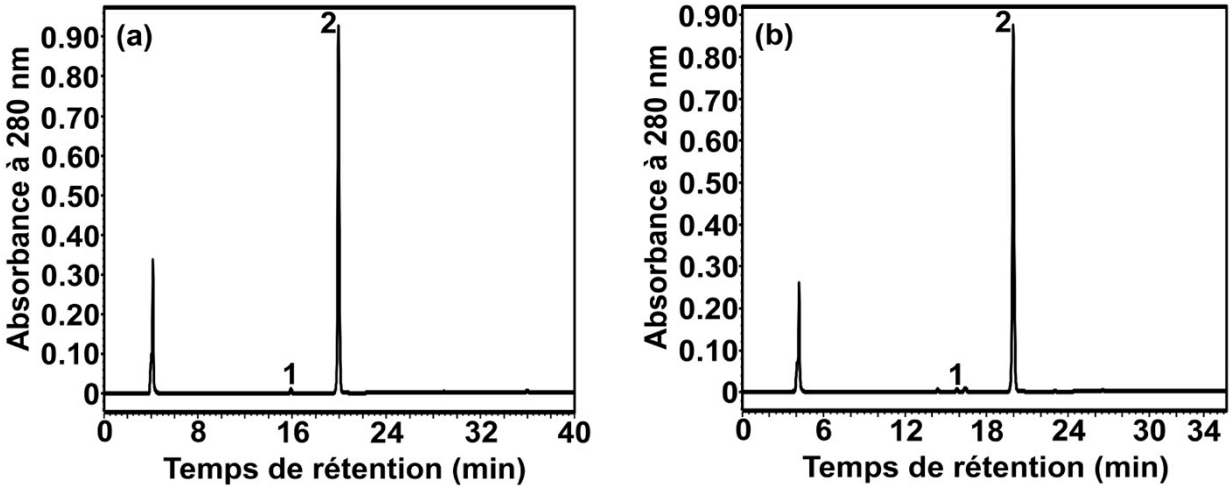
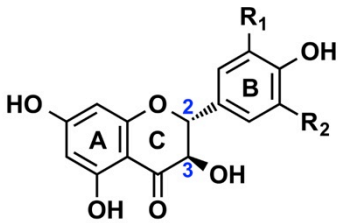


Figure 30. La naringénine n'est pas transformée en produit par la *Vv*ANS.

Chromatogrammes HPLC sur colonne Atlantis C18. (a) Echantillon de standard commercial de (±)-naringénine; (b) Extrait du milieu réactionnel contenant 10^{-6} M de *Vv*ANS après addition d'une concentration initiale de (±)-naringénine égale à 100 µM.

II.1.2. Dihydroflavonols

Les dihydroflavonols (ou flavanolols) constituent une sous-famille de flavonoïdes, et comme nous l'avons vu précédemment, l'un d'entre eux, la (+)-DHQ (dihydroquercétine ou taxifoline), qui a pour caractéristique de porter un groupement catéchol sur le cycle B, est bien substrat de la *Vv*ANS. Deux autres dihydroflavonols ont été testés, et leurs structures sont représentées sur la **figure 31**.



$R_1 = R_2 = H$: (+)-dihydrokaempférol, (+)-DHK
$R_1 = H$, $R_2 = OH$: (+)-dihydroquercétine, (+)-DHQ
$R_1 = R_2 = OH$: (+)-dihydromyricétine, (+)-DHM

Structure 2,3-trans de configuration 2R, 3R

Figure 31. Structures des trois dihydroflavonols testés avec la *Vv*ANS.

II.1.2.1. Dihydrokaempférol (DHK)

Le (+)-DHK est un dihydroflavonol qui ne contient qu'un seul hydroxyle phénolique sur le cycle B (**figure 31**).

Comme le montre la **figure 32a**, l'analyse HPLC du standard commercial de (+)-DHK montre 2 pics sur le chromatogramme, un pic 1 (16,1 min) qui correspond au (+)-DHK, et un pic 2 (19,6 min)

qui est un contaminant du produit commercial de (+)-DHK, et qui est probablement la naringénine d'après le temps de rétention de notre standard commercial de (±)-naringénine (pic 2' bleu, 19,9 min, **figure 32b**). Comme le montre la **figure 32c**, un pic de produit (pic 3 bleu, 22,3 min) est observé après réaction de 10^{-6} M de *Vv*ANS avec une concentration initiale de (+)-DHK égale à 100 µM, et il est attribué au kaempférol, d'après le temps de rétention du standard commercial (pic 3' rouge, 22,2 min). Le (+)-DHK est donc un substrat de *Vv*ANS, et le seul produit enzymatique auquel il conduit est le kaempférol.

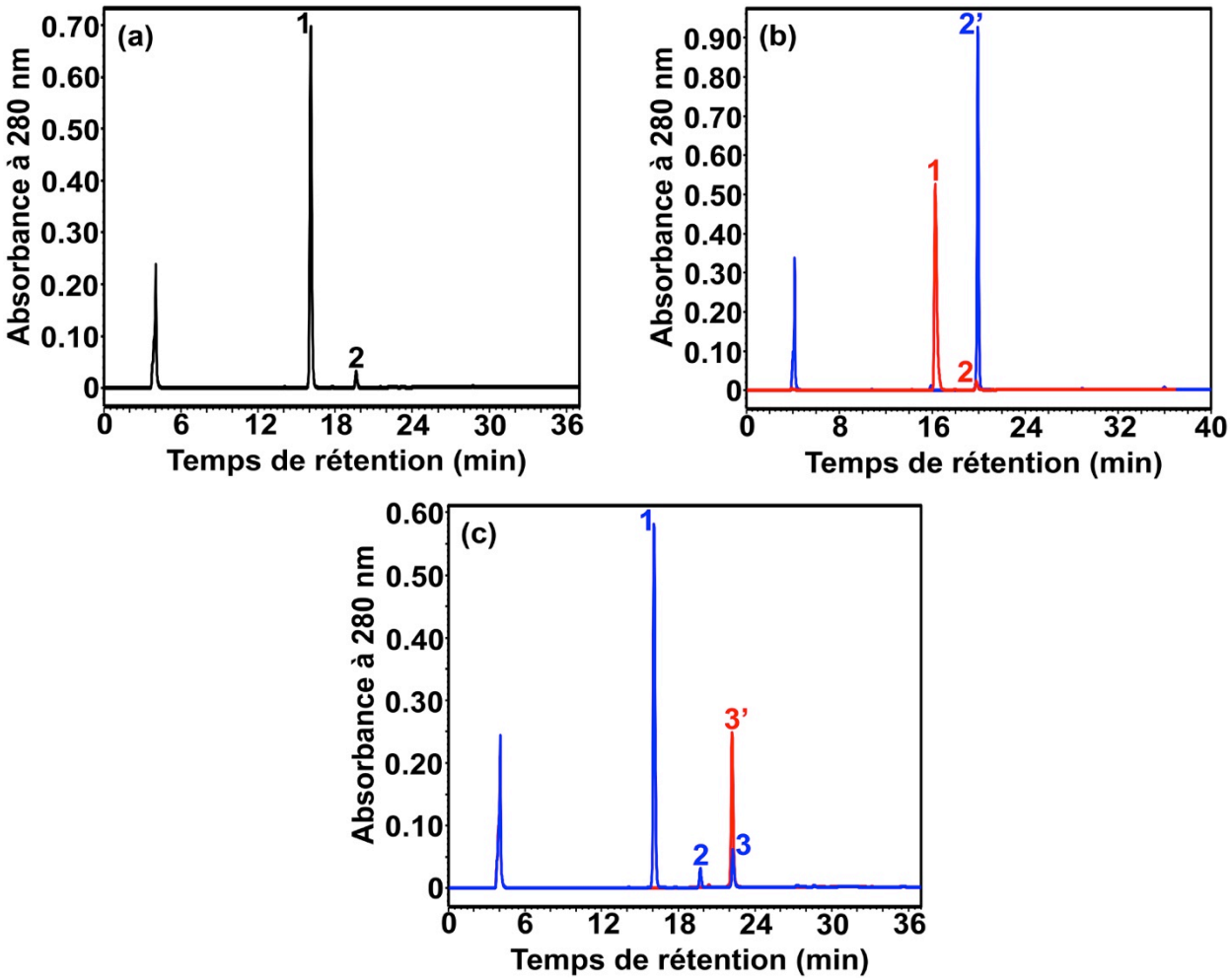


Figure 32. Analyse chromatographique de la transformation enzymatique du (+)-DHK par la *Vv*ANS.

Chromatogrammes HPLC sur colonne Atlantis C18. (a) Echantillon de 100 µM de standard commercial de (+)-DHK; (b) Echantillon de 100 µM de standard commercial de (±)-naringénine (en bleu); (c) Extrait du milieu réactionnel contenant 10^{-6} M de *Vv*ANS après addition d'une concentration initiale de (+)-DHK égale à 100 µM (en bleu).

Après identification du contaminant et du produit enzymatique par HPLC, les résultats ont été confirmés par spectrométrie de masse (MS) et spectrométrie de masse en tandem (MS/MS). Pour le

contaminant de produit commercial de (+)-DHK, l'analyse MS et MS/MS de standard commercial de (±)-naringénine ont été utilisées comme témoins. Comme le montre a **figure 33a**, le pic de *m/z* 273 correspondant à l'ion $[M+H]^+$ de naringénine est le plus intense sur le spectre, et la fragmentation MS/MS de cet ion $[M+H]^+$ de *m/z* 273 produit trois principaux ions fragments de *m/z* 119, 147 et 153 (**figure 33b**).

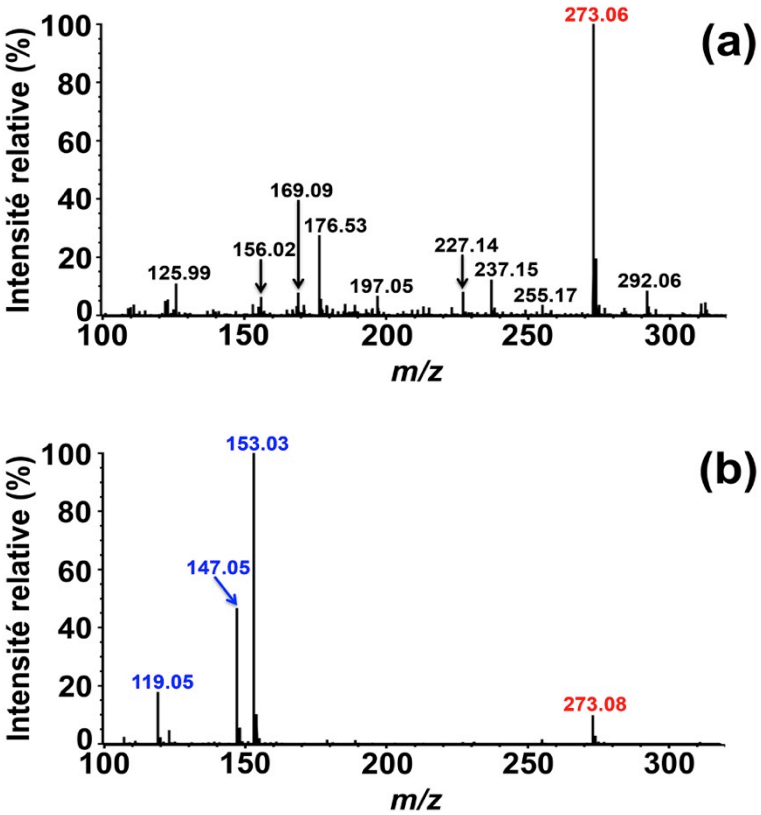


Figure 33. Spectres MS et MS/MS de la (±)-naringénine.

(a) Spectre MS de l'échantillon de standard commercial de (±)-naringénine; (b) Spectre MS/MS de l'ion $[M+H]^+$ de *m/z* 273.

Le contaminant (pic 2, **figure 32a**) a été collecté lors de l'analyse HPLC puis analysé directement par MS et MS/MS. L'analyse MS de ce contaminant donne aussi un pic majeur de *m/z* 273 (**figure 34a)**, et l'analyse MS/MS de l'ion $[M+H]^+$ de ce contaminant de *m/z* 273 donne deux ions fragments de *m/z* 147 et 153 (**figure 34b**), qui sont observés à l'identique sur le spectre MS du standard commercial de naringénine (**figure 33b**). Ce contaminant est donc bien la naringénine.

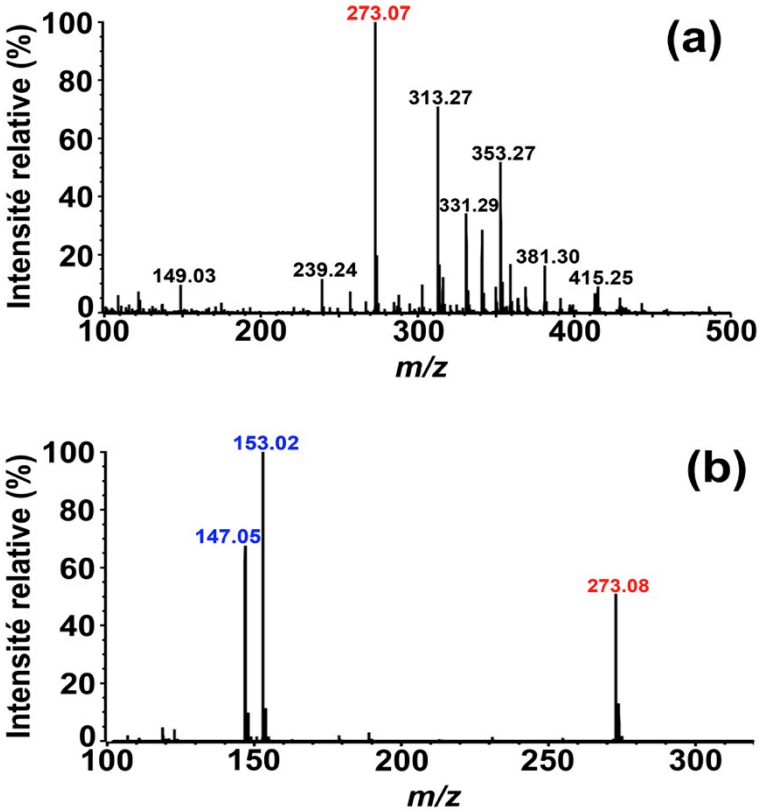


Figure 34. Spectres MS et MS/MS du contaminant du (+)-DHK commercial.

(a) Spectre MS du contaminant collecté (pic 2, **figure 32a**) lors de l'analyse HPLC; (b) Spectre MS/MS de l'ion $[M+H]^+$ de *m/z* 273.

Pour caractériser le seul produit enzymatique de *Vv*ANS utilisant le (+)-DHK comme substrat, les analyses MS et MS/MS du standard commercial de kaempférol ont été utilisées comme témoins. Le pic de *m/z* 287 correspondant à l'ion $[M+H]^+$ du kaempférol est observé comme pic majeur sur le spectre MS de standard commercial de kaempférol (**figure 35a**), et la fragmentation MS/MS de cet ion $[M+H]^+$ de *m/z* 287 a induit plusieurs ions fragments (**figure 35b**).

Le produit enzymatique (pic 3' rouge, **figure 32c**) a été collecté lors de l'analyse HPLC puis analysé directement par MS et MS/MS. L'analyse MS de l'échantillon de produit collecté montre un pic majeur de *m/z* 287 (**figure 36a**), et la fragmentation MS/MS de l'ion $[M+H]^+$ de ce produit de *m/z* 287 produit aussi plusieurs ions fragments (**figure 36b**), qui sont tous observés sur le spectre MS du standard commercial de kaempférol (**figure 35b**). Ce produit est donc bien le kaempférol.

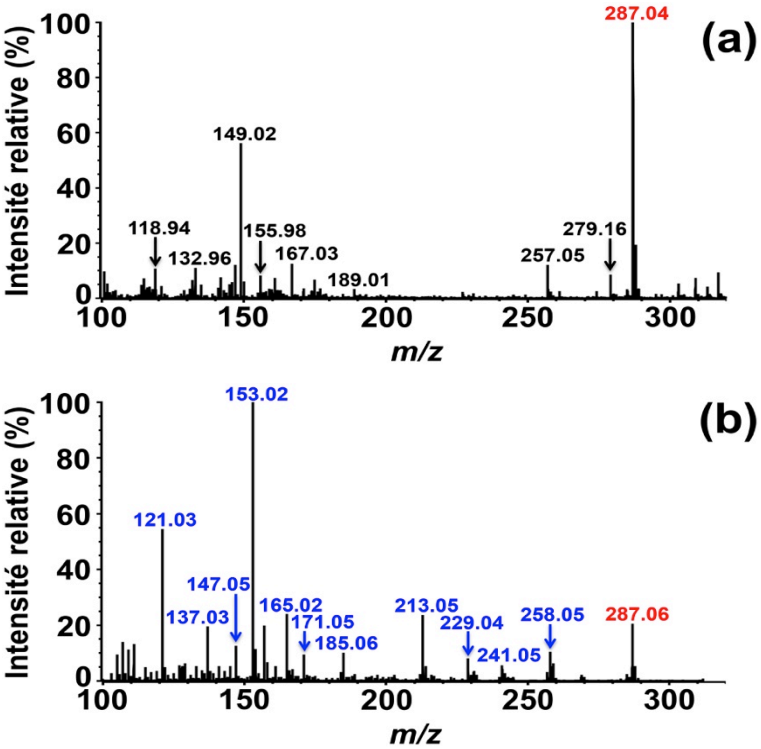


Figure 35. Spectres MS et MS/MS du kaempférol.

(a) Spectre MS du standard commercial de kaempférol; (b) Spectre MS/MS de l'ion $[M+H]^+$ de *m/z* 287.

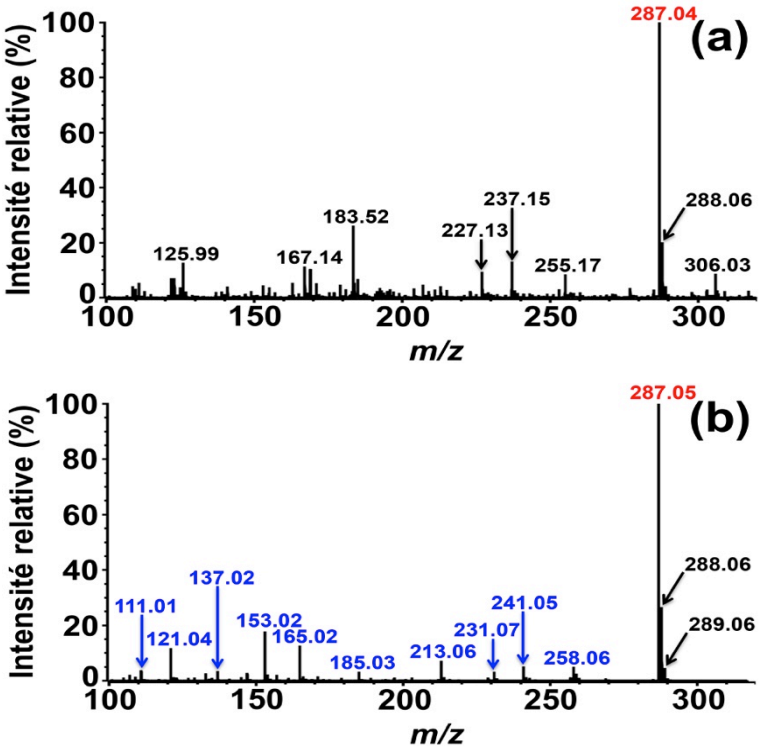


Figure 36. Spectres MS et MS/MS du produit enzymatique dérivé du (+)-DHK.

(a) Spectre MS du produit enzymatique collecté (pic 3', **figure 32c**) lors de l'analyse HPLC; (b) Spectre MS/MS de l'ion $[M+H]^+$ de *m/z* 287 correspondant à ce produit enzymatique.

II.1.2.2. Dihydroquercétine (DHQ)

Comme nous l'avons indiqué précédemment, la (+)-DHQ est substrat de la *Vv*ANS, et le seul produit enzymatique observé serait la quercétine d'après le temps de rétention du standard commercial (pic 3' rouge, **figure 24c**). Par ailleurs, comme le montre la **figure 37**, le produit commercial de (+)-DHQ contient aussi un contaminant inconnu (pic 2, 16,3 min), et ce contaminant serait le DHK d'après le temps de rétention du standard commercial (pic 2' bleu, 16,3 min).

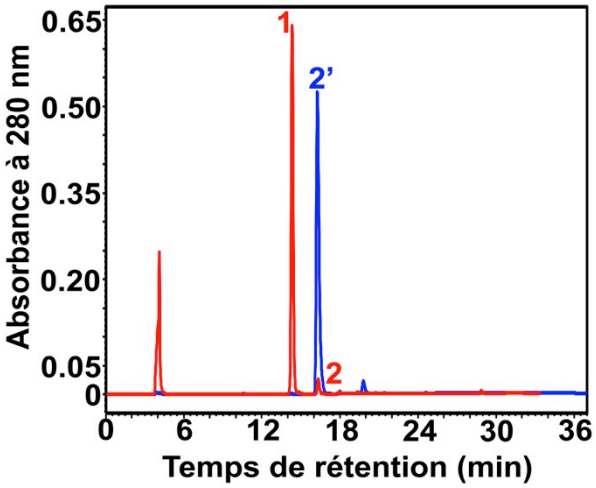


Figure 37. Analyse chromatographique des standards commerciaux de (+)-DHQ et (+)-DHK. Chromatogrammes HPLC sur colonne Atlantis C18. En rouge: Standard commercial de (+)-DHQ 100 µM; en bleu: standard commercial de (+)-DHK 100 µM.

Pour confirmer cette interprétation, l'analyse MS et MS/MS du contaminant et du produit enzymatique ont été effectuées. Le contaminant et le produit ont été collectés lors de l'analyse HPLC, puis analysés directement par MS et MS/MS, et leurs spectres MS et MS/MS ont ensuite été respectivement comparés avec ceux des standards commerciaux de (+)-DHK et de quercétine.

Le spectre MS du standard commercial de (+)-DHK montre un grand pic de *m/z* 289 qui correspond à l'ion $[M+H]^+$ de la (+)-DHK (**figure 38a**), et la fragmentation MS/MS de cet ion $[M+H]^+$ de *m/z* 289 produit plusieurs ions fragments (**figure 38b**). Le spectre MS du contaminant collecté montre lui aussi un pic majeur de *m/z* 289 (**figure 39a**), et la fragmentation MS/MS de l'ion $[M+H]^+$ issu de ce produit de *m/z* 289 produit plusieurs ions fragments (**figure 39b**) qui sont retrouvés à l'identique sur le spectre MS du standard commercial de DHK (**figure 38b**). Ce contaminant est donc bien le DHK.

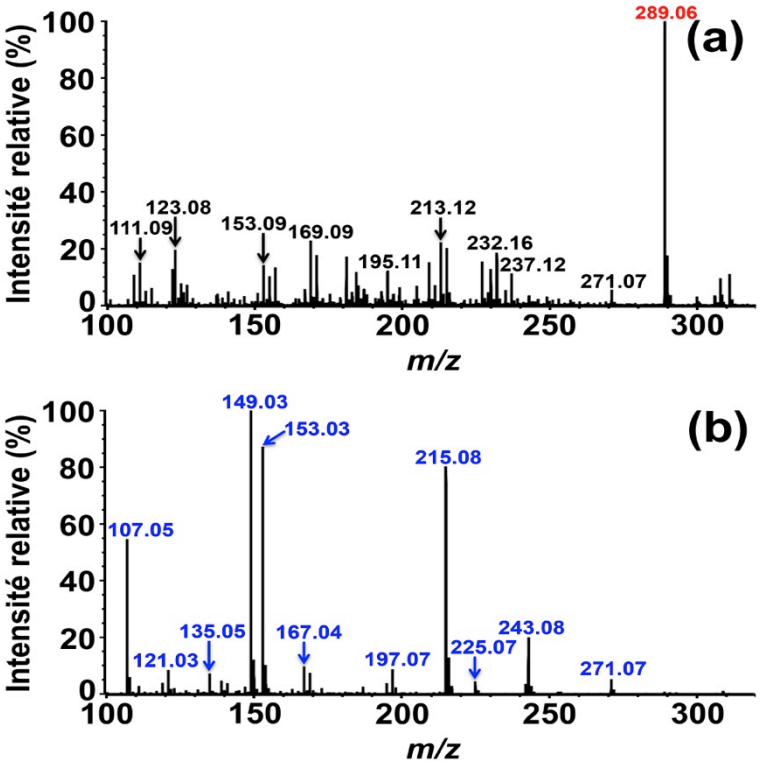


Figure 38. Spectres MS et MS/MS du standard commercial de (+)-DHK.

(a) Spectre MS du standard commercial de (+)-DHK; (b) Spectre MS/MS de l'ion $[M+H]^+$ de *m/z* 289.

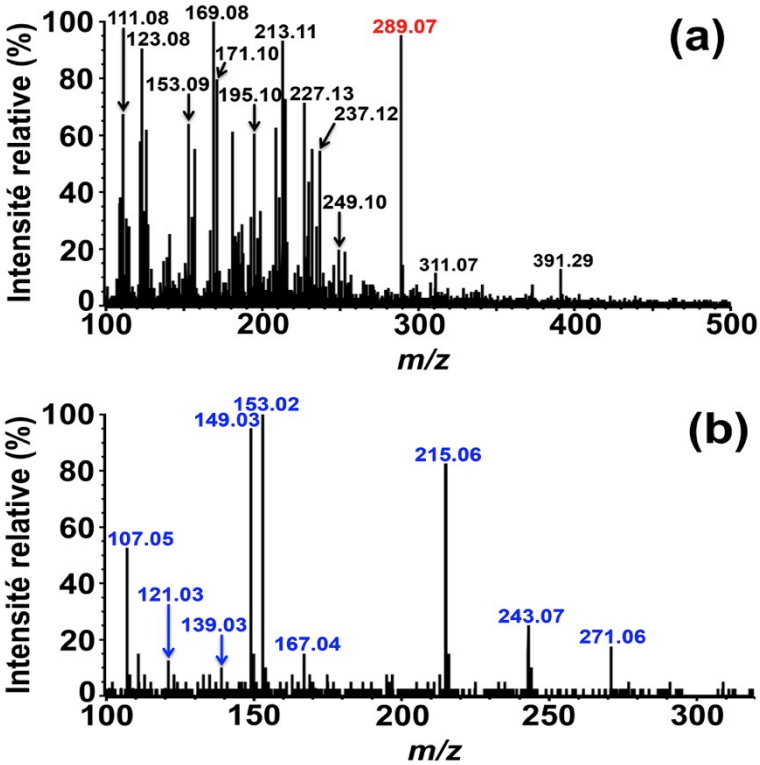


Figure 39. Spectres MS et MS/MS du contaminant du standard commercial de (+)-DHQ.

(a) Spectre MS du contaminant collecté lors de l'analyse HPLC (pic 2, **figure 37**); (b) Spectre MS/MS de l'ion $[M+H]^+$ de *m/z* 289 issu de ce contaminant.

Le spectre MS de l'échantillon du standard commercial de quercétine montre un grand pic de *m/z* 303 qui correspond à l'ion $[M+H]^+$ de la quercétine (**figure 40a**), et la fragmentation MS/MS de cet ion $[M+H]^+$ de *m/z* 303 produit plusieurs ions fragments (**figure 40b**).

Un grand pic de *m/z* 303 est aussi observé sur le spectre MS du produit enzymatique collecté (**figure 41a**), et la fragmentation MS/MS de l'ion de *m/z* 303 correspondant à l'ion $[M+H]^+$ de ce produit donne plusieurs ions fragments (**figure 41b**) dont la plupart sont retrouvés à l'identique sur le spectre MS du standard commercial de quercétine (**figure 40b**). Ce produit est donc bien la quercétine.

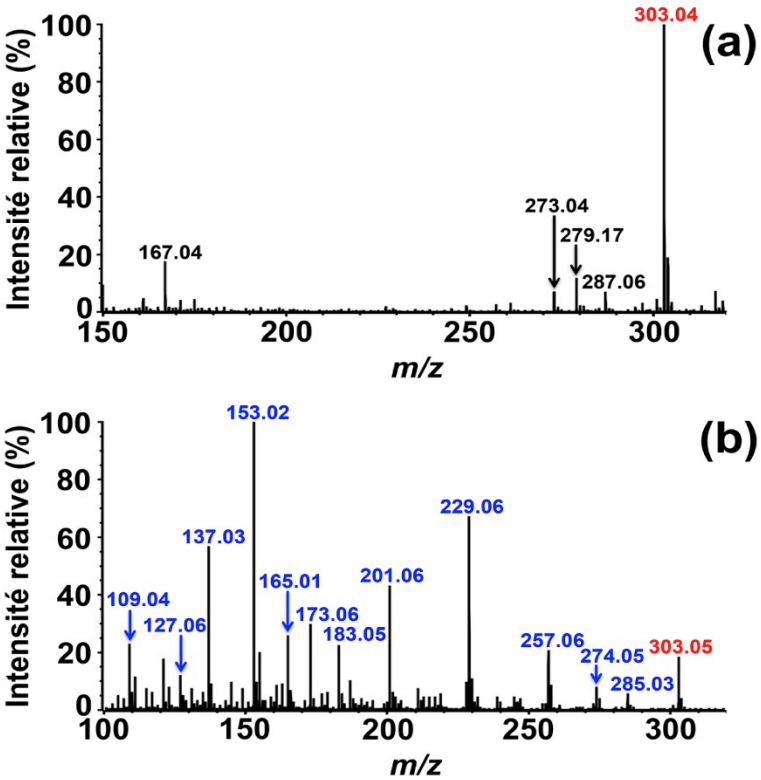


Figure 40. Spectres MS et MS/MS du standard commercial de quercétine.

(a) Spectre MS du standard commercial de quercétine; (b) Spectre MS/MS de l'ion $[M+H]^+$ de *m/z* 303.

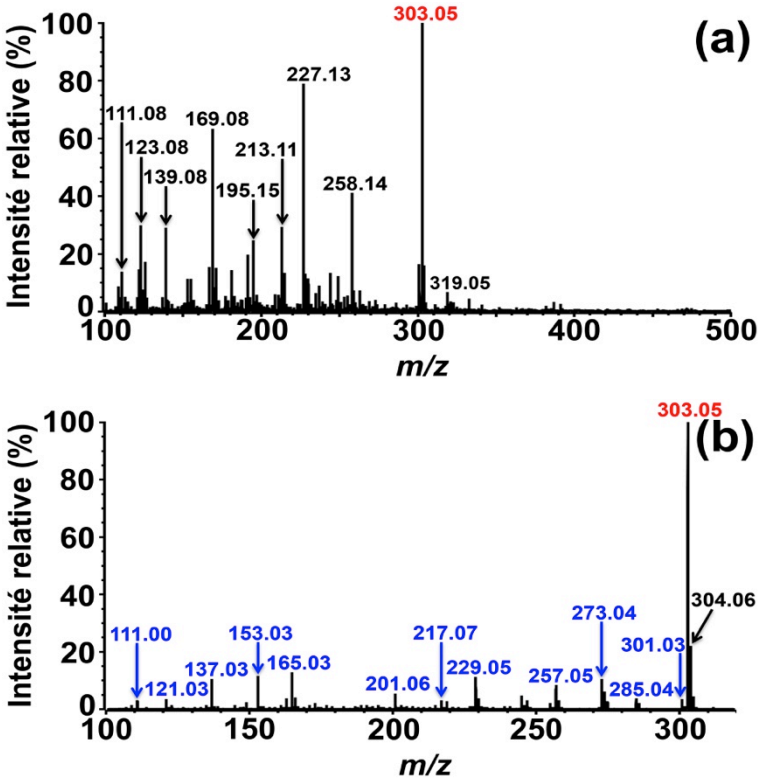


Figure 41. Spectres MS et MS/MS du produit enzymatique dérivé de la (+)-DHQ.

(a) Spectre MS du produit enzymatique collecté lors de l'analyse HPLC; (b) Spectre MS/MS de l'ion $[M+H]^+$ de *m/z* 303 issu de ce produit.

II.1.2.3. Dihydromyricétine (DHM)

La (+)-DHM est un dihydroflavonol qui, contrairement au (+)-DHK, ne possède pas un hydroxyle phénolique de moins que la (+)-DHQ sur le noyau B, mais un hydroxyle phénolique de plus (**figure 31**).

Comme le montre la **figure 42a**, l'analyse HPLC du standard commercial de (+)-DHM montre un seul grand pic (pic 1, 11,2 min), et aucun contaminant n'est observé. Après réaction de 10^{-6} M de *Vv*ANS avec 100 µM de (+)-DHM, deux petits nouveaux pics sont observés (**figure 42b**). Entre les deux, le pic 3 bleu ayant un temps de rétention de 18,4 min est le seul produit enzymatique, et il s'agirait de la myricétine d'après le temps de rétention du standard commercial (pic 3' rouge, 18,4 min). Le pic 2 observé à 12,3 min est apparemment un produit de dégradation de la (+)-DHM ou un complexe de (+)-DHM avec le fer, car on retrouve ce pic après incubation de 100 µM de (+)-DHM dans le mélange réactionnel en présence de Fe(II) mais en l'absence d'enzyme (**figure 42c**).

Ces résultats indiquent que la (+)-DHM est bien substrat de la *Vv*ANS et que son seul produit enzymatique est la myricétine.

L'analyse MS et MS/MS du produit enzymatique de la *Vv*ANS avec la (+)-DHM ont ensuite été réalisées pour confirmer notre interprétation. Le produit enzymatique (pic 3, **figure 42b**) a été

purifié et collecté lors de l'analyse HPLC, puis analysé par MS et MS/MS. Les spectres MS et MS/MS du standard commercial de myricétine ont été utilisés comme témoins.

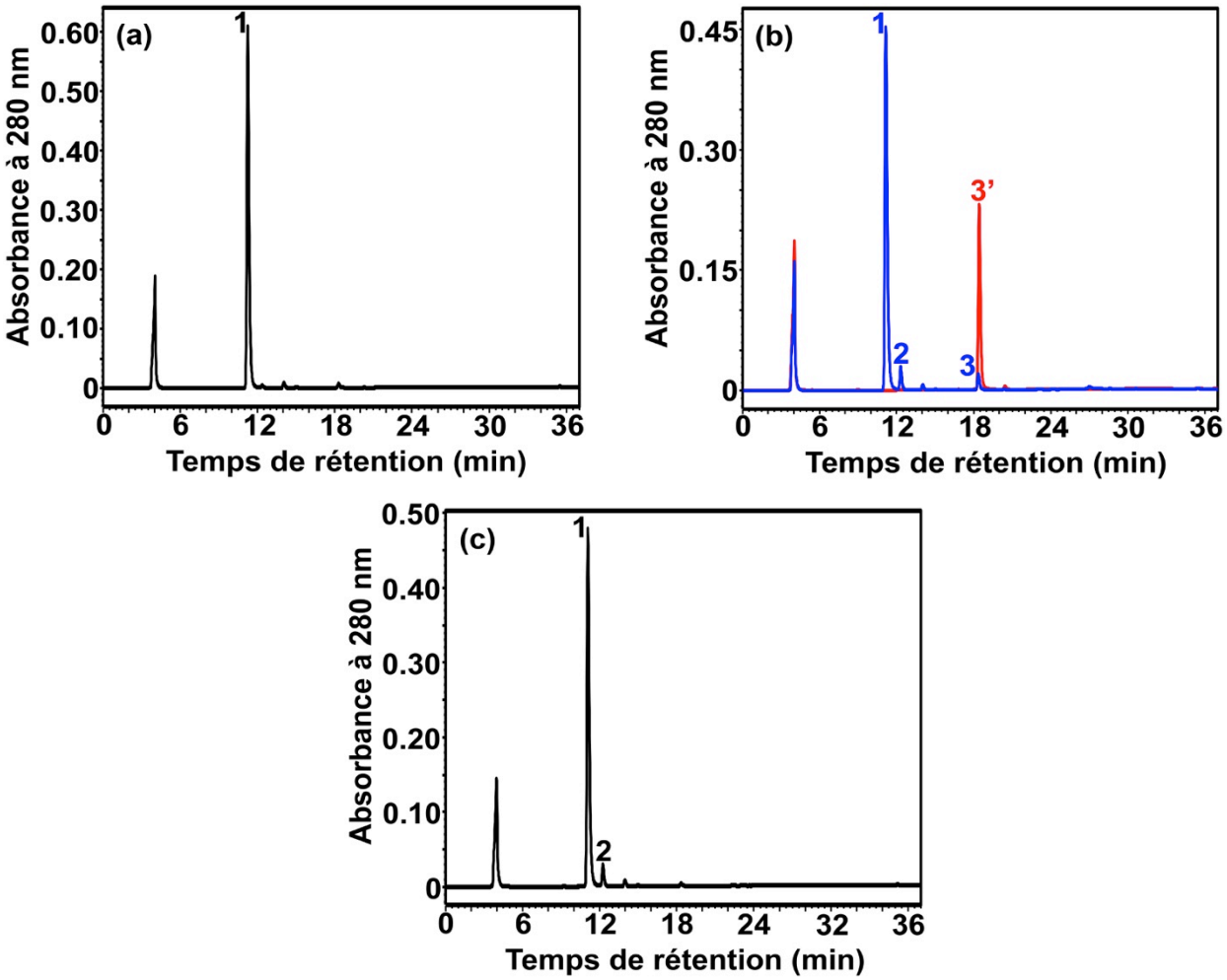


Figure 42. Analyse chromatographique de la transformation enzymatique de la (+)-DHM en myricétine par la *Vv*ANS.

Chromatogrammes HPLC sur colonne Atlantis C18. (a) Echantillon de standard commercial de (+)-DHM; (b) Echantillon de 100 µM de standard commercial de myricétine (en rouge) et extrait du milieu réactionnel obtenu 30 min après introduction d'une concentration initiale de 100 µM de (+)-DHM en présence de *Vv*ANS (en bleu); (c) Même chose qu'en (b) mais en l'absence de *Vv*ANS.

L'analyse MS de l'échantillon de standard commercial de myricétine révèle un grand pic de *m/z* 319, qui correspond à l'ion $[M+H]^+$ de la myricétine (**figure 43a**), et la fragmentation MS/MS de cet ion $[M+H]^+$ de *m/z* 319 produit plusieurs ions fragments (**figure 43b**). Un grand pic de *m/z* 319 est aussi observé sur le spectre MS du produit enzymatique collecté (**figure 44a**), et la fragmentation MS/MS de l'ion $[M+H]^+$ de *m/z* 319 produit plusieurs ions fragments (**figure 44b**) dont la plupart sont retrouvés à l'identique sur le spectre MS du standard commercial de myricétine **(figure 43b)**. Ce produit est donc bien la myricétine.

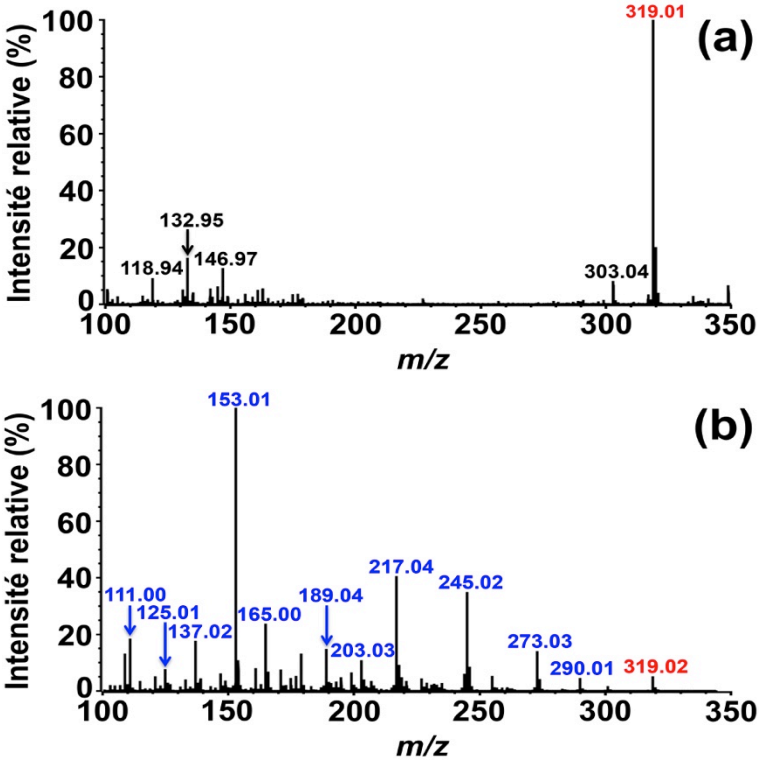


Figure 43. Spectres MS et MS/MS de la myricétine.

(a) Spectre MS du standard commercial de myricétine; (b) Spectre MS/MS de l'ion $[M+H]^+$ de *m/z* 319.

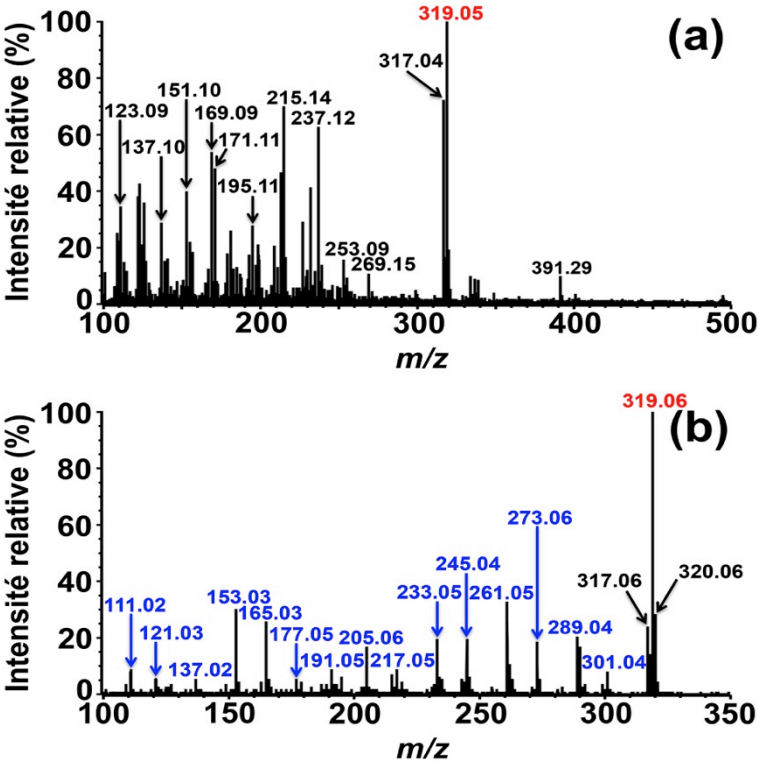


Figure 44. Spectres MS et MS/MS du produit enzymatique dérivé de la (+)-DHM.

(a) Spectre MS du produit enzymatique collecté lors de l'analyse HPLC; (b) Spectre MS/MS de l'ion $[M+H]^+$ de *m/z* 319 issu de ce produit.

Finalement, nous pouvons conclure que les trois dihydroflavonols testés sont substrats de la *Vv*ANS, et qu'ils sont transformés par *Vv*ANS en flavonols, ce qui est résumé sur la **figure 45**.

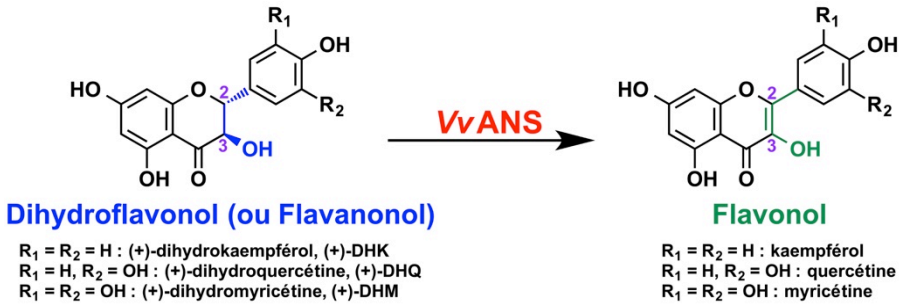


Figure 45. Transformation des dihydroflavonols en flavonols par la *Vv*ANS.

II.1.3. Flavan-3-ols

Les flavan-3-ols constituent une importante sous-famille de flavonoïdes, et nous avons vu précédemment que l'un d'entre eux, la (+)-catéchine était un substrat de la *Vv*ANS. Cinq autres composés organiques de cette famille ont aussi été testés la (+)-afzéléchine, la (+)-gallocatéchine, la (-)-catéchine, la (+)-épicatéchine et la (-)-épicatéchine, dont les structures sont représentées sur la **figure 46**.

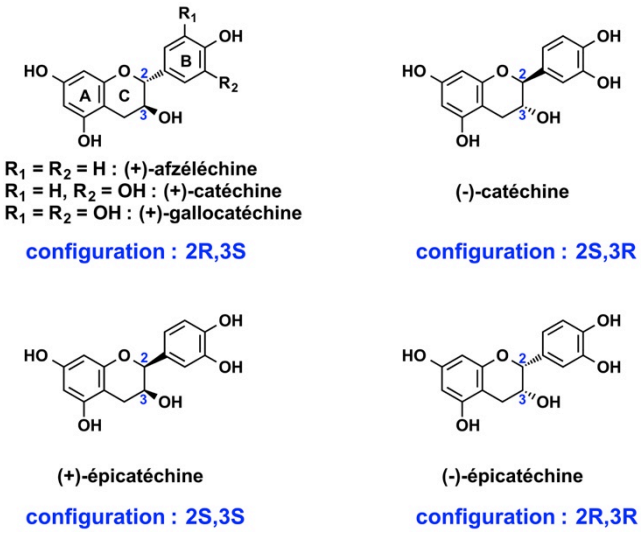


Figure 46. Structures des flavan-3-ols testés.

II.1.3.1. (+)-catéchine

Wellmann et coll. (***2006***) ont montré que l'ANS de *Gerbera hybrida* catalysait la transformation de (+)-catéchine en trois produits (**figure 47**).

D'après nos premiers résultats (**figure 25**), la (+)-catéchine est aussi transformée par *Vv*ANS en trois produits. L'analyse chromatographique de ces produits a été d'abord effectuée en utilisant un standard externe.

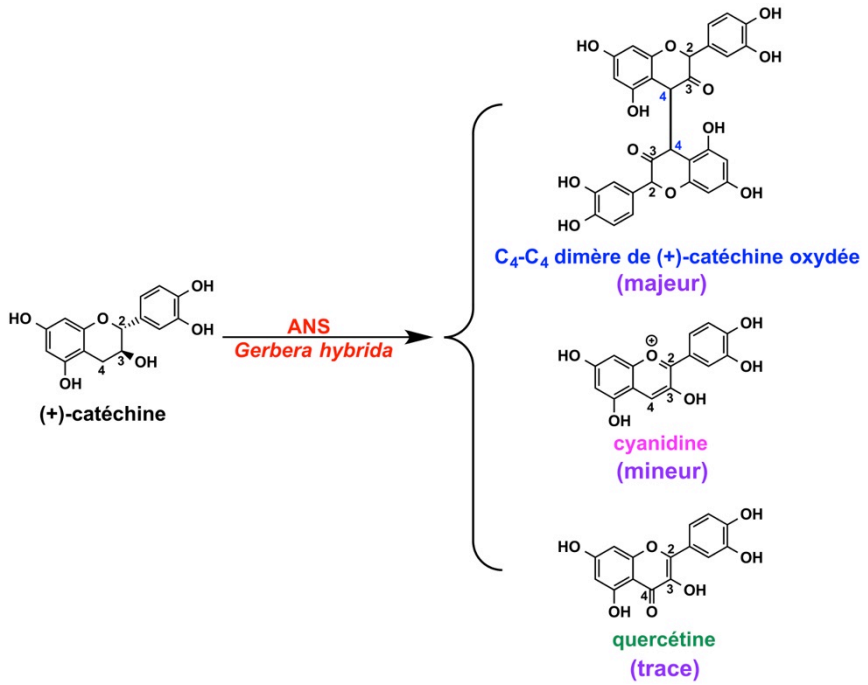


Figure 47. Transformations de la (+)-catéchine par l'ANS de *Gerbera hybrida*.
D'après ***Wellmann et coll.*** (***2006***).

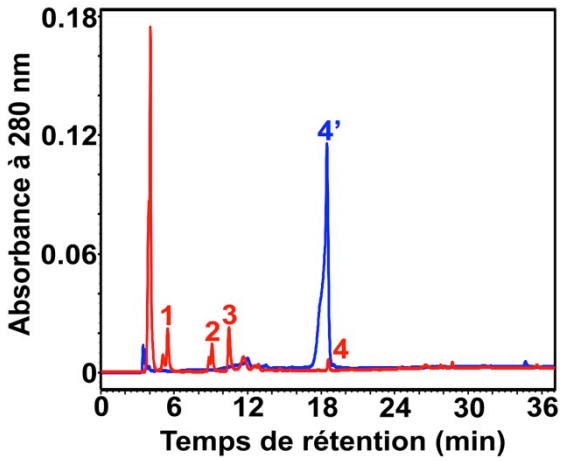


Figure 48. Analyse chromatographique des produits de la (+)-catéchine qui sont obtenus en présence de *Vv*ANS.

Chromatogrammes HPLC sur colonne Atlantis C18. En rouge: Extrait du milieu réactionnel contenant 10^{-6} M de *Vv*ANS après 30 min d'incubation en présence d'une concentration initiale de (+)-catéchine égale à 100 µM; en bleu: standard commercial de chlorure de cyanidine (100 µM).

Comme le montre la **figure 48**, le produit élué à 18,6 min (pic 4 mineur) serait la cyanidine, compte tenu du temps de rétention d'un standard commercial de chlorure de cyanidine (pic 4', 18,5 min), mais les deux autres produits majeurs (pic 1 et 3) sont à ce stade encore inconnus.

Le produit élué à 18,6 min (pic 4, **figure 48**) a été collecté puis analysé par MS et MS/MS, le standard commercial de chlorure de cyanidine étant utilisé comme témoin. Comme le montre la **figure 49a**, l'analyse MS de l'échantillon de standard commercial de chlorure de cyanidine révèle un grand pic de *m/z* 287, qui correspond à l'ion flavylium de cyanidine, et la fragmentation MS/MS de cet ion de *m/z* 287 produit plusieurs ions fragments (**figure 49b**).

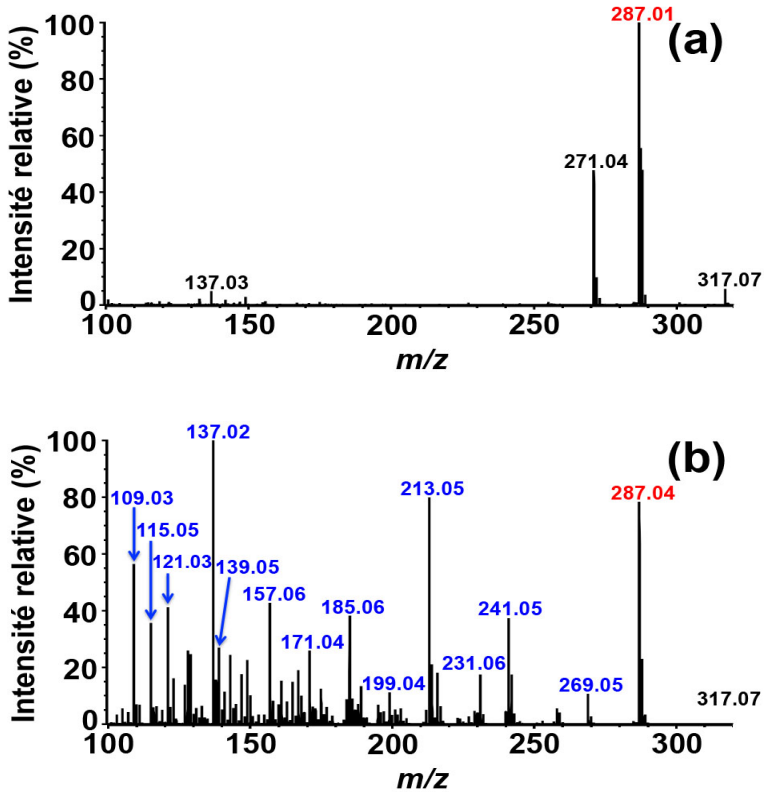


Figure 49. Spectres MS et MS/MS du standard commercial de chlorure de cyanidine.
(a) Spectre MS; (b) Spectre MS/MS de l'ion de *m/z* 287.

L'analyse MS du produit élué à 18,6 min (pic 4, **figure 48**) montre aussi un pic majeur de *m/z* 287 (**figure 50a**), qui correspond à l'ion $[M+H]^+$ du produit collecté, et la fragmentation MS/MS de cet ion $[M+H]^+$ de *m/z* 287 produit aussi plusieurs ions fragments (**figure 50b**), qui sont identiques à ceux obtenus avec le standard commercial de cyanidine (**figure 49b**). Le produit enzymatique élué à 18,6 min (pic 4, **figure 48**) est donc bien la cyanidine.

Les deux autres produits majeurs observés en présence de *Vv*ANS et de (+)-catéchine (pic 1 et pic 3, **figure 48**), ne peuvent être anticipés sur la base de leurs temps de rétention, et ils ont donc été collectés pour une analyse MS puis MS/MS.

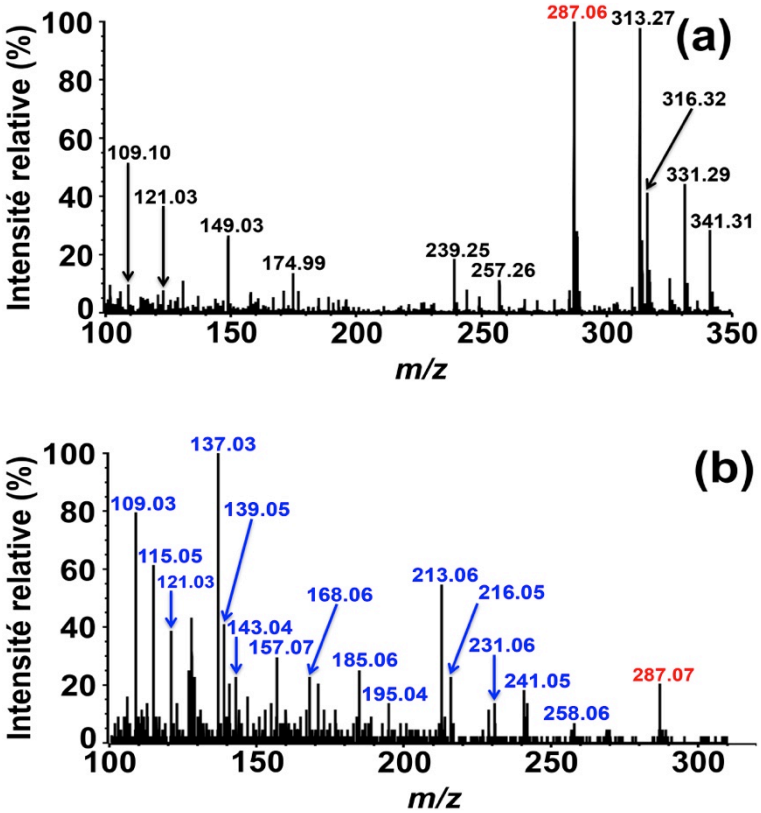


Figure 50. Spectres MS et MS/MS de la cyanidine produite à partir de (+)-catéchine en présence de *Vv*ANS.

(a) Spectre MS du produit enzymatique collecté (18,6 min) lors de l'analyse HPLC; (b) Spectre MS/MS de l'ion $[M+H]^+$ de *m/z* 287 issu de ce produit.

Pour le produit majeur élué à 5,5 min (pic 1, **figure 48**), l'analyse MS de l'échantillon collecté révèle un pic majeur de *m/z* 463 que nous pensons être l'ion $[M+H]^+$ de ce produit (**figure 51a**), et la fragmentation de cet ion $[M+H]^+$ de *m/z* 463 produit plusieurs ions fragments (**figure 51b**) dont les deux plus importants (*m/z* 177 et 287) correspondent respectivement aux ions $[M+H]^+$ dérivés de l'acide ascorbique (*m/z* 177) et de la cyanidine (*m/z* 287). Nous pouvons en conclure que le pic de *m/z* 463 (**figure 51a**) correspond à l'ion $[M+H]^+$ d'un adduit d'ascorbate et de cyanidine.

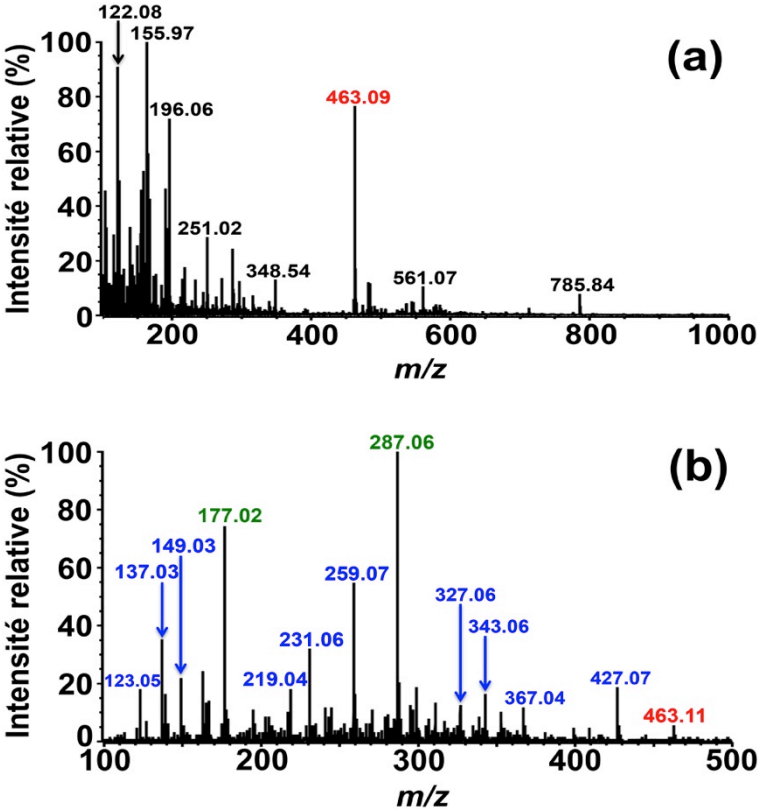


Figure 51. Spectres MS et MS/MS d'un complexe covalent ascorbate-cyanidine dérivé de la (+)-catéchine en présence de *Vv*ANS.

(a) Spectre MS du produit enzymatique collecté à 5,5 min (pic 1, figure 48) lors de l'analyse HPLC;
(b) Spectre MS/MS de l'ion $[M+H]^+$ de *m/z* 463 issu de ce produit.

Pour le produit majeur élué à 10,5 min (pic 3, **figure 48**), l'analyse MS du produit collecté révèle un seul grand pic de *m/z* 575 qui correspond à un ion $[M+H]^+$ (**figure 52a**), et la fragmentation de cet ion $[M+H]^+$ de *m/z* 575 produit plusieurs ions fragments (**figure 52b**) dont le plus important est bien celui de *m/z* 287 qui correspond au cation flavylium de la cyanidine (ou d'une forme tautomère cationique équivalente).

Nous en déduisons que ce produit est un dimère de cyanidine (ou (+)-catéchine oxydée), et compte tenu de la similarité des résultats avec ceux de ***Wellmann et coll.*** (***2006***), nous pensons que ce dimère est le même que le leur, c'est-à-dire le C_4-C_4 dimère de (+)-catéchine oxydée (**figure 47**) qu'ils ont identifié par RMN.

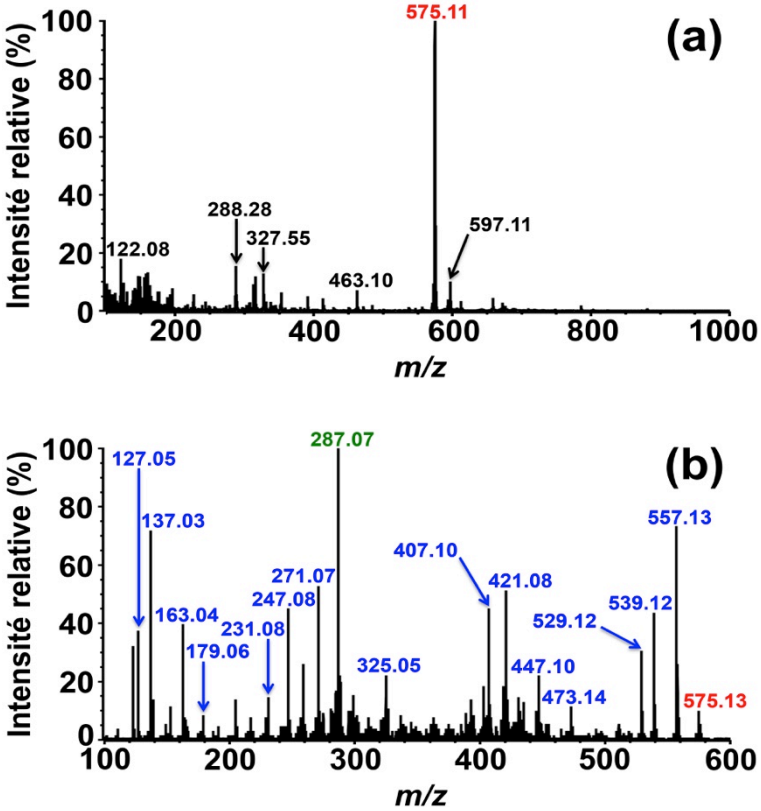


Figure 52. Spectres MS et MS/MS d'un dimère de cyanidine dérivé de la (+)-catéchine en présence de *Vv*ANS.

(a) Spectre MS du produit enzymatique collecté à 10,5 min (pic 1, **figure 48**) lors de l'analyse HPLC (pic 3, **figure 48**); (b) Spectre MS/MS de l'ion $[M+H]^+$ de *m/z* 575.

II.1.3.2. (+)-gallocatéchine

La (+)-gallocatéchine est un flavan-3-ol qui possède trois hydroxyles phénoliques sur le noyau B, c'est-à-dire un de plus que la (+)-catéchine (**figure 46**).

L'analyse HPLC de 100 µM de standard commercial de (+)-gallocatéchine incubé pendant 30 min à 35°C dans le milieu réactionnel en l'absence de *Vv*ANS montre deux pics majeurs (**figure 53a**) dont le plus grand (4,1 min) correspond à l'ascorbate présent dans le milieu comme cofacteur de la *Vv*ANS, et le pic 1 (6,2 min) correspond à la (+)-gallocatéchine qui n'a pas été transformée. Après incubation de 10^{-6} M de *Vv*ANS en présence de 100 µM de (+)-gallocatéchine, un seul nouveau pic très mineur (pic 2 bleu, 17,6 min) est observé (**figure 53b**), qui correspond certainement à un produit enzymatique compte tenu de l'absence de dégradation non-enzymatique de la (+)-gallocatéchine dans les mêmes conditions (**figure 53a**). Comme le montre la **figure 53b**, ce nouveau produit (pic 2) est élué au même temps de rétention qu'un standard commercial de chlorure de delphinidine (pic 2', 17,6 min). La (+)-gallocatéchine est donc vraisemblablement transformée en delphinidine par la *Vv*ANS.

Pour confirmer que le produit observé est bien la delphinidine, il a été collecté lors de l'analyse HPLC puis analysé directement par MS et MS/MS. Comme le montre la **figure 54a**, l'analyse MS de l'échantillon de standard commercial de chlorure de delphinidine révèle un grand pic de *m/z* 303, qui correspond à la delphinidine sous forme de cation flavylium, et la fragmentation MS/MS de cet ion flavylium produit plusieurs ions fragments (**figure 54b**).

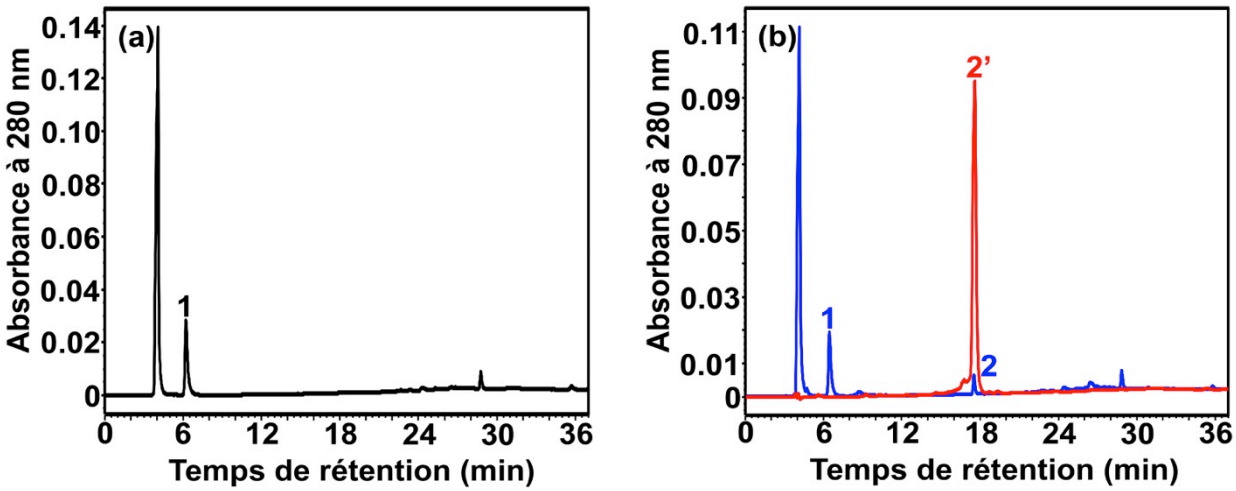


Figure 53. Analyse chromatographique des produits de la (+)-gallocatéchine qui sont obtenus en présence de *Vv*ANS.

Chromatogrammes HPLC sur colonne Atlantis C18. (a) Incubation de la (+)-gallocatéchine en l'absence de *Vv*ANS; (b) En bleu: Extrait du milieu réactionnel contenant 10^{-6} M de *Vv*ANS après 30 min d'incubation en présence d'une concentration initiale de (+)-gallocatéchine égale à 100 µM; en rouge: standard commercial de chlorure de delphinidine.

L'analyse MS du produit collecté montre aussi un grand pic de *m/z* 303 (**figure 55a**), qui correspond certainement au cation flavylium, puisque la fragmentation MS/MS de cet ion produit plusieurs ions fragments (**figure 55b**) qui étaient observés avec le standard commercial de delphinidine (**figure 54b**).

La (+)-gallocatéchine est donc bien exclusivement transformée par la *Vv*ANS en delphinidine.

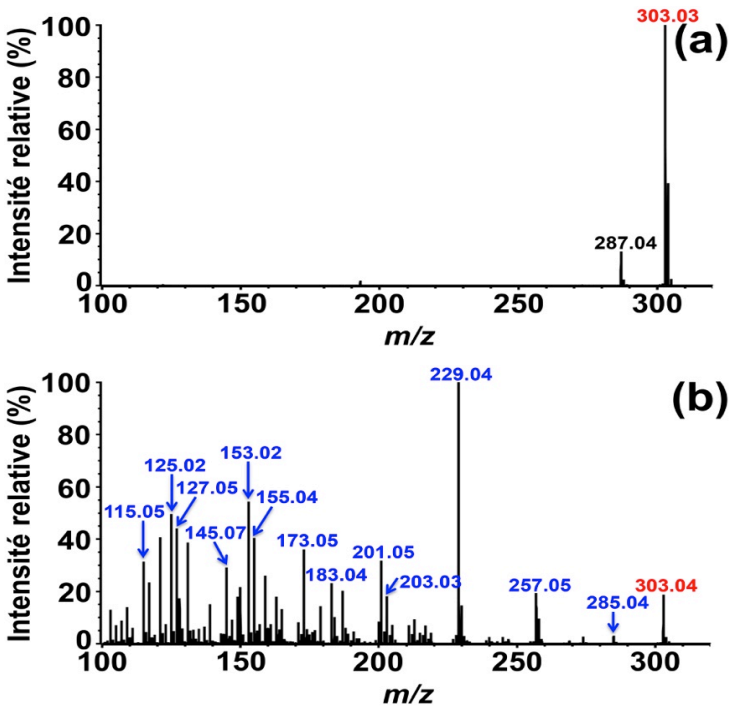


Figure 54. Spectres MS et MS/MS de la delphinidine.

(a) Spectre MS du standard commercial de chlorure de delphinidine; (b) Spectre MS/MS de l'ion de *m/z* 303.

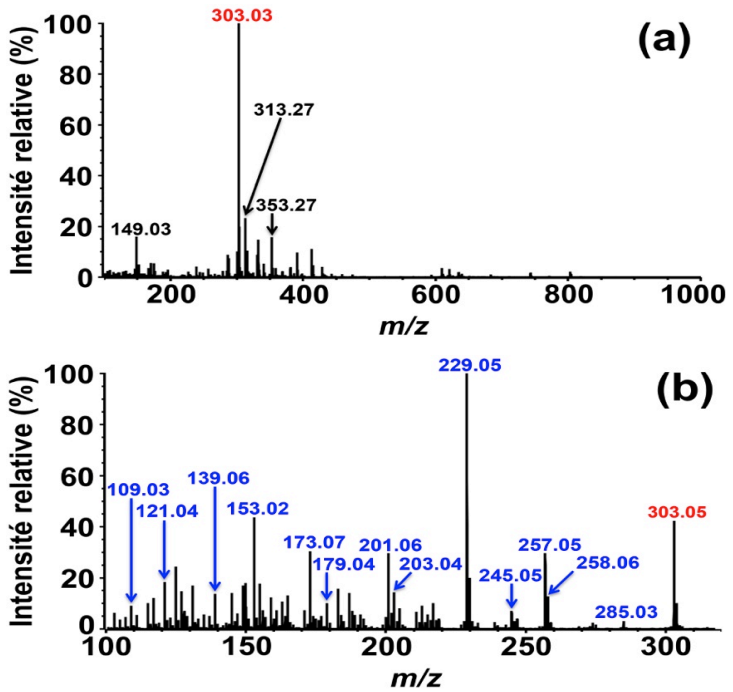


Figure 55. Spectres MS et MS/MS de la delphinidine dérivée de la (+)-gallocatéchine en présence de *Vv*ANS.

(a) Spectre MS du produit enzymatique collecté lors de l'analyse HPLC (pic 2, **figure 53**); (b) Spectre MS/MS de l'ion $[M+H]^+$ de *m/z* 303.

II.1.3.3. (-)-catéchine

La (-)-catéchine est un stéréoisomère de catéchine, de configuration 2S,3R (**figure 46**).

L'analyse HPLC de 100 µM d'un extrait du milieu réactionnel incubé en présence de standard commercial de (-)-catéchine sans addition de *Vv*ANS montre deux pics majeurs (**figure 56a**). Le pic observé à 4,1 min correspond à l'ascorbate et le pic 1 (9,1 min) correspond à la (-)-catéchine. Comme le montre la **figure 56b**, on retrouve ces deux pics et aucun autre après incubation de 10^{-6} M de *Vv*ANS en présence de 100 µM de (-)-catéchine. La (-)-catéchine n'est donc pas substrat de la *Vv*ANS.

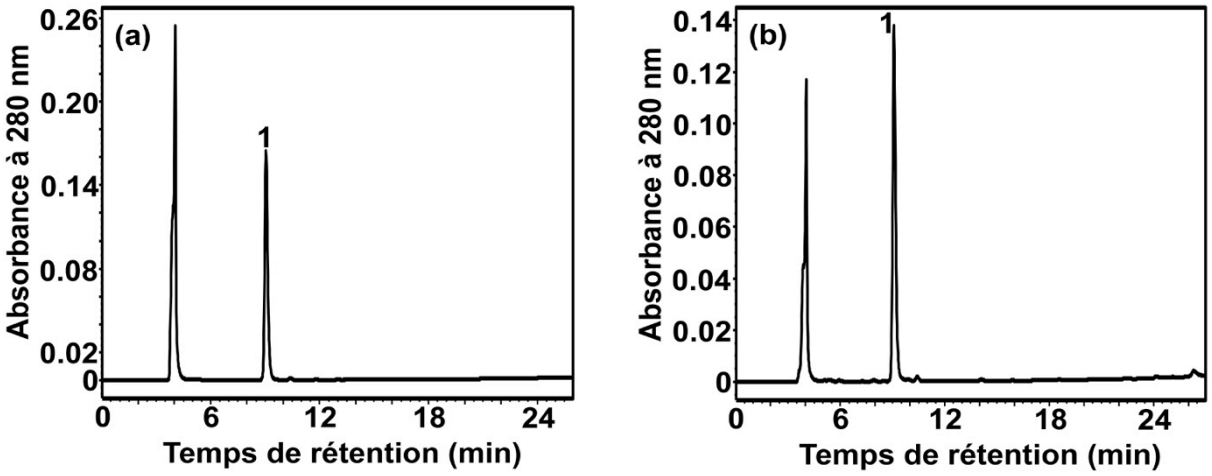


Figure 56. Confirmation chromatographique de l'absence de produit dans le mélange de *Vv*ANS et de (-)-catéchine.

Chromatogrammes HPLC sur colonne Atlantis C18. (a) Standard commercial de (-)-catéchine incubé dans le milieu réactionnel sans *Vv*ANS; (b) Standard commercial de (-)-catéchine incubé dans le milieu réactionnel en présence de *Vv*ANS.

II.1.3.4. (-)-épicatéchine

La (-)-épicatéchine est un autre stéréoisomère de catéchine, de configuration 2R,3R (**figure 46**). La (-)-épicatéchine et la (+)-catéchine sont les deux stéréoisomères les plus fréquents dans la nature. Comme le montre la **figure 57**, un grand pic correspondant à la (-)-épicatéchine (pic 1, 11,4 min) est encore observé après la réaction enzymatique de 10^{-6} M de *Vv*ANS avec 100 µM de (-)-épicatéchine, et aucun nouveau pic n'est observé. La (-)-épicatéchine n'est donc pas substrat de la *Vv*ANS.

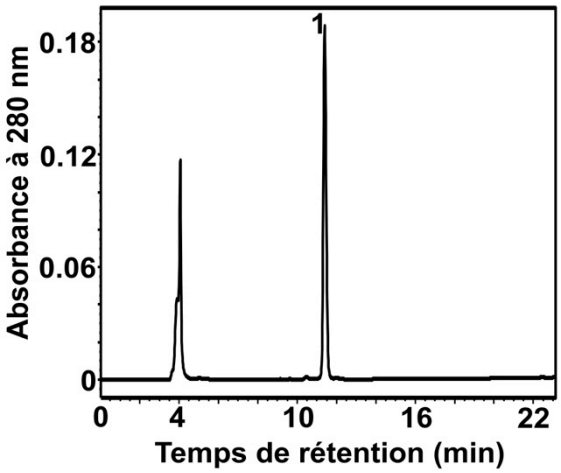


Figure 57. Confirmation chromatographique de l'absence de produit dans le mélange de *Vv*ANS et de (-)-épicatéchine.

Chromatogrammes HPLC sur colonne Atlantis C18. Standard commercial de (-)-épicatéchine incubé dans le milieu réactionnel en présence de *Vv*ANS.

II.1.3.5. (+)-épicatéchine

La (+)-épicatéchine est le troisième stéréoisomère de catéchine, de configuration 2S,3S (**figure 46**). Elle n'est pas disponible dans le commerce, et elle a été produite grâce à la réduction enzymatique de la cyanidine par l'anthocyanidine réductase de *Vitis vinifera* (*Vv*ANR) (***Gargouri et coll***., ***2009***). Comme le montre la **figure 58**, après incubation de 10^{-6} M de *Vv*ANS avec 100 µM de (+)-épicatéchine, on retrouve le pic correspondant de (+)-épicatéchine (pic 1, 11,7 min), et aucun nouveau pic n'est observé. La (+)-épicatéchine n'est donc pas substrat de la *Vv*ANS.

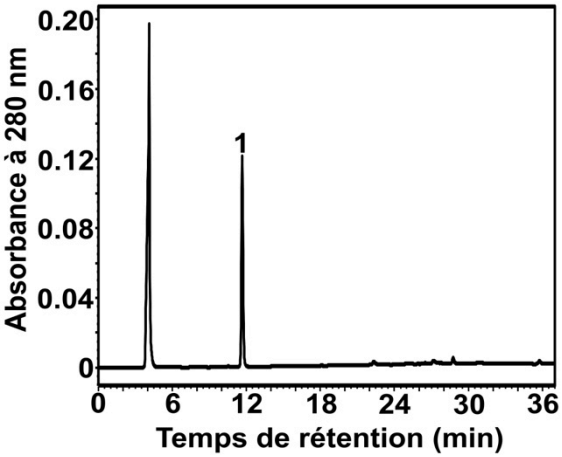


Figure 58. Confirmation chromatographique de l'absence de produit dans le mélange de *Vv*ANS et de (+)-épicatéchine.

Chromatogrammes HPLC sur colonne Atlantis C18. Standard commercial de (+)-épicatéchine incubé dans le milieu réactionnel en présence de *Vv*ANS.

II.1.3.6. (+)-afzéléchine

La (+)-afzéléchine est un flavan-3-ol qui ne diffère de la (+)-catéchine, que par la présence d'un seul hydroxyle phénolique sur le noyau B (monophénol et non catéchol) (**figure 46**).

Comme le montre la **figure 59a**, l'analyse chromatographique du milieu réactionnel contenant l'afzéléchine en l'absence de *Vv*ANS, ne montre que deux pics. Le pic observé à 4,1 min correspond à l'ascorbate et le pic 1 observé à 20,1 min correspond à la (+)-afzéléchine. Comme le montre la **figure 59b**, en présence de 10^{-6} M de *Vv*ANS, on retrouve un pic majeur de (+)-afzéléchine à 20,2 min, et aucun nouveau pic n'est observé. La (+)-afzéléchine n'est donc pas substrat de la *Vv*ANS.

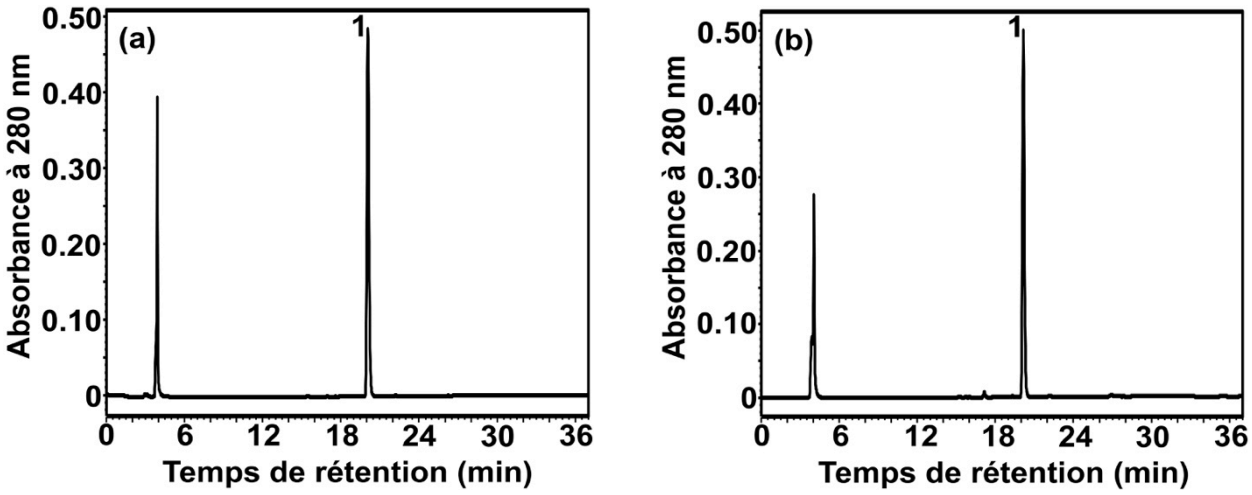


Figure 59. Confirmation chromatographique de l'absence de produit dans le mélange de *Vv*ANS et de (+)-afzéléchine.

Chromatogrammes HPLC sur colonne Atlantis C18. (a) Standard commercial d'afzéléchine 50 µM incubé dans le milieu réactionnel en l'absence de *Vv*ANS; (b) Standard commercial de (+)-afzéléchine incubé dans le milieu réactionnel en présence de *Vv*ANS.

II.1.4. Flavan-3,4-diols

Les flavan-3,4-diols (ou leucoanthocyanidines) constituent une autre sous-famille de flavonoïdes. D'après ce que nous savons, il existe au moins deux stéréoisomères de leucocyanidine, l'un de configuration 3,4-cis et l'autre de configuration 3,4-trans, ces deux configurations faisant référence aux positions relatives des deux hydroxyles en C_3 et C_4 du cycle C (**figure 60**). La (+)-2,3-trans-3,4-cis-leucocyanidine est considérée comme le substrat naturel de l'ANS, et sa transformation par l'ANS en cyanidine est généralement considérée comme la principale source physiologique de cyanidine *in vivo*. La (+)-2,3-trans-3,4-trans-leucocyanidine, quant à elle, n'existe peut-être pas dans la nature. D'après ***Turnbull et coll.*** (***2004***), ces deux stéréoisomères sont substrats de l'*At*ANS. Comme décrit plus haut, nous les avons synthétisés au laboratoire.

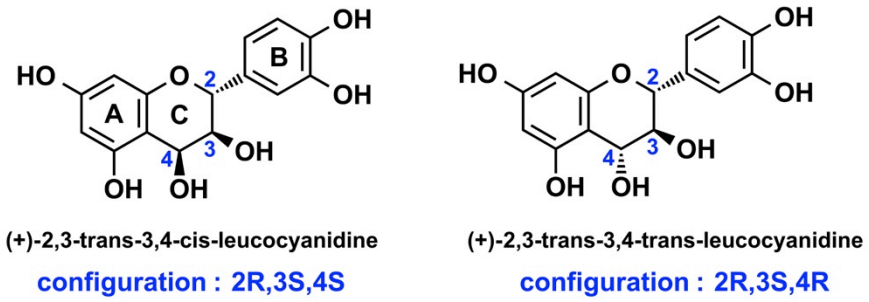


Figure 60. Structures des deux stéréoisomères 3,4-cis et 3,4-trans de leucocyanidine.

II.1.4.1. (+)-2,3-trans-3,4-cis-leucocyanidine

L'échantillon de 3,4-cis-leucocyanidine incubé dans le milieu réactionnel en l'absence de *Vv*ANS donne trois pics chromatographiques (**figure 61a**). Celui qui est observé à 3,6 min correspond à l'ascorbate, le pic 1 (6,2 min) très minoritaire correspond à un contaminant inconnu dans l'échantillon de 3,4-cis-leucocyanidine, et le pic 2 (8 min) correspond à la 3,4-cis-leucocyanidine. Après incubation de la même 3,4-cis-leucocyanidine en présence de 10^{-6} M de *Vv*ANS, deux nouveaux pics sont observés (**figure 61b**). La 3,4-cis-leucocyanidine est donc substrat de la *Vv*ANS. Comme le montre la **figure 61b**, le produit élué à 20,1 min (pic 4) est vraisemblablement la quercétine, d'après le temps de rétention du standard commercial (pic 4', 20,6 min), et celui qui est élué à 4,5 min (pic 3) est inconnu.

Pour bien identifier le contaminant présent dans l'échantillon de 3,4-cis-leucocyanidine (pic 1, **figure 61a**) et les deux produits enzymatiques (pic 3 et 4, **figure 61b**), les trois composés ont été collectés puis analysés directement par MS et MS/MS.

L'analyse MS du contaminant collecté (pic 1, **figure 61a**) produit deux pics de *m/z* 577 et 595 (**figure 62a**). La fragmentation MS/MS de l'ion de *m/z* 577 produit plusieurs ions fragments (**figure 62b**), celui de *m/z* 289 correspondant à l'ion $[M+H]^+$ de leucocyanidine déshydratée. Donc, l'ion de *m/z* 577 serait l'ion $[M+H]^+$ d'un dimère du produit déshydraté de leucocyanidine (288 × 2 = 576 Da). De plus, la fragmentation MS/MS de l'ion de *m/z* 595 produit quatre ions fragments majeurs de *m/z* 577, 425, 307 et 289 (**figure 62c**), celui *m/z* 289 correspondant à l'ion $[M+H]^+$ du produit déshydraté de leucocyanidine (307-18Da), alors que celui de *m/z* 307 correspond à l'ion $[M+H]^+$ de leucocyanidine. Donc l'ion de *m/z* 595 serait l'ion $[M+H]^+$ d'un adduit covalent de leucocyanidine avec son produit déshydraté (306 + 289 = 595 Da).

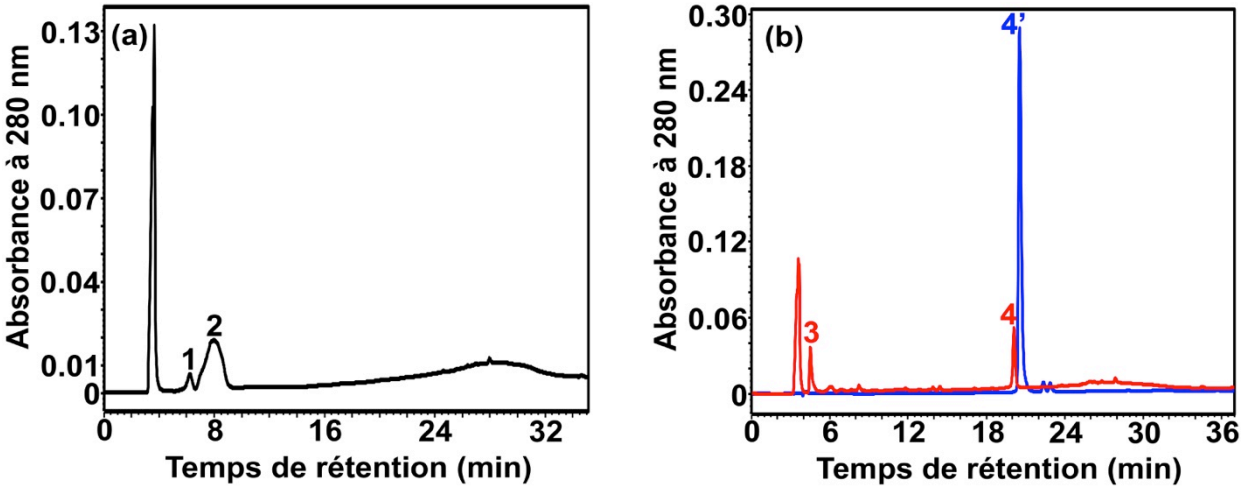


Figure 61. Analyse chromatographique de la transformation enzymatique de la 3,4-cis-leucocyanidine par la *Vv*ANS.

Chromatogrammes HPLC sur colonne Atlantis C18. (a) 3,4-cis leucocyanidine (environ 100µM) incubée dans le milieu réactionnel en l'absence de *Vv*ANS; (b) En rouge: Extrait du milieu réactionnel contenant 10^{-6} M de *Vv*ANS après 30 min d'incubation en présence de 3,4-cis leucocyanidine; en bleu: standard commercial de quercétine 100 µM.

Nous pouvons donc en conclure que le contaminant présent dans l'échantillon de 3,4-cis-leucocyanidine (pic 1, **figure 61a**) est un adduit covalent de leucocyanidine avec son produit déshydraté (M+1, *m/z* 595) ou un mélange du dimère de leucocyanidine déshydratée (M+1, *m/z* 577) et de cet adduit covalent (M+1, *m/z* 595). Cependant, comme le montre la **figure 62c**, l'ion fragment de *m/z* 577 est observé comme un ion fragment majeur, et nous pensons donc que l'ion de *m/z* 577 initialement observé en simple MS (**figure 62a**) provient peut-être de la fragmentation de l'ion de *m/z* 595. En conclusion, le contaminant est probablement un adduit covalent de leucocyanidine avec son produit déshydraté.

L'analyse MS du produit collecté à 4,5 min (pic 3, **figure 61b**) donne trois pics de *m/z* 287, 305 et 323 (**figure 63a**). Parmi eux, l'ion de *m/z* 287 correspond à la cyanidine sous forme d'ion flavylium (ou à un ion $[M+H]^+$ de la cyanidine sous une autre forme), et l'ion de *m/z* 305 pourrait correspondre à l'ion $[M+H]^+$ de la DHQ. Ces deux produits sont cependant élués plus tard sur notre colonne HPLC Atlantis C18. Il s'agit donc d'autres ions, et l'ion de *m/z* 323 pourrait en fait correspondre à l'ion $[M+H]^+$ de la leucocyanidine hydroxylée (306 + 17 = 323 Da). Comme le montre la **figure 63b**, la fragmentation de cet ion donne deux ions fragments majeurs de *m/z* 287 et 305. Par conséquent, les deux ions de *m/z* 287 et 305 observés sur la **figure 63a** proviennent de la fragmentation d'un ion $[M+H]^+$ de *m/z* 323 qui est bien dérivé de la (+)-3,4-cis-leucocyanidine hydroxylée (M = 322 Da).

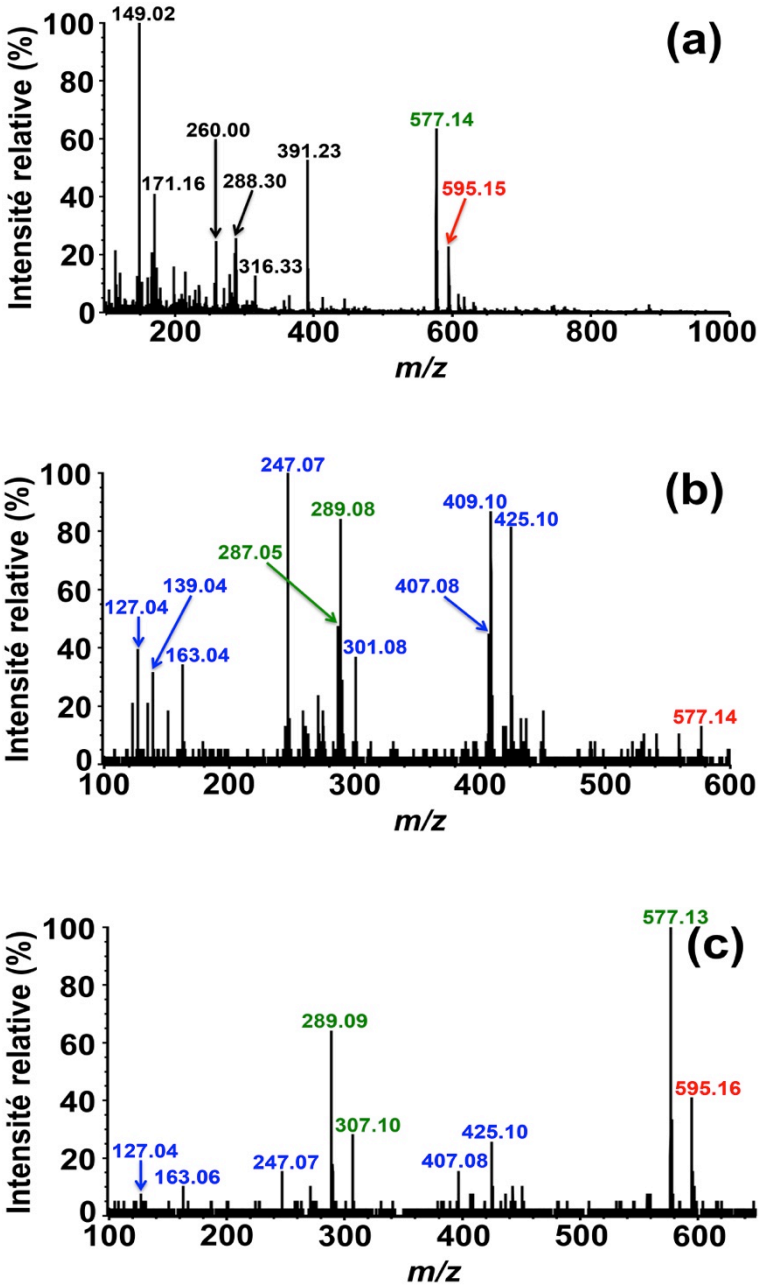


Figure 62. Spectres MS et MS/MS du contaminant de la 3,4-cis-leucocyanidine.

(a) Spectre MS du contaminant collecté lors de l'analyse HPLC (pic 1, **figure 61a**); (b) Spectre MS/MS de l'ion de *m/z* 577; (c) Spectre MS/MS de l'ion de *m/z* 595.

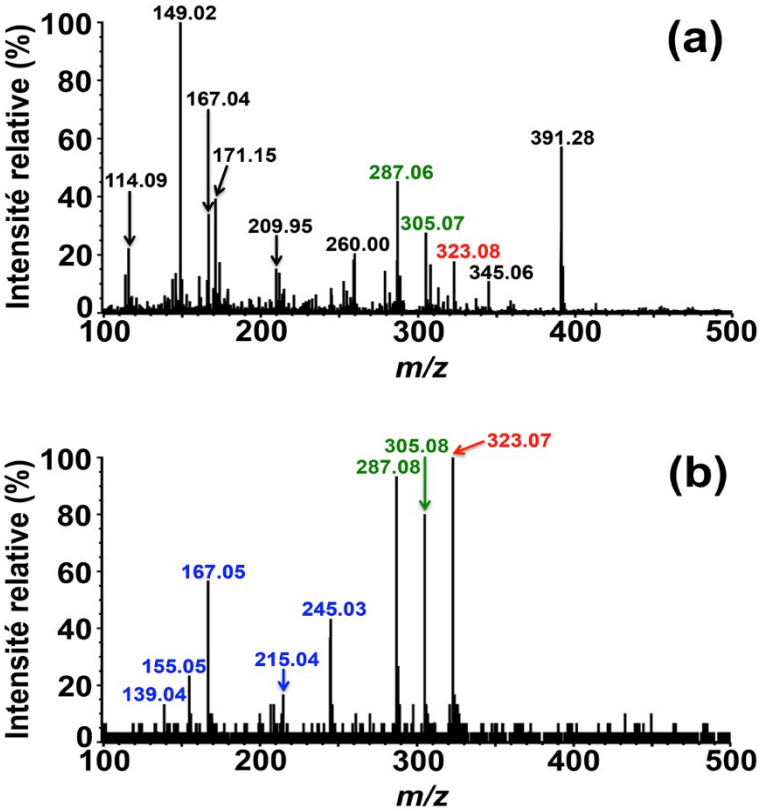


Figure 63. Spectres MS et MS/MS du produit enzymatique de la 3,4-cis-leucocyanidine qui est élué à 4,5 min.

(a) Spectre MS du produit élué à 4,5 min lors de l'analyse HPLC (pic 3, **figure 61b**); (b) Spectre MS/MS de l'ion $[M+H]^+$ de *m/z* 323.

Le produit élué à 20,1 min (pic 4, **figure 61b**) est quant à lui observé au même temps de rétention que la quercétine dont les spectres MS et MS/MS ont été présentés sur la **figure 40**. L'analyse MS de ce produit collecté montre un pic majeur de *m/z* 303 (**figure 64a**), qui correspond à un ion $[M+H]^+$ dont la fragmentation produit plusieurs ions fragments (**figure 64b**), qui sont les mêmes que ceux qu'on observe avec le standard commercial de quercétine (**figure 40b**). Ce produit est donc bien la quercétine.

Nous pouvons donc conclure que la 3,4-cis-leucocyanidine est transformée en deux produits majeurs par la *Vv*ANS, le premier étant un produit d'hydroxylation et d'autre part, la quercétine. Par ailleurs, ces expériences montrent que la cyanidine n'est pas produite lors de la réaction enzymatique de *Vv*ANS avec la (+)-2,3-trans-3,4-cis-leucocyanidine.

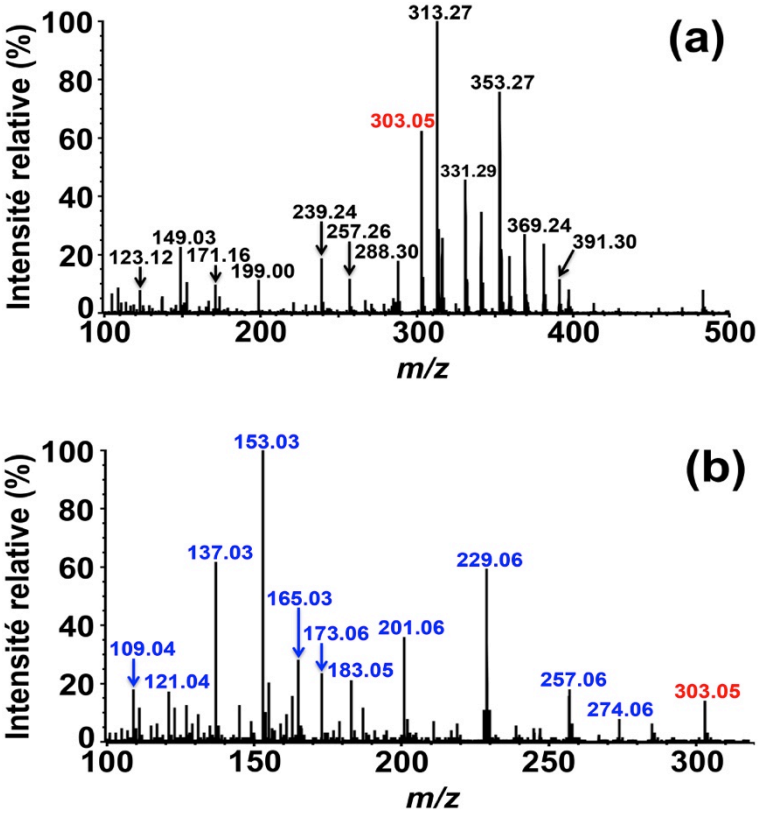


Figure 64. Spectres MS et MS/MS du produit enzymatique de la 3,4-cis leucocyanidine qui est élué à 20,1 min.

(a) Spectre MS du produit élué à 20,1 min lors de l'analyse HPLC (pic 3, **figure 61b**); (b) Spectre MS/MS de l'ion $[M+H]^+$ de *m/z* 303.

II.1.4.2. (+)-2,3-trans-3,4-trans-leucocyanidine

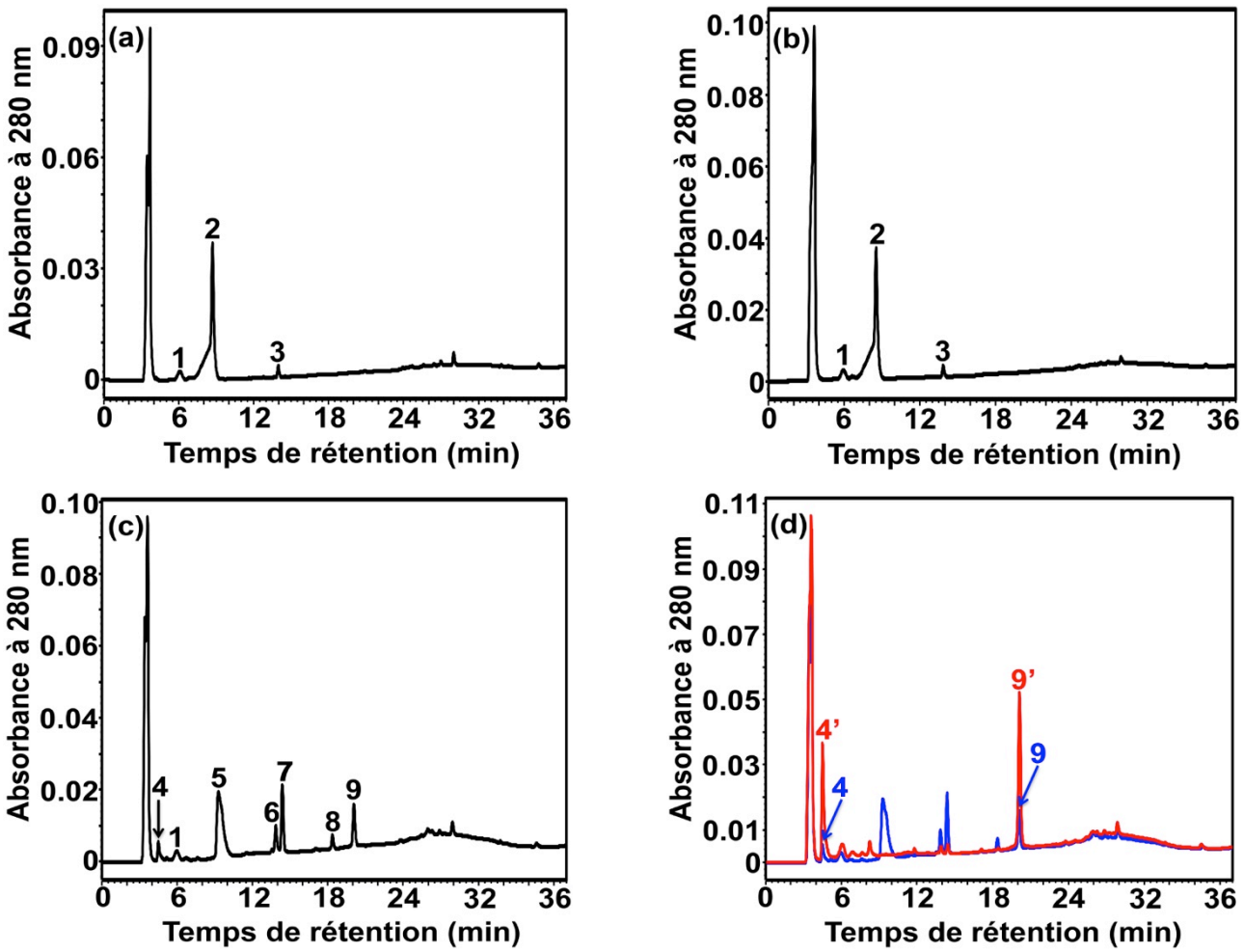
L'analyse chromatographique directe de l'échantillon de 100 µM de 3,4-trans-leucocyanidine donne quatre pics sur le chromatogramme HPLC (**figure 65a**). Le pic observé à 3,7 min correspond à l'ascorbate, le petit pic 1 observé à 6,1 min correspond à un 1er contaminant de l'échantillon de 3,4-trans-leucocyanidine, le pic 2 observé à 8,7 min correspond à la 3,4-trans-leucocyanidine elle-même, et enfin un petit pic 3 observé à 14 min correspond à un second contaminant de l'échantillon de 3,4-trans-leucocyanidine. Après 30 min d'incubation de cet échantillon à 35°C dans le milieu réactionnel en l'absence de *Vv*ANS, le chromatogramme obtenu (**figure 65b**) donne exactement les mêmes pics. Enfin, après incubation dans le milieu réactionnel de 100 µM de 3,4-trans-leucocyanidine en présence de 10^{-6} M de *Vv*ANS, six nouveaux pics sont observés (**figure 65c**).

Comme le montre la **figure 65d**, le produit élué à 4,5 min (pic 4 bleu) et le produit élué à 20,1 min (pic 9 bleu) correspondent bien aux deux produits enzymatiques observés avec la 3,4-cis-leucocyanidine (pic 4' et 9'), qui sont respectivement le produit hydroxylé et la quercétine. Le produit élué à 13,9 min (pic 6) serait la (+)-DHQ dont le temps de rétention est le même (pic 6',

13,8 min, **figure 65e**), et le produit élué à 18,4 min (pic 8) serait la cyanidine d'après le temps de rétention du standard commercial de chlorure de cyanidine (pic 8', 18,5 min, **figure 65f**). Comme le montre la **figure 65g**, le contaminant élué à 14 min (pic 3) correspond au produit élué à 13,9 min (pic 6), qui a été attribué à (+)-DHQ (**figure 65e**), donc ce contaminant est la (+)-DHQ, qui provient sans doute de la synthèse chimique de 3,4-trans-leucocyanidine utilisant la (+)-DHQ.

Le contaminant élué à 6,1 min (pic 1), et les produits élués à 9,3 min (pic 5) et 14,4 min (pic 7) sont quant à eux collectés pour analyse directe par MS et MS/MS.

Pour le contaminant élué à 6 min (pic 1, **figure 65b**) et collecté, les résultats des analyses MS et MS/MS (**figure 66**) sont identiques à ceux des analyses MS et MS/MS du contaminant observé avec la 3,4-cis-leucocyanidine (**figure 62**). Il s'agirait donc d'un adduit covalent de leucocyanidine avec son produit déshydraté.



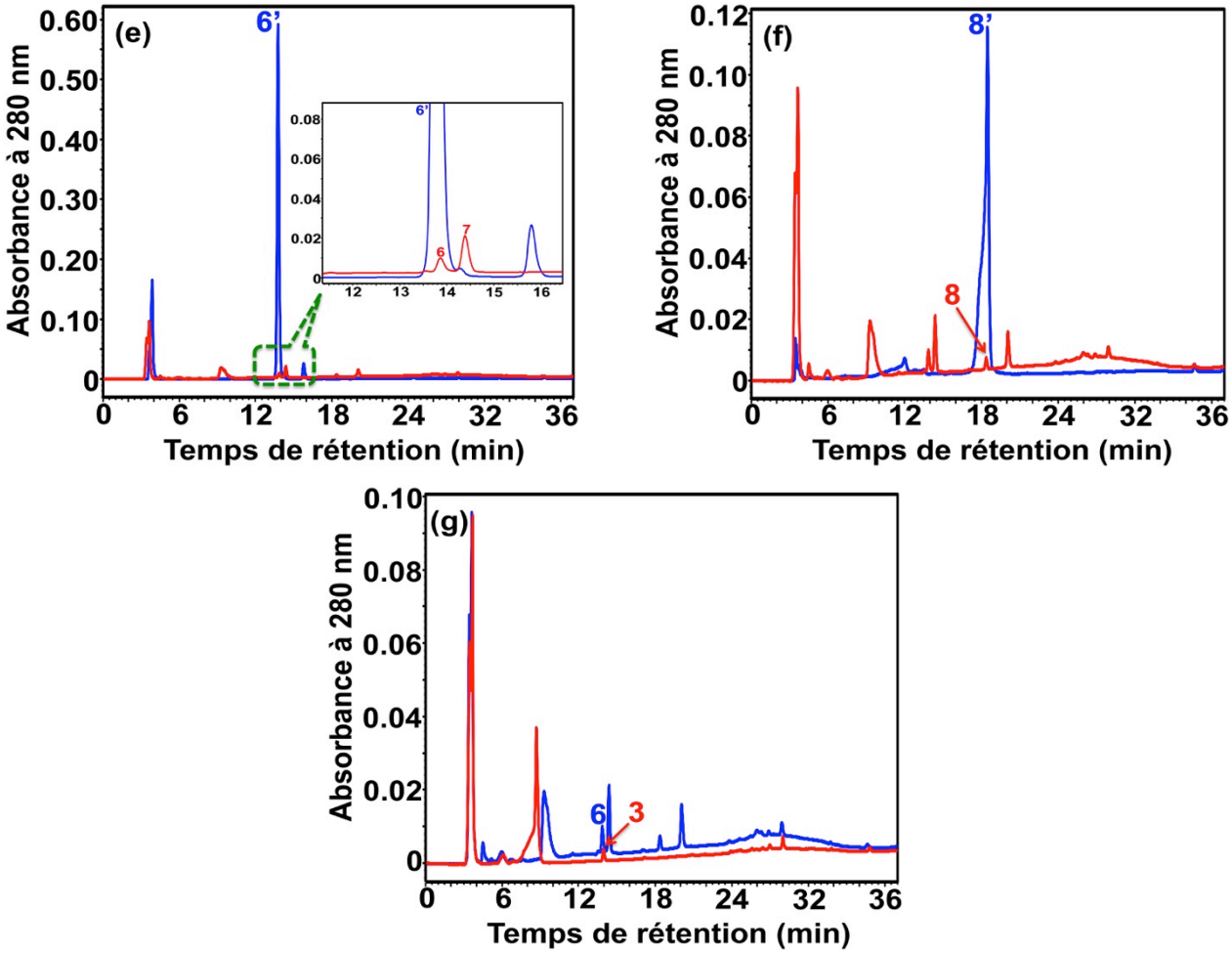


Figure 65. Analyse chromatographique de la transformation enzymatique de la 3,4-trans-leucocyanidine par la *Vv*ANS.

Chromatogrammes HPLC sur colonne Atlantis C18. (a) Echantillon de 3,4-trans-leucocyanidine; (b) Dégradation non-enzymatique de la 3,4-trans-leucocyanidine; (c) Extrait du milieu réactionnel contenant 10^{-6} M de *Vv*ANS après 30 min d'incubation en présence de 3,4-trans-leucocyanidine; (d) Comparaison des produits obtenus lors de la réaction de *Vv*ANS avec la 3,4-trans-leucocyanidine (en bleu) et la 3,4-cis-leucocyanidine (en rouge); (e) Standard commercial de (+)-DHQ en bleu; (f) Standard commercial de chlorure de cyanidine (en bleu); (g) Dégradation non-enzymatique de la 3,4-trans-leucocyanidine (en rouge) et transformation enzymatique de la 3,4-trans-leucocyanidine par la *Vv*ANS (en bleu).

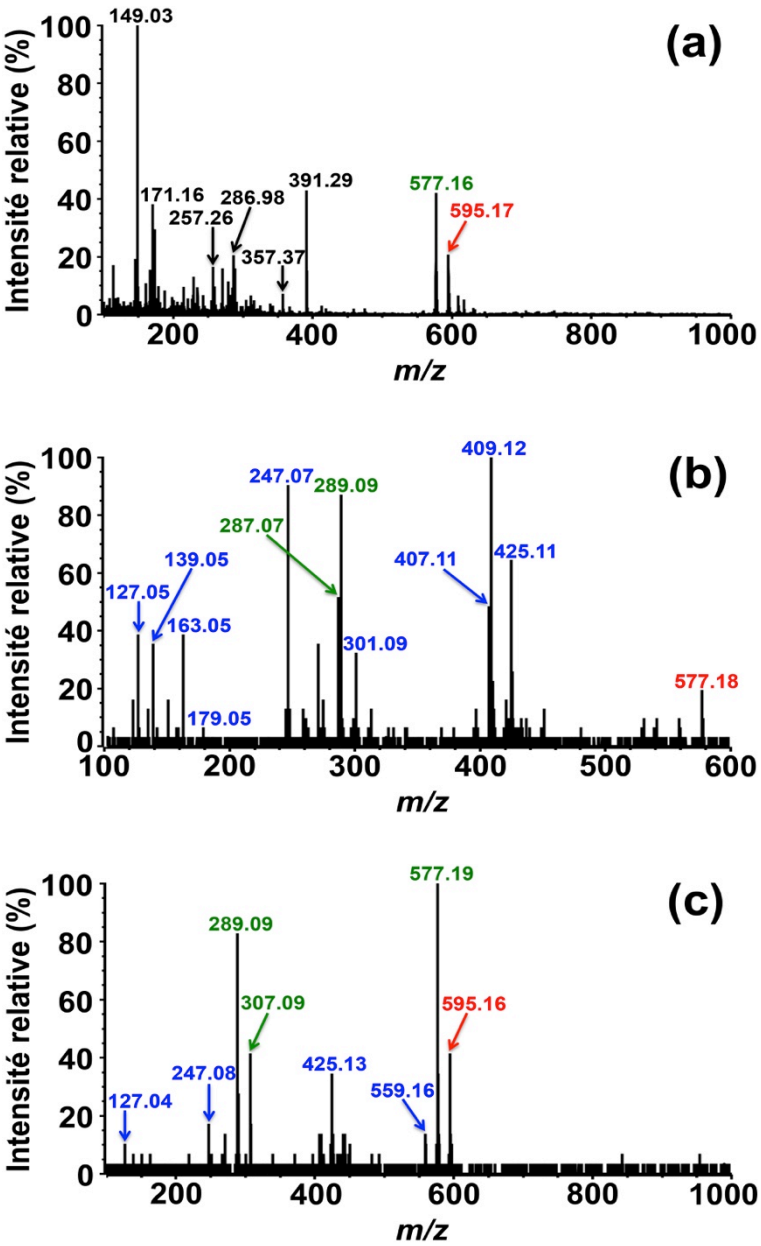


Figure 66. Spectres MS et MS/MS du contaminant élué à 6 min lors de l'analyse HPLC des produits enzymatiques de la 3,4-trans-leucocyanidine.

(a) Spectre MS du contaminant collecté à 6 min lors de l'analyse HPLC (pic 1, **figure 65b**); (b) Spectre MS/MS de l'ion de *m/z* 577; (c) Spectre MS/MS de l'ion de *m/z* 595.

Comme le montre la **figure 67**, l'analyse par MS et MS/MS du produit élué à 9,3 min (pic 5, **figure 65c**), donne des spectres qui sont presque identiques à ceux de l'analyse MS et MS/MS du produit élué à 4,5 min lors de la réaction enzymatique de la *Vv*ANS avec la 3,4-cis-leucocyanidine (**figure 63**). Les deux produits enzymatiques sont donc très similaires, bien que distincts puisque leurs temps de rétention sont différents. Par analogie avec notre analyse précédente du produit dérivé de la 3,4-cis-leucocyanidine, nous pouvons considérer que ce produit enzymatique est un produit d'hydroxylation de la (+)-3,4-trans-leucocyanidine.

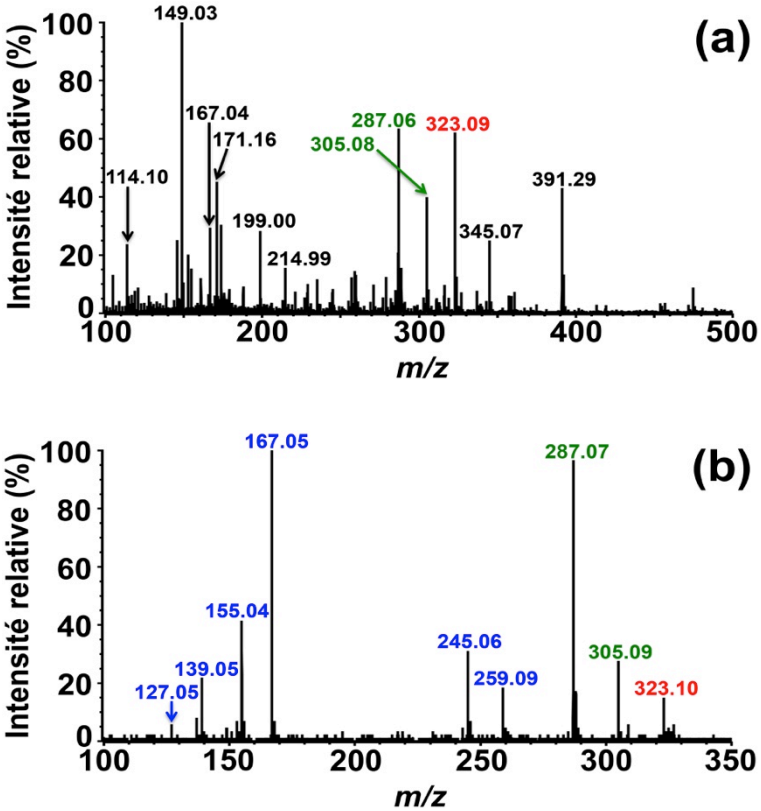


Figure 67. Spectres MS et MS/MS du produit élué à 9,3 min lors de l'analyse HPLC des produits enzymatiques de la 3,4-trans-leucocyanidine.

(a) Spectre MS produit élué à 9,3 min lors de l'analyse HPLC (pic 5, **figure 65c**); (b) Spectre MS/MS de l'ion de *m/z* 323.

En ce qui concerne le produit élué à 14,4 min (pic 7, **figure 65c**), un petit pic de *m/z* 305 est observé sur son spectre MS (**figure 68a**), et il présente une signature MS/MS intéressante. La fragmentation de cet ion de *m/z* 305 produit en effet six ions fragments majeurs de *m/z* 304, 287, 259, 231, 195, 153, 149 et 123 (**figure 68b**). Etant donné que cet ion de *m/z* 305 pourrait correspondre à l'ion $[M+H]^+$ de DHQ, l'analyse MS et MS/MS du standard commercial de (+)-DHQ a été effectuée. Comme le montre la **figure 69a**, un grand pic de *m/z* 305 est bien observé, et la fragmentation de cet ion $[M+H]^+$ de *m/z* 305 produit plusieurs ions fragments (**figure 69b**) dont les 5 ions fragments majeurs de *m/z* 259, 231, 153, 149,et 123 sont retrouvés à l'identique sur le spectre MS/MS de l'ion de *m/z* 305 (**figure 68b**). Par conséquent, l'ion de *m/z* 305 observé sur la **figure 68a** devrait correspondre à l'ion $[M+H]^+$ de DHQ, mais comme la (+)-DHQ est éluée légèrement plus tôt que ce produit, nous pensons que ce dernier pourrait être un stéréoisomère de la (+)-DHQ. On notera que la faible intensité de cet ion est seulement due à la faible concentration du produit correspondant.

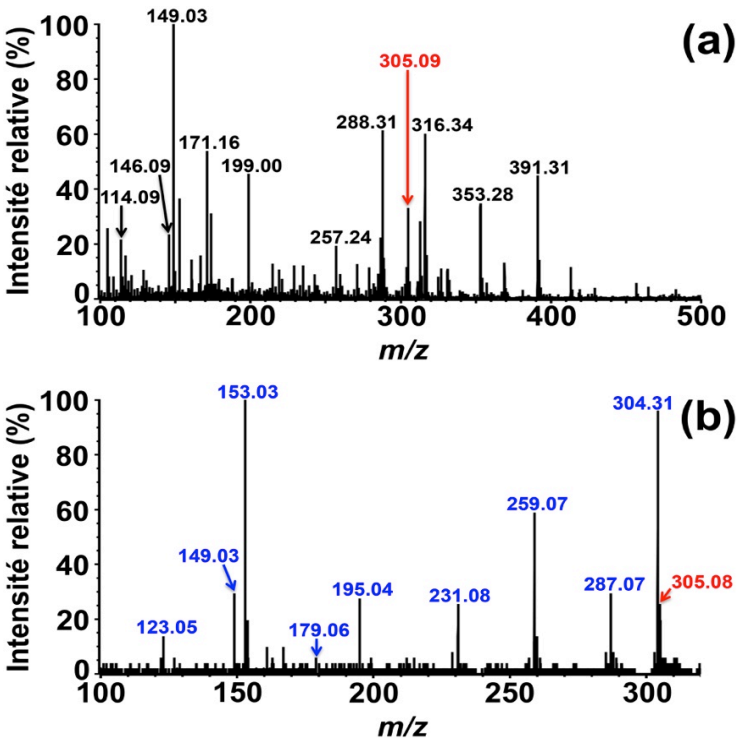


Figure 68. Spectres MS et MS/MS du produit élué à 14,4 min lors de l'analyse HPLC des produits enzymatiques de la 3,4-trans-leucocyanidine.

(a) Spectre MS du produit élué à 14,4 min lors de l'analyse HPLC (pic 7, **figure 65c**); (b) Spectre MS/MS de l'ion de *m/z* 305.

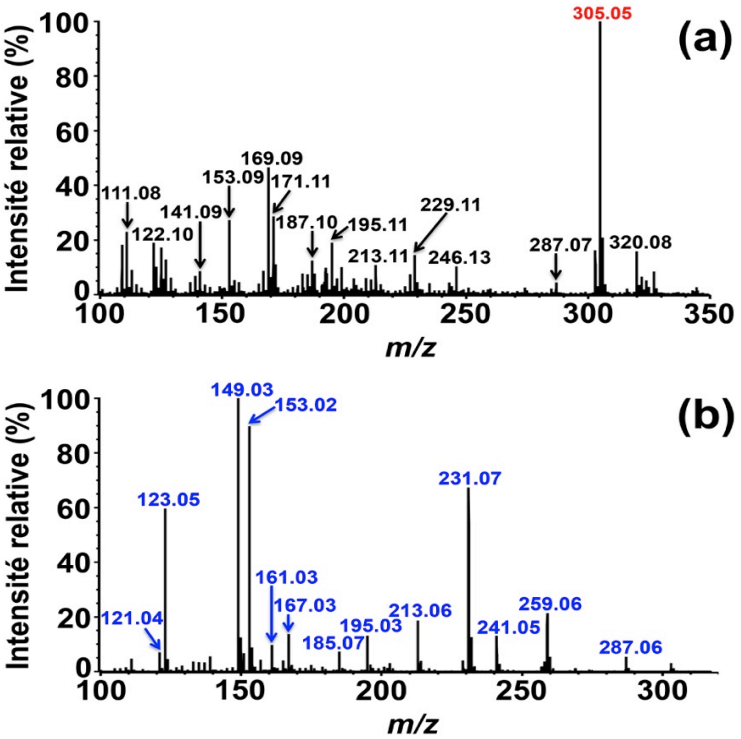


Figure 69. Spectres MS et MS/MS du standard commercial de (+)-DHQ.

(a) Spectre MS; (b) Spectre MS/MS de l'ion $[M+H]^+$ de *m/z* 305.

Turnbull et coll. (***2004***) ont montré que la (+)-3,4-trans-leucocyanidine pouvait être transformée par l'*At*ANS en cinq produits dont trois sont la (+)-DHQ et ses deux stéréoisomères, (-)-DHQ et (-)-épiDHQ (**figure 70**). Nous savons qu'il n'est pas possible de séparer la (+)-DHQ et la (-)-DHQ sur notre colonne Atlantis C18, or comme le montre la **figure 65c**, ce produit (pic 7) est pourtant séparé de la (+)-DHQ (pic 6), même s'ils sont très proches. Notre conclusion est que ce produit est un stéréoisomère de (+)-DHQ, qui est soit la (-)-épiDHQ, soit la (+)-épiDHQ.

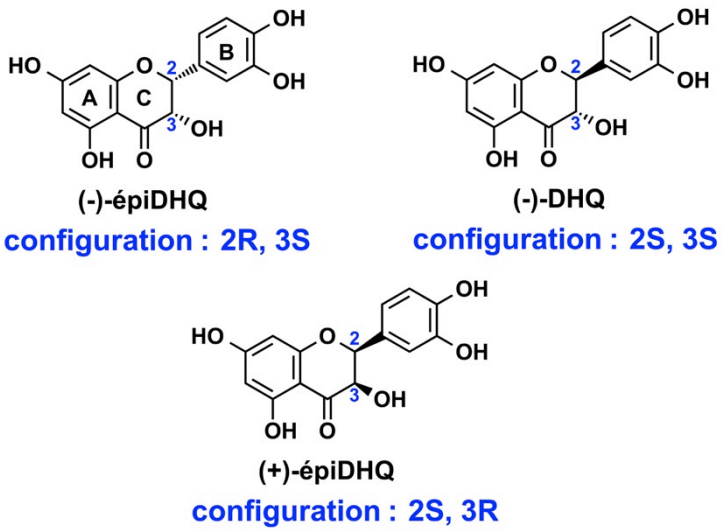


Figure 70. Structures des trois stéréoisomères de la (+)-DHQ.

Nous pouvons finalement conclure que la 3,4-trans-leucocyanidine est un substrat de la *Vv*ANS, qui est apparemment transformé en cinq produits (**figure 65c**) qui incluent un produit monohydroxylé (pic 5), la (+)-DHQ (pic 6), un stéréoisomère de (+)-DHQ qui serait *a priori* de type épiDHQ (pic 7), la cyanidine (pic 8) et la quercétine (pic 9).

Nous pensons cependant que le produit monohydroxylé observé (pic 4, **figure 65c**) est dérivé de la 3,4-cis-leucocyanidine, dont nous avons vu qu'on le retrouvait à hauteur de 13% dans l'échantillon de 3,4-trans-leucocyanidine.

Il n'est pas non plus exclu que la quercétine ne soit pas non plus un produit enzymatique directement dérivé de la 3,4-trans-leucocyanidine, puisque de la DHQ est produite dans le milieu, et qu'on sait qu'elle est transformée en quercétine par la *Vv*ANS. Le plus probable est que la (+)-DHQ est un produit majeur de la transformation enzymatique de la 3,4-trans-leucocyanidine par la *Vv*ANS, mais qu'elle apparait finalement comme un produit mineur parce qu'elle est immédiatement transformée en quercétine par l'enzyme.

II.1.4.2.1. Confirmation du produit enzymatique considéré comme un stéréoisomère de la (+)-DHQ

Comme l'avaient montré ***Gargouri et coll.*** (***2009***) dans notre laboratoire, la colonne chiralcel OJ-H (5 µm, 4,6 mm × 250 mm, Daicel) sépare bien la (+)-catéchine et la (-)-catéchine. C'est pourquoi nous avons utilisé cette colonne chirale pour essayer de séparer les deux stéréoisomères de (+)-DHQ, et les mêmes conditions d'HPLC ont été utilisées, comme décrit ci-dessous. L'élution des stéréoisomères de (+)-DHQ est réalisée à température ambiante et en mode isocratique. L'éluant est un mélange de n-hexane et d'éthanol (70/30, v/v), le débit est de 0,5 ml/min et la détection se fait en absorbance à 214 nm.

Il faut noter que les deux stéréoisomères de (+)-DHQ ne sont pas encore commercialisés à ce jour, et ils ont été synthétisés dans notre laboratoire, comme décrit ci-dessous.

Comme l'ont montré ***Kiehlmann et Li*** (***1995***), la (+)-DHQ peut s'épimériser sur le C_2 du cycle C dans une solution aqueuse ou alcoolique chaude, pour former la (+)-épiDHQ (**figure 71**). Sur la base de leur publication, la (+)-épiDHQ a été produite en incubant l'échantillon de 1 mM de (+)-DHQ dans 1 ml de méthanol/H_2O (50/50, v/v) en présence de 0,5 M de HCl à 75°C pendant 12h.

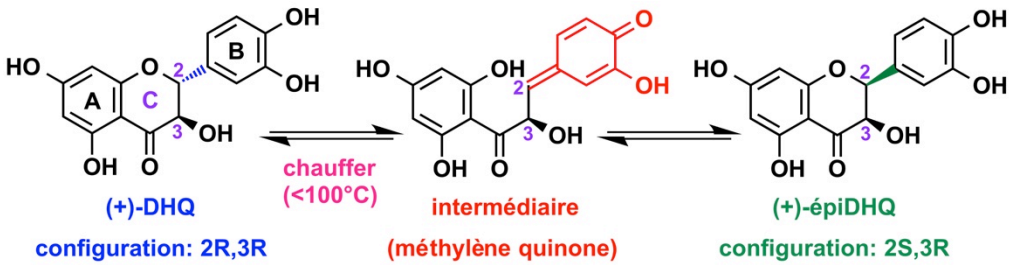


Figure 71. Mécanisme supposé de l'épimérisation de la (+)-DHQ en (+)-épiDHQ, en milieu acide et à chaud.

L'inversion de configuration du carbone tétraédrique C_2 requiert sa conversion en carbone trigonal grâce à la formation d'un intermédiaire méthylène quinone. D'après ***Kiehlmann et Li*** (***1995***).

Après 12h d'incubation à 75°C, 100 µl de milieu réactionnel sont injectés directement sur colonne Atlantis C18. Comme le montre la **figure 72a**, trois pics sont observés. Le pic 1 correspond à la (+)-DHQ résiduelle, le pic 3 correspond au (+)-DHK qui est un contaminant de la (+)-DHQ commerciale, comme nous l'avions noté antérieurement, et le pic 2 est un nouveau pic qui doit correspondre à l'épimère de (+)-DHQ, la (+)-épiDHQ. Un échantillon purifié de (+)-épiDHQ pure a été obtenu en collectant et rassemblant les pics 2 d'une série de chromatogrammes identiques, et l'analyse HPLC de cet échantillon sur colonne Atlantis C18 montre deux pics (**figure 72b**). Le plus petit (pic 1') est *a priori* la (+)-DHQ résiduelle, et le plus grand (pic 2') correspond à la (+)-

épiDHQ. Ceci a été confirmé en comparant l'analyse HPLC de la (+)-épiDHQ pure avec celle du milieu contenant le produit épimérisé avant et après purification (voir **figure 72c**).

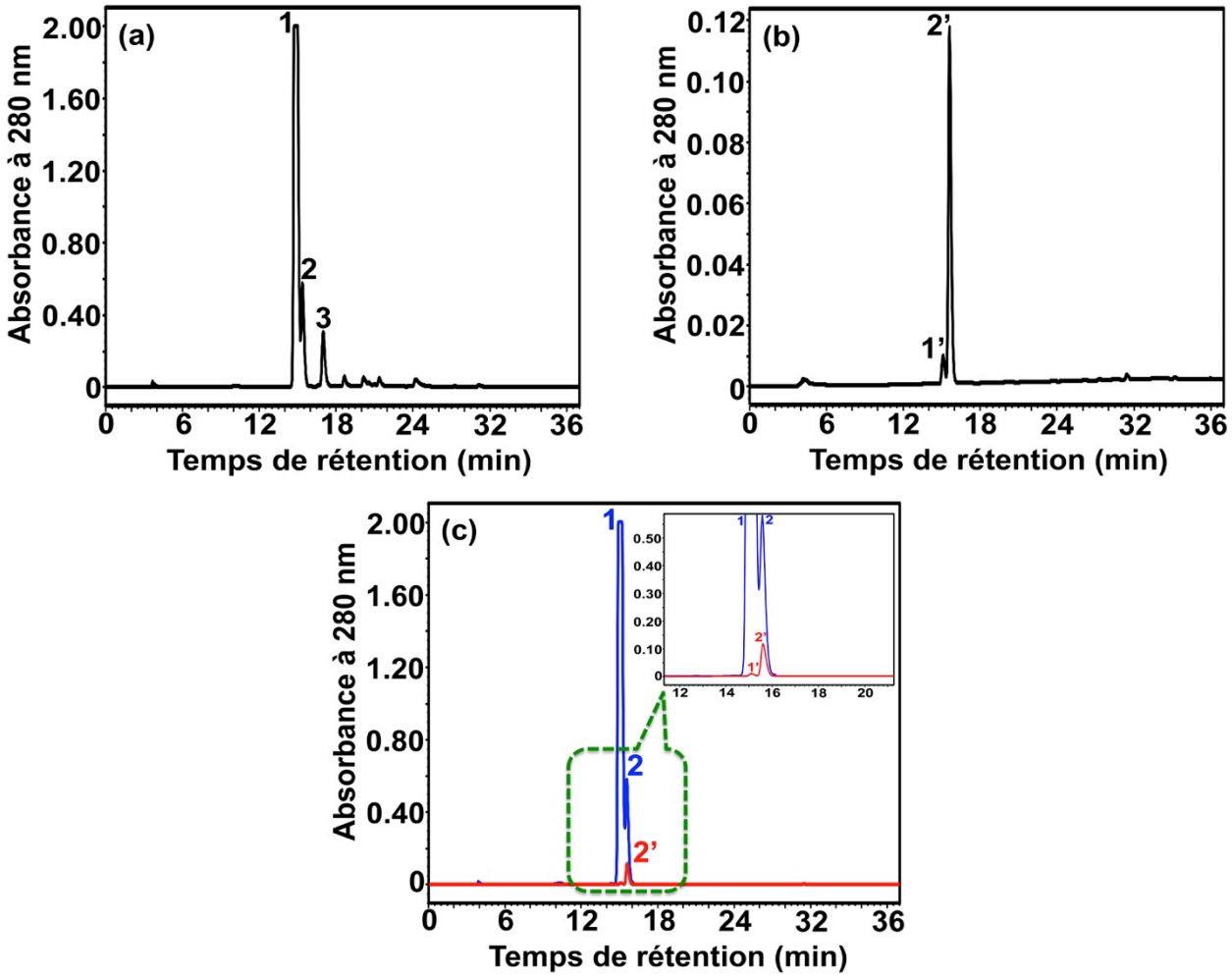


Figure 72. Analyse chromatographique de l'épimérisation acide et à chaud de la (+)-DHQ en (+)-épiDHQ.

Chromatogrammes HPLC sur colonne Atlantis C18. (a) Echantillon de (+)-DHQ à l'issue de l'étape d'isomérisation, mais avant purification; (b) Même échantillon après purification; (c) Superposition de (a) et (b), pour comparaison.

Enfin, l'échantillon de (+)-épiDHQ collecté (≈ 5 ml) a été transféré dans un petit ballon rond d'évaporation en verre (10 ml), puis asséché à 20°C à l'aide d'un évaporateur rotatif. Ce ballon contenant l'échantillon sec de (+)-épiDHQ a été scellé avec un bouchon et du parafilm, puis conservé à -20°C jusqu'à l'analyse HPLC chirale.

Le produit enzymatique considéré comme un stéréoisomère de (+)-DHQ (pic 7, **figure 65b**) a été produit par transformation enzymatique de la 3,4-trans-leucocyanidine par *Vv*ANS sur un grand volume (40 ml). Le mélange de réaction contient 2 mM d'ascorbate, 1 mM de 2OG, 10 µM de Fe(II), 0,1 mg/ml de catalase, et 10^{-6} M de *Vv*ANS dans le tampon 20 mM MES sans NaCl, pH 6,5.

La réaction est déclenchée par addition de 3,4-trans-leucocyanidine (4 ml de solution stock de concentration inconnue). Après 30 min d'incubation à 35°C, 100 µl d'échantillon sont analysés par HPLC sur colonne Atlantis C18 (**figure 73a**), ce qui confirme que l'activité enzymatique est bien la même que celle précédemment visualisée sur la **figure 65**. Le pic 3 correspond à la 3,4-trans-leucocyanidine résiduelle, ce qui indique que la 3,4-trans-leucocyanidine ajoutée était en excès.

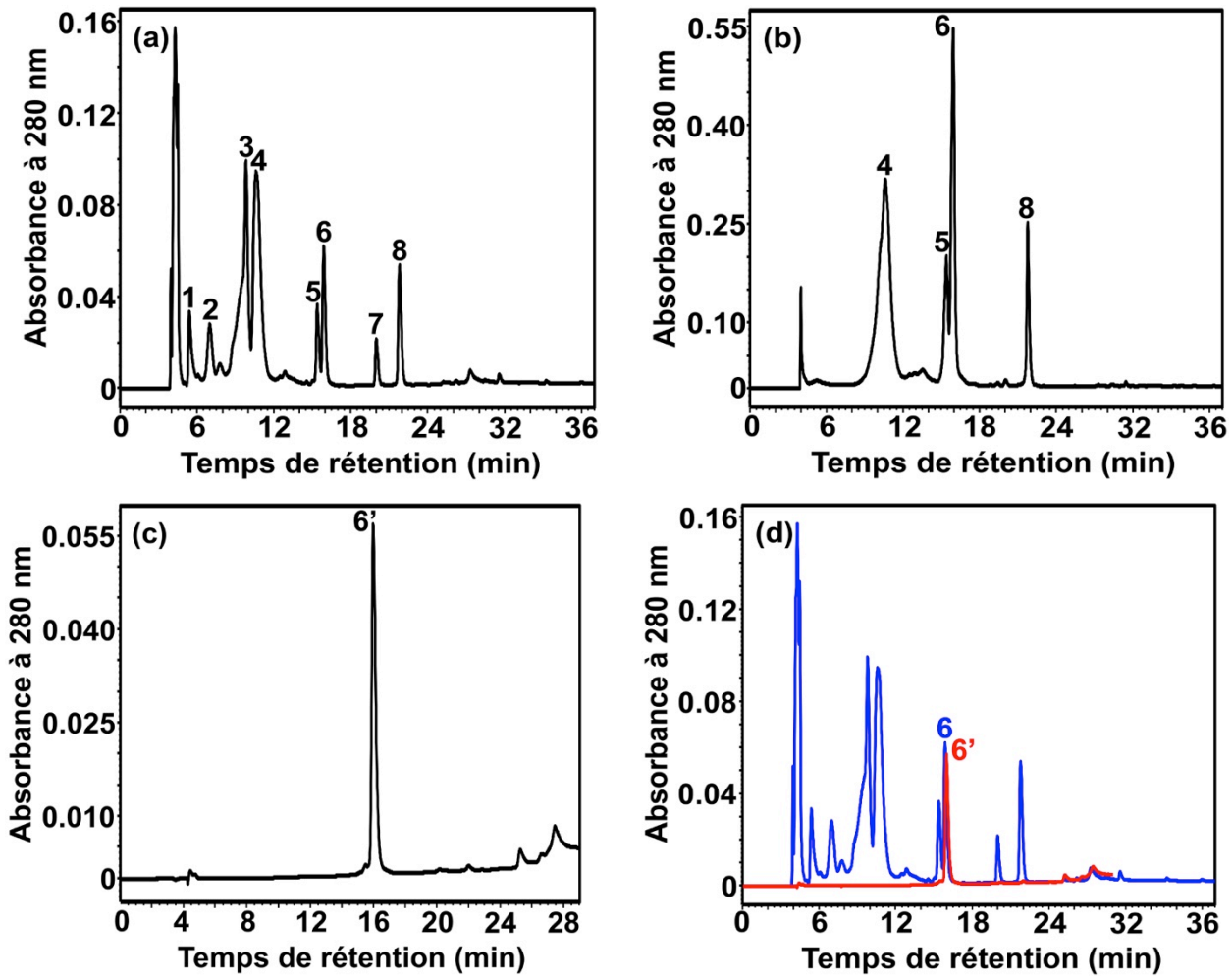


Figure 73. Analyse chromatographique de la transformation de la 3,4-trans-leucocyanidine par la *Vv*ANS dans 40 ml de volume réactionnel.

Chromatogrammes HPLC sur colonne Atlantis C18. (a) Milieu réactionnel après 30 min d'incubation avec la 3,4-trans-leucocyanidine en présence de 10^{-6} M *Vv*ANS; (b) Extrait des produits enzymatiques par l'acétate d'éthyle; (c) Stéréoisomère présumé de la (+)-DHQ; (d) Superposition des chromatogrammes obtenus en (a) et en (c).

Les produits enzymatiques ont ensuite été extraits par l'acétate d'éthyle (2 × 40 ml). Après évaporation complète (à 20°C) de l'extrait d'acétate d'éthyle contenant les produits enzymatiques, le dépôt a été remis en solution dans 2,5 ml de méthanol/H_2O (60/40, v/v), et l'analyse HPLC de cet échantillon sur colonne Atlantis C18 montre quatre pics majeurs (**figure 73b**). Le pic 6 (15,9 min)

correspond au stéréoisomère présumé de (+)-DHQ, et les trois autres pics (4, 5 et 8) correspondent respectivement au produit hydroxylé de la 3,4-trans-leucocyanidine, à la (+)-DHQ et à la quercétine. Un échantillon purifié du stéréoisomère présumé de (+)-DHQ a été obtenu en collectant et rassemblant les pics 6 d'une série de chromatogrammes identiques (**figure 73b**). Comme le montre la **figure 73c**, l'analyse chromatographique de ce produit collecté confirme sa pureté puisqu'un seul pic est observé (pic 6', 16 min) qui est bien le pic attendu d'après la **figure 73d**.

Le produit considéré comme un stéréoisomère de (+)-DHQ a été collecté puis asséché à 20°C grâce à un évaporateur rotatif. Le dépôt obtenu a été remis en solution dans 500 µl de n-hexane/éthanol (70/30, v/v), puis conservé à 4°C pour analyse sur colonne chiralcel.

Dans un premier temps, la séparation de la (+)-catéchine et de la (-)-catéchine sur cette colonne chirale a été testée pour vérifier l'état de la colonne. Un mélange de ces deux stéréoisomères à 100 µM a été préparé dans un solvant n-hexane/éthanol (70/30, v/v), et l'analyse de cet échantillon a été ensuite effectuée sur colonne chirale (50 µl injectés).

Comme le montre la **figure 74a**, deux pics similaires et proches sont observés. Le pic 1 (42,9 min) correspond à la (-)-catéchine, et le pic 2 (49,8 min) correspond à la (+)-catéchine. La colonne chiralcel est donc bien fonctionnelle. L'analyse sur colonne chirale du stéréoisomère présumé de la (+)-DHQ a donc été réalisée immédiatement, et comme le montre la **figure 74b**, le pic 3 (40,5 min) doit correspondre à ce produit.

De manière similaire, l'échantillon de (+)-épiDHQ séché a été remis en solution dans 500 µl de n-hexane/éthanol (70/30, v/v), puis analysé par HPLC sur colonne chiralcel OJ-H (100 µl d'injection). Comme montré sur la **figure 74c**, trois pics proches sont observés, et le pic 4 (29,9 min) qui est le plus grand ne peut correspondre qu'à la (+)-épiDHQ, les deux autres pics minoritaires étant *a priori* des contaminants de l'échantillon initial ou des produits de dégradation de la (+)-épiDHQ. On se souvient que l'échantillon collecté de (+)-épiDHQ contient un peu de (+)-DHQ contaminante (**figure 72b**). Un échantillon de 100 µM de (+)-DHQ a donc été préparé dans le mélange n-hexane/éthanol (70/30, v/v), puis analysé par HPLC sur colonne chiralcel OJ-H (100 µl d'injection).

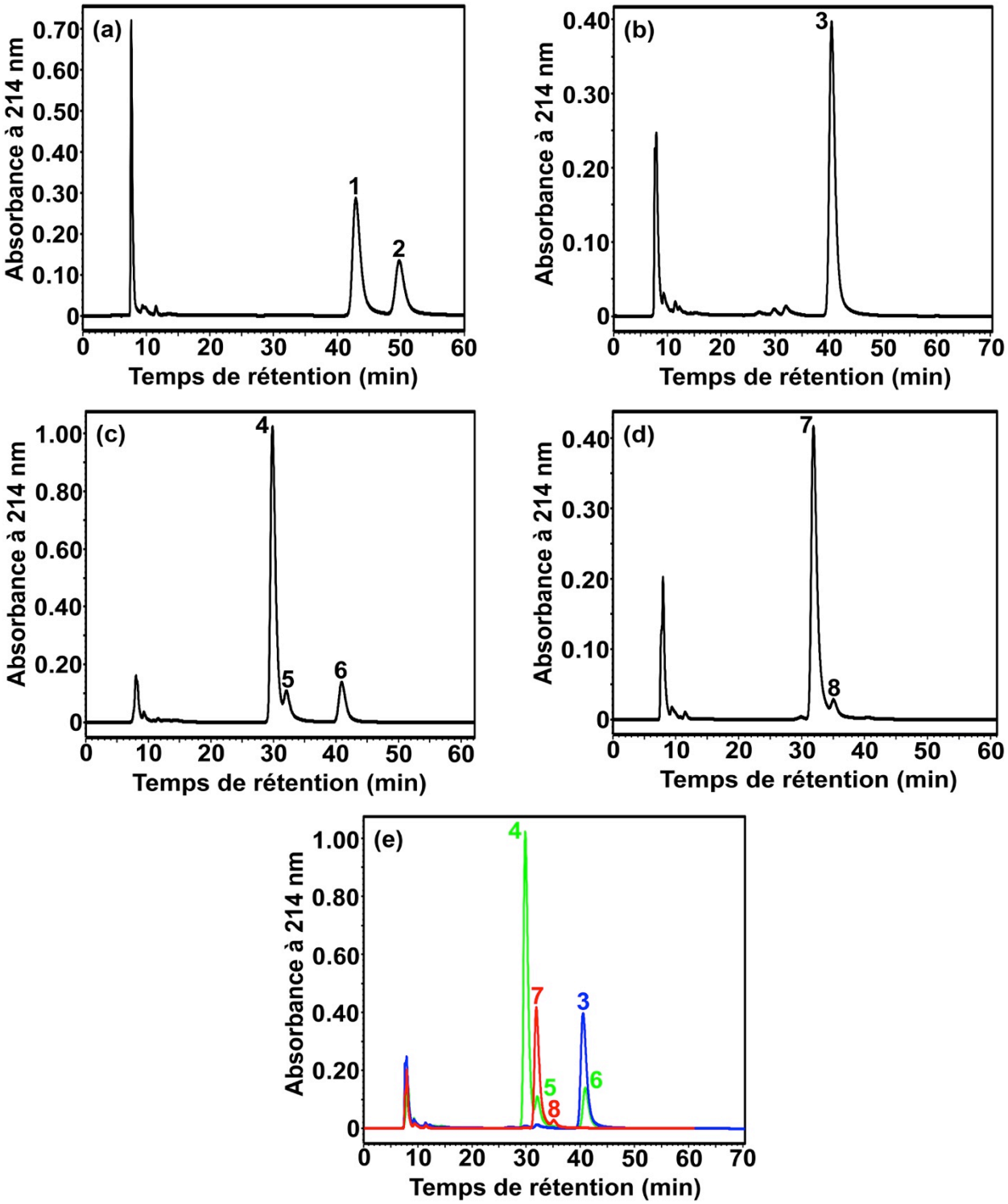


Figure 74. Analyse chromatographique sur colonne chirale du mélange [(+)-catéchine / (-)-catéchine] et du stéréoisomère présumé de la (+)-DHQ produit par la *Vv*ANS en présence de 3,4-trans-leucocyanidine.

Chromatogrammes HPLC sur colonne chiralcel. (a) Mélange de (+)-catéchine et de (-)-catéchine (100 µM chacune); (b) Stéréoisomère présumé de la (+)-DHQ; (c) (+)-épiDHQ; (d) (+)-DHQ; (e) Superposition des chromatogrammes obtenus: (b) en bleu, (c) en vert, et (d) en rouge.

Comme le montre la **figure 74d**, deux pics très proches sont observés, le plus grand (pic 7, 31,9 min) correspond à la (+)-DHQ, et le plus petit (pic 8, 35,1 min) correspond sans doute à un contaminant de l'échantillon de (+)-DHQ, qui pourrait être la (-)-DHQ.

Enfin, la comparaison des chromatogrammes de la (+)-épiDHQ, de la (+)-DHQ et du stéréoisomère présumé de la (+)-DHQ (**figure 74e**) montre clairement que le pic 5 (32,1 min) est bien la (+)-DHQ (pic 7, 31,9 min) et que le pic 6 (40,9 min) est bien le stéréoisomère présumé de la (+)-DHQ (pic 3, 40,5 min). Enfin, il est essentiel de noter que la (+)-épiDHQ (29,9 min) est bien séparée du stéréoisomère présumé de la (+)-DHQ (40,5 min), ce qui indique clairement que ce dernier ne peut être que la (-)-épiDHQ.

II.1.4.2.2. Structure du produit hydroxylé de 3,4-trans-leucocyanidine

Comme le montre la **figure 73a**, le pic 4 (10,6 min) correspond à un produit enzymatique majeur de la 3,4-trans-leucocyanidine, et bien que les analyses MS et MS/MS indiquent de manière quasi-certaine qu'il s'agit d'un produit monohydroxylé de la 3,4-trans-leucocyanidine, la position de l'hydroxylation sur la 3,4-trans-leucocyanidine reste à préciser. Ce produit enzymatique (pic 4, **figure 73b**) a donc été lui aussi collecté lors de l'analyse HPLC, puis stocké à -20°C pour analyse ultérieure. Après deux semaines de conservation à -20°C dans l'éluant méthanol/H_2O (proche de 50/50, v/v) contenant 0,1% de TFA, 100 µl de ce produit ont été analysés par HPLC sur colonne Atlantis C18.

Comme le montre la **figure 75a**, un grand pic (pic 1, 10,1 min) est observé, qui correspond bien au produit hydroxylé de la 3,4-trans-leucocyanidine observé avant sa purification (pic 1', **figure 75b**).

Les autres pics minoritaires sur le chromatogramme (**figure 75a**) pourraient être des produits de dégradation, dont les structures pourraient dès lors nous permettre d'identifier sans ambigüité la molécule source.

Pour ce faire, l'échantillon collecté a été d'abord séché à 20°C par roto-évaporation puis remis en solution dans 200 µl de méthanol/H_2O (v/v, 50/50), afin de le concentrer. L'analyse HPLC de l'échantillon concentré de ce produit montre plusieurs pics (**figure 75c**) dont le premier (pic 1, 10,4 min) est celui que l'on attend (pic 1', 10,6 min, **figure 75b**), mais les quatre autres pics inconnus (pic 2, 3, 4 et 5) méritent une certaine attention, car leurs temps de rétention sont assez proches des temps de rétention de la (+)-DHQ, de la (-)-épiDHQ, de la cyanidine et de la quercétine, respectivement. Ils ont donc été collectés puis analysés par HPLC, MS et MS/MS, en utilisant les standards externes correspondants.

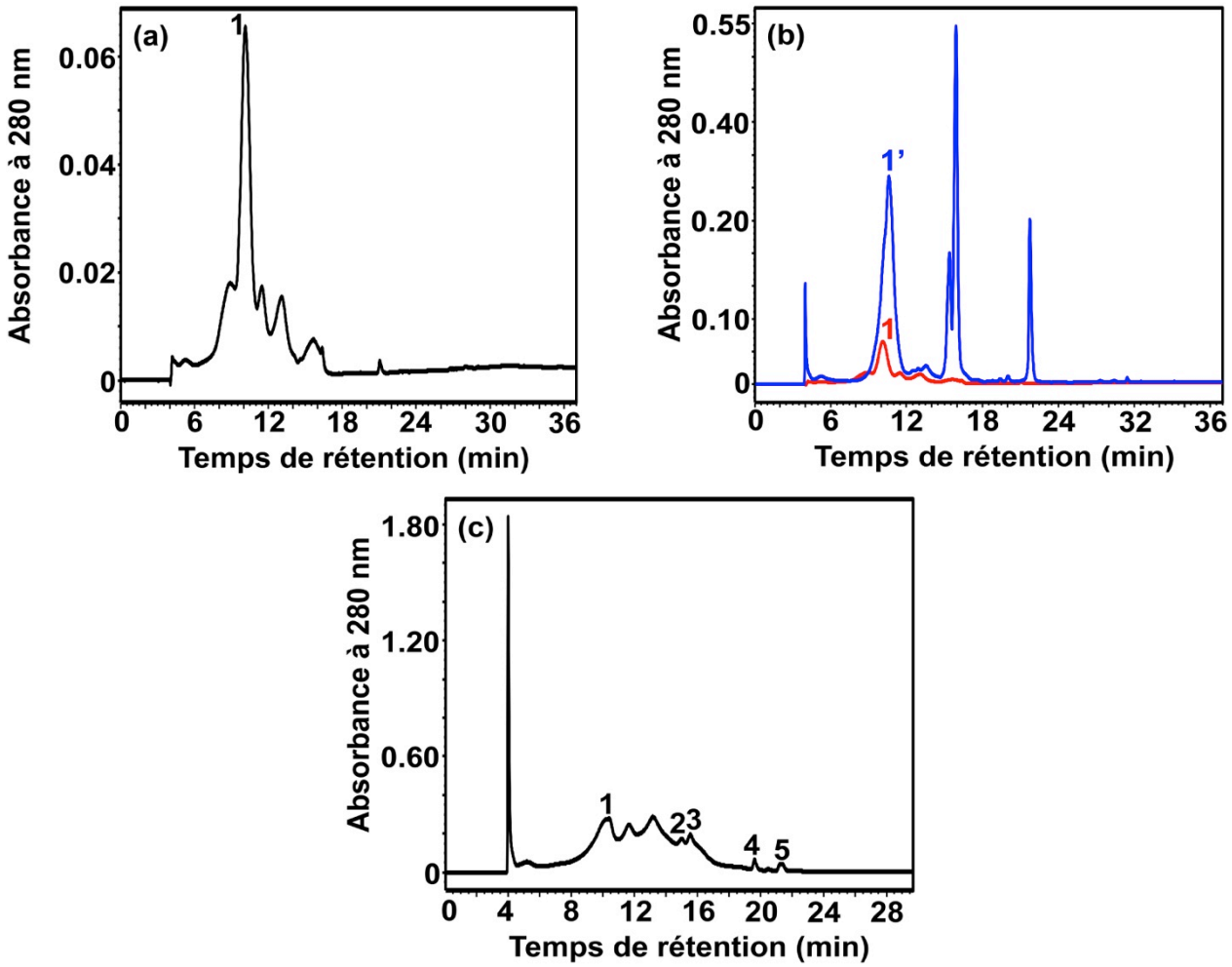


Figure 75. Analyse chromatographique du produit enzymatique monohydroxylé de la 3,4-trans-leucocyanidine.

Chromatogrammes HPLC sur colonne Atlantis C18. (a) Produit collecté, après deux semaines de conservation à -20°C; (b) Superposition du chromatogramme observé en (a) en rouge, et du chromatogramme du produit enzymatique hydroxylé antérieurement observé (**figure 73b**), en bleu; (c) Après concentration du produit collecté en (a).

Les pics 2 (15 min) et 3 (15,6 min) observés sur la **figure 75c** ont été collectés ensemble lors de l'analyse HPLC, à cause des temps de rétention très proches, et l'analyse HPLC de l'échantillon collecté ne montre bien que ces deux pics (**figure 76a**).

Le pic 2 (15 min) est attribué à la (+)-DHQ, le temps de rétention du standard commercial étant le même (pic 2', **figure 76b**), et le pic 3 (15,5 min) est attribué à la (-)-épiDHQ, le temps de rétention du produit de référence que nous avons synthétisé étant là aussi le même (pic 3', **figure 76c**).

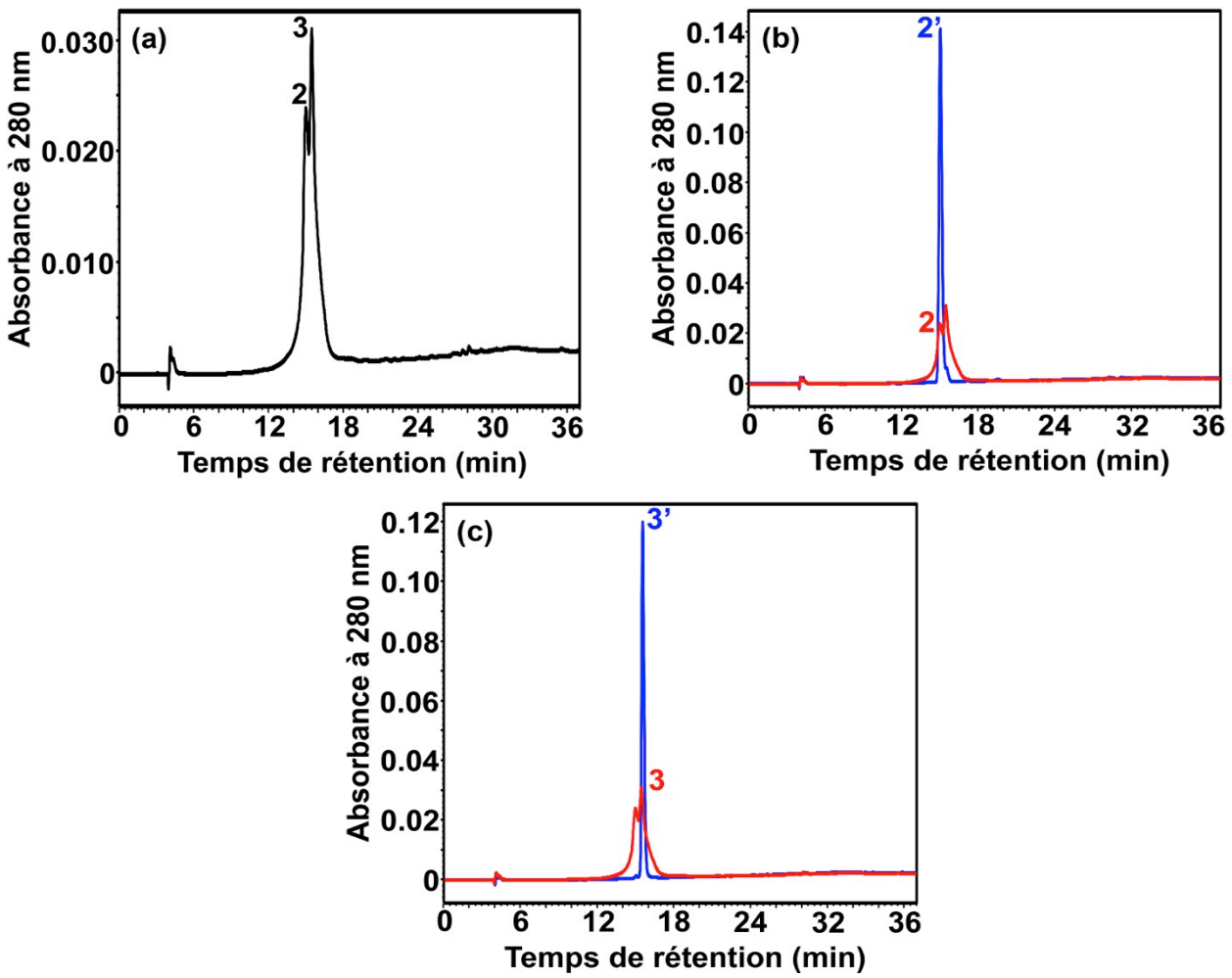


Figure 76. Confirmation chromatographique de l'existence de deux produits de dégradation de même temps de rétention que la (+)-DHQ et la (-)-épiDHQ.

Chromatogrammes HPLC sur colonne Atlantis C18. (a) Produit collecté (pics 2 et 3, **figure 75c**), après deux semaines de conservation à -20°C; (b) Superposition du chromatogramme observé en (a) en rouge, et du chromatogramme de standard de (+)-DHQ, en bleu; (c) Superposition du chromatogramme observé en (a) en rouge, et du chromatogramme de la (-)-épiDHQ, en bleu.

L'analyse MS de l'échantillon collecté des pics 2 + 3 (**figure 75c**) montre plusieurs ions, dont un ion de *m/z* 305 qui pourrait correspondre à l'ion $[M+H]^+$ de DHQ (**figure 77a**). La fragmentation MS/MS de cet ion produit plusieurs ions fragments (**figure 77b**) qui permettent d'affirmer qu'il s'agit bien de l'ion $[M+H]^+$ de la (+)-DHQ après comparaison avec le spectre MS/MS de la **figure 69b**. En conclusion, nous pouvons maintenant confirmer que le pic 2 correspond à la (+)-DHQ et que le pic 3 correspond à la (-)-épiDHQ.

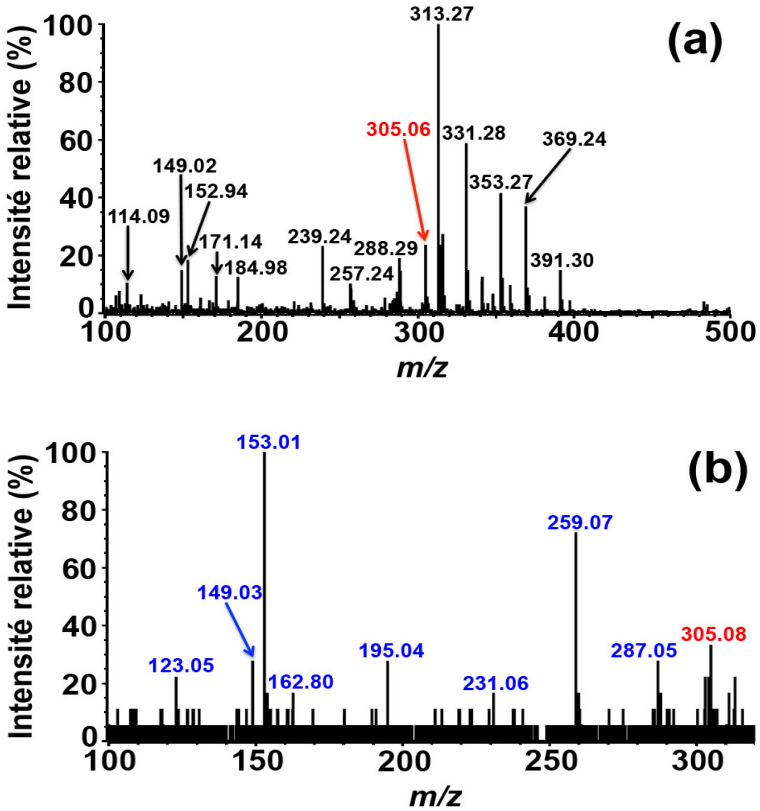


Figure 77. Spectres MS et MS/MS du mélange de (+)-DHQ et (-)-épiDHQ.

(a) Spectre MS du mélange des deux produits élués à 15 min lors de l'analyse HPLC (pics 2 et 3, **figure 75c**); (b) Spectre MS/MS de l'ion de *m/z* 305.

Comme le montre la **figure 78a**, le pic 4 (19,8 min) qui est exactement le même que le pic 4 observé sur la **figure 75c** (19,6 min) peut être attribué à la cyanidine d'après le temps de rétention du standard de chlorure de cyanidine (pic 4', 20 min, **figure 78b**). L'analyse MS de ce pic 4 collecté (**figure 79a**) montre un petit pic de *m/z* 287, qui pourrait correspondre au cation flavylium de la cyanidine, et la fragmentation MS/MS de cet ion de *m/z* 287 produit plusieurs ions fragments (**figure 79b**) qui permettent de confirmer que cette interprétation est correcte, d'après le spectre MS/MS du standard de chlorure de cyanidine (**figure 49b**).

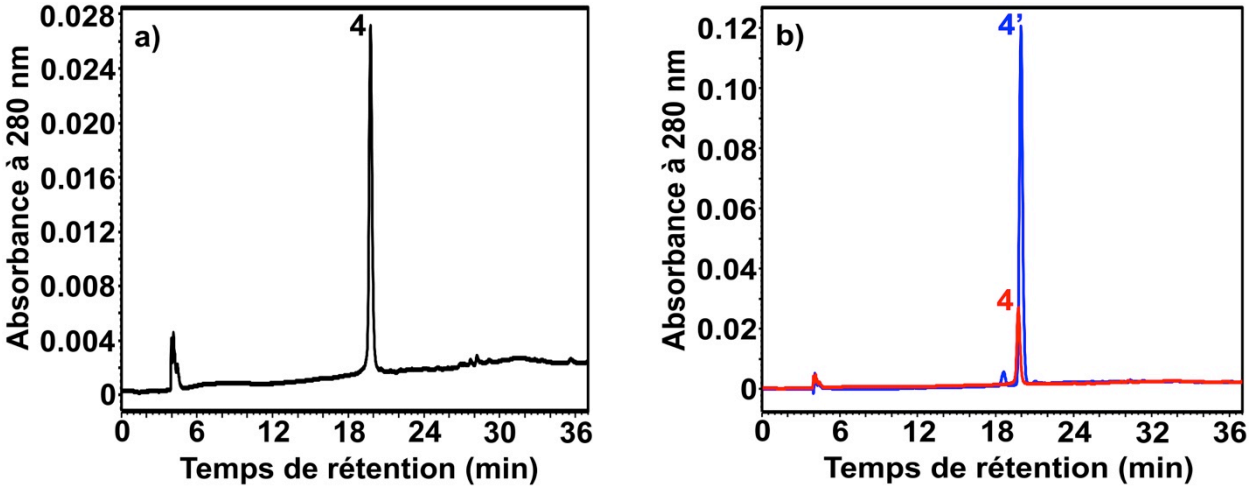


Figure 78. Confirmation chromatographique de l'existence d'un produit de dégradation de même temps de rétention que la cyanidine.

Chromatogrammes HPLC sur colonne Atlantis C18. (a) Produit collecté (pic 4, **figure 75c**); (b) Standard de chlorure de cyanidine, en bleu.

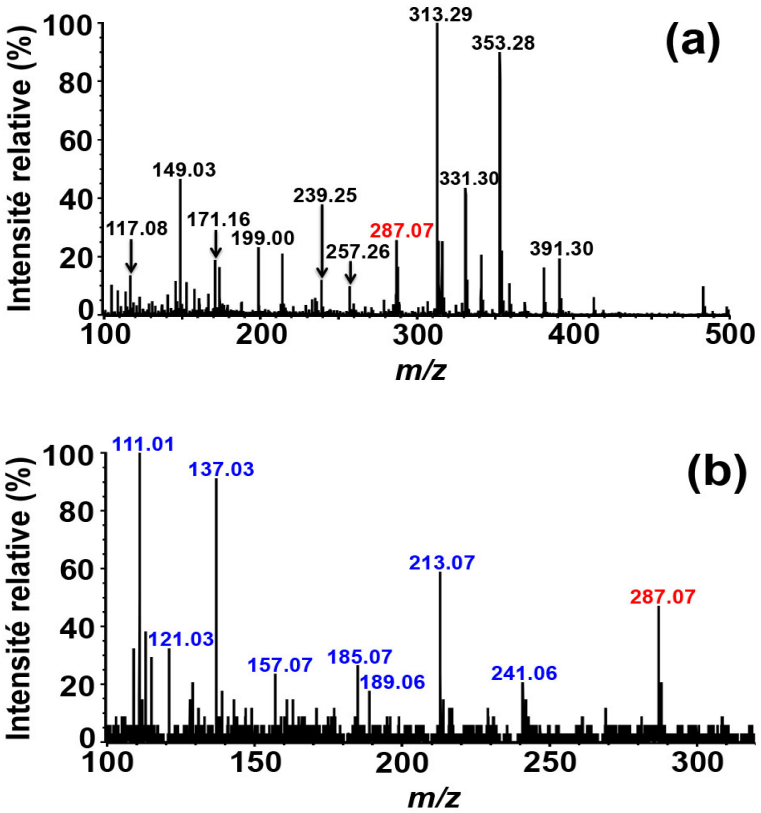


Figure 79. Confirmation par MS et MS/MS de la cyanidine comme sous-produit de dégradation du dérivé hydroxylé (3,3-gem-diol) de 3,4-trans-leuccocyanidine.

(a) Spectre MS du pic 4 collecté lors de l'analyse HPLC des produits de dégradation de la 3,4-trans-leucocyanidine hydroxylée (**figure 75c**); (b) Spectre MS/MS de l'ion de *m/z* 287.

Comme le montre la **figure 80a**, le pic 5 (21 min) est vraisemblablement le même que le pic 5 observé sur la **figure 75c** (21,4 min), et il s'agirait donc de la quercétine sur la base de son temps de rétention (pic 5', 21,2 min, **figure 80b**). L'analyse MS de ce produit est représentée sur la **figure 81a**, où l'on voit un petit pic de *m/z* 303 qui correspondrait à l'ion $[M+H]^+$ de quercétine, et la fragmentation MS/MS de cet ion de *m/z* 303 produit plusieurs ions fragments (**figure 81b**) qui sont les mêmes que ceux d'un standard de quercétine (**figure 40b**). Le pic 5 de la **figure 75c** est donc bien un pic de quercétine.

En conclusion, nous pouvons confirmer que les quatre pics (2, 3, 4 et 5) observés sur la **figure 75c** correspondent à des sous-produits ou produits de dégradation du produit hydroxylé de la 3,4-trans-leucocyanidine, qui sont respectivement la (+)-DHQ, la (-)-épiDHQ, la cyanidine et la quercétine.

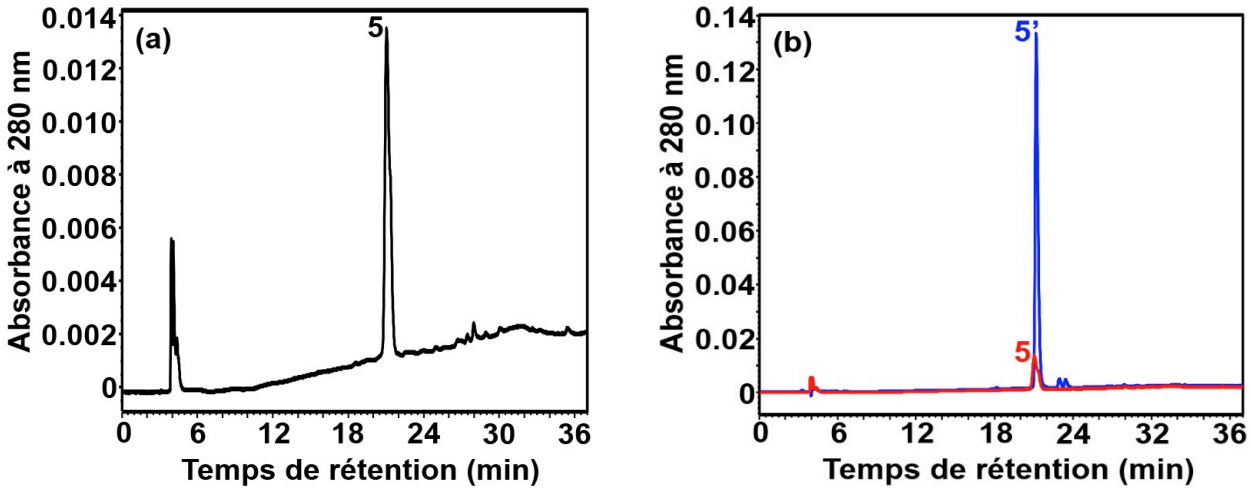


Figure 80. Confirmation chromatographique de l'existence d'un produit de dégradation de même temps de rétention que la quercétine.

Chromatogrammes HPLC sur colonne Atlantis C18. (a) Produit collecté (pic 5, **figure 75c**); (b) Standard de quercétine, en bleu.

Le produit hydroxylé de la 3,4-trans-leucocyanidine (pic 5, **figure 65c**) étant élué beaucoup plus tôt que ces quatre polyphénols (pic 6, 7, 8 et 9), ces derniers ne peuvent avoir été collectés simultanément.

Ces informations nous conduisent à proposer que le produit monohydroxylé de la 3,4-trans-leucocyanidine est un triol dont deux des trois groupements hydroxyles sont portés par les carbones C_3 et/ou C_4, ou bien qu'il s'agit d'un 2,3,4-triol.

On notera cependant qu'un dérivé monohydroxylé de la 3,4-cis-leucocyanidine avait aussi été observé (pic 4, **figure 65c**) avec un temps de rétention clairement différent de celui du produit monohydroxylé de la 3,4-trans-leucocyanidine, ce qui permet d'exclure la possibilité d'un 3,4-triol ayant un diol géminal en C_4, parce que s'il existait, aucune différence ne pourrait être observée entre

les produits monohydroxylés des deux stéréoisomères de leucocyanidine. Ceci est illustré sur la **figure 82**.

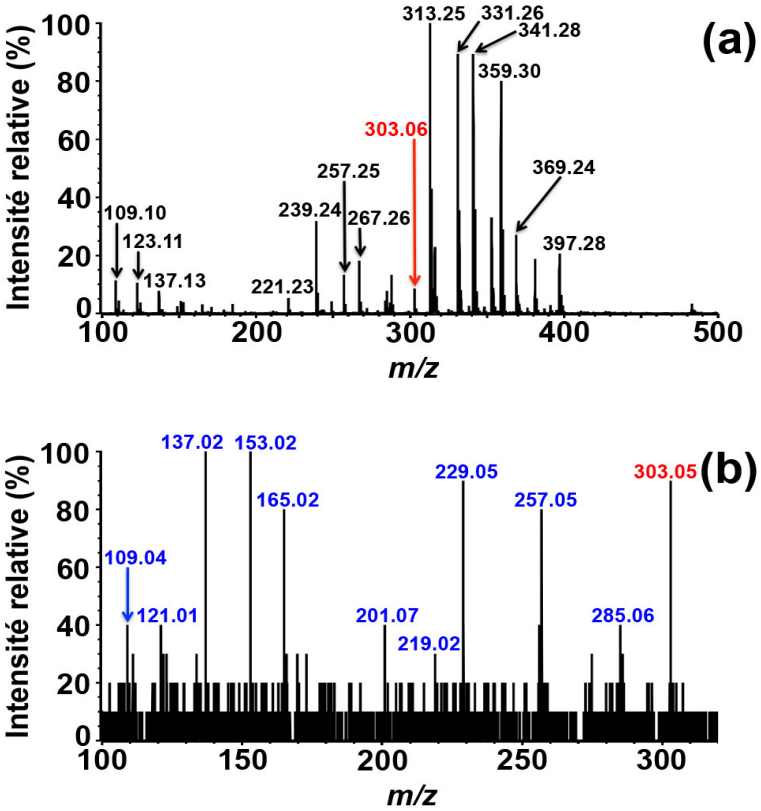


Figure 81. Confirmation par MS et MS/MS de l'existence de quercétine.

(a) Spectre MS du pic 5 collecté lors de l'analyse HPLC des produits de dégradation de la 3,4-trans-leucocyanidine hydroxylée (**figure 75c**); (b) Spectre MS/MS de l'ion de *m/z* 303.

Donc, il ne reste que deux structures possibles pour le produit monohydroxylé de la 3,4-trans-leucocyanidine, le 2,3,4-triol et le 3,4-triol ayant un diol géminal en C_3. Comme le montre la **figure 83**, le 2,3,4-triol **1** peut se déshydrater en C_2-C_3 par perte du groupement hydroxyle en C_2, formant un intermédiaire flav-2-en-3,4-diol **1.1**. Une deuxième élimination d'eau pourrait avoir lieu, formant un deuxième intermédiaire de type méthylène quinone **1.2** dont la protonation pourrait conduire à la cyanidine **1.3**, qui serait donc un sous-produit de ce 2,3,4-triol. Par ailleurs, deux autres sous-produits (**1.4 et 1.5**) peuvent aussi être envisagés. Cependant, il est évident que la formation de DHQ et de quercétine ne peut se faire à partir de ce 2,3,4-triol, ce qui est difficilement compatible avec nos résultats. Donc, le plus probable est que le produit monohydroxylé de la 3,4-trans-leucocyanidine est un 3,4-triol ayant un diol géminal en C_3.

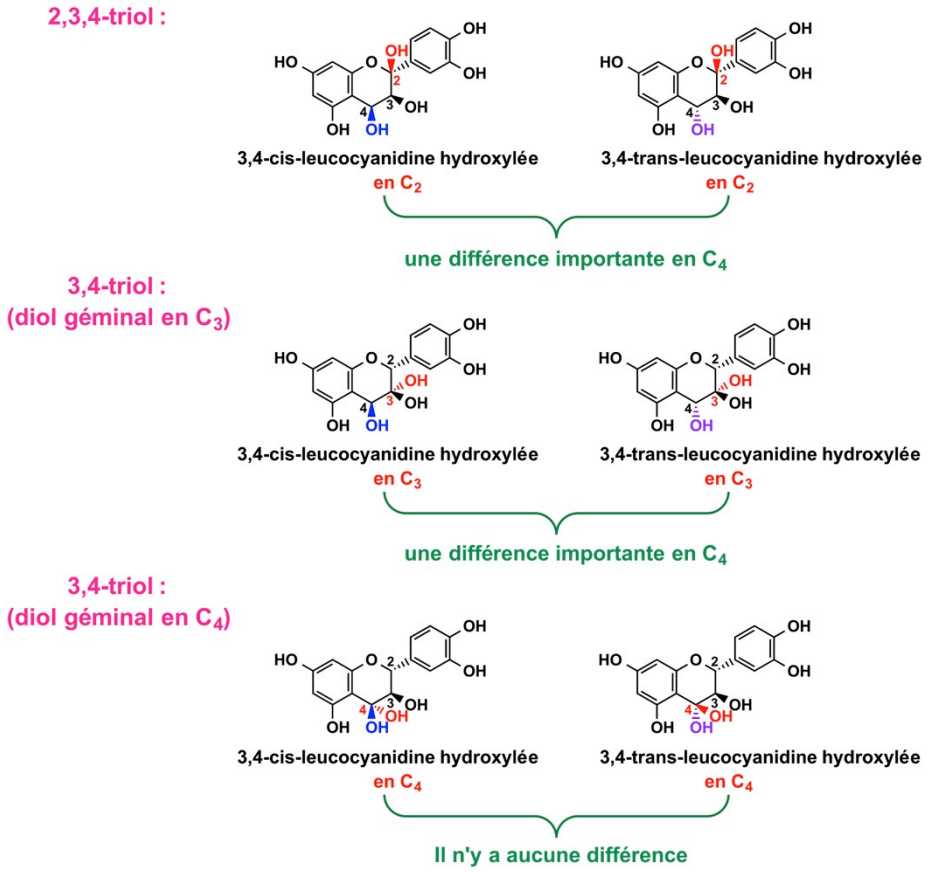


Figure 82. Structures proposées du produit monohydroxylé des deux stéréoisomères de leucocyanidine.

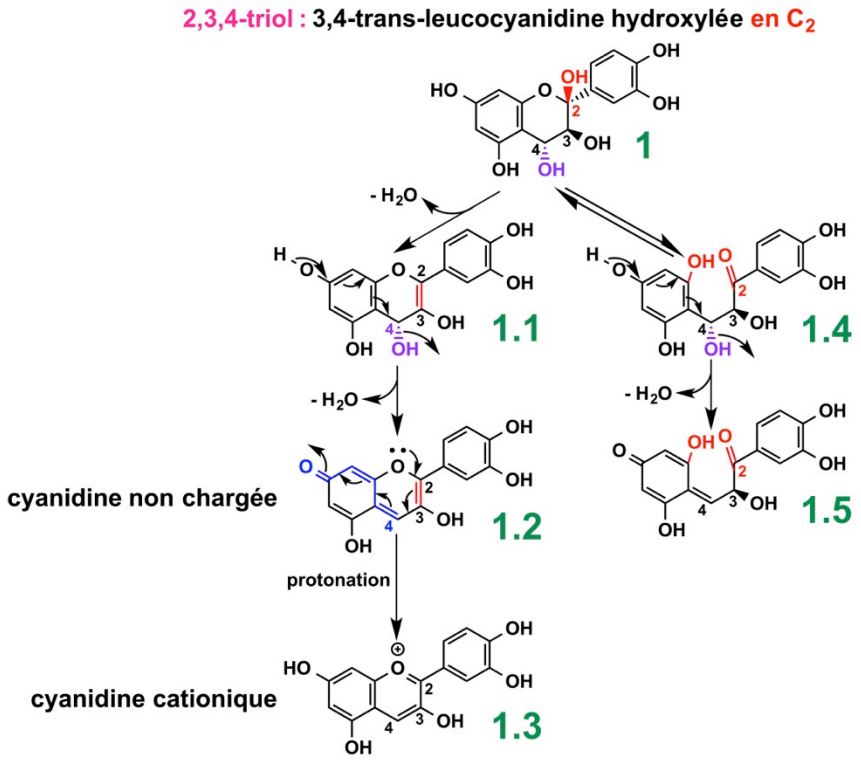


Figure 83. Voies de dégradation non-enzymatique proposées du 2,3,4-triol envisagé.

En principe, le diol géminal est instable, car les deux groupements hydroxyle portés par le même atome de carbone devraient se déshydrater facilement en groupement carbonyle. Donc, comme le montre la **figure 84**, le 3,4-triol ayant un diol géminal en C_3 **1** pourrait se déshydrater facilement pour former un intermédiaire flav-3-on-4-ol **1.1'** qui est une forme tautomère des flav-2-en-3,4-diol **1.1** et flav-3-en-3,4-diol **1.4**.

Le 3,4-diol ayant un diol géminal en C_3 peut aussi se décomposer en flav-2-en-3,4-diol **1.1** par déshydratation en C_2-C_3. Dans ce cas, une deuxième déshydratation pourrait ensuite avoir lieu sur cet intermédiaire, formant une structure de type méthylène quinone qui est la cyanidine non chargée **1.2** dont la protonation peut conduire à la forme cationique (flavylium) de la cyanidine **1.3**, qui bien qu'observée par MS en ionisation positive, n'est certainement pas la forme majoritaire de la cyanidine à pH 6,3.

Une autre déshydratation en C_3-C_4 peut être envisagée sur ce 3,4-triol, formant l'intermédiaire flav-3-en-3,4-diol **1.4** qui est une forme tautomère de la (-)-épiDHQ **1.5** et de la (+)-DHQ **1.6** qui devraient être produite en rapport 50/50 puisque les deux configurations épimériques en C_3 sont équiprobables.

Enfin, la formation de traces de quercétine **1.7** par oxydation spontanée de l'intermédiaire flav-3-en-3,4-diol **1.4** est elle aussi possible.

Donc, tous les sous-produits possibles du 3,4-triol/3,3-gem-diol correspondent aux produits observés qui sont la (-)-épiDHQ, la (+)-DHQ, la cyanidine et la quercétine. Par conséquent, il est fort probable que le produit monohydroxylé de la 3,4-trans-leucocyanidine soit un 3,4-triol ayant un diol géminal en C_3 (flavan-3,3,4-triol).

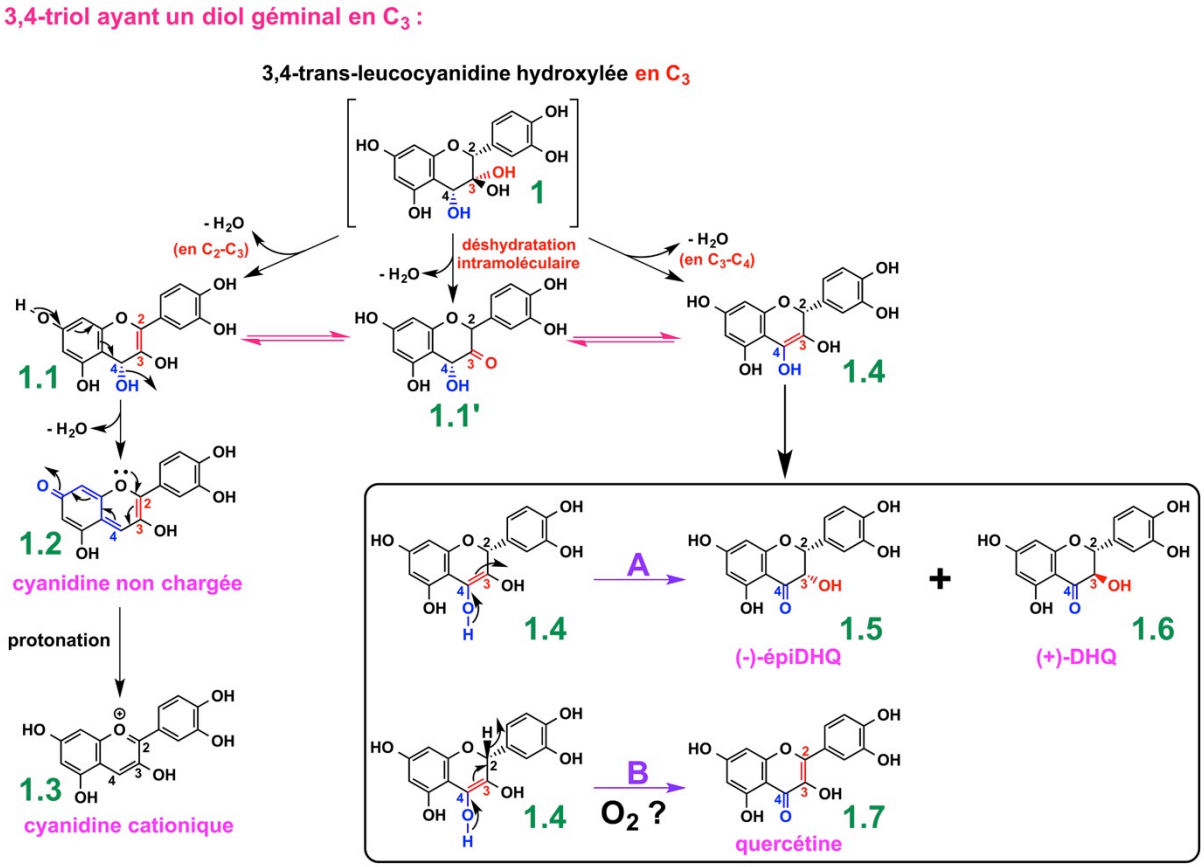


Figure 84. Voies de dégradation non-enzymatique proposées du 3,4-triol/3,3-gem-diol.

II.1.5. Conclusions sur les différentes structures polyphénoliques reconnues comme substrats de la VvANS

Seuls sept des douze polyphénols testés sont des substrats de la *Vv*ANS, dont trois polyphénols de la famille des dihydroflavonols, deux polyphénols de la famille des flavan-3-ols et deux polyphénols de la famille des flavan-3,4-diols. Le **tableau 5** résume les informations essentielles concernant la transformation de ces sept substrats par la *Vv*ANS.

Les cinq autres polyphénols incluant la (+)-afzéléchine, la (-)-catéchine, la (-)-épicatéchine, la (+)-épicatéchine et la (±)-naringénine, ne sont pas acceptés par la *Vv*ANS comme substrats.

Comme nous l'avons mentionné précédemment, l'ANS d'*Arabidopsis thaliana* (*At*ANS) possède un large panel de substrats, et il en va de même pour la *Vv*ANS, même si certaines différences ont été observées.

Tableau 5. Produits enzymatiques obtenus lors de la réaction catalysée par la *Vv*ANS.

Substrat polyphénolique				Produit observé		
Nom		*m/z*	TR*	Nom	*m/z*	TR*
Dihydroflavonols (2R,3R)	(+)-DHK	289,05	16,3 min	kaempférol	287,05	22,3 min
	(+)-DHQ	305,05	13,9 min	quercétine	303,05	20,1 min
	(+)-DHM	321,05	11,2 min	myricétine	319,05	18,4 min
Flavan-3-ols (2R,3S)	(+)-catéchine	291,06	9,0 min	adduit covalent ascorbate-cyanidine	463,07	5,5 min
				dimère de (+)-catéchine oxydée	575,11	10,5 min
				cyanidine	287,05	18,6 min
	(+)-gallocatéchine	307,07	6,2 min	delphinidine	303,04	17,6 min
Flavan-3,4-diols (leucocyanidine) (2R,3S,4S/R)	(+)-2,3-trans-3,4-cis-leucocyanidine	307,09	7,0 min	flavan-3,3,4-triol (3,4-cis)	323,09	4,5 min
				quercétine	303,05	20,1min
	(+)-2,3-trans-3,4-trans-leucocyanidine	307,09	10,6 min	flavan-3,3,4-triol (3,4-trans)	323,09	9,3 min
				(+)-DHQ	305,05	13,9 min
				(-)-épiDHQ	305,05	14,4 min
				cyanidine	287,05	18,6 min
				quercétine	303,05	20,1 min

* TR = Temps de Rétention (HPLC sur colonne µBondapak C18 pour les deux stéréoisomères de leucocyanidine, et sur colonne Atlantis C18 pour les autres).

En termes de relations structure/fonction, nous pouvons conclure de nos résultats que seuls les 2R,3S-flavan-3-ols ayant deux hydroxyles phénoliques (catéchol) ou trois (gallol) sur le cycle B sont acceptés par la *Vv*ANS. C'est par exemple le cas de la (+)-catéchine (catéchol) et de la (+)-gallocatéchine (gallol), comme le montre la **figure 85a**.

Cette conclusion s'applique également aux flavan-3,4-diols.

La nécessité d'un catéchol ou d'un gallol sur le cycle B a été confirmée avec la (+)-afzéléchine qui n'est pas substrat de la *Vv*ANS, alors qu'elle possède la bonne configuration (2R,3S). La seule chose qui la distingue de la (+)-catéchine ou de la (+)-gallocatéchine (**figure 85b**) est bien l'absence de catéchol ou de gallol.

La nécessité d'une configuration (2R,3S) est quant à elle démontrée avec la (-)-catéchine, la (+)-épicatéchine et la (-)-épicatéchine. Bien qu'ayant un catéchol sur le cycle B, ces trois stéréoisomères de la (+)-catéchine ne sont pas substrats de la *Vv*ANS, or ce qui les distingue de la (+)-catéchine est qu'ils n'ont pas de configuration (2R,3S), comme le montre la **figure 85c**.

Cependant, le catéchol ou gallol n'est pas indispensable pour les dihydroflavonols, puisque la (+)-DHK qui n'a qu'un seul groupement hydroxyle sur le cycle B est un bon substrat de la *Vv*ANS (**figure 85d**).

Comme le montre la **figure 85e**, les deux stéréoisomères de (+)-DHQ de configuration (2S,3R) et (2R,3S) ne sont pas substrats de la *Vv*ANS. Ceci montre que seuls les 2R,3R-dihydroflavonols sont acceptés comme substrats de la *Vv*ANS. Enfin, la 2S-naringénine (flavanone) n'est pas acceptée comme substrat par la *Vv*ANS, *a priori* en raison de l'absence d'un groupement hydroxyle en C_3 (**figure 85f**).

Une dernière tendance peut enfin être soulignée si l'on compare les substrats de la *Vv*ANS au sein d'une même sous-famille, qui est que l'efficacité de l'enzyme semble décroître avec le nombre d'hydroxyles phénoliques portés par le cycle B.

Par exemple, pour les deux substrats de la famille des flavan-3-ols (**figure 85a**), l'activité enzymatique observée avec la (+)-catéchine (deux hydroxyles phénoliques sur le cycle B) est plus forte que celle observée avec la (+)-gallocatéchine (trois hydroxyles phénoliques sur le cycle B). De même, pour les trois substrats de la famille des dihydroflavonols, comme le montre la **figure 86**, l'activité enzymatique observée est plus forte avec la (+)-DHK (un seul hydroxyle phénolique sur le cycle B) qu'avec la (+)-DHQ (deux groupements hydroxyles sur le cycle B), ou *a fortiori* avec la (+)-DHM (trois hydroxyles phénoliques sur le cycle B).

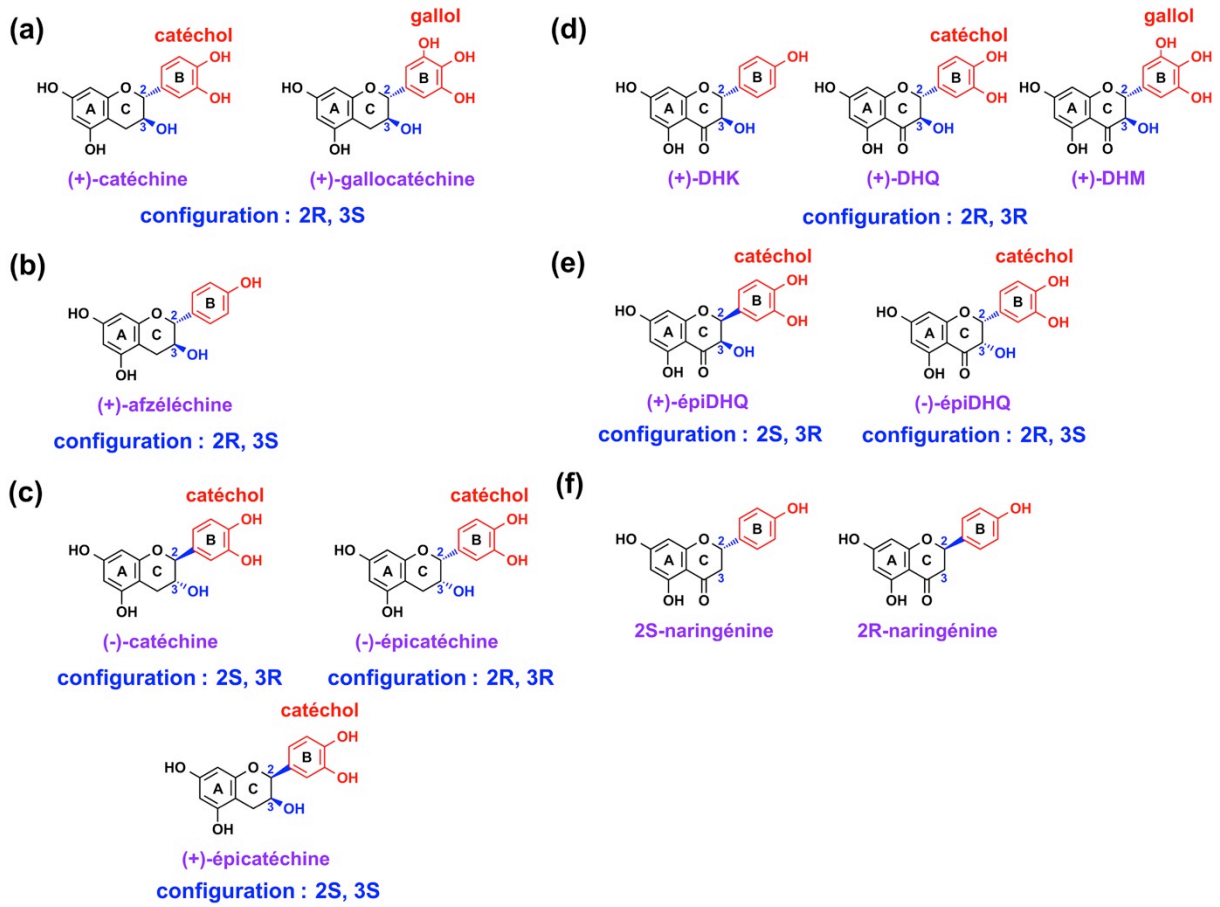


Figure 85. Structures des flavan-3-ols, des dihydroflavonols et des flavanones testés.

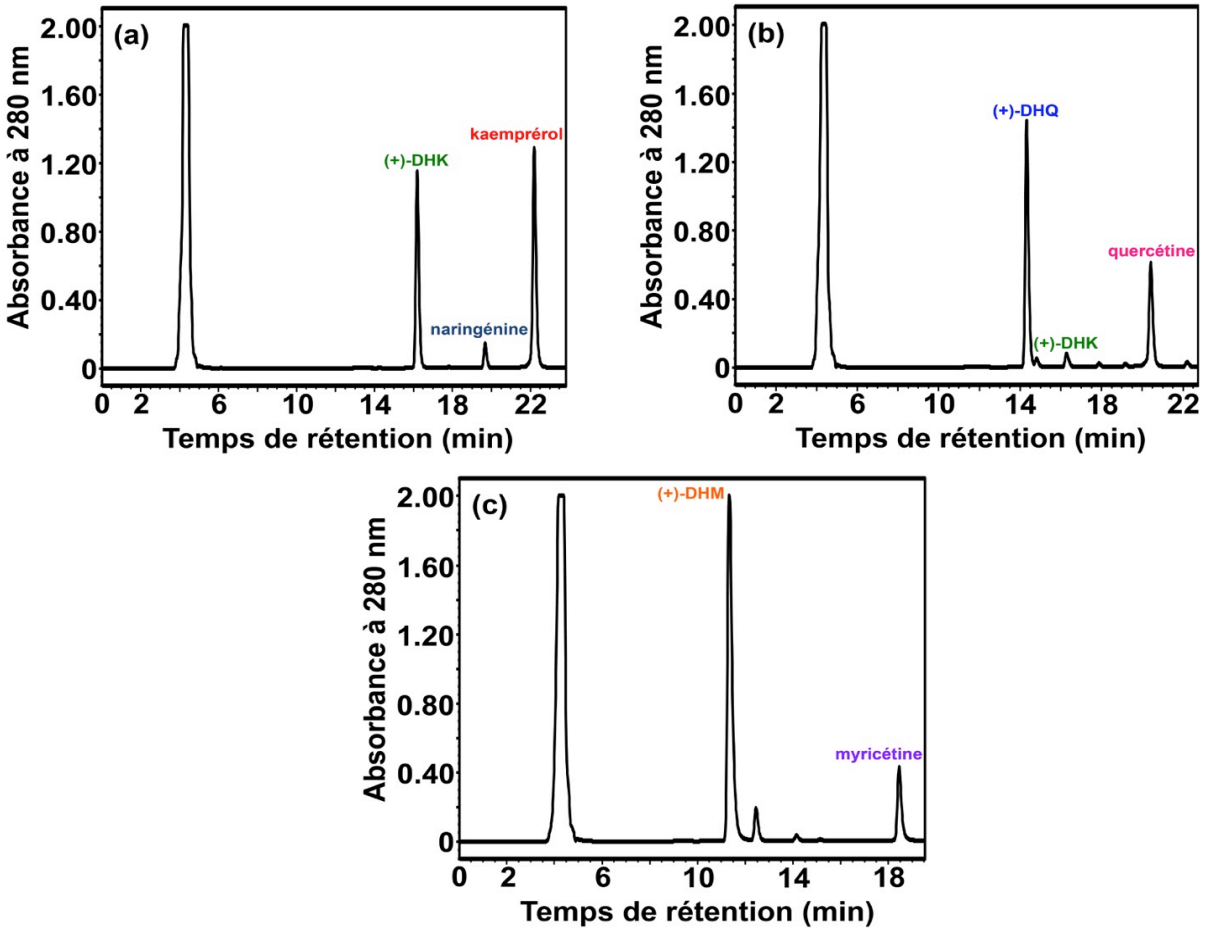


Figure 86. Analyse chromatographique de la transformation des dihydroflavonols par la *Vv*ANS.

Chromatogrammes HPLC sur colonne Atlantis C18 (500 µl d'échantillon ont été injectés). Extrait du milieu réactionnel contenant 2×10^{-6} M de *Vv*ANS après 30 min d'incubation en présence de 100 µM de (a) (+)-DHK; (b) (+)-DHQ; (c) (+)-DHM.

III. Production du complexe *Vv*ANS-Fe(II)

Nous avons indiqué plus haut (**figure 26**) que la consommation d'oxygène dans le milieu réactionnel contenant un sel de Fe(II) était incontournable et *a priori* associée à la production d'espèces oxydantes comme le radical hydroxyle issu de la réaction de Fenton, ou des complexes du type ascorbate/Fer/O_2 qui sont responsables des réactions d'hydroxylation dites d'Udenfriend.

Ces espèces très oxydantes peuvent induire des réactions d'oxydation artefactuelle de certains polyphénols et altérer l'enzyme elle-même, mais la nécessité de contrôler la concentration stationnaire d'oxygène dissout est tout aussi importante, puisque l'activité de l'ANS qui est une dioxygénase, dépend inévitablement de la concentration de ce cosubstrat O_2.

En l'absence de concentrations véritablement stationnaires d'enzyme active et d'oxygène dissout, il est en particulier impossible de garantir la reproductibilité quantitative des résultats, ou de réaliser des études cinétiques et mécanistiques exigeant une stœchiométrie précise.

Nous avons déjà fortement réduit le problème des réactions artefactuelles en diminuant la concentration de sel de Fe(II) dans le milieu jusqu'à 10 µM, mais la seule façon de nous affranchir de tous les problèmes évoqués consisterait à ne plus avoir de Fe(II) libre dans le milieu.

Or il s'agit d'un cofacteur indispensable de l'ANS, et plus précisément d'un élément essentiel du site actif, ce qui explique pourquoi aucune activité n'est observée en son absence. Nous avons donc essayé de produire/préformer un complexe ANS-Fe(II) en espérant qu'il serait suffisamment stable pour nous éviter d'avoir à rajouter un sel de Fe(II) dans le milieu réactionnel.

Pour ce faire, nous avons mis au point le protocole décrit dans la section Matériels et Méthodes (IV.1.2), et qui est schématisé sur la **figure 87**.

Nous avons testé l'activité du complexe *Vv*ANS-Fe(II) en utilisant la (+)-DHQ comme substrat polyphénolique, puisqu'elle a l'avantage d'être transformée par la *Vv*ANS en un seul produit, la quercétine.

Tout d'abord, la réaction témoin de 10^{-6} M de *Vv*ANS (holoenzyme) avec 100 µM de concentration initiale de (+)-DHQ dans le milieu réactionnel sans sel de Fe(II) a été réalisée. Comme le montre la **figure 88a**, seules des traces de quercétine sont observées, ce qui indique que l'holoenzyme (*Vv*ANS) ne fonctionne pas en l'absence de Fe(II) dans le milieu, la très faible activité observée étant vraisemblablement due à une très faible concentration de complexe enzyme-Fe(II) formé en présence des traces de Fe(II) du milieu.

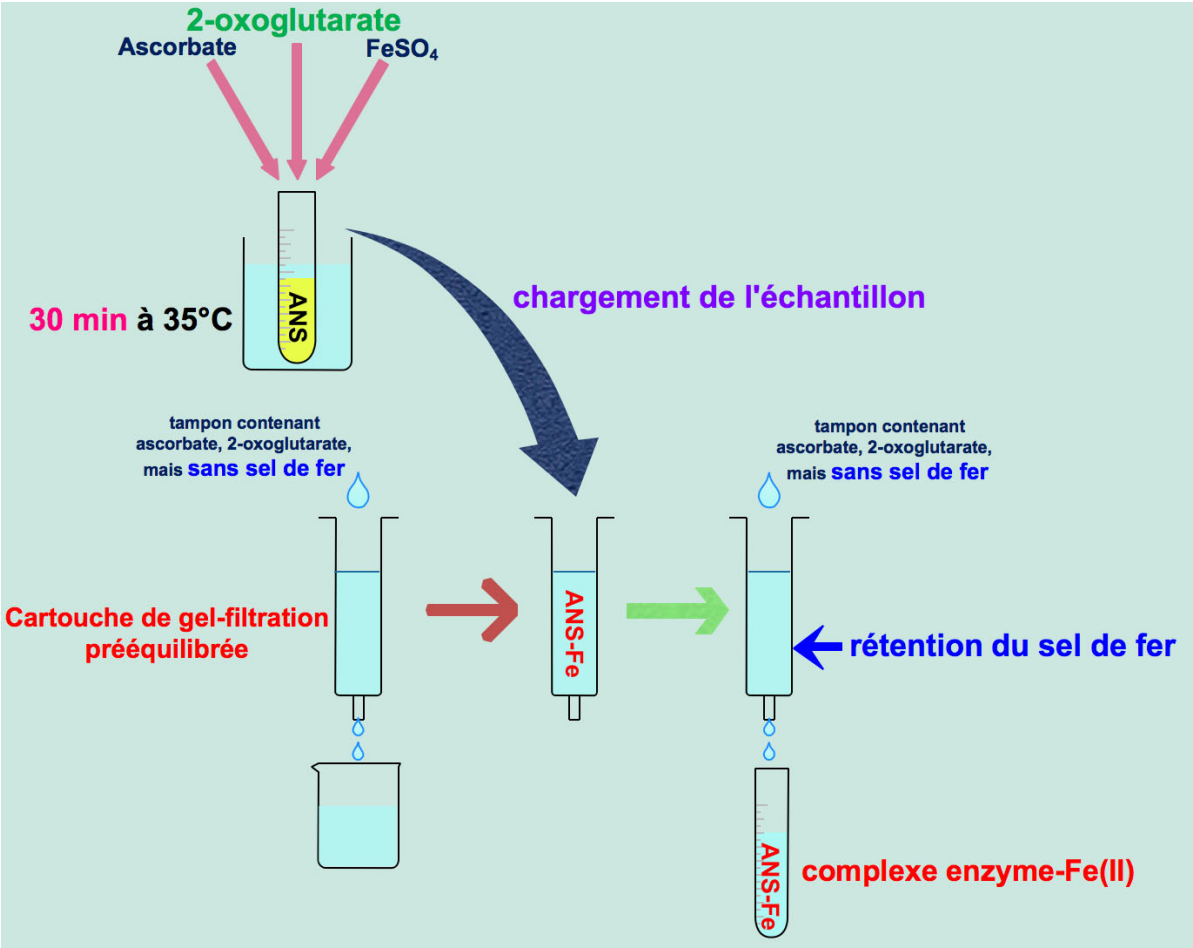


Figure 87. Protocole de production du complexe *Vv*ANS-Fe(II).

L'enzyme est incubée en présence de 2-oxoglutarate (1 mM) qui est un ligand du fer au site actif de l'enzyme au repos, d'ascorbate (2 mM) qui est un cofacteur de l'enzyme et qui permet de maintenir le sel de fer (30 µM) sous la forme Fe(II) malgré la présence d'oxygène. Elle est ensuite chargée sur une cartouche de gel-filtration, puis éluée par un tampon contenant le 2-oxoglutarate et l'ascorbate, mais pas de sel de fer. L'enzyme éluée est collectée avant la sortie des solutés de petit poids moléculaire, ce qui permet de la débarrasser du sel de fer libre qui n'est pas encore élué de la cartouche.

Ceci suggère au moins que la préformation du complexe *Vv*ANS-Fe(II) est possible. L'activité du complexe *Vv*ANS-Fe(II) supposé produit a été ensuite testée. Après 5 min de pré-incubation de l'échantillon final de complexe *Vv*ANS-Fe(II) à 35°C, la réaction est déclenchée par addition de 100 µM de (+)-DHQ. Après 15 min d'incubation à 35°C, 100 µl d'échantillon ont été prélevés, puis analysés par HPLC sur colonne Atlantis C18 (**figure 88b**).

La concentration de produit enzymatique (quercétine) observée dans ces conditions est très proche de celle qui est observée dans un mélange réactionnel contenant 10 µM de sel de Fe(II), toutes conditions égales par ailleurs (**figure 88c**).

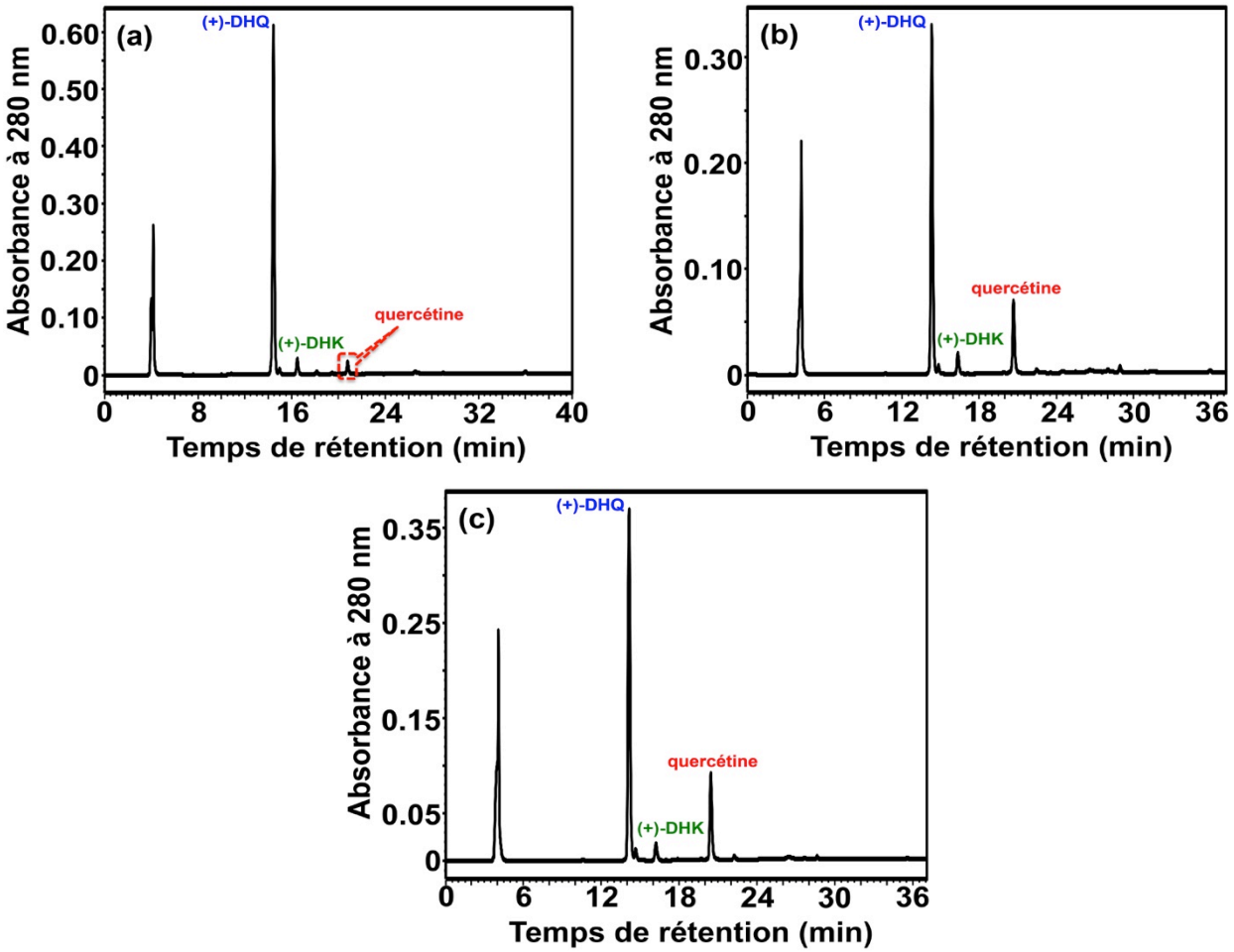


Figure 88. Analyse chromatographique du produit enzymatique de la (+)-DHQ obtenu en présence du complexe *Vv*ANS-Fe(II) et en l'absence de sel de fer.

Chromatogrammes HPLC sur colonne Atlantis C18. (a) Traces de quercétine observées après incubation de l'holoenzyme (non chargée en fer) en présence de (+)-DHQ mais en l'absence de sel de Fe(II); (b) Quercétine produite par le complexe *Vv*ANS-Fe(II) dans les mêmes conditions qu'en (a); (c) Quercétine produite après incubation de l'holoenzyme (non chargée en fer) en présence de (+)-DHQ et en présence de sel de Fe(II) 10 µM.

L'échantillon enzymatique produit, complexe *Vv*ANS-Fe(II) présumé, fonctionne donc aussi bien en l'absence de Fe(II) que la *Vv*ANS pré-incubée avec le sel de Fe(II), alors que l'activité de l'holoenzyme non incubée en présence de sel de Fe(II) est très faible. Ces observations indiquent que nous avons bien produit un complexe *Vv*ANS-Fe(II) qui est actif, même si nous n'avons pas les moyens d'affirmer que sa production est quantitative. La répétition de ces expériences nous a cependant permis de montrer que cette production du complexe *Vv*ANS-Fe(II) était reproductible (données non montrées).

La question du rendement de production du complexe, et celle de la concentration de sel de fer résiduel dans le milieu contenant le complexe enzyme-Fe(II) sont deux questions auxquelles nous n'avons pas pu répondre précisément à ce stade, mais nous verrons plus tard que l'activité du

complexe enzyme-Fe(II) reste proportionnelle à la concentration d'enzyme dans le domaine sub-micromolaire, ce qui n'est probablement pas compatible avec un rôle significatif du Fe(II) libre.

IV. Effet du glutathion (GSH) sur la réaction catalysée par la *Vv*ANS

Le glutathion (GSH) est un tripeptide de γ-glutamyl-cystéinyl-glycine (**figure 89**). De même que l'ascorbate qui est un cofacteur important de l'ANS, le GSH est un puissant nucléophile, agent réducteur et piégeur de radicaux libres, qui est abondant dans les baies de raisins. C'est aussi un coenzyme présent en forte concentration dans la cellule (1-10 mM), où il joue un rôle majeur, en particulier en tant que partenaire des glutathion peroxydases et des glutathion transférases, mais aussi de la glutarédoxine qui l'utilise pour réduire le déshydroascorbate en ascorbate. Il nous a donc paru important d'étudier son effet potentiel sur les réactions catalysées par la *Vv*ANS.

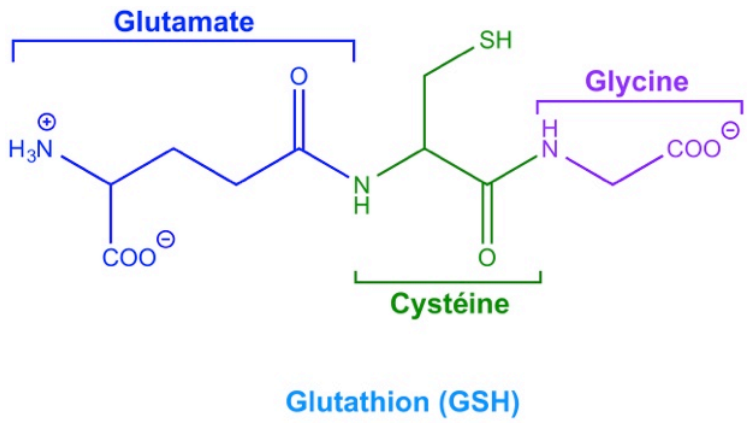


Figure 89. Structure du GSH ou γ-glutamyl-cystéinyl-glycine.

La concentration intracellulaire de ce coenzyme est typiquement comprise entre 0,5 et 10 mM. La liaison pseudo-peptidique γ-Glu-Cys réalisée avec le carboxylate de la chaîne latérale du résidu glutamyl empêche son hydrolyse par les peptidases courantes. Le centre réactionnel est le groupement thiol de la chaine latérale du résidu cystéyl. Le pKa du groupement thiol/thiolate est très proche de 9, et le potentiel de réduction apparent E'^0 du couple GSSG/GSH est de l'ordre de -0,23 V/ENH.

IV.1. Effet du GSH sur la transformation des substrats de la famille des dihydroflavonols

L'effet de GSH sur la réaction catalysée par la *Vv*ANS a été d'abord étudié en utilisant le (+)-DHK comme substrat, et la réaction enzymatique de 10^{-6} M de *Vv*ANS (holoenzyme) avec 100 µM de (+)-DHK a été réalisée en présence de 1 mM de GSH et 10 µM de Fe(II). Comme le montre la **figure 90a**, le kaempférol est encore observé comme le seul produit de la transformation enzymatique du (+)-DHK par la *Vv*ANS en présence de GSH, et comparé à la réaction enzymatique

observée en présence de 10 µM de Fe(II) mais en l'absence de GSH, aucune différence significative n'est observée (**figure 90c**). Les mêmes conclusions peuvent être formulées après utilisation de la (+)-DHQ comme substrat, si bien que nous pouvons conclure que le GSH n'a aucun d'effet sur la transformation des dihydroflavonols par la *Vv*ANS.

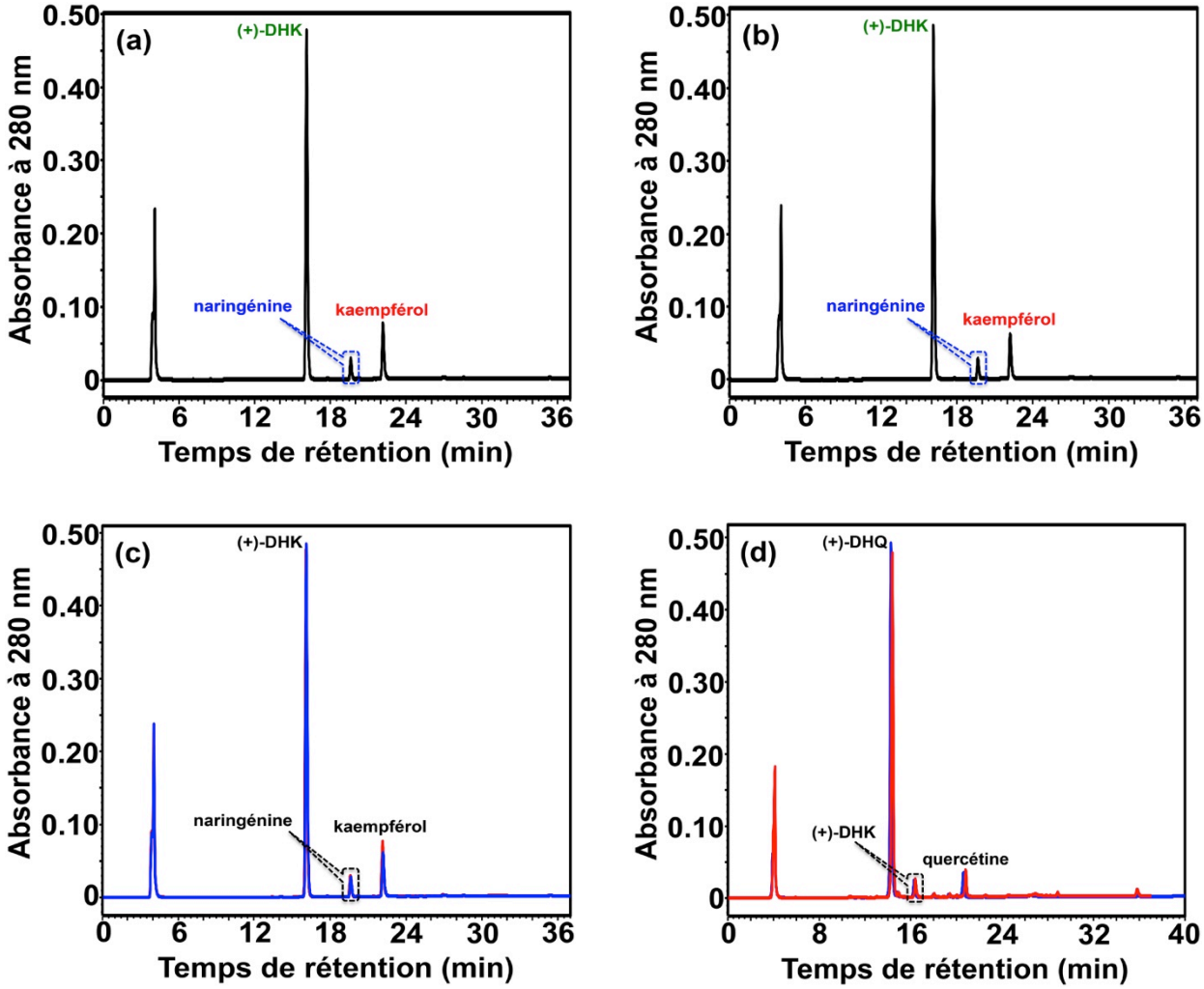


Figure 90. Analyse chromatographique de la transformation du (+)-DHK et de la (+)-DHQ par la *Vv*ANS en présence de GSH.

Chromatogrammes HPLC sur colonne Atlantis C18. (a) Transformation du DHK en l'absence de GSH; (b) Transformation du DHK en présence de GSH 1 mM; (c) Superposition des chromatogrammes observés en (a) et (b); (d) En rouge: Chromatogramme issu d'un milieu réactionnel contenant 10^{-6} M de *Vv*ANS (holoenzyme), 100 µM de (+)-DHQ initiale, 10 µM de Fe(II) et 1 mM de GSH; en bleu: chromatogramme issu d'un milieu réactionnel ne contenant pas de GSH, mais sinon identique au précédent.

IV.2. Effet du GSH sur la transformation des substrats de la famille des flavan-3-ols

IV.2.1. Effets du GSH sur la transformation enzymatique de la (+)-catéchine

Pour les deux substrats de la famille des flavan-3-ols, la (+)-catéchine a été d'abord utilisée pour vérifier l'effet de GSH, et la transformation de 100 µM de (+)-catéchine par 10^{-6} M de *Vv*ANS (holoenzyme) dans le mélange de réaction en présence de 10 µM de Fe(II) mais sans GSH a été utilisée comme témoin. Comme le montre la **figure 91a**, la (+)-catéchine (pic 2, 9,3 min) est transformée en trois produits majeurs par la *Vv*ANS, un adduit covalent ascorbate-cyanidine (pic 1, 5,9 min), un dimère de (+)-catéchine oxydée (pic 3, 10,9 min) et la cyanidine (pic 4, 19 min).

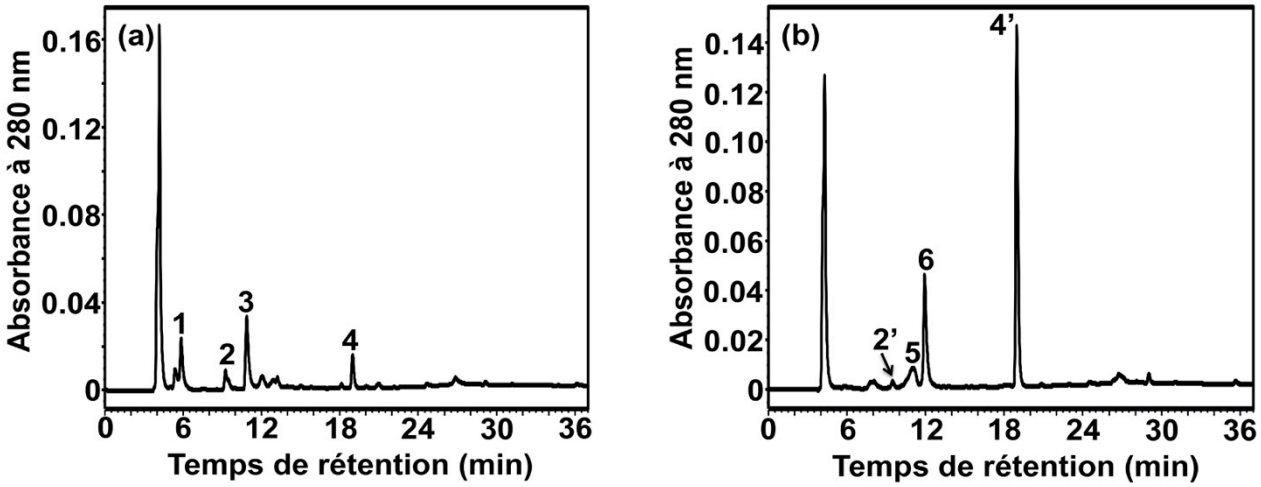


Figure 91. Analyse chromatographique de la transformation de la (+)-catéchine par la *Vv*ANS en présence de GSH.

Chromatogrammes HPLC sur colonne Atlantis C18. (a) Milieu réactionnel contenant la *Vv*ANS (holoenzyme) en présence de sel de Fe(II) 10 µM, mais sans GSH; (b) Même milieu en présence de GSH 1 mM.

En revanche, la transformation enzymatique de la (+)-catéchine par la *Vv*ANS est considérablement modifiée par la présence de GSH dans le milieu réactionnel. Comme le montre la **figure 91b**, seuls deux pics majeurs (pic 6 et pic 4') sont observés. Le pic 6 (11,2 min) correspond à un produit incolore (**figure 92a**) et le pic 4' (19,2 min) correspond à la cyanidine (pic 4, 19 min, **figure 91a**) qui est colorée (**figure 92b**). De plus, l'adduit covalent ascorbate-cyanidine (pic 1, **figure 91a**) et le dimère de (+)-catéchine oxydée (pic 3, **figure 91a**) obtenus lors de la réaction de la *Vv*ANS avec la (+)-catéchine en l'absence de GSH ne sont plus observés. En comparant les deux chromatogrammes de la **figure 91**, nous pouvons voir qu'en présence de GSH, la réaction enzymatique est plus propre. Seuls deux produits majeurs sont observés, et le rendement de production de la cyanidine augmente

fortement. Le glutathion GSH a donc un effet majeur sur la transformation de la (+)-catéchine par la *Vv*ANS. Cet effet est d'ailleurs visible à l'œil nu du fait du changement de couleur du milieu réactionnel, comme le montre la **figure 93**.

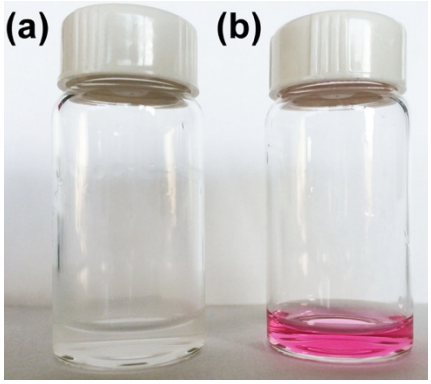


Figure 92. Couleurs des produits de la transformation enzymatique de la (+)-catéchine en présence de GSH.

(a) Couleur du produit collecté à 11,2 min (pic 6, **figure 91b**); (b) Couleur de la cyanidine (pic 4', **figure 91b**)

Figure 93. Couleurs du milieu réactionnel observées à l'issue de la transformation enzymatique de la (+)-catéchine avec et sans GSH.

Nous avons ensuite analysé le produit élué à 11,2 min par MS et MS/MS. L'analyse MS de l'échantillon collecté montre un grand pic de *m/z* 594 (**figure 94a**), qui produit plusieurs ions fragments en MS/MS (**figure 94b**), en particulier un ion de *m/z* 308 qui pourrait correspondre à l'ion $[M+H]^+$ de GSH. Donc, l'analyse MS/MS de cet ion de *m/z* 308 a été ensuite réalisée, et comme le montre la **figure 94c**, elle produit quatre ions fragments qui sont tous observés sur la **figure 94b**. Nous en concluons que la fragmentation de l'ion $[M+H]^+$ de *m/z* 594 produit seulement deux ions fragments majeurs de *m/z* 308 et 287, les autre ions fragments provenant de la fragmentation de l'ion de *m/z* 308. De même, les deux ions de *m/z* 308 et 287 observés sur la **figure 94a** proviennent de la fragmentation de l'ion de *m/z* 594.

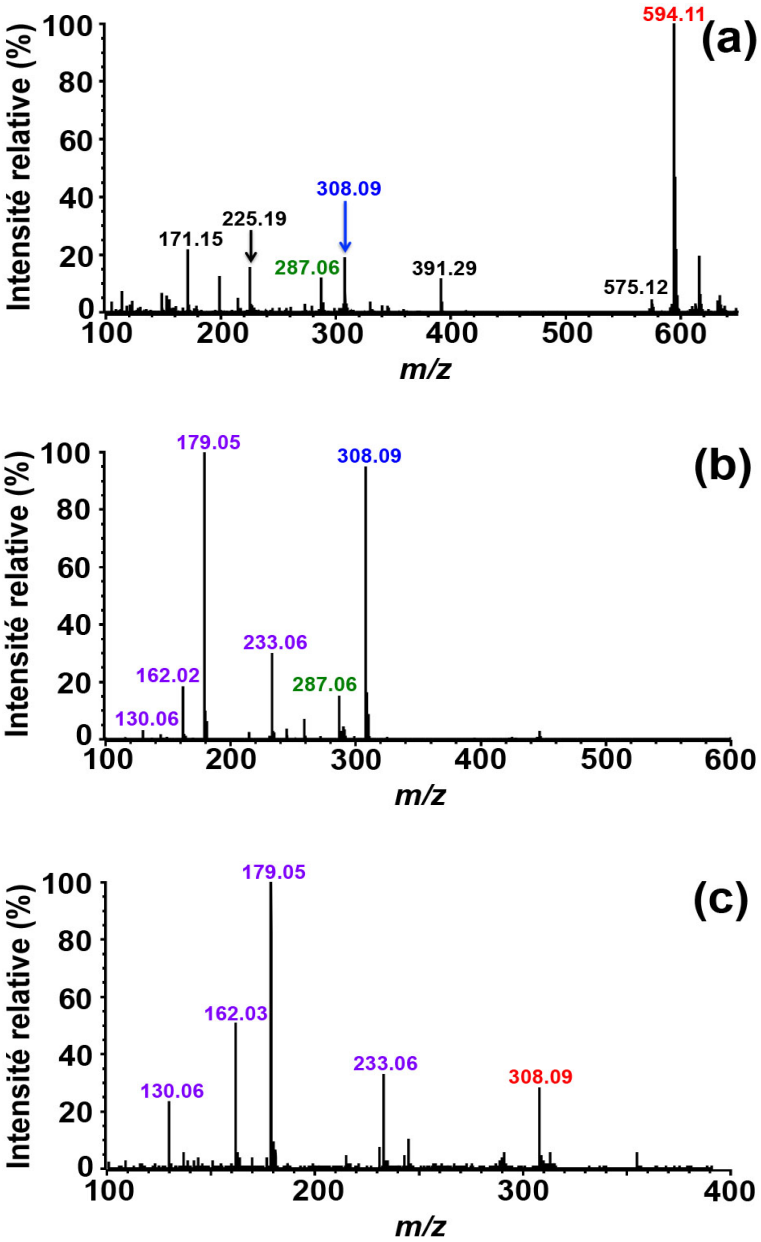


Figure 94. Spectres MS et MS/MS du nouveau produit enzymatique de la catéchine qui est observé dans un milieu réactionnel contenant du glutathion GSH.

(a) Spectre MS du produit élué à 11,2 min (pic 6, **figure 91b**) lors de l'analyse HPLC; (b) Spectre MS/MS de l'ion de *m/z* 594; (c) Spectre MS/MS de l'ion de *m/z* 308.

Les analyses MS et MS/MS du standard commercial de GSH ont aussi été réalisées. Comme le montre la **figure 95a**, un grand pic de *m/z* 308 est observé, qui correspond à l'ion $[M+H]^+$ de GSH, et la fragmentation de cet ion produit six ions fragments majeurs, dont cinq (*m/z* 130, 144, 162, 179 et 233) sont les ions fragments majeurs observés sur la **figure 94c**. Cet ion de *m/z* 308 est donc bien l'ion $[M+H]^+$ de GSH.

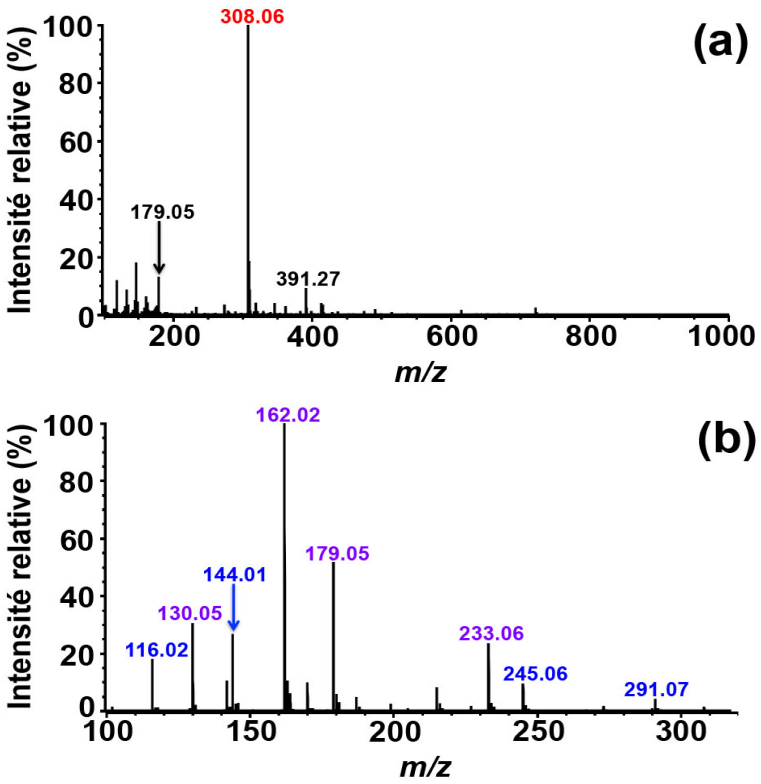


Figure 95. Spectre MS et MS/MS du standard commercial de glutathion GSH.
(a) Spectre MS du standard commercial; (b) Spectre MS/MS de l'ion $[M+H]^+$ de *m/z* 308.

On notera que GSH ne peut pas être collecté en même temps que le produit élué à 11,2 min, car il est très polaire et par conséquent élué beaucoup plus tôt. Nous pouvons donc finalement conclure que le produit élué à 11,2 min (pic 6, **figure 91b**) est un adduit covalent du GSH (*m/z* 307) et de la cyanidine (*m/z* 287).

IV.2.2. Effets du GSH sur la transformation enzymatique de la (+)-gallocatéchine

Nous avons suivi le même protocole que pour la (+)-catéchine, c'est-à-dire que nous avons testé un milieu réactionnel contenant 10^{-6} M de *Vv*ANS et 100 µM de concentration initiale de (+)-gallocatéchine en présence de 10 µM de Fe(II) et de 1 mM de GSH (**figure 96a**), et comparé les résultats obtenus avec ceux d'un milieu ne contenant pas de GSH, toutes conditions égales par ailleurs.

En présence de GSH, un nouveau pic (pic 2, 9 min) est observé, et la concentration de delphinidine (pic 3, 17,5 min) a augmenté fortement. De plus, ce nouveau produit enzymatique est un adduit covalent du GSH avec la delphinidine (M+1, *m/z* 610), d'après l'analyse MS (**figure 97a**) et l'analyse MS/MS de l'ion $[M+H]^+$ de *m/z* 610. Le GSH a donc un effet majeur et similaire sur la transformation enzymatique de la (+)-catéchine et de la (+)-gallocatéchine.

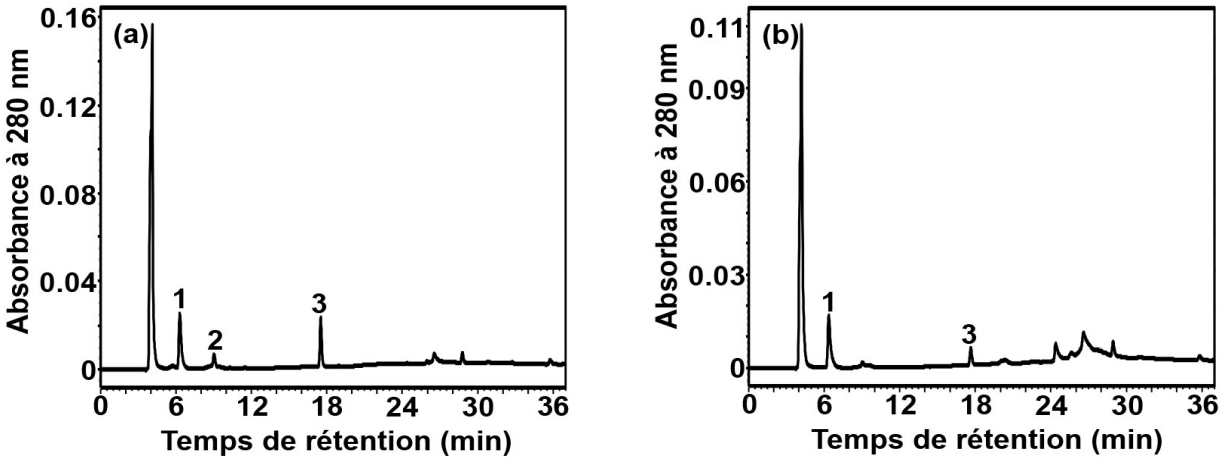


Figure 96. Analyse chromatographique de la transformation de la (+)-gallocatéchine par la *Vv*ANS en présence de GSH.

Chromatogrammes HPLC sur colonne Atlantis C18. (a) Le milieu réactionnel contient la *Vv*ANS (holoenzyme), le sel de Fe(II) 10 µM et le glutathion 1mM; (b) Milieu réactionnel précédent sans GSH.

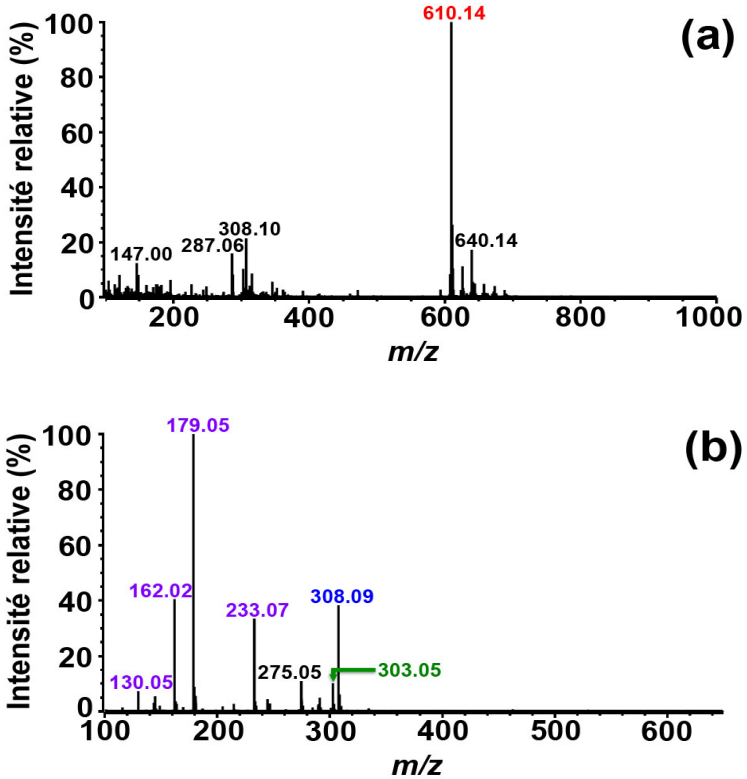


Figure 97. Spectres MS et MS/MS du nouveau produit enzymatique de la (+)-gallocatéchine qui est observé dans un milieu réactionnel contenant du GSH.

(a) Spectre MS du produit élué à 9 min (pic 2, **figure 96a**) lors de l'analyse HPLC; (b) Spectre MS/MS de l'ion de *m/z* 610.

Pour confirmer cette interprétation, un témoin non-enzymatique a été réalisé avec les deux substrats, et comme le montre la **figure 98**, aucun nouveau produit n'est observé en l'absence d'enzyme. Les adduits covalents du glutathion avec chacun des deux substrats sont donc bien des produits enzymatiques.

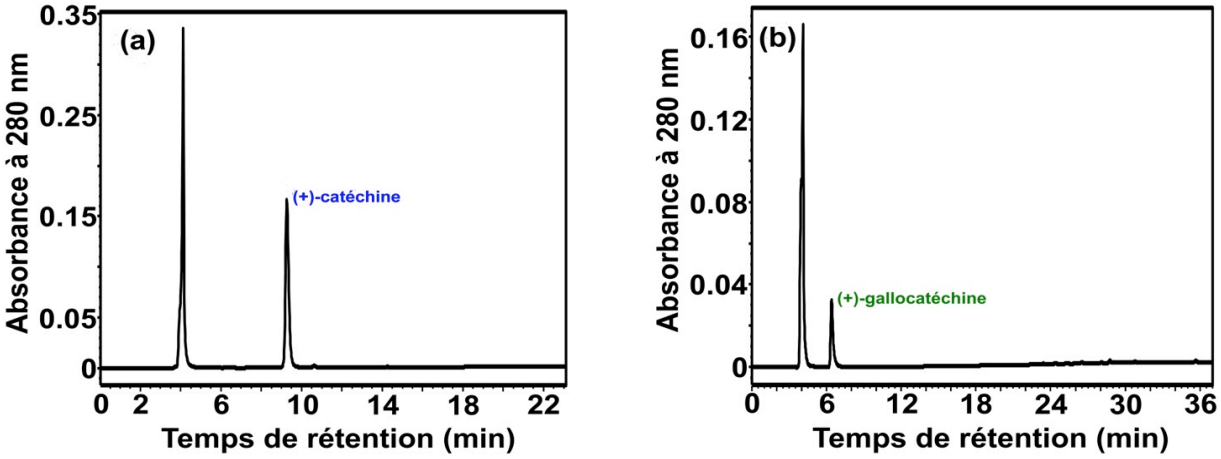


Figure 98. Absence d'effet du glutathion GSH sur la transformation de la (+)-catéchine et de la (+) gallocatéchine en l'absence d'enzyme.

Chromatogrammes HPLC sur colonne Atlantis C18. Le milieu réactionnel contient le sel de Fe(II) 10 µM et 1 mM de GSH en l'absence d'enzyme, plus 100 µM de substrat polyphénolique.
(a) Substrat = (+)-catéchine; (b) Substrat = (+)-gallocatéchine.

IV.3. Effet du GSH sur la transformation des substrats de la famille des flavan-3,4-diols

La 3,4-cis- et la 3,4-trans-leucocyanidine ont été testées comme substrats dans un milieu réactionnel contenant 10 µM du sel de Fe(II), en présence et en l'absence de GSH.

Comme le montre la **figure 99**, les deux produits observés en l'absence de GSH, le 3,4-cis-triol (3,3-gem diol) (pic 1) et la quercétine (pic 2), sont retrouvés à l'identique en présence de GSH. Le GSH n'a donc aucun effet sur la réaction enzymatique de *Vv*ANS avec la 3,4-cis-leucocyanidine.

La même conclusion s'impose pour la 3,4-trans-leucocyanidine. En effet, comme le montre la **figure 100**, les cinq produits observés en l'absence de GSH, c'est-à-dire le 3,4-trans-triol/3,3-gem diol (pic 1), la (+)-DHQ (pic 2), la (-)-épiDHQ (pic 3), la cyanidine (pic 4) et la quercétine (pic 5), sont retrouvés à l'identique en présence de GSH.

Nous pouvons donc conclure que le GSH n'a aucun effet sur la transformation des deux stéréoisomères de leucocyanidine par la *Vv*ANS.

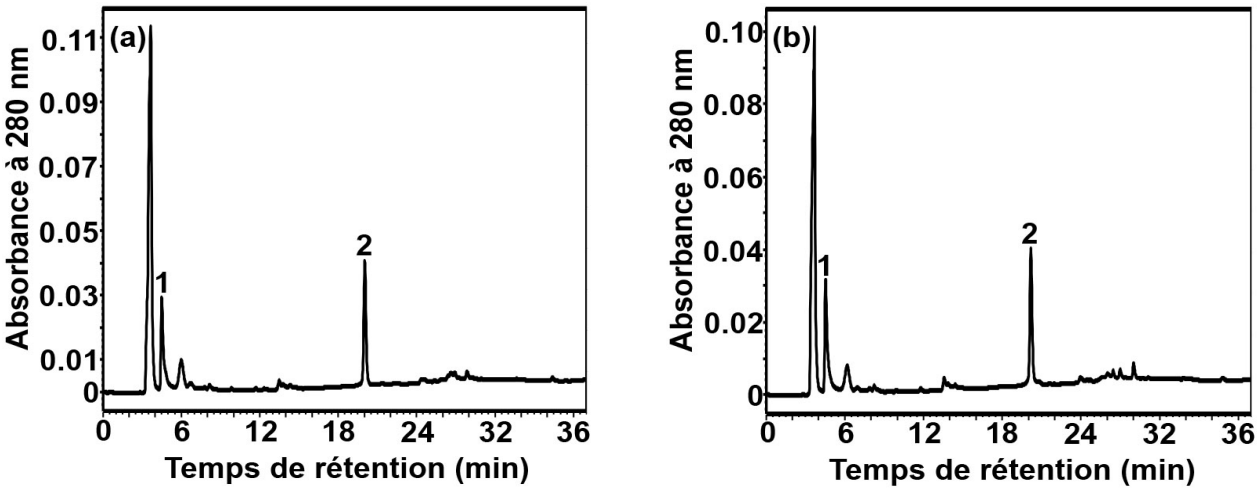


Figure 99. Absence d'effet du glutathion GSH sur la transformation enzymatique de la 3,4-cis-leucocyanidine par la *Vv*ANS.

Chromatogrammes HPLC sur colonne Atlantis C18. Le mélange réactionnel contient 10^{-6} M de *Vv*ANS (holoenzyme), 10 µM de sel de Fe(II) et une concentration initiale de 100 µM de 3,4-cis-leucocyanidine. (a) En présence de GSH 1 mM; (b) En l'absence de GSH.

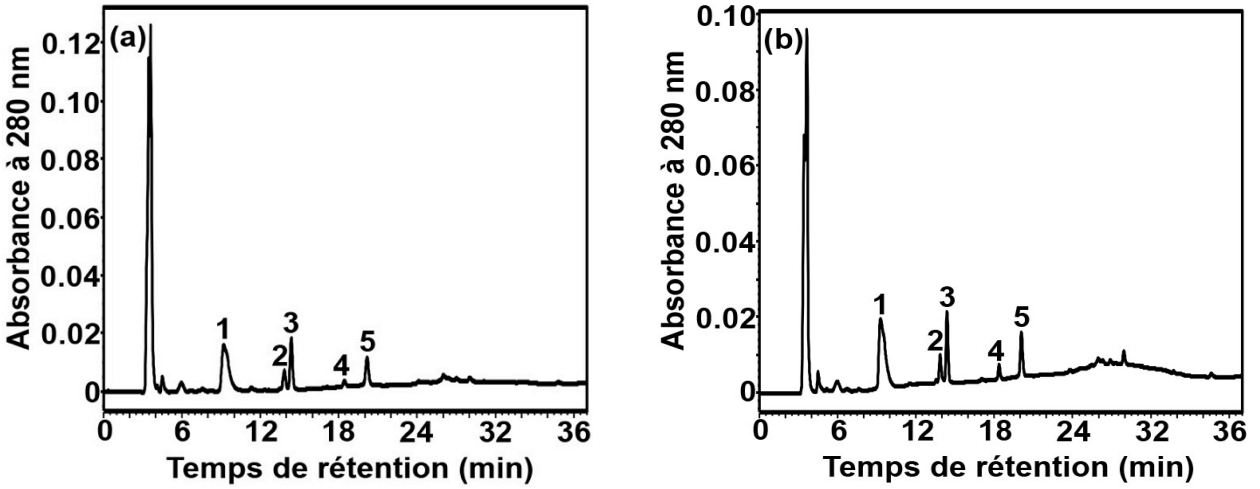


Figure 100. Absence d'effet du glutathion GSH sur la transformation enzymatique de la 3,4-trans-leucocyanidine par la *Vv*ANS.

Chromatogrammes HPLC sur colonne Atlantis C18. Le mélange réactionnel contient 10^{-6} M de *Vv*ANS (holoenzyme), 10 µM de sel de Fe(II) et une concentration initiale de 100 µM de 3,4-trans-leucocyanidine. (a) En présence de GSH 1 mM; (b) En l'absence de GSH.

IV.4. Conclusions préliminaires sur l'effet de GSH

L'ensemble des résultats que nous venons d'exposer permet de conclure que la présence de GSH a un effet majeur sur la transformation des substrats de la sous-famille des flavan-3-ols tels que la (+)-catéchine et la (+)-gallocatéchine. La concentration d'anthocyanidine formée (cyanidine ou delphinidine) est fortement augmentée et l'on observe la formation d'un nouvel adduit covalent entre GSH et anthocyanidine (cyanidine ou delphinidine).

IV.5. Stabilité de l'adduit covalent GSH-cyanidine

Après quelques jours de conservation à 4°C dans un solvant méthanol/H_2O (v/v, environ 50/50) contenant 0,1% de TFA, le produit collecté qui est initialement incolore devient rose pâle (**figure 92a**). Cette observation suggère que cet adduit covalent glutathion-cyanidine n'est pas très stable et peut se décomposer en un composé coloré, qui pourrait être la cyanidine. L'étude de la stabilité de ce complexe covalent a donc été effectuée. Après plusieurs productions enzymatiques et purifications par HPLC, un grand volume d'échantillon (environ 20 ml) de cet adduit a été collecté puis congelé immédiatement dans l'azote liquide. Après lyophilisation, la poudre a été remise en solution dans 500 µl de méthanol/H_2O (50/50, v/v) contenant 0,1% de TFA, puis analysé immédiatement par HPLC.

Comme le montre la **figure 101a**, trois pics sont observés, dont le grand pic 2 correspond à l'adduit covalent, les deux autres petits pics étant inconnus. Après une nuit de conservation à 4°C, une forte diminution de la concentration de cet adduit est observée (≈ 50%), ainsi qu'une forte augmentation de la concentration des pics 1 et 3 (**figure 101b**), ce qui suggère qu'il s'agit de produits de dégradation de l'adduit GSH-cyanidine. Il n'y a cependant pratiquement plus d'évolution de la composition du milieu au-delà de 12h, comme le montre la **figure 101c**. Ces pics 1 et 3 collectés ont été analysés par MS et MS/MS. L'analyse MS de l'échantillon du pic 1 collecté (**figure 102a**) montre un grand pic de *m/z* 594 qui correspond à l'ion $[M+H]^+$ du composé incolore élué à 10,6 min (pic 1, **figure 101c**), et la fragmentation MS/MS de cet ion (**figure 102b**) produit plusieurs ions fragments de *m/z* 308, 287, 233 et 179, qui sont les mêmes que ceux l'adduit covalent glutathion-cyanidine. Nous en concluons que ce composé est un isomère, et probablement une forme tautomère de l'adduit covalent glutathion-cyanidine initialement produit.

L'analyse MS du pic 3 coloré donne quant à elle un petit pic de *m/z* 287 (**figure 103a**), et la fragmentation MS/MS de cet ion de *m/z* 287 produit six ions fragments majeurs (**figure 103b**), cinq d'entre eux (*m/z* 109, 121, 137, 157, 213 et 241) correspondent aux ions fragments majeurs de la fragmentation MS/MS de l'ion de *m/z* 287 qui est le cation flavylium de la cyanidine. Le pic 3 est donc bien la cyanidine.

En conclusion, le pic 3 observé après 12 h de conservation de l'adduit glutathion-cyanidine correspond à un produit de décomposition qui est la cyanidine elle-même, et le pic 1 est un produit de masse moléculaire identique, et par conséquent presque certainement un isomère et probablement une forme tautomère de l'adduit glutathion-cyanidine qui aurait tendance à se former dans l'éluant acide (≈ pH 2). Si cette interprétation est correcte, le rapport des deux isomères à

l'équilibre est d'après la **figure 101c** proche de 50/50 (surfaces des pics). De plus, le glutathion GSH devrait être produit en même temps que la cyanidine, mais il ne peut pas être observé sur le chromatogramme, car il n'absorbe pas à 280 nm.

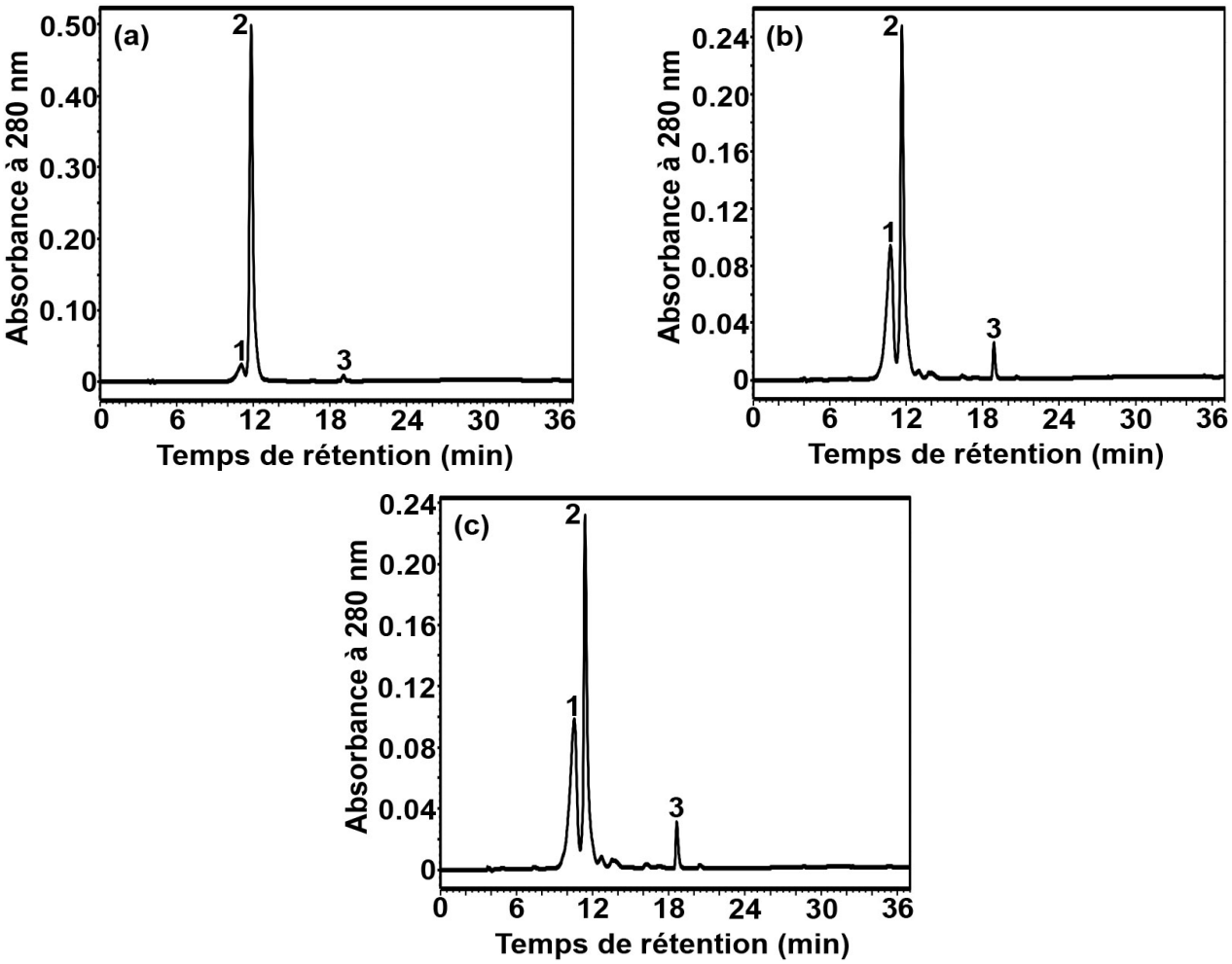


Figure 101. Analyse chromatographique de l'évolution spontanée de l'adduit covalent glutathion-cyanidine dans le solvant d'élution.

Chromatogrammes HPLC sur colonne Atlantis C18. (a) Composition immédiate du pic collecté; (b) Composition après 12h de conservation; (c) Composition après 24h de conservation.

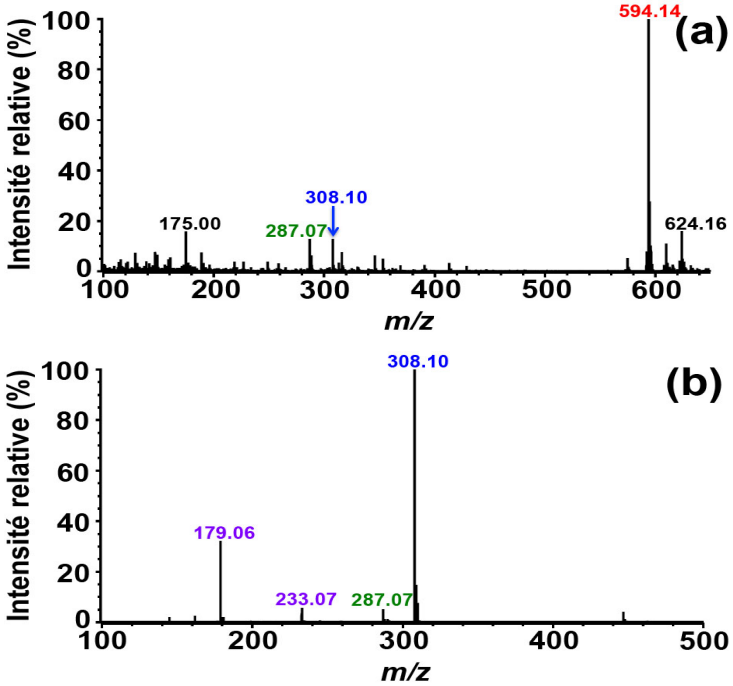


Figure 102. Confirmation par MS et MS/MS de la production d'un isomère de l'adduit covalent glutathion-cyanidine.

(a) Spectre MS du produit élué à 10,6 min (pic 1, **figure 101c**) lors de l'analyse HPLC; (b) Spectre MS/MS de l'ion de *m/z* 594 correspondant à ce produit.

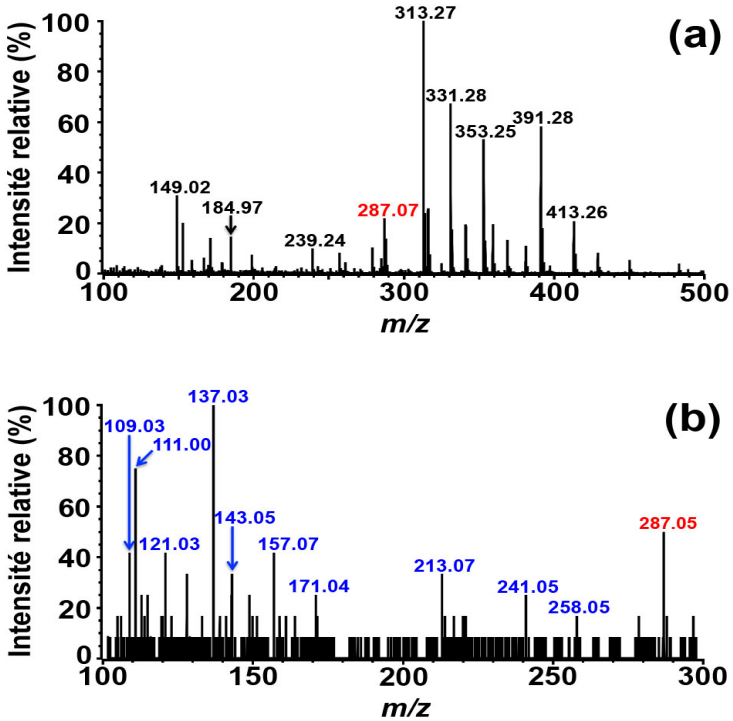


Figure 103. Spectres MS et MS/MS du produit de décomposition coloré de l'adduit covalent glutathion-cyanidine initialement produit.

(a) Spectre MS du produit élué à 18,6 min (pic 3, **figure 101c**) lors de l'analyse HPLC; (b) Spectre MS/MS de l'ion de *m/z* 287 correspondant à ce produit.

V. Suivi par spectrométrie de masse en temps réel de la transformation enzymatique de la (+)-catéchine par la *Vv*ANS en présence et en l'absence de GSH

V.1. Choix d'un tampon approprié

Nous avons essayé de clarifier le mécanisme de formation de l'adduit glutathion-cyanidine en utilisant la spectrométrie de masse "en mode cinétique". Pour ce faire, la réaction enzymatique a été monitorée dans le milieu réactionnel avec ou sans GSH, en utilisant d'une part l'holoenzyme en présence du sel de Fe(II), et d'autre part, le complexe de *Vv*ANS-Fe(II) préformé, donc en l'absence de sel de Fe(II).

La réaction enzymatique avait été réalisée jusqu'ici dans le tampon MES, mais l'injection continue de ce tampon faiblement volatile est une source possible d'altération de l'appareillage de spectrométrie de masse, c'est pourquoi nous avons dû lui substituer un tampon plus volatile, et nous avons décidé de tester le tampon acétate d'ammonium (20 mM, pH 6,5) qui présentait l'avantage d'avoir un pKa lui conférant un bon pouvoir tampon au pH de travail envisagé. L'activité de la *Vv*ANS (holoenzyme) a été d'abord testée dans ce tampon en présence de sel de Fe(II) mais sans GSH. Comme le montre la **figure 104a**, les produits enzymatiques sont les mêmes que ceux obtenus lors de la réaction réalisée dans le tampon MES (**figure 104b**), l'activité de l'enzyme étant très similaire. La réaction enzymatique a été ensuite analysée dans ce tampon en présence de GSH et toujours en présence de sel de Fe(II).

Comme le montre la **figure 105**, les produits observés sont les mêmes que dans le tampon MES, mais une inversion des rapports entre l'adduit glutathion-cyanidine (pic 3, **figure 105**) et la cyanidine (pic 4, **figure 105**) est observée, ce qui suggère d'une part, que l'adduit glutathion-cyanidine est peut-être plus stable dans le tampon acétate d'ammonium que dans le MES, et d'autre part, que la cyanidine est probablement un produit de décomposition de l'adduit glutathion-cyanidine.

Comme le montre la **figure 106**, on observe de manière similaire une forte augmentation de l'adduit glutathion-delphinidine lors de la transformation de la (+)-gallocatéchine par la *Vv*ANS, dans le tampon acétate d'ammonium et dans les mêmes conditions.

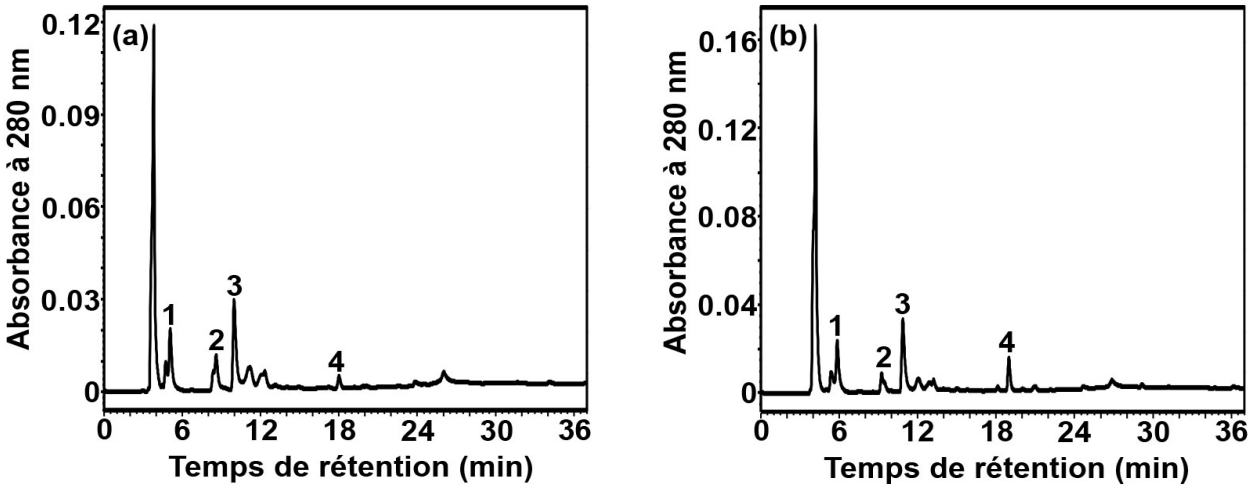


Figure 104. Analyse chromatographique de la transformation de la (+)-catéchine par la *Vv*ANS dans le tampon acétate d'ammonium en l'absence de GSH.

Chromatogrammes HPLC sur colonne Atlantis C18. Le milieu réactionnel contient 10 µM de sel de Fe(II), sans GSH. (a) Réaction réalisée dans le tampon acétate d'ammonium; (b) Réaction témoin dans le tampon MES.

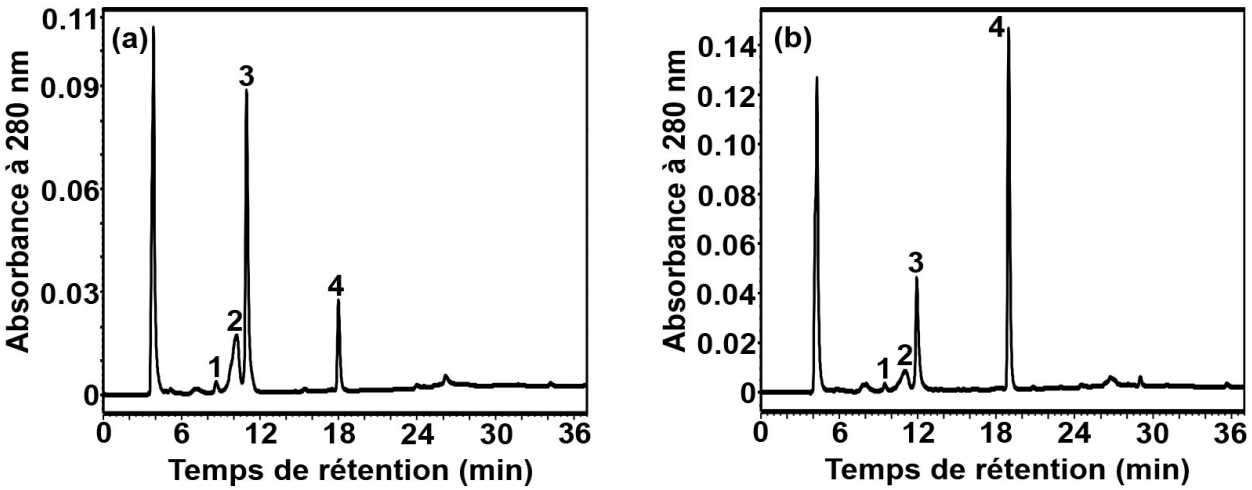


Figure 105. Analyse chromatographique de la transformation de la (+)-catéchine par la *Vv*ANS dans le tampon acétate d'ammonium en présence de GSH.

Chromatogrammes HPLC sur colonne Atlantis C18. Le milieu réactionnel contient 10 µM de sel de Fe(II), 1 mM de GSH. (a) Réaction réalisée dans le tampon acétate d'ammonium; (b) Réaction témoin dans le tampon MES.

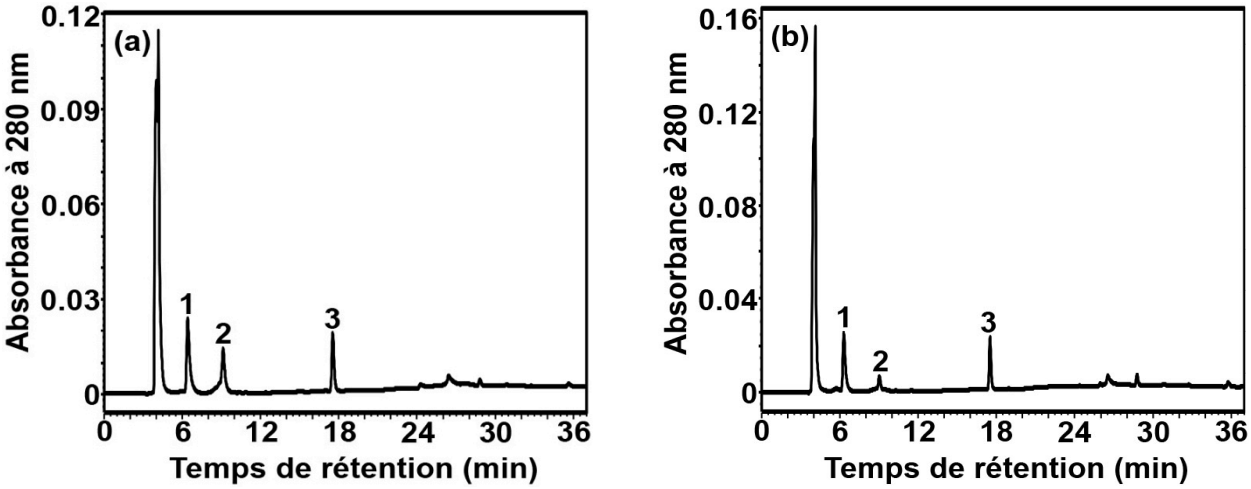


Figure 106. Analyse chromatographique de la transformation de la (+)-gallocatéchine par la *Vv*ANS dans le tampon acétate d'ammonium en présence de GSH.

Chromatogrammes HPLC sur colonne Atlantis C18. Le milieu réactionnel contient 10 µM de sel de Fe(II) et 1 mM de GSH. (a) Réaction réalisée dans le tampon acétate d'ammonium; (b) Réaction témoin dans le tampon MES.

V.2. Production du complexe *Vv*ANS-Fe(II) dans le tampon acétate d'ammonium

La formation d'un adduit covalent glutathion-anthocyanidine pouvant éventuellement impliquer un mécanisme radicalaire, il nous a semblé nécessaire de pouvoir travailler en l'absence de sel de Fe(II) libre pour éviter la formation "extra-enzymatique" d'intermédiaires radicalaires. L'utilisation d'un milieu réactionnel ne contenant pas de sel de Fe(II) libre était par ailleurs préférable pour une série d'injections en flux continu dans la cellule du spectromètre de masse. C'est pourquoi nous avons testé la possibilité de produire le complexe de *Vv*ANS-Fe(II) (≈ 10^{-6} M) en remplaçant le tampon MES par le tampon acétate d'ammonium 20 mM, pH 6,3, toutes conditions égales par ailleurs (Matériels et Méthodes, IV.1.2). L'activité du complexe *Vv*ANS-Fe(II) présumé (obtenu en sortie de cartouche de gel-filtration) a été ensuite testée en utilisant la (+)-catéchine 100 µM comme substrat. Comme le montre la **figure 107**, un complexe *Vv*ANS-Fe(II) d'activité spécifique à peu près identique à celle du complexe produit en tampon MES a bien été produit, puisque les produits enzymatiques observés sont les mêmes, et qu'aucune différence significative n'est observée par rapport à la réaction catalysée par l'holoenzyme plus sel de Fe(II) (**figure 105a**).

Nous pouvons donc utiliser le complexe *Vv*ANS produit dans le tampon acétate d'ammonium, et analyser l'évolution du milieu réactionnel par spectrométrie de masse en temps réel dans ce même tampon.

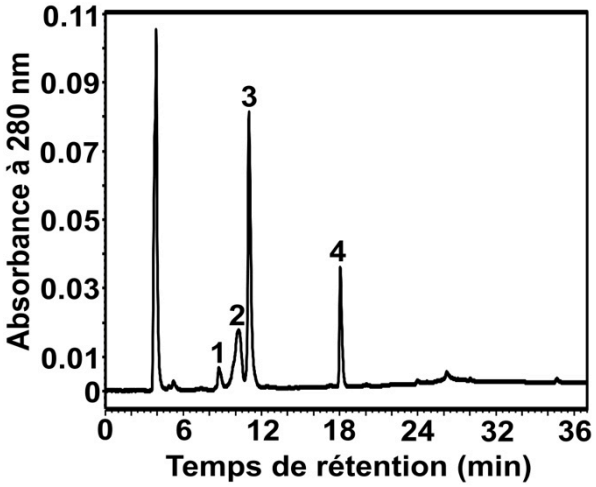


Figure 107. Analyse chromatographique de la transformation de la (+)-catéchine par le complexe *Vv*ANS-Fe(II) produit dans le tampon acétate d'ammonium.

Chromatogramme HPLC sur colonne Atlantis C18. Le milieu réactionnel contient 10^{-6} M de complexe *Vv*ANS-Fe(II) préformé dans le tampon acétate d'ammonium et une concentration initiale de 100 µM de (+)-catéchine, dans le tampon acétate d'ammonium 20 mM, pH 6,5 et 35°C.

V.3. Monitorage en temps réel de l'évolution du milieu réactionnel contenant l'holoenzyme plus le sel de Fe(II) en présence de GSH

La transformation de la (+)-catéchine par l'holoenzyme (*Vv*ANS) dans le milieu réactionnel en présence de sel de Fe(II) et de GSH a été d'abord suivie par MS. Ce milieu (1,9 ml) contient 1 mM d'α-cétoglutarate, 2 mM d'ascorbate, 10 µM de Fe(II), 0,2 mM de GSH, 0,1 mg/ml de catalase et 10^{-6} M de *Vv*ANS dans le tampon acétate d'ammonium 20 mM, pH 6,3, et la réaction enzymatique est déclenchée par addition de 100 µl de solution mère de (+)-catéchine (2 mM dans le méthanol). Après homogénéisation du mélange en quelques secondes, 300 µl de ce milieu sont prélevés à l'aide d'une seringue Hamilton de 500 µl, puis injectés en continu dans la source ESI grâce à un piston motorisé réglé sur un débit de 5 µl/min, à température ambiante (local thermostaté à 24°C). La réaction enzymatique est donc ici monitorée à 24°C et non à 35°C.

Comme le montre la **figure 108**, la formation de l'adduit d'ascorbate (M+1, *m/z* 463) et du dimère de (+)-catéchine oxydée (M+1, *m/z* 575) qui avait été observée en l'absence de GSH (**figure 104**) n'est plus observée ici en présence de GSH. La diminution des ions $[M+H]^+$ de la (+)-catéchine (M+1, *m/z* 291) et du GSH (M+1, *m/z* 308) avec le temps est bien observée pendant 60 min, ainsi que la formation des deux produits majeurs, la cyanidine non chargée (M+1, *m/z* 287) et l'adduit covalent glutathion-cyanidine (M+1, *m/z* 594).

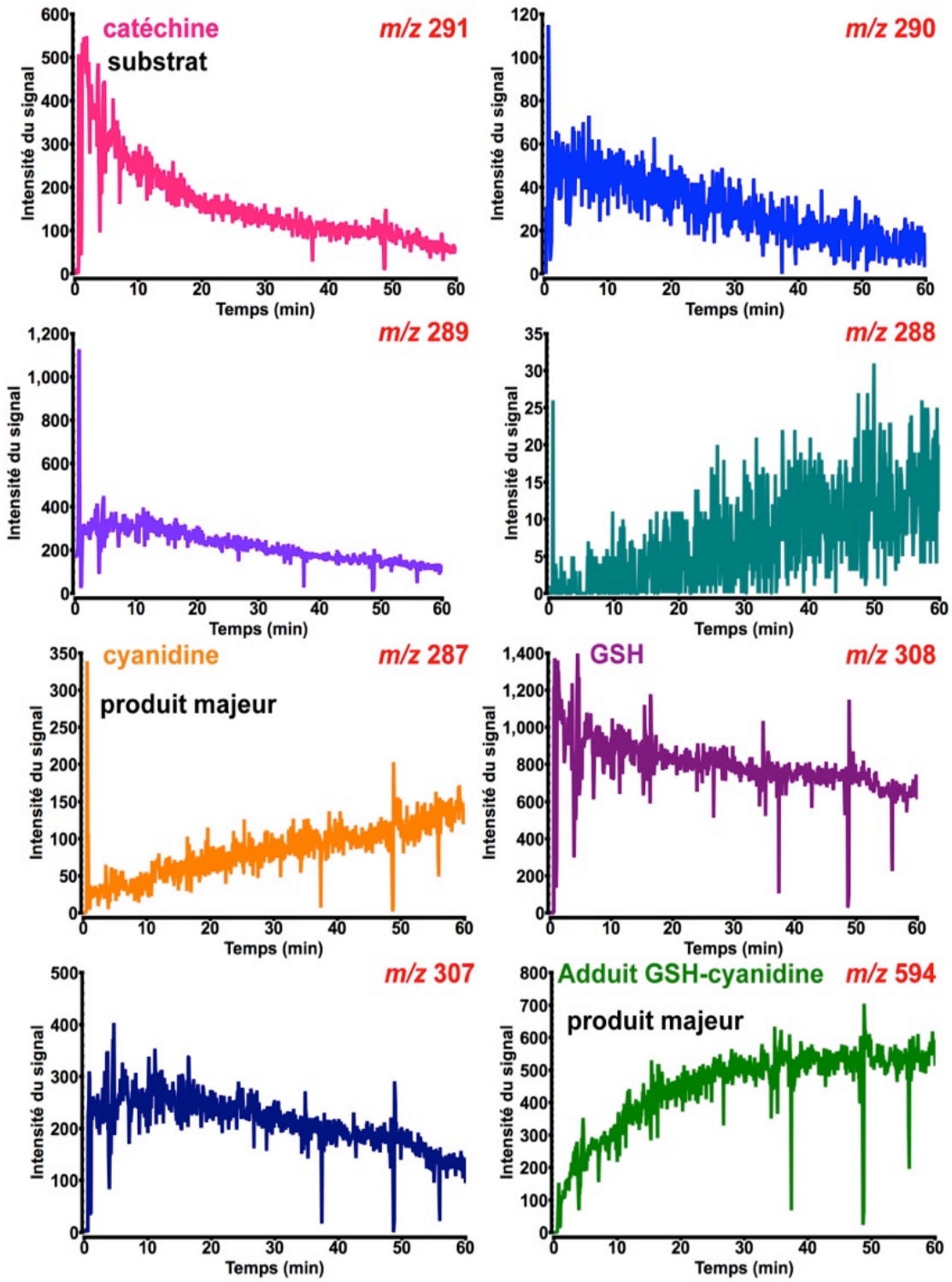


Figure 108. Monitorage par spectrométrie de masse en temps réel de la transformation de la (+)-catéchine par l'holoenzyme en présence de sel de fer et de GSH.

Mais ce qui est nouveau et fort intéressant est que l'on observe la formation transitoire de quatre intermédiaires d'oxydation, qui d'après les *m/z* enregistrés peuvent être respectivement considérés comme des produits d'oxydation à un électron (M+1, *m/z* 290), à deux électrons (M+1, *m/z* 289), à trois électrons (M+1, *m/z* 288) et à quatre électrons (cyanidine, *m/z* 287). Par ailleurs, un ion de *m/z*

307 est aussi observé, qui correspond vraisemblablement à un produit monohydroxylé de la (+)-catéchine.

V.4. Monitorage en temps réel de l'évolution du milieu réactionnel contenant le complexe *Vv*ANS-Fe(II) sans sel de Fe(II)

La production du complexe *Vv*ANS-Fe(II) (≈ 10^{-6} M) a été réalisée dans le tampon 20 mM acétate d'ammonium pH 6,3, contenant 2 mM d'ascorbate, 1 mM de 2OG, 30 µM de Fe(II) et 0,1 mg/ml de catalase, et deux échantillons ainsi produits ont été respectivement utilisés sans GSH et en présence de GSH 1 mM (Matériels et Méthodes, IV.1.2).

La réaction est ensuite déclenchée par addition de 125 µl de solution mère de (+)-catéchine (2 mM dans le méthanol), puis monitorée par spectrométrie de masse en utilisant le même montage et les mêmes conditions que dans la section précédente.

V.4.1. Monitorage de la transformation de catéchine en l'absence de GSH

Comme le montre la **figure 109**, lorsque la réaction enzymatique est effectuée en l'absence de GSH, l'adduit ascorbate-cyanidine (M+1, *m/z* 463) est immédiatement observé, et une rapide augmentation non linéaire de cet adduit est enregistrée pendant les 10 premières minutes, puis la vitesse de ce processus diminue pour atteindre un état stationnaire vers 20 min. On voit de plus que l'augmentation de cet adduit ascorbate-cyanidine est à peu près linéairement corrélée à la diminution de la (+)-catéchine.

Le produit d'oxydation à quatre électrons (cyanidine, *m/z* 287) est lui aussi observé immédiatement, et une augmentation non linéaire de ce produit est enregistrée pendant les 20 premières minutes au moins, comme pour l'adduit ascorbate-cyanidine.

L'intensité du signal du dimère de (+)-catéchine oxydée (M+1, *m/z* 575) est quant à elle très faible pendant les 6 premières minutes, et aucune augmentation de ce produit n'est enregistrée. Ces résultats suggèrent que la cyanidine et l'adduit ascorbate-cyanidine pourraient être les deux seuls produits enzymatiques.

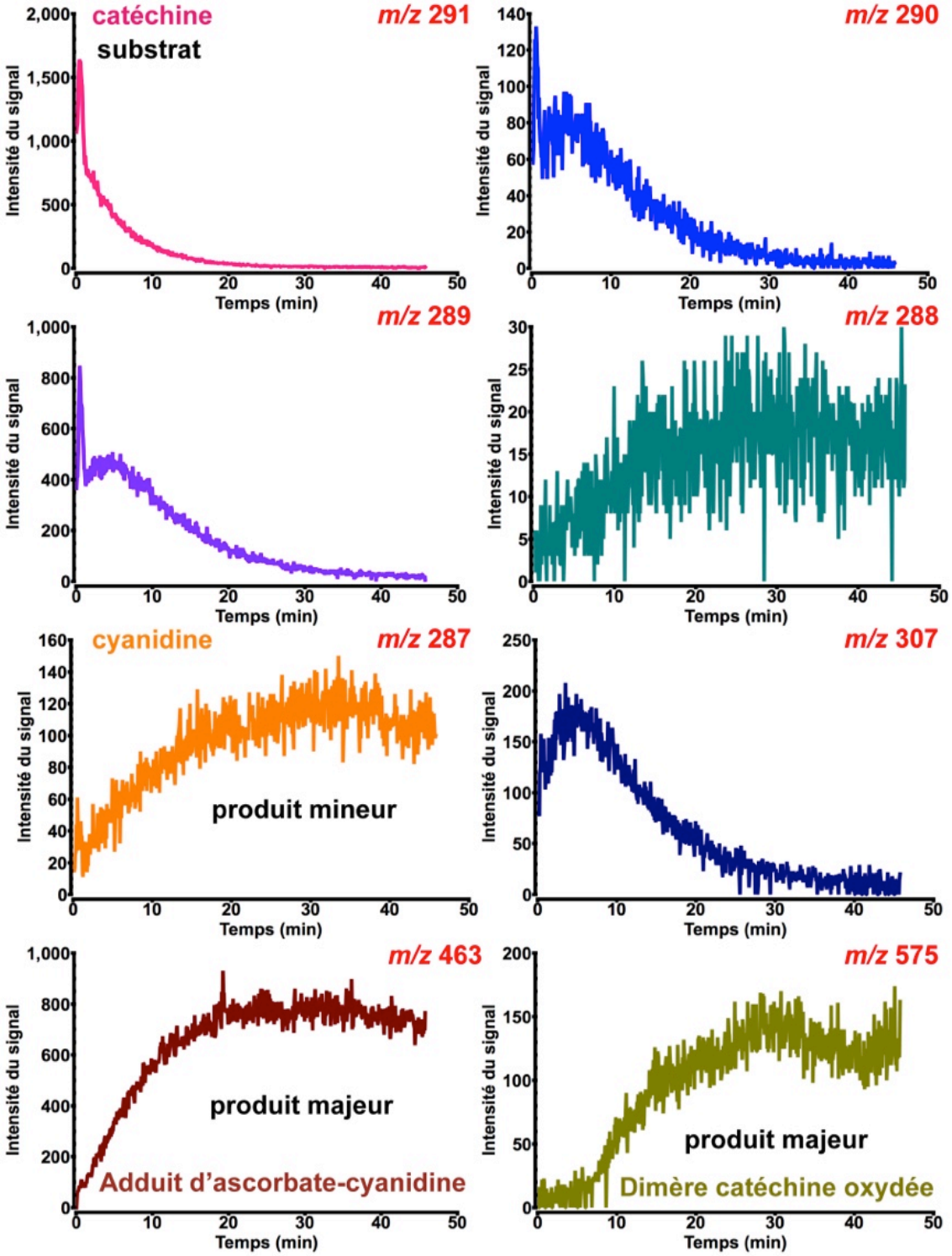


Figure 109. Monitorage par spectrométrie de masse en temps réel de la transformation de la (+)-catéchine par le complexe *Vv*ANS-Fe(II) en l'absence de GSH.

V.4.2. Monitorage de la transformation de catéchine en présence de GSH

Comme le montre la **figure 110**, lorsque la réaction enzymatique est effectuée en présence de 1 mM de GSH, l'adduit glutathion-cyanidine (M+1, *m/z* 594) est immédiatement observé, et une augmentation non linéaire de cet adduit est bien enregistrée pendant les 30 premières minutes, parallèlement à une dégradation non linéaire de la (+)-catéchine. La formation de l'adduit glutathion-cyanidine semble proportionnelle à la dégradation de (+)-catéchine.

Une augmentation non linéaire de la cyanidine (*m/z* 287) est aussi enregistrée pendant 50 min, mais la vitesse d'augmentation est très lente. Ceci suggère que l'adduit glutathion-cyanidine est un "vrai" produit enzymatique et non un sous-produit, alors que c'est plus douteux pour la cyanidine.

On notera enfin que si l'on compare ces résultats avec la cinétique de transformation de la (+)-catéchine par l'holoenzyme réalisée en présence de sel de Fe(II) (**figure 108**), on constate que la cinétique observée en l'absence de sel de Fe(II) est plus propre, y compris pour ce qui concerne l'évolution des intermédiaires.

En résumé, les quatre intermédiaires d'oxydation et l'intermédiaire d'hydroxylation (catéchine hydroxylée) sont toujours observés, en présence comme en l'absence de GSH, et nous pouvons voir que les deux premiers intermédiaires d'oxydation (M+1, *m/z* 290 et *m/z* 289), tout comme l'intermédiaire hydroxylé (M+1, *m/z* 307), sont immédiatement observés, et qu'après une très rapide augmentation au cours des 5 premières minutes, ils diminuent tous de manière non-linéaire jusqu'à la fin de la réaction.

Par ailleurs, on voit que le premier intermédiaire d'oxydation (M+1, *m/z* 290) semble atteindre un plateau maximal un peu plus tôt que l'intermédiaire hydroxylé (M+1, *m/z* 307), lui-même plafonnant apparemment un peu plus tôt que le second intermédiaire d'oxydation (M+1, *m/z* 289).

Sur cette base, nous pouvons formuler une hypothèse plausible quant aux structures probables de ces cinq intermédiaires. Comme le montre la **figure 111**, le produit d'oxydation à un électron (M+1, *m/z* 290) serait un radical libre en C_3 ou C_4 formé à partir de la (+)-catéchine. Le produit d'oxydation à deux électrons (M+1, *m/z* 289) serait un flav-2-en-3-ol ou flav-3-en-3-ol. Le produit d'oxydation à trois électrons (M+1, *m/z* 288) serait un radical libre en C_4 formé à partir du produit d'oxydation à deux électrons. Et le produit d'oxydation à quatre électrons (M+1, *m/z* 287) ne peut être quant à lui que la cyanidine.

Le produit d'hydroxylation de la (+)-catéchine (M+1, *m/z* 307) peut dès lors être considéré comme le 3,3-gem-diol, à partir duquel le produit d'oxydation à deux électrons (M+1, *m/z* 289) peut être formé facilement par déshydratation.

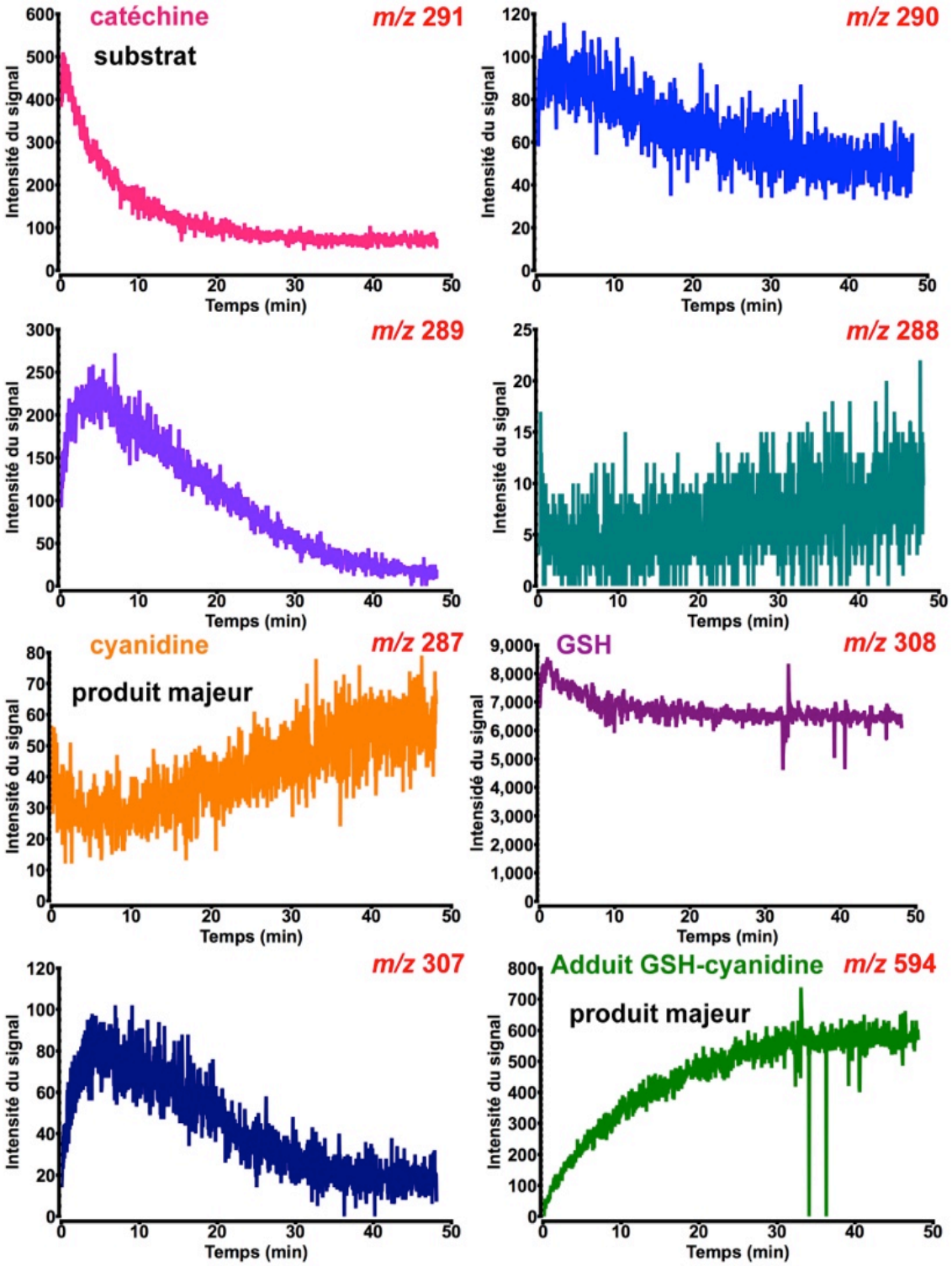


Figure 110. Monitorage par spectrométrie de masse en temps réel de la transformation de la (+)-catéchine par le complexe *Vv*ANS-Fe(II) en présence de GSH.

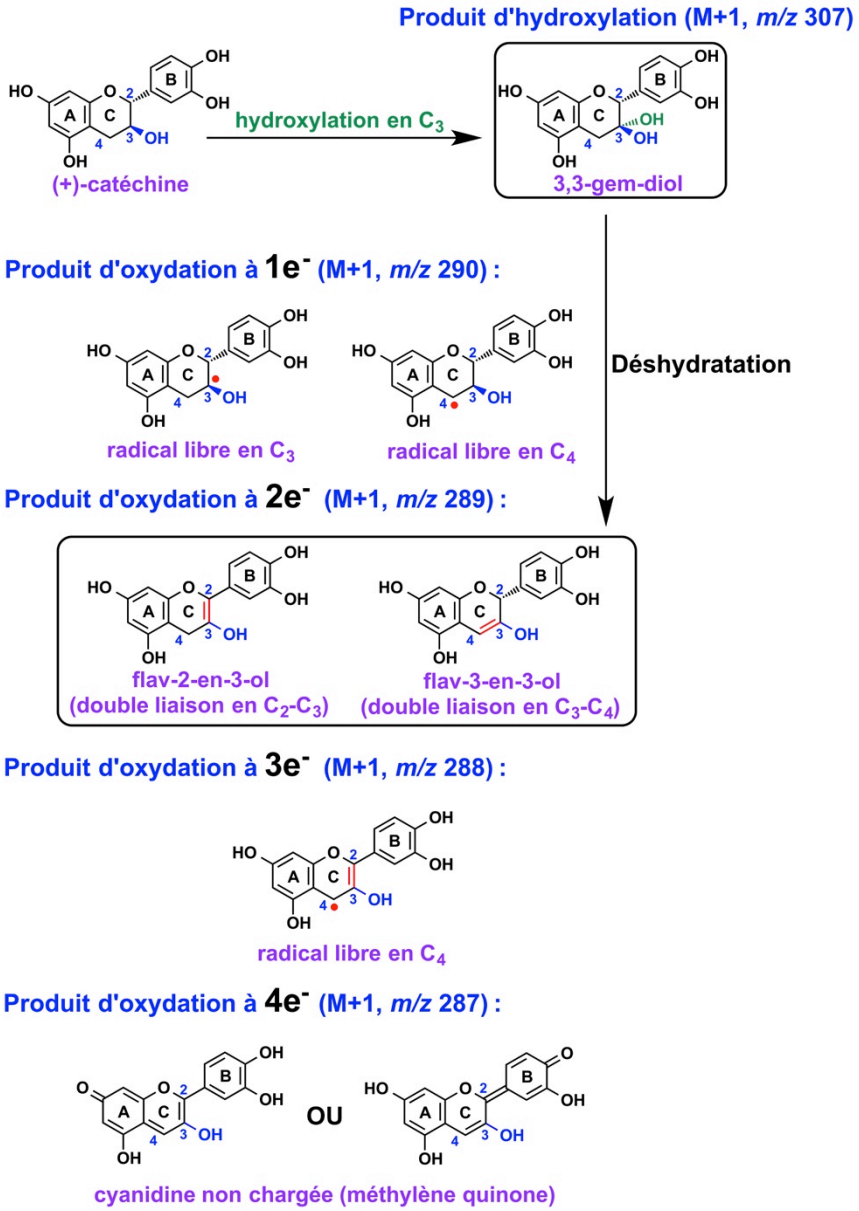


Figure 111. Structures proposées des quatre intermédiaires d'oxydation et de l'intermédiaire d'hydroxylation de la (+)-catéchine.

VI. Hypothèses sur la formation de l'adduit glutathion-cyanidine

D'après nos données, cet adduit a une masse moléculaire de 593 Da (M+1, *m/z* 594). Toutes les positions d'addition possibles sur la (+)-catéchine ont donc été essayées, et après calcul exact, seules quatre structures possibles ayant la bonne masse moléculaire peuvent être obtenues, incluant deux thioéthers en C_4 (adduits 1 et 2), un en C_2 (adduit 4) et un en C_3 (adduit 3), comme le montre la **figure 112**.

Nos résultats montrent clairement que cet adduit glutathion-cyanidine peut se décomposer en cyanidine et GSH, donc l'adduit 2 peut être exclu car il ne pourrait se décomposer ainsi. Quant à

l'adduit 3, il faut bien admettre que sa formation éventuelle serait fort difficile à expliquer, la seule possibilité semblant reposer sur l'attaque d'une forme électrophile de GSH (GSOH ou GSSG) par un carbone 3 nucléophile (pseudo-carbanion) tel que celui de l'adduit 1, *a priori* assez improbable.

Il nous faut enfin rajouter une information importante qui est qu'aucune formation d'adduit glutathion-cyanidine n'est observée lors de l'incubation de cyanidine et de GSH dans le milieu réactionnel sans ANS (données non montrées).

L'addition nucléophile (non enzymatique) du thiolate de GSH sur le carbone 2 ou le carbone 4 de la cyanidine n'est donc pas opérationnelle au pH 6,3 qui est le nôtre: on peut supposer que les concentrations de thiolate GS^- et de cyanidine électrophile (le cation flavylium, ou la structure neutre) sont toutes les deux trop faibles à ce pH pour que la vitesse de réaction non enzymatique soit significative.

Il nous semble en revanche concevable que le site actif de l'enzyme permette par catalyse acido-basique la présence simultanée de la forme réactive de ces deux réactants potentiels (thiolate nucléophile et cyanidine électrophile) si le glutathion GSH est un coenzyme ou ligand spécifique de l'enzyme. Dans cette hypothèse, les thioéthers en C_2 ou en C_4 sont tous les deux envisageables, même si un thioéther en C_4 (électrophile mou/nucléophile mou), c'est-à-dire l'adduit 1, semblerait plus logique.

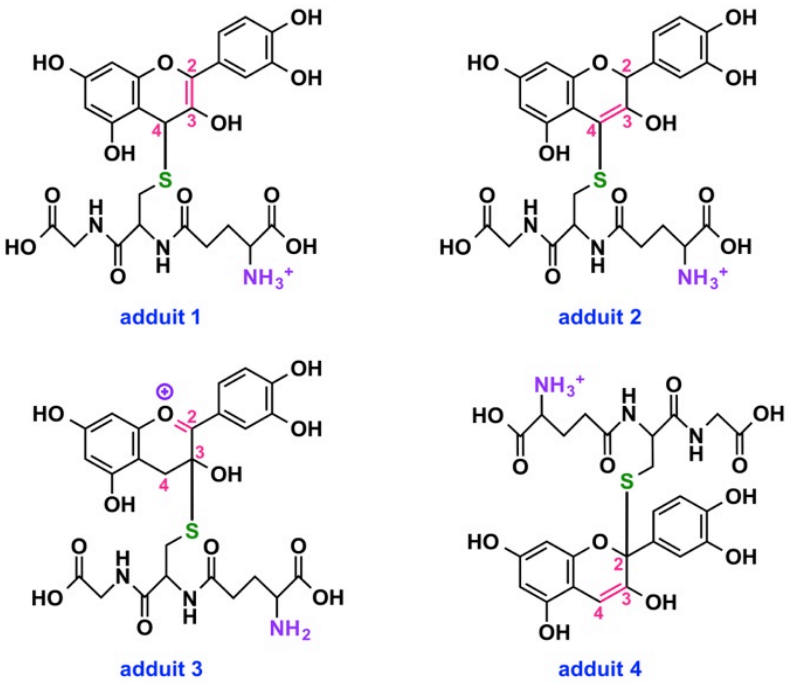


Figure 112. Quatre structures possibles de l'adduit covalent glutathion-cyanidine.

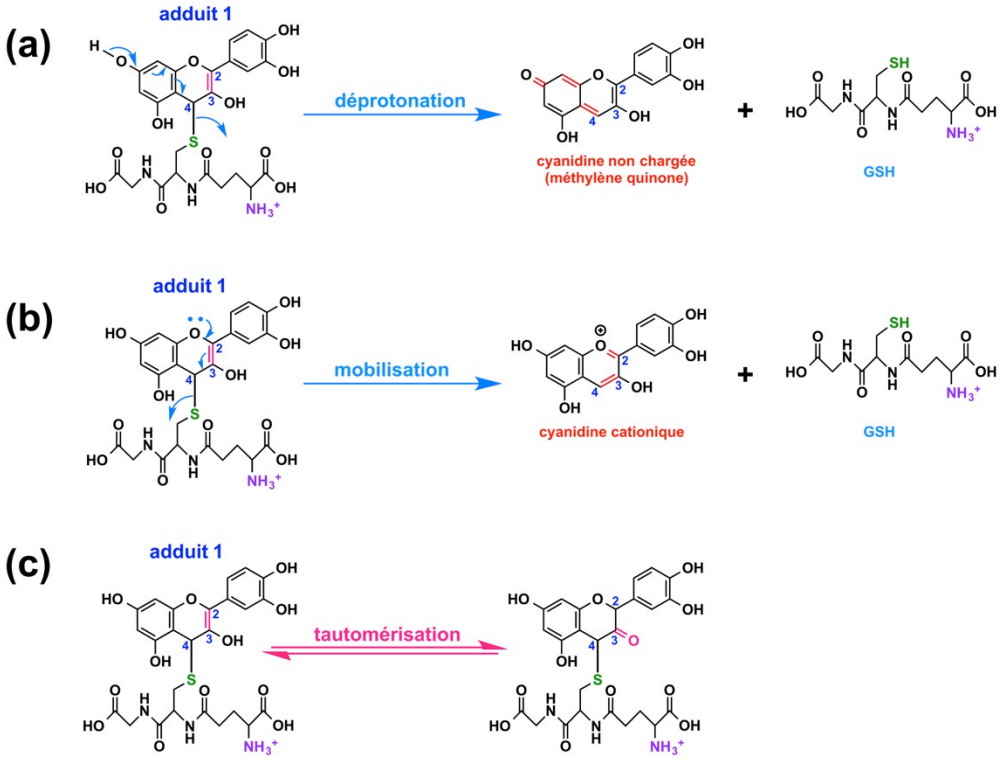


Figure 113. Tautomérisation et décomposition de l'adduit 1 glutathion-cyanidine.

Par ailleurs, comme illustré sur la **figure 113**, l'adduit 1 peut se décomposer en cyanidine et GSH par déprotonation donnant la forme méthylène quinone de la cyanidine **(a)**, ou bien par mobilisation d'un doublet non liant de l'oxygène du cycle C **(b)**.

Et cet adduit 1 peut aussi faire l'objet d'un équilibre de tautomérisation céto-énolique (**figure 113c**). Toutes ces propriétés seraient compatibles avec nos résultats expérimentaux (Résultats - Partie 3, IV.2).

Notre hypothèse privilégiée est donc que l'adduit glutathion-cyanidine est un thioéther en C_4 ayant une double liaison en C_2-C_3.

Nous pouvons dès lors envisager deux hypothèses mécanistiques de formation de cet adduit, un mécanisme d'addition radicalaire et un mécanisme d'addition nucléophile.

VI.1. Mécanisme radicalaire

Comme nous l'avons décrit précédemment, lors du suivi de la transformation enzymatique de (+)-catéchine par spectrométrie de masse, quatre intermédiaires d'oxydation ont été observés dont un intermédiaire d'oxydation à trois électrons que nous avons considéré comme un radical libre centré sur le carbone C_4 (radical le plus stable que l'on puisse envisager puisque l'électron célibataire est idéalement délocalisé sur les deux noyaux aromatiques) ayant par conséquent une double liaison en

C_2-C_3 (**figure 111**), qui a une masse moléculaire de 287 Da (M+1, *m/z* 288). Si cet intermédiaire est un précurseur direct de l'adduit thioéther, c'est inévitablement par recombinaison avec un radical thiyl $GS^{\bullet}$, comme le montre la **figure 114**. Cependant, nous n'avons aucune indication que l'enzyme produit ce radical $GS^{\bullet}$. Or il faut souligner qu'un radical thiyl produit hors du site actif ne pourrait se recombiner efficacement avec un radical centré sur le C_4 parce qu'il se trouverait alors en présence d'un large excès de GSH/GS^{-} à partir duquel il a été produit, et avec lequel il réagirait beaucoup plus rapidement pour donner l'anion radical disulfure $GSSG^{\bullet-}$ ($k_{forward} = 6 \times 10^8\ M^{-1}.s^{-1}$), lequel réduirait quasi-instantanément l'oxygène dissout en anion superoxyde $O_2^{\bullet-}$ pour donner GSSG (***Wardman et Von Sonntag, 1995***).

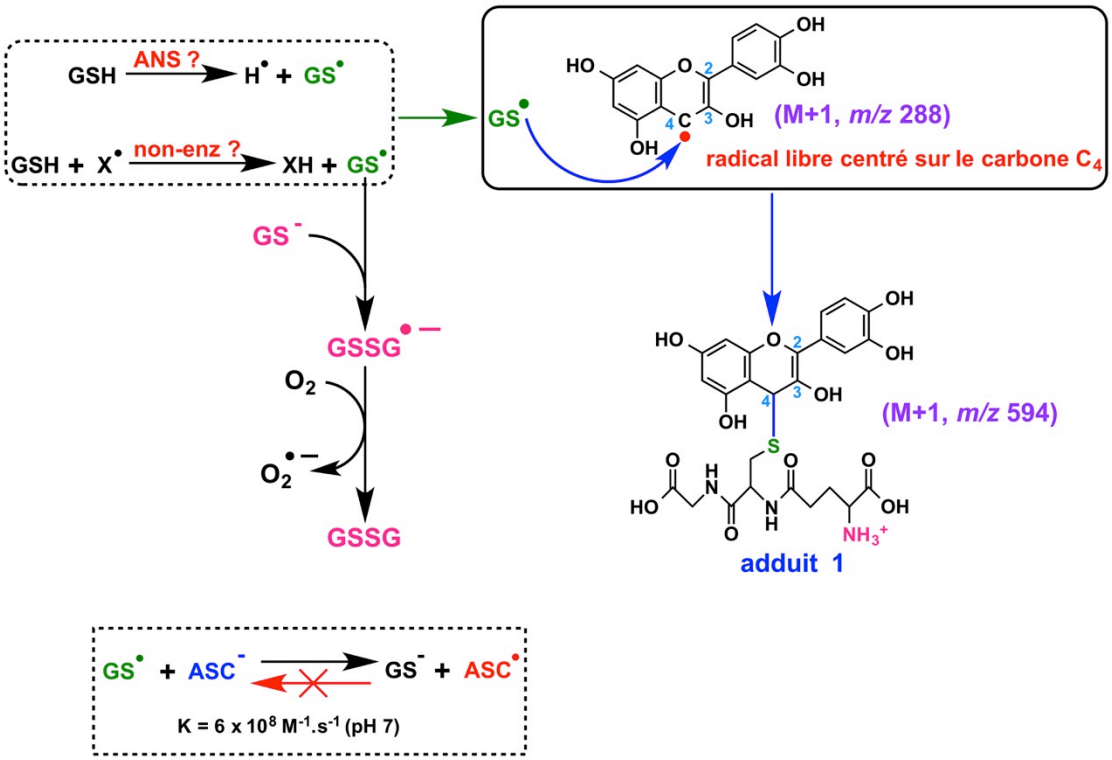


Figure 114. Mécanisme hypothétique de formation radicalaire de l'adduit thioéther glutathion-cyanidine.

Le Trolox C est un dérivé de la vitamine E, qui est un piégeur de radicaux libres très efficace en milieu aqueux, et il est oxydé en radical phénoxyle par le radical thiyl $GS^{\bullet}$ avec une constante de vitesse de $2{,}2 \times 10^7\ M^{-1}.s^{-1}$ (***Packer, 1993***). Nous avons donc étudié l'effet du Trolox C sur la formation de l'adduit glutathion-cyanidine. Nous avons utilisé la (+)-catéchine 100 µM comme substrat dans le milieu réactionnel préparé en tampon acétate d'ammonium 20 mM, pH 6,3 contenant 1 mM de GSH, avec ou sans Trolox C 100 µM. Comme le montre le chromatogramme de la **figure 115a**, 5 pics sont observés en présence de Trolox C, qui correspondent respectivement à la

(+)-catéchine résiduelle (8,7 min), au tautomère de l'adduit glutathion-cyanidine (10,2 min; probablement cétone en C_3, **figure 113**), à l'adduit glutathion-cyanidine initialement formé (11,2 min; probablement adduit 1, **figure 112**), à la cyanidine (18 min) et au Trolox C (19,9 min). Un chromatogramme identique est obtenu en l'absence de Trolox C (**figure 115b**, en rouge), ce qui indique que le Trolox C n'a aucun effet sur la formation de l'adduit glutathion-cyanidine.

Un résultat négatif n'est jamais totalement concluant et nous ne savons pas si le Trolox C est capable de "réparer" le radical libre centré sur un carbone de polyphénol à pH 6,3 puisqu'il est surtout décrit comme un piégeur de radicaux peroxyles $ROO^{\bullet}$.

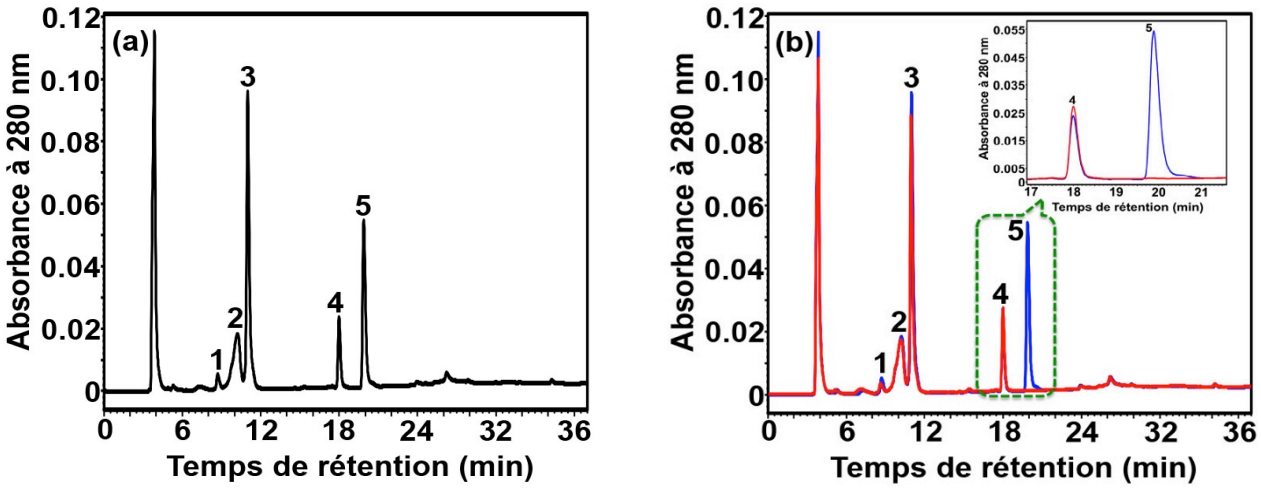


Figure 115. Analyse chromatographique de l'effet du Trolox C sur la transformation enzymatique de la (+)-catéchine.

Chromatogrammes HPLC sur colonne Atlantis C18. (a) Produits obtenus lors de la transformation enzymatique de la (+)-catéchine en présence de Trolox C; (b) En l'absence de Trolox C, toutes conditions égales par ailleurs.

De plus, ***Forni et coll. (1983)*** ont montré que l'oxydation de l'ascorbate AH^- en radical déshydroascorbyl $AH^{\bullet}$ pouvait être réalisée par le radical $GS^{\bullet}$ et qu'il s'agissait d'une réaction très rapide et irréversible (**figure 114**). A partir de toutes ces observations, nous pouvons dire que le radical thiyl n'est certainement pas produit hors du site actif de l'enzyme, mais en toute rigueur, il n'est pas possible d'affirmer qu'il n'est pas produit au site actif de l'enzyme, puisque nous ne savons pas si l'ascorbate et le Trolox C pourraient s'y positionner de manière efficace.

Nous pouvons donc seulement conclure que si un mécanisme radicalaire impliquant la production de $GS^{\bullet}$ était opérationnel, ce radical $GS^{\bullet}$ devrait être produit par l'enzyme.

VI.2. Addition nucléophile

Comme le montre la **figure 115**, la seconde possibilité que nous avions indiquée précédemment, et qui est à notre avis plus probable, est que l'adduit thioéther glutathion-cyanidine soit formé par addition nucléophile du thiolate GS^- sur le C_4 électrophile de la cyanidine (soit sous la forme flavylium, soit sous la forme méthylène quinone non chargée).

Dans ce mécanisme, le rôle clé de l'enzyme serait de produire les états de protonation requis des deux partenaires au site actif.

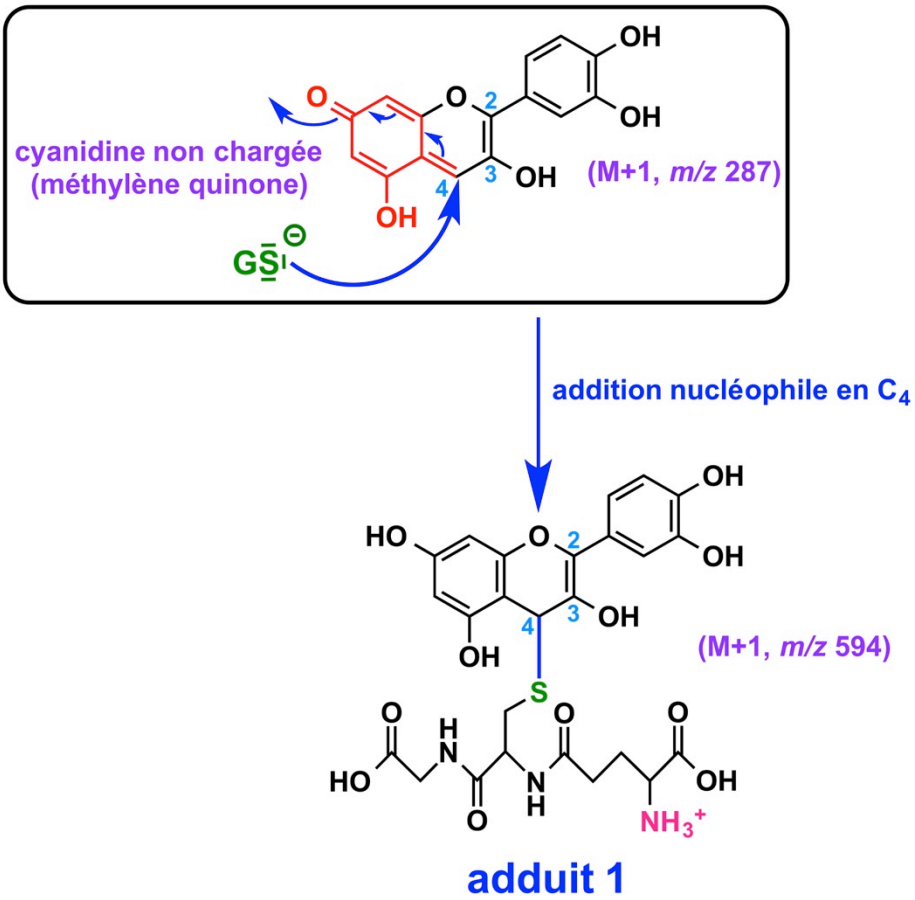


Figure 116. Formation de l'adduit glutathion-cyanidine par addition nucléophile du thiolate GS^- sur une forme électrophile de la cyanidine.

Nous avons vu en effet que cette réaction n'avait pas lieu en l'absence d'enzyme dans notre milieu réactionnel tamponné à pH 6,3. Un contrôle enzymatique des pKas des deux partenaires supposerait donc que le GSH soit reconnu comme coenzyme par la *Vv*ANS, et il nous a donc semblé nécessaire de vérifier que d'autres mercaptans RSH ne pouvaient pas se substituer au GSH pour former eux-aussi un adduit de type thioéther.

A défaut, l'hypothèse du GSH reconnu comme coenzyme et ligand spécifique par la *Vv*ANS devrait être écartée. Pour cela, nous avons étudié l'effet de trois autres mercaptans sur la réaction enzymatique, la cystéine, la cystéamine et le thiomalate, respectivement neutre, cationique et anionique à pH 6,3 (**figure 116**).

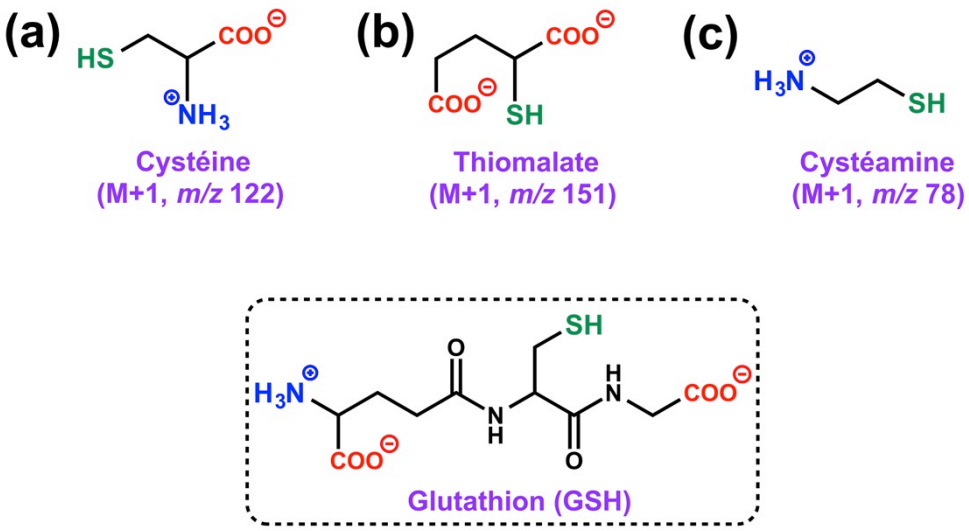


Figure 117. Structure des trois mercaptans utilisés à la place du glutathion GSH.

VI.2.1. Effet de la cystéine sur la transformation enzymatique de la (+)-catéchine

L'intérêt d'un test de la cystéine est qu'elle fournit le mercaptan témoin le plus simple que l'on puisse imaginer pour une comparaison avec le GSH, puisqu'il s'agit du résidu central du tripeptide. Si un adduit covalent cystéine-cyanidine de même nature que l'adduit glutathion-cyanidine que nous avons observé pouvait se former en présence d'enzyme, la structure neutre aurait une masse moléculaire de 407 Da (M+1, *m/z* 408).

L'effet de la cystéine sur la transformation enzymatique de la (+)-catéchine a été d'abord testé en utilisant l'holoenzyme en présence de sel de Fe(II). Comme le montre la **figure 118a**, cinq pics sont observés. Le pic 1 (8,7 min) est la (+)-catéchine résiduelle (pic 1', 8,6 min, **figure 118b**), et les quatre autres pics sont de nouveaux produits qui sont inconnus.

De plus, la concentration de (+)-catéchine résiduelle est plus élevée qu'en l'absence de cystéine, et l'adduit ascorbate-cyanidine n'est plus observé.

Les quatre nouveaux produits ont été collectés puis analysés par MS et MS/MS.

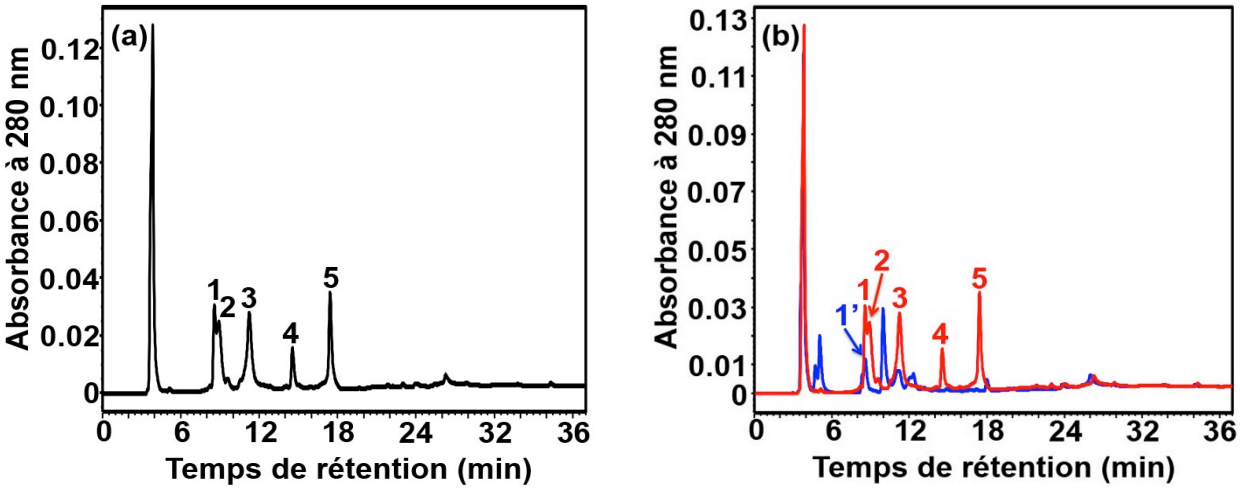


Figure 118. Analyse chromatographique de l'effet de la cystéine sur la transformation enzymatique de la (+)-catéchine en présence de sel de Fe(II).

Chromatogrammes HPLC sur colonne Atlantis C18. Le milieu réactionnel contient 10^{-6} M de *Vv*ANS (holoenzyme), 10 µM de sel de Fe(II) et une concentration initiale de 100 µM de (+)-catéchine, dans le tampon acétate d'ammonium 20 mM, pH 6,5 et 35°C. (a) En présence de cystéine 1 mM; (b) En l'absence de cystéine, en bleu.

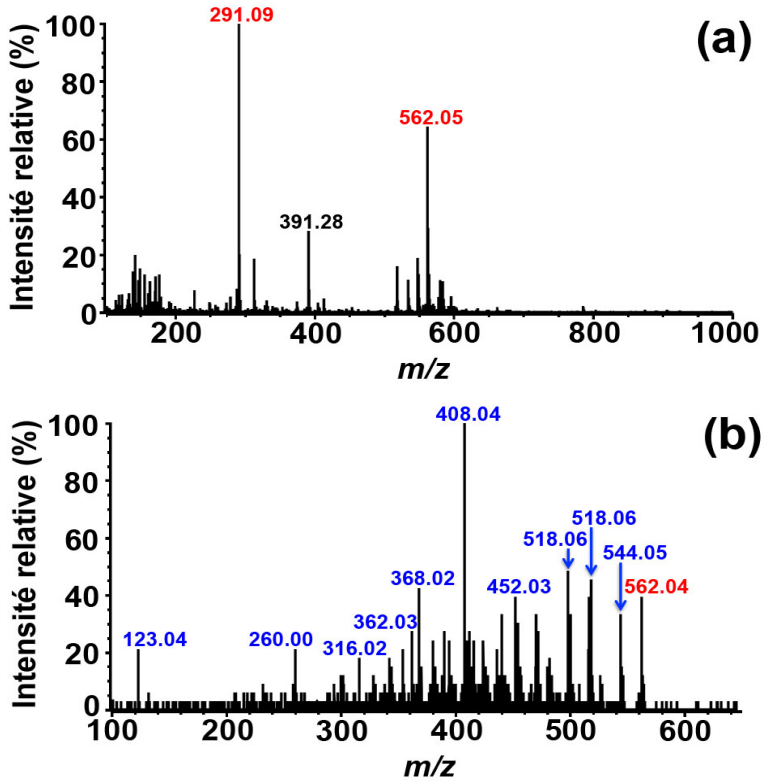


Figure 119. Analyse MS et MS/MS du produit induit par la présence de cystéine et dont le temps de rétention est proche de celui de la (+)-catéchine.

(a) Analyse MS du mélange de (+)-catéchine résiduelle et de produit élué à 8,9 min; (b) Analyse MS/MS de l'ion de *m/z* 562 correspondant à l'ion $[M+H]^+$ de ce produit.

Le produit élué à 8,9 min (pic 2, **figure 118**) étant très proche de la (+)-catéchine résiduelle, les deux composés ont été collectés ensemble. L'analyse MS de l'échantillon collecté montre deux grands pics de *m/z* 291 et 562 (**figure 119a**). L'ion de *m/z* 291 est l'ion $[M+H]^+$ de la (+)-catéchine, et l'ion de *m/z* 562 est l'ion $[M+H]^+$ du produit élué à 8,9 min. La fragmentation MS/MS de cet ion $[M+H]^+$ de *m/z* 562 produit plusieurs ions fragments (**figure 119b**), mais nous n'avons pas pu interpréter ces données.

Comme le montre la **figure 120**, l'analyse MS du produit élué à 11,2 min (pic 3, **figure 118**) montre un seul grand pic de *m/z* 374 (**figure 120a**), qui est l'ion $[M+H]^+$ correspondant. La fragmentation MS/MS de cet ion de *m/z* 374 produit plusieurs ions fragments (**figure 120b**) qui n'ont pas pu être interprétés.

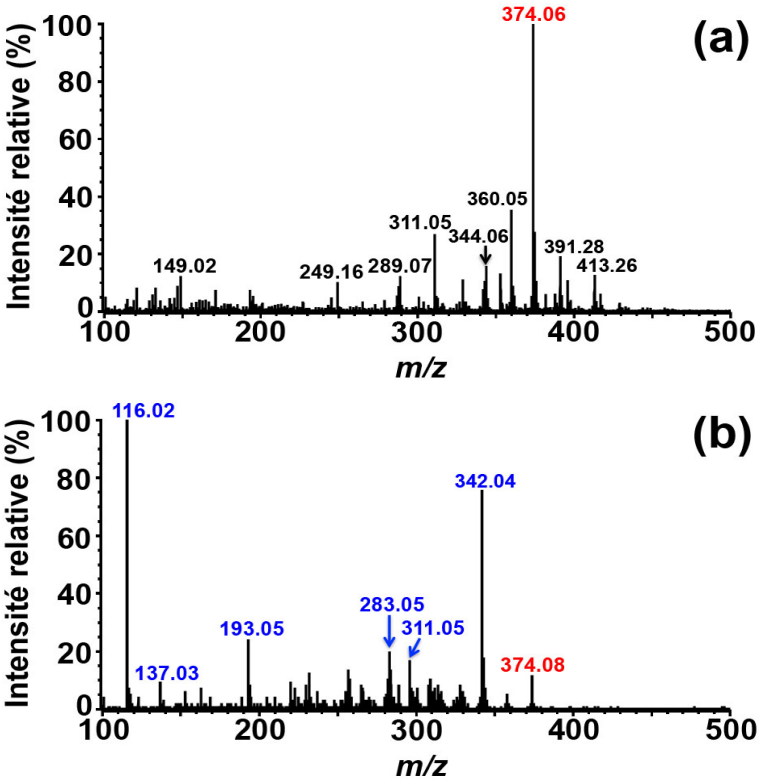


Figure 120. Analyse MS et MS/MS du produit induit par la présence de cystéine et dont le temps de rétention est de l'ordre de 11,2 min.

(a) Analyse MS; (b) Analyse MS/MS de l'ion de *m/z* 374.

Comme le montre la **figure 121**, l'analyse MS du produit élué à 14,6 min (pic 4, **figure 118**) montre deux ions majeurs de *m/z* 344 et 388 (**figure 121a**) dont l'assignation est incertaine. Comme le montre l'analyse MS/MS de la **figure 121b**, l'ion de *m/z* 344 ne donne qu'un ion fragment de *m/z* 234 dont l'intensité est assez forte. L'ion de *m/z* 388 donne quant à lui trois ions fragments majeurs de *m/z* 149, 342 et 370, et un ion fragment mineur de *m/z* 234 dont l'intensité de signal est la plus

faible (**figure 121c**). Ces résultats suggèrent que les ions de *m/z* 344 et 388 correspondent à deux produits différents qui ne sont pas séparés sur la colonne Atlantis C18 (pic 4, **figure 118**).

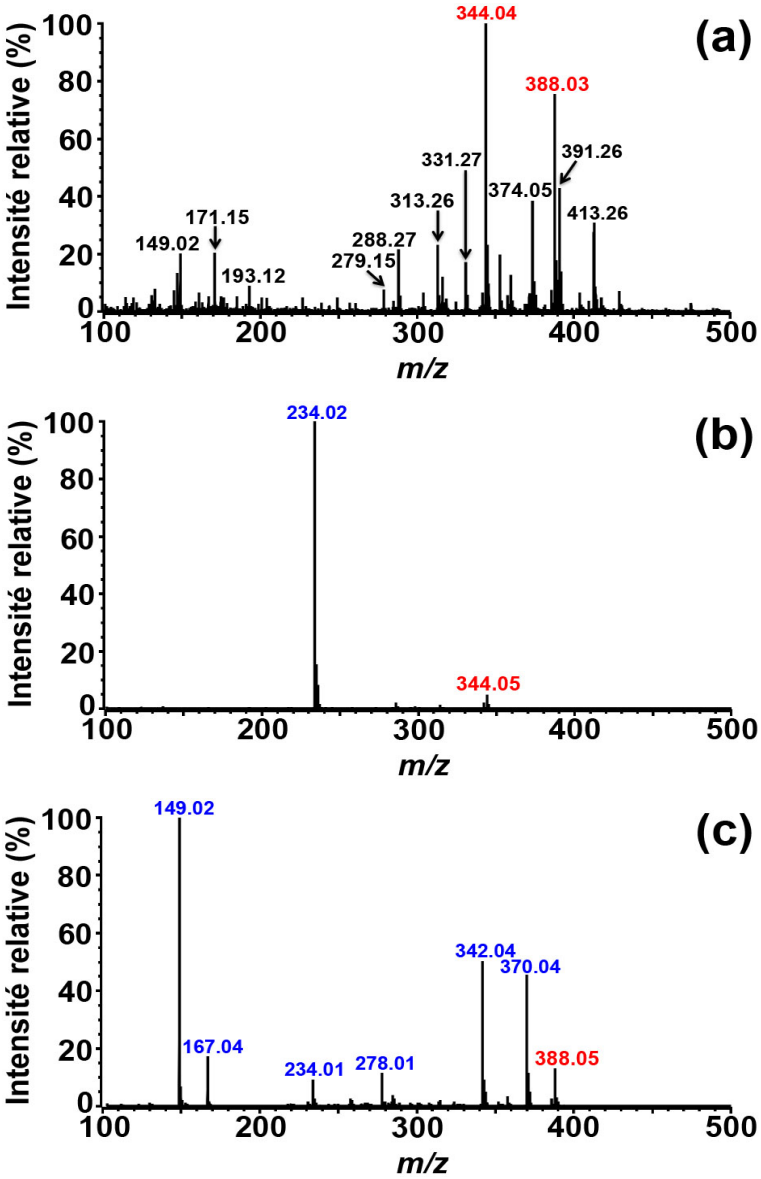


Figure 121. Analyse MS et MS/MS du produit induit par la présence de cystéine et dont le temps de rétention est de l'ordre de 14,6 min.

(a) Analyse MS; (b) Analyse MS/MS de l'ion de *m/z* 344; (c) Analyse MS/MS de l'ion de *m/z* 388.

Comme le montre la **figure 122**, l'analyse MS du produit élué à 17,4 min (pic 5, **figure 118**) montre un grand pic de *m/z* 388 qui doit être l'ion $[M+H]^+$ correspondant (**figure 122a**). La fragmentation MS/MS de cet ion produit plusieurs ions fragments (**figure 122b**).

Notons qu'un ion de *m/z* 388 a été déjà observé lors de l'analyse MS du produit élué à 14,6 min (**figure 121a**). Cependant, nous pensons que ces deux ions de *m/z* 388 proviennent de deux produits

différents ayant la même masse moléculaire, parce que, comme le montre dans les **figures 121c** et **122b**, tous les autres ions fragments majeurs de ces deux ions de *m/z* 388 sont différents, à l'exception des ions fragments de *m/z* 149 et 342.

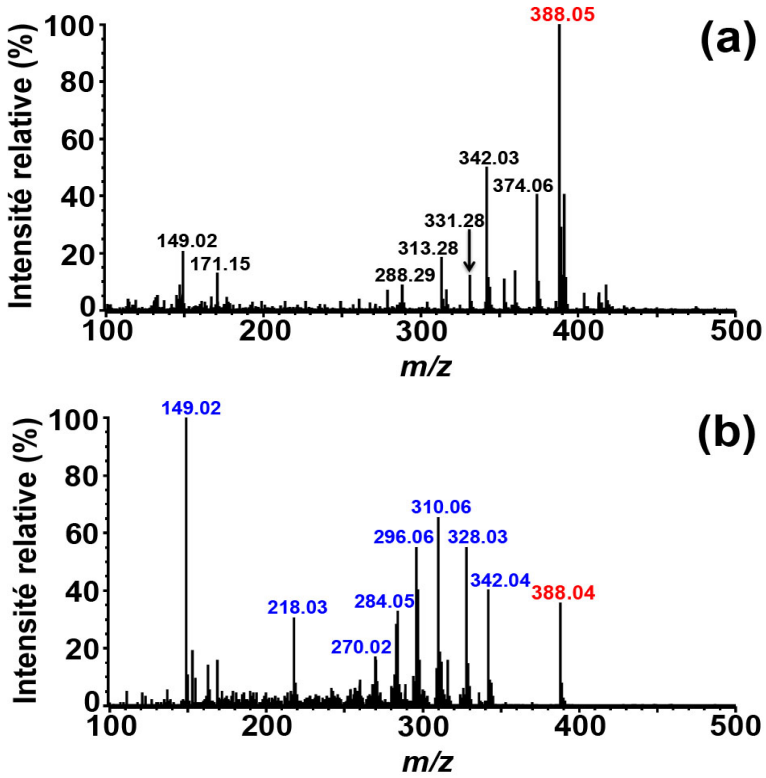


Figure 122. Analyse MS et MS/MS du produit induit par la présence de cystéine et dont le temps de rétention est de l'ordre de 17,4 min.

(a) Analyse MS; (b) Analyse MS/MS de l'ion de *m/z* 388.

Ces résultats indiquent que la cystéine modifie complètement le mode de transformation enzymatique de la (+)-catéchine, car aucun des produits obtenus lors de la réaction réalisée en l'absence de cystéine (**figure 118b**, en bleu) n'est plus observé. Il est par ailleurs certain qu'aucun adduit thioéther n'est observé, même si les quatre nouveaux produits (pics 2-5) n'ont pas pu être identifiés par MS et MS/MS.

Afin de savoir si l'effet particulier de la cystéine pourrait être dû à son interaction avec le sel de Fe(II), nous avons testé son effet sur le complexe *Vv*ANS en l'absence de sel de Fe(II).

La production du complexe de *Vv*ANS-Fe(II) (≈ 10^{-6} M) a été réalisée dans le tampon acétate d'ammonium 20 mM, pH 6,3, comme pour le complexe préparé en présence de GSH, mais cette fois-ci en présence de 0,2 mM de cystéine (Matériels et Méthodes, IV.1.2). La réaction est déclenchée par l'addition de 125 µl de solution mère de (+)-catéchine (2 mM dans le méthanol) puis

l'analyse de spectrométrie de masse en flux continu est réalisée à 24°C en suivant exactement la même procédure que lors de l'analyse des effets du GSH.

Comme le montre la **figure 123**, la diminution de la (+)-catéchine (M+1, *m/z* 291) est observée pendant 50 min, ainsi que la formation correspondante des deux produits ayant respectivement une masse moléculaire de 343 Da (M+1, *m/z* 344) et 387 Da (M+1, *m/z* 388). Le produit élué à 11,2 min (pic 3, **figure 118**) ayant une masse moléculaire de 373 Da (M+1, *m/z* 374) est observé immédiatement, et aucun changement d'intensité du signal correspondant n'est plus observé pendant les 50 min suivantes, ce qui suggère qu'il s'agit d'un produit trop précoce pour être visualisé en HPLC, mais très stable.

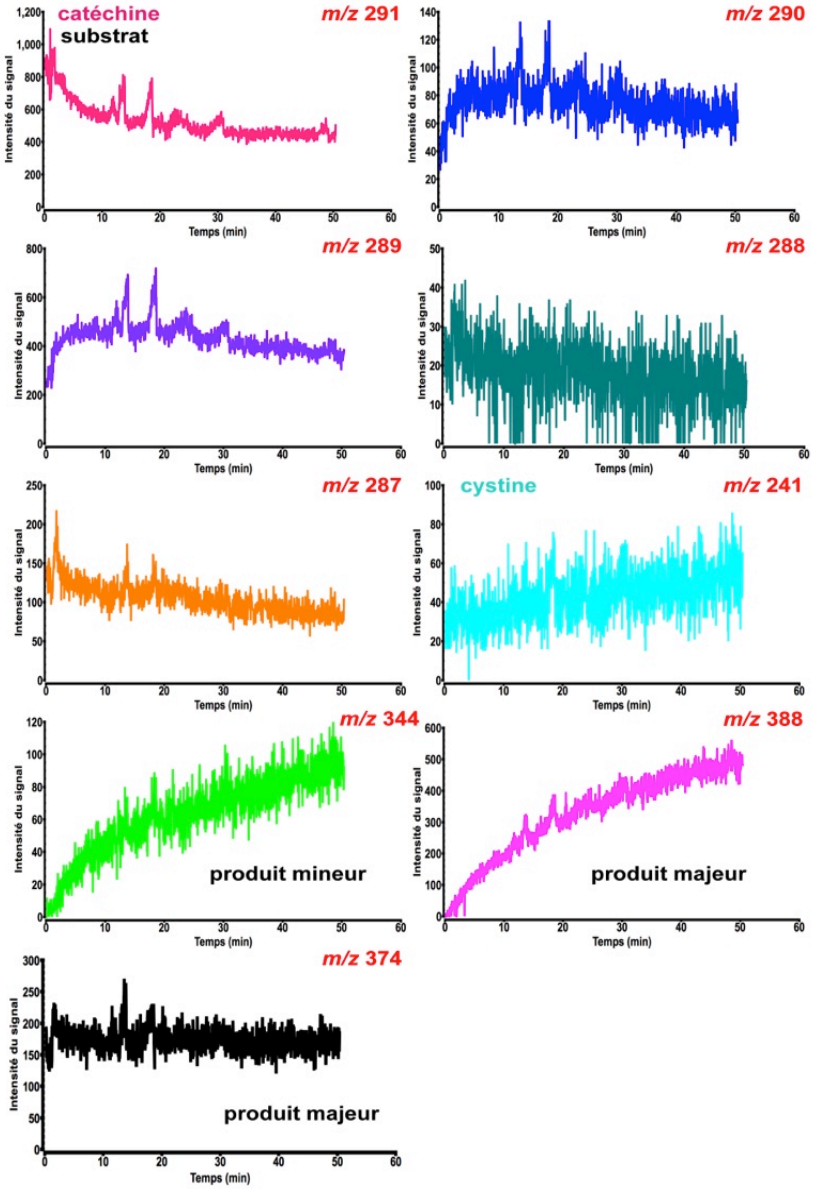


Figure 123. Monitorage par spectrométrie de masse en temps réel de la transformation de la (+)-catéchine par le complexe *Vv*ANS-Fe(II) en présence de cystéine.

Le produit élué à 8,9 min (pic 2, **figure 118**) ayant une masse moléculaire de 561 Da (M+1, *m/z* 562) a quant à lui disparu en l'absence de sels de Fe(II). Comparé à la réaction analysée en l'absence de mercaptan **(figure 109**), les intermédiaire d'oxydation à un électron (M+1, *m/z* 290), deux électrons (M+1, *m/z* 289), trois électrons (M+1, *m/z* 288) et quatre électrons (M+1, *m/z* 287) issus de la (+)-catéchine sont retrouvés, mais il semble que l'intermédiaire d'oxydation à deux électrons soit beaucoup plus stable en présence de cystéine, et que les intermédiaires d'oxydation à trois et à quatre électrons soient au contraire moins stables en présence de cystéine. Ces deux derniers intermédiaires diminuent en effet au lieu d'augmenter comme en l'absence de cystéine. Enfin, une oxydation de cystéine en cystine (M+1, *m/z* 241) a été observée.

Pour confirmer la disparition du produit normalement élué à 8,9 min (pic 2, **figure 118**) que nous avons découverte par spectrométrie de masse en temps réel, la transformation de la (+)-catéchine par le complexe *Vv*ANS-Fe(II) a été refaite en présence de cystéine 0,2 mM, de manière à vérifier ce qu'il en est en HPLC.

Comme le montre la **figure 124**, nous pouvons confirmer que le produit élué à 8,9 min a bien disparu en l'absence de Fe(II), et que les trois autres produits sont bien observés. Il n'y a donc bien aucune production de thioéther en présence de cystéine.

On notera par ailleurs que cette expérience de contrôle nous confirme au passage que le monitorage par spectrométrie de masse en temps réel est fiable.

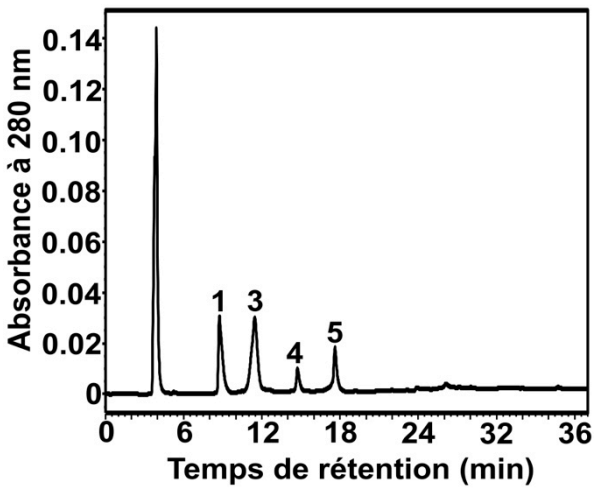


Figure 124. Analyse chromatographique de l'effet de la cystéine sur la transformation de la (+)-catéchine par le complexe *Vv*ANS-Fe(II).

Chromatogramme HPLC sur colonne Atlantis C18. Le milieu réactionnel contient 10^{-6} M de complexe *Vv*ANS-Fe(II), 0,2 mM de cystéine et une concentration initiale de 100 µM de (+)-catéchine, dans le tampon acétate d'ammonium 20 mM, pH 6,5 et 35°C.

VI.2.2. Effet du thiomalate sur la transformation enzymatique de la (+)-catéchine

D'un point de vue physico-chimique, ce qui nous intéresse ici est que la structure porteuse du groupement thiol possède deux charges proximales négatives aux pH physiologiques (carboxylates), contrairement au GSH, ce qui se traduira entre autres par un pKa de transition thiol/thiolate plus élevé (moindre stabilité du thiolate).

Si un adduit covalent thiomalate-cyanidine de même nature que l'adduit glutathion-cyanidine que nous avons observé pouvait se former en présence d'enzyme, la molécule neutre aurait une masse moléculaire de 436 Da (M+1, *m/z* 437).

L'effet du thiomalate (ou mercaptosuccinate) sur la transformation de la (+)-catéchine a été d'abord testé en utilisant l'holoenzyme en présence de sel de Fe(II). Le mélange réactionnel (1,9 ml) est le même que pour les tests réalisés avec le GSH ou la cystéine, à l'exception du mercaptan introduit dans le milieu qui est le thiomalate 1 mM.

Comme le montre la **figure 125a**, cinq pics sont observés. On retrouve deux des pics observés en l'absence de thiomalate (**figure 125b**), le pic 1 (8,5 min) qui correspond à la (+)-catéchine résiduelle (pic 1', 8,6 min, **figure 125b**), et le pic 4 (17,9 min) qui correspond à la cyanidine (pic 4', 18 min, **figure 125b**), alors que les autres pics sont nouveaux.

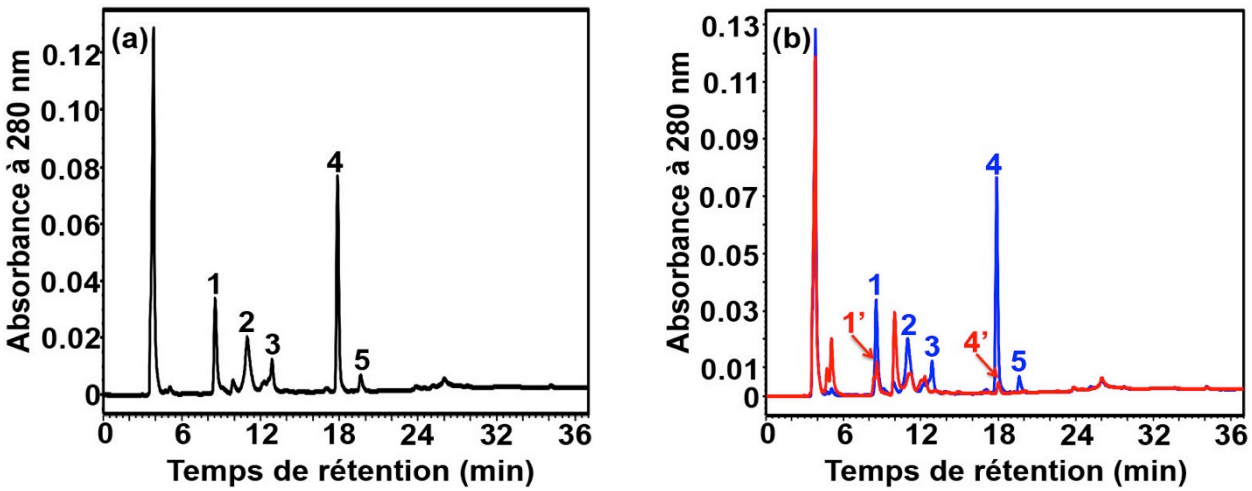


Figure 125. Analyse chromatographique de l'effet du thiomalate sur la transformation de la (+)-catéchine par la *Vv*ANS en présence de sel de Fe(II).

Chromatogrammes HPLC sur colonne Atlantis C18. Le milieu réactionnel contient 10^{-6} M de complexe *Vv*ANS-Fe(II), 10 µM de sel de Fe(II) et une concentration initiale de 100 µM de (+)-catéchine, dans le tampon acétate d'ammonium 20 mM, pH 6,5 et 35°C. (a) En présence de thiomalate 1 mM; (b) En l'absence de thiomalate, en rouge.

On peut également noter que la concentration de (+)-catéchine résiduelle est plus élevée qu'en l'absence de thiomalate, ce qui indique que la présence de thiomalate altère l'activité enzymatique,

et que seules des traces d'adduit covalent ascorbate-cyanidine (les premiers deux petits pics bleus à 5 min, **figure 125b**) sont observées. En revanche, une augmentation importante de la concentration de cyanidine est observée en présence de thiomalate, c'est-à-dire que le rendement de production de cyanidine est nettement plus élevé.

L'analyse MS du produit élué à 11 min (pic 2, **figure 125**) montre deux grands pics de *m/z* 289 et 575 (**figure 126a**). La fragmentation MS/MS de l'ion de *m/z* 575 produit plusieurs ions fragments majeurs (**figure 126b**), qui sont les mêmes que ceux que nous avions observés avec l'ion $[M+H]^+$ du dimère de (+)-catéchine oxydée (**figure 52b**), mais ces deux dimères ne sont pas les mêmes car leurs temps de rétention HPLC sont différents. L'ion de *m/z* 289 produit quant à lui quatre ions fragments majeurs de *m/z* 111, 123, 135 et 139 (**figure 126c**) dont trois (*m/z* 123, 135 et 139) sont les mêmes que ceux qui sont dérivés de l'ion $[M+H]^+$ de (+)-catéchine (**figure 126d**).

Nous pouvons donc considérer que l'ion de *m/z* 575 est l'ion $[M+H]^+$ du dimère de (+)-catéchine oxydée déjà observé lors de la transformation enzymatique en l'absence de mercaptan. Bien que non formellement identifié, l'ion de *m/z* 289 est probablement l'ion $[M+H]^+$ du produit d'oxydation à deux électrons de la (+)-catéchine oxydée (**figure 111**) qui avait été observé lors du monitorage en temps réel de la transformation de (+)-catéchine par MS. Le pic élué à 11 min (pic 2, **figure 125**) contenait donc deux produits, la (+)-catéchine oxydée (M+1, *m/z* 289) et le dimère de (+)-catéchine oxydée (M+1, *m/z* 575), qui n'étaient pas séparés.

Comme le montre la **figure 127**, une analyse similaire a été réalisée avec le produit élué à 12,9 min (pic 3, **figure 125**), qui donne trois ions de *m/z* 289, 305 et 575 (**figure 127a**), qui reflètent un mélange de trois produits. La fragmentation MS/MS de l'ion de *m/z* 575 produit plusieurs ions fragment majeurs (**figure 127b**), qui sont les mêmes que ceux de la **figure 126b**, ce qui permet de conclure qu'il s'agit de l'ion $[M+H]^+$ d'un dimère de (+)-catéchine oxydée, qui est peut-être un isomère ou tautomère du dimère élué à 11 min. De même, l'ion de *m/z* 289 (**figure 127a**) pourrait être l'ion $[M+H]^+$ d'un isomère ou tautomère de la (+)-catéchine oxydée élué à 11 min. En revanche, l'ion de *m/z* 305 est complètement inconnu.

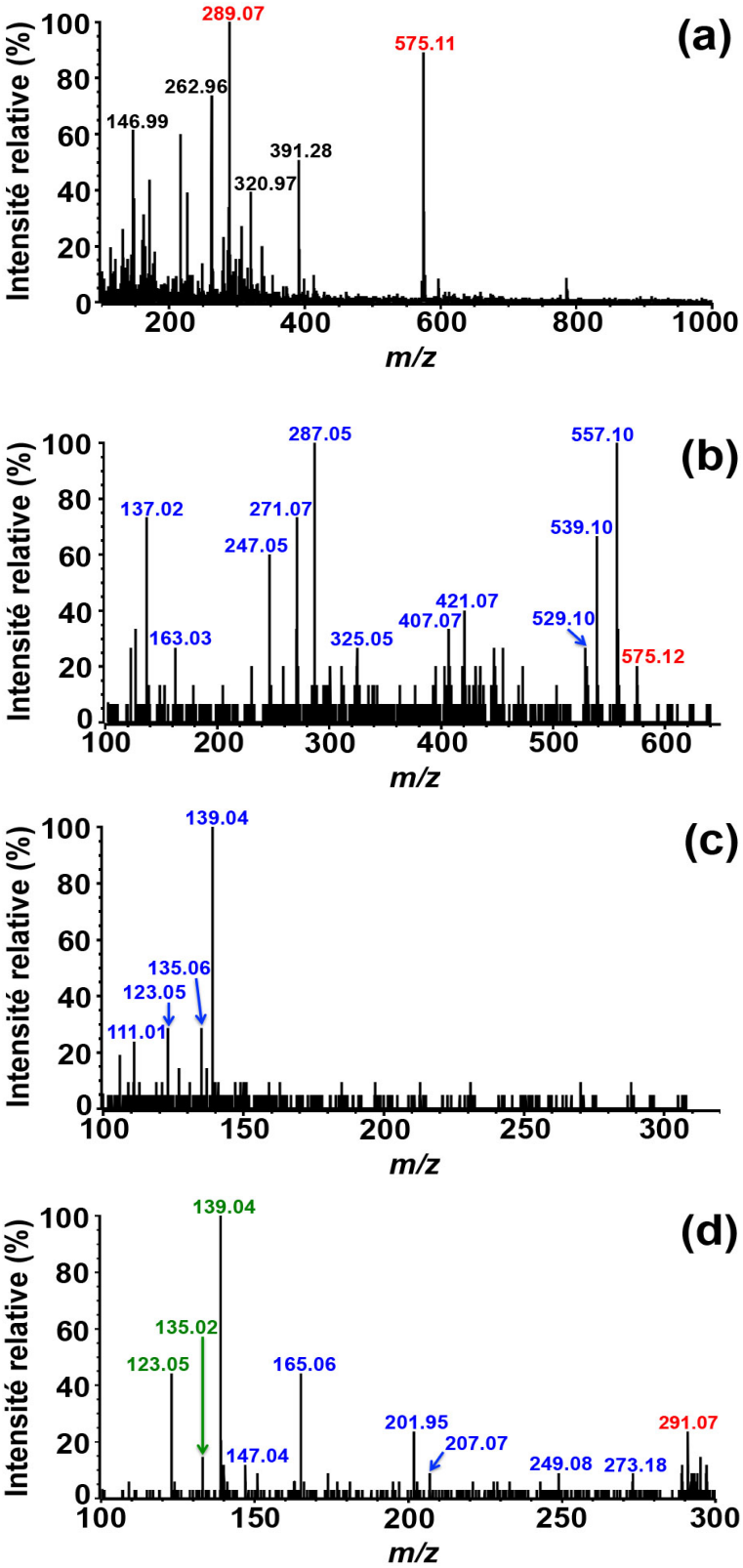


Figure 126. Analyse MS et MS/MS du produit enzymatique de la (+)-catéchine observé en présence de thiomalate et élué à 11 min.

(a) Analyse MS; (b) Analyse MS/MS de l'ion de *m/z* 575; (c) Analyse MS/MS de l'ion de *m/z* 289; (d) Analyse MS/MS de l'ion de *m/z* 291.

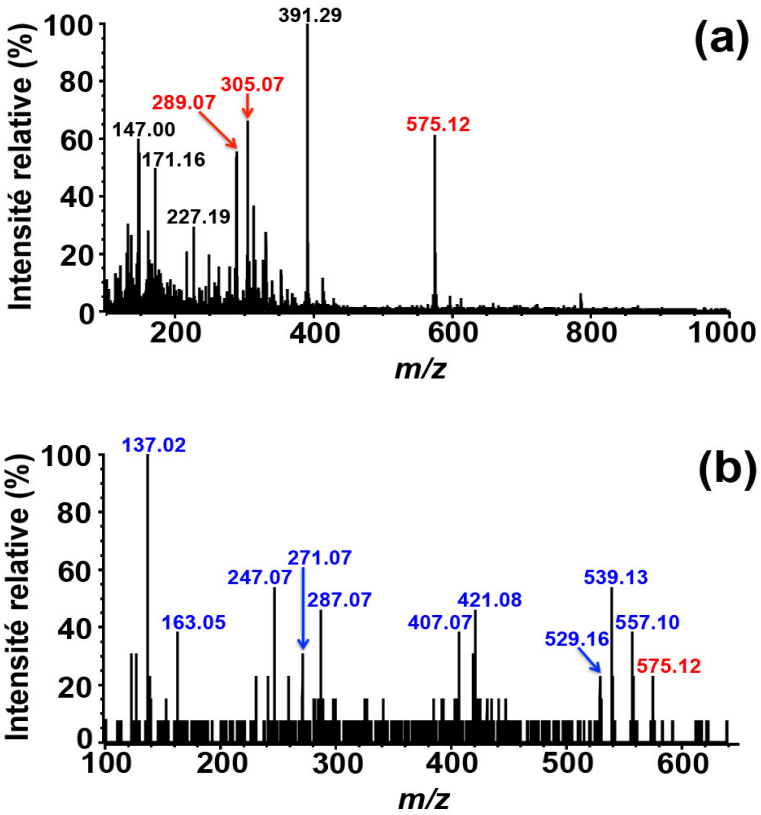


Figure 127. Analyse MS et MS/MS du produit enzymatique de la (+)-catéchine observé en présence de thiomalate et élué à 12,9 min.

(a) Analyse MS; (b) Analyse MS/MS de l'ion de *m/z* 575.

Le produit élué à 19,6 min (pic 5, **figure 125**) a le même temps de rétention que la quercétine (*m/z* 302). L'analyse MS de ce produit donne un ion de *m/z* 303 (**figure 128a**), lequel donne en MS/MS plusieurs ions fragment majeurs (**figure 128b**), qui sont identiques à ceux de l'ion $[M+H]^+$ de quercétine (**figure 40b**). Le produit élué à 19,6 min est donc bien la quercétine.

Nous pouvons conclure que le thiomalate augmente fortement la production enzymatique de cyanidine, mais que le mode de transformation de la (+)-catéchine n'est pas fondamentalement modifié, puisque les produits et intermédiaires observés sont à peu près les mêmes qu'en l'absence de thiomalate. La seule différence nette est que les deux dimères de (+)-catéchine oxydée obtenus en présence de thiomalate (pic 2 et 3, **figure 125**) sont deux isomères du dimère de (+)-catéchine oxydée obtenu en l'absence de thiomalate (le grand pic rouge à environ 10 min, **figure 125b**). Enfin, comme pour la cystéine, aucun adduit thioéther n'est formé en présence de thiomalate.

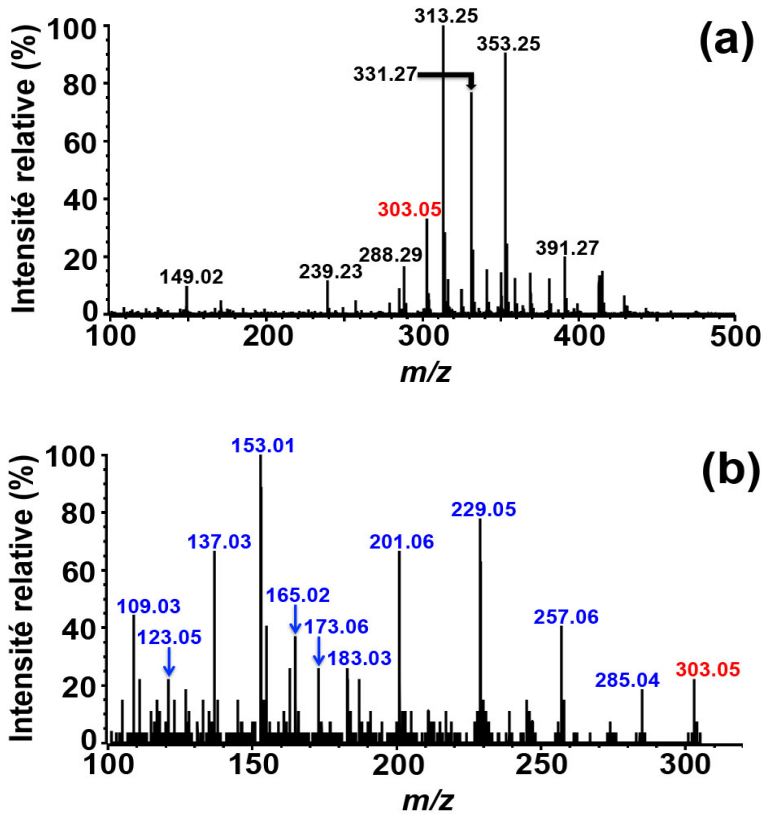


Figure 128. Analyse MS et MS/MS du produit enzymatique de la (+)-catéchine observé en présence de thiomalate et élué à 19,6 min.

(a) Analyse MS; (b) Analyse MS/MS de l'ion de *m/z* 303. Ce profil est celui de la quercétine.

Ici encore nous avons ensuite testé l'effet du thiomalate sur le complexe *Vv*ANS en l'absence de sel de Fe(II). Comme le montre la **figure 129**, une augmentation quasi-linéaire de la cyanidine (*m/z* 287) et du dimère de (+)-catéchine oxydée (M+1, *m/z* 575) est observée sur environ 50 min, ainsi qu'une diminution non linéaire de la (+)-catéchine. Si l'on compare ces résultats avec ceux de la réaction observée en l'absence de mercaptan (**figure 109**), on retrouve les intermédiaires d'oxydation à un électron (M+1, *m/z* 290), deux électrons (M+1, *m/z* 289), trois électrons (M+1, *m/z* 288) et quatre électrons (M+1, *m/z* 287) issus de la (+)-catéchine, ainsi que l'intermédiaire hydroxylé (M+1, *m/z* 307). Et il semble que les intermédiaires d'oxydation à un et à deux électrons, ainsi que l'intermédiaire hydroxylés soient plus stables en présence de thiomalate, parce que les diminutions qui suivent leur rapide augmentation sont plus lentes. Enfin, l'intensité de signal correspondante à l'intermédiaire d'oxydation à trois électrons est beaucoup plus élevée, ce qui suggère qu'il est produit en plus forte concentration en présence de thiomalate.

D'après nos résultats de MS (**figure 127a**), le produit élué à 12,9 min (pic 3, **figure 125**) serait un mélange de trois produits dont l'un a une masse moléculaire de 304 Da (M+1, *m/z* 305), qui n'est observée qu'en présence de thiomalate. Or ce produit n'est pratiquement pas observé pendant les dix

premières minutes de réaction (**figure 129**). La structure de ce produit ne peut être déduite sans ambigüité de nos résultats. Il s'agit *a priori* d'une structure obtenue par oxydation biélectronique d'un composé de *m/z* 306 (M+1, *m/z* 307) qui n'est sans doute pas l'intermédiaire hydroxylé puisque ce dernier est immédiatement produit en abondance. Il est en revanche possible qu'une oxydation ultérieure (à nouveau biélectronique) de ce produit soit responsable de la production de quercétine (M+1, *m/z* 303, très faible concentration).

Par ailleurs, les traces de quercétine observées lors de l'analyse HPLC (pic 5, **figure 125**), n'ont pas été retrouvées lors du monitorage de la réaction en temps réel, sans doute en raison d'une sensibilité insuffisante. Enfin, ici encore, aucune formation de thioéther n'est observée en présence de thiomalate.

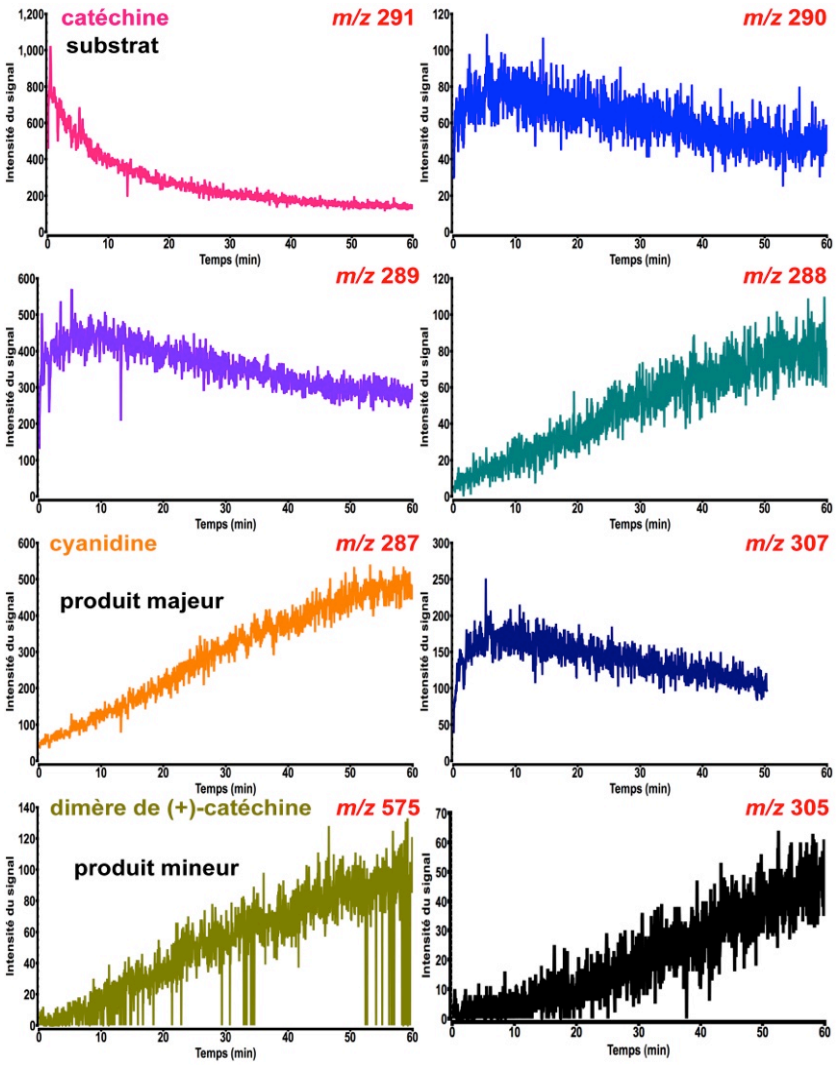


Figure 129. Monitorage par spectrométrie de masse en temps réel de la transformation de la (+)-catéchine par le complexe *Vv*ANS-Fe(II) en présence de thiomalate.

La concentration de thiomalate est de 0,2 mM.

VI.2.3. Effet de la cystéamine sur la transformation enzymatique de la (+)-catéchine

D'un point de vue physico-chimique, ce qui nous intéresse ici est que la structure porteuse du groupement thiol possède une charge proximale positive (groupement NH_3^+) aux pH physiologiques, contrairement au GSH, ce qui se traduira entre autres par un pKa de transition thiol/thiolate moins élevé (stabilisation du thiolate), contrairement à ce que nous avons vu pour le thiomalate.

Si un adduit covalent cystéamine-cyanidine de même nature que l'adduit glutathion-cyanidine que nous avons observé pouvait se former en présence d'enzyme, la structure neutre aurait une masse moléculaire de 363 Da (M+1, *m/z* 364).

L'effet de la cystéamine sur la transformation de la (+)-catéchine a été d'abord testé en utilisant l'holoenzyme en présence de sel de Fe(II). Le mélange réactionnel (1,9 ml) est le même que pour les tests réalisés avec le GSH, la cystéine ou le thiomalate, à l'exception du mercaptan introduit dans le milieu qui est la cystéamine 1 mM.

Comme le montre la **figure 130a** (en bleu), trois nouveaux pics sont observés, qui sont absents dans le milieu réactionnel non-enzymatique (**figure 130a**, en rouge). Si l'on compare ces résultats à ceux de la réaction réalisée en l'absence de cystéamine (**figure 130b**), on voit que la cystéamine a un effet majeur sur la transformation de la (+)-catéchine. De plus, après une heure de conservation à 4°C, le milieu réactionnel (100 µl) a été ré-analysé par HPLC (**figure 130c**) et nous pouvons voir que le rapport (pic 3/pic 4) s'est inversé. Le produit élué à 18,2 min (pic 3) n'est donc pas stable, et il semble qu'il puisse se transformer en produit élué à 25,8 min (pic 4), puisqu'aucun autre produit n'est observé.

Comme le montre la **figure 131a**, l'analyse MS du produit élué à 15,6 min (pic 2, **figure 130a**) montre plusieurs pics (**figure 131a**) parmi lesquels le pic de *m/z* 362 pourrait correspondre à l'ion $[M+H]^+$ du produit collecté. La fragmentation MS/MS de cet ion de *m/z* 362 produit plusieurs ions fragments de *m/z* 128, 153, 210, 302 et 344 (**figure 131b**).

Comme le montre la **figure 132**, l'analyse MS du produit élué à 18,2 min (pic 3, **figure 130a**), produit un ion de *m/z* 344 dont la fragmentation MS/MS produit plusieurs ions fragments (**figure 132b**).

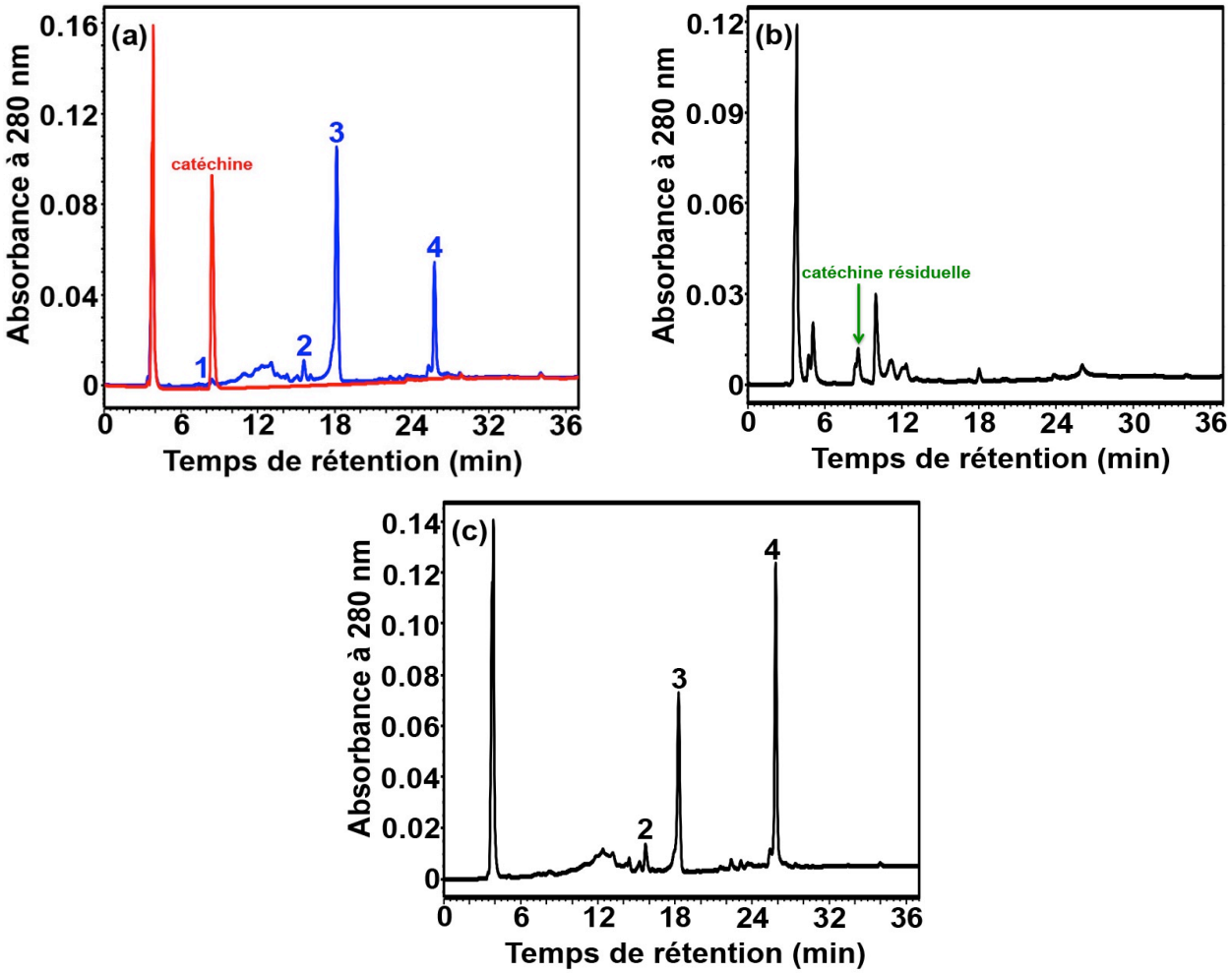


Figure 130. Analyse chromatographique de l'effet de la cystéamine sur la transformation de la (+)-catéchine par la *Vv*ANS en présence de sel de Fe(II).

Chromatogramme HPLC sur colonne Atlantis C18. Le milieu réactionnel contient 10^{-6} M de complexe *Vv*ANS-Fe(II), 10 µM de sel de Fe(II) et une concentration initiale de 100 µM de (+)-catéchine, dans le tampon acétate d'ammonium 20 mM, pH 6,5 et 35°C. (a) En présence de cystéamine 1 mM, en bleu; (b) En l'absence de cystéamine; (c) Répétition de l'analyse (tracé bleu) de la figure (a) après 1h de conservation à 4°C.

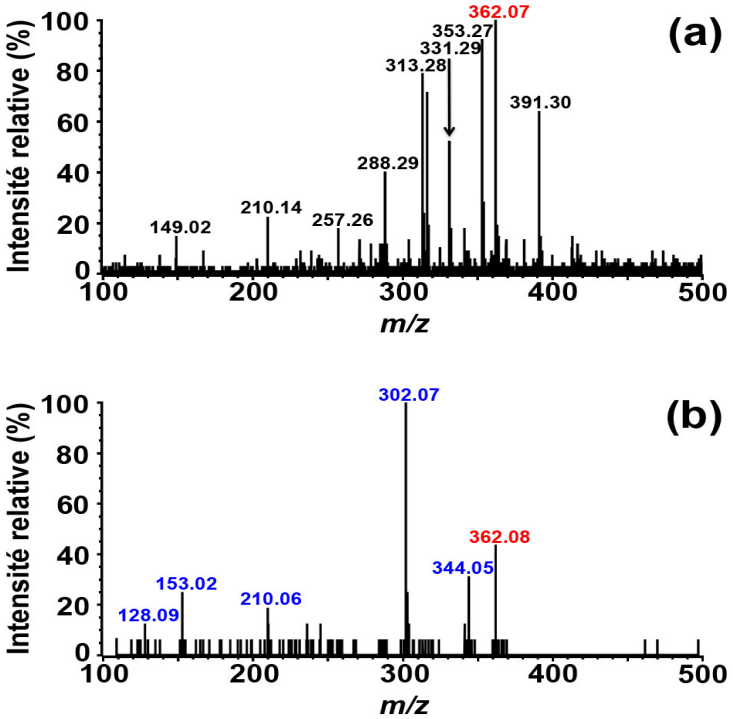


Figure 131. Analyse MS et MS/MS du produit enzymatique de la (+)-catéchine observé en présence de cystéamine et élué à 15,6 min.

(a) Analyse MS; (b) Analyse MS/MS de l'ion de *m/z* 362.

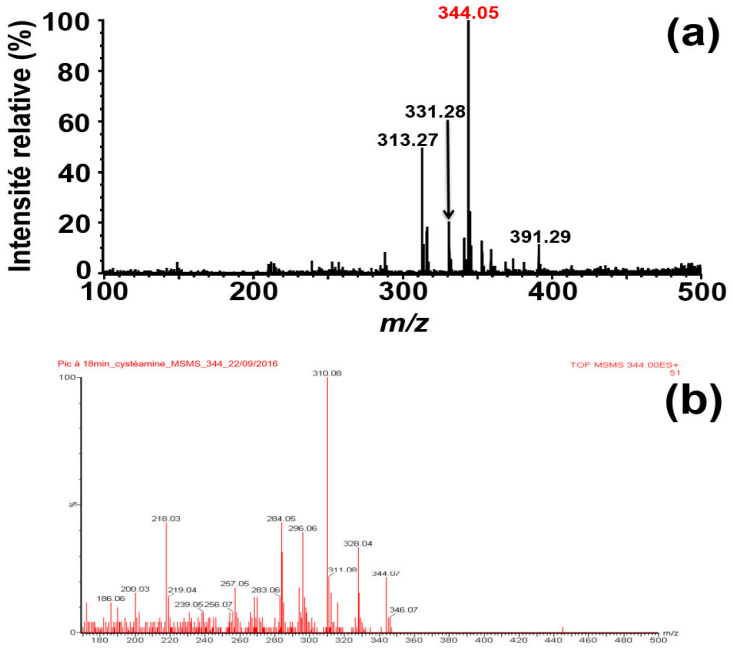


Figure 132. Analyse MS et MS/MS du produit enzymatique de la (+)-catéchine observé en présence de cystéamine et élué à 18,2 min.

(a) Analyse MS; (b) Analyse MS/MS de l'ion de *m/z* 344.
Le spectre MS/MS (b) est le document extrait le jour même par le spectromètre de masse, le fichier numérique correspondant ayant été égaré.

Comme le montre la **figure 133**, l'analyse MS du produit élué à 25,8 min (pic 4, **figure 130c**), donne plusieurs pics, mais il semble que l'ion correspondant à l'ion parent $[M+H]^+$ du produit collecté ne soit pas observé. Etant donné que la concentration de ce produit élué à 25,8 min semble nettement plus forte que celle du produit élué à 18,2 min (pic 3, **figure 130c**) qui donne quant à lui un ion parent de forte intensité, nous pensons qu'il est peu probable qu'il donne un ion parent de faible intensité. Une explication possible serait que le produit élué à 18,2 min soit un monomère ayant une masse moléculaire de 343 Da, et que le produit élué à 25,8 min soit un oligomère de ce produit dont la masse moléculaire dépasserait la gamme des *m/z* mesurés (de 100 à 1000 Da), et qui ne serait donc pas observé.

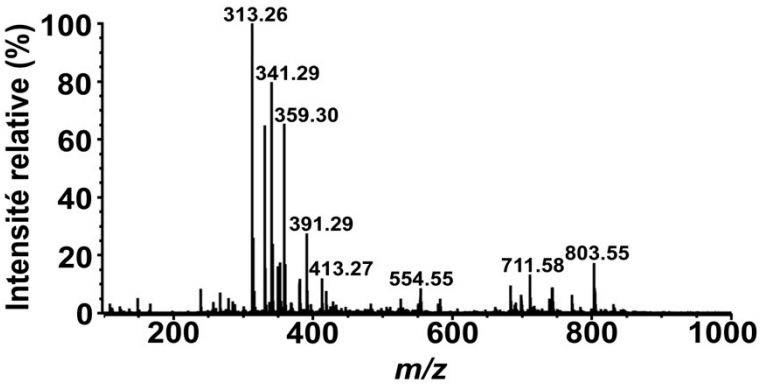


Figure 133. Analyse MS du produit enzymatique de la (+)-catéchine observé en présence de cystéamine et élué à 25,8 min.

Le spectre MS/MS n'a pas été fait.

Au final, et en dépit des incertitudes évoquées, on peut dire que le mode de transformation enzymatique de la (+)-catéchine est complètement modifié en présence de cystéamine. Comme pour la cystéine, aucun des produits observés en l'absence de cystéamine n'est plus observé. De plus, selon nos résultats HPLC, la concentration de (+)-catéchine résiduelle (pic 1, **figure 130a**) en présence de cystéamine est plus faible que celle en l'absence de cystéamine (**figure 130b**), c'est-à-dire que la consommation enzymatique du substrat est plus importante en présence de cystéamine, alors que c'était l'inverse pour la cystéine et pour le thiomalate. Enfin, aucune formation de thioéther n'est observée.

Nous pouvons conclure que les trois mercaptans testés ont des effets importants sur la transformation enzymatique de la (+)-catéchine. Comme le montre la **figure 134**, ces effets peuvent être facilement visualisés par les changements de couleur du milieu réactionnel.

En dépit de plusieurs questions restées sans réponse, ce travail permet de conclure qu'on ne peut identifier aucun adduit thioéther de type mercaptan-cyanidine qui serait produit par l'holoenzyme ou le complexe *Vv*ANS-Fe(II) en présence de chacun des trois mercaptans.

Il semble donc que pour ce qui concerne la production de cyanidine à partir de catéchine, la *Vv*ANS fonctionne de manière spécifique avec le GSH, qui est précisément le seul mercaptan physiologique présent en concentration typiquement millimolaire dans le milieu intracellulaire où elle est censée fonctionner.

Ceci suggère que le GSH pourrait être un ligand spécifique, voire un coenzyme de *Vv*ANS.

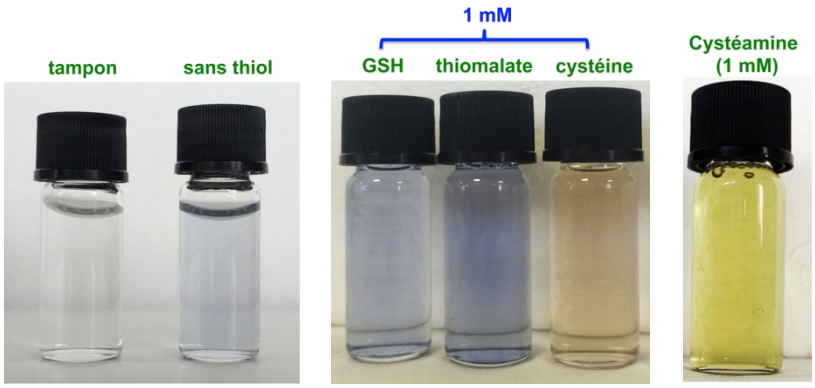


Figure 134. Couleur finale du milieu réactionnel avec ou sans mercaptan.

VII. Effet de la superoxyde dismutase (SOD) sur la transformation de la (+)-catéchine par le complexe *Vv*ANS-Fe(II)

Comme discuté plus haut (**figure 116**), nous pensons que l'adduit covalent GSH-cyanidine pourrait se former au site actif de l'enzyme par addition nucléophile du thiolate GS^- sur le carbone C_4 électrophile de la cyanidine (*a priori* sous la forme méthylène quinone non chargée, donc nettement électrophile). On notera que cette hypothèse présuppose la formation préalable de cyanidine au site actif, point sur lequel nous n'avons pas de donnée expérimentale, mais il ne s'agit pas de notre sujet ici.

Comme le montre la **figure 135**, un radical alkyl peroxyle **1** pourrait se former par addition d'oxygène sur le C_4 du produit d'oxydation à trois électrons si ce dernier est un radical centré sur le carbone C_4. Ce radical **1** peut se déprotoner facilement sur le groupement hydroxyle du cycle B (voie a) ou sur le groupement hydroxyle du cycle A (voie b) – ce qui peut être éventuellement facilité par le positionnement approprié d'une chaîne latérale basique de l'enzyme – pour former la cyanidine **1.2** et **1.4**, en extrudant simultanément l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet -}$). Par ailleurs, une addition nucléophile en C_4 peut avoir lieu sur la cyanidine (**1.2** ou **1.4**) pour former, soit le dimère

de (+)-catéchine oxydée en l'absence de GSH, soit l'adduit covalent glutathion-cyanidine en présence de GSH, par addition nucléophile de GS^- (**figure 136**).

Dans ce type de mécanisme, la réaction d'extrusion d'anion superoxyde peut être réversible (ré-addition de l'anion superoxyde sur la méthylène quinone) et elle devrait alors augmenter avec la vitesse de dégradation de l'anion superoxyde par dismutation (réaction irréversible), si bien que la superoxyde dismutase (SOD) qui catalyse cette dismutation pourrait déplacer la réaction vers la droite et favoriser la formation de cyanidine.

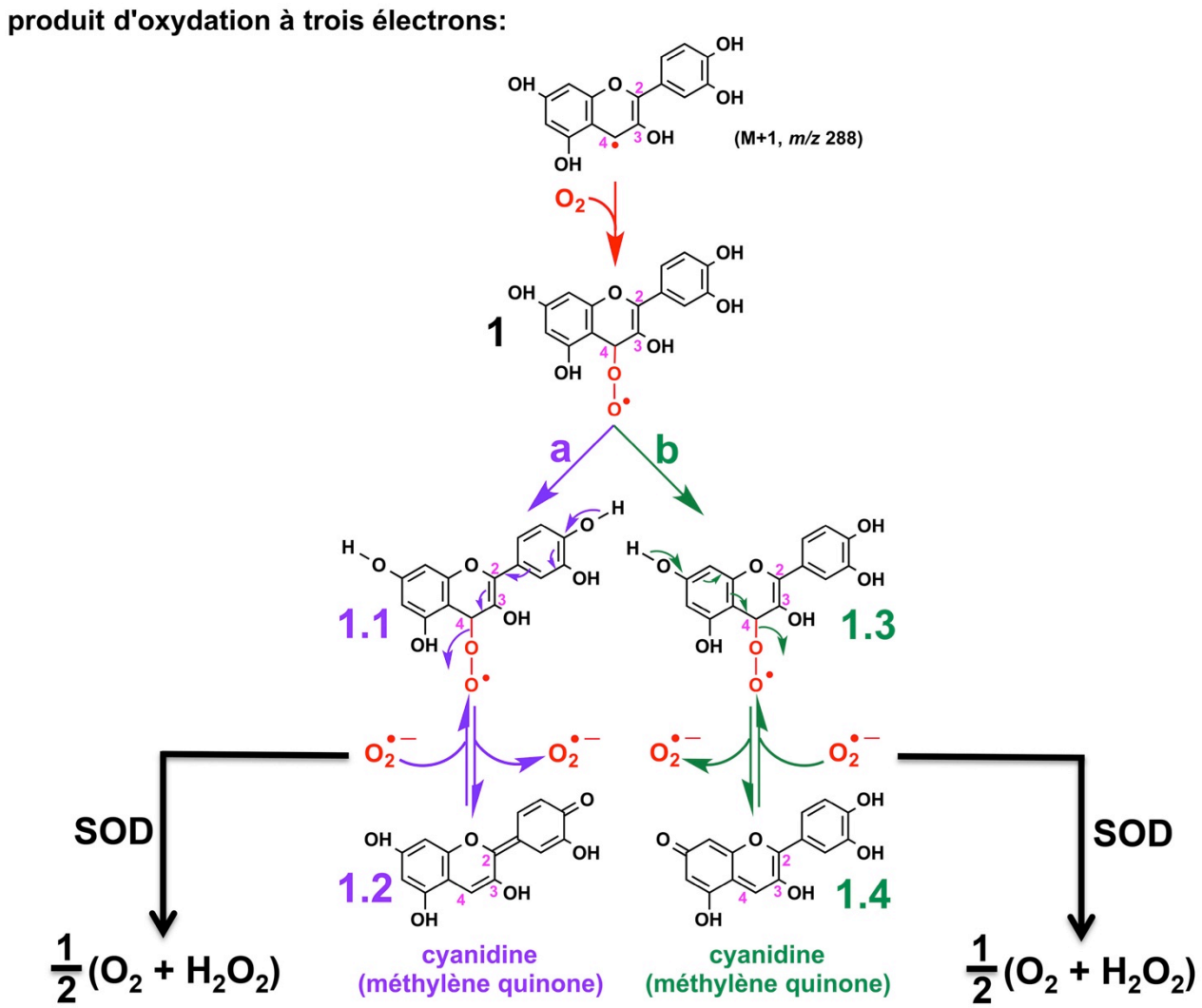


Figure 135. Mécanisme possible de formation de la cyanidine (sous la forme méthylène quinone) à partir d'un radical peroxyle en C_4.

Si l'extrusion d'anion superoxyde à partir d'un radical peroxyle en C_4 est bien impliquée dans la formation de cyanidine (**figure 135**), un effet stimulateur de la SOD n'est donc pas exclu.

Nous avons donc décidé d'étudier l'effet de la SOD sur la formation enzymatique de cyanidine à partir de catéchine, et nous avons utilisé le complexe *Vv*ANS-Fe(II), afin d'éviter les effets *a priori* indésirables du sel de Fe(II).

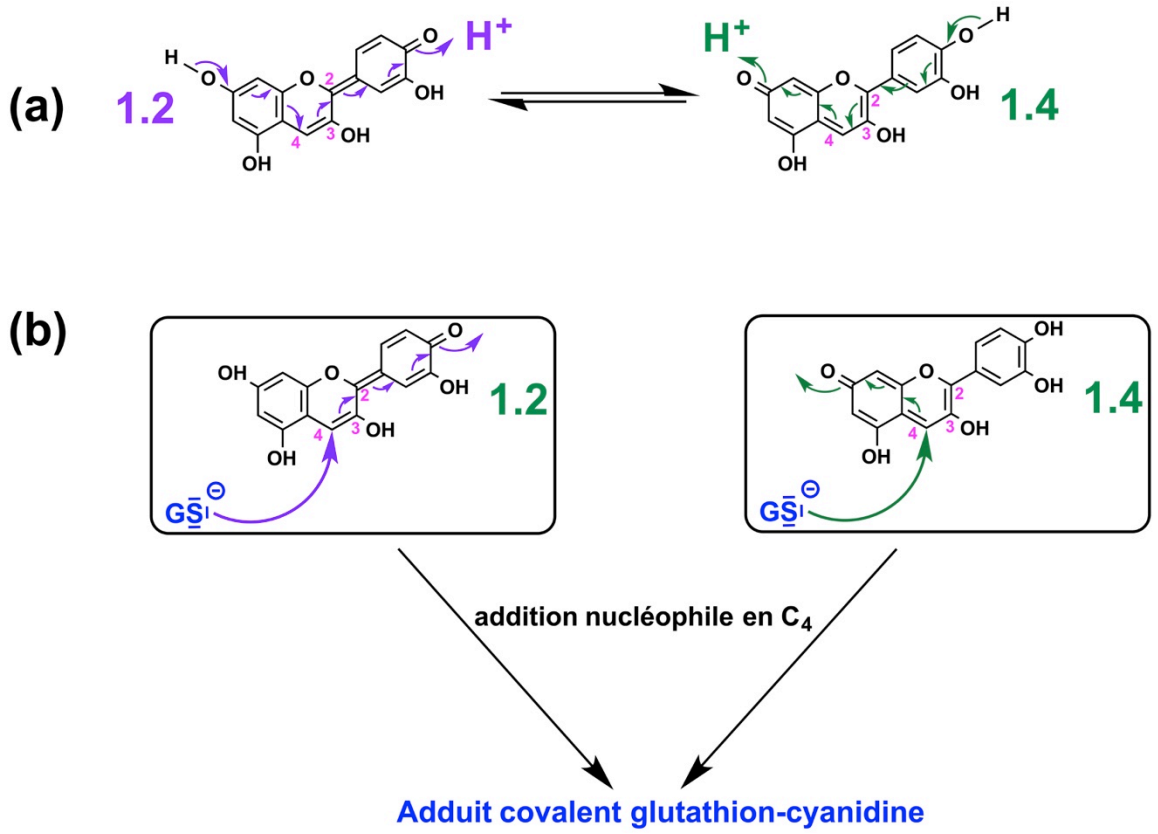


Figure 136. Tautomérisation de la cyanidine non chargée (a) et mécanisme proposé pour la formation de l'adduit covalent glutathion-cyanidine, à partir de cyanidine préformée (b).

VII.1. Test de l'activité de la SOD utilisée

La poudre de SOD a été dissoute (20 unités/µl) dans l'acétate d'ammonium 20 mM ajusté à pH 7,5, puis conservée à -20°C. Un test préalable de l'activité de notre SOD a été effectué en utilisant une méthode spectrophotométrique basée sur l'autoxydation de l'hématoxyline (HTH_2) en hématéine (HT) chromophorique absorbant à 560 nm en milieu légèrement basique (***Martin, 1990***), méthode qui présente l'avantage d'exploiter justement le type d'effet que nous avons évoqué plus haut, et de surcroît sur un substrat polyphénolique, l'hématoxyline.

L'autoxydation de l'hématoxyline est réversible et inhibée par la SOD dans la gamme de pH physiologique allant de 6,8 à 7,8.

Cette réaction d'autoxydation est en revanche accélérée par la SOD aux pH supérieur à 8,1 pour lesquels la dismutation spontanée de l'anion superoxyde (qui requiert des protons) est limitante (**figure 137**).

L'autoxydation de l'hématoxyline en l'absence de SOD est utilisée comme témoin.

Comme le montre la **figure 138**, à pH 8,3, la vitesse de formation de l'hématéine en présence de SOD est beaucoup plus élevée qu'en l'absence de SOD, la réaction d'autoxydation est donc bien accélérée par la SOD, ce qui indique que notre SOD est bien fonctionnelle.

L'activité de la SOD a ensuite été testée à 35°C dans le tampon acétate d'ammonium, 20 mM, pH 6,5, afin de vérifier si elle fonctionne bien dans nos conditions. Une concentration d'hématoxyline beaucoup plus élevée, typiquement 2 mM, doit dans ce cas être utilisée pour des raisons de sensibilité à ce pH.

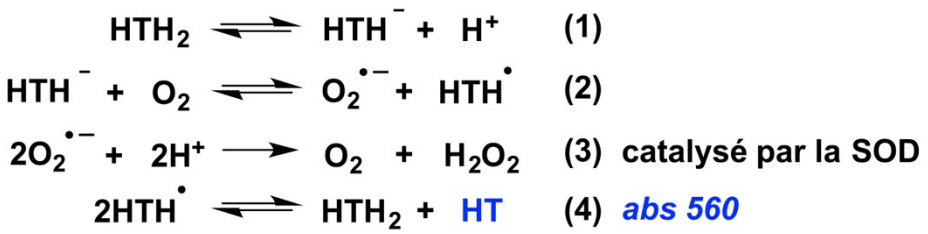


Figure 137. Autoxydation de l'hématoxyline (HTH_2) en hématéine (HT) à pH alcalin.

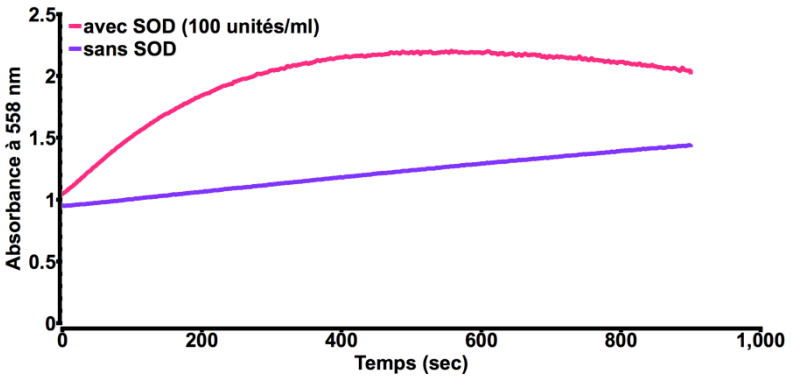


Figure 138. Cinétique de formation de l'hématéine lors de l'autoxydation d'hématoxyline à pH 8,3.

Hématoxyline 100 µM; en présence de SOD en rose, et en l'absence de SOD en violet.

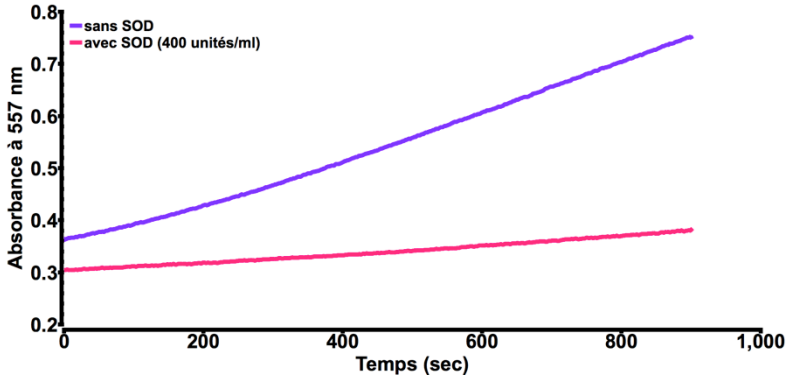


Figure 139. Cinétique de formation d'hématéine lors de l'autoxydation d'hématoxyline à pH 6,5.

Hématoxyline (2 mM) à 35°C, en présence de SOD en rose, et en l'absence de SOD en violet.

VII.2. Test de l'effet de la SOD à pH 7,8

Nos tests d'activités nous ont permis de vérifier que l'on ne pouvait espérer accélérer un processus réversible d'extrusion de superoxyde qu'à pH plutôt alcalin.

Nous avons toutefois dû renoncer à travailler à un pH supérieur à 7,8 pour éviter d'être gênés par des réactions d'oxydation artefactuelles de notre substrat polyphénolique sous ses différentes formes "phénolate".

Nous avons donc utilisé un tampon Tris 20 mM, pH 7,8, et c'est dans ce tampon que nous avons cette fois préformé le complexe *Vv*ANS-Fe(II).

La réaction est déclenchée immédiatement après addition de SOD (20 unités/µl), par addition de 125 µl de solution méthanolique de (+)-catéchine 2 mM permettant d'obtenir une concentration initiale de 100 µM dans le milieu réactionnel. La transformation de la (+)-catéchine par le complexe *Vv*ANS-Fe(II) en l'absence de SOD a d'abord été testée comme témoin.

Comme le montre la **figure 140**, le dimère de (+)-catéchine oxydée (pic 2) et la cyanidine (pic 3) sont observés comme produits majeurs à pH 7,8, et aucune différence n'est observée après addition de 150 unités/ml (en bleu) ou 200 unités (en vert) de SOD.

Les mêmes expériences ont ensuite été répétées en présence de GSH 1 mM, toutes conditions égales par ailleurs.

De même, comme le montre la **figure 141**, l'adduit glutathion-cyanidine (pic 2) et la cyanidine (pic 3) sont observés comme produits majeurs à pH 7,8 et en présence de GSH, et aucune différence n'est observée en présence de SOD. La SOD n'a donc aucun effet sur la formation de l'adduit thioéther glutathion-cyanidine et de la cyanidine.

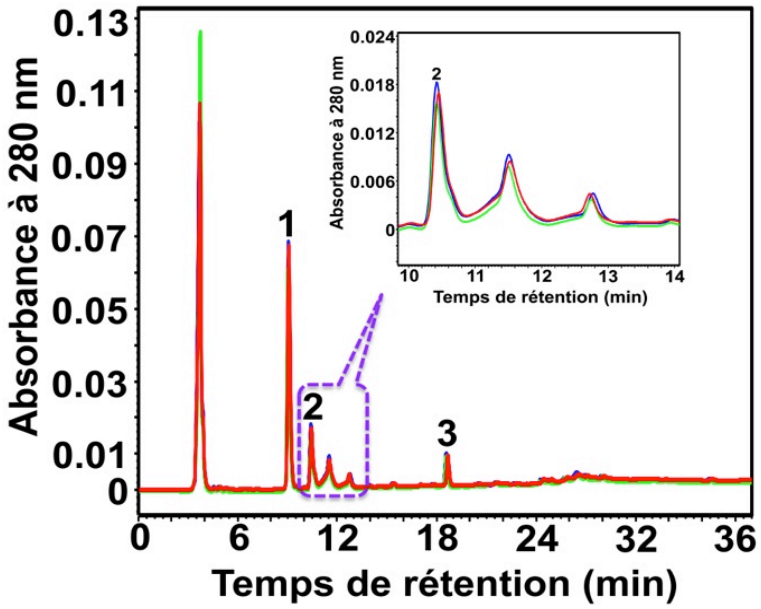


Figure 140. Analyse chromatographique de la transformation de la (+)-catéchine par le complexe *Vv*ANS, avec et sans SOD à pH 7,8 et sans GSH.

Analyse HPLC sur colonne Atlantis C18. Le milieu réactionnel contient 10^{-6} M de complexe *Vv*ANS-Fe(II) et une concentration initiale de 100 µM de (+)-catéchine, sans GSH. (a) En l'absence de SOD, en bleu; (b) En présence de 150 unités/ml (en vert) et 200 unités/ml de SOD (en rouge).

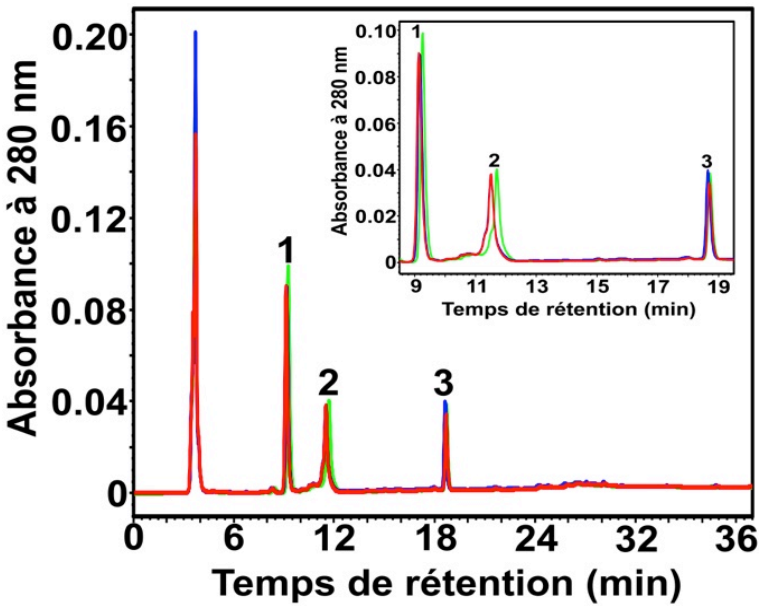


Figure 141. Analyse chromatographique de la transformation de la (+)-catéchine par le complexe *Vv*ANS, avec et sans SOD à pH 7,8 et en présence de GSH.

Analyse HPLC sur colonne Atlantis C18. Le milieu réactionnel contient une concentration initiale de 100 µM de (+)-catéchine, 10^{-6} M de complexe *Vv*ANS-Fe(II) et 1 mM de GSH. (a) En l'absence de SOD, en bleu; (b) En présence de SOD 150 unités/ml (en vert) et 200 unités/ml (en rouge).

Ceci n'exclut pas formellement un mécanisme d'addition d'oxygène O_2 sur un radical libre centré sur le carbone C_4, suivi d'une extrusion d'anion superoxyde.

D'une part, nous n'avons pas pu travailler à un pH supérieur à 8, et au pH 7,8 utilisé, la dismutation spontanée de l'ion superoxyde étant peut être encore trop rapide pour que la SOD puisse avoir un effet.

Et d'autre part, il n'est pas exclu que l'ascorbate en forte concentration puisse piéger au site actif de l'enzyme un radical peroxyle $ROO^{\bullet}$ centré sur le carbone C_4. Ceci transformerait le radical peroxyle en hydroperoxyde ROOH qui pourrait se décomposer en cyanidine par extrusion de HO_2^{-}, base conjuguée de H_2O_2. Or nous travaillons en présence de catalase, qui dans ce cas pourrait rendre irréversible l'extrusion de HO_2^{-}, comme la SOD rendrait irréversible l'extrusion de $O_2^{\bullet -}$.

Ce type de mécanisme est difficile à étudier et cette étude préliminaire devra être reprise. Dans les milieux réactionnels qui sont les nôtres et qui contiennent toujours 5% de méthanol au final, nous n'avons pas pu obtenir d'information précise sur les stœchiométries de consommation d'oxygène, mais nous avons bon espoir d'y parvenir prochainement à l'aide d'un équipement oxygraphique n'exploitant pas une électrode de Clark. Nous pensons que ces données seront indispensables pour clarifier le mécanisme de formation de la cyanidine.

VIII. Données complémentaires sur l'effet d'un pH plus alcalin sur les réactions catalysées par la *Vv*ANS

L'étude précédente nous a montré que l'activité enzymatique était assez fortement diminuée à pH 7,8 par comparaison avec les résultats observés à pH 6,5.

Nous avons souhaité vérifier ce qu'il en était pour les trois familles de substrats de la *Vv*ANS.

Pour ce faire, nous avons comparé à pH 6,5 et 7,8 la transformation enzymatique de la (+)-catéchine, de la 3,4-trans-leucocyanidine et de la (+)-DHQ en présence de sel de Fe(II).

VIII.1. Transformation de la (+)-catéchine

Comme le montre la **figure 142a**, une forte concentration de (+)-catéchine résiduelle (pic 1) est observée, et le dimère de (+)-catéchine oxydée (pic 2) ainsi que la cyanidine (pic 3) sont les produits majeurs.

Enfin, ces données montrent que la concentration de (+)-catéchine résiduelle est beaucoup plus forte à pH 7,8 qu'à pH 6,5, ce qui confirme que l'activité enzymatique est beaucoup plus faible à pH 7,8. Cependant, on peut aussi noter que l'adduit covalent ascorbate-cyanidine a disparu, et que la concentration de cyanidine a parallèlement augmenté.

Nous pensons que l'augmentation de cyanidine et la disparition de l'adduit covalent glutathion-cyanidine ont une même explication, ce que nous discuterons plus loin.

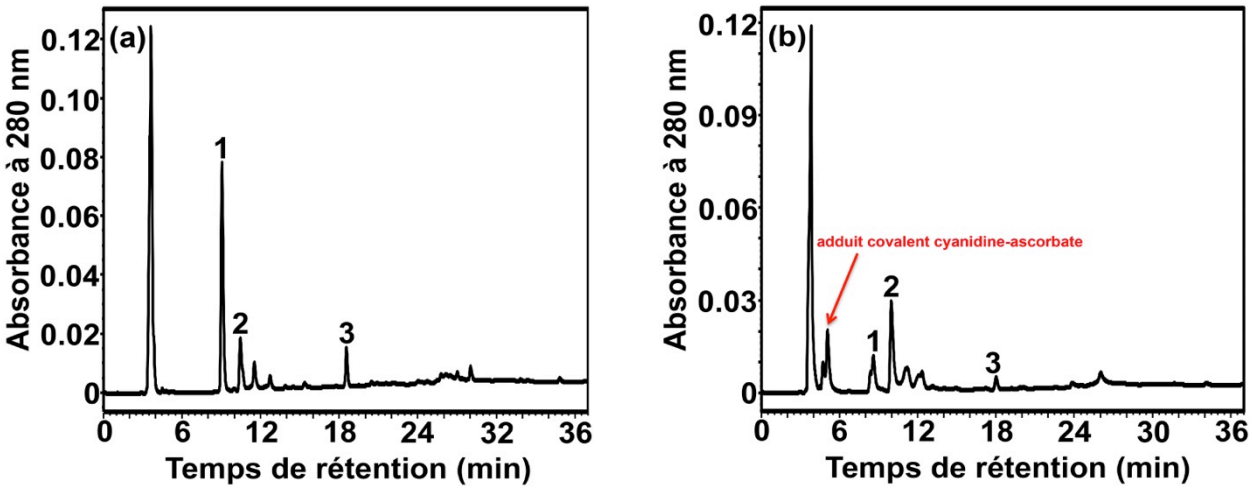


Figure 142. Comparaison chromatographique de la transformation de la (+)-catéchine par la *Vv*ANS en présence de sel de Fe(II) à pH 6,5 et à pH 7,8.

Analyse HPLC sur colonne Atlantis C18. Le milieu réactionnel contient 10^{-6} M de *Vv*ANS (holoenzyme) et 10 µM de sel de Fe(II), sans GSH. (a) Tampon Tris, pH 7,8; (b) Tampon acétate d'ammonium, pH 6,5.

VIII.2. Transformations de la 3,4-trans-leucocyanidine et de la (+)-DHQ

Comme le montre la **figure 143**, la transformation enzymatique de la 3,4-trans-leucocyanidine à pH 7,8 a elle aussi été comparée à la transformation observée à pH 6,5 dans l'acétate d'ammonium 20 mM (**figure 143b**).

A pH 7,8, on observe un nouveau pic correspondant à la (+)-3,4-trans-leucocyanidine résiduelle (pic 2, **figure 143a**), ce qui indique une plus faible activité enzymatique. On observe par ailleurs une augmentation de la concentration du flavan-3,3,4-triol (gem-diol en C_3) (pic 1), de la (+)-DHQ (pic 4) et de la cyanidine (pic 6), ainsi que la disparition du flavan-3,3,4-triol (pic 3, gem-diol en C_3, stéréoisomère du précédent).

A pH 6,5 (**figure 143b)**, la (+)-DHQ (pic 4) est en réalité un produit majeur qui n'est observé comme produit mineur que parce qu'il a été transformé en continu par la *Vv*ANS en quercétine.

A pH 7,8 (**figure 143a)**, la (+)-DHQ est en revanche observée comme produit majeur parce que la transformation simultanée de (+)-DHQ en quercétine est beaucoup plus lente (comme le montre la **figure 144**). On note par ailleurs que la (+)-DHQ et la (-)-épiDHQ sont produites en quantités apparemment égales.

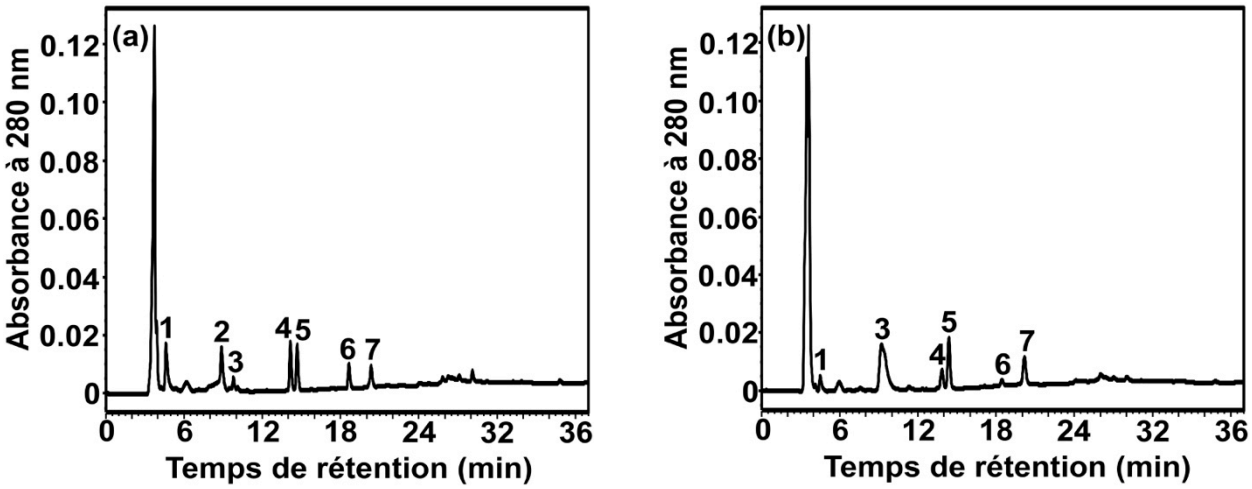


Figure 143. Comparaison chromatographique de la transformation de la 3,4-trans-leucocyanidine par la *Vv*ANS en présence de sel de Fe(II) à pH 6,5 et à pH 7,8.

Analyse HPLC sur colonne Atlantis C18. Le milieu réactionnel contient une concentration initiale de 100 µM de 3,4-trans-leucocyanidine, 10^{-6} M de *Vv*ANS (holoenzyme) et 10 µM de sel de Fe(II), sans GSH. (a) Tampon Tris, pH 7,8; (b) Tampon acétate d'ammonium, pH 6,5.

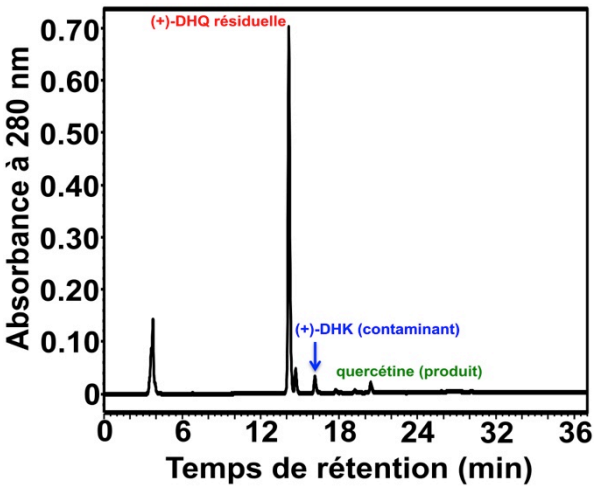


Figure 144. Comparaison chromatographique de la transformation de la (+)-DHQ par la *Vv*ANS en présence de sel de Fe(II) à pH 7,8.

Analyse HPLC sur colonne Atlantis C18. Le milieu réactionnel contient une concentration initiale de 100 µM de (+)-DHQ, 10^{-6} M de *Vv*ANS (holoenzyme) et 10 µM de sel de Fe(II), sans GSH.

Comme nous l'avons précisé précédemment (Résultats - Partie 3, II.1.4.2.2), le flavan-3,3,4-triol (gem-diol en C_3) dérivé de (+)-3,4-cis-leucocyanidine est un stéréoisomère du flavan-3,3,4-triol dérivé de (+)-3,4-trans-leucocyanidine, par conséquent l'augmentation du premier et la disparition du second à pH 7,8 (**figure 143**), suggèrent que le second est instable à pH alcalin, et serait converti par épimérisation en l'autre épimère, plus stable à pH 7,8.

IX. Rôle essentiel de l'ascorbate

Comme l'ont montré ***Wilmouth et coll.*** (***2002***), l'α-cétoglutarate est à la fois cosubstrat et ligand bidentate du Fe(II) au site actif de l'ANS d'*Arabidopsis thaliana*. L'ascorbate agit quant à lui probablement comme réducteur monoélectronique du Fe(III) facilement produit au site actif, ce qui empêcherait l'inactivation de l'ANS lors de la catalyse, comme cela est par exemple bien démontré pour la prolyl hydroxylase (***De Jong et coll., 1982; De Jong et Kemp, 1984***). Néanmoins, le rôle exact de l'ascorbate n'a pas été démontré pour l'ANS.

Comme le montre la **figure 145a**, la *Vv*ANS ne présente plus aucune activité sur la (+)-catéchine en l'absence d'ascorbate, et ceci reste le cas en présence de GSH 1 mM (**figure 145b**).

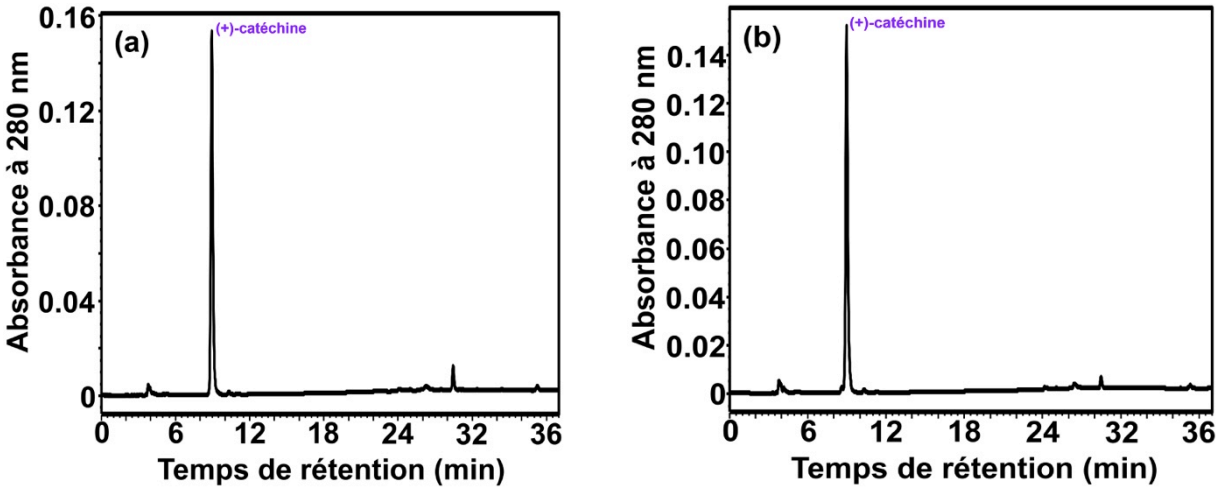


Figure 145. Illustration chromatographique du rôle essentiel de l'ascorbate dans la transformation de la (+)-catéchine par la *Vv*ANS en présence de sel de Fe(II).

Analyse HPLC sur colonne Atlantis C18. Le milieu réactionnel contient une concentration initiale de 100 µM de (+)-catéchine, 10^{-6} M de *Vv*ANS (holoenzyme) et 10 µM de sel de Fe(II) dans le tampon acétate d'ammonium, pH 6,5 et 35°C, sans ascorbate. (a) En l'absence de GSH; (b) En présence de GSH 1 mM.

L'activité de la *Vv*ANS reste nulle si l'on triple la concentration de GSH (résultats non montrés). Ce dernier ne peut donc pas se substituer à l'ascorbate.

L'ascorbate est donc un cofacteur essentiel de la *Vv*ANS en présence de sel de Fe(II).

Enfin, l'activité du complexe *Vv*ANS préformé est également nulle en l'absence d'ascorbate (données non montrées), avec ou sans GSH.

Une question qui s'imposait dans ce contexte était de savoir si l'intégration du Fe(II) au site actif de l'enzyme exigeait la présence d'ascorbate et pourrait ainsi expliquer son rôle essentiel en présence de sel de Fe(II) dans le milieu.

Nous avons donc essayé de produire le complexe *Vv*ANS-Fe(II) en l'absence d'ascorbate, ce qui s'est avéré possible en éliminant l'ascorbate des milieux et tampons utilisés.

Le test d'activité a ensuite été réalisé avec la (+)-gallocatéchine.

Comme le montre la **figure 146**, la delphinidine est bien produite, et aucune différence n'est observée par rapport à la transformation effectuée par l'holoenzyme en présence de sel de Fe(II), ce qui indique que le complexe *Vv*ANS-Fe(II) produit en l'absence d'ascorbate est fonctionnel.

Ces résultats indiquent que la production du complexe *Vv*ANS-Fe(II) n'exige pas la présence d'ascorbate, contrairement à la catalyse.

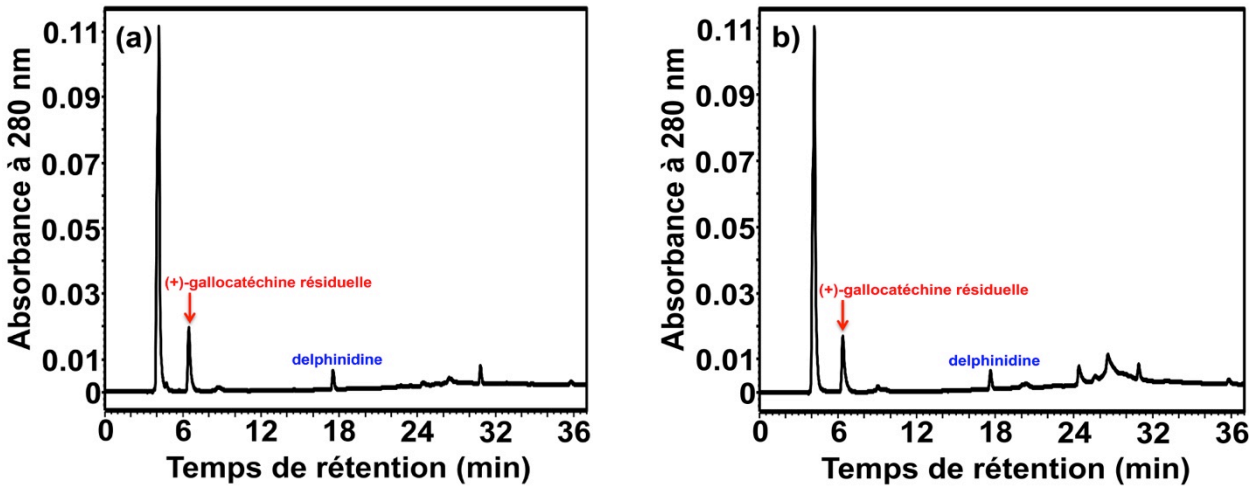


Figure 146. Vérification de l'intégrité fonctionnelle du complexe *Vv*ANS-Fe(II) préformé en l'absence d'ascorbate.

Analyse HPLC sur colonne Atlantis C18. Transformation de la (+)-gallocatéchine en présence d'ascorbate. (a) Par le complexe *Vv*ANS-Fe(II) produit en l'absence d'ascorbate; (b) Par l'holoenzyme en présence de Fe(II).

Nous pouvons donc finalement conclure que l'ascorbate est un cofacteur essentiel de la *Vv*ANS pendant la catalyse, et que le glutathion GSH ne peut, même partiellement, se substituer à lui.

Une question intéressante à laquelle nous n'apportons pas de réponse dans ce travail est de savoir si ce rôle essentiel de l'ascorbate est associé à des propriétés de ligand spécifique de la *Vv*ANS.

Nous n'avons pas non plus mesuré les quantités d'ascorbate qui sont consommées, *a priori* nettement sous-stœchiométriques, car il est difficile de mesurer avec précision une consommation d'ascorbate inférieure à 50 µM dans un milieu contenant 2 mM d'ascorbate.

- **Hypothèse sur la formation de l'adduit covalent ascorbate-cyanidine**

Comme nous l'avons discuté précédemment (Résultats - Partie 3, II.1.3.1), un adduit ascorbate-cyanidine ayant une masse moléculaire de 462 Da a été observé lors de la transformation de la (+)-catéchine par la *Vv*ANS en l'absence de mercaptan. Toutes les positions d'addition possible de l'ascorbate sur un dérivé approprié de la (+)-catéchine ont été envisagées, et après un calcul exact, seules trois structures ayant la bonne masse moléculaire ont été retenues (**figure 147**). Nous pensons cependant qu'une addition d'ascorbate sur le carbone C_2 (adduit 3) est beaucoup moins probable que sur le carbone C_4.

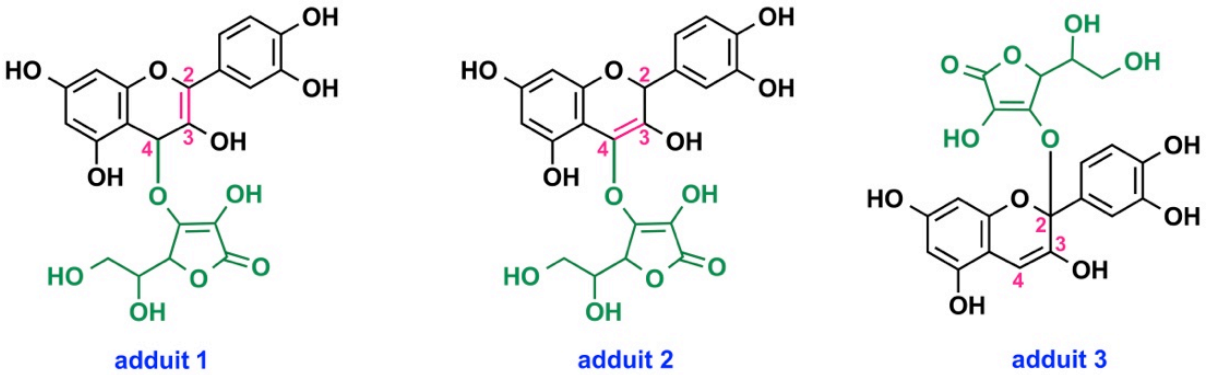


Figure 147. Trois structures possibles de l'adduit covalent ascorbate-cyanidine.

Il n'est pas non plus exclu qu'une addition C-C et non O-C se fasse grâce à l'addition nucléophile d'un équivalent carbanionique de l'énolate d'ascorbate. Nous avons vu que l'adduit covalent ascorbate-cyanidine avait disparu lors de la transformation de (+)-catéchine par la *Vv*ANS à pH 7,8, ce qui indique que la formation de cet adduit est pH dépendante. Or l'ascorbate est anionique et nucléophile à pH 6,5 comme à pH 7,8, si bien que nous faisons l'hypothèse que c'est la concentration d'une forme électrophile de cyanidine (ou d'un précurseur électrophile immédiat pouvant faire l'objet d'un déplacement nucléophile) produite au site actif qui est trop faible à pH 7,8 pour que la cinétique d'addition reste significative. Il pourrait s'agir de la forme méthylène quinone non chargée ou du cation flavylium (par opposition au chromophore phénolate-quinone qui est la base conjuguée de la première et qui n'est plus électrophile). Nous avons essayé de produire cet adduit covalent ascorbate-cyanidine dans notre milieu réactionnel en l'absence d'enzyme, mais aucun produit n'a été obtenu (données non montrées).

Cet adduit covalent est donc un produit enzymatique.

L'adduit covalent ascorbate-cyanidine est plus stable que l'adduit covalent glutathion-cyanidine à pH acide, et aucune décomposition de cet adduit en ascorbate et cyanidine n'a été observée en

HPLC. Néanmoins, beaucoup de poudre rouge a été trouvée lors de la lyophilisation de l'échantillon collecté de cet adduit (dans méthanol/H_2O plus 0,1% de TFA), poudre rouge qui est probablement la forme flavylium de cyanidine, ce qui suggère que la décomposition de l'adduit covalent ascorbate-cyanidine est tout de même possible en milieu très acide.

Sur cette base, l'adduit 1 serait le candidat le plus logique, même si l'adduit 3 ne peut être formellement exclu.

Cet adduit 1 pourrait être formé par addition nucléophile de l'ascorbate sur le carbone C_4 de la cyanidine (sous forme méthylène quinone non chargée), comme schématisé sur la **figure 148**. Et sur cette base, l'absence de l'adduit covalent cyanidine-ascorbate lors de la transformation de la (+)-catéchine par *Vv*ANS à pH 7,8 peut être expliquée.

Comme le montre la **figure 149**, la déprotonation de la cyanidine **1** peut facilement avoir lieu à pH 7,8, formant l'anion cyanidine **2**, qui n'est plus électrophile et sur lequel l'addition nucléophile de l'ascorbate est bloquée, d'où la disparition de l'adduit covalent ascorbate-cyanidine.

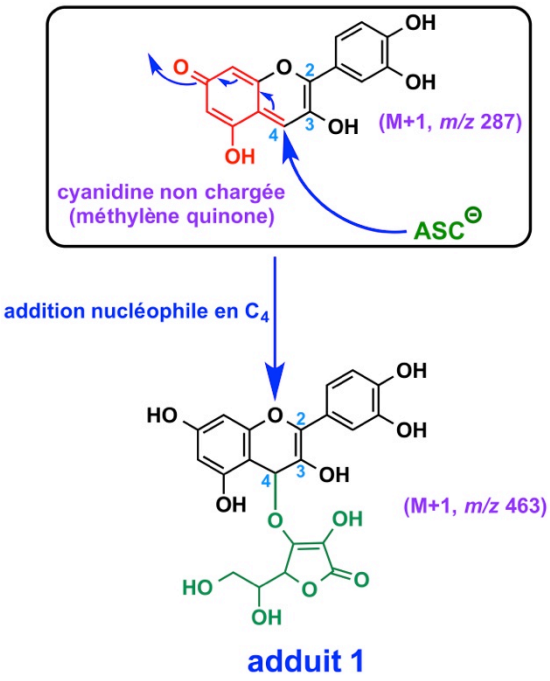


Figure 148. Hypothèse de formation de l'adduit covalent cyanidine-ascorbate par addition nucléophile.

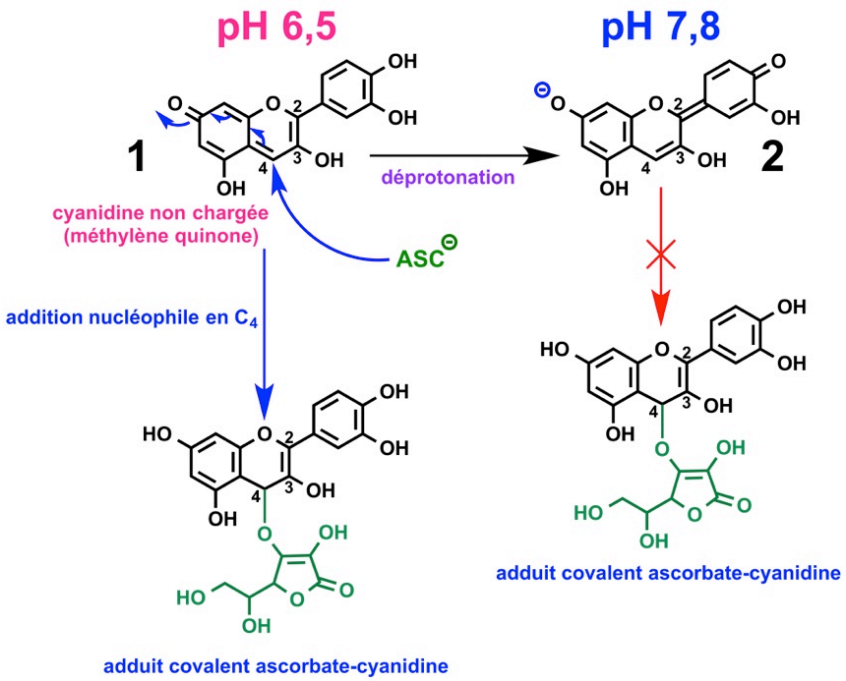


Figure 149. Effet du pH sur la formation de l'adduit covalent cyanidine-ascorbate.

Ces raisonnements n'ont pas pris en considération la possibilité de formation de l'adduit covalent par addition radicalaire, qui n'est pas formellement exclue, comme pour l'adduit covalent glutathion-cyanidine.

X. Comportement cinétique de la *Vv*ANS

Le lecteur sera peut-être étonné de constater que nous n'évoquons la cinétique de l'enzyme que dans l'ultime section de cette thèse, et relativement brièvement.

Nous n'avons en effet pas encore pu rassembler des données suffisamment précises pour être en mesure de discuter d'un mécanisme cinétique bien défini, principalement en raison de deux problèmes :

(1) Le premier problème est lié à la complexité des réactions catalysées.

Avec les substrats qui donnent plusieurs produits (c'est-à-dire tous sauf les dihydroflavonols) et dont les rendements sont généralement distincts, il est en effet exclu d'obtenir une cinétique qui soit stationnaire et susceptible d'être interprétée simplement (en termes de constante catalytique et de constantes de Michaelis ou concentrations de demi-saturation).

Nous ne savons pas pour le moment préparer notre enzyme active de telle manière que sa concentration dans le milieu réactionnel final puisse excéder 2 µM, et dans ces conditions, le seul dihydroflavonol pour lequel la vitesse enzymatique puisse être mesurée (absorbance à 370 nm) sur

moins de cinq minutes est la dihydroquercétine (DHQ), dont nous allons voir que l'on ne peut tirer que des informations assez limitées compte tenu de la concentration maximale que l'on peut dissoudre dans notre milieu réactionnel.

(2) Le second problème est l'impossibilité de mesurer de manière fiable la concentration d'oxygène dissoute dans nos milieux réactionnels à l'aide d'un oxygraphe à électrode de Clark, parce que nos procédures de dosage impliquent toujours un changement du % de méthanol au déclenchement de la réaction, du fait de la faible solubilité de nos polyphénols dans l'eau.

La réaction est en effet toujours déclenchée par addition d'un volume donné (typiquement 5% du volume final total) de solution mère d'un substrat polyphénolique (dissout dans le méthanol) dans une solution aqueuse d'enzyme contenant tous les autres ingrédients requis (tampon, ascorbate, oxoglutarate, etc.).

Ainsi, au t_0 de la réaction, nous avons un milieu réactionnel qui vient d'être ajusté à 5% de méthanol, ce qui n'induit pas seulement une augmentation de la concentration d'oxygène dissout avec une augmentation proportionnelle du signal, mais aussi un saut transitoire et majeur du signal de l'électrode, qui met plus de 6 minutes pour revenir sur une ligne de base à peu près stable, y compris en l'absence de consommation d'oxygène. Nous n'avons pu résoudre le problème en pré-équilibrant l'électrode avec une solution de tampon contenant 5% de méthanol. Nous avons utilisé deux appareillages distincts et constaté que ce problème était rédhibitoire avec une électrode de Clark.

Une mesure précise de la consommation d'oxygène en même temps que celle du substrat polyphénolique permettrait de connaître les rapports stœchiométriques le long d'une courbe de consommation et d'intégrer si possible les concentrations des deux substrats dans des équations de vitesse appropriées, travail sans lequel les mesures de cinétique sont peu utiles.

Nous espérons être en mesure de résoudre ultérieurement le problème avec un oxygraphe à détecteur de signal luminescent.

Les résultats que nous avons obtenus par spectrophotométrie d'absorbance avec la (+)-DHQ sont résumés sur la **figure 150**.

Nous avons monitoré l'apparition de quercétine à 370 nm, ce qui présente l'avantage de fournir un point initial exact (0,0) sur la courbe de vitesse, la quercétine n'étant pas un contaminant significatif de l'échantillon de (+)-DHQ.

En présence de ce substrat à pH 6,5 et pour une concentration initiale comprise entre 0 et 100 µM à pH 6,5 et 35°C, nous constatons sur les courbes de production Abs = f(t) qu'un état stationnaire est bien atteint sur plus d'une minute, mais généralement seulement après une phase de latence d'environ 30 à 50 secondes pendant laquelle le produit n'apparaît pas.

Nous pensons cependant que la vitesse mesurée pendant cet état stationnaire est bien une vitesse quasi-initiale, mais ceci ne pourra être rigoureusement démontré que lorsque nous serons capables de mesurer simultanément la concentration d'oxygène.

La première observation importante est que la vitesse est raisonnablement proportionnelle à la concentration d'enzyme totale (**figure 150 a**).

Dans ces conditions, nous avons effectué une régression non-linéaire sur la courbe de vitesse de la **figure 150b** où nous voyons qu'une hyperbole rectangulaire V = a x (S)/[b + (S)] peut être ajustée aux données (R = 0,998), mais sans possibilité d'estimer véritablement un plateau de saturation (a = 0,178 ± 0,06 Abs/min; b = 286 ± 124 µM), puisque les points sont presque alignés sur l'asymptote initiale de l'hyperbole, si c'est bien d'une hyperbole qu'il s'agit. Ceci suggère que l'enzyme ne pourrait être théoriquement saturée que pour des concentrations de (+)-DHQ très supérieures à 100 µM. Et cela pourrait d'ailleurs signifier que la (+)-DHQ n'est pas un substrat physiologique significatif de la *Vv*ANS *in vivo*.

Enfin, nous avons mesuré les vitesses initiales pour différentes concentrations d'oxygène dissout, après avoir pré-équilibré par bullage pendant 15 minutes et à 35°C la solution de substrat et le milieu réactionnel en l'absence d'enzyme, sous un pourcentage d'oxygène contrôlé grâce à un mélangeur vide-argon préalablement étalonné. La réaction est ensuite déclenchée normalement, dans une cuve spectrophotométrique extemporanément fermée par un bouchon de caoutchouc (non rigoureusement étanche). Le substrat n'est donc pas injecté à travers un septum étanche, ce qui oblige à travailler sur deux minutes au maximum pour s'affranchir des échanges avec l'air ambiant.

Comme le montre la **figure 150c**, les résultats obtenus montrent que l'enzyme n'est pas saturée par l'oxygène à PO_2 ambiante dans nos conditions. Ici, une régression non-linaire permet un ajustement sur une hyperbole rectangulaire qui reste approximative comme précédemment, et parler de K_M apparente serait probablement prématuré.

Dans ces premières expériences de cinétique, nous n'avons pas fait varier la concentration initiale du 2-oxoglutarate, qui est donc restée égale à 1 mM, de manière à éviter d'avoir à multiplier des contrôles assez lourds de la concentration de complexe *Vv*ANS-Fe(II) actif dans le milieu. Nous pouvons cependant conclure que lorsque la (+)-DHQ est utilisée comme substrat, le comportement de l'enzyme est probablement michaélien (non allostérique), bien que le choix de ce substrat ne permette de l'étudier que dans des conditions très éloignées de la saturation.

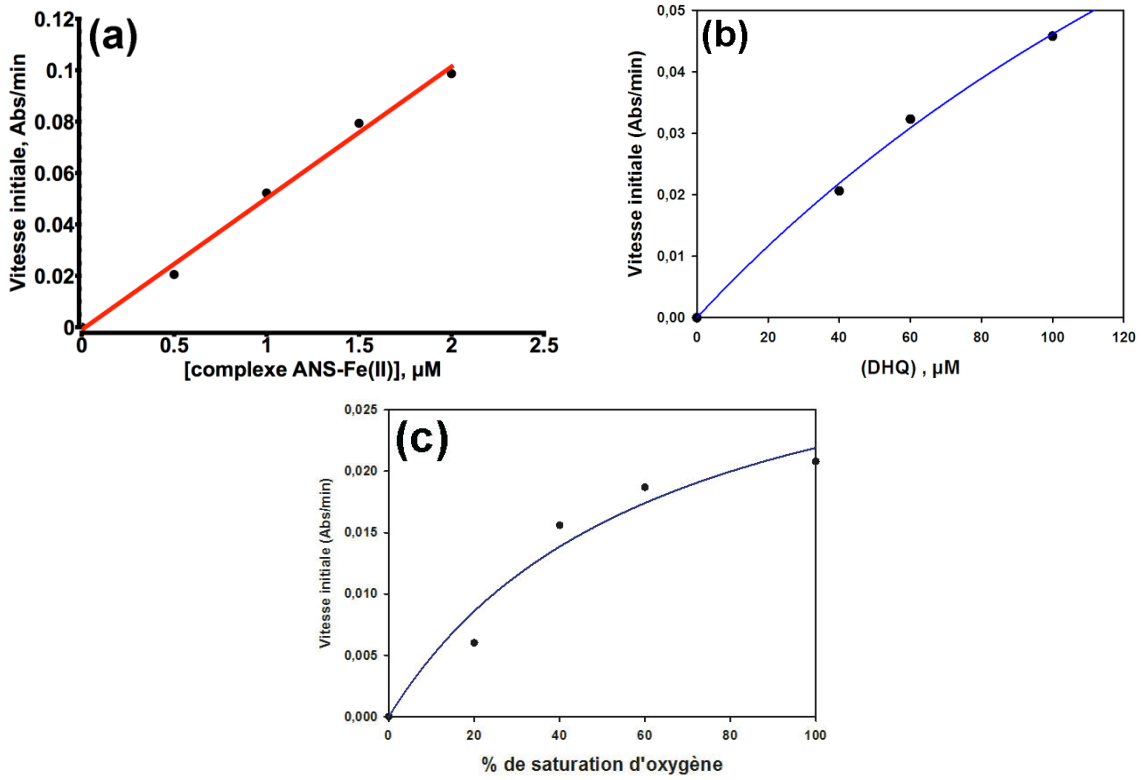


Figure 150. Cinétique de production enzymatique de la quercétine à partir de DHQ.

Le milieu réactionnel contient le complexe *Vv*ANS-Fe(II) et le substrat en présence de 1 mM d'oxoglutarate et 2 mM d'ascorbate à pH 6,5 et 35°C. La vitesse d'augmentation d'absorbance à 370 nm (apparition de la quercétine) est mesurée dès qu'un état stationnaire est atteint et se maintient au moins pendant 1 min. (a) Concentration initiale de (+)-DHQ égale à 100 µM et PO_2 ambiante pour différentes concentrations d'enzyme; (b) PO_2 ambiante et concentration d'enzyme égale à 1 µM, pour différentes concentrations de (+)-DHQ; (c) Concentration d'enzyme égale à 1 µM et concentration initiale de (+)-DHQ égale à 100 µM, pour différents pourcentages de saturation en oxygène dissout.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Lorsque nous avons entrepris cette étude, nous souhaitions confirmer les différents types de réactions catalysées par la *Vv*ANS, puis étudier son mécanisme catalytique et en particulier clarifier le rôle de l'ascorbate au cours de la catalyse.

Le premier objectif a été atteint, et un assez grand nombre d'informations nouvelles ont permis d'avancer sur les deux autres problématiques, mais il est clair que les réponses à plusieurs des questions que soulèvent nos résultats ne pourront être apportées qu'au-delà de cette thèse.

L'ANS recombinante issue d'un ADNc de raisin, de cépage *Cabernet Sauvignon* (*Vitis vinifera*) (*Vv*ANS), a été exprimée chez *E.coli*, puis purifiée.

L'enzyme ainsi produite comprend deux acides aminés supplémentaires laissés par le site de clivage de la thrombine, et l'analyse MS de la protéine intacte montre bien une masse qui correspond à la masse moléculaire théorique de la *Vv*ANS plus la masse de ces deux acides aminés.

Aucune modification de l'enzyme (autoclivage ou modification post-traductionnelle) n'a donc été observée. La *Vv*ANS est très stable dans un tampon MES (20 mM, pH 6,5) contenant 500 mM de NaCl et 10% de glycérol (v/v), aucune précipitation ni perte d'activité n'étant observées lors d'une conservation à 4°C pendant un mois, ou à -20°C pendant au moins six mois.

L'activité de la *Vv*ANS augmente avec la température au-delà de 35°C, mais nous n'avons pas dépassé cette valeur pour analyser son activité en détail, de manière à éviter tout problème de dénaturation incontrôlée pour des temps d'incubation pouvant excéder 30 min.

Pour une majorité des dioxygénases à fer et oxoglutarate, les activités sont mesurées en présence de sel de Fe(II) libre dans le milieu, faute de disposer d'un complexe enzyme-Fe(II) préformé et stable.

Nous avons observé des phénomènes de dégradation non-enzymatique pour certains de nos substrats polyphénoliques en présence de sel de Fe(II) et d'ascorbate en excès.

Ces réactions artefactuelles n'ont rien de surprenant puisque nos conditions sont réunies pour produire $O_2^{\bullet-}$ et H_2O_2, puis des espèces oxydantes plus réactives à travers les réactions de Fenton ou d'Udenfriend. Le problème a été atténué en diminuant la concentration de sel de Fe(II) à 10 µM.

Nous avons cependant réalisé qu'un contrôle raisonnablement précis de la concentration initiale d'oxygène dissout dans le milieu était dans ces conditions douteux.

Les réactions d'autoxydation du Fe(II), en dépit d'un excès d'ascorbate maintenant en principe sa concentration stationnaire, conduisent à un flux de consommation d'oxygène qui n'est certainement jamais nul et qui doit varier en fonction des conditions de pH et de pourcentage de méthanol.

C'est pourquoi nous avons mis au point une procédure de purification de l'holoenzyme chargée en Fe(II), afin d'éviter d'ajouter un sel de Fe(II) dans le milieu réactionnel.

Il s'agit d'une étape clé de ce travail.

Nous avons en effet trouvé qu'un complexe *Vv*ANS-Fe(II) stable pouvait être formé de manière reproductible par incubation de l'holoenzyme dans un milieu contenant des concentrations millimolaires d'α-cétoglutarate (ligand du Fe^{II} dans l'enzyme au repos) et d'ascorbate, le sel de Fe(II) étant présent en excès d'un facteur environ 30 par rapport à l'enzyme.

Ce complexe est catalytiquement actif à PO_2 ambiante en l'absence de sel de Fe(II), ce qui a permis l'analyse quantitative précise des réactions enzymatiques étudiées dans des conditions parfaitement reproductibles.

Nous ne sommes cependant pas encore parvenus à répondre avec précision à deux questions:

(1) Quel est le rendement de fixation du Fe(II) dans un échantillon de complexe préformé (rapport Fe/protéine), autrement dit, l'enzyme est-elle entièrement ou partiellement chargée en Fe(II) ?

(2) Existe-t-il des traces de Fe(II) résiduel dans l'échantillon de complexe *Vv*ANS-Fe(II) collecté en sortie de cartouche de gel filtration ?

La reproductibilité de nos expériences plaide en faveur d'une production quasi-quantitative de complexe *Vv*ANS-Fe(II), mais pour le prouver, il faut être capable de mesurer avec une grande précision à la fois le fer lié, le fer libre, et la concentration de protéine ANS (environ 10^{-6} M). La spectrométrie d'absorption atomique devrait être assez sensible pour mesurer les quantités de fer, mais paradoxalement, la mesure précise de la concentration de notre protéine (de l'ordre du micromolaire) dans un échantillon contenant 1 mM d'α-cétoglutarate et 2 mM d'ascorbate (forte absorption à 280 nm) nous pose un problème pour lequel nous n'avons pas encore de solution.

La (+)-2,3-trans-3,4-cis-leucocyanidine censée être substrat naturel de la *Vv*ANS mais non commerciale, a été produite chimiquement par épimérisation acide de la (+)-2,3-trans-3,4-trans-leucocyanidine, elle-même synthétisée par réduction de la DHQ en présence de $NaBH_4$, et la structure des deux stéréoisomères de leucocyanidine a été confirmée par RMN du proton. L'analyse des deux stéréoisomères a été effectuée par MS/MS, et nous avons montré que leurs voies de fragmentation MS/MS sont distinctes et peuvent être rationnalisées. L'analyse MS/MS peut être utilisée pour distinguer chacun des deux stéréoisomères lors de leur production, en complément des techniques de RMN qui ne peuvent pas être utilisées sur un échantillon biologique ou de faible concentration.

Nous avons montré que ces deux stéréoisomères pouvaient être conservés sous forme congelée dans l'eau à -20°C pendant 70 jours avec moins de 6% de perte.

Douze flavonoïdes de quatre familles distinctes (flavanones, dihydroflavonols, flavan-3-ols et flavan-3,4-diols) ont été testés comme substrats potentiels de la *Vv*ANS. Tous les produits enzymatiques ont été purifiés par HPLC en phase inverse, puis identifiés par MS/MS. Les résultats ont montré que sept des flavonoïdes testés sont acceptés comme substrats par la *Vv*ANS.

L'étude détaillée des transformations de ces sept substrats nous a permis de conclure que:

1) Seuls les dihydroflavonols de configuration 2R,3R sont acceptés comme substrats par la *Vv*ANS, et l'activité enzymatique diminue avec le nombre de groupements hydroxyles phénoliques du cycle B.
2) Seuls les flavan-3-ols ou flavan-3,4-diols de configuration 2R,3S ayant un catéchol ou trois OH phénoliques vicinaux sur le cycle B sont acceptés comme substrats.
3) La naringénine, substrat de l'ANS de *Arabidopsis thaliana*, n'est pas substrat de la *Vv*ANS, sans doute en raison de l'absence de groupement hydroxyle en C_3 sur le cycle B.

La (+)-2,3-trans-3,4-cis-leucocyanidine est le stéréoisomère naturel de leucocyanidine dont la transformation par la *Vv*ANS est généralement considérée comme la source physiologique de cyanidine *in vivo*. En réalité, nous avons constaté qu'elle était transformée par la *Vv*ANS en deux produits majeurs, la quercétine et un produit d'hydroxylation de la 3,4-cis-leucocyanidine qui est un flavan-3,3,4-triol (gem-diol en C_3) et non en cyanidine. Cette observation jette un doute sur le rôle de la 3,4-cis-leucocyanidine comme principal précurseur naturel de la cyanidine *in vivo*.

La (+)-2,3-trans-3,4-trans-leucocyanidine est aussi substrat de la *Vv*ANS, et elle est transformée en cinq produits, la (+)-DHQ, la (-)-épiDHQ, la cyanidine, la quercétine et un produit d'hydroxylation de la 3,4-trans-leucocyanidine qui est un flavan-3,3,4-triol (gem-diol en C_3, stéréoisomère du précédent) dont la dégradation non enzymatique donne la (+)-DHQ, (-)-épiDHQ, la cyanidine et la quercétine, qui est sans doute obtenue par déshydratation.

De plus, un intermédiaire flavan-3,3-gem-diol dérivé de la (+)-catéchine a aussi été observé lors du monitorage en temps réel de la transformation de la (+)-catéchine par MS, ainsi qu'un intermédiaire flav-2-en-3-ol, qui pourrait être un sous-produit de déshydratation du flavan-3,3-gem-diol.

Tous ces résultats sont compatibles avec l'idée que les deux premières étapes catalytiques de l'ANS sont une hydroxylation en C_3 produisant systématiquement un gem-diol, suivie d'une déshydratation en C_2-C_3 ou en C_3-C_4, formant une double liaison.

L'ascorbate est un agent nucléophile et réducteur qui est décrit comme un cofacteur quasi-indispensable mais en l'absence duquel une certaine activité enzymatique est tout de même observée avec l'ANS d'*Arabidopsis thaliana* (***Wilmouth et coll., 2002***). Dans nos mains, l'ascorbate s'est avéré être un cofacteur essentiel de la *Vv*ANS.

Un adduit covalent ascorbate-cyanidine a été observé *in vitro*, mais seulement en l'absence de GSH, ce qui suggère que l'ascorbate pourrait être un ligand de la *Vv*ANS, bien que ceci reste à démontrer.

Nous avons trouvé que le complexe *Vv*ANS-Fe(II) pouvait être produit dans le milieu de complexation sans ascorbate, et que le complexe *Vv*ANS-Fe(II) ainsi produit était actif (une fois introduit dans le milieu contenant l'ascorbate). Le rôle de l'ascorbate n'est donc pas associé à l'étape

de chargement du fer au site actif de l'enzyme. Il serait plutôt nécessaire pour recycler le Fe(II) "accidentellement" produit au site actif pendant la catalyse, comme cela a été démontré pour d'autres oxygénases à fer et oxoglutarate.

Le glutathion GSH est lui aussi un puissant nucléophile, réducteur et piégeur de radicaux libres, qui est abondant dans la baie de raisin. L'effet du GSH sur l'activité de la *Vv*ANS avec tous les substrats identifiés a montré que le GSH n'avait aucun effet sur la transformation des dihydroflavonols et des flavan-3,4-diols.

En revanche, il modifie le mode de transformation des flavan-3-ols, la (+)-catéchine étant transformée en deux produits majeurs en présence de GSH, la cyanidine et un adduit glutathion-cyanidine de type thioéther, alors que l'adduit covalent ascorbate-cyanidine et le dimère de la (+)-catéchine obtenus lors de la réaction réalisée en l'absence de GSH ont disparu. Le rendement de production de la cyanidine est augmenté fortement par la présence de GSH.

Un adduit thioéther similaire glutathion-delphinidine est aussi observé lors de la transformation de (+)-gallocatéchine en présence de GSH.

D'après ces résultats, nous avons pu conclure que le mode de transformation de la (+)-catéchine et de la (+)-gallocatéchine était considérablement modifié par GSH.

L'étude de stabilité de l'adduit covalent cyanidine-GSH par HPLC en phase inverse et MS/MS suggère qu'il s'agirait d'un thioéther en C_4 qui fait l'objet d'un équilibre de tautomérisation céto-énolique en C_3, et qui se décompose en cyanidine et GSH. La structure exacte de cet adduit thioéther glutathion-cyanidine présumé en C_4 ne peut cependant être affirmée sans analyse RMN, ce qui reste à faire.

Nous pensons que l'adduit thioéther glutathion-cyanidine pourrait être formé par addition directe de GS^- sur une forme électrophile de la cyanidine (méthylène quinone non chargée ou flavylium cationique) formée au site actif de l'enzyme.

Aucun adduit thioéther glutathion-cyanidine n'a été observé lors de l'incubation directe de cyanidine avec GSH en l'absence de *Vv*ANS et dans les mêmes conditions réactionnelles, ce qui n'est pas surprenant compte tenu des états de protonation attendus des deux réactants à pH 6,5.

Le monitorage en temps réel de la transformation de la (+)-catéchine par le complexe *Vv*ANS-Fe(II) a été effectué par spectrométrie de masse, et les intermédiaires d'oxydation à un électron, deux électrons, trois électrons et quatre électrons dérivés de la (+)-catéchine ont été observés, ce qui suggère qu'une série de transferts monoélectroniques est mise en œuvre.

L'hypothèse d'une addition possible de radical thiyl $GS^\bullet$ sur un radical libre centré sur le carbone C_4 du flav-2-en-3-ol supposé correspondre à l'intermédiaire d'oxydation à trois électrons n'a pu être étayée par nos données, et aucun effet du Trolox C, piégeur efficace du radical $GS^\bullet$, n'a été observé.

Ces données suggèrent que si l'adduit thioéther glutathion-cyanidine était formé par addition radicalaire, ce ne pourrait être que grâce à un radical $GS^{\bullet}$ produit par l'enzyme au site actif.
Nous avons également émis l'hypothèse d'une formation de l'adduit thioéther glutathion-cyanidine par addition nucléophile de GS^{-} sur le carbone C_4 de la cyanidine (sous forme méthylène quinone non chargée). Nous avons comparé l'effet du glutathion GSH à celui de trois mercaptans distincts, le thiomalate, la cystéine et la cystéamine. Les résultats ont montré que ces trois mercaptans avaient chacun un effet marqué sur la transformation de la (+)-catéchine, mais aucun adduit thioéther similaire n'a été observé.
L'analyse des produits formés en présence de chacun de ces trois mercaptans exigera cependant une étude plus approfondie permettant d'effectuer un tri efficace des masses significatives, d'une part en exploitant la "règle de l'azote" ou règle de parité concernant les masses des molécules contenant un ou plusieurs atomes d'azote, et d'autre part, en travaillant en mode "haute résolution".
Nos résultats suggèrent que le thioéther observé avec le GSH pourrait reposer sur une interaction spécifique de ce dernier avec la *Vv*ANS, et même si ce travail n'apporte pas la preuve d'une telle interaction spécifique entre GSH et *Vv*ANS, nous pouvons dire qu'elle est en cours de confirmation, grâce à des expériences de liaison à l'équilibre que nous avons effectuées sur Biacore (technique de résonance de plasmon de surface; données non montrées).

Nos résultats montrent que les anthocyanidines peuvent être produites *in vitro* à partir d'un substrat flavan-3-ol (catéchine ou gallocatéchine) via un intermédiaire thioéther de glutathion, alors que le stéréoisomère naturel (3,4-cis) de la leucocyanidine n'est pas transformé en cyanidine. Si ces résultats reflètent le mode d'action de l'enzyme *in vivo*, il est certain qu'il s'agit d'une découverte importante, et les travaux qu'il conviendra de réaliser dans une prochaine étape devront apporter prioritairement des informations complémentaires sur ce sujet.
Une question intéressante est de savoir si le GSH est un coenzyme de *Vv*ANS, ce qui exigera d'abord de quantifier avec précision une liaison spécifique (travail en cours), pour ensuite essayer d'obtenir par diffraction aux rayons X la structure 3D du ou des complexes *Vv*ANS/GSH cristallisés.

REFERENCES

Abrahams S., Lee E., Walker A.R, Tanner G.J, Larkin P.J. and Ashton A.R. (2003), The Arabidopsis TDS4 gene encodes leucoanthocyanidin dioxygenase (LDOX) and is essential for proanthocyanidin synthesis and vacuole development; Plant J. **35**(5):624-36.

Abu-Omar M.M., Loaiza A. and Hontzeas N. (2005), Reaction mechanisms of mononuclear non-heme iron oxygenases; Chem Rev. **105**(6):2227-52.

Achnine L., Blancaflor E.B., Rasmussen S. and Dixon R.A. (2004), Colocalization of L-phenyllalanine ammonia-lyase and cinnamate 4-hydroxylase for metabolic channeling in phenylpropanoid biosynthesis; Plant Cell **16**(11):3098-3109.

Afaq F., Saleem M., Krueger C.G., Reed J.D. and Mukhtar H. (2005), Anthocyanin- and hydrolyzable tannin-rich pomegranate fruit extract modulates MAPK and NF-KappaB pathways and inhibits skin tumorigenesis in CD-1 mice; Int. J. Cancer **113**(3):423-433.

Appelhagen I., Jahns O., Bartelniewoehner L., Sagasser M., Weisshaar B. and Stracke R. (2011), Leucoanthocyanidin dioxygenase in *Arabidopsis thaliana*: characterization of mutant alleles and regulation by MYB-BHLH-TTG1 transcription factor complexes; Gene **484**(1-2):61-8.

Baig M. I., Clark-Lewis J. W. and Thompson M. J. (1969), Flavan derivatives. XXVII. Synthesis of a new racemate of leucocyanidin tetramethyl ether (2,3-cis-3,4-trans-isomer); NMR spectra of the four racemates of leucocyanidin tetramethyl ether (5,7,3',4'-tetramethoxyflavan-3,4-diol); *Aust. J. Chem*. **22**:2645-2650.

Basílio N., Al Bittar S., Mora N., Dangles O. and Pina F. (2016), Analogs of natural 3-deoxyanthocyanins: O-glucosides of the 4',7-dihydroxyflavylium ion and the deep influence of glycosidation on color; Int. J. Mol. Sci. **17**(10).

Blume D.E., Jaworski J.G. and McClure J.W. (1979), Uridinediphosphate-glucose: isovitexin 7-O-glucosyltrasferase from barley protoplasts: subcellular localization; Planta **146**(2):199-202.

Brisson L., El Bakkali-Taheri N., Giorgi M., Fadel A., Kaizer J., Réglier M., Tron T., Ajandouz el H. and Simaan A.J. (2012), 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase: insight into cofactor binding from experimental and theoretical studies; J. Biol. Inorg. Chem. **17**(6): 939-49.

Brisson L. (2010). Relations structure-fonction de l'ACC oxydase et de l'anthocyanidine synthase: analogies et differences. Thèse de l'université d'Aix-Marseille.

Bruick R.K. and McKnight S.L. (2001), A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF; Science **294**(5545):1337-40.

Burbulis I.E. and Winkel-Shirley B. (1999), Interactions among enzymes of the *Arabidopsis* flavonoid biosynthesis pathway; Proc. Natl. Acad. Sci. USA **96**(22):12929-34.

Burzlaff N.I., Rutledge P.J., Clifton I.J., Hensgens C.M., Pickford M., Adlington R.M., Roach P.L. and Baldwin J.E. (1999), The reaction cycle of isopenicillin N synthase observed by X-ray diffraction; Nature **401**(6754):721-724.

Chalker-Scott L. (1999), Environmental significance of anthocyanins in plant stress responses; Photochem. Photobiol. **70**(1):1-9.

Cheng A.X., Han X.J., Wu Y.F. and Lou H.X. (2014), The function and catalysis of 2-oxoglutarate-dependent oxygenases involved in plant flavonoid biosynthesis; Int. J. Mol. Sci. **15**(1):1080-1095.

Chen P.N., Chu S.C., Chiou H.L., Chiang C.L., Yang S.F. and Hsieh Y.S. (2005), Cyanidin 3-glucoside and peonidin 3-glucoside inhibit tumor cell growth and induce apoptosis in vitro and suppress tumor growth in vivo; Nutr. Cancer **53**(2):232-43.

Cheynier V., Comte G., Davies K.M., Lattanzio V. and Martens S. (2013), Plant phenolics: recent advances on their biosynthesis, genetics, and ecophysiology; Plant Physiol. Biochem. **72**:1-20.

Chu K.O., Chan S.O., Pang C.P. and Wang C.C. (2014), Pro-oxidative and antioxidative controls and signaling modification of polyphenolic phytochemicals: contribution to health promotion and disease prevention?; J. Agri. Food Chem. **62**(18): 4026-38.

Costas M., Mehn M.P., Jensen M.P. and Que L. Jr (2004), Dioxygen activation at mononuclear nonheme iron active sites: enzymes, models, and intermediates; Chem. Rev. **104**(2):939-86.

Debeaujon I., Peeters A.J.M., Léon-Kloosterziel K.M. and Koornneef M. (2001), The *TRANSPARENT TESTA* 12 gene of Arabidopsis encodes a multidrug secondary transporter-like protein required for flavonoid sequestration in vacuoles of the seed coat endothelium; Plant Cell **13**(4):853-872.

De Jong L., Albracht S.P. and Kemp A. (1982), Prolyl 4-hydroxylase activity in relation to the oxidation state of enzyme-bound iron. The role of ascorbate in peptidyl proline hydroxylation; Biochim. Biophys. Acta **704**(2):326-32.

De Jong L. and Kemp A. (1984), Stoichiometry and kinetics of the prolyl 4-hydroxylase partial reaction; Biochim. Biophys. Acta **787**(1):105-11.

Di Meo F., Sancho Garcia J.C., Dangles O. and Trouillas P. (2012), Highlights on anthocyanin pigmentation and copigmentation: A matter of flavonoid π-stacking complexation to be described by DFT-D; J. Chem. Theory Comput. **8**(6):2034-43.

Ding M., Feng R., Wang S.Y., Bowman L., Lu Y., Qian Y., Castranova V., Jiang B.H. and Shi X. (2006), Cyanidin-3-glucoside, a natural product derived from blackberry, exhibits chemopreventive and chemotherapeutic activity; J. Biol. Chem. **281**(25):17359-68.

Forni L.G., Mönig J., Mora-Arellano V.O. and Willson R.L. (1983), Thiyl free radicals: direct observations of electron transfer reactions with phenothiazines and ascorbate; J.chem. Soc., Perkin Trans. **7**: 961-965.

Francis F.J. (1989), Food colorants: anthocyanins; Crit. Rev. Food Sci. Nutr. **28**(4): 272-314.

Fritsch H. and Grisebach H. (1975), Biosynthesis of cyanidin in cell cultrues of *Haplopappus Gracilis*; Phytochemistry **14**(11):2437-42.

Gargouri M., Manigand C., Maugé C., Granier T., Langlois d'Estaintot B., Cala O., Pianet I., Bathany K., Chaudière J. and Gallois B. (2009), Structure and epimerase activity of anthocyanidin reductase from *Vitis vinifera*; Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. **65**: 989-1000.

Gargouri M. (2010). Biosynthèse des flavan-3-ols: étude structurale et fonctionelle de l'anthocyanidine réductase de *Vitis vinifera*. Thèse de l'université Bordeaux 1.

Gould K.S., Markham K.R., Smith R.H. and Goris J.J. (2000), Functional role of anthocyanins in the leaves of *Quintinia serrata* A. Cunn.; J. Exp. Bot. **51**(347):1107-15.

Goupy P., Dufour C., Loonis M. and Dangles O. (2009a), Quantitative kinetic analysis of hydrogen transfer reactions from dietary polyphenols to the DPPH radical; J. Agric. Food Chem. **51**(3):615-22.

Goupy P., Bautista-Ortin A.B., Fulcrand H. and Dangles O. (2009b), Antioxidant activity of wine pigments derived from anthocyanins: hydrogen transfer reactions to the DPPH radical and inhibition of the heme-induced peroxidation of linoleic acid; J Agric. Food Chem. **57**(13):5762-70.

Hagiwara A., Miyashita K., Nakanishi T., Sano M., Tamano S., Koda T., Nakamura M., Imaida K., Ito N. and Shirai T. (2001), Pronounced inhibition by a natural anthocyanin, purple corn color, of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP)-associated colorectal carcinogenesis in male F344 rats pretreated with 1,2-dimethylhydrazine; Caner Lett. **171**(1):17-25.

Hamed R.B., Gomez-Castellanos J.R., Henry L., Ducho C., McDonough M.A. and Schofield C.J. (2013), The enzymes of β-lactam biosynthesis; Nat. Prod. Rep. **30**(1):21-107.

Hausinger R.P. (2015), Biochemical diversity of 2-oxoglutarate-dependent oxygenases; in: 2-Oxoglutarate-Dependent Oxygenases, Hausinger R.P. & Schofield C.J. Eds., RSC Metallobiology Series No. 3, The Royal Society of Chemistry.

Hedin P.A., Jenkins J.N., Collum D.H., White W.H. and Parrott W.L. (1983), Multiple factors in cotton contributing to resistance to the tobacco budworm, *Heliothis virescens* F., Plant Resistance to Insects; American Chemical Society, Washington, DC.

Hewitson K.S., McNeill L.A., Riordan M.V., Tian Y.M., Bullock A.N., Welford R.W, Elkins J.M., Oldham N.J., Bhattacharya S., Gleadle J.M., Ratcliffe P.J., Pugh C.W. and Schofield C.J. (2002), Hypoxia-inducible factor (HIF) asparagine hydroxylase is identical to factor inhibiting HIF (FIH) and is related to the cupin structural family; J. Biol. Chem. **277**(29):26351-5.

Hewitson K.S., McNeill L.A., Elkins J.M. and Schofield C.J. (2003), The role of iron and 2-oxoglutarate oxygenases in signaling; Biochem. Soc. Trans. **31**(Pt 3):510-5.

Hewitson K.S., Granatino N., Welford R.W., McDonough M.A. and Schofield C.J. (2005), Oxidation by 2-oxoglutarate oxygenases: non-haem iron systems in catalysis and signaling; Philos. Trans. A Math. Phys. Eng. Sci. **363**(1829):807-28

Hrazdina G. (1981), Tissue and subcellular localization of anthocyanins and flavonoids, Symposium on cellular and subcellular localization in plant metabolism; Cornell University: Phytochemical Society of North America, Ithaca.

Hrazdina G. and Wagner G.J. (1985), Metabolic pathways as enzyme complexes: evidence for the synthesis of phenylpropanoids and flavonoids on membrane associated enzyme complexes; Arch. Biochem. Biophys. **237**(1):88-100.

Hrazdina G., Wagner G.J. and Siegelman H.W. (1978), Subcellular localization of enzymes of anthocyanin biosynthesis in protoplasts; Phytochemistry **17**(1): 53-56.

Huergo L.F. and Dixon R. (2015), The Emergence of 2-Oxoglutarate as a Master Regulator Metabolite; Microbiol. Mol. Biol. Rev. **79**(4):419-35.

Johnson E.T., Berhow M.A. and Dowd P.F. (2008), Colored and white sectors from star-patterned petunia flowers display differential resistance to corn earworm and cabbage looper larvae; J. Chem. Ecol. **34**:757-765.

Källberg M., Margaryan G., Wang S., Ma J. and Xu J. (2014), RaptorX server: a resource for template-based protein structure modeling; Methods Mol Biol. **1137**:17-27.

Kelley L.A., Mezulis S., Yates C.M., Wass M.N. and Sternberg J.E. (2015), The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis; Nat. Protoc. **10**(6):845-858.

Kiehlmann E. and Li E.P.M. (1995), Isomerization of dihydroquercetin; J. Nat. Prod. **58**(3):450-55.

Klein M., Weissenböck G., Dufaud A., Gaillard C., Kreuz K. and Martinoia E. (1996), Different energization mechanisms drive the vacuolar uptake of a flavonoid glucoside and a herbicide glucoside; J. Biol. Chem. **271**(47):29666-71.

Kocic B., Filipovic S., Nikolic M. and Petrovic B. (2011), Effects of anthocyanins and anthocyanin-rich extracts on the risk for cancers of the gastrointestinal tract; J BUON **16**(4):602-608

Kong J.M., Chia L.S., Goh N.K., Chia T.F. and Brouillard R. (2013), Analysis and biological activities of anthocyanins; Phytochemistry **64**(5):923-33.

Kristiansen K.N. (1984), Biosynthesis of proanthocyanidins in barley: genetic control of the conversion of dihydroquercetin to catechin and procyanidins; *Carlsberg Res. Commun*. **49**:503-524.

Kristiansen K.N. (1986), Conversion of (+)-dihydroquercetin to (+)-2,3-trans-3,4-cis-leucocyanidin and (+)-catechin with an enzyme extract from maturing grains of barley; *Carlsberg Res. Commun*. **51**:51-60.

Lando D., Peet D.J., Whelan D.A., Gorman J.J. and Whitelaw M.L. (2002), Asparagine hydroxylation of the HIF transactivation domain: a hypoxic switch; Science **295**:858–861.

Lee H.J., Lloyd M.D., Clifton I.J., Harlos K., Dubus A., Baldwin J.E., Frere J.M. and Schofield C.J. (2001), lteration of the co-substrate selectivity of deacetoxycephalosporin C synthase. The role of arginine 258; J. Biol. Chem. **276**(21):18290-5.

Li H.J. and Deinzer M. L. (2007), Tandem mass spectrometry for sequencing proanthocyanidins; *Anal. Chem*. **79**:1739-1748.

Li L., Ban Z.J., Li X.H., Wu M.Y., Wang A.L., Jiang Y.Q. and Jiang Y.H. (2012), Differential expression of anthocyanin biosynthetic genes and transcription factor PcMYB10 in pears (Pyrus communis L.); PLoS One **7**(9):e46070.

Li D., Wang P., Luo Y., Zhao M. and Chen F. (2017), Health benefits of anthocyanins and molecular mechanisms: Update from recent decade; Crit. Rev. Food Sci. Nutr. **57**(8):1729-1741.

Li Z.S., Alfenito M., Rea P.A., Walbot V. and Dixon R.A. (1997), Vacuolar uptake of the phytoalexin medicarpin by the glutathione conjugate pump; Phytochemistry **45**(4):689-693.

Marrs K.A., Alfenito M.R. Lloyd A.M. and Walbot V. (1995), A glutathione S-transferase involved in vacuolar transfer encoded by the maize gene Bronze-2; Nature **375**(6530):397-400.

Martinez S. and Hausinger R.P. (2015), Catalytic Mechanisms of Fe(II)- and 2-Oxoglutarate-dependent Oxygenases; J. Biol. Chem. **290**(34):20702-11.

Martinez S. and Hausinger R.P. (2016), Biochemical and Spectroscopic Characterization of the Non-Heme Fe(II)- and 2-Oxoglutarate-Dependent Ethylene-Forming Enzyme from Pseudomonas syringae pv. phaseolicola PK2; Biochemistry **55**(43):5989-99.

Maugé C., Granier T., Langlois d'Estaintot B., Gargouri M., Manigand C., Schmitter J.M., Chaudière J. and Gallois B. (2010), Crstal structural and catalytic mechanism of leucoanthocyanidin reductase from *Vitis vinifera*; J. Mol. Biol. **397**:1079-91.

Maugé C. (2010). Biosynthèse des flavan-3-ols chez *Vitis vinifera*: structure, mécanisme catalytique et première approche cinétique de la leucoanthocyanidine réductase. Thèse de l'université de Bordeaux 1.

Menssen A., Höhmann S., Martin W., Schnable P., Peterson P., Saedler H. and Gierl A. (1990), The En/Spm transposable element of *Zea mays* contains splice sites at the termini generating a novel intron from a dSpm element in the A2 gene; EMBO J. **9**(10): 3051–3057.

Mueller L.A., Goodman C.D., Silady R.A. and Walbot V. (2000), AN9, a petunia glutathione S-transferase required for anthocyanin sequestration, is a flavonoid-binding protein; Plant Physiol. **123**(4):1561-70.

Nakajima J.I., Sato Y., Hoshino T., Yamazaki M. and Saito K. (2006), Mechanistic study on the oxidation of anthocyanidin synthase by quantum mechanical calculation; J. Biol. Chem. **281**(30):21387-98.

Olivas-Aguirre F.J., Rodrigo-Garcia J., Martinez-Ruiz N.D., Cárdenas-Robles A.I., Mendoza-Díaz S.O., Álvarez-Parrilla E., González-Aguilar G.A., de la Rosa L.A., Ramos-Jiménez A. and Wall-Medrano A. (2016), Cyanidin-3-O-glucoside: physical-chemistry, foodomics and health effects; Molecules **21**(9):E1264.

Olivo G., Cussó O., Borrell M. and Costas M. (2017), Oxidation of alkane and alkene moieties with biologically inspired nonheme iron catalysts and hydrogen peroxide: from free radicals to stereoselective transformations; J. Biol. Inorg. Chem. **22**(2-3):425-452.

Omote H., Hiasa M., Matsumoto T., Otsuka M. and Moriyama Y. (2006), The MATE proteins as fundamental transporters of metabolic and xenobiotic organic cations; Trends Pharmacol Sci. **27**(11):587-93.

Petit P. (2007), Etude structurale de la dihydroflavonol 4-réductase, enzyme clé de la biosynthèse des flavonoïdes chez *Vitis vinifera*. Thèse de l'université Bordeaux 1.

Petrussa E., Braidot E., Zancani M., Peresson C., Bertolini A., Patui S. and Vianello A. (2013), Plant flavonoids – biosynthesis, transport and involvement in stress responses; Int. J. Mol. Sci. **14**(7):14950-73.

Porter L.J. and Foo L.Y. (1982), Leucocyanidin: synthesis and properties of (2R,3S,ER)-(+)-3,4,5,7,3',4'-hexahydroxyflavan; Phytochemistry, **21**(12):2947-52.

Prescott A.G. and Lloyd M.D. (2000), The iron(II) and 2-oxoacid-dependent dioxygenases and their role in metabolism; Nat. Prod. Rep. **17**(4):367-83.

Proshlyakov D.A., McCracken J. and Hausinger R.P. (2017), Spectroscopic analyses of 2-oxoglutarate-dependent oxygenases: TauD as a case study; J. Biol. Inorg. Chem. **22**(2-3):367-379.

Pugh C.W. and Ratcliffe P.J. (2017), New horizons in hypoxia signaling pathways; Exp. Cell. Res. **356**(2):116-121.

Ravindra P.V. and Narayan M.S. (2003), Antioxidant activity of the anthocyanin from carrot (*Daucus carota*) callus culture; Int. J. Food Sci. Nutr. **54**(5):349-355.

Rinaldo A.R., Cavallini E., Jia Y., Moss S.M., McDavid, D.A., Hooper L.C., Robinson S.P., Tornielli G.B., Zenoni, S., Ford, C.M., Boss P.K. and Walker A.R. (2015), A grapevine anthocyanin acyltransferase, transcriptionally regulated by VvMYBA, can produce most acylated anthocyanins present in grape skins; Plant Physiol. **169**(3):1897-1916.

Roach P.L., Clifton I.J., Fülöp V., Harlos K., Barton G.J., Hajdu J., Andersson I., Schofield C.J. and Baldwin J.E. (1995), Crystal structure of isopenicillin N synthase is the first from a new structural family of enzymes; Nature **375**(6533):700-4.

Roach P.L., Clifton I.J., Hensgens C.M., Shibata N., Schofield C.J., Hajdu J. and Baldwin J.E. (1997), Structure of isopenicillin N synthase complexed with substrate and the mechanism of penicillin formation; Nature **387**(6635):827-830.

Rocklin A.M., Tierney D.L., Kofman V., Brunhuber N.M., Hoffman B.M., Christoffersen R.E., Reich N.O., Lipscomb J.D. and Que L. Jr. (1999), Role of the nonheme Fe(II) center in the biosynthesis of the plant hormone ethylene; Proc. Natl. Acad. Sci. USA **96**(14):7905-9.

Rocklin A.M., Kato K., Liu H.W., Que L. Jr and Lipscomb J.D. (2004), Mechanistic studies of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase: single turnover reaction; J. Biol. Inorg. Chem. **9**(2):171-82.

Saito K., Kobayashi M., Gong Z., Tanaka Y. and Yamazaki M. (1999), Direct evidence for anthocyanidin synthase as a 2-oxoglutarate-dependent oxygenase: molecular cloning and functional expression of cDNA from a red forma of Perilla frutescens; Plant J. **17**(2):181–189.

Schofield C.J., Baldwin J.E., Byford M.F., Clifton I., Hajdu J., Hensgens C. and Roach P. (1997), Proteins of the penicillin biosynthesis pathway; Curr Opin Struct Biol. **7**(6):857-64.

Schofield C.J. and McDonough M.A. (2007), Structural and mechanistic studies on the peroxisomal oxygenase phytanoyl-CoA 2-hydroxylase (PhyH); Biochem. Soc. Trans. **35**(Pt 5):870-5.

Shao L., Shu Z., Sun S.L., Peng C.L., Wang X.J. and Lin Z.F. (2007), Antioxidation of an anthocyanins in photosynthesis under high temperature stress; J. Integr. Plant Biol. **49**(9):1341)51.

Smirnova N.A., Hushpulian D.M., Speer R.E., Gaisina I.N., Ratan R.R. and Gazaryan I.G. (2012), Catalytic mechanism and substrate specificity of HIF prolyl hydroxylases; Biochemistry (Mosc) **77**(10):1108-19.

Sorrenti V., Vanella L., Acquaviva R., Cardile V., Giofrè S. and Di Giacomo C. (2015), Cyanidin induces apoptosis and differentiation in prostate cancer cells; Int. J. Oncol. **47**(4):1303-10.

Stafford H. (1974), Possible multi-enzyme complexes regulating the formation of C6-C3 phenolic compounds and lignins in higher plants; Rec. Adv. Phytochem. **8**:53-79.

Stafford H. A., Lester H. H. and Porter L. J. (1985), Chemical and enzymatic synthesis of monomeric procyanidins (leucocyanidins or 3',4',5,7-tetrahydroxy-flavan-3,4-diols) from (2R,3R)-dihydroquercetin; *Phytochemistry*. **24**:333-338.

Steinitz B. and Bergfeld R. (1977), Pattern formation underlying phytochrome-mediated anthocyanin synthesis in the cotyledons of *Sinapis alba L.*; Planta **133**(3):229-35.

Steyn W.J., Wand S.J.E., Holcroft D.M. and Jacobs G. (2002), Anthocyanins in vegetative tissues: a proposed unified function in photoprotection; New Phytol. **155**(3):349-361.

Strijbis K., Vaz F.M. and Distel B. (2010), Enzymology of the carnitine biosynthesis pathway; IUBMB Life **62**(5):357-62.

Tarhonskaya H., Szöllössi A., Leung I.K., Bush J.T., Henry L., Chowdhury R., Iqbal A., Claridge T.D., Schofield C.J. and Flashman E. (2014), Studies on deacetoxycephalosporin C synthase support a consensus mechanism for 2-oxoglutarate dependent oxygenases; Biochemistry 53(15):2483-93.

Tanner G.J. and Kristiansen K.N. (1993), Synthesis of 3,4-cis-[^{3}H]leucocyanidin and enzymatic reduction to catechin; Anal. Biochem. **209**(2):274-277.

Trabelsi N., Langlois d'Estainto B., Sigaud G., Gallois B. et Chaudière J. (2011b), Kinetic and binding equilibrium studies of dihydroflavonol 4-reductase from *Vitis vinifera* and its unusually strong substrate inhibition; Journal of Biophysical Chemistry 2(3):332-344.

Trouillas P., Sancho-García J.C., De Freitas V., Gierschner J., Otyepka M. and Dangles O. (2016), Stabilizing and modulating color by copigmentation: insights from theory and Experiment; Chem Rev. **116**(9):4937-82.

Turnbull J.J., Prescott A.G, Schofield C.J. and Wilmouth R.C. (2001), Purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction of anthocyanidin synthase from *Arabidopsis thaliana*; Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. **57**(Pt 3):425-7.

Turnbull J.J., Nagle M.J., Seibel J.F., Welford R.W., Grant G.H. and Schofield C.J. (2003), The C-4 stereochemistry of leucocyanidin substrates for anthocyanidin synthase affects product selectivity; Bioorg. Med. Chem. Lett. **13**(21):3853-7.

Turnbull J.J., Nakajima J., Welford R.W., Yamazaki M., Saito K. and Schofield C.J. (2004), Mechanistic studies on three 2-oxoglutarate-dependent oxygenases of flavonoid biosynthesis: anthocyanidin synthase, flavonol synthase, and flavanone 3beta-hydroxylase; J. Biol. Chem. **279**(2):1206-16.

Vallverdú-Queralt A., Meudec E., Eder M., Lamuela-Raventos R.M., Sommerer N. and Cheynier V. (2017), The Hidden face of wine polyphenol polymerization highlighted by high-resolution mass spectrometry; ChemistryOpen **6**(3):336-339.

Wang H., Wang W., Li H., Zhang P., Zhan J. and Huang W. (2011), Expression and tissue and subcellular localization of anthocyanidin synthase (ANS) in grapevine; Protoplasma **248**(2):267-79.

Wardman P. and Von Sonntag C. (1995), Kinetic factors that control the fate of thiyl radicals in cells; Meth. Enzymol. **251**: 31-45.

Welford R.W.D., Turnbull J.J., Claridge T.M.W., Prescott A.G. and Schofield C.J. (2001), Evidence for oxidation at C-3 of the flavonoid C-ring during anthocyanin biosynthesis; Chem. Commun. 1828–1829.

Welford R.W.D., Kirkpatrick J.M., McNeill L.A., Puri M., Oldham N.J. and Schofield C.J. (2005a), Incorporation of oxygen into the succinate co-product of iron(II) and 2-oxoglutarate dependent oxygenases from bacteria, plants and humans; FEBS Lett. **579**:5170-74.

Welford R.W.D., Clifton I.J., Turnbull J.J., Wilson S.C. and Schofield C.J. (2005b), Structural and mechanistic studies on anthocyanidin synthase catalysed oxidation of flavanone substrates: the effect of C-2 stereochemistry on product selectivity and mechanism; Org. Biomol. Chem. **3**(17):3117-26.

Wellmann F., Griesser M., Schwab W., Martens S., Eisenreich W., Matern U. and Lukacin R. (2006), Anthocyanidin synthase from *Gerbera hybrida* catalyzes the conversion of (+)-catechin to cyanidin and a novel procyanidin; FEBS Lett. **580**(6):1642-8.

Wilmouth R.C., Turnbull J.J., Welford R.W., Clifton I.J., Prescott A.G. and Schofield C.J. (2002), Structure and mechanism of anthocyanidin synthase from *Arabidopsis thaliana*; Structure **10**(1):93-103.

Xie D.Y., Sharma S.B., Paiva NL, Ferreira D. and Dixon R.A. (2003), Role of anthocyanidin reductase, encoded by BANYULS in plant flavonoid biosynthesis; Science. **299**(5605):396-9.

Yuan Y., Hilliard G., Ferguson T. and Millhorn D.E. (2003), Cobalt inhibits the interaction between hypoxia-inducible factor-alpha and von Hippel-Lindau protein by direct binding to hypoxia-inducible factor-alpha; J. Biol. Chem. **278**(18):15911-15916.

Zhang H., Wang L., Deroles S., Bennett R. and Davies K. (2006), New insight into the structures and formation of anthocyanic vacuolar inclusions in flower petals; BMC Plant Biol. **6**:29.

Zhang Y., Zhang J., Song T., Li J., Tian J., Jin K. and Yao Y. (2014), Low medium pH value enhances anthocyanin accumulation in *Malus* crabapple leaves; PLoS One. **9**(6):e97904.

Zhang Y.Z., Xu S.Z., Cheng Y.W., Ya H.Y. and Han J.M. (2016), Transcriptome analysis and anthocyanin-related genes in red leaf lettuce; Genet. Mol. Res. **15**(1).

Zhou J., Rocklin A.M., Lipscomb J.D., Que L. Jr and Solomon E.I. (2002), Spectroscopic studies of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase: molecular mechanism and CO_2 activation in the biosynthesis of ethylene; J. Am. Chem. Soc. **124**(17):4602-9.

Summary :

Recombinant anthocyanidin synthase from *Vitis vinifera* (*Vv*ANS) has been expressed in *E. coli*, and purified by nickel affinity chromatography.
The production and purification of the iron-loaded enzyme has been developed in order to avoid uncontrolled non-enzymatic oxidation reactions in the presence of Fe(II) salt. A stable *Vv*ANS-Fe(II) complex is formed in the presence of 2-oxoglutarate and ascorbate, and this complex is catalytically active at ambient PO_2 in the absence of Fe(II) salt.
The transformation of (+)-catechin by *Vv*ANS has been studied with and without ascorbate, by using either the *Vv*ANS-Fe(II) complex or the holoenzyme co-incubated with ferrous sulfate, to investigate the role of ascorbate. No enzyme activity has been observed in the absence of ascorbate, which means that it is an essential enzyme cofactor. A covalent adduct ascorbate-cyanidin is produced *in vitro*, but only in the absence of glutathione (GSH), another major nucleophilic and reducing agent.
The two stereoisomers of leucocyanidin (3,4-cis et 3,4-trans flavan-diols) which were expected to behave as substrates of *Vv*ANS, are not commercial and were synthesized by reduction of dihydroquercetin by $NaBH_4$, and characterized by proton NMR. The analysis of the two stereoisomers by means of tandem mass spectrometry (MS/MS) shows that their fragmentation pathways are distinct and may be used to distinguish them during their production. The two stereoisomers are stable in frozen aqueous medium at -20°C.
Twelve flavonoids of four distinct families (flavanones, dihydroflavonols, flavan-3-ols et flavan-3,4-diols) were tested as potential substrates of *Vv*ANS. All enzymatic products were purified by means of reverse-phase HPLC and characterized by MS/MS, with the following results:

1) Only dihydroflavonols of (2R,3R) configuration are accepted as substrates by *Vv*ANS, the activity decreasing with the number of hydroxyl groups of ring B.
2) Only flavan-3-ols or flavan-3,4-diols of (2R,3S) configuration having either a catechol or three vicinal phenolic OH on ring B are accepted as substrates.
3) Naringenin is not substrate of *Vv*ANS, most likely because a C_3 hydroxyl group is missing.
4) 3,4-cis-leucocyanidin (natural stereoisomer) is transformed into two major products, quercetin and flavan-3,3,4-triol (gem-diol at C_3) instead of cyanidin. 3,4-trans-leucocyanidin is also a substrate of *Vv*ANS, but it is transformed into five products, (+)-DHQ, (-)-epiDHQ, cyanidin, quercetin and flavan-3,3,4-triol (gem-diol at C_3, stereoisomer of the previous one). A flavan-3,3-gem-diol intermediate derived from (+)-catechin has also been observed by real-time monitoring of the transformation of (+)-catechin by MS, as well as a flav-2-en-3-ol intermediate. All these results are compatible with the hypothesis that the first catalytic step of ANS is a C_3-hydroxylation that systematically produces a gem-diol.

Glutathione GSH is a powerful nucleophilic and reducing agent as well as a free radical scavenger, which is abundant in grape berries. We therefore studied its effect on *Vv*ANS activity with all identified substrates. GSH has no effect on the transformation of dihydroflavonols and flavan-3,4-diols, but it considerably modifies the transformation pattern of (+)-catechin and (+)-gallocatechin. In the presence of (+)-catechin and GSH, we observe two major products, cyanidin and a cyanidin-glutathione thioether, with production yields which are much higher than in the absence of GSH. Moreover, the ascorbate-cyanidin covalent adduct and the (+)-catechin dimer that had been obtained in the absence of GSH have disappeared. Our data suggest that the cyanidin-glutathione adduct is a C_4-thioether which is in equilibrium between the two keto-enolic tautomeric forms at C_3, and decomposes into cyanidin and GSH. In the presence of (+)-gallocatechin, a similar delphinidin-glutathione thioether adduct is also observed. In order to test the possible specificity of GSH as a cofactor, three other mercaptans (thiomalate, cysteine and cysteamine) were tested, and no similar product was observed, which suggests that GSH is a specific ligand, and might be a coenzyme of *Vv*ANS.
Our results suggest that anthocyanidins could be produced *in vivo* from a flavan-3-ol substrate (catechin or gallocatechin) via a glutathione thioether intermediate, whereas the natural 3,4-cis stereoisomer of leucocyanidin is not transformed into cyanidin by *Vv*ANS.

Keywords : Anthocyanidin synthase; oxygenase; oxoglutarate; ascorbate; glutathione; leucocyanidin

Résumé :

L'ANS recombinante de *Vitis vinifera* (*Vv*ANS) a été exprimée chez *E. coli*, et purifiée par chromatographie d'affinité sur colonne Nickel.
La production et purification de l'holoenzyme chargée en fer a été mise en point, afin d'éviter les réactions d'oxydation non-enzymatique incontrôlée en présence de sel de Fe(II). Un complexe *Vv*ANS-Fe(II) stable est formé en présence d'α-cétoglutarate et d'ascorbate, complexe qui est catalytiquement actif à PO_2 ambiante en l'absence de sel de Fe(II).
La transformation de la (+)-catéchine par *Vv*ANS a été étudiée avec ou sans ascorbate, en utilisant le complexe *Vv*ANS-Fe(II) ou l'holoenzyme co-incubée en présence de sulfate ferreux, afin d'étudier le rôle de l'ascorbate. Aucune activité enzymatique n'a été observée en l'absence d'ascorbate, ce qui indique qu'il s'agit d'un cofacteur indispensable de *Vv*ANS. Un adduit covalent ascorbate-cyanidine est produit *in vitro*, mais seulement en l'absence d'un autre réducteur nucléophile majeur, le glutathion GSH.
Les deux stéréoisomères de la leucocyanidine (flavan-diols 3,4-cis et 3,4-trans), substrats potentiels de *Vv*ANS, mais non commerciaux, ont été synthétisés par réduction de la dihydroquercétine par $NaBH_4$, puis identifiés par RMN du proton. L'analyse des deux stéréoisomères par spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) montre que leurs voies de fragmentation MS/MS sont distinctes et peuvent être utilisées pour les distinguer lors de leur production. Les deux stéréoisomères sont stables en milieu aqueux congelé à -20°C.
Douze flavonoïdes de quatre familles distinctes (flavanones, dihydroflavonols, flavan-3-ols et flavan-3,4-diols) ont été testés comme substrats potentiels. Tous les produits enzymatiques ont été purifiés par HPLC en phase inverse, puis identifiés par MS/MS, avec les résultats suivants:

1) Seuls les dihydroflavonols de configuration (2R,3R) sont acceptés comme substrats par *Vv*ANS dont l'activité diminue avec le nombre de groupements hydroxyles du cycle B.
2) Seuls les flavan-3-ols ou flavan-3,4-diols de configuration (2R,3S) ayant un catéchol ou trois OH phénoliques vicinaux sur le cycle B sont acceptés comme substrats.
3) La naringénine n'est pas substrat de *Vv*ANS, sans doute en raison de l'absence de groupement hydroxyle en C_3.
4) La 3,4-cis-leucocyanidine (stéréoisomère naturel) est transformée en deux produits majeurs, la quercétine et le flavan-3,3,4-triol (gem-diol en C_3) au lieu de la cyanidine. La 3,4-trans-leucocyanidine est aussi un substrat de *Vv*ANS, et elle est transformée en cinq produits, (+)-DHQ, (-)-épiDHQ, cyanidine, quercétine et flavan-3,3,4-triol (gem-diol en C_3, stéréoisomère du précédent). Un intermédiaire flavan-3,3-gem-diol dérivé de la (+)-catéchine a aussi été observé par monitorage en temps réel de la transformation de (+)-catéchine par MS, ainsi qu'un intermédiaire flav-2-en-3-ol. Tous ces résultats sont compatibles avec l'idée que la première étape catalytique de l'ANS est une hydroxylation en C_3 produisant systématiquement un gem-diol.

Le glutathion GSH est un puissant nucléophile, réducteur et piégeur de radicaux libres, qui est abondant dans la baie de raisin. Nous avons donc étudié son effet sur l'activité de *Vv*ANS avec tous les substrats identifiés. GSH n'a pas d'effet sur la transformation des dihydroflavonols et des flavan-3,4-diols, mais il modifie considérablement le mode de transformation de la (+)-catéchine et de la (+)-gallocatéchine. En présence de (+)-catéchine et de GSH, on observe deux produits majeurs, la cyanidine et un adduit thioéther cyanidine-glutathion, et le rendement de production est beaucoup plus élevé qu'en l'absence de GSH. De plus, l'adduit covalent ascorbate-cyanidine et le dimère issu de la (+)-catéchine obtenus lors de la réaction réalisée en l'absence de GSH ont disparu. Nos données suggèrent que l'adduit covalent cyanidine-glutathion est un thioéther en C_4 qui fait l'objet d'un équilibre de tautomérisation céto-énolique en C_3, et se décompose en cyanidine et GSH. En présence de (+)-gallocatéchine, un adduit thioéther similaire delphinidine-glutathion est aussi observé. Pour tester l'éventuelle spécificité de GSH, trois autres mercaptans (thiomalate, cystéine et cystéamine) ont été testés et aucun adduit similaire n'a été observé, ce qui suggère que GSH est un ligand spécifique, et pourrait être un coenzyme de *Vv*ANS.
Nos résultats suggèrent que les anthocyanidines pourraient être produites *in vivo* à partir d'un substrat flavan-3-ol (catéchine ou gallocatéchine) via un intermédiaire thioéther de glutathion, alors que le stéréoisomère naturel (3,4-cis) de la leucocyanidine n'est pas transformé en cyanidine.

Mots clés : Anthocyanidine synthase; oxygénase; oxoglutarate; ascorbate; glutathion; leucocyanidine

---

CBMN, UMR 5248

Allée Geoffroy Saint Hilaire, Bât B14, 33600 Pessac