

Interactions entre muqueuse orale, salive et molécules de la flaveur

Sarah Ployon

► To cite this version:

Sarah Ployon. Interactions entre muqueuse orale, salive et molécules de la flaveur. Alimentation et Nutrition. Université de Bourgogne, 2016. Français. NNT: 2016DIJOS037. tel-01947553

HAL Id: tel-01947553 https://theses.hal.science/tel-01947553

Submitted on 7 Dec 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.



UNIVERSITE DE BOURGOGNE- FRANCHE-COMTE

ECOLE DOCTORALE ENVIRONNEMENT ET SANTE

Thèse

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE BOURGOGNE- FRANCHE-COMTE

Discipline : Sciences des Aliments

Présentée et soutenue publiquement par

Sarah PLOYON

Le 5 décembre 2016

Interactions entre muqueuse orale, salive et molécules de la flaveur

Directrice de thèse : Dr. Martine Morzel Co-encadrant : Dr. Francis Canon

Jury

Rapporteurs	Dr. Catherine Robbe-Masselot	Maître de conférence, Université de Lille
	Dr. Véronique Cheynier	Directrice de Recherche, INRA, Montpellier
Examinateurs	Dr. Erwan Engel	Directeur de Recherche, INRA, Theix
	Pr. Eric Lesniewska	Professeur, Université de Bourgogne
		Franche-Comté
Membres	Dr. Martine Morzel	Chargée de Recherche, INRA, Dijon
	Dr. Francis Canon	Chargé de Recherche, INRA, Dijon



Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation (CSGA) UMR 6265 CNRS, UMR1324 INRA, Université de Bourgogne Franche-Comté, Dijon

REMERCIEMENTS

Mes plus sincères remerciements

A mes encadrants, Dr Martine Morzel et Dr Francis Canon

Pour la confiance que vous m'avez accordée et pour vos encouragements, de notre première rencontre, au jour du concours, et au jour de la soutenance.

Pour votre disponibilité tout au long des ces 3 années. Et pour votre patience aussi, car il en a fallu parfois...

Pour tous les autres moments, un peu moins « professionnels », beaucoup de rires, qui ont rendu cette thèse agréable, et dont je garderai un beau souvenir.

A mon jury et à mon comité de suivi de thèse

Dr Véronique Cheynier et Dr Catherine Robbe

Pour avoir accepté d'être rapporteur de cette thèse et pour votre discussion constructive.

Pr Eric Lesniewska

Pour avoir accepté de présider ce jury, ainsi pour vos conseils lors des réunions MUFFIN.

Dr Erwan Engel

Pour avoir accepté d'évaluer ce travail au dernier moment et avoir pris le temps d'apporter conseils et expertise sur le sujet.

Dr Muriel Bonin-Mercier, Pr Carole Prost et Dr Axel Marchal

Pour avoir accepté d'être membres de mon comité de thèse, pour vos conseils et vos encouragements à chacune de nos rencontres.

Je remercie très chaleureusement les personnes qui ont participé à ce projet

Christine Belloir

Pour tout ce que tu m'as enseigné, pour ton aide précieuse tout au long de ces 3 années, ta grande disponibilité, ta sympathie, ta bonne humeur communicative. Pour les week-end « à rallonge » que tu m'as permis de prendre en venant t'occuper des TR.

Claire Pradels

Pour le travail réalisé durant ton stage, et pour être venue me soutenir le jour J.

Marine Brulé

Pour ta gentillesse et ton aide précieuse, surtout pour les manip' de dernières minutes, car sans toi ça n'aurait pas été possible de finir.

Aline Bonnotte

Pour ton aide mais aussi ta sympathie qui ont rendu ces journées passées ensemble devant le MEB beaucoup plus agréables.

Dr Jeannine Lherminier, Christine Arnould et Frédéric Herbst

Pour votre expertise scientifique et votre disponibilité lors de ma venue à DimaCell et à l'ICB.

Etienne Sémon

Pour tout le travail que tu as réalisé, ta patience, ta disponibilité. (Pour ta confiture !)

Isabelle Andriot et Karine Gourrat

Pour votre disponibilité, votre aide et vos conseils. Pour votre sympathie et toutes les discussions et pauses cafés partagées.

Marie Annick Maire, Franck Ménétrier et Dr Claire Fenech

Pour vos conseils techniques, et pour le dépannage de matériel.

La team MUFFIN, Hélène, Carolina et Ece.

Je remercie aussi

Le **MESR** pour ma bourse de thèse. Et l'**ANR** pour le financement du projet MUFFIN.

Enfin, un grand merci à

L'équipe 1

Pour votre accueil chaleureux.

Dr Eric Neyraud alias tonton Rico

Pour ton expertise sur la salive, tes conseils bien sûr... mais surtout pour ton humour, nos discussions peu scientifiques, les cinés et ton expertise sur les Marvel.

Dr Laurianne

Pour m'avoir supportée dans ton bureau quand tu finissais ta rédaction et pour m'avoir initiée à la folie du labo.

Elisa, Dr Estelle, Julie, Mathilde, Marianne, Zoé, Dr Nico

Pour votre amitié. Pour toutes les journées, soirées et weekends partagés, les discussions, les rires et le reste. Pour avoir rendu ces 3 années mémorables.

SOMMAIRE

Valorisation des travaux	4
Liste des figures	5
Liste des tableaux	8
Liste des abréviations	10
Introduction	12
Etat de l'art	14
1. La perception sensorielle des aliments : Généralités	14
2. La libération des molécules d'arôme et la perception aromatique	15
2.1. Les molécules d'arôme	
2.2. Mécanismes de la perception aromatique	
2.3. Paramètres influant sur la libération des molécules d'arôme	
2.4. La persistance aromatique	
3. La sensation d'astringence	24
3.1. Les tanins	
3.2. Mécanismes physiologiques	
4. Le rôle de la salive dans la perception de la flaveur	
4.1. La salive	
4.2. Salive et perception aromatique	
4.3. Salive et astringence	49
5. Effet des polyphénols sur la perception aromatique	52
5.1. Observations sensorielles	52
5.2. Nature des interactions entre polyphénols et composés volatils	
6. La pellicule mucosale	54
6.1. Composition et structure	54
6.2. Propriétés et fonctions biologiques	56
6.3. Formation de la pellicule mucosale	58
6.4. La muqueuse orale	
7. Méthodes analytiques mises en œuvre	64
7.1. Caractérisation structurale par microscopie	64
7.2. Analyse d'arôme par analyse de l'espace de tête	
Chapitre 1 Développement d'un modèle in vitro d'épithélium oral	72
1. Introduction	72
1.1. Problématique	72
1.2. Stratégie	73
2. Matériels et méthodes	75
2.1. Culture cellulaire	75
2.2. Formation de la pellicule mucosale	75
2.3. Expression de la mucine 1 par les cellules de la lignée TR146	76
2.4. Caractérisation microscopique du modèle	
3. Résultats	89
3.1. Viabilité des cellules incubées avec de la salive	

3.2. Sélection du clone exprimant MUC1	
3.3. Evaluation de l'épaisseur du tapis cellulaire et de la pellicule mucosale	
3.4. Developpement d'un modèle cellulaire de muqueuse orale et étude du rôle d	e MUC1
dans la formation de la pellicule mucosale	95
4. Discussion	99
4.1. Expression de MUC1 par la lignée TR146	
4.2. Caractérisation microscopique du modèle cellulaire	
4.3. Avantages et limites du modèle	101
5. Conclusion et perspectives	
Chapitre 2 – Etude du rôle de la muqueuse orale dans le phénomène de persista	nce
aromatique	111
1. Introduction	111
1.1. Contexte et problematique	
1.2. Strategie	
2.1 Modèle collulaire de muqueuse arale	113
2.1. Modele cellulaire de muqueuse orale	113
2.2. Molecules d'alonne	113 115
2.5. Evaluation de la coartité d'acu retorne nor les collules	115 115
2.4. Evaluation de la qualitite d'édu l'étende par les cenules	115
CC FID	que pai
2.6. Analyse de la dégradation des molécules d'arôme par analyses CC-NS	113
2.0. Analyse de la degradation des molecules d'aronne par analyses de-MS	
2.8 Analyse statistiques	110
3 Résultats	127
3.1 Evaluation de la toxicité des molécules d'arôme	127
3.2. Etude <i>in vitro</i> des interactions entre muqueuse orale et molécules d'arôme	128
3.3. Etude <i>in vitro</i> de la cinétique de libération des molécules d'arômes en préser	ice de la
muqueuse orale modèle	
4. Discussion	
4.1. Effet de la muqueuse modèle sur la libération des molécules à l'équilibre	
thermodynamique	
4.2. Effet de la muqueuse orale sur la CINETIQUE de libération des molécules d'a	arôme152
5. Conclusion et perspectives	
Chapitre 3 - Etude des interactions entre protéines salivaires, pellicule mucosal	e et tanins
1. Introduction	
1.1. Contexte et problématique	
1.2. Stratégie	
2. Matériels et méthodes	
2.1. Modèle cellulaire de muqueuse orale	
2.2. Toxicité des molécules	164
2.3. Tanins et PRP	164
2.4. Précipitation des protéines salivaires PRP par les tanins	
2.5. Exposition de la muqueuse modèle aux tanins	165

2.6. Microscopie	166
2.7. Analyse des images	
2.8. Analyse statistique	
3. Résultats	169
3.1. Toxicité des tanins	169
3.2. Effet des tanins sur la structure de la pellicule	
3.3. Effet des tanins sur la structure de la pellicule en présence d'IB5	174
4. Discussion	
4.1. Effet des tanins EgC et EgCG sur la pellicule mucosale	
4.2. PRP et protection de la muqueuse	
5. Conclusion et perspectives	
Conclusion générale et perspectives	185
Références bibliographiques	
Annexe	215

VALORISATION DES TRAVAUX

PUBLICATIONS

Ployon S., Belloir C., Bonnotte A., Lherminier J., Canon F., Morzel M. (2016). The membraneassociated MUC1 improves adhesion of salivary MUC5B on buccal cells. Application to development of an in vitro cellular model of oral epithelium. *Archives of Oral Biology*, *61*, 149-15

Ployon S., Morzel M., Canon F. (2016). The role of saliva in aroma release and perception. *Food Chemistry 226 (2017) 212–220*

COMMUNICATIONS ECRITES

Ployon S., Belloir C., Bonnotte A., Canon F., Morzel M. (2014) Design of an in-vitro model of oral mucosa : microscopic characterization, *Saliva Symposium, Egmond aan Zee, the Netherlands*

Ployon S., Belloir C., Bonnotte A., Canon F., Morzel M. (2014) L'astringence à la loupe, 5^e Journées de la microscopie DimaCell, Dijon.

Ployon S., Sémon E., Le Quéré J-L., Belloir C., Tromelin A., Guichard E., Morzel M., Francis Canon F. (2015) Développement d'une méthode d'analyse par PTR-MS de la désorption de composés d'arôme depuis un modèle in vitro de muqueuse orale, *Congrès Français de Spectrométrie de Masse et d'Analyse Protéomique (SMAP), Ajaccio.*

Ployon S., Pradels C., Belloir C., Morzel M., Canon F. (2016) Role of oral mucosa and mucosal pellicle in aroma persistence, *International Association for Dental Research, Seoul, Korea.*

COMMUNICATIONS ORALES

Ployon S., Belloir C., Bonnotte A., Canon F., Morzel M. (2015) Etude de l'implication de MUC1 dans l'adsorption des protéines salivaires MUC5B aux cellules de l'épithélium oral, *Forum des Jeunes Chercheurs, Dijon.*

Ployon S., Pradels C., Belloir C., Morzel M., Canon F. (2016) Interactions between aroma compounds and the oral mucosa could be responsible for aroma persistence, 4th International Conference on Food Oral Processing (FOP), Lausanne, Swizerland.

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Représentation schématique de la libération rétronasale des molécules d'arôme
Figure 2: Profils respiratoires obtenus après la consommation de solutions aromatisées avec a) de l'anéthol ou
b) du para-cymène (d'après Linforth and Taylor, 2001)23
Figure 3: Classification structurale des tanins25
Figure 4: Structure de monomères de proanthocyanidines (a) et d'acide gallique (b)
Figure 5: Les mécanismes pouvant intervenir conjointement dans la sensation d'astringence – 1) Agrégation
des protéines salivaires libres, 2) Déstructuration du film salivaire, 3) Précipitation des protéines de la
pellicule salivaire, 4) Diminution des propriétés de lubrification (activation de mécanorécepteurs), 5)
Détection des tanins par des chémorécepteurs et interaction avec la membrane des cellules épithéliales
orales
Figure 6: Représentation schématique de la muqueuse orale et de la pellicule mucosale
Figure 7: Immuno-détection des MUC5B (grains d'or) sur des coupes de cellules buccales cryofixées (Morzel et
al., 2014)
Figure 8: Les régimes de lubrification de la salive (Courbe de Stribeck) (adaptée de Coles et al., 2009)57
Figure 9: Structure d'isoformes de MUC1 (adapté de Hanisch & Müller, 2000)61
Figure 10: Images MEB de la surface de cellules épithéliales de la muqueuse bordante orale (Kullaa et al.,
2014)
Figure 11: Principe de la RT-PCR appliqué à la détection de MUC179
Figure 12: Vecteur pCMV6-Entry utilisé pour la transfection83
Figure 13: Principes de la microscopie focalisée et de la microscopie grand champ
Figure 14: Diagramme de phase du CO ₂ 87
Figure 15 : Viabilité des cellules incubées avec de la salive humaine
Figure 16: Exemple d'une membrane de Western Blot. Les MUC1 (avec ou sans le tag DDK) sont détectées
comme une seule bande immuno-réactive. Lignes 1 et 2: clones marqués DDK lysés au RIPA ou au FC14.
Ligne 3 : marqueur de poids moléculaire. Lignes 4, 5 et 6: clones non marqués. Ligne 7: salive clarifiée.
Ligne 8: marqueur de poids moléculaire90
Figure 17: Immunomarquage des MUC1 marquées DDK sur des cellules natives (A) et des cellules transfectées
(B)
Figure 18: Semi-quantification des MUC5B retenues en surface de cellules natives (T) et de quatre clones (13,
19, 20 et 23) : intensité de chimiluminescence sur des Dot-Blots91
Figure 19: Immunomarquage des MUC1 dans les cellules natives (A) ou transfectées (B) après induction de
leur production par différentes concentrations de NaBu92
Figure 20: observation confocale de cellules TR146 marquées avec du SYTO 9 (vert) et de l'IP (rouge). Lxl =
375 μm², z = 12,7 μm

Figure 21 : Superposition des images obtenues au confocal de cellules incubées 24h avec de la salive clarifiée
diluée. Les noyaux sont marqués au DAPI (bleu) et les MUC5B avec de l'Alexa 488 (vert). Vues en plan et
en coupe, L et l = 204,6 μm, épaisseur= 7,32 μm94
Figure 22 : Reconstitution 3D après acquisition d'images au microscope biphotonique de cellules incubées
24h avec de la salive clarifiée diluée/ Calibration x : 0,41 μm, y : 0,41 μm, z : 0,15 μm. L et l = 211,97 μm,
épaisseur = 10,35 μm94
Figure 23: Expression de MUC1 par la lignée TR146/MUC1 mise en évidence par RT-PCR (a) et
immunocytochimie sur les cellules natives TR146 (b) et transfectées TR146/MUC1 (c). Les noyaux sont
marqués au DAPI. Barre d'échelle = 100 μm95
Figure 24: Cellules TR146 (a et b) et TR146/MUC1 (c et d) observées au MEB. Barre d'échelle = 1 μM
Figure 25: Immunomarquage fluorescent des MUC5B sur les cellules TR146 (a) et TR146/MUC1 (b), TR146
incubée 2 h avec de la salive (c) TR146/MUC1 incubée 2 h avec de la salive. Barre d'échelle = 100 μm97
Figure 26 : Observation par MEB des cellules incubées 2 h avec de la salive. Cellules TR146 (a) et
TR146/MUC1 (b) : barre d'échelle = 1 μm. Détection par immuno-MEB des MUC5B (c) : les grains d'or
sont colorés en rose, barre d'échelle = 500 nm
Figure 27: Semi-quantification (moyenne ± écart-type) des MUC5B sur les cellules TR146 et TR146/MUC1
après incubation 2 h avec de la salive par mesure de la chimiluminescence de Dot-blot (a) ou
immunocytochimie et analyse d'image (b)
Figure 28 : Schéma du montage PTR-ToF-MS utilisé dans l'étude
Figure 29 : Protocole d'injection et de bACulement des circuits connectés au PTR-ToF-MS
Figure 30 : Suivi et obtention des courbes de libération de l'ion m/z
Figure 31 : Courbe des aires cumulées
Figure 32 : Paramètres extraits des courbes de libération (gauche) et de la courbe des aires cumulées (droite).
Figure 33 : Evaluation de la viabilité des cellules exposée 1 h à une solution d'arôme préparée dans du PBS.
Figure 34 : Coefficients de partage des cétones en présence de l'épithélium modèle avec et sans pellicule
mucosale
Figure 35 : Effet de la salive clarifiée diluée au demi sur le coefficient de partage de la nonan-2-one et de la
decan-2-one
Figure 36 : K normalisés (par rapport à la condition contrôle hydraté pour les conditions « Cellules » ou «
Cellules + pellicule », et par rapport au « tampon » pour la condition « salive clarifiée diluée ») de
différentes molécules d'arôme
Figure 37 : K en présence de la muqueuse modèle normalisés par K_{CH} et exprimés en fonction de
l'hydrophobie des molécules
Figure 38 : A. Chromatogramme GC-MS de la nonan-2-one pure ; B. Chromatogramme de l'extrait obtenu à
partir du surnageant après incubation des cellules par la nonan-2-one.
Figure 39 : A. Spectres de fragmentation du composé produit ; B. Spectre de fragmentation de la nonan-2-ol.

Figure 40 : Courbes de libération (gauche) et de cumul des aires (droite) de la pentan-2-one	
Figure 41 : Courbes de libération (gauche) et de cumul des aires (droite) de l'octan-2-one	
Figure 42 : Courbes de libération et courbes des aires cumulées de la pentan-2-one (haut) et de l'octan	-2-one
(bas) injectées sous forme d'une fraction de gaz aromatisé	
Figure 43 : Courbes de libération et courbes des aires cumulées de la pentan-2-one (haut) et de l'octan	-2-one
(bas) injectées sous forme d'une solution aqueuse aromatisée	
Figure 44 : Suivi de la libération des ions m/z = 89,14 et m/z = 131,22.	
Figure 45 : Comparaison du spectre théorique de l'octan-2-one et des spectres moyens obtenus avec le	e CH
(Témoin) ou en présence des cellules	
Figure 46: Valeurs de K des cétones linéaires méthylées dans l'eau trouvées dans la littérature exprime	ées en
fonction du log P des molécules (croix) et K des cétones dans le PBS calculés dans cette étude (po	ints) 149
Figure 47: Rétention des molécules d'arôme par la muqueuse orale et de la pellicule mucosale. 1. Réter	ntion
des cétones en surface de la muqueuse orale via des effets hydrophobes ; 2. Rétention de la penta	n-2-one
par des protéines de la pellicule salivaire par des interactions électrostatiques. Interactions limite	ées de
l'octan-2-one (stérique)	157
Figure 48 : Métabolisation des molécules d'arôme par les EMX cellulaires et production de nouveaux	
composés aromatiques. 1. Absorption et métabolisation des molécules d'arômes par les EMX cell	ulaires;
2. Diffusion des molécules à travers la pellicule salivaire; 3. Diffusion à travers la pellicule facilité	e pour
les petites molécules hydrophiles; 4. Meilleure perméabilité membranaire pour les molécules	
hydrophobes	158
Figure 49 : Clivage enzymatique de PRB4S (d'après PACal <i>et al.</i> , 2006)	
Figure 50 : Analyse d'image et détection de la fluorescence avec le logiciel ImageJ	167
Figure 51 : Toxicité des tanins à différentes concentrations	169
Figure 52 : Immunomarquage des MUC5B après exposition du modèle cellulaire à une solution de tani	ns EgCG
ou EgCG à différentes concentrations. A. Témoin, B. EgCG 0,05 mM, C. EgCG 1 mM, D. EgC 0,05 mM	I, E. EgC
1 mM. Barre d'échelle 100 μm	
Figure 53 : Tapissage de la surface des cellules par les MUC5B lors de l'exposition du modèle à des solu	ution
d'EgC et d'EgCG de différentes concentrations	
Figure 54 : Taille moyenne des dépôts de mucines (MUC5B) lors de l'exposition du modèle cellulaire à	des
solutions d'EgC et d'EgCG de différentes concentrations	
Figure 55 : Evaluation de l'intensité de la fluorescence des échantillons lors de l'exposition du modèle	
cellulaire à des solutions d'EgC et d'EgCG de différentes concentrations	
Figure 56 : Observation MEB du modèle cellulaire après exposition à des solutions de tanins. A. Témoir	n ; B.
EgCG 0,05 mM ; C. EgC 0,05 mM ; D. EgCG 1mM ; E. EgC 1 mM. Barre d'échelle 1 μm	174
Figure 57 : A. IB5 0,33 mM + EgCG 0,5 mM, B. IB5 0,33 mM + EgCG 1 mM. Barre d'échelle = 100 μm	175
Figure 58 : Effet d'IB5 sur le tapissage de cellules par les MUC5B lors de l'ajout d'EgCG	176
Figure 59 : Effet d'IB5 sur la taille moyenne des dépôts de MUC5B lors de l'ajout d'EgCG	177
Figure 60 : Effet d'IB5 sur l'intensité de fluorescence des échantillons lors de l'ajout d'EgCG	

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Familles chimiques et exemples de molécules d'arômes alimentaires
Tableau 2: Seuils orosensoriels de perception de l'astringence de quelques monomères de proanthocyanidines
(stéréochimie du cycle B non précisée, d'après Scharbert et al., 2004)
Tableau 3 : Effect of specific salivary components on aroma release
Tableau 4 : Saliva effects on aroma release from food matrix
Tableau 5: Effet des polyphénols sur la libération des arômes du vin53
Tableau 6: Lignées et modèles cellulaires d'épithélium oral64
Tableau 7: Avantages et inconvénients des techniques de microscopies. D'après Wilson et al. (2012) et
Heinisch et al. (2012)67
Tableau 8: Comparaison des principales techniques d'extraction de l'espace de tête en analyse d'arôme69
Tableau 9: Etapes de la transcription inverse. 80
Tableau 10: Cycles d'amplification PCR
Tableau 11 : Liste et propriétés chimiques des molécules d'arômes utilisées
Tableau 12 : K théoriques et concentrations de solutions d'arômes utilisées pour les injections sous forme de
gaz aromatisé
Tableau 13 : Suivi et d'analyse des ions moléculaires par PTR-MS
Tableau 14 : Bornes d'intégrations utilisées pour l'extraction des données de libération de l'octan-2-one et des
isotopes M + 1 et M + 2
Tableau 15: identification des métabolites135
Tableau 16 : Paramètres moyens de libération des conditions Contrôle Hydraté (CH) normalisés par rapport
au Contrôle Sec (CS) – Les données brutes ont été soumises à un test non paramétrique de Mann Whitney
(p< 0,05)
Tableau 17 : Paramètres de libération de la pentan-2-one injectée sous forme de gaz aromatisé. Les valeurs de
la condition (Cellules ou Cellules + pellicule) sont normalisées par rapport à la condition Contrôle
Hydraté. Les valeurs en rose indiquent une différence significative entre le CH et la condition, l'étoile
indique une différence significative entre la condition Cellules et la condition Cellules + pellicule pour le
paramètre étudié
Tableau 18 : Paramètres de libération de l'octan-2-one injectée sous forme de gaz aromatisé. Les valeurs de la
condition (Cellules ou Cellules + pellicule) sont normalisées par rapport à la condition Contrôle Hydraté
(CH). Les valeurs en rose indiquent une différence significative entre le CH et la condition, l'étoile indique
une différence significative entre la condition Cellules et la condition Cellules + pellicule pour le
paramètre étudié
Tableau 19 : Paramètres de libération de la pentan-2-one injectée sous forme de solution aqueuse aromatisée.

Les valeurs de la condition (Cellules ou Cellules + pellicule) sont normalisées par rapport à la condition Contrôle Hydraté (CH). Les paramètres en rose indiquent une différence significative entre le CH et la

condition, l'étoile indique une différence significative entre la condition Cellules et la condition Cellules +
pellicule pour le paramètre étudié
Tableau 20 : Paramètres de libération de la octan-2-one injectée sous forme de solution aqueuse aromatisée.
Les valeurs de la condition (Cellules ou Cellules + pellicule) sont normalisées par rapport à la condition
Contrôle Hydraté. Les paramètres en rose indiquent une différence significative entre le CH et la
condition, l'étoile indique une différence significative entre la condition Cellules et la condition Cellules +
pellicule pour le paramètre étudié
Tableau 21 : Comparaison des abondances relatives théoriques des isotopes M et M +1 et des abondances
réelles mesurées
Tableau 22 : Quelques valeurs et conditions expérimentales de mesures de K de cétones 148
Tableau 23 : Protocoles d'évaluation du seuil de précipitation d'IB5 par l'EgCG165
Tableau 24 : Différentes conditions d'exposition aux tanins et aux PRP testées

LISTE DES ABREVIATIONS

Α	Adénosine		
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire		
AFM	Microscopie à force atomique (atomic force microscopy)		
ALDH	Aldéhyde deshydrogénase		
APCI	Ionisation chimique à pression atmosphérique (atmospheric pressure		
	chemical ionisation)		
ARNm	Acide ribonucléique messager		
AC(t)	Aire sous courbe (à l'instant t)		
ACn	Aire sous courbe normalisée		
С	Cytosine		
Cai	Concentration de la phase aqueuse du composé i		
CAVI	Anhydrase carbonique IV		
CD36	Cluster de différenciation 36		
Cgi	Concentration dans la phase gazeuse du composé i		
СН	Contrôle hydraté		
Со	Concentration dans l'octanol		
CPD	Séchage supercritique (critical point drying)		
CS	Contrôle sec		
Cw	Concentration dans l'eau		
DAPI	4',6-diamidino-2-phénylindole		
DCXR	Dicarbonyl/L-xylulose reductase		
DHS	Espace de tête dynamique (dynamic headspace)		
DMSO	Diméthylsufoxyde		
DP	Degré de polymérisation		
E/N	Ratio de densité de champ (field density ratio)		
EC	Epicatéchine		
EgC	Epigallocatéchine		
EgCG	Epigallocatéchine gallate		
EMX	Enzyme de métabolisation des xénobiotiques		
EtOH	Ethanol		
FC	Fos-choline		
FID	Détecteur à ionisation de flamme (flame ionization detector)		
G	Guanine		
GC	Chromatographie gazeuse		
GLC	Chromatographie gazeuse en phase liquide		
GPR120 :	Récepteur couplé à une protéine G (G-protein coupled receptor) 120		
Hi	Constante de solubilité de Henry du composé i		
IgA	Immunoglobuline A		
Imax	Intensité maximum		
ImmunoMEB	Immuno-microscopie électronique à balayage		
IP	Iodure de propidium		
Ki(c)	Constante de volatilité du composé i (dans la condition c)		
Log P	Coefficient de partage eau - octanol		

ME	Microscop(i)e électronique	
MEB	Microscop(i)e électronique à balayage	
MET	Microscop(i)e) électronique à transmission	
MPL	Microplicae	
MS	Spectrométr(i)e de masse (mass spectromet(ry)er)	
MUC	Mucine	
NaBu	Butyrate de sodium	
NaCl	Chlorure de sodium	
NAD	Nicotinamide adénine dinucléotide	
NADP	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate	
NH ₄ Cl	Chlorure d'ammonium	
OBP	Protéine de liaison aux odorants (odorant binding protein)	
PBS	Tampon phosphate (phosphate buffer solution)	
PFA	Paraformaldéhyde	
Pi	Pression partielle du composé i	
Ppbv	Partie par milliard sur base volumique	
PRP	Protéine riche en proline	
PTR	Réaction par transfert de proton (proton transfer reaction)	
RMN	Résonance magnétique nucléaire	
SHS	Espace de tête statique (static headspace)	
SOOM	Spitt-off measurement	
SPME	Microextraction en phase solide (solid phase microextraction)	
Т	Thymine	
TGM	Transglutaminase	
ToF	Temps de vol (time of flight)	
TR	Récepteur du goût (taste receptor)	
VNTR	Séquence à répétition en tandem polymorphe (variable number tandem repeat)	
VSC	Composé soufré volatil (volatile sulfur compound)	
xi	Fraction molaire du composé i	

INTRODUCTION

INTRODUCTION

La perception de la flaveur des aliments, qui englobe les sensations gustatives, les sensations rétro-olfactives et les sensations trigéminales, est un déterminant majeur de l'acceptabilité et des choix alimentaires. Les composés de la flaveur (molécules sapides, molécules d'arôme, molécules à effet trigéminal, composés astringents) sont en partie responsables des qualités organoleptiques des aliments (Sørensen, Møller et al. 2003).

La salive intervient dans la perception sensorielle des aliments notamment puisqu'elle permet la lubrification des particules alimentaires, facilitant ainsi leur déglutition mais aussi la libération des composés de la flaveur des matrices alimentaires et leur diffusion au sein de la cavité orale (Salles, Chagnon et al. 2011, Neyraud 2014). Le rôle de la salive dans la perception sensorielle des aliments est en partie du à sa composition en protéines. En effet, certaines protéines salivaires sont capables d'interagir avec les composés de la flaveur notamment les tanins (Yan and Bennick 1995, Lu and Bennick 1998) et les molécules d'arômes (van Ruth, Grossmann et al. 2001, Pages-Helary, Andriot et al. 2014), et ainsi pourraient moduler la concentration et/ou la cinétique de libération de ces composés en bouche.

Si par le terme « salive » on pense dans un premier temps au fluide présent dans la bouche et dégluti, il est important de préciser qu'une partie des protéines de la salive est adsorbée en surface des cellules épithéliales et forme une structure anatomique appelée pellicule mucosale (Bradway, Bergey et al. 1989). Cette structure pourrait interagir avec des composés de la flaveurs et ainsi moduler leur perception. Ainsi, le projet d'ANR MUcosal salivary Film et Flavor Interactions (MUFFIN), dans lequel s'inscrit cette thèse, s'intéresse aux mécanismes d'interactions moléculaires entre la pellicule mucosale et les composés de la flaveur en se concentrant sur deux modalités sensorielles : l'astringence et la persistance aromatique. Bien que ces deux phénomènes sensoriels aient été à différentes reprises étudiés, les mécanismes moléculaires impliqués ne sont à ce jour pas complètement compris.

Des études *in vivo* sur les interactions entre pellicule mucosale et composés de la flaveur seraient difficiles à mener du fait de la très grande variabilité interindividuelle existante, de la difficulté à contrôler les différents paramètres physiologiques et de l'impossibilité d'utiliser certaines méthodes d'analyse et de caractérisation sur des sujets humains. C'est pourquoi l'objectif global de cette thèse était de développer un modèle d'épithélium oral incluant la pellicule mucosale

INTRODUCTION

puis de tester son applicabilité à l'étude *in vitro* des interactions entre molécules de la flaveur et pellicule mucosale.

Les travaux sont articulés en axes principaux.

Dans un premier temps, un modèle cellulaire *in vitro* d'épithélium oral doté d'une pellicule mucosale a été développé. Au cours de ce développement, dans le but d'améliorer le modèle, nous nous sommes intéressés au rôle de la mucine membranaire MUC1 dans l'ancrage des protéines salivaires aux cellules épithéliales. Le modèle proposé a été caractérisé par différents types de microscopie, apportant ainsi des informations structurales essentielles sur la pellicule salivaire.

Dans le deuxième axe, le modèle cellulaire a été appliqué à l'étude des mécanismes moléculaires d'interaction entre l'épithélium oral, la pellicule mucosale et les molécules d'arômes. Pour ce faire, deux stratégies ont été mises en place. Des analyses à l'équilibre thermodynamique des molécules d'arôme ont été effectuées par chromatographie gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme (GC-FID) afin de mettre en évidence les interactions pouvant exister entre muqueuse orale et molécules d'arôme. Une deuxième étude a porté sur le processus dynamique de libération des molécules d'arômes par spectrométrie de masse à ionisation par transfert de proton (PTR-MS).

Enfin, le troisième axe visait à étudier par une approche microscopique le processus par lequel la pellicule mucosale pourrait contribuer à la sensation d'astringence. Pour cela, en utilisant le modèle développé, la muqueuse modèle a été exposée à des solutions de composés astringents que sont les tanins. Les modifications induites par cette exposition ont été caractérisées par microscopie. L'hypothèse d'un rôle protecteur de protéines salivaires particulières, les protéines riches en proline basiques (bPRP), contre la déstructuration de la pellicule a également été étudiée.

ETAT DE L'ART

1. LA PERCEPTION SENSORIELLE DES ALIMENTS : GENERALITES

La perception sensorielle désigne l'ensemble des informations apportées par les cinq sens : la vision, l'olfaction, la gustation, l'audition et le toucher.

Un aliment émet des informations sensorielles perçues par le consommateur avant même sa mise en bouche. La vision et l'olfaction sont en général les premiers sens mobilisés et vont guider en partie les choix et la prise alimentaires (Clydesdale 2009, Burger, Cornier et al. 2011, Gaillet, Sulmont-Rossé et al. 2013). Des informations sur la texture et les propriétés mécaniques de l'aliment sont apportées par la vision et le toucher (Chen 2007). Bien que le rôle de l'audition soit relativement mineur dans la perception des aliments, certains aliments, comme les aliments croustillants produisent un bruit caractéristique lorsqu'ils sont manipulés (Vickers and Bourne 1976).

Dans un second temps, la texture et la flaveur sont perçues lors de la mise en bouche. Ces modalités sont des éléments clés de l'acceptabilité des aliments par les consommateurs. Le terme flaveur est un terme générique qui regroupe trois modalités sensorielles : les sensations gustatives ou saveurs, les sensations rétro-olfactives ou arôme et les sensations trigéminales. Les molécules de la flaveur sont libérées en bouche lors de la déstructuration de l'aliment, et solubilisées dans la salive avant d'atteindre leurs différentes structures réceptrices lorsque celles-ci sont dans la cavité orale. Les molécules d'arôme sont elles libérées de la salive vers la phase gazeuse de la cavité buccale puis nasale, et sont ensuite solubilisées dans le mucus nasal couvrant les cellules réceptrices.

Les sensations gustatives résultent du traitement cérébral d'informations provoquées par l'activation, par des molécules sapides, de chémorécepteurs situés dans la cavité orale. Pendant longtemps, il a été considéré l'existence de cinq saveurs, sucré, salé, acide, amer et umami, mais le gras est depuis peu considéré comme une sixième saveur (Running, Craig et al. 2015). Les récepteurs T1R aux saveurs sucrée et umami (Zhao, Zhang et al. 2003) et les récepteurs à l'amertume T2R (Adler, Hoon et al. 2000) sont des récepteurs couplés à une protéine G. Ces trois saveurs sont provoquées par diverses molécules sapides, dont les principales sont respectivement les sucres et édulcorants, le glutamate et les molécules amères, par exemple la quinine et la caféine. Plusieurs récepteurs permettraient la détection des acides gras, par exemple le GPR120, qui appartient lui aussi à la famille des récepteurs couplés à une protéine G (Galindo, Voigt et al. 2012)

et le récepteur CD36 (Degrace-Passilly and Besnard 2012). Les récepteurs aux saveurs salée et acide sont quant à eux des canaux ioniques, activés par une élévation des teneurs en ions Na⁺ et H⁺ dans la salive.

Les composés et les mécanismes à l'origine des sensations rétro-olfactives, responsables de l'arôme des aliments, seront détaillés dans le paragraphe 2 de cet état de l'art.

Les sensations trigéminales résultent de la stimulation du nerf trijumeau lors de l'activation de différents types de récepteurs (mécanorécepteurs, thermorécepteurs et chémorécepteurs) par divers composés chimiques volatils ou non. Par exemple, la « pseudo-chaleur » ressentie lors de la consommation de piments ou à l'opposé la sensation de fraicheur associée aux produits mentholés sont dues respectivement à deux composés, la capsaïcine et le menthol. L'astringence a été récemment décrite comme une sensation trigéminale (Schobel, Radtke et al. 2014). Cette sensation, caractéristique de certains produits tels que le vin ou le thé, sera détaillée dans le paragraphe 3.

2. LA LIBERATION DES MOLECULES D'AROME ET LA PERCEPTION AROMATIQUE

2.1. LES MOLECULES D'AROME

2.1.1. Définition

Appelées aussi composés odorants volatils, les molécules d'arômes sont des petites molécules volatiles à température ambiante, ayant un poids moléculaire inférieur à 400 Da. Les arômes n'apportent aucune qualité nutritive aux aliments dans lesquels ils sont présents en général à des concentrations de l'ordre de quelques ppm (Richard and Multon 1992).

2.1.2. Structure chimique

Les molécules d'arôme présentent une très grande diversité chimique et structurale. Il est difficile de classer les arômes en fonction de leur famille et structure chimique puisque de nombreuses molécules d'arôme sont les molécules polyfonctionnelles. Les familles chimiques majeures auxquelles appartiennent les molécules odorantes sont présentées dans le Tableau 1 avec quelques exemples de composés pour chacune.

Familles chimiques	Exemples
Hydrocarbures	Limonène, β-pinène
Composés corbonylés : Aldéhydos at Cétanos	Hexanal, Benzaldéhyde
composes carbonyles : Aldenydes et Cetones	Octan-2-one, Carvone
Acides	Acide butyrique
Alcools et phénols	Octan-3-ol, Thymol
Esters et lactones	Acétate de butyle
Thiols	Disulfure de diméthyle
Amines	Triméthylamine
Hétérocycles : Furanes et Pyranes	Méthylfurane, Pyrazine

Tableau 1: Familles chimiques et exemples de molécules d'arômes alimentaires.

2.1.3. Propriétés physico-chimiques

Cette section présente quelques propriétés physico-chimiques caractéristiques du comportement des molécules d'arôme.

2.1.3.1. Volatilité

La volatilité est la mesure de la capacité d'une substance à se vaporiser.

Une molécule est dite volatile quand sa pression de vapeur saturante à température ambiante est élevée. Dans un système fermé à température constante, la pression de vapeur saturante est la pression à laquelle la phase gazeuse d'un composé ou d'un mélange est en équilibre avec sa phase liquide.

La pression de vapeur saturante à température ambiante des molécules d'arôme est relativement élevée (en général de l'ordre de quelques mmHg). Ainsi, à pression atmosphérique et température ambiante, les molécules d'arômes sont en général très volatiles bien qu'il existe quelques exceptions, comme par exemple la vanilline qui a une pression de vapeur relativement faible (Pvap = 1,18.10⁻⁴ mmHg (Episuit)).

2.1.3.2. Solubilité

La solubilité est la capacité d'un soluté à se dissoudre dans un solvant. Dans le cas des produits alimentaires, qui contiennent généralement une importante fraction aqueuse, le solvant est très souvent l'eau.

Les molécules d'arôme sont présentes en très faible quantité dans les aliments (de l'ordre du ppm ou moins) et obéissent donc à la loi de Henry (Taylor 1998). Celle-ci énonce qu'à *température constante et à l'équilibre, la quantité de gaz dissous dans un liquide est proportionnelle à la pression partielle qu'exerce ce gaz sur le liquide.* La loi de Henry s'applique uniquement aux solutions assez diluées dans lesquelles on peut considérer l'absence d'interactions moléculaires. Dans le cas d'une solution aqueuse, à température constante, dans un volume clos donné, le partage d'un composé d'arôme i entre la phase aqueuse et la phase gazeuse s'exprime par la constante de solubilité de Henry H_i (en 1/atm):

$$Hi = \frac{xi}{Pi}$$

Avec P_i la pression partielle du composé i dans la phase gaz (en atm) et x_i la fraction molaire du composé i dans la phase aqueuse.

Il existe de nombreuses variantes de la constante de Henry (Sander 2015). Elle est notamment exprimée comme le ratio sans dimension de la concentration du composé *i* dans la phase aqueuse Ca_i sur sa concentration dans la phase gaz Cg_i :

$$Hi = \frac{Cai}{Cgi}$$

La constante de volatilité Ki est définie comme l'inverse de la constante de Henry $Ki = \frac{1}{Hi}$ et est aussi appelée coefficient de partage air/liquide.

La solubilité des molécules d'arômes dans un solvant est directement liée à leur polarité. Elle est très variable et diminue rapidement avec l'augmentation de la longueur de la chaîne aliphatique. Ainsi, la solubilité dans l'eau peut aller jusqu'à plusieurs grammes par litre pour les petits acides mais elle est faible voire nulle pour les hydrocarbures comme par exemple le limonène.

2.1.3.3. Polarité

La polarité définit la répartition des charges positives et négatives dans une molécule, appelée dipôle.

De par leur grande variété chimique, les molécules d'arôme présentent une large gamme de polarité. Les liaisons carbone-hydrogène sont non polaires et n'induisent donc pas de polarité des molécules. Les atomes d'oxygène, souvent présents dans les molécules d'arôme, possèdent une forte électronégativité et par conséquent induisent la polarisation de la molécule.

On classe la polarité des fonctions chimiques de la façon suivante :

Acides > Alcools > Cétones > Aldéhyde > Amine > Ester > Hydrocarbures

La polarité des molécules influe sur leurs propriétés physicochimiques. Ainsi, les molécules polaires sont très solubles dans l'eau à l'inverse des molécules apolaires, qui sont hydrophobes.

2.1.3.4. Hydrophobie

L'hydrophobie caractérise la propriété d'une molécule à ne pas être soluble dans l'eau. La mesure de la solubilité dans l'eau traduit donc le caractère hydrophile ou hydrophobe des molécules. Elle est définie par leur log P (ou Log Kow) qui mesure la solubilité différentielle d'un composé entre deux volumes identiques d'eau et d'octanol. Cette grandeur est appelée aussi coefficient de partage octanol/eau et se calcule de la façon suivante :

$$\log P = \log(\frac{Co}{Cw})$$

où Co est la concentration de la molécule dans l'octanol et Cw sa concentration dans l'eau.

La solubilité des molécules d'arômes peut être diminuée par la présence d'électrolytes ou d'autres molécules, qui exercent alors un effet de relargage, tels que les sels ou les sucres (Friel and Taylor 2001) ou d'autres composés d'arômes ayant une plus forte affinité pour le solvant. Il est donc important dans le cas de la préparation de solutions complexes d'arôme, de ne pas tenir compte de la solubilité individuelle de chaque composé.

2.2. MECANISMES DE LA PERCEPTION AROMATIQUE

2.2.1. Bases physiologiques de la perception olfactive

Le système olfactif des mammifères est capable de détecter et discriminer un grand nombre de molécules odorantes par le biais de récepteurs olfactifs au niveau de l'épithélium olfactif situé dans la cavité nasale. Les récepteurs appartiennent à la famille des récepteurs couplés à une protéine G (Buck and Axel 1991). L'activation d'un récepteur olfactif induit la création d'un message nerveux conduit vers le bulbe olfactif via le nerf olfactif CN I.

L'épithélium olfactif est recouvert d'un mucus aqueux, constituant une barrière biologique aux molécules gazeuses dont la solubilisation et la diffusion à travers cette barrière sont directement liées à leur solubilité dans l'eau (Medinsky and Bond 2001). Pour les composés les plus hydrophobes, leur diffusion et par conséquent leur détection seraient facilitées par la présence dans le mucus nasal (Pevsner, Sklar et al. 1986, Pelosi 2001) de protéines de liaisons ou « Odorant Binding Proteins» (OBPs), petites protéines s'apparentant à la famille des lipocalines.

L'accès des molécules odorantes à la cavité nasale peut se faire par deux voies. L'odeur est perçue directement par le nez, ou voie orthonasale tandis que l'arôme est perçu par la voie rétronasale.

2.2.2. Libération en bouche et perception rétronasale

La perception rétronasale nécessite une première étape de libération des molécules d'arôme de la matrice alimentaire. Celle-ci est facilitée par une succession d'étapes en bouche schématisés et numérotés de 1 à 3 sur la Figure 1.

Lors de la mastication, l'aliment est déstructuré et ses propriétés rhéologiques sont modifiées afin de permettre sa déglutition (van der Bilt, Engelen et al. 2007, Loret, Walter et al. 2011). Conjointement, la mastication et la salivation permettent aussi la solubilisation des composés aromatiques présents dans la matrice alimentaire dans la salive, à la fois en augmentant la surface d'échange par réduction de la taille des particules alimentaire et en facilitant la diffusion des molécules à travers le bol (étape 1) (Pionnier, Chabanet et al. 2004, Doyennette, Déléris et al. 2011). Le rôle détaillé de la salive dans la libération des molécules aromatiques fera l'objet du paragraphe 4.2.

Les molécules d'arôme sont ensuite libérées de la phase aqueuse que constitue la salive vers l'air de la cavité orale (étape 2). Lors de la déglutition, le flux d'air provoqué par l'ouverture du velum entraine le transfert des molécules d'arôme vers la cavité nasale (Buettner, Beer et al. 2001, Hodgson, Linforth et al. 2003) (étape 3). La quantité totale d'arôme atteignant la cavité nasale est corrélée positivement avec le nombre de déglutitions (Boisard, Tournier et al. 2014). C'est lors de la première déglutition, que la plus grande quantité de molécules d'arôme est libérée vers la cavité nasale (Linforth and Taylor 2000).



Figure 1: Représentation schématique de la libération rétronasale des molécules d'arôme.

Dans les matrice simples, du type gels aromatisés, l'intensité de la perception ne semble pas liée à la quantité totale d'arôme libéré, mais plutôt au taux de libération, une libération plus lente induisant une perception moins intense (Baek, Linforth et al. 1999).

2.3. PARAMETRES INFLUANT SUR LA LIBERATION DES MOLECULES D'AROME

2.3.1. Physiologie et variabilité interindividuelle de la libération et de la perception aromatique

Si la libération des molécules d'arôme suit un schéma global commun, cela reste un phénomène étroitement dépendant de paramètres physiologiques individuels.

L'activité masticatoire (incluant nombre de cycles masticatoires, durée et amplitude de la mastication) est décrite comme le paramètre physiologique majeur influant sur la libération des molécules d'arôme (Repoux, Sémon et al. 2012, Labouré, Repoux et al. 2014).

Des différences au niveau des patterns de déglutition, notamment dans la variation du volume de la cavité orale lors de la déglutition (Mishellany-Dutour, Woda et al. 2012) ainsi que dans la fréquence d'ouverture du velum (Labouré, Repoux et al. 2014) ont aussi été associées à des différences interindividuelles de libération des molécules d'arôme vers la cavité nasale.

ETAT DE L'ART

2.3.2. Influence de la matrice alimentaire

Parallèlement à la variabilité physiologique individuelle, la libération des arômes est influencée par les propriétés de la matrice alimentaire, en particulier ses propriétés rhéologiques et sa composition.

Dans le cas de gels, la libération des composés volatils mesurée *in vitro* (Hansson, Giannouli et al. 2003, van Ruth and King 2003, Boland, Buhr et al. 2004) comme *in vivo* (Frank, Eyres et al. 2015) est généralement inversement corrélée à la viscosité du gel du fait de la diminution de la diffusion des molécules à travers les gels les plus durs. Cependant, dans le cas de produits laitiers, la diminution de la viscosité n'est pas nécessairement synonyme d'augmentation de libération des arômes (Gierczynski, Guichard et al. 2011), ce qui souligne que la nature et de la composition de la matrice sont également des paramètres importants à prendre en compte.

La distribution des composés d'arômes est modifiée par des mécanismes moléculaires de diverses natures s'établissant entre constituants alimentaires et molécules d'arôme (Solms, Osman-Ismail et al. 1973). Les sels et sucres exercent un effet de « salting out » ou relargage (Friel and Taylor 2001, Boisard, Tournier et al. 2014). Les carbohydrates, souvent utilisés dans les aliments comme agents épaississants, influent sur la libération des molécules d'arôme en modifiant la viscosité de la matrice mais aussi par le biais d'interactions moléculaires entre molécules d'arôme et carbohydrates (Naknean and Meenune 2010), telles que la formation de liaisons hydrogènes (Le Thanh, Thibeaudeau et al. 1992).

2.3.3. Cas particulier des protéines

La présence de protéines influe très largement sur le comportement des molécules d'arôme du fait d'interactions possibles entre ces deux types de molécules (Kinsella 1988, O'Neill 1996, Guichard 2006). Parmi les protéines alimentaires les plus étudiées, on citera la β -lactoglobuline (O'Neill and Kinsella 1987, Pelletier, Sostmann et al. 1998, Andriot, Harrison et al. 2000, Reiners, Nicklaus et al. 2000), les caséines (Fares, Landy et al. , Le Thanh, Thibeaudeau et al. 1992) ou le collagène contenu dans la gélatine (Zafeiropoulou, Evageliou et al. 2012).

Les interactions entre protéines et molécules d'arôme peuvent être de natures diverses. Dans la plupart des cas, elles impliquent des interactions non covalentes de types effet hydrophobe et liaisons hydrogènes (Lubbers, Landy et al. 1998). Par exemple, il a été observé que des cétones méthylées s'enchâssent dans la cavité hydrophobe de la β -lactoglobuline guidées par des effets hydrophobes (O'Neill and Kinsella 1987, Andriot, Harrison et al. 2000). Un mécanisme similaire a

été observé entre les caséines et diverses molécules d'arômes (Le Thanh, Thibeaudeau et al. 1992). Il a été montré que des interactions électrostatiques et des liaisons covalentes de type ponts disulfures, pouvaient aussi s'établir entre molécules d'arôme et protéines (Wang and Arntfield 2016).

Pour résumer et conclure sur ces deux paragraphes, la libération des molécules d'arôme est un phénomène complexe, dépendant de nombreuses variables, autant physiologiques, liées au consommateur, que physico-chimiques, liées à la matrice alimentaire et aux molécules arômes. Certains de ces paramètres sont étroitement liés.

2.4. LA PERSISTANCE AROMATIQUE

2.4.1. Définition

Certains aliments (notamment certains vins) sont caractérisés par une perception prolongée de l'arôme, appelé persistance aromatique.

Ce phénomène de persistance a été caractérisé analytiquement par le suivi des molécules odorantes dans l'air expiré au cours des cycles respiratoires, après la consommation de solutions aromatisées (Linforth and Taylor 2000, Wright, Hills et al. 2003, Buffo, Rapp et al. 2005). Dans la Figure 2 sont représentés deux profils respiratoires relevés lors de la consommation de deux solutions d'anethol (a) et de para-cymène (b). Si le para-cymène n'est plus détecté après quelques secondes, le signal de l'anéthol persiste dans chaque volume d'air expiré pendant plusieurs dizaines de secondes après déglutition (Linforth and Taylor 2000).



Figure 2: Profils respiratoires obtenus après la consommation de solutions aromatisées avec a) de l'anéthol ou b) du para-cymène (d'après Linforth and Taylor, 2001).

2.4.2. Origine

La mesure de la persistance de composés dans l'air expiré après consommation de solutions aqueuses aromatisées a permis d'établir des modèles prédictifs, basés sur les propriétés physicochimiques des molécules d'arôme. La persistance des composés est corrélée avec la pression de vapeur saturante (et donc la volatilité) (Linforth and Taylor 2000, Wright, Hills et al. 2003, Buffo, Rapp et al. 2005), l'hydrophobie des molécules (Linforth and Taylor 2000, Wright, Hills et al. 2003) et le nombre de groupements carbonyles (Wright, Hills et al. 2003). Cela peut s'expliquer par le fait que les molécules d'arôme ayant une plus grande affinité pour la phase aqueuse (mélange bol et salive) sont libérées plus lentement, de même que les molécules moins volatiles. Après déglutition, les muqueuses orale et pharyngée étant tapissées par un fin film résiduel, mélange de salive et de résidus alimentaires (de Loubens, Magnin et al. 2011), la libération de composés volatils peut perdurer plusieurs minutes (Buettner and Mestres 2005).

Un second mécanisme a été proposé pour expliquer l'origine de la persistance aromatique. La persistance sensorielle des notes de vins de Chardonnay (Buettner 2004) et d'arômes de fraise (Buettner and Mestres 2005) a été corrélée avec une persistance intra-orale des composés d'arômes associés. Les auteurs de ces recherches ont suggéré qu'un effet de rétention des molécules aromatiques par la muqueuse orale serait responsable de cette persistance intra-orale et par conséquent de la persistance rétronasale.

La capacité de la muqueuse orale à retenir les molécules d'arôme a été étudiée et démontrée par quantification différentielle d'arômes dans des échantillons de solutions aqueuses aromatisées (Hussein, Kachikian et al. 1983, Buettner, Beer et al. 2002) et de vin (Esteban-Fernandez, Rocha-Alcubilla et al. 2016) mis en bouche puis expectorés. Les mécanismes moléculaires à l'origine des interactions entre molécules d'arômes et muqueuse orale restent à ce jour pas mal compris. En effet, aucune corrélation claire n'a été établie entre rétention et caractère hydrophobe des molécules, le composé le plus hydrophile étudié, le gaiacol (log P = 1,34) et deux des composés les plus hydrophobes, à savoir la β -ionone (log P = 4,42) et hexanoate d'ethyl (Log P = 3,38) ayant présenté la plus forte rétention (Esteban-Fernandez, Rocha-Alcubilla et al. 2016). Il a aussi été rapporté une diminution de la persistance intra-orale avec l'augmentation de la polarité des composés (Buettner and Schieberle 2000). Outre les propriétés physico-chimiques des molécules, la quantité relative d'arôme retenu semble être liée à la concentration initiale, le pourcentage persistant en bouche étant d'autant plus important que la concentration en arôme utilisée est faible (Buettner and Schieberle 2000).

3. LA SENSATION D'ASTRINGENCE

L'astringence est définie comme l'ensemble des sensations d'assèchement et de rugosité des tissus buccaux, ainsi qu'une sensation d'étirement des joues et des muscles du visage (ASTM 1989). Cette sensation est caractéristique des tanins, molécules présentes dans de nombreux produits alimentaires d'origine végétale, tels que les fruits rouges, le vin ou le thé.

3.1. LES TANINS

3.1.1. Diversité des tanins

Les tanins sont des molécules organiques synthétisées par les végétaux. Ils appartiennent à la famille des polyphénols. Les tanins ont tout d'abord été décrits comme l'ensemble des composés phénoliques hydrosolubles de masse molaire comprise entre 500 et 3000 Da capables de précipiter les alcaloïdes et diverses protéines (Bate-Smith and Swain 1962). Cependant, cette définition n'inclut pas les tanins de masse supérieure à 20 000 Da découverts plus récemment (Khanbabaee and van Ree 2001).

La classification des tanins (Figure 3) est basée sur leurs propriétés structurales (Khanbabaee and van Ree 2001).



Tanins

Figure 3: Classification structurale des tanins.

Les **tanins hydrolysables** sont constitués d'un noyau polyol, dont les fonctions hydroxyles sont totalement ou partiellement acylées par des acides galliques ou des acides ellagiques. On classifie donc ces tanins dans les familles respectives des gallotanins et ellagitanins.

Les **tanins condensés** sont des composés appartenant à la famille des flavanoïdes. Ce sont des oligomères ou polymères de flavanols (appelés aussi catéchines) dont le squelette de base est le 2-phényl-3-chromanol. Leur traitement acide à chaud conduit à la formation d'anthocyanidines, leur valant ainsi l'appellation de proanthocyanidines. Les monomères de flavanols (Figure 4a) se différencient par leur degré d'hydroxylation sur les cycles A et B, la présence d'un acide gallique (Figure 4b) sur le cycle C ainsi que par la stéréochimie du carbone C3 du cycle B.



Figure 4: Structure de monomères de proanthocyanidines (a) et d'acide gallique (b).

Les **tanins complexes** sont constitués d'une unité de gallotanin ou d'ellagitanin liée à une unité de catéchine par une liaison glycosidique.

3.1.2. Relation structure - astringence

Le caractère astringent des tanins varie avec leur structure et les différences sensorielles perçues dépendent de cinq paramètres structuraux : le degré de polymérisation (DP), la nature de la liaison inter-monomères, la stéréochimie des monomères, la présence d'acide gallique et le degré de galloylation.

L'astringence des tanins augmente avec leur DP (Peleg, Gacon et al. 1999, Vidal, Francis et al. 2003). A degré de polymérisation égal, la position de la liaison entre monomères et la nature des monomères influe aussi sur le caractère astringent des composés. Dans le cas de dimères de catéchine, la présence d'une liaison (4-8) entraine une astringence moindre que la présence d'une liaison (4-6) et un dimère catechine- épicatéchine est perçu moins astringent qu'un dimère de catéchine (Peleg, Gacon et al. 1999). De plus la stéréochimie impacte le caractère astringent des molécules. Ainsi, le monomère d'epicatéchine a été rapporté comme plus astringent que son énantiomère, la catéchine (Thorngate and Noble 1995). En parallèle, l'augmentation du degré d'hydroxylation du cycle B ainsi que la galloylation en C3 du cycle C sont d'autres facteurs augmentant le caractère astringent des composés (Scharbert, Holzmann et al. 2004).

Les seuils d'astringence des monomères de proanthocyanidines dans de l'eau ont été évalués par la méthode sensorielle dite de comparaison par paires (Scharbert, Holzmann et al. 2004). Ces concentrations sont des valeurs moyennes susceptibles de varier d'un individu à l'autre. Elles sont reportées dans le Tableau 2.

Composés	Concentration
	seuil (µmol/L)
Catéchine	410
Catéchine gallate	250
Epicatéchine	930
Epicatéchine gallate	260
Epigallocatéchine	520
Epigallocatéchine gallate	190
Gallocatéchine	540
Gallocatéchine gallate	390

Tableau 2: Seuils orosensoriels de perception de l'astringence de quelques monomères de proanthocyanidines (stéréochimie du cycle B non précisée, d'après Scharbert et al., 2004).

3.2. MECANISMES PHYSIOLOGIQUES

L'astringence est un phénomène suscitant beaucoup d'intérêt au sein de la communauté scientifique du fait de son importance sensorielle lors de la consommation de divers aliments et boissons. Les mécanismes ont été largement étudiés, pourtant, l'origine de cette sensation reste encore controversée (Bajec and Pickering 2008).

Historiquement, Kawamura et al. (1969) (Kawamura, Funakoshi et al. 1969) ont d'abord décrit l'astringence comme une saveur, hypothèse appuyée par Simon et al. (1992) qui ont démontré la capacité des composés astringents à modifier le transport des ions dans les cellules gustatives chez le chien (Simon, Hall et al. 1992). Cette hypothèse a par la suite été réfutée (Green 1993) et une étude récente a démontré que la lésion ou l'anesthésie du Chorda tympani, le nerf véhiculant les signaux afférents inhérents aux sensations gustatives, ne modifiait pas la perception de l'astringence chez l'homme. La confusion pourrait être due au fait que certains composés astringents stimulent les récepteurs à l'amertume (Narukawa, Noga et al. 2011, Schobel, Radtke et al. 2014).

ETAT DE L'ART

Dans cette même étude, Schobel et al. (2014) ont mis en évidence une altération de la sensation d'astringence lors de l'anesthésie de l'innervation trigéminale de la langue, confirmant ainsi la sollicitation du système trigéminal dans la perception de la sensation (Schobel, Radtke et al. 2014). Plusieurs théories sont proposées quant à l'origine du phénomène.

La première théorie postule que l'astringence est provoquée par l'interaction des tanins directement avec la muqueuse orale. Si certains composés à effet trigéminal comme la capscaïcine ou le menthol induisent l'activation de canaux ioniques TRP (Transient Receptor Potential) (Gerhold and Bautista 2009), il a été observé *in vitro* que cela n'était pas le cas de polyphénols de thé (Carpenter 2013) et de l'EgCG (Schobel, Radtke et al. 2014). Néanmoins, un polyphénol du vin rouge contenant des groupements galloyles a montré une aptitude à stimuler une protéine G, impliquée dans la transduction de signaux chimiosensoriels (Schobel, Radtke et al. 2014). Cependant ces résultats doivent être considérés avec prudence car ils ont été obtenus sur des neurones de souris (Schobel, Radtke et al. 2014). Des études ont aussi rapporté la capacité des tanins à déstabiliser des structures lipidiques en solution (Furlan, Castets et al. 2014) ainsi que la capacité à établir des liaisons hydrogène avec les membranes cellulaires (Sirk, Friedman et al. 2011). Les interactions avec les phospholipides proches des récepteurs gustatifs pourraient perturber ces récepteurs (Furlan, Castets et al. 2014).

La seconde théorie propose que l'astringence serait une sensation tactile induite par une diminution des capacités de lubrification de la muqueuse suite à la précipitation des protéines salivaires libres ou ancrées aux cellules épithéliales (Green 1993, Yao, Lin et al. 2010). Les interactions entre protéines salivaires et tanins, ainsi que leur implication dans la sensation d'astringence seront développées dans la partie 0.

Toutes ces hypothèses ne s'excluant pas l'une l'autre, La sensation d'astringence pourrait être un phénomène multimodal impliquant de nombreux mécanismes (Gibbins and Carpenter 2013) (Figure 5).



Figure 5: Les mécanismes pouvant intervenir conjointement dans la sensation d'astringence – 1) Agrégation des protéines salivaires libres, 2) Déstructuration du film salivaire, 3) Précipitation des protéines de la pellicule salivaire, 4) Diminution des propriétés de lubrification (activation de mécanorécepteurs), 5) Détection des tanins par des chémorécepteurs et interaction avec la membrane des cellules épithéliales orales.

4.1. LA SALIVE

La salive est un fluide biologique sécrété par trois paires de glandes majeures (les parotides, les sous-maxillaires ou submandibulaires et les sublinguales) et plusieurs types de glandes mineures (linguales, labiales etc.) situées dans la muqueuse orale.

La salive est constituée à 98% d'eau et contient aussi de nombreux électrolytes et une large variété de protéines. A ce jour, plus de 1000 protéines et enzymes ont été identifiées (Chauney, Lionetti et al. 1954, Denny, Hagen et al. 2008), dont des mucines, stathérines, immunoglobulines, α -amylase, etc... Le pH de la salive est tamponné autour d'une valeur de 6,8 grâce à la présence de carbonates (Aframian, Davidowitz et al. 2006). Au repos, le flux salivaire moyen est d'environ de 0,5 ml/min (Dawes and Dong 1995, Fenoll-Palomares, Munoz Montagud et al. 2004) mais peut dépasser 5 ml/min en cas de stimulation mécanique (Dawes and Dong 1995).

La salive contribue à la protection de la cavité orale, notamment grâce à des propriétés antibactériennes, antifongiques et antivirales. Elle joue un rôle de tampon et favorise la lubrification de la cavité orale (Amerongen and Veerman 2002). La salive joue aussi un rôle crucial dans la prise alimentaire. L'augmentation du flux salivaire lors de la mastication permet l'insalivation du bol alimentaire, initie la digestion (Pedersen, Bardow et al. 2002) et favorise la libération et la perception des molécules de la flaveur (Neyraud 2014).

Il est important de différencier les différents types de salive. La salive dite libre est déglutie à l'opposé de la salive organisée en films. On distinguera la pellicule mucosale du film salivaire. La pellicule mucosale est une mince couche de protéines salivaires adsorbée en surface de l'épithélium oral (Bradway, Bergey et al. 1989), contrairement au film salivaire, ou film résiduel, qui est la fine couche de salive mobile mesurant entre 70 et 100 μ m d'épaisseur et observable sur les surfaces orales après déglutition (Collins and Dawes 1987).

4.2. SALIVE ET PERCEPTION AROMATIQUE

Ce paragraphe fait l'objet d'une revue intitulée « The rôle of saliva in aroma release and perception » publié dans Food Chemistry.

The role of saliva in aroma release and perception

Sarah Ployon^a, Martine Morzel^a, Francis Canon^{a*}

^a Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation, CNRS, INRA, Univ. Bourgogne Franche-Comté, F-21000 Dijon, France

Corresponding author: francis.canon@dijon.inra.fr; tel: +33 (0) 3 80 69 35 29

Abstract

Aroma perception is an important factor driving food acceptance. Volatile organic compounds (VOCs) are released from the food matrix and then reach the receptors located in the nasal cavity, leading to their perception. These steps are closely dependent on the physico-chemical properties of the volatile compounds and the food matrix, but also on human physiology. Among the different physiological parameters involved, the literature reports that saliva has various effects on VOCs and therefore appears as a major actor impacting the perception of aroma.

This article reviews how saliva takes part in aroma release, considering both *in vitro* and *in vivo* approaches, and how it may affect perception. It describes the direct mechanisms (molecular interactions, enzymatic conversion, salting-out effect, dilution) involving salivary components (salts, proteins including enzymes, microbiota) that can modify the release of aroma compounds. It also considers the indirect impact of saliva, such as changes of aroma diffusion through modification of the physico-chemical properties of the food matrix.

Keywords: Saliva, aroma release, interactions, enzymatic conversion, mucins, volatile organic compounds, salivary proteins, flavour
4.2.1. Introduction

Retronasal olfaction is a part of flavor, together with taste and trigeminal sensation, and it is a key factor driving food choices and acceptability. The flavor modality corresponds to the perception of aromas after activation of olfactory receptors by the binding of aroma compounds. Different factors impact aroma release from food and can therefore modulate the final perception. Two main factors affecting aroma release are inherent to the food product, namely the chemical properties of volatile compounds and the physico-chemical properties of the food matrix. For the first factor, the vapor pressure is an important characteristic involved in aroma partitioning, which is defined as the ratio of concentration between a gas phase and a liquid phase for one compound at equilibrium. It has also been reported that aroma partitioning can vary with hydrophobicity (Buttery, Ling et al. 1969) or other properties such as polarity of the molecule (Tromelin, Merabtine et al. 2010). For the second factor, food matrices exhibit a large range of physico-chemical properties due to different physical states and composition. These characteristics are important factors affecting aroma release (Boisard, Andriot et al. 2014, Frank, Eyres et al. 2015).

In contrast to odorants, which reach the receptors by the orthonasal route, aroma compounds are released in the oral cavity and then follow the retronasal route. Differences between retronasal and orthonasal perception of the same odorant molecule have been reported, indicating an influence of oral processing and oral physiology on aroma perception (Linforth, Martin et al. 2002). For example, opening of the soft palate (velum palatinum) during mastication, which allows the transfer of volatiles to the nose cavity (Buettner, Beer et al. 2001), influences the timing and extent of aroma release. It was thus shown that the highest amount of aroma delivery occurs during the first expiration after swallowing (Buettner and Schieberle 2000, Linforth and Taylor 2000). Total aroma release from model cheeses was positively correlated with numbers of swallowing (Boisard, Andriot et al. 2014), demonstrating the importance of taking into account oral processing to understand aroma perception.

Saliva also plays a significant role in aroma release. *In vitro* experiments have revealed differences in aroma release from coffee or wine when water, human or artificial saliva was added to the food matrix (Genovese, Caporaso et al. 2014, Munoz-Gonzalez, Feron et al. 2014). In an *in vivo* experiment aiming at determining the relative contribution of the main food oral processing events in aroma release during cheese consumption, it was found that aroma release was poorly linked to the composition of resting saliva but it was explained by the characteristics of stimulated saliva (Feron, Ayed et al. 2014), emphasizing the importance of saliva composition and flow. Saliva is

made of 98% water, and contains salts and more than a thousand proteins (Denny, Hagen et al. 2008), among which mucins, histatins, statherins, IgA, proline rich proteins and enzymes like alphaamylase, carbonic anhydrase IV or lysozyme. Therefore, different mechanisms such as non-covalent or covalent binding, enzymatic reactions or degradation of the food matrix should be taken into account when considering the role of salivary proteins in aroma release, as illustrated in Figure 1. Saliva secretion is characterized by both intra-individual and inter-individual variability. Indeed, unstimulated flow rate is on average 0.3 mL/min but it can increase to 7 ml/min during stimulation, especially during chewing (Dawes 1969, Dawes and Dong 1995). Inter-individual variability of saliva impacts both the flow and the composition of saliva. For example, diet can modify saliva composition with an impact on amylase activity (Mejean, Morzel et al. 2015). Other factors impacting on saliva inter-individual variability are age, pathological conditions, medications etc (Humphrey and Williamson 2001). These differences in terms of composition and flow could be at the origin of inter-individual variation of aroma perception (Repoux, Sémon et al. 2012, Piombino, Genovese et al. 2014).

This review focuses specifically on the impact of saliva on aroma release, considering the different mechanisms by which it may modify the amount, the nature or the release kinetic of aromatic molecules in the air of the oral cavity. First, physico-chemical interactions between salivary proteins and aroma molecules and their effect on aroma release will be reviewed. Then, we will consider in-mouth enzymatic reactions, both of host and microbial origin, leading to the production of odorous volatiles from non-odorant precursors or to the conversion of aroma molecules. A possible correlation between saliva characteristics and aroma perception will be discussed. Finally, we will review how saliva can influence aroma release from food matrices through dilution or modification of the matrix or food bolus properties.

4.2.2. Interactions between saliva components and aroma molecules

4.2.2.1. Binding of aroma molecules to salivary proteins

Proteins have demonstrated their ability to interact with aroma compounds, and consequently to modify aroma release and perception (Guichard 2006). This capacity is determined by their conformations and physico-chemical properties, themselves dependent on the proteins' peptide sequence, post-translational modifications and environment. For example, the structure of ß-lactoglobulin includes a central hydrophobic pocket, allowing the binding of hydrophobic ligands such as aroma compounds (Tavel, Moreau et al. 2010). In this case, interactions are due to

hydrophobic effects, but other kinds of non-covalent interactions can also occur between aroma compounds and proteins, such as electrostatic interactions (including hydrogen bonds) or Van der Waals forces (Lubbers, Landy et al. 1998).

Proteomic analyses have revealed that saliva contains at least 1166 proteins (Denny, 2008), the most abundant being mucins and α -amylase. Therefore, numerous studies have used artificial salivas containing only these two proteins, alone or in combination, to investigate the effect of saliva on aroma release.

Salivary mucins exhibit high molecular weight. Their peptide chain is highly glycosylated and has several hydrophobic domains. Mucins are largely responsible for the viscous and elastic properties of saliva. These properties allow saliva fulfilling several functions such as lubrication of oral surfaces during the actions of eating or talking, and maintenance of a hydrated layer covering the epithelium (Bansil and Turner 2006). Different mucins have been tested to formulate artificial saliva. The effect of pig gastric mucins and mucins from bovine submaxillary glands on the release of four aroma compounds has been compared, and no significant difference was observed (Friel and Taylor 2001). Mucins are globally negatively charged proteins, due to the sulfate groups on the oligosaccharide side chains, leading to repulsion of mucin molecules between each other. The pH and the presence of salts, which can cause a charge-shielding effect, can affect the charge of the protein and lead to mucin self-aggregation and modification of the viscosity. Friel and Taylor (2001) investigated the effect of mucin on the release of fourteen volatile compounds while taking into account the effect of salt and ionic strength. Volatiles were classified into three groups according to their behaviors. The first group was not affected by the presence of mucin in contrast to the second and third groups, suggesting a binding between mucin and compounds of the 2nd and 3rd groups. The presence of salts did not modify the effect of mucin for the second group, while differences were observed for the molecules classified in the third group. The types of interactions between mucin and volatiles therefore probably differed depending on the volatile structure.

The retention by mucin of aroma molecules belonging to ketones and esters families increases as a function of the aliphatic chain length, suggesting the involvement of hydrophobic effect for these molecules (Pages-Helary, Andriot et al. 2014). However, the same authors did not exclude the involvement of other types of non-covalent interactions to fully explain their results. For a group of molecules representing different chemical classes, Friel et al. (2001) did not observe a correlation between molecule retention and their log P value (Friel and Taylor 2001). Moreover, addition of sugar to mucin solution affected differently the retention of the different molecules by the protein. This could be due to the existence of different types of binding sites of aroma compounds on mucins, which are differently affected by competition between aroma molecules and sugars.

Establishment of covalent interactions between aroma compounds and mucins can also occur. For example, release of aldehydes is strongly affected by the presence of mucins (van Ruth, Roozen et al. 1995, Friel and Taylor 2001). Aldehydes and ketones may bind to protein through formation of Schiff bases. However this mechanism was excluded on the basis that compounds from different chemical classes acted similarly to aldehyde in presence of mucins (Friel and Taylor 2001).

The second abundant protein widely used in aroma release studies is α -amylase. This globular protein exhibits a well-defined three-dimensional structure (Kandra and Gyémánt 2000) contrarily to mucins. In their study, Pagès et al. showed that human α -amylase could decrease release of ketones and esters (Pages-Helary, Andriot et al. 2014). Retention was negatively correlated to hydrophobicity of the molecules, which suggests binding through hydrophobic interactions between hydrophobic domains of the protein and aroma compounds. However, there were no cumulative effect of mucin and α -amylase for saliva containing both proteins. The authors proposed that protein-protein interactions could preclude the access to a part of the binding sites of the proteins modifying the total number of binding sites available for aroma molecules (Pages-Helary, Andriot et al. 2014).

Regarding differences between artificial and human saliva, Van Ruth et al. (2000) did not observe any significant difference on aldehyde release from rehydrated diced bell peppers in presence of whole human saliva or artificial saliva (van Ruth and Roozen 2000). In contrast Pagès et al. (2014) demonstrated a stronger effect of human whole saliva than artificial saliva on ester release. The difference observed between the two studies may be explained by variability in human saliva composition and/or by the different chemical natures of aroma analysed (ester vs aldehydes), which may be more or less prone to interaction with proteins or enzymatic conversion. This observation highlights the importance of other salivary proteins that are not present in artificial saliva. Enzymes in particular may convert aroma compounds into different molecules, as described in the next section.

Among other salivary proteins that could impact the release of aroma compounds, lipocalin 1 (also referred to as LCN1 or von Ebner gland protein) deserves special attention. LCN1 belongs to the superfamily of lipocalins. Lipocalins are small-secreted proteins characterized by their ability to bind small hydrophobic molecules. Lipocalins family proteins exhibit a common pattern structure with beta-barrel forming an hydrophobic core formed by the side-chains of both hydrophobic and polar amino acids (Flower 1996). Although LCN1 concentration in saliva is quite low, around 100 ng/ml (Mounayar, Septier et al. 2013), and its ability to bind aroma has not been reported, this protein could interact with aroma compounds since other proteins from the lipocalin family, namely beta-lactoglobulin and odorant binding proteins (OBPs), already exhibited this property. For

example, beta-lactoglobulin, present in dairy products, was extensively studied for its capacity to bind aroma compounds (Tavel, Moreau et al. 2010). OPBs present in the nasal mucus of many mammalian species, also bind aroma compounds and assist the transfer of odorants from the gas phase to the olfactory receptors.

4.2.2.2. Aroma enzymatic conversion by human saliva

Numerous salivary proteins are enzymes catalysing chemical reactions, which can potentially involve aroma compounds depending on their chemical structure. Salivary aroma-converting enzymes may originate from the salivary glands, oral tissues or even microbiota. Some studies have reported enzymatic degradations of different aroma compounds in presence of human saliva. Pagès et al. (2014) reported a stronger effect of human saliva compared to artificial saliva composed of mucin and alpha-amylase on the release of esters and the production of their acid forms. These observations led to the conclusion that esters undergo hydrolysis in presence of saliva, which can be attributed to an enzymatic activity of esterase in whole saliva (Pages-Helary, Andriot et al. 2014). Buettner et al. (2002) previously described degradation of esters by human saliva (Buettner 2002). This degradation was inhibited after thermal denaturation of saliva confirming its enzymatic origin. The same authors reported a very low inter-individual variability, but this result was obtained with only two subjects and needs to be confirmed. In both articles, it was reported that the extent of enzymatic degradation varies according to the chemical structure of esters. In particular, it increases with the aliphatic chain length up to 7 carbons (Buettner 2002, Pages-Helary, Andriot et al. 2014).

Regarding the identification of the enzyme(s) at the origin of this activity, it has been reported that there is heterogeneity of esterases present in saliva. Three groups of esterase have been identified in human saliva (Lindqvist and Augustinsson 1980), all mainly secreted by the submandibular glands (Lindqvist and Augustinsson 1975). An aldehyde dehydrogenase is also present in saliva: this enzyme exhibits an esterolytic activity (8390 mIU/mg protein), as other aldehyde dehydrogenases (Sreerama, Hedge et al. 1995).

As indicated by its name, this enzyme has also an enzymatic activity on aldehyde. Aldehyde dehydrogenases catalyze the pyridine nucleotide-dependent oxidation of aldehydes to acids. The hydrogen acceptor is usually NAD, even if NADP can also be used depending of the enzyme. The reaction is essentially irreversible. The main salivary aldehyde dehydrogenase probably consists in the isozyme ALDH3A1, also called ALDH-3 (Giebultowicz, Wolinowska et al. 2009). However, another ALDH enzyme, known as ALDH6 or ALDH1A3, has also been identified in salivary glands

(Hsu, Chang et al. 1994) although its activity in saliva has not be confirmed. Interestingly, Giebułtowicz et al. (2009) have compared the salivary ALDH activity toward a series of aromatic aldehydes with that of the purified ALDH3A1 and reported no significant difference (Giebultowicz, Wolinowska et al. 2009). Therefore, it is likely that the salivary ALDH activity is due to ALDH3A1. The ability of this enzyme to oxidize aldehydes into carboxylic acids has been reported for numerous aldehydes including saturated aliphatic aldehydes (Pappa, Estey et al. 2003) and aromatic aldehydes (Giebultowicz, Wolinowska et al. 2009). A large variability in the level of the salivary ALDH activity has been reported, which could not be attributed to gender, ethnicity, alcohol consumption, use of tobacco or consumption of animal products. However, it appeared to be correlated with the consumption of coffee or vegetables such as broccoli (Sreerama, Hedge et al. 1995). Buettner et al. (2002) also confirmed that aldehydes undergo enzymatic degradation in presence of saliva. They reported the reduction of aldehydes to alcohols but did not observe the formation of the corresponding acids. A tendency to higher degradation was observed for the less polar compounds. However, the exact mechanism at the origin of this reduction was not determined (Buettner 2002).

Aldose reductase catalyzes the NADPH-dependent reduction of a wide variety of carbonylcontaining compounds to their corresponding alcohols with a broad range of catalytic efficiencies. Therefore, this enzyme and aldehyde reductase (Bohren, Bullock et al. 1989) are two potential candidates to catalyze the reduction of aldehydes into alcohols. However, proteomic investigations did not report the presence of aldose reductase in human saliva (Denny, Hagen et al. 2008).

Thiols have been also reported to be sensitive to degradation in presence of non-denatured human saliva, while they are not affected by heated saliva, suggesting that they are degraded by salivary enzymatic activity (Buettner 2002). Peroxydases are enzymes able to catalyze oxidation of a variety of substrates including thiols (Svensson 1988). Lactoperoxidase is a peroxidase that is secreted in saliva and milk in humans (Gothefors and Marklund 1975). The peroxidase activity of saliva shows high between-subject variability. It depends for example on a subject's physiological status and age (Buettner 2002). In samples of palm wine, esters, aldehydes and thiols were also observed to be highly degraded in presence of human saliva while no noticeable effect was observed for pyrazines, pyrrolines and most alcohols (Lasekan 2013). These observations are in accordance with those of Buettner (Buettner 2002, Buettner 2002) and demonstrate that degradation of aroma compounds by salivary enzymes can also be observed *in vitro* in real food matrices.

Regarding the effect of enzymatic degradations on aroma perception, two effects have to be considered: the decrease of the concentration of the degraded molecules, but also the formation of new volatile odorant metabolites.

4.2.2.3. Impact of oral microbiota on aroma release

The oral microbial population presents a huge diversity. At the species level, 707 entries are currently documented (Mark Welch, Rossetti et al. 2016). Comparing the bacterial population of 9 mouth sites of more than 200 healthy individuals, it was shown that most bacteria species are specialized in one oral habitat (Eren, Borisy et al. 2014). Analysis of salivary microbiome has revealed a high diversity between individuals, but relatively little variation between geographical locations around the globe (Nasidze, Li et al. 2009). Saliva has a strong influence on the oral microbiota. Indeed, saliva acts as buffer, thereby maintaining a pH favorable to bacterial growth. Saliva favors clearance of fermentable substrates, limiting the growth of bacteria with a saccharolytic mode of metabolism. Antimicrobial factors present in saliva (i.e. statherin, histatins, defensins, lysozyme) also contribute to the regulation of the microbial populations (Marsh, Do et al. 2016).

Oral microbiota in one factor at the origin of oral malodor due to its ability to produce odorant molecules (Krespi, Shrime et al. 2006). Oral malodor is mainly due to the putrefactive degradation by the Gram-negative anaerobic bacteria of peptides and proteins found in saliva, gingival crevicular fluid, blood and residues of food found in the oral cavity. These degradations lead to the production of volatile sulfur compounds (VSC), especially hydrogen sulfide and methyl mercaptan from cysteine/cysteine and methionine, respectively (Codipilly and Kleinberg 2008). The most commonly identified bacteria producing VSCs are *Porphyromonas, Prevotella, Actinobacillus*, and *Fusobacterium* (Krespi, Shrime et al. 2006). Microbial metabolism produces a large variety of metabolites, and many of them are odorants (Takahashi 2015).

The production of odorant molecules by oral microbiota from non-odorant precursors has been observed for molecules containing Cysteine. Cysteine-S-conjugates from fruit are odourless molecules, which are transformed into odorant VSC such as thiols by oral bacteria, especially *Fusarium nucleatum* (Starkenmann, Le Calvé et al. 2008), a species also identified as responsible for oral malodor (Krespi, Shrime et al. 2006). More recently, the ability of human oral microbiota to produce odorant molecules from odorless grape glycosidic aroma precursors was demonstrated in *in vitro* and *ex vivo* conditions, using cultures of representative oral bacteria. The hydrolysis of odorless glycosidic precursors was highly variable and produced different types of odorant molecules belonging to different chemical families (terpenes, benzenic derivatives and C6-alcohols), depending on the bacteria species (Muñoz-González, Cueva et al. 2015). The conversion of ethanol into acetaldehyde by oral streptococci has also been evidenced (Kurkivuori, Salaspuro et al. 2007).

Regarding the effect of the oral microbiota composition on aroma release, even though oral bacterial composition differences were observed between two populations (obese vs normal weight subjects), there was no link with differences of aroma release from wine between the two groups (Piombino, Genovese et al. 2014).

Table 3 summarizes the effects of specific salivary components (salts, proteins including enzymes, microbiota) on aroma release.

4.2.2.4. Potential sensory relevance

Usually, consumption of food and beverages leads to the release of a mixture of aroma compounds and not to the release of a monomolecular aroma. The perception process of a molecular aroma has been well characterized. Its quality and intensity are mainly linked to the chemical structure (Stevens 1960) and the concentration of the molecule (Chastrette 1997), respectively. However, the perception of mixtures of aroma compounds is far more complicated, as exposed in a review dealing with odor perception (Thomas-Danguin, Sinding et al. 2014), whose concepts can be extended to aroma perception. Briefly, the perception of mixtures of odorant compounds can either be homogenous, leading to the perception of a single odor, or heterogeneous, when several odors are perceived. In the homogeneous case, the specific odors of the different molecules are not individually perceived and blend into a new odor. The mixture is called a blending mixture and the perception can be considered as configural or synthetic. Configural perception is both specific to the molecules composing the blending mixture but also to their respective proportions (Sinding, Thomas-Danguin et al. 2013). There is another case that can be considered as homogeneous, when one molecule presents a strong intensity and masks the quality of the other molecules. When the perception of the mixture is heterogeneous, the specific odor of at least some molecules in the mixture can be identified. In this case, the processing is qualified as analytical or elemental. In that case, the odor quality of the mixture is linked to the odor intensity of molecules.

Previous paragraphs of the present review show that different phenomena occurring in the mouth affect the release of aroma compounds through two main mechanisms: binding of aroma compounds to salivary proteins and enzymatic conversion of odorant or non-odorant molecules into new odorant molecules.

Binding of aroma compounds modifies the concentration of the released molecules. Therefore, in the case of the perception of a monomolecular aroma, it will only affect the intensity of the aroma as a function of the binding affinity of the molecules to its salivary partner(s) and the concentration of such partner(s). In the case of mixtures, the different molecules composing the mixture will also

be differently affected as a function of their binding affinity. In configural perception, changes in relative proportion of the blending mixture can influence the mode of perception of the mixture and impact the specific odor quality of the blending mixture (Sinding, Thomas-Danguin et al. 2013). In contrast, in the case where one odorant molecule masks the others, if the main molecule is not affected or poorly affected, the quality and intensity of the odor will not be affected. When the mixture is heterogeneous, the quality of the mixture could also be affected as it depends of the odor intensity of the components.

Enzymatic conversion will both generate new aroma molecules and decrease the amount of the precursor, which can be an odorant. The release of new molecules will consequently affect the quality of the aroma, except in the case of homogenous mixture when a molecule has a strong odor and covers the odor of the other molecules.

It is also important to take into account the time dimension of perception and release. The majority of the *in vitro* experiments are performed after exposure to saliva from a few minutes to 1h and generally at thermodynamic equilibrium, which does not represent the condition during food consumption (van Ruth, Roozen et al. 1995, van Ruth and Roozen 2000, van Ruth, Grossmann et al. 2001, Pages-Helary, Andriot et al. 2014). While these studies suggest an effect of saliva on aroma release, using a dynamic mouth model system and monitoring aroma release in the few seconds after saliva addition, Rabe et al. (2004) did not observe any effect of artificial saliva on initial flavour release from solutions (Rabe, Krings et al. 2004). In general, the highest release of aroma molecules occurs a few seconds after swallowing, within the first breath (Hodgson, Linforth et al. 2003) consequently to velum opening. It is possible that the effect of saliva is limited during this initial step. However in vivo measurements of aroma compounds' concentrations in the nasal cavity have revealed temporal differences in aroma release depending on the molecule, following aroma solutions (Linforth and Taylor 2000, Buffo, Rapp et al. 2005) or wine consumption (Buettner 2004), with release time ranging overall from 0 to 240s. This longer release of aroma compounds is thought to be at the origin of a phenomenon named aroma persistence, whose mechanisms remain unknown. An in vivo study following aroma release in the nasal cavity of several subjects reported a correlation between the release kinetic of ethyl hexanoate and the saliva composition of the subjects. Moreover, in-mouth persistence of ethyl hexanoate was significantly lower after mouth rinsing. This observation did not occur for ethyl propanoate, which is a more hydrophilic compound. Authors suggested that reversible binding of the molecule to salivary proteins could be responsible for ethyl hexanoate persistence (Canon, Pages-Helary et al. 2015). Indeed, a residual salivary film with thickness from 10 μ m to 70 μ m persists on the different oral surfaces, after swallowing (DiSabato-Mordarski and Kleinberg 1996). Furthermore, some salivary proteins, especially salivary mucins, are anchored onto epithelial cells and form a thin structure named the mucosal pellicle. Consequently, a mixture of aroma molecules and residual saliva coats the oral surfaces even after swallowing, allowing the establishment of slower processes. From a sensory point of view, the desorption of aroma compounds from salivary proteins or oral mucosa is a slow process that could participate to aroma persistence (Hussein, Kachikian et al. 1983, Rabe, Krings et al. 2004), even though to date, the role of saliva in the phenomenon is not clearly established. In *in vitro* conditions, initial flavour release from solutions was not influenced by artificial saliva or the presence of oral mucosa, but the authors did not exclude that adsorption/desorption onto the mucosa could be involved in the persistence phenomenon (Rabe, Krings et al. 2004).

Enzymatic conversion of molecules may lead to the production of new odorant molecules. Taking into account that the longer the molecule is absorbed onto the mucosa, the higher the probability that the precursor is converted, the relative proportion of the different molecules could strongly change over time. Therefore, the odorant quality of "aftertaste" could be quite different than those of the initial breath. For example, ester concentration was affected by degradation by whole saliva during 180s (Pages-Helary, Andriot et al. 2014), while the corresponding acid was produced over the same period.

To date, no direct links have been established between salivary composition and aroma perception. However, adsorption/desorption mechanism of aroma compounds onto/from salivary components and production of odorant molecules from odorless precursor or by conversion of aroma molecules are mechanisms likely to influence aroma perception, in particular after swallowing.

Type of saliva	Salivary component	Odorous volatiles studied	Effect and proposed mechanisms when available	References
	Mucins	14 compounds from different physicochemical classes	Retention by mucins for some compounds. No correlation with hydrophobicity and different behaviours suggest different binding sites.	Friel et al. (2001)
		12 compounds from different physicochemical classes (from rehydrated diced peppers)	Retention by mucins by hydrophobic effects	Van Ruth et al. (1995)
	Alpha-	Linear series of esters & methylketones Linear series of esters & methylketones	Retention by alpha-amylase by hydrophobic effects	Pages-Helary et al. (2014) Pages-Helary
	amylase	,	•	et al. (2014)
Artificial Saliva	Mucins + Alpha- amylase	Linear series of esters & methylketones	No cumulative effect of mucins and amylase Modification of binding sites by protein-protein interactions	
	Salts	20 compounds from different physicochemical classes	Effect of salts only In presence of salivary proteins: salts increase hydrophilic compounds and reduce hydrophobic compounds release	Van Ruth et al. (2001)
		14 compounds from different physicochemical classes	Salts affect release of some compounds. No correlation with hydrophobicity.	Friel et al. (2001)
			Modification of mucin binding sites by ionic strength: charge-shielding effect & self aggregation	
	Proteins	Linear series of methylketones	Retention of aroma by salivary proteins by hydrophobic effects	Pages-Helary et al. (2014)
	Enzymes	Esters	Hydrolysis of esters increasing with chain length.	Buettner (2002b)
		Thiols	Involvement of esterases or aldehyde dehvdrogenases Oxidation of thiols.	Pages-Helary et al. (2014) Buettner (2002b)
Human saliva			Involvement of peroxidases.	х У
		Aldehydes	Reduction of aldehydes to alcohols.	Buettner (2002a)
			aldehyde reductases	, ,
	Oral microbiota		Release of aroma (terpenes, benzenic derivatives and lipid derivatives) from odorless glycosidic precursors	Munoz- Gonzales et al. (2015)
			Involvement of microbial enzymes	

4.2.3. Effect of saliva on aroma release from food matrix

To deeply understand the effect of saliva on aroma perception, it is important to consider the food systems in which aroma molecules are initially present. Indeed, aroma compounds are released from the food matrices, which show a huge diversity of composition, structure, texture and physico-chemical properties. These characteristics impact the release of aroma compounds, but also mastication and salivation. During consumption and mastication, dissolution in saliva and changes in temperature can lead to transition in the physical states of food, changing from a semisolid or solid to a liquid state. As a result, the release of aroma compounds in the mouth will be impacted. Mastication, which corresponds to the breakdown of food, increases the surface/volume ratio of food particles, and thereby improves the transfer of flavour molecules to saliva and to air of the oral cavity according to the first Fick's law (van Ruth and Roozen 2000, Salles, Chagnon et al. 2011). It is also important to consider diffusion in the system. The diffusion rate depends on the type of diffusion in the system. In a static fluid system, mass transport occurs by molecular diffusion, which is mathematically described by the Ficks's laws of diffusion. In this case the diffusion and the release of aroma compounds is affected by the viscosity (Guichard, Issanchou et al. 1991) but also by molecular interactions occurring between aroma compounds and the molecules composing the food matrix (Bylaite, Adler-Nissen et al. 2005). However during mastication, mass transport takes place by eddy diffusion, conducting to higher release rates. In this case, aroma release is less affected by the viscosity of the matrix (Hollowood, Linforth et al. 2002).

Saliva is incorporated into food to form the food bolus during oral processing. The amount of saliva incorporated depends on the food matrix and can represent up to 96 % of the bolus weight (Repoux, Labouré et al. 2012). This incorporation is an essential step of bolus formation (Salles, Chagnon et al. 2011). It affects the release of aroma compounds through direct and indirect effects. Regarding the mechanisms involved in the direct way, the first to consider is the solubilisation of the compounds into saliva. Concentrations of molecules in the different phases, namely food, saliva and air, are characterized by two inter-related food-saliva and saliva-air equilibria (Taylor 2002) Consequently, the dilution of aroma molecules in saliva directly affects their release to the oral cavity. Even if no significant differences were observed in total aroma release from coffee with or without artificial saliva addition (Genovese, Caporaso et al. 2014), differences were observed when compounds were considered individually, highlighting the influence of the molecule chemical nature. Different behaviors were also observed *in vitro* in polyphasic products. When artificial saliva was added to water/oil emulsions, hydrophilic compounds were preferentially diluted in saliva, which is essentially made of water, resulting in a lower release of these compounds in the air phase.

In contrast, hydrophobic compounds were mostly solubilized in the oil phase, thus saliva addition did not impact on their partitioning with air (Odake, Roozen et al. 1998).

Effect of bite size can affect aroma release, likely through different dilution rates, but Genovese et al (2015) also noticed during *in vitro* experiments that for a same ratio wine/saliva, sip volume could affect aroma release as a function of chemical classes (Genovese, Moio et al. 2015).

Another direct effect of saliva onto the release of aroma compounds is due to noncovalent interactions occurring between food matrix molecules and aroma compounds. The retention of aroma molecules by salivary proteins has been frequently reported, but phenomena occurring in real conditions are much more complex and the literature contains contradictory observations. For example, although hydrophobicity was observed to be a significant parameter impacting volatiles release from artificial and human saliva (van Ruth, Grossmann et al. 2001, Pages-Helary, Andriot et al. 2014), correlation between hydrophobicity and release from food products showed discordance between studies (Boland, Buhr et al. 2004, Flores and Olivares 2008, Doyennette, de Loubens et al. 2011), and the rate of release of aroma compounds from dry fermented sausages was not related with the compound's hydrophobicity value (Flores and Olivares 2008). To explain such results, it is necessary to consider the food systems used, since other phenomena due to different physicochemical properties could take place simultaneously to non-covalent binding between aroma compounds and food matrix molecules. As a result, saliva may have a different effect according to the matrix studied. Regarding semisolid products, in gelatin and pectin gels, an increase of the gel water content by artificial saliva addition increased hydrophobic volatiles partitioning by enhancing the hydrophilic nature of the system and enhancing the diffusion of flavor through the gel, whereas partitioning of more hydrophilic compounds decreased (Boland, Buhr et al. 2004). By contrast, saliva addition increased the release of a hydrophilic compound (ethyl propanoate) from a model cheese bolus (Dovennette, de Loubens et al. 2011). Therefore, both the physico-chemical properties of aroma compounds and those of the the non-volatile matrix components have to be taken into account.

Saliva may also have indirect effect on aroma release. Indeed, saliva incorporation contributes to bolus moistening and modifies the rheological properties of the food bolus, especially viscosity and spreadability. It was observed *in vitro*, adding artificial saliva to dressings, that a higher viscosity of the bolus increases aroma release to the gas phase (Odake, Roozen et al. 1998) by enhancing spreadability of the matrix onto the measurement flask, thus increasing the exchange surface with the gas phase. This finding was confirmed *in vivo*, where aroma release could be explained partly by bolus spreadability after model cheese consumption. A higher spreadability enhanced exposure to the gas phase and thus release of volatiles to the gas phase (Feron, Ayed et al. 2014).

Moreover, saliva contains enzymes which can modify the food matrix and bolus properties. For example, addition of alpha-amylase (in the concentration range found in human saliva) to starchbased systems increased the volatiles' release through modification of the matrix viscosity (Ferry, Hort et al. 2004).

Some salivary proteins are also able to interact with food matrix components resulting in a modification of aroma release. This phenomenon was well studied in wines. Red wines differ from white wines for example by their composition in tannins, which are able to bind salivary proteins, especially proline rich proteins (PRPs) and mucins, to form soluble and non-soluble complexes (Canon, Paté et al. 2013). Mitropoulou et al. (2011) noticed that artificial saliva addition to reconstituted red wines decreased the release of the more hydrophilic molecules but enhanced that of hydrophobic volatiles. Authors proposed that the protein-tannin complexes could expel hydrophobic compounds from the matrix (Mitropoulou, Hatzidimitriou et al. 2011). Two others studies used both human and artificial saliva. A first study demonstrated that aroma release from white wines was more affected by saliva addition than for red wines. This lower effect of saliva on aroma release was attributed to the fact that tannins-salivary proteins complexes inhibited binding of aroma molecules to salivary mucins (Genovese, Piombino et al. 2009). In a more recent study, it was observed in general a reduction of aroma release by saliva addition, but red wines were more affected than white wines. In this case, authors suggested that tannins - salivary proteins complexes could retain aroma molecules into hydrophobic cavities and decrease their release in the headspace, (Munoz-Gonzalez, Feron et al. 2014). In both studies, human saliva had a stronger effect than artificial saliva, possibly due to specific interactions between tannins and proteins in real saliva, as these proteins are not included in artificial saliva. Indeed, proline rich-proteins have demonstrated a high affinity for tannins due to their extended conformation the presence of several proline clusters in their sequence leading to high protein•ntannins stoichiometries (Canon, Milosavljević et al. 2013, Canon, Paté et al. 2013). An important phenomena to consider is the formation of large PRP-tannin aggregates (Canon, Paté et al. 2013), which could differently interact with aroma compounds than isolated proteins and tannins.

Salivary proteins, especially mucins, can also interact with the sucrose containing in food matrices. Mucins have a limited number of binding sites which are preferentially taken by sucrose (Friel and Taylor 2001). Thus competition between sucrose and aroma molecules can lead to an increase of some aroma compounds' release from sugar-containing solutions (Friel and Taylor 2001). Surprisingly, this did not happen in sugar containing gels (Boland, Buhr et al. 2004), maybe due to an effect of the viscosity.

The pH of some food matrices, like wine, is quite different from the pH of saliva. Despite saliva's strong buffering capacity, beverages can therefore affect pH in the mouth during consumption. The structure and activity of proteins are pH sensitive, in particular enzymes, but other salivary proteins such as mucins can also be strongly affected by pH. Mucins show a conformational transition at pH 4, from a random coil to a stiff worm-like chain, leading to gelation at acidic pH due to the exposing of mucin hydrophobic domains(Bansil and Turner 2006). Therefore, interaction of aroma compounds with salivary proteins can also be affected by pH. Ionic strength is another parameter that can strongly affect the structure of proteins and the interaction between proteins. Indeed, proteins like mucins are strongly and globally negatively charged. Salts in solution can cause a charge-shielding effect. The neutralisation of the coulomb repulsions between units can lead to interactions between mucin units and modify the number of binding sites available for aroma binding (Friel and Taylor 2001). During food consumption, modification of the pH and ionic strength conditions can affect the conversion and binding mechanisms previously presented.

This highlights once again the complexity of aroma release from food matrix, which cannot be explained by a single effect, but rather by combined effects of dilution, retention by non-covalent interaction and modification of the physico-chemical properties of the food matrix such as viscosity.

Table 4 summarizes the main effects of saliva on aroma release from food matrix.

4.2.4. Conclusion

Saliva is a complex biological fluid with numerous biological functions. The role of saliva in aroma release is complex and cannot be explained by a single effect. To fully understand the role of saliva in aroma release, it is necessary to take into account combined effects of dilution, retention by salivary proteins, enzymatic conversion by salivary proteins or microbiota and modification of the physico-chemical properties of the matrix by saliva. Moreover, aroma compounds show a huge diversity of chemical structures, resulting in a large diversity of physico-chemical properties. These properties modulate the effects of saliva. For example, volatiles partitioning between oral gas phase, saliva and matrix is closely dependent on their chemical nature and thus their affinity for each phase.

To our knowledge, the impact of saliva on aroma perception has never been directly investigated. Extrapolation between in-nose aroma concentration measurements to aroma sensory perception must be cautiously done since the amount of volatiles present in the nasal cavity does not necessarily correlate well with sensory perception. However, the rates of volatile release seem to correlate with sensory data (Baek, Linforth et al. 1999). With regards to the potential effect of

saliva on aroma perception, it appears crucial in the future to both deeply understand these phenomena and to link them with aroma perception. Studies combining sensory analysis, in-nose aroma release monitoring and saliva biochemical analysis would be useful to better understand the role of saliva in aroma perception.

Saliva effect	Food matrix	In vivo / in vitro	Observed impact of saliva	Mechanisms of action of saliva	References
Dilution	Water oil emulsion	In vitro	Lower release of hydrophilic compounds.	Modification of volatiles partition into the different phases.	Odake et al. (1998)
			No effect on hydrophobic compounds		
	Coffee	In vitro	Different behaviours depending on aroma		Genovese et al. (2014)
Modification of food matrix	Gelatin and pectin gels	In vitro	Increased release of hydrophobic compounds	Enhancement of the hydrophilic nature of the system	Boland et al. (2004)
properties	Dressings	In vitro	Increased release of compounds	Enhancement of matrix spreadability and increase of exchange surfaces	Odake et al. (1998)
	Model cheese	In vivo	Increased release of compounds		Feron et al. (2014)
	Starch-based system	In vitro	Increased release of compounds	Starch degradation due to amylase activity, leading to modification of	Ferry et al. (2004)
	Rehydrated bell pepper	In vitro	Increased release of highly volatiles compounds	matrix viscosity	Van Ruth et al. (2000)
Interaction of food matrix constituents	Red wine	In vitro	Increased release of hydrophobic compounds	Expulsion of hydrophobic compounds by complexes formed by saliva proteins, tannins and carbohydrates	Mitropoulou et al. (2009)
with salivary proteins		In vitro	Decreased release of hydrophobic compounds	Retention of hydrophobic compounds by hydrophobic cavities of complexes formed by saliva proteins and tannins	Munoz-Gonzales et al. (2014)
		In vitro	Higher aroma release than from white wines	Modification of salivary proteins structure and binding sites by polyphenols	Genovese et al. (2009)
	Sucrose solution	In vitro	Increased release of some molecules	Competition between sugar and aromas for binding sites on salivary proteins	Friel et al. (2001)

Tableau 4 : Saliva effects on aroma release from food matrix.

4.3. SALIVE ET ASTRINGENCE

De nombreuses études ont mis en avant l'importance de la salive et de ses protéines dans la perception de l'astringence (Pour revue voir (Gibbins and Carpenter 2013)). Les tanins sont caractérisés par une aptitude à interagir avec les protéines, ainsi les interactions entre tanins et protéines salivaires ont été particulièrement étudiées.

4.3.1. Interactions tanins et protéines salivaires

Parmi les protéines contenues dans la salive, plusieurs ont montré une capacité à interagir avec les tanins.

4.3.1.1. Les Protéines Riches en Proline

Du fait de leur affinité particulière pour les tanins (Hagerman and Butler 1981), les protéines riches en proline (PRP) sont les protéines salivaires qui ont été les plus étudiées. Les PRP salivaires sont des protéines non structurées contenant plus de 20% de proline et différant par leur point isoélectrique et leur degré de glycosylation, ce qui permet de les classer en trois groupes : les PRP acides (aPRP), les PRP basiques (bPRP) et les PRP glycosylées (gPRP) (Bennick 1982).

La fixation des tanins constitue à ce jour la fonction majeure connue des bPRP, le phénomène étant à l'origine de la formation de complexes moléculaires (Baxter, Lilley et al. 1997, Lu and Bennick 1998, Canon, Pate et al. 2009, Canon, Giuliani et al. 2010). Au contraire, les aPRP et gPRP ont montré une plus faible capacité à fixer les tanins (Pascal, Poncet-Legrand et al. 2008).

La formation de complexes entre polyphénols et PRP est un phénomène réversible, qui peut être divisé en deux étapes. L'établissement de liaisons non covalentes entre les deux types de molécules est à l'origine de la formation de complexes. Dans un second temps, ces complexes forment des agrégats solubles qui précipitent ensuite pour former des agrégats non solubles (Luck, Liao et al. 1994, Pascal, Poncet-Legrand et al. 2007, Canon, Pate et al. 2009) (Canon, Pate et al. 2013).

Les interactions entre PRP et tanins dépendent de la structure de ces derniers. L'étude des interactions entre la bPRP IB5 et différents tanins a montré l'importance de la structure des tanins dans la force de l'interaction avec la protéine. Ainsi, le DP puis la galloylation et le degré d'hydroxylation du cycle B sont des caractéristiques augmentant l'interaction entre les composés (Canon, Giuliani et al. 2010). Une corrélation linéaire entre le nombre de groupements hydroxyles et la force d'interaction suggère l'implication des liaisons hydrogènes (Canon, Giuliani et al. 2010).

4.3.1.2. Autres protéines salivaires

Parmi les autres protéines présentes dans la salive, les histatines (Yan and Bennick 1995, Naurato, Wong et al. 1999), les stathérines (Soares, Vitorino et al. 2011), les α -amylases (de Freitas and Mateus 2001, Hara, Ohara et al. 2012) et les mucines (Davies, Pudney et al. 2014) peuvent être précipitées par les tanins.

La salive contient différents types de mucines. Les mucines sont des glycoprotéines de masse moléculaire allant de 0,5 à 20 MDa. Les régions glycosylées des mucines sont constituées d'oligosaccharides de 5 à 15 monomères, essentiellement des N-acetylgalactosamines, des Nacetylglucosamines, des fucoses, des galactoses et des acides sialiques liés aux groupements hydroxyles des sérines et thréonines du corps protéiques par des liaisons O-glycosidiques (Bansil and Turner 2006). Parmi les mucines présentes dans la salive, on trouve des MUC5B, dites mucines gélifiantes, qui sont des mucines glycosylées de poids moléculaire élevé (supérieur à 1 mDa) et des MUC7, non gélifiantes et de plus faible poids moléculaire (125 kDa) (Tabak 1990).

L'EgCG provoque l'agrégation des domaines protéiques des mucines salivaires MUC5B, mais pas de leurs régions glycosylées, ainsi que la précipitation des MUC7 (Davies, Pudney et al. 2014). Les interactions entre mucine et EgCG seraient initiées par une attraction de type hydrophobe entre les tanins et les régions hydrophobes des mucines, suivie par d'établissement de liaisons hydrogènes (Zhao, Chen et al. 2012). Aucune des deux mucines MUC5B et MUC7 ne semble être précipitée par l'EC (Davies, Pudney et al. 2014), ce qui confirme le rôle des unités galliques dans le pontage interprotéique. En effet les tanins peuvent être vus comme des ligands présentant plusieurs sites d'interactions avec les protéines, ce qui leur permet de pouvoir ponter deux protéines entre elles (Canon, Pate et al. 2013) (Haslam, Lilley et al. 1992).

4.3.2. Rôle des interactions protéines salivaires - tanins dans la sensation d'astringence

Nous avons abordé précédemment les différents mécanismes à l'origine de l'astringence. Dans ce paragraphe, nous nous intéressons plus particulièrement aux conséquences mécaniques et sensorielles résultant des interactions entre protéines salivaires et tanins.

Les tanins peuvent avoir des propriétés nutritionnelles délétères, pouvant conduire à une perte de poids et à la mort chez l'animal (Jean Blain 1998). Il a été montré qu'un régime riche en tanins induit la production de PRP salivaires chez la souris, en réaction à ce type de diète afin de neutraliser l'effet antinutritionnel des tanins (Mehansho, Clement et al. 1985). En effet, les complexes formés entre tanins et PRP et tanins et histatines sont insolubles et stables dans les conditions trouvées au niveau de l'estomac et de l'intestin, limitant ainsi l'interaction des tanins avec d'autres composés, notamment les enzymes digestives (Lu and Bennick 1998, Naurato, Wong et al. 1999). Au niveau intestinal, le gel de mucines sécrété par une lignée de cellules épithéliales intestinales aurait un effet protecteur vis à vis de la toxicité des tanins EC et EgCG (D'Agostino, Rossetti et al. 2012). De la même manière, le piégeage des tanins par certaines protéines salivaires, notamment les PRP limiterait l'accès des tanins à la muqueuse et induirait une perception moindre de l'astringence (Sarni-Manchado, Canals-Bosch et al. 2008).

Plusieurs études se sont intéressées à l'effet de tanins sur la rhéologie de la salive humaine. Rossetti et ses collaborateurs ont montré qu'elle était modifiée par l'ajout d'EgCG, induisant une augmentation du coefficient de friction de la salive (Rossetti, Yakubov et al. 2008) et une modification de l'élasticité du film salivaire (Rossetti, Bongaerts et al. 2009, Rossetti, Ravera et al. 2013). Ils ont ainsi proposé que l'astringence découlerait d'une déstabilisation du film salivaire couvrant la muqueuse, par précipitation des protéines salivaires, ce qui réduirait son pouvoir lubrifiant. L'augmentation des coefficients de friction d'échantillons de salive humaine suite à l'ajout de vins ou solutions de tanins a été corrélée positivement avec l'intensité d'astringence perçue des produits (Brossard, Cai et al. 2016). Cependant, certains composés perçus comme astringents, notamment les polyphénols non galloylés comme l'EC, n'induisent pas de modification du coefficient de friction de la salive (Rossetti, Yakubov et al. 2008, Rossetti, Bongaerts et al. 2009, Rossetti, Ravera et al. 2013) et ne précipitent pas les mucines (Davies, Pudney et al. 2014). De plus, in vivo, Lee et al. (2012) n'ont pas observé d'altération du tapissage de la muqueuse par les mucines après la consommation d'un mélange de tanins commercial (Lee, Ismail et al. 2012). Une autre étude a révélé que le thé était perçu plus astringent après que les sujets se soient rincés la bouche, en ayant ainsi éliminé le film résiduel de salive présent en bouche (Nayak and Carpenter 2008). Ces résultats suggèrent que la précipitation des protéines salivaires, bien que pouvant être un facteur contribuant à la sensation, mais n'est pas nécessairement une condition requise à la perception de l'astringence.

Ainsi, l'autre hypothèse est que les protéines de la salive ne jouent qu'un rôle de protection et que ce sont les interactions des tanins avec les protéines salivaires ancrées en surface de l'épithélium oral, formant une structure appelée pellicule mucosale, qui seraient à l'origine de la sensation d'astringence (Nayak and Carpenter 2008, Gibbins and Carpenter 2013). La capacité de deux polyphénols, l'EgC et l'EgCG, à interagir avec des protéines de la pellicule a par ailleurs été observée sur une pellicule salivaire formée *in vitro* (Joiner, Muller et al. 2004). La fixation des tanins aux protéines de la pellicule salivaire diminuerait les capacités de lubrification de cette dernière entrainant une stimulation des mécanorécepteurs présents au niveau de la muqueuse.

5. EFFET DES POLYPHENOLS SUR LA PERCEPTION AROMATIQUE

5.1. OBSERVATIONS SENSORIELLES

D'un point de vue sensoriel, il a été observé que l'ajout de certains arômes à des solutions de catéchine augmentait l'intensité et la persistance de l'astringence (Ferrer-Gallego, Hernandez-Hierro et al. 2014). Une autre étude a montré que l'ajout d'arômes pouvait moduler la perception de l'astringence de vins ayant la même fraction non volatile (Saenz-Navajas, Campo et al. 2010).

Dans une autre étude, une tendance non significative à l'accentuation de certaines notes de vins de Sauvignon a été notée en présence de polyphénols (Lund, Nicolau et al. 2009). A l'inverse, une étude a montré que plus la quantité de polyphénols dans un vin augmentait, plus l'intensité de notes aromatiques diminuait (Goldner, di Leo Lira et al. 2011).

Les effets réciproques d'une modalité sur l'autre suggèrent l'existence d'interactions entre les polyphénols et les molécules d'arômes et/ou d'une compétition pour les interactions avec d'autres molécules.

5.2. NATURE DES INTERACTIONS ENTRE POLYPHENOLS ET COMPOSES VOLATILS

Plusieurs travaux ont été réalisés sur le rôle des polyphénols dans la libération des arômes du vin (Tableau 5). Les interactions dépendent à la fois de la nature des arômes et de celle des polyphénols (Aronson and Ebeler 2004).

L'analyse des interactions polyphénols-arômes par RMN a mis en évidence l'existence d'interactions entre le benzaldéhyde et les catéchines dus à des effets hydrophobes (Dufour and Bayonove 1999). D'autres auteurs ont suggéré l'existence de liaisons hydrogènes entre les groupements hydroxyles des catéchines et d'autres composés volatils polaires (methoxypyrazine) (Lund, Nicolau et al. 2009).

La présence de polyphénols peut aussi avoir pour conséquence de diminuer la solubilité des autres molécules présentes en solution pouvant exercer un effet de salting-out sur les composés les plus hydrophobes (Dufour and Bayonove 1999).

La présence de salive est un facteur important influant sur les interactions tanins –arômes du fait de l'affinité de ces deux familles de molécules pour les protéines salivaires. Les complexes polyphénols –protéines salivaires solubles sont aussi susceptibles d'exercer un effet de salting-out sur les composés peu solubles (Mitropoulou, Hatzidimitriou et al. 2011), mais pourraient aussi offrir des régions hydrophobes dans lesquelles ces composés pourraient être retenus (Munoz-Gonzalez,

Feron et al. 2014). D'autre part, les complexes formés entre les protéines salivaires et les tanins pourraient diminuer la capacité des protéines salivaires à lier les molécules d'arôme en occupant les sites de liaison aux arômes ou en modifiant la structure des protéines salivaires (Genovese, Piombino et al. 2009).

Matrices	Conditions	Observations	Interprétations	Sources
Solution hydro alcoolique d'arômes	Pas de salive Ajout catéchines et tanins condensés de vins	 libération limonène libération benzaldé- hyde libération esters 	Effets hydrophobes (benzaldéhyde) Effet de salting out (Limonène)	(Dufour and Bayonove 1999)
Vins blancs dilués aromatisés	Pas de salive Ajout de polyphénols dont catéchine	 ▶ libération methoxypyrazine, 3- mercaptohexanol et ethyl decanoate 	Interactions non covalentes (hydrogènes)	(Lund, Nicolau et al. 2009)
Vin rouge reconstitué	Ajout salive artificielle	 ▶ libération composés hydrophiles ↗ libération composés hydrophobes 	Expulsiondescomposés hydrophobesparlescomplexesprotéines-taninscarbohydrates	(Mitropoulou, Hatzidimitriou et al. 2011)
Vins rouges et blancs	Ajout salive artificielle ou humaine	Plus grande influence de l'ajout de salive sur les vins blancs .	Inhibition de l'effet de la salive par les polyphénols : diminution des sites de liaisons protéines/arômes + important dans vins rouges	(Genovese, Piombino et al. 2009)
Vins rouges et blancs dés- aromatisés puis aromatisés	Ajout salive artificielle ou humaine	 rétention composés hydrophobes Plus grande influence de l'ajout de salive sur les vins rouges. 	Rétentiondescomposésvolatils danscavitéshydrophobesforméesparlescomplexescomplexesprotéinestanins - carbohydrates	(Munoz- Gonzalez, Feron et al. 2014)

Tableau 5: Effet des polyphénols sur la libération des arômes du vin.

6. LA PELLICULE MUCOSALE

Les différentes structures anatomiques se situant à l'intérieur de la cavité orale sont recouvertes par une mince couche organique acellulaire, appelée pellicule salivaire. On parlera de pellicule dentaire ou de pellicule mucosale selon qu'elle se trouve sur la surface dentaire (Hannig and Joiner 2006) ou en surface de la muqueuse orale (Bradway, Bergey et al. 1989). La pellicule mucosale est une mince couche de protéines salivaires adsorbée en surface de l'épithélium oral (Bradway, Bergey et al. 1989).

Plusieurs études *in vitro* se sont intéressées à la structure et à la composition de la pellicule mucosale, mais peu d'études ont été menées *in vivo* du fait de la difficulté à prélever uniquement la pellicule. Les études *in vitro* sont réalisées sur des surfaces synthétiques hydrophobes ayant des propriétés de surface (hydrophobie, mouillabilité) proches des propriétés de surface de la muqueuse orale (Ranc, Elkhyat et al. 2006).

6.1. COMPOSITION ET STRUCTURE

Seules quelques études ont été menées *in vivo*, sur des cellules épithéliales collectées à l'aide d'un rinçage de bouche. Une première étude de Bradway et al. (1989) a permis d'identifier les composants de la pellicule mucosale. Des mucines MUC5B et MUC7, des amylases, cystatine SN et PRP ont été détectées (Bradway, Bergey et al. 1992). Il ressort d'une étude plus récente que d'autres protéines sont aussi retenues en surface des cellules, notamment l'immunoglubuline A (IgA), l'anhydrase carbonique VI (CAVI), la cystatine S, la stathérine et le secretory component (Gibbins, Proctor et al. 2014). Les auteurs ont aussi rapporté une faible rétention des amylases et pas de rétention des PRP, contrairement à la première étude. Cependant selon les auteurs, l'absence de PRP pourrait s'expliquer par la méthode utilisée peu adaptée à la détection de ces protéines (Gibbins, Proctor et al. 2014). La concentration des IgA dans la pellicule par rapport à la concentration trouvée dans la salive totale ainsi que l'absence d'amylase, qui est une protéine majoritaire de la salive, illustre bien la spécificité de l'adsorption des protéines sur les cellules épithéliales (Gibbins, Proctor et al. 2014).

In vitro, la concentration de protéines salivaires retenues sur une surface hydrophobe mimant la surface orale a été estimée à 3,6 mg/m² (Macakova, Yakubov et al. 2010) et 5,4 mg/m² (Cardenas, Arnebrant et al. 2007) selon le support utilisé, à savoir le polydimethylsiloxane (PDMS) ou l'alumine, le second étant plutôt utilisé pour mimer la surface dentaire.

Ces études sur surfaces hydrophobes ont d'autre part permis d'évaluer la structure de la pellicule salivaire. Une modèle propose actuellement une organisation en deux couches : une couche d'ancrage constituée des régions hydrophobes et non glycosylées des mucines et de petites protéines salivaires, et une couche externe, constituée des zones glycosylées des mucines (Cardenas, Arnebrant et al. 2007) (Figure 6). De plus il a été observé la présence d'agrégats (Cardenas, Arnebrant et al. 2007), identifiés comme étant constitués de mucines MUC5B, dont la taille peut atteindre 8 µm dans la couche externe de la pellicule (Cardenas, Elofsson et al. 2007). L'épaisseur de la pellicule salivaire formée sur le PDMS a été mesurée à environ 20 nm après rinçage au NaCl 70mM (Macakova, Yakubov et al. 2010), la hauteur maximale pouvant atteindre 120 nm (Cardenas, Elofsson et al. 2007).



Figure 6: Représentation schématique de la muqueuse orale et de la pellicule mucosale.

Peu de données sont disponibles *in vivo*. Néanmoins, des images de microscopie électronique à transmission (MET) et la détection spécifique des MUC5B sur des coupes de cellules buccales cryofixées semblent confirmer les données *in vitro*, l'épaisseur de la pellicule *in vivo* variant entre 0 et 100 nm, avec la présence de plus gros dépôts localisés de MUC5B (Morzel, Tai et al. 2014) (Figure 7).



Figure 7: Immuno-détection des MUC5B (grains d'or) sur des coupes de cellules buccales cryofixées (Morzel et al., 2014).

La structure, notamment l'épaisseur de la couche externe de la pellicule dépend de la force ionique du milieu environnant. Les régions glycosylées des mucines sont chargées négativement du fait de la présence d'acide sialique et de sulfates (Tabak, Levine et al. 1982). De ce fait, une légère diminution de la force ionique provoque un déploiement de ces régions par répulsion intermoléculaire. Si la force ionique diminue de façon trop importante, ces zones chargées négativement collapsent sur les régions chargées positivement des groupements amines des protéines (Macakova, Yakubov et al. 2010), mécanisme à l'origine de la gélification des mucines (Bansil and Turner 2006).

6.2. PROPRIETES ET FONCTIONS BIOLOGIQUES

6.2.1. Lubrification de la muqueuse orale

Les propriétés de lubrification de la salive sont attribuables en majeure partie à sa composition en mucines (Tabak 1995) bien que les PRP aient aussi montré une capacité de lubrification (Hahn Berg, Lindh et al. 2004). La salive contient deux mucines majeures, les MUC5B et les MUC7, qui sont aussi les composants majoritaires de la pellicule mucosale (Gibbins, Proctor et al. 2014). La mucine MUC5B est une grande glycoprotéine oligomérique de plus de 1000 kDa tandis que MUC7 est une petite glycoprotéine monomérique de masse moléculaire comprise entre 200 et 250 kDa. Toutes deux sont caractérisées par une grande richesse en oligosaccharides, MUC5B contenant plus de 78% et MUC7 environ 68% (Loomis, Prakobphol et al. 1987). Ces protéines sont respectivement

responsables de deux propriétés rhéologiques de la salive, à savoir la viscosité et le spinnbarkeit (capacité de la salive à s'étirer en fils) (Inoue, Ono et al. 2008). Les régions glycosylées des protéines chargées négativement retiennent les molécules d'eau et contribuent aussi à la formation d'un gel hydraté. Des répulsions stériques (Berg, Rutland et al. 2003) et électrostatiques (Lee, Muller et al. 2005) entre les régions glycosylées sont à l'origine des propriétés lubrifiantes.

Des études tribologiques sur des pellicules salivaires formées sur des surfaces synthétiques hydrophobes ont montré une diminution du coefficient de friction en présence d'une pellicule salivaire (Berg, Rutland et al. 2003, Macakova, Yakubov et al. 2011). En utilisant des langues de porcs, Ranc et al. (2006) ont observé une diminution du coefficient de friction d'un facteur 1,6 ainsi qu'une augmentation du caractère hydrophile de la surface en présence d'une pellicule salivaire (Ranc, Elkhyat et al. 2006). Du fait de sa fine épaisseur et de sa viscosité, la pellicule salivaire s'inscrit dans un régime dit de lubrification d'interface ou « boundary lubrication », caractérisé par une coefficient de friction élevé (Yakubov, McColl et al. 2009, Coles, Chang et al. 2010). Ce régime s'oppose à la lubrification hydrodynamique de la salive (Figure 8).





6.2.2. Barrière biologique

En plus de leur rôle de protection mécanique contre l'abrasion des surfaces orales, les mucus offrent un rôle de barrière biologique. Le rôle du mucus comme barrière biologique a été largement étudié au niveau de la muqueuse intestinale (Boegh and Nielsen 2015) et suscite aujourd'hui un intérêt au niveau de la muqueuse orale (Teubl, Absenger et al. 2013).

Le mucus offre une perméabilité sélective par le biais de deux mécanismes. D'une part, il constitue un filtre stérique du fait de la taille des pores du réseau de mucines, et, d'autre part, une barrière interactive puisque les molécules engagées dans une interaction assez forte avec les molécules constitutives du mucus sont retenues indépendamment de leur taille, du fait d'interactions hydrophobes ou électrostatiques (Lieleg and Ribbeck 2011). Des observations microscopiques réalisées sur des mucines humaines séchées ont permis de mesurer le diamètre des pores du réseau, celui-ci pouvant atteindre 800 nm. *In vitro*, ce réseau limite la pénétration de nanoparticules hydrophiles de 200 nm chargées négativement, en les agrégeant, mais laisse passer les particules de même taille non chargées et chargées positivement (Teubl, Absenger et al. 2013). Le réseau formé par les mucines limite aussi l'accès et la fixation des microorganismes à la muqueuse orale (Tabak, Levine et al. 1982).

La concentration importante des IgA dans la pellicule mucosale laisse penser qu'elle pourrait avoir un rôle dans la protection immunitaire, notamment en jouant le rôle de « réservoir » de protéines immunitaires, et ainsi protéger la muqueuse des infections (Gibbins, Proctor et al. 2014).

6.2.3. Perception sensorielle

L'implication de la pellicule mucosale dans la perception sensorielle est à ce jour hypothétique. Cependant, comme il a déjà été dit précédemment, les interactions entre protéines de la pellicule mucosale et les molécules de la flaveur que sont les arômes et les tanins pourraient participer aux phénomènes de rémanence aromatique (Esteban-Fernandez, Rocha-Alcubilla et al. 2016) et d'astringence (Nayak and Carpenter 2008).

6.3. FORMATION DE LA PELLICULE MUCOSALE

La formation des pellicules salivaires est un processus complexe du fait du grand nombre de protéines présentes dans la salive. Si la formation de la pellicule dentaire a été bien caractérisée en raison de son importance dans la protection des dents (Hay 1967), celle de la pellicule mucosale reste à ce jour encore peu étudiée. L'adsorption sélective des protéines en surfaces des cellules épithéliales à l'origine de la formation de la pellicule salivaire est un processus dynamique impliquant plusieurs mécanismes dont l'établissement d'interactions covalentes et non-covalentes entre la surface des cellules épithéliales et les protéines salivaires.

6.3.1. Rôle de la transglutaminase

L'analyse de cellules épithéliales incubées avec de la salive parotidienne a révélé la formation de complexes macromoléculaires entre les cellules et protéines salivaires. L'inhibition du processus par un pré-traitement des cellules par chauffage a démontré l'implication de réactions enzymatiques dans ce processus, qui ont été attribuées à la transglutaminase (TGM) (Bradway, Bergey et al. 1989, Bradway, Bergey et al. 1992). Cette enzyme appartient à la famille des aminotransférases et catalyse la formation de liaisons covalentes entre les résidus glutamines et les groupements amines des protéines (Williams-Ashman and Canellakis 1980). La TGM catalyse notamment la transpeptidation des PRP et des stathérines, qui initie la formation de la pellicule dentaire (Yao, Lamkin et al. 2000), mais n'a pas montré d'effet sur l'amylase et les cystatines (Bradway, Bergey et al. 1992).

Huit formes de TGM ont été identifiées chez l'homme (Griffin, Casadio et al. 2002). Les formes actives et inactives de la TGM 3, ou TGM épidermale, ont été détectées dans des lysats de cellules orales (Gibbins, Proctor et al. 2014).

In vitro, la présence de TGM favorise d'adhésion de MUC7 sur des surfaces synthétiques (Gibbins, Yakubov et al. 2014). La rétention des MUC7 pourrait être un effet indirect résultant de l'interaction entre les MUC7 et d'autres protéines dont la rétention est favorisée par la TGM, comme les PRP ou les stathérines (Gibbins, Yakubov et al. 2014). La TGM n'a par ailleurs pas d'effet sur l'adhésion des MUC5B aux surfaces synthétiques (Gibbins, Yakubov et al. 2014). Cependant, ces études ne permettent pas d'évaluer le rôle de la TGM dans l'établissement les liaisons covalentes avec les protéines membranaires ou celles du cytosquelette.

6.3.2. Propriétés de surface

Bien que peu d'études le démontrent, il semble que la surface de la muqueuse orale soit de nature hydrophobe (van der Mei, White et al. 2004, Ranc, Elkhyat et al. 2006). *In vitro*, les protéines sont capables de s'adsorber à la fois sur les surfaces hydrophobes et sur les surfaces hydrophiles (Aroonsang, Sotres et al. 2014, Gibbins, Yakubov et al. 2014). Cependant, si certains auteurs n'ont vu qu'un faible effet de l'hydrophobie de la surface sur la composition de la pellicule (Aroonsang, Sotres et al. 2014) d'autres ont rapporté une différence notable dans la composition et la quantité de protéines retenues, suggérant l'implication d'effets hydrophobes dans la formation de la pellicule (Vassilakos, Arnebrant et al. 1993, Cardenas, Elofsson et al. 2007, Gibbins, Yakubov et al. 2014).

Gibbins et al (2014) ont noté que les MUC5B étaient uniquement retenues sur les surfaces hydrophobes ce qui est en accord avec le modèle structural de la pellicule qui suggère que la couche d'ancrage de la pellicule mucosale est constituée en partie des régions hydrophobes des MUC5B. Cependant, la quantité retenue sur ce type de surface est très faible par rapport à la concentration salivaire de MUC5B et par rapport aux données collectées *in vivo*, ce qui suggère qu'un autre mécanisme serait impliqué dans l'adhésion de cette protéine (Gibbins, Yakubov et al. 2014). Aroonsang et al. (2014) ont quant à eux détecté les mucines en quantité relativement abondante dans la pellicule formée sur les surfaces hydrophobes (Aroonsang, Sotres et al. 2014). Dans leurs études, Gibbins et al. (2014) et Aroonsang et al (2014) utilisent des surfaces différentes (polystyrène vs silice méthylée, sphérique vs plane) et des temps d'incubation différents (20 h vs 1h), ce qui pourrait expliquer en partie les différences observées.

6.3.3. Interactions mucines - protéines et mucines - mucines

L'étude *in vitro* de l'adhésion des protéines salivaires aux surfaces synthétiques a révélé l'existence d'interactions protéines – protéines. En effet, lors de l'incubation avec de la salive totale, les MUC7 et les IgA se lient aux surfaces, mais en l'absence de MUC7 (salive parotidienne), aucune rétention d'IgA n'est observée, ce qui suggère la formation de liaisons entre les deux molécules (Gibbins 2014).

Alors que les mucines semblent être à la fois les protéines majoritaires et celles ayant la plus forte interaction avec les cellules (Gibbins, Proctor et al. 2014), elles n'ont montré qu'une faible rétention sur les surfaces synthétiques (Gibbins, Yakubov et al. 2014), ce qui suggère l'implication d'un autre mécanisme dans leur adsorption aux cellules épithéliales. Une hypothèse de la littérature propose que des interactions entre mucines salivaires glycosylées et mucines membranaires seraient impliquées dans l'ancrage des MUC5B aux cellules. Les MUC5B pourraient interagir avec la mucine 1 (MUC1), soit de façon directe, soit avec un complexe formé entre MUC1 et les mucines 4 (MUC4). (Offner and Troxler 2000).

Pramanik et al (2010) ont observé une diminution de la lubrification orale chez les patients souffrant du syndrome de la bouche sèche associée à une expression réduite de MUC1 (Pramanik, Osailan et al. 2010). Chang et al (2011) ont observé que l'expression de MUC1 au niveau de la muqueuse orale diminuait chez les personnes âgées, indiquant une diminution des défenses de la muqueuse orale au sein de cette population (Chang, Chang et al. 2011). Cette conséquence pourrait résulter d'une diminution de la lubrification de la muqueuse, soit directement du fait de la sous-expression de MUC1, soit par une rétention des MUC5B moindre.

MUC1 est une mucine membranaire polymorphique glycosylée présentant une distribution quasi ubiquitaire dans les épithéliums (Hanisch and Müller 2000) et notamment présente au niveau des épithéliums labiaux et buccaux (Pramanik, Osailan et al. 2010, Kullaa, Asikainen et al. 2014). Elle est constituée d'une région N-terminale extracellulaire constituée de 107 acides aminés, d'une région contenant une nombre variable de séquences répétées (variable number of tandem repeats, VNTR) contenant entre 420 et 2500 acides aminés suivie d'une séquence de 227 acides aminés, d'une petite région transmembranaire de 27 acides aminés et d'une région C-terminale cytoplasmique de 69 acides aminés (Offner and Troxler 2000). Il existe de nombreux variants de MUC1 (Figure 9), dont une isoforme Y (MUC1/Y), tronquée des régions répétées VNTR et une forme excrétée (MUC1/sec) (Hanisch and Müller 2000) résultant très probablement d'un clivage protéolytique de la forme transmembranaire (Liu, Lague et al. 2002).



Figure 9: Structure d'isoformes de MUC1 (adapté de Hanisch & Müller, 2000).

Peu d'études se sont intéressées aux interactions entre MUC1 et MUC5B. Des travaux *in vitro* ont suggéré que diverses régions des MUC5B peuvent former des complexes avec la région N-terminale extracellulaire de MUC1 (Wang, Li et al. 2004), sans toutefois identifier précisément quelle partie de cette région est impliquée.

Des travaux ont récemment été réalisés sur deux lignées cellulaires intestinales HT29-MTX et HT29 (Gibbins, Proctor et al. 2015). Les HT29-MTX secrètent la mucine membranaire MUC5AC, à l'origine du mucus intestinal (Pelaseyed, Bergstrom et al. 2014) tandis que les HT29 sont non muco-

sécrétrices. Lors de l'incubation des deux types cellulaires avec de la salive, seules les HT29-MXT permettent une rétention des MUC5B. Les cellules muco-sécrétrices présentent une meilleure rétention des cystatines S et une rétention des IgA 8 fois supérieure que sur les cellules HT29. De plus, l'adhésion des IgA purifiées est moins importante que lorsque les cellules sont incubées avec de la salive totale (Gibbins, Proctor et al. 2015). Bien que la muqueuse ainsi modélisée diffère de la muqueuse orale, à la fois par la structure des cellules et par la nature du mucus, ces résultats mettent en avant le rôle des interactions mucines-mucines dans la formation de la pellicule, notamment l'ancrage des MUC5B aux cellules épithéliales, et montrent aussi l'importance du réseau de mucines dans l'adhésion d'autres protéines constitutives de la pellicule.

6.4. LA MUQUEUSE ORALE

6.4.1. Structure

La muqueuse orale est constituée d'un épithélium peu ou non kératinisé selon sa localisation surmontant une couche de tissu conjonctif appelé lamina propria. On distingue trois types de muqueuses. La muqueuse masticatoire, qui recouvre le palais osseux et les gencives, possède un épithélium kératinisé résistant aux forces de mastication et à l'abrasion. La muqueuse dite bordante est une surface élastique et déformable recouverte d'un épithélium squameux non kératinisé qui tapisse le reste de la cavité orale, excepté la face dorsale de la langue, qui est elle recouverte d'une muqueuse spécialisée, ayant les caractéristiques des deux autres types de muqueuse et étant pourvue de papilles gustatives (Squier 1991).

La surface des cellules épithéliales orales superficielles présente des replis de la membrane appelés microplicae (MPL) comme on peut le voir sur la Figure 10 A. Il n'y a pas de différence de hauteur ou de largeur entre les MPL des différentes régions orales, mais différentes organisations des MPL ont été notées. La muqueuse kératinisée à une apparence alvéolée. La surface des cellules recouvrant la langue, entre les papilles, présente différents motifs de MPL, parallèles et en branche tandis que les MPL en surface des cellules de la muqueuse bordante présentent uniquement une organisation en branches et une densité supérieure aux autres régions de la bouche (Asikainen, Mikkonen et al. 2014). Des molécules dépassant de la membrane plasmique ont été observées au niveau des MPL (Figure 10 B.) qui semble être relativement discontinue. Ces molécules pourraient être des mucines 1 participant à la formation de la pellicule mucosale (Kullaa, Asikainen et al. 2014).



Microplicae (MPL) sur des cellules épithéliales orales de la muqueuse bordante (A, barre d'échelle $10\mu m$). A fort grossissement (B), de petites molécules dépassent des membranes.

Figure 10: Images MEB de la surface de cellules épithéliales de la muqueuse bordante orale (Kullaa et al., 2014).

6.4.2. Lignées et modèles cellulaires existants

Les lignées cellulaires sont des populations homogènes stables de cellules ayant d'un point de vue théorique un nombre de divisons illimité, ce qui leur confère un avantage par rapport aux cultures primaires.

Différents modèles cellulaires *in vitro* ont été développés ces dernières années, notamment pour étudier les propriétés de diffusion à travers la muqueuse intestinale (Boegh, Baldursdottir et al. 2014) et orale (Teubl, Absenger et al. 2013) et les interactions mucines-mucines à l'origine de la formation de la pellicule (Gibbins, Proctor et al. 2015). Les lignées cellulaires orales utilisées dans la littérature et les modèles de muqueuse développés, le type de mucus s'il existe et les avantages et inconvénients des modèles et lignées sont décrits dans le Tableau 6.

Type cellulaire	Mucus	Avantages	Inconvénients	Sources
HT29 et HT29-MXT	- Mucines sécrétées - Incubation salive humaine	- Lignée muco- sécrétrice ou non - Salive humaine	- Cellules intestinales (cellules cylindriques) - Sécrétion MUC5AC → mucus épais (100- 300 μm)	(Gibbins, Proctor et al. 2015)
TR146	- Mucines de porc déshydratées - Salive humaine déshydratée	-Cellules épithéliales orales non kératinisées - Bien caractérisées	- N'expriment pas MUC1 - Mucines séchées = dénaturées	(Teubl, Absenger et al. 2013)
KB	-	Expriment MUC1	Cellules orales kératinisées contaminées par cellules HeLa (Lacroix 2008)	(Hori, Sugiyama et al. 2007)
HO-1-N-1	-	Cellules épithéliales orales non kératinisées	- Peu caractérisées - Lignée non- commercialisée	(Payne, Bowyer et al. 2009)

Tableau 6: Lignées et modèles cellulaires d'épithélium oral.

A ce jour aucun modèle d'épithélium oral cellulaire incluant une pellicule salivaire fonctionnelle n'a été proposé dans la littérature. Les cellules de la lignée TR146 sont proches de celles observées dans la muqueuse orale, que ce soit au niveau structural ou fonctionnel (Rupniak, Rowlatt et al. 1985, Jacobsen, Van Deurs et al. 1995), c'est pourquoi elles constituent un choix intéressant pour développer un modèle *in vitro* d'épithélium oral. Ces cellules ne sont pas muco-sécrétrices.

7. METHODES ANALYTIQUES MISES EN ŒUVRE

7.1. CARACTERISATION STRUCTURALE PAR MICROSCOPIE

La pellicule mucosale est une structure peu caractérisée à ce jour. Seule quelques études *in vivo* sont disponibles sur sa composition (Gibbins, Proctor et al. 2014) et sa structure (Morzel, Tai et al. 2014) notamment du fait de la difficulté à prélever et à conserver cette structure fragile.

L'objectif premier de ce travail est de développer un modèle *in vitro* d'épithélium oral, doté d'une pellicule mucosale. Ainsi les méthodes à mettre en œuvre ont pour but :

• De caractériser la surface des cellules épithéliales.

La surface des cellules épithéliales orales a été étudiée par microscopie électronique à balayage et à transmission (MEB et MET) (Kullaa-Mikkonen 1986, Asikainen, Mikkonen et al. 2014). Le MEB permet d'avoir une image à haute résolution de la surface de l'échantillon uniquement, tandis que les images MET sont réalisées sur des coupes et permettent aussi d'observer l'ultrastructure des cellules.

• D'évaluer le tapissage des cellules par les MUC5B.

Le tapissage des cellules par les MUC5B (une protéine constitutive majeure de la pellicule mucosalechoisie comme indicateur de cette structure) a été observé après immunomarquage de la protéine sur des cellules prélevées in vivo par frottis buccal (Zadoroznyj, Brignot et al. 2012) à l'aide d'un anticorps monoclonal spécifique F2 (Veerman, Bolscher et al. 1997).

o D'observer la structure de la pellicule

Le mucus constitué de mucines animales et humaines a été observé par MEB (Teubl, Absenger et al. 2013). MUC5B a été détectée sur des coupes de cellules cryofixées et observées par MET (Morzel, Tai et al. 2014). Cette technique offre l'avantage de mieux conserver les structures que les techniques de fixation chimique, ce qui s'avère intéressant pour une structure fragile comme la pellicule mucosale. *In vitro*, la topographie de la pellicule formée sur des surfaces hydrophobes a été observée par microscopie à force atomique (AFM) (Cardenas, Elofsson et al. 2007)

o D'étudier l'effet des tanins sur la structure de la pellicule

Des observations par AFM ont été réalisées sur des mucines purifiées et ont permis de mettre en évidence un phénomène d'agrégation des protéines par les tanins (Davies, Pudney et al. 2014).

Le Tableau 7 présente les avantages et inconvénients de quelques méthodes de microscopie (Heinisch, Lipke et al. 2012, Wilson and Bacic 2012) applicables à l'étude structurale d'un modèle cellulaire doté ou non d'une pellicule salivaire. Ces méthodes s'avèrent complémentaires. La microscopie optique permet après immunomarquage d'étudier spécifiquement la couche de mucines en surface via la localisation de la protéine cible. La microscopie électronique à balayage apporte des informations structurales de surface à haute résolution. La microscopie électronique à transmission permet des observations ultrastructurales. Elle peut être couplée à un marquage sur coupes de cellules préservées dans leur structure, ce qui permet ainsi d'observer la pellicule et potentiellement d'en mesurer l'épaisseur. Des observations en conditions physiologiques peuvent

être réalisées en microscopie à force atomique, qui offre aussi la possibilité d'observer des processus dynamiques (High-Speed AFM), tels que l'agrégation des protéines salivaires par les tanins.

Tableau 7: Avantages et inconvénients des techniques de microscopies. D'après Wilson et al. (2012) et Heinisch et al. (2012).

	Principe	Avantages	Inconvénients	
	Source = photons			
Microscopie Optique (MO)	Grand champPossibilité d'observer desLumière blanche oustructures vivantesfluorescenceIdentification d'organites/Transmission ou réflexionmoléculesMicroscopie confocale àBiphoton : observation d'unbalayage laserBiphoton : observation d'un		Fixation nécessaire pour immunomarquage : altération/déplacement des structures Résolution limitée à environ 0,5 µm (grand champ) et 0,2	
	Microscopie biphotonique : excitation d'un fluorophore dans l'échantillon	échantillon épais	μm (focalisée)	
4E)	Source = électrons sous un vide poussé	Meilleure résolution que MO Possible couplage avec techniques d'immunocytochimie	Fixation et déshydratation nécessaires	
opie Electronique (→ A transmission Les électrons traversent l'échantillon et permettent d'observer les organites au sein de la cellule 	Résolution 2nm Grossissement jusqu'à 600 000 x Possibilité de cryofixation qui conserve les structures	Préparation des échantillons longue Machinerie sophistiquée et coûteuse La zone d'intérêt doit être dans la zone de coupe	
Microscol	→ A balayage Les électrons balayent la surface de l'échantillon et permettent d'en observer la surface	Résolution jusqu'à 3-5 nm Grossissement 100 000 x Informations sur la topographie Possibilité de cryofixation qui conserve les structures	Métallisation des échantillons organiques : modification des structures anatomiques	
Microscopie à Force Atomique (AFM)	Sonde locale, interactions (attraction/répulsion) entre la sonde et la surface de l'échantillon	Résolution de l'ordre du nm Possibilité d'observer les structures en conditions physiologiques Sondes fonctionnalisées -> propriétés de surfaces Observation de processus dynamiques	Dégradation rapide de l'échantillon Temps d'analyse long Faible surface couverte	
7.2. ANALYSE D'AROME PAR ANALYSE DE L'ESPACE DE TETE

7.2.1. Principe de l'analyse de l'espace de tête

L'analyse des molécules d'arôme présentes en solution nécessite leur extraction du substrat. Il existe plusieurs méthodes d'extraction des arômes dont les plus utilisées sont: l'extraction par solvant, la distillation par la vapeur et l'analyse de l'espace de tête.

Le choix de la technique d'analyse dépend à la fois des conditions (*in vivo, in vitro*), de la matrice utilisée, et de l'objectif de l'analyse. Ainsi, la méthode d'extraction employée sera différente selon que l'on souhaite par exemple connaître la composition globale d'un produit, mettre en évidence l'existence d'interactions entre odorants et substrat ou observer une cinétique de libération. Nous nous intéressons ici plus particulièrement aux techniques d'analyse de l'espace de tête utilisées pour l'analyse i*n vitro*.

Cette technique consiste à placer un échantillon solide ou liquide dans un flacon hermétique, et à analyser la phase gazeuse après équilibre. La sensibilité de la méthode est proportionnelle au volume de gaz prélevé et analysé. L'analyse de l'espace de tête présente l'avantage d'être simple à mettre en œuvre et de ne pas nécessiter l'utilisation de solvant.

7.2.2. Méthode séparative : La chromatographie en phase gazeuse.

7.2.2.1. Généralité

La chromatographie est une technique analytique non destructrice basée sur la séparation différentielle de constituants entrainés par une phase mobile à travers une phase stationnaire selon la différence d'affinité entre cette dernière et les composés.

La chromatographie en phase gazeuse s'applique à l'analyse de composés gazeux ou susceptibles d'être vaporisés par chauffage, sans décomposition. Elle est donc particulièrement adaptée à l'analyse des molécules d'arôme.

Elle est généralement couplée à des techniques de détection destructives. Parmi la diversité des systèmes existants, le détecteur à ionisation de flamme (FID) est couramment utilisé pour l'analyse d'arômes car il ne détecte que les produits organiques. Il donne une réponse proportionnelle au nombre d'atomes de carbone de la molécule. Ce détecteur présente une bonne sensibilité, une bonne linéarité ainsi que de bons résultats quantitatifs. Un couplage avec un spectromètre de masse (MS), est utile pour l'identification de composés inconnus.

7.2.2.2. Extraction de l'espace de tête

Il existe différentes techniques permettant d'extraire le gaz de l'espace de tête. Les techniques les plus couramment utilisées en analyse GC sont résumées dans le Tableau 8

Technique d'extraction	Principe	Avantages	Inconvénients	Sources
Espace de tête statique (SHS)	Prélèvement direct de l'espace de tête à l'équilibre thermodynamique	Simple Pas de pré- traitement des échantillons	Sélectivité (composés les plus volatils) Sensibilité limitée	(Miller and Stuart 1999, Fabre, Aubry et al. 2002)
Espace de tête dynamique (DHS) ou « purge and trap»	Purge de l'espace de tête et concentration dans un piège sous l'action d'un flux gazeux	Mêmes avantages que SHS Sensibilité Peu sélectif	Mauvaise répétabilité Extraction longue Discrimination de l'effet des matrices limitée par le déplacement d'équilibre	(Fabre, Aubry et al. 2002)
Micro- extraction sur phase solide (SPME) (Statique ou dynamique)	Fibre rétractable recouverte d'une phase stationnaire Désorption des composés dans l'injecteur	Meilleure sensibilité que SHS Meilleure discrimination des composés que DHS	Optimisation des conditions longue Reconditionnement fibre après chaque analyse Sélectivité (composés dont l'affinité pour la phase solide est élevée) Compétition entre COVs Introduction d'un deuxième équilibre	(Jeleń, Wlazły et al. 1998, Miller and Stuart 1999)

Tableau 8: Comparaison des principales techniques d'extraction de l'espace de tête en analyse d'arôme

L'analyse d'un même échantillon peut donner des résultats différents selon la méthode utilisée (Fabre, Aubry et al. 2002) c'est pourquoi il est important de considérer le but de l'étude lors du choix d'une méthode. Bien que présentant des inconvénients par rapport aux autres techniques, l'analyse statique de l'espace de tête est intéressante dans le cas d'études d'interactions entre matrice et composés volatils. Elle permet une analyse à l'équilibre thermodynamique tandis que l'analyse dynamique induit un déplacement d'équilibre ce qui peut limiter la discrimination de libération de certains composés (Fabre, Aubry et al. 2002, Munoz-Gonzalez, Feron et al. 2014). L'utilisation de fibres SPME n'est pas adaptée à notre étude du fait de la sélectivité de la fibre vis à

vis des composés d'arôme et l'introduction d'un deuxième équilibre qui pourrait biaiser l'étude comparative des résultats.

7.2.2.3. Détermination des coefficients de partage à l'équilibre

Un système fermé tend naturellement à un état d'équilibre thermodynamique. Selon la loi de Henry, dans un idéal de dilution infinie, la pression partielle à l'équilibre d'une molécule dans la phase gaz est proportionnelle à sa concentration dans la phase liquide. Cet état est caractérisé par le coefficient de partage des molécules, défini comme le ratio entre la concentration d'un composé dans la phase gazeuse et celle dans la phase liquide.

L'analyse de l'espace de tête est couramment utilisée pour déterminer les facteurs modifiant la partition des molécules d'arômes entre un produit et la phase gazeuse. La mesure des coefficients de partage est notamment utilisée pour obtenir des informations sur les interactions entre matrice et molécules d'arômes en condition d'équilibre (van Ruth and King 2003, Chana, Tromelin et al. 2006).

Plusieurs méthodes permettent de calculer la concentration de l'espace de tête en conditions dynamique et statique. La variation du ratio de phase (PRV) (Ettre, Welter et al. 1993) qui est basée sur la constance du coefficient de partage dans une enceinte fermée, est une méthode simple et plus précise que la calibration liquide, qui semble sous-estimer jusqu'à 50 % la concentration de la phase gaz (Athes, Lillo et al. 2004).

7.2.3. Méthode non séparative : injection directe en spectrométrie de masse

7.2.3.1. Généralités

La spectrométrie de masse est une technique analytique destructrice permettant l'identification, la quantification et l'analyse structurale des molécules d'intérêt par la mesure de leur masse. Cette technique est basée sur la détection de composés préalablement ionisés puis séparés selon leur rapport masse sur charge (m/z). L'injection directe d'un échantillon dans la chambre d'ionisation d'un spectromètre de masse permet d'obtenir un spectre caractéristique en s'affranchissant de l'étape de séparation des composés, ce qui permet de réduire considérablement le temps d'analyse (Taylor and Linforth 2003) tout en donnant des résultats comparables à ceux obtenus avec les analyses GC–FID et GC-MS (van Ruth, Boscaini et al. 2003).

Plusieurs systèmes de spectrométrie de masse existent pour l'analyse des composés volatils (Biasioli, Yeretzian et al. 2011), les plus couramment utilisés en analyse d'arôme étant l'APCI-MS

70

(Atmospheric Pressure Chemical Ionization – Mass Spectrometry) et le PTR-MS (Proton Transfert Peaction – Mass Spectrometry) (Taylor and Linforth 2003, van Ruth, Boscaini et al. 2003, Deleris, Saint-Eve et al. 2013).

7.2.3.2. Intérêt des techniques non séparatives

Comparé à la GC, l'injection directe en spectrométrie de masse permet d'ajouter une dimension temporelle à l'analyse d'arôme grâce au suivi en temps réel de la libération des composés (Biasioli, Yeretzian et al. 2011). Ainsi, les systèmes APCI-MS et PTR-MS sont utilisés pour suivre *in vitro* et *in vivo* des cinétiques de libération d'arômes (Pionnier, Chabanet et al. 2004, Heenan, Soukoulis et al. 2012).

Dans les concentrations coïncidant avec le principe de la dilution infinie, certains composés ayant un point d'ébullition supérieur à 200°C, ou une pression de vapeur saturante inférieure à 0,1hPa à 25°C sont difficilement détectables en GC-FID (Heilig, Sonne et al. 2016). L'injection directe en MS permet aussi de calculer les coefficients de partage et présente l'avantage d'être plus sensible. Une nouvelle méthode de mesure de coefficient de partage par APCI-MS a récemment été développée. Le système permet l'analyse de l'espace de tête de solution dont la concentration est inférieur à 0,1 ppm (Avison, van Gruijthuijsen et al. 2015). Le PTR offre l'avantage de permettre la détection de composés volatils dans des concentrations de l'ordre du ppb (Hansel, Jordan et al. 1995) et s'est révélé être un outil idéal pour la mesure des constantes de Henry (Lindinger, Hansel et al. 1998).

CHAPITRE 1 DEVELOPPEMENT D'UN MODELE IN VITRO D'EPITHELIUM ORAL

1. INTRODUCTION

1.1. PROBLEMATIQUE

Parmi les propriétés de la pellicule mucosale, celle-ci pourrait interagir avec les molécules de la flaveur que sont les arômes et les tanins et ainsi moduler leur perception.

L'étude *in vivo* des interactions entre muqueuse orale, molécules d'arôme et tanins est confrontée à deux problèmes : la variabilité physiologique interindividuelle (surface et volume oraux et composition de la salive et de la pellicule) et la difficulté de prélever des cellules *in vivo* sans déstructurer la pellicule.

Bien que la pellicule ait été récréée sur des surfaces synthétiques (Gibbins, Yakubov et al. 2014) (Aroonsang, Sotres et al. 2014) (Macakova, Yakubov et al. 2010), celles-ci ne reproduisent que mal la surface de la muqueuse orale, à la fois d'un point de vue topographique avec notamment la présence de microplicae à la surface des cellules épithéliales (Kullaa-Mikkonen 1986) et d'un point de vue biochimique. La muqueuse orale ne peut donc pas être réduite à une surface hydrophobe plane. C'est pourquoi la composition de la pellicule formée sur des surfaces hydrophobes diffère substantiellement de la composition réelle de la pellicule, notamment par une faible rétention des MUC5B sur les surfaces hydrophobes, pourtant identifiées comme un composant majeur dans la pellicule *in vivo* (Gibbins, Proctor et al. 2014) (Gibbins, Yakubov et al. 2014).

Il n'existe pas à ce jour de modèle *in vitro* de muqueuse orale incluant la pellicule mucosale. Afin de comprendre et de caractériser les interactions entre pellicule mucosale et molécules de la flaveur, il est donc nécessaire de disposer d'un modèle *in vitro* de muqueuse orale ayant des caractéristiques structurales et biochimiques les plus proches possible des conditions physiologiques *in vivo*.

Notre objectif a donc été de développer un modèle d'épithélium oral incluant la pellicule mucosale.

CHAPITRE 1

1.2. STRATEGIE

L'utilisation d'une lignée cellulaire s'est révélée être une solution intéressante puisqu'elle permet de disposer de cellules en quantité illimitée. Nous avons choisi d'utiliser la lignée de cellules épithéliales orales TR146 puisqu'elles ont montré des caractéristiques structurales (présence de MPL) des cellules épithéliales orales (Jacobsen, Van Deurs et al. 1995) (Teubl, Absenger et al. 2013). La stratégie globale a été d'incuber des cultures confluentes de cellules avec de la salive humaine, puis de rincer afin de ne conserver que la salive ancrée aux cellules. Afin de recréer au mieux la composition de la pellicule mucosale, de la salive humaine totale non stimulée clarifiée a été utilisée. Un pool de salive a été utilisé afin de pallier la variabilité individuelle observée dans la composition de la salive (Jehmlich, Dinh et al. 2013).

Par ailleurs, la synthèse bibliographique ayant suggéré l'implication de la mucine membranaire MUC1 dans la formation de la pellicule mucosale, la lignée a été transfectée de manière à exprimer la protéine et ainsi tester si cela apportait une amélioration dans la rétention de salive par les cellules.

Enfin, la mucine salivaire MUC5B, qui a été identifiée comme un composant majeur de la pellicule mucosale (Gibbins, Proctor et al. 2014) est aussi une des protéines interagissant préférentiellement avec les molécules de la flaveur : arômes (Pages-Helary, Andriot et al. 2014) et tanins (Davies, Pudney et al. 2014). Aussi, nous avons donc choisi d'utiliser cette protéine comme indicateur de la pellicule.

Différentes techniques de microscopie ont été mises en œuvre afin de caractériser le modèle.

• Microscopie optique classique en fluorescence.

Nous avons choisi de procéder à l'immunomarquage des MUC5B à l'aide d'un anticorps anti-MUC5B fourni par le professeur Veerman (Université d'Amsterdam) afin d'évaluer la capacité des cellules épithéliales à retenir les mucines salivaires. Cette technique permet d'observer la présence et la répartition des mucines sur le tapis cellulaire (notamment l'éventuelle formation d'agrégats).

• Microscopie optique focalisée : microscopies confocale et biphotonique.

La focalisation du faisceau permet de réduire le bruit hors focus qui donne une image floue de tout objet situé en dehors du plan focal. L'acquisition d'images dans les différents plans permet une reconstitution 3D de l'échantillon dans le but l'évaluer l'épaisseur du modèle et de la couche de mucines.

73

• Microscopie Electronique à Balayage (MEB)

La surface des cellules et la structure de la pellicule formée ont été observées par microscopie électronique à balayage. La méthode a été couplée avec une technique d'immuno-marquage des MUC5B afin de confirmer la nature des structures observées.

2. MATERIELS ET METHODES

2.1. CULTURE CELLULAIRE

Les cellules épithéliales de la lignée TR146 ont été utilisées. Ces cellules dérivent de carcinomes épidermoïdes buccaux humains (Rupniak, Rowlatt et al. 1985) et sont couramment utilisées pour établir des modèles d'épithélium oral (Jacobsen, Van Deurs et al. 1995).

Les cellules ont été cultivées dans du milieu DMEM/F12 – GlutaMAX medium de chez Gibco® (1:1, v:v), supplémenté avec 10% de sérum fœtal de veau (FBS), 100 unités/ml de pénicilline et 100 µg/ml de streptomycine, dans des flacons de culture T75 (Life Technologies).

Le milieu a été changé tous les deux jours et les cellules ont été trypsinées lorsque 80 % de confluence était atteinte. Les cellules ont été incubées à 37°C sous atmosphère humide contenant 7,5% de C0₂. Pour les observations de microscopie, les cellules ont été ensemencées à une densité de 4x10⁴ cellules/cm², sur des lames en verre à huit chambres pour l'immunomarquage et sur des lames en verre de 10 mm de diamètre pour les observations MEB. Les supports en verre ont préalablement été recouverts avec de la Cell-Tak[™] (Corning) afin de permettre l'adhérence des cellules.

La confluence a été atteinte en 48 h et les cellules ont été cultivées trois jours supplémentaires.

2.2. FORMATION DE LA PELLICULE MUCOSALE

2.2.1. Collecte de salive

De la salive non stimulée a été collectée chez quinze sujets ayant déclaré avoir une bonne santé orale. Il leur a été demandé de ne pas fumer, manger ou boire pendant 2 h avant le début de la collecte. La collecte a duré environ 1 h pendant laquelle les sujets ont craché dans un flacon en plastique la salive qui s'accumulait naturellement dans leur bouche, sans stimulation. Tous les échantillons ont ensuite été mélangés et centrifugés à 14000 g pendant 20 h à 4°C de manière à éliminer les éventuels résidus alimentaires et les bactéries. Des aliquots de salive ainsi clarifiée ont été préparés et congelés à – 80°C.

2.2.2. Viabilité des cellules incubées avec de la salive

Il a été nécessaire d'évaluer l'impact de la salive sur la viabilité des cellules. Pour cela, les cellules confluentes ont été incubées 24 h avec de la salive clarifiée diluée dans du milieu de culture aux dilutions 1/8, 1/4, et 1/2 et avec de la salive non diluée. Le DMSO 50 % a été utilisé comme témoin positif de toxicité. La toxicité de la salive a été évaluée à l'aide du test fluorimétrique développé par Rat et al. (1994) (Rat, Korwin-Zmijowska et al. 1994). Cette méthode est basée sur l'accumulation de la solution de rouge neutre dans les lysosomes des cellules vivantes. Ainsi, la proportion de cellules vivantes est proportionnelle à la quantité de rouge neutre. Les résultats sont exprimés en pourcentage de cellules vivantes, en fixant à 100% la valeur obtenue pour les cellules non traitées. Une substance a un effet toxique lorsque le pourcentage de viabilité est inférieur à 80% par rapport aux cellules non traitées.

2.2.3. Incubation des cellules avec la salive

Afin de former la pellicule mucosale, les cellules ont été incubées avec de la salive clarifiée diluée au demi dans du milieu de culture pendant 2 h à 37° C sous atmosphère humide contenant 7,5 % de C0₂.

Le liquide a été retiré et les cellules rincées une fois au PBS afin d'éliminer les protéines non fixées à leur surface.

2.3. EXPRESSION DE LA MUCINE 1 PAR LES CELLULES DE LA LIGNEE TR146

2.3.1. Choix du variant

Dix-sept variants de la mucine 1 humaine sont répertoriés sur le site uniprot.org (Entry P15941). Il est important de préciser que le plasmide utilisé pour nos expérimentations code pour une protéine contenant deux domaines: une séquence transmembranaire afin que cela ne soit pas une forme sécrétée de MUC1 et une séquence N-terminale extracellulaire susceptible d'interagir avec les protéines salivaires.

Un plasmide codant pour l'isoforme variant 2 a été acheté chez Origene (ref. SC302125). Des alignements entre la séquence de la protéine codée par le plasmide d'Origene, la séquence de la forme entière de MUC1 (variant 1 sur Uniprot) et la séquence transmembranaire de MUC1 ont été réalisés en utilisant le logiciel CLC viewer. L'alignement des séquences est donné en annexe 1. Il

confirme que la protéine codée par le plasmide contient un domaine transmembranaire et un domaine extracellulaire constitué de 35 acides-aminés N-terminaux.

Un second vecteur de transfection a été utilisé et une seconde transfection a été réalisée en parallèle avec un plasmide contenant un myc-tag DDK (OriGene Technology, ref. RC221390) L'objectif de l'utilisation d'une telle séquence et de faciliter la détection et la purification de la protéine recombinante.

Pour la suite, le même protocole a été suivi en parallèle pour chacun des plasmides.

2.3.2. Transformation et amplification du plasmide par E. coli

Le plasmide pCMV6-Entry-MUC1 (ref. SC302125) ou pCMV6-Entry-Myc-DDK-MUC1 (ref. RC221390) a été dilué dans de l'eau stérile de façon à obtenir une solution à 2 ng/µl.

Dix ng de plasmides ont été ajoutés à 50 μ l de *E. coli* DH5 α . Le mélange de bactéries compétentes et de plasmides a été incubé 15 h dans de la glace, puis a subi un choc thermique de 45 s au bain marie à 42°C avant d'être placé 5 h dans la glace. 450 μ l de milieu S.O.C. ont été ajoutés et les bactéries ont été agitées 1 h à 37°C. Le mélange réactionnel a été étalé sur des boîtes gélosées de milieu LB additionné de kanamycine à 25 μ g/mL.

2.3.3. Purification des plasmides

Une colonie isolée a été inoculée dans 2 ml de milieu LB liquide contenant 25 μ g/ml de kanamycine (antibiotique de sélection). L'inoculum a été incubé 8 h à 37°C sous agitation (225 rpm). Le bouillon formé a été repiqué dans 200 ml de milieu LB liquide avec kanamycine et incubé une nuit à 37°C sous agitation.

La purification a été réalisée par centrifugation à l'aide du kit Pure Yield Plasmid Midiprep System (Promega). Une solution de plasmide à 100 ng/µl a été préparée.

2.3.4. Transfection

La transfection a été réalisée deux jours après ensemencement des cellules TR146 à 0,1.10⁶ cellules/ml dans une boite de Pétri de 100 mm de diamètre contenant 10 ml de milieu de culture. A ce stade, la culture avait atteint 80 % de confluence.

Le protocole de transfection a été optimisé avec le *FuGENE*[®] *HD Protocole Database* pour une transfection avec un ratio FuGENE[®]HD: ADN de 3.0: 1.

77

Une solution contenant 20 µg d'ADN, soit 200 µl de solution de plasmide et 70 µl de FuGENE® a été préparée dans du milieu OpiMEM pour un volume total de 1 ml. Après une courte agitation et une incubation de 5 h à température ambiante, le mélange a été réparti au goutte à goutte sur les 10 ml de milieu. Les cellules ont été incubées avec le mélange pendant 5 h puis le milieu a été changé.

Quarante-huit heures après la transfection, les cellules ont été trypsinées puis resuspendues dans du milieu de culture additionné de G418 (généticine) à 0,2 mg/ml et ensemencées dans des plaques de culture 96 puits. Après 3 semaines de culture en plaque 96 puits les premiers clones commencent à être visibles au microscope et vont être amplifiés individuellement.

Des cultures successives ont été réalisées à partir de chaque clone isolé dans les puits de plaques 96, 24, 12 puis 6 puits et enfin dans des flacons T25 puis T75.

Vingt-trois clones non marqués et cinq clones marqués DDK ont été produits. Lorsqu'ils ont atteint la culture en T75, les clones ont été trypsinés puis repris dans du milieu de culture contenant 10 % de DMSO et ont été congelés dans l'azote liquide.

2.3.5. Sélection des clones

Les 23 clones obtenus avec le plasmide non marqué ont été soumis à des mesures visant à sélectionner le plus satisfaisant selon deux critères : expression de MUC1 (RT-PCR, Western Blot, immunohistochimie) et rétention des MUC5B (Dot Blot).

2.3.5.1. RT-PCR

La réaction en chaine par polymérase après transcription inverse (RT-PCR) est une technique de biologie moléculaire utilisée pour la détection des ARNm. Les ARNm sont convertis en ADN complémentaire (ADNc) à l'aide d'une transcriptase inverse. Les ADNc sont ensuite amplifiés par une Taq polymérase (Figure 11).

78



Figure 11: Principe de la RT-PCR appliqué à la détection de MUC1.

Choix des amorces

Deux paires d'amorces ont été utilisées : une première paire AB permettant la détection des formes recombinante et intrinsèque de MUC1, et une paire AC, spécifique du vecteur utilisé pour la forme recombinante de MUC1 (Figure 11). L'amorce était C fournie par Origene tandis que les amorces A et B étaient synthétisées à façon par Eurogenetec (Belgique).

Les amorces ont été construites à l'aide du Primer-BLAST (NCBI). La paire d'amorce choisie AB (Amorce A Forward, 5'TGCTTACAGCTACCACAGCC3' et Amorce B Reverse 5'CCAGACTGGGCAGAGAAAGG3') permet la production d'un fragment de 436 bases de la séquence du variant 2 de MUC1. L'amorce contresens C de la paire d'amorce AC (Amorce A Froward, 5'TGCTTACAGCTACCACAGCC3' et Amorce C Reverse 5'ATTAGGACAAGGCTGGTGGG3') s'hybride avec une séquence spécifique du plasmide se situant avant la queue polyA qui initie la fin de la transcription. Elle s'hybride donc uniquement avec l'ARNm produit par les cellules ayant intégré le plasmide.

• Synthèse des ADNc

Les ARNm ont été extraits des cellules natives et transfectées à partir des culots d'environ 4.10⁶ cellules à l'aide du kit Qiagen RNeasy Plus Mini (Qiagen) selon les recommandations du fournisseur, puis dosés au NanoDrop.

La synthèse des ADNc a été réalisée à l'aide du kit BioRAD iScript cDNA Synthesis (Biorad). 450 ng d'ARNm qsp 15 μ l d'eau sans nucléases, 4 μ l de mélange de reaction iScript et 1 μ l de transcriptase inverse iScript ont été traités selon le protocole de réaction suivant : 5 h à 25 °C puis 30 h à 42°C puis 5 h à 85°C (Tableau 9). Les ADNc ont ensuite été maintenus à 4°C.

Etape	Durée	Température
Dénaturation structures secondaires des	5 min	65°C
ARNm		
Transcription inverse	30 min	42°C
Inactivation de l'enzyme	5 min	85°C

Tableau 9: Etapes de la transcription inverse.

Amplification des ADNc par PCR

L'ADNc a été amplifié à l'aide du kit Taq PCR MasterMiX (Qiagen). Pour chaque paire d'amorces, 2,5 µl d'ADNc ont été mélangés avec 2,5 µl de chaque amorce A et B ou A et C, 5 µL d'eau et 12,5 µL de reaction mix (Taq PCR Master Mix). Après une étape de dénaturation initiale de 3 h à 94°C, 30 cycles d'amplification détaillés dans le Tableau 10 ont été réalisés.

Tableau 10: Cycles d'amplification PCR

Etape	Durée	Température
Dénaturation	50 s	94°C
Hybridation	50 s	60°C
Extension	2 min	72°C

Les solutions finales d'ADNc ont été conservées la nuit à 4°C ou à -20°C pour une durée supérieure.

CHAPITRE 1

• Détection des ADNc par électrophorèse

Des gels à 0,8% d'agarose ont été préparés dans 10 ml de tampon Tris-Borate-EDTA (TBE) contenant du BET. Cinq μ l de marqueur de taille et 10 μ l d'échantillon contenant du bleu de bromophénol ont été déposés sur le gel et ont migré à 100 V pendant 20 h.

2.3.5.2. Détection de MUC1 par Western Blot

L'expression de MUC1 par les cellules a été vérifiée par Western Blot.

Les culots de cellules ont été lysés dans 150 µl de RIPA (Sigma-Aldrich) ou du PBS contenant 2 % de fos-choline 14 (FC14) puis soniqués et passés au « tissue lyser » (Retsch) avec des billes de tungstène pendant 3 h à la fréquence de 30 agitations.s⁻¹. La concentration protéique des lysats cellulaires et de la salive clarifiée a été mesurée à l'aide du kit DC protein assay (Bio-Rad). 20 µg de protéines de lysats cellulaires, 5 µg de protéines de salive ou 5 µl de marqueurs de poids moléculaire Kaleidoscope (Bio-Rad) ont été déposés sur des gels précoulés 4-20 %. La migration en SDS-PAGE a été réalisée à 200 V pendant 25 h. Les protéines ont été transférées en semi-sec sur des membranes de nitrocellulose à 10 V pendant 20 h à l'aide d'un Turbo Transblot SD (BioRad). Les membranes ont été saturées pendant 3 h dans un bain de lait écrémé 8% dans du NaCl 9 ‰ sous agitation puis incubées pendant 1 h dans une solution à la dilution 1/2000^e d'anticorps primaire (anti-MUC1 de souris, OriGene Technologies, ref. TA800838) dans du NaCl 9 ‰ /BSA 5%. Après rinçages, les membranes ont été bloquées dans une solution de lait écrémé 8 % dans du NaCl 9 ‰ /BSA 5% au 1/1000^e pendant 1 h. L'enzyme HRP a été révélée par chimiluminescence grâce au kit Clarity Western ECL Blotting (Bio-Rad), avec acquisition des données sur un ChemiDoc (BioRad).

2.3.5.3. Immunomarquage de MUC1 sur cellules

La détection de MUC1 par immunohistologie a été réalisée sur les cellules TR146 et TR146 transfectées, sans pellicule salivaire.

Les cellules cultivées à confluence sur lame de verre à huit chambres ont été fixées au méthanol froid (-20°C) pendant 10 h. Les fixations non spécifiques ont été bloquées avec un mélange de lait écrémé à 0,3 % et de sérum de chèvre non immun à 5 % dans du PBS pendant 1 h. Les cellules ont été incubées pendant 1 h à température ambiante avec un anticorps monoclonal anti-MUC1 de souris (OriGene Technologies, ref. TA800838) dilué au 1/200^e dans du PBS, ou avec un anticorps anti-DDK de souris (OriGene Technology, ref. TA50011) dilué au 1/200^e dans le cas de la lignée marquée DDK. Un anticorps de chèvre Alexa 488 anti-souris (Invitrogen) a été utilisé comme

anticorps secondaire (1/400^e dans du PBS, 1 h). Après retrait des chambres plastiques, les lames ont été montées dans du milieu Prolong Gold antifade contenant du DAPI (Invitrogen). La fluorescence a été observée au microscope Nikon Eclipse E600 (Nikon Instruments) équipé de filtres UV-2A (excitation 330-380nm, émission 400 nm) et B-2A (excitation 450-490 nm, émission 505 nm). Les images ont été acquises avec le logiciel NIS-Br de Nikon.

2.3.5.4. Semi quantification des MUC5B par Dot Blot

Les cellules natives et transfectées ont été cultivées dans des plaques 12 puits, à raison de trois puits par type de cellule. Une fois la confluence atteinte, les cellules ont été incubées avec de la salive clarifiée diluée dans du milieu de culture selon le protocole décrit précédemment. Après rinçage, les cellules ont été lysées avec 150 µl de RIPA (Sigma-Aldrich). La concentration protéique des lysats a été mesurée à l'aide du kit DC protein assay (Bio-Rad).

Afin de comparer la quantité de mucines MUC5B retenue par chaque type de cellule, 5 μg de protéines ont été déposés sur les membranes de nitrocellulose à l'aide du dispositif Bio-Dot[®] (Biorad). Chaque échantillon a été déposé trois fois.

Les fixations non spécifiques ont été bloquées dans du lait écrémé à 0,3 %. Pour la détection des MUC5B, les membranes ont été incubées 1 h dans une solution d'anticorps de souris F2 anti-MUC5B dilué au 1/400^e dans du PBS. Après rinçages, les membranes ont été incubées dans du lait écrémé à 0,3 %. Un anticorps secondaire de chèvre anti-souris couplé à une protéine HRP (LifeTechnologies) a été utilisé. Les membranes ont été incubées 1 h dans une solution d'anticorps secondaire diluée au 1/2000^e dans du PBS. L'enzyme HRP a été révélée avec le kit Clarity Western ECL Blotting (Bio-Rad), avec acquisition des données par une caméra ChemiDoc (BioRad). L'intensité de chimie-luminescence de chaque dépôt (« dot ») a été mesurée avec le logiciel ImageLab. La valeur médiane de chaque réplicat technique a été calculée pour chaque échantillon biologique et la différence entre les deux types cellulaires, natif et transfecté, a été évaluée par ANOVA.

2.3.6. Induction de la production de MUC1

La possibilité d'accroître l'expression de MUC1 par le butyrate de sodium a été évaluée. Les vecteurs utilisés pour la production de protéines recombinantes contiennent des promoteurs en amont de la séquence codante qui permettent d'initier la transcription du gène recombinant. Le promoteur pCMV du cytomégalovirus utilisé dans les vecteurs eucaryotes est reconnu par l'ARN polymérase des cellules de mammifères. Il a été montré que le butyrate de sodium (NaBu) induisait la réplication du CMV dans les lignées cellulaires épithéliales (Tanaka, Sadanari et al. 1991). Le

NaBu est donc couramment utilisé pour induire la synthèse de protéines recombinantes par activation du CMV.



Figure 12: Vecteur pCMV6-Entry utilisé pour la transfection.

Le pCMV est utilisé comme promoteur dans le vecteur pCMV6-Entry utilisé pour cette étude (Figure 12). Afin d'induire la production de la protéine par l'activation du promoteur CMV, les cellules natives et transfectées (MUC1 non étiquetées DDK) ensemencées à 0,08.10⁶ cellules/ml ont été cultivées sur des lames en verre pendant 48 h. Après 24 h, 500 µl de solution de butyrate de sodium à 0; 0,1; 0,2; 0,5; 1; 2; 3; 4 et 5 mM dans du milieu de culture ont été ajoutés. Après 24 h d'incubation, les cellules ont été fixées et les mucines 1 immuno-marquées selon le protocole décrit précédemment.

2.4. CARACTERISATION MICROSCOPIQUE DU MODELE

Cette caractérisation s'est effectuée sur cellules natives TR146 et sur cellules transfectées du clone sélectionné à l'issue des mesures décrites en 2.3.5.

2.4.1. Evaluation du tapissage des cellules par les mucines par immunomarquage fluorescent des MUC5B

2.4.1.1. Immunomarquage fluorescent des MUC5B

L'immuno-détection de MUC5B a été réalisée sur les cellules TR146 et TR146/MUC1, avec et sans pellicule salivaire préparées comme décrit dans le paragraphe 2.3.

Les cellules cultivées sur lame de verre à huit chambres ayant atteint la confluence ont été fixées au méthanol froid (-20°C). Les fixations non spécifiques ont été bloquées avec un mélange de lait écrémé à 0,3 % et de sérum de chèvre non immun à 5 % dans du PBS pendant 15 h. Les cellules ont été incubées à température ambiante avec une solution d'anticorps de souris F2 anti-MUC5B dilué au 1/400^e dans du PBS pendant 1 h Un anticorps de chèvre Alexa 488 anti-souris (Invitrogen) a été utilisé comme anticorps secondaire (1/400^e dans du PBS, 1 h). Après retrait des chambres plastiques, les lames ont été montées sous une lamelle dans du milieu Prolong Gold antifade contenant du DAPI (Invitrogen). La fluorescence a été observée au microscope Nikon Eclipse E600 (Nikon Instruments) équipé de filtres UV-2A (excitation 330-380nm, émission 400 nm) et B-2A (excitation 450-490nm, émission 505nm). Les images ont été acquises avec le logiciel NIS-Br de Nikon.

2.4.1.2. Analyse d'image

La quantité de MUC5B retenue en surface des cellules a été semi-quantifiée par analyse d'image à l'aide du logiciel Image J sur 5 images de chacun des types cellulaires. Pour ce faire, l'intensité de fluorescence du canal vert a été mesurée pour chaque image. La différence statistique des mesures entre les TR146 et les TR146/MUC1 a été évaluée par le test de Student.

2.4.2. Evaluation de l'épaisseur du modèle cellulaire et de la pellicule par microscopie optique focalisée à balayage

Afin d'estimer l'épaisseur du tapis cellulaire, deux types de microscopie focalisées (Figure 13) ont été utilisées : la microscopie monophotonique à détection confocale et la microscopie biphotonique.

En microscopie monophotonique confocale, l'échantillon est excité sur tout le trajet du faisceau mais le signal hors focus est filtré. Lors de l'excitation biphotonique, l'échantillon est excité uniquement dans le plan focal. L'excitation à deux photons permet de réduire le bruit de fond en minimisant l'excitation indésirable du tissu en dehors du point focal et d'améliorer ainsi le contraste.



Figure 13: Principes de la microscopie focalisée et de la microscopie grand champ

2.4.2.1. Evaluation de l'épaisseur du tapis cellulaire

Les cellules TR146 ont été cultivées 5 jours sur des lames de verres à 4 chambres. Après élimination du milieu de culture et rinçage du tapis cellulaire au PBS, les cellules non fixées ont été marquées avec un mélange à 0,3 % de SYTO 9 et d'iodure de propidium (IP) dans du PBS. Le SYTO 9 est un marqueur fluorescent d'acide nucléique dans les cellules vivantes. L'IP est un fluorochrome permettant la détection de l'ADN des cellules ayant perdu leur intégrité membranaire.

Les lames ont été observées avec un microscope confocal à balayage laser Leica SP2 avec un pas de 162 nm depuis le haut de l'échantillon jusqu'à la lame de verre. L'épaisseur du tapis cellulaire a été estimée à partir de l'épaisseur totale du balayage.

2.4.2.2. Evaluation de l'épaisseur de la pellicule salivaire

Il est à noter que cette estimation a été faite sur cellules incubées 24 h avec de la salive, avant la validation du protocole final dans lequel les cellules sont incubées 2 h avec la salive.

Des cellules TR146 ont été cultivées sur des lames en verre pendant 48 h puis incubées avec de la salive humaine clarifiée diluée dans du milieu de culture pendant 24 h. Le surnageant a été éliminé et les cellules rincée au PBS. Les cellules ont été fixées avec du paraformaldhéhyde (PFA) à 4 % pendant 30 min. L'autofluorescence du PFA a été bloquée avec une solution de NH₄Cl à 50 mM dans du PBS. L'immuno-marquage des MUC5B et des noyaux suit le même protocole que celui décrit dans le paragraphe 2.4.1.

Les lames ont été observées avec un microscope confocal à balayage laser Leica SP2 et un microscope biphotonique Nikon A1-MP. Des images ont été acquises depuis le haut de l'échantillon jusqu'à la lame de verre support avec un pas de 163 nm avec le microscope confocal et de 150 nm avec le microscope biphotonique. En microscopie confocale, le DAPI a été excité avec une diode laser à 405 et l'Alexa 488 a été excité à l'aide d'un laser argon avec la raie 488 nm. En microscopie biphotonique, la longueur d'onde d'excitation du laser était de 720 nm. Le DAPI a été observé à une longueur d'onde d'émission de 447,5 nm et l'Alexa 488 à une longueur d'onde de 527,5 nm.

2.4.3. Observation de la surface des cellules et de la pellicule par microscopie électronique à balayage

Le modèle cellulaire a été préparé comme décrit dans le paragraphe 2.2.

2.4.3.1. Principe de MEB

La microscopie électronique à balayage est basée sur les interactions électrons-matière. Un faisceau d'électrons est projeté sur la surface de l'échantillon qui réémet différents type d'électrons ainsi que des rayons X. On différenciera notamment les électrons secondaires (SEI) des électrons rétrodiffusés (BSE). Les électrons secondaires sont produits par transfert d'énergie de l'électron du faisceau primaire à un électron de l'atome de l'échantillon qui est réémis avec une faible énergie et en grande quantité ce qui permet d'obtenir des images avec une bonne résolution. Ils apportent ainsi des informations topographiques sur l'échantillon. Les électrons rétrodiffusés ont quant à eux une énergie comparable à celle des électrons primaires et offrent une moins bonne résolution. Cependant, leur rendement d'émission dépend du numéro atomique de l'atome ce qui permet une analyse en contraste atomique.

2.4.3.2. Fixation et séchage

Le modèle cellulaire a été fixé au glutaraldéhyde dilué à 2,5 % dans du PBS pendant 30 h, puis avec du tetroxyde d'osmium à 0,4 % pendant 30 h. Le glutaraldéhyde est un fixateur à pénétration lente qui permet la fixation des protéines par pontage des groupements aminés. La seconde fixation au tetroxyde d'osmium permet de fixer les lipides et d'éviter ainsi leur extraction lors de la déshydratation.

86

Les échantillons ont été déshydratés dans des bains successifs de 20 h dans des solutions d'éthanol de concentrations croissantes de 30 % à 100 % d'éthanol.

2.4.3.3. Déshydratation supercritique

Les échantillons ont été séchés par séchage supercritique à l'aide d'un Leica CPD 030. Cette technique consiste à remplacer l'éthanol contenu dans les cellules par du CO₂ liquide puis à éliminer ce dernier en évitant la transition de phase liquide-gaz qui pourrait endommager l'échantillon en contournant le point critique du CO₂.



Figure 14: Diagramme de phase du CO₂.

2.4.3.4. Métallisation des échantillons

La métallisation consiste à recouvrir les échantillons non conducteurs d'un matériau conducteur afin d'éviter les accumulations de charge. Les échantillons ont été recouverts d'une couche d'environ 9 nm de carbone à l'aide d'un évaporateur sous vide CRESSINGTON 308R.

2.4.3.5. Observations des échantillons

Les échantillons ont été observés avec un microscope électronique à balayage JEOL JSM 7600F (JEOL Ltd) sous une tension d'accélération des électrons de 2kV et à une distance de travail de 5mm.

CHAPITRE 1

2.4.3.6. Immuno-MEB

Le principe de l'immuno-MEB est basé sur la détection conjointe des électrons secondaires et des électrons rétrodiffusés. L'anticorps secondaire est couplé à un matériau de numéro atomique différent de celui utilisé pour la métallisation de l'échantillon. Ainsi, lors de l'observation en électrons rétrodiffusés, l'anticorps sera contrasté par rapport au reste de l'échantillon. La superposition des images SEI et BSE permet la détection de la molécule d'intérêt à haute résolution.

Les échantillons ont été fixés au paraformaldéhyde à 4% dans du PBS pendant 30 h. Le blocage des fixations non spécifiques et l'incubation avec l'anticorps primaire ont été réalisés selon le même protocole que pour l'immuno-marquage fluorescent des MUC5B. Les échantillons ont ensuite été incubés avec anticorps secondaire de chèvre anti-souris couplé à un grain d'or (z = 79) dilué au 1/15^e dans du PBS.

Les échantillons ont ensuite été déshydratés, séchés et métallisés selon le protocole décrit précédemment, et observés avec un microscope Hitachi SU5000 Schottky Field Emission équipé d'un détecteur d'électrons rétrodiffusés. Les observations ont été réalisées sous une tension d'accélération des électrons de 5 kV à une distance de travail de 8 mm.

3. RESULTATS



3.1. VIABILITE DES CELLULES INCUBEES AVEC DE LA SALIVE

Figure 15 : Viabilité des cellules incubées avec de la salive humaine.

Comme on peut le voir sur la Figure 15 une forte diminution de la viabilité cellulaire a été observée lors de l'incubation avec de la salive non diluée. Ceci peut s'expliquer par des conditions osmotiques non adaptées, et l'absence de nutriments et d'ions nécessaires à la viabilité cellulaire.

Lorsque la salive clarifiée est diluée au demi dans du milieu de culture, aucun effet n'a été observé sur la viabilité des cellules estimée après 24 h d'incubation. Cette condition a donc été choisie pour la suite du travail.

3.2. SELECTION DU CLONE EXPRIMANT MUC1

L'objectif de cette sélection était de ne conserver qu'un clone parmi les 23 produits, selon deux critères : expression efficace de MUC1 et rétention optimale de MUC5B.

3.2.1. Expression de MUC1 évaluée par Western Blot

Un exemple de membrane de Western blotting est présenté en Figure 16.

La mucine 1 recombinante est attendue aux alentours de 25 kDa. La mucine 1 a été détectée dans la salive clarifiée, ce qui a permis de vérifier l'efficacité de l'anticorps anti-MUC1. Cependant, aucune bande n'a été détectée pour aucun des clones, qu'ils soient marqués DDK ou non marqués.

Le Western blotting ne nous a pas permis de confirmer l'expression de la mucine 1 dans les cellules transfectées.



Figure 16: Exemple d'une membrane de Western Blot. Les MUC1 (avec ou sans le tag DDK) sont détectées comme une seule bande immuno-réactive. Lignes 1 et 2: clones marqués DDK lysés au RIPA ou au FC14. Ligne 3 : marqueur de poids moléculaire. Lignes 4, 5 et 6: clones non marqués. Ligne 7: salive clarifiée. Ligne 8: marqueur de poids moléculaire.

3.2.2. Immunomarquage des MUC1 marquées DDK

Le tag DDK a été détecté par immunofluorescence sur les cellules natives et transfectées (clone marqué DDK). Des images des deux types cellulaires marqués sont présentées en Figure 17.



Figure 17: Immunomarquage des MUC1 marquées DDK sur des cellules natives (A) et des cellules transfectées (B).

Un bruit de fond important est observé sur le contrôle (TR146 natives) marqué avec l'anticorps anti-DDK. Cette fixation aspécifique est un frein pour évaluer l'expression de MUC1 par les cellules transfectées. L'utilisation de l'anticorps anti-DDK ne semble donc pas appropriée. Nous avons choisi d'utiliser les cellules n'exprimant pas le tag DDK.

3.2.3. Rétention des MUC5B par les différents clones

La quantité de mucines salivaires MUC5B retenues par les différents clones a été évaluée par mesure de l'intensité de chimiluminescence sur Dot-Blot réalisés sur des lysats de cellules. Comme nous le montre la Figure 18, parmi les quatre clones testés, seul le clone 23 a montré une rétention significativement plus importante des MUC5B (+34%, p<0,05) que les cellules natives.



Le clone 23 a donc été sélectionné et la lignée nommée TR146/MUC1.

Figure 18: Semi-quantification des MUC5B retenues en surface de cellules natives (T) et de quatre clones (13, 19, 20 et 23) : intensité de chimiluminescence sur des Dot-Blots.

3.2.4. Induction de la production de MUC1 par le butyrate de sodium

Les images du marquage de MUC1 après incubation avec différentes concentrations de butyrate de sodium sont présentées en Figure 19.

CHAPITRE 1



Figure 19: Immunomarquage des MUC1 dans les cellules natives (A) ou transfectées (B) après induction de leur production par différentes concentrations de NaBu.

Comme attendu, la mucine 1 n'est pas détectée dans les cellules natives (A). La mucine 1 est présente dans les cellules transfectées (B) de façon éparse et l'effet du butyrate de sodium sur son expression est faible voire inexistant. Ce résultat ne justifie pas l'utilisation du butyrate de sodium qui est un produit cancérogène, mutagène et reprotoxique (CMR) et qui exige des précautions d'utilisation contraignantes.

3.3. EVALUATION DE L'EPAISSEUR DU TAPIS CELLULAIRE ET DE LA PELLICULE MUCOSALE

Les observations réalisées au microscope confocal sur les cellules TR146 non fixées ont permis d'évaluer l'épaisseur du tapis cellulaire 12,7 µm maximum, constitué de plusieurs couches de cellules. Nous avons observé peu de cellules mortes, qui apparaissent en rouge sur la Figure 20.



Figure 20: observation confocale de cellules TR146 marquées avec du SYTO 9 (vert) et de l'IP (rouge). Lxl = 375 μm², z = 12,7 μm.

En ce qui concerne la mesure de l'épaisseur de la pellicule, les observations ont été réalisées lors du développement du modèle cellulaire, sur des cellules natives incubées pendant 24 h avec de la salive clarifiée diluée dans du milieu de culture.

Après 24h d'incubation avec la salive clarifiée diluée, les mucines forment des agrégats en surface des cellules (Figure 21).

La superposition des sections obtenues au microscope confocal a permis d'obtenir une vue de profil de l'échantillon (Figure 21). Par ailleurs, une vue de profil de la reconstitution 3D de l'échantillon observé au microscope biphotonique est donnée en Figure 22. Les cellules TR146 sont des cellules adhérentes relativement plates, la monocouche de cellules fixées mesurant environ 2 μ m. Une fine couche hétérogène, présentant des agrégats, formée par les mucines MUC5B a pu être observée en surface des cellules, et son épaisseur évaluée à moins d'un micron.



Figure 21 : Superposition des images obtenues au confocal de cellules incubées 24h avec de la salive clarifiée diluée. Les noyaux sont marqués au DAPI (bleu) et les MUC5B avec de l'Alexa 488 (vert). Vues en plan et en coupe, L et l = 204,6 μm, épaisseur= 7,32 μm.



Figure 22 : Reconstitution 3D après acquisition d'images au microscope biphotonique de cellules incubées 24h avec de la salive clarifiée diluée/ Calibration x : 0,41 µm, y : 0,41 µm, z : 0,15 µm. L et l = 211,97 µm, épaisseur = 10,35 µm.

3.4. DEVELOPPEMENT D'UN MODELE CELLULAIRE DE MUQUEUSE ORALE ET ETUDE DU ROLE DE MUC1 DANS LA FORMATION DE LA PELLICULE MUCOSALE

L'objectif de ce travail a été d'étudier le rôle de MUC1 dans la formation de la pellicule salivaire, en comparant les cellules TR146 et TR146/MUC1. Les deux types cellulaires ont été incubés avec de la salive clarifiée diluée dans du milieu de culture afin de former la pellicule mucosale. Les cellules avec et sans pellicule salivaire ont été caractérisées par microscopie. La rétention des MUC5B par les deux types cellulaire a été semi-quantifiée.

3.4.1. Expression de MUC1 par la lignée TR146/MUC1

Nous n'avons pas observé d'expression de MUC1 chez les TR146 natives (Figure 23 a et b). L'expression de MUC1 a été confirmée par RT-PCR (Figure 23a) et immunocytochimie (Figure 23c) sur le clone finalement sélectionné (lignée TR146/MUC1).



Figure 23: Expression de MUC1 par la lignée TR146/MUC1 mise en évidence par RT-PCR (a) et immunocytochimie sur les cellules natives TR146 (b) et transfectées TR146/MUC1 (c). Les noyaux sont marqués au DAPI. Barre d'échelle = 100 μm.

3.4.2. Caractérisation microscopique des cellules TR146 et TR146/MUC1

Une caractérisation microscopique des cellules TR146 et TR146/MUC1 a ensuite été effectuée. La surface des cellules observée au MEB qui est illustrée en Figure 24 est typique des cellules épithéliales squameuses non kératinisées, et présente de nombreux replis de la membrane appelés microplicae (MPL). Il n'a pas été observé de différences entre les cellules TR146 natives (a et b) et les cellules TR146/MUC1 (c et d).



Figure 24: Cellules TR146 (a et b) et TR146/MUC1 (c et d) observées au MEB. Barre d'échelle = 1 µM.

3.4.3. Rétention de MUC5B par les deux types cellulaires

Les deux types cellulaires ont été incubés 2 h avec de la salive clarifiée diluée puis rincés de façon à éliminer les protéines non ancrées aux cellules.

L'immunomarquage des MUC5B sur les cellules incubées avec de la salive TR146 (Figure 25c) et TR146/MUC1 (Figure 25d) a révélé un tapissage hétérogène de la surface des cellules par les MUC5B. La fluorescence est plus marquée sur certaines cellules du modèle TR146/MUC1.



Figure 25: Immunomarquage fluorescent des MUC5B sur les cellules TR146 (a) et TR146/MUC1 (b), TR146 incubée 2 h avec de la salive (c) TR146/MUC1 incubée 2 h avec de la salive. Barre d'échelle = 100 μm.

Le dépôt formé par la salive en surface des cellules se présente comme un fin réseau filamenteux, et cela sur chacune des deux lignées cellulaires (Figure 26 a et b). L'immuno-détection des MUC5B a confirmé que ces dépôts en contiennent (Figure 26c)



Figure 26 : Observation par MEB des cellules incubées 2 h avec de la salive. Cellules TR146 (a) et TR146/MUC1 (b) : barre d'échelle = 1 μm. Détection par immuno-MEB des MUC5B (c) : les grains d'or sont colorés en rose, barre d'échelle = 500 nm.

La quantité de MUC5B retenue à la surface des cellules a été semi-quantifiée par Dot-blot et par analyse d'image.

Comme on peut le voir sur la Figure 27, une rétention supérieure des MUC5B par les cellules TR146/MUC1 de +34.1% (p < 0.05) et de +44% (p < 0.001) par rapport aux cellules natives a été mesurée, respectivement par analyse de l'intensité de la chimiluminescence de Dot-blot (a) ou immunocytochimie et analyse d'image (b).



Figure 27: Semi-quantification (moyenne ± écart-type) des MUC5B sur les cellules TR146 et TR146/MUC1 après incubation 2 h avec de la salive par mesure de la chimiluminescence de Dot-blot (a) ou immunocytochimie et analyse d'image (b).

4. DISCUSSION

4.1. EXPRESSION DE MUC1 PAR LA LIGNEE TR146

L'expression de la mucine transmembranaire MUC1 par la lignée TR146/MUC1 n'a pas pu être mise en évidence par Western Blot. Il est probable que la quantité de MUC1 produite est très faible par rapport à la quantité totale de protéines contenue dans les lysats cellulaires, qui inclut l'ensemble des protéines cellulaires cytoplasmiques, cytosquelettiques et membranaires. Ceci pourrait expliquer la non détection de MUC1 dans les lysats.

La détection par immunofluorescence de la mucine 1 sur cellules a révélé une distribution hétérogène de cette dernière au sein du tapis cellulaire. Cela peut s'expliquer par le fait que toutes les cellules ne sont pas même stade de développement au sein du tapis cellulaire, et ne présentent donc toutes pas la même intégration membranaire de la mucine 1.

4.2. CARACTERISATION MICROSCOPIQUE DU MODELE CELLULAIRE

Des techniques microscopiques complémentaires ont permis d'évaluer l'aspect des cellules et de la pellicule formée à différentes échelles.

Après 5 jours de culture, nous avons observé la formation d'un tapis cellulaire pluristratifié d'une épaisseur d'environ 12-13 μ m. l'épithélium ainsi formé est plus fin que l'épaisseur de l'épithélium oral dont l'épaisseur varie de 100 à 300 μ m dans la cavité orale (Prestin, Rothschild et al. 2012). Il permet néanmoins de modéliser la partie supérieure de l'épithélium oral. Contrairement à la situation *in vivo*, nous n'avons pas observé de desquamation des cellules en surface de l'épithélium modèle.

Les cellules de la lignée TR146 natives et de la lignée transfectée TR146/MUC1 présentent une surface hétérogène recouverte de replis de la membrane appelés microplicae, semblables à ceux observés *in vivo* (Kullaa-Mikkonen 1986) (Asikainen, Sirvio et al. 2015). Cette observation est particulièrement intéressante du fait que ces structures pourraient servir de base à la formation de la pellicule mucosale (Asikainen, Ruotsalainen et al. 2012), notamment du fait la présence de molécules transmembranaires au niveau de leur membrane plasmique, qui pourraient interagir avec les protéines salivaires (Kullaa, Asikainen et al. 2014).

Nous avons aussi pu mettre en évidence un tapissage hétérogène de la surface des cellules épithéliales par les mucines salivaires de type MUC5B. Bien que peu de données structurales *in vivo*

soient disponibles dans la littérature, nos observations sont en accord avec la description de la pellicule comme une structure hétérogène présentant des amas localisés de mucines (Morzel, Tai et al. 2014).

La rétention des MUC5B se produit sur les deux types cellulaires, exprimant et n'exprimant par MUC1, ce qui illustre le fait que l'adhésion des mucines salivaires aux cellules épithéliales est un mécanisme multimodal. La formation de la pellicule impliquerait des réactions enzymatiques catalysées par la transglutaminase (Bradway, Bergey et al. 1992), des interactions hydrophobes (Gibbins, Yakubov et al. 2014) (Aroonsang, Sotres et al. 2014) entre les surfaces orales et les régions hydrophobes des protéines salivaires et des interactions protéines-protéines (Gibbins, Proctor et al. 2015). Nous avons constaté sur le modèle TR146/MUC1, que certaines cellules semblaient mieux retenir les MUC5B. Cette observation peut être mise en relation avec l'expression hétérogène de MUC1 par les cellules. L'expression de la mucine membranaire MUC1 par les cellules de la lignée TR146 réalisée au cours de cette étude a permis de mettre en évidence une augmentation de la rétention des mucines salivaires MUC5B, apportant ainsi un argument en faveur de l'implication de cette protéine membranaire dans la formation de la pellicule mucosale.

Nous avons constaté la présence de gros agrégats lorsque l'incubation des cellules avec la salive clarifiée est prolongée jusqu'à 24 h. Cette agrégation pourrait être provoquée par l'acidification locale du milieu par les cellules (Bansil and Turner 2006). Le temps d'exposition des cellules avec la salive de 2 h limite ce phénomène et est en adéquation avec le taux de renouvellement de la couche superficielle des cellules de l'épithélium oral estimé par Dawes (2003) (Dawes 2003).

Les observations MEB et immuno-MEB ont permis de confirmer la présence de MUC5B organisées comme un réseau filamenteux lâche. Nous n'avons pas constaté de différences structurales du réseau de MUC5B entre les deux types cellulaires. Il apparaît que la pellicule formée est relativement fine puisque les MPL sont toujours apparents sous les dépôts de mucines.

Nous n'avons pas pu évaluer avec précision l'épaisseur de la pellicule salivaire formée après 24 h d'incubation avec la salive clarifiée, du fait des limites de résolution des microscopes utilisés.. La résolution en z du microscope utilisé avec l'objectif 40X a été mesurée à 533 nm. Le microscope biphotonique possède une limite théorique de résolution théorique en z de l'ordre du µm. L'échantillonnage a été réalisé avec un pas de 163 nm avec le microscope confocal et avec un pas de 150 nm avec le microscope biphotonique. Ce sur-échantillonage permet d'obtenir une meilleure résolution 3D, mais il ne permet pas d'avoir une résolution inférieure à 1 µm. D'autres méthodes seraient nécessaires afin d'évaluer plus précisément l'épaisseur de la pellicule formée. En utilisant la microscopie électronique à transmission par exemple, l'épaisseur maximale de la pellicule mucosale sur cellules prélevées en bouche a été mesurée à 100 nm environ (Morzel, Tai et al. 2014)

CHAPITRE 1

4.3. AVANTAGES ET LIMITES DU MODELE

Comme tout modèle, celui-ci comporte un certain nombre de limites. Nous n'avons pas observé de desquamation des cellules en surface de l'épithélium modèle contrairement à la situation *in vivo*. *In vivo*, la structure altérée des cellules de la couche externe de l'épithélium oral pourrait influer sur les interactions avec les protéines salivaires.

L'isoforme de MUC1 utilisée dans cette étude est une forme tronquée de la protéine, notamment au niveau de sa région extracellulaire qui interagirait avec les mucines salivaires. Ceci pourrait expliquer l'augmentation limitée de la rétention des MUC5B par les cellules transfectées par rapport aux cellules natives.

Le modèle proposé présente aussi des avantages, puisque par rapport aux surfaces hydrophobes généralement utilisées, il possède des propriétés de surfaces (topographie, mouillabilité) proches de celles trouvées dans la cavité orale. Ceci est un atout pour permettre aux constituants de la pellicule salivaires d'adopter une conformation réaliste et étudier les interactions entre cellules épithéliales, composants salivaires et molécules exogènes

5. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

La pellicule mucosale est une structure difficile à caractériser, car fragile et difficile à prélever. Ainsi, la majorité des études structurales et mécanistiques portant sur la pellicule salivaire ont été réalisées sur des surfaces hydrophobes (Gibbins, Yakubov et al. 2014) (Aroonsang, Sotres et al. 2014) (Yakubov, McColl et al. 2009).

Un modèle *in vitro* d'épithélium oral, basé sur l'utilisation d'une lignée cellulaire épithéliale orale et incluant la pellicule mucosale est proposé au terme de ces travaux. En parallèle, la surexpression de la mucine transmembranaire MUC1 par la lignée cellulaire TR146 a permis d'apporter un argument en faveur de l'implication de cette protéine dans l'ancrage des mucines salivaires MUC5B aux cellules épithéliales orales.

Du fait de l'utilisation de cellules buccales d'origine humaine, le modèle proposé offre des caractéristiques de surface proches de la situation *in vivo*, notamment au niveau de la structure de la surface cellulaire, comme nous l'avons détaillé précédemment, ce qui permet une conformation spatiale réaliste des protéines salivaires. Il serait intéressant d'évaluer l'hydrophobie et les propriétés électriques de la surface du modèle avec et sans pellicule puisqu'il a été observé *in vitro* que ces deux propriétés influaient sur l'adhésion des protéines salivaires aux surfaces synthétiques (Aroonsang, Sotres et al. 2014).

Les techniques de microscopies focalisées ne nous ont pas permis d'évaluer l'épaisseur de la pellicule formée puisque celle-ci est inférieure à la limite de résolution en z qu'offrent les microscopes confocal et biphotonique. L'observation au microscope électronique à transmission (MET) de coupes de cellules serait une alternative intéressante puisque sa résolution est de l'ordre du nm. Cette technique peut être associée à la cryofixation des échantillons, technique consistant à stabiliser les échantillons biologiques par vitrification de leur phase aqueuse. Lors de fixations chimiques aqueuses, la forte hydrophilie du mucus peut provoquer un gonflement et une coalescence des mucines (Nicolas 1991). Cette technique a d'ailleurs permis d'évaluer l'épaisseur de la pellicule mucosale sur des cellules prélevées *in vivo* (Morzel, Tai et al. 2014).

Nous nous sommes focalisés sur les MUC5B puisqu'elles constituent un des composants majoritaires de la pellicule mucosale. D'autres protéines ont néanmoins été identifiées dans la pellicule *in vivo*, telles que les cystatines S, les IgA... (Gibbins, Proctor et al. 2014). Il serait intéressant d'étudier la rétention de ces autres protéines constitutives par le modèle ici présent afin de le comparer aux données *in vivo* et *in vitro* sur surface hydrophobes.

Ces travaux font l'objet d'un article publié dans Archives of Oral Biology.

Ployon, S., Belloir, C., Bonnotte, A., Lherminier, J., Canon, F., & Morzel, M. (2016). The membrane-associated MUC1 improves adhesion of salivary MUC5B on buccal cells. Application to development of an in vitro cellular model of oral epithelium. *Archives of Oral Biology, 61,* 149-155. doi:10.1016/j.archoralbio.2015.11.002
Archives of Oral Biology 61 (2016) 149-155



Contents lists available at ScienceDirect

Archives of Oral Biology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/aob



The membrane-associated MUC1 improves adhesion of salivary MUC5B on buccal cells. Application to development of an in vitro cellular model of oral epithelium



Sarah Ployon^{a,b,c}, Christine Belloir^{a,b,c}, Aline Bonnotte^d, Jeannine Lherminier^e, Francis Canon^{a,b,c}, Martine Morzel^{a,b,c,*}

^a CNRS, UMR 6265 Centre des Sciences du GoÛt et de l'Alimentation, F-21000 Dijon, France

^b INRA, UMR1324 Centre des Sciences du GoÛt et de l'Alimentation, F-21000 Dijon, France

^c Université de Bourgogne, UMR Centre des Sciences du GoÛt et de l'Alimentation, F-21000 Dijon, France

^d Université de Bourgogne, UMR 1347 Agroécologie, Plateforme DImaCell, Centre de Microscopie INRA/Université de Bourgogne, F-21000 Dijon, France

e INRA, UMR1347 Agroécologie, ERL CNRS 6300, Plateforme DImaCell, Centre de Microscopie INRA/Université de Bourgogne, F-21000 Dijon, France

ARTICLE INFO

Article history: Received 20 August 2015 Received in revised form 2 November 2015 Accepted 3 November 2015

Keywords: Oral mucosa Mucosal pellicle TR146 cells Mucins Immunocytochemistry Scanning electron microscopy

ABSTRACT

Objectives: The mucosal pellicle is a thin layer of salivary proteins, mostly MUC5B mucins, anchored to epithelial oral cells. This pellicle is involved in protection of oral mucosae against abrasion, pathogenic microorganisms or chemical xenobiotics. The present study aimed at studying the involvement of MUC1 in mucosal pellicle formation and more specifically in salivary MUC5B binding using a cell-based model of oral epithelium.

Design: MUC1 mRNAs were not detected in TR146 cells, and therefore a stable cell line named TR146/ MUC1 expressing this protein was developed by transfection. TR146 and TR146/MUC1 were incubated with human saliva in order to evaluate retention of MUC5B by epithelial cells.

Results: The cell surface of both TR146 and TR146/MUC1 was typical of a squamous non-keratinized epithelium, with the presence of numerous microplicae. After incubation for 2 h with saliva diluted in culture medium (1:1) and two washes with PBS, saliva deposits on cells appeared as a loose filamentous thin network. MUC5B fluorescent immunostaining evidenced a heterogeneous lining of confluent cell cultures by this salivary mucin but with higher fluorescence on TR146/MUC1 cells. Semi-quantification of MUC5B bound to cells confirmed a better retention by TR146/MUC1, evaluated by Dot Blot (+34.1%, p < 0.05) or by immunocytochemistry (+44%, p < 0.001).

Conclusion: The membrane-bound mucin MUC1 is a factor enhancing the formation of the mucosal pellicle by increasing the binding of salivary MUC5B to oral epithelial cells. An in vitro model suitable to study specifically the function and properties of the mucosal pellicle is proposed.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The oral cavity is lined by a thin layer of salivary proteins anchored onto mucosae (Bradway, Bergey, Jones, & Levine, 1989) and teeth (Hay, 1967), termed the mucosal and dental pellicles respectively. The mucosal pellicle is the inner structure of the protective mucus layer on mucosae, the upper structure being a mobile layer of saliva (Pramanik, Osailan, Challacombe, Urquhart, & Proctor, 2010). Salivary pellicles are known to have an essential

* Corresponding author at: INRA-CSGA, 17 rue Sully, 21000 Dijon, France. Fax: +33 380 69 32 27.

http://dx.doi.org/10.1016/j.archoralbio.2015.11.002

0003-9969/© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

role in oral health (Tabak, Levine, Mandel, & Ellison, 1982). For example, the dental pellicle ensures lubrication and buffering of dental surface (Hannig & Joiner, 2006). Regarding more specifically the mucosal pellicle, by similarity with the dental pellicle, it could contribute to moisture retention, lubrication or protection against microbial colonization (Bradway et al., 1989). It could also play a role in sensory perception of astringency (Nayak & Carpenter, 2008). Finally, similarly to intestinal mucus which is a gel barrier to drug delivery (Boegh & Nielsen, 2015), it is likely that the salivary mucus modulates diffusion properties of drugs and other chemical compounds through the oral mucosa (Teubl et al., 2013). Based on these functions of the mucosal pellicle, it appears necessary to include this biological structure to in vitro models of oral mucosa.

E-mail address: martine.morzel@dijon.inra.fr (M. Morzel).

The mucosal pellicle contains salivary proteins such as amylase, IgA, cystatins (Bradway et al., 1989), carbonic anhydrase IV, secretory component or mucins (Gibbins, Yakubov, Proctor, Wilson, & Carpenter, 2014). Among these salivary proteins, MUC5B has been identified as a major component of *in vivo*(Gibbins, Proctor, Yakubov, Wilson, & Carpenter, 2014) and *in vitro*(Cardenas, Elofsson, & Lindh, 2007) mucosal pellicles. Detecting MUC5B on cells sampled from human buccal surfaces confirmed its attachment to epithelial cells (Morzel, Tai, Brignot, & Lherminier, 2014).

The mechanisms of pellicle formation are not fully understood. Hydrophobic effects between the cell surface and salivary proteins have been suggested to be a prominent factor in pellicle formation (Gibbins, Yakubov et al., 2014). Surface wettability has also been reported to be involved in the structural organization of pellicle components (Aroonsang, Sotres, El-Schich, Arnebrant, & Lindh, 2014). From a biochemical point of view, cross-linking between salivary components by transglutaminase was demonstrated (Bradway et al., 1992; Gibbins, Yakubov et al., 2014). The involvement of the membrane-bound mucins MUC1 in MUC5B adhesion to cells through direct binding between the two mucins has also been suggested (Gibbins, Yakubov et al., 2014; Offner & Troxler, 2000). A recent study further supported the hypothesis of a role of membrane-bound mucins, by demonstrating that MUC5B could bind to HT29 intestinal cells only when they were induced to secrete the membrane-bound mucins MUC5AC(Gibbins, Proctor, Yakubov, Wilson, & Carpenter, 2015).

MUC1 is a polymorphic membrane-associated glycoprotein (Hanisch & Muller, 2000), expressed in most healthy epithelial tissues. In relation to tissues of the human oral cavity, MUC1 mRNAs were found in salivary glands (Sengupta et al., 2001) but also in epithelial oral cells (Chang, Chang, Kim, Lee, & Kho, 2011). Recently, the protein MUC1 was detected in the superficial part of oral epithelium (Kullaa, Asikainen, Herrala, Ukkonen, & Mikkonen, 2014). Decrease of MUC1 levels in epithelial cells of elderly has been associated to lower mucosal defences in the oral cavity (Chang et al., 2011), supporting its implication in the formation of the mucosal pellicle.

The aim of the present study was to investigate the role of MUC1 in the binding of MUC5B to oral mucosae. We opted for a cell-based model using TR146 cells, which have been shown to be suitable for establishing a model of oral epithelium (Jacobsen, Van Deurs, Pedersen, & Rassing, 1995). TR146 cells were stably transfected in order to over-express MUC1, and adhesion of human salivary MUC5B on either transfected or native cell lines was compared. The resulting models, constituted of epithelial cells lined by a salivary pellicle, were characterized by microscopic approaches

2. Materials and methods

2.1. Saliva collection

The study was performed following the guidelines of the declaration of Helsinki. Written informed consent was obtained from the participants. Saliva was obtained from fifteen volunteers who declared to be in good oral health. Subjects were instructed to refrain from smoking, eating or drinking for at least two hours before saliva collection. Subjects donated saliva for approximately 1 h by spitting out saliva accumulating spontaneously in their mouth into plastic vessels. All samples were pooled and centrifuged at 14 000 g for 20 min at 4 °C. The resulting pool of clarified saliva was aliquoted and immediately frozen at – 80 °C.

2.2. Cell culture

TR146 epithelial cells, derived from a human buccal squamous cell carcinoma (Rupniak et al., 1985), were obtained from the

European Collection of Cell Cultures (ECACC, Salisbury, Wiltshire, UK). TR146 cells were routinely grown in DMEM/F12-GlutaMAX medium from Gibco[®] (1:1, v:v), supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and 100 units/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin in T75 flasks (all obtained from Life Technologies). Cells were subcultured at 7 days intervals and medium was changed every 2 days. Cells were incubated at 37 °C in a humidified atmosphere containing 7.5% CO2. Cells were seeded at a density of 4×10^4 cells/cm² in 96-well plates for viability assay, in 12-well culture plates for semi-guantification of MUC5B by dot blot, in 8well culture slides coated with Cell-TakTM (Corning) for MUC5B and MUC1 immunostaining or on 10 mm diameter glass slips coated with Cell-TakTM for Scanning Electron Microscopy (SEM) and confocal microscopy. In these conditions, confluence was reached in 48 h and cells formed a multi-layer culture after five days. Cells were grown for five days before depositing clarified saliva at the culture surface.

2.3. Exposure of cells to human saliva: viability assay and formation of a salivary pellicle

At confluence, cells were incubated for 24 h with clarified saliva diluted in growth medium (1:1, v:v). DMSO 50% was used as a positive control of cytotoxic effect. Cytotoxic effect of saliva was assessed using the Neutral Red assay using a fluorimetric method (Rat, Korwinzmijowska, Warnet, & Adolphe, 1994). Briefly, cells were incubated for 3 h at 37 °C with 200 μ l of medium containing neutral red at 50 μ g/ml, washed twice with PBS that was removed, and then incubated at room temperature for 1 h in neutral red eluent (ethanol:H₂O:acetic acid, 50:49:1) with gentle agitation. Reading of fluorescence was performed with Victor³V microplate reader (PerkinElmer) with excitation and emission wavelengths fixed at 544 nm and 595 nm, respectively. 80% of viability was considered as an indicator of non-cytotoxicity. Assays were performed in triplicates.

A salivary pellicle was deposited onto cells by incubating cell subcultures for 2 h with clarified saliva diluted into growth medium (1:1). After incubation, samples were washed twice with PBS in order to eliminate the non-adsorbed saliva.

2.4. Measurement of the cell multi-layer thickness

Five-day subcultures were stained using LIVE/DEAD[®] BacLight[™] (LifeTechnologies), which stains live cells with Syto 9 and dead cells with propidium iodide. Confocal microscopy was used in order to observe throughout the culture. Pictures were taken from the glass surface to the upper cells' surface with 160 nm steps imaging and were merged in order to obtain an overlay projection, which allowed evaluating the cell model thickness.

2.5. Cell transfection

The vector (pCMV6) carrying the gene of MUC1 variant 2 from OriGene (OriGene Technologies, ref. SC302125) was used. The protein encoded by the gene matches with the isoform Y of the human MUC1 (Uniprot identifier P15941-7). The plasmid was amplified by subcloning in DH5 α *Escherichia coli* (Life Technologies) and purified using PureYieldTM Plasmid Miniprep System (Promega). Cells were transfected when 80% confluence was reached. FuGENE[®]-HD (Promega) was used as transfection reagent at a FuGENE[®]-HD:DNA ratio of 3.0:1 following the manufacturer's instructions. After 48 h, cells were subjected to drug selection in 0.2 mg/ml geneticin (G418 sulfate, LifeTechnologies) for 2–3 weeks. Surviving cell colonies were then picked up and subcloned using cloning rings. Twenty-four clones were expanded stepwise in 96, 24, 6-well plates and screened for gene expression of MUC1



Fig. 1. Over-expression of MUC1 in TR146/MUC1 cells evidenced by (a) RT-PCR in native TR146 cells and transfected TR146/MUC1 cells, (b) and (c) immunostaining of MUC1 on TR146 and TR146/MUC1 transfected cells, respectively. Cell nuclei are stained in blue by DAPI. Scale bars 100 μ m. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

by RT-PCR. The best stable cell line named TR146/MUC1 was obtained after 55 days of selection and growth.

2.6. Expression of MUC1 by RT-PCR

For preparation of cDNA from the cells, total RNA was extracted from TR146 and TR146/MUC1 confluent cells using RNAeasy Plus Mini Kit (QIAGEN) and quantified using a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (Thermo Scientific). Reverse transcription was performed using Biorad iScriptTM cDNA Synthesis Kit on 450 ng of total RNA in a final volume of 10 μ l. PCR was performed using Taq PCR Master Mix Kit (QIAGEN) with 2.5 μ l of template DNA and 0.2 μ M primers in a total reaction volume of 25 μ l. The following cycling parameters were applied: 94 °C for 3 min and 30 cycles of amplification (94 °C for 50 s; 60 °C for 50 s and 72 °C for 2 min). Gene specific primers were designed according to standard recommendations with primer design software (Primer-Blast and Vector NTI[®] software). Two primers pairs were ordered at Eurogentec. A first pair (AB, 5'TGCTTACAGCTACCACAGCC3' and 5'CCAGACTGGGCAGAGAAAGG3') was designed in order to hybrid with all MUC1 mRNA forms (cDNA sequence of 436 pb). A second pair (AC, 5'TGCTTACAGCTACCACAGCC3' and 5'ATTAGGACAAGGCTGGTGGG3') was designed in order to target specifically insertion sequence MUC1 of 795 bp length specific for *pCMV6-MUC1* construction. Amplified products were resolved by agarose gel electrophoresis (0.8%) at 100 V for 20 min. Gel was stained with ethidium bromide and viewed under UV transilluminator Geldoc 2000 imaging system (Bio-Rad).

2.7. Fluorescence immunostaining of MUC1 and MUC5B

Immunostaining of MUC1 was performed on TR146 and TR146/ MUC1 cells without a salivary pellicle. Immunostaining of MUC5B was performed on native or transfected cells with or without a salivary pellicle.

Samples on glass slides were fixed by immersion in cold methanol for 10 min. Non-specific binding was prevented using 0.3% fat-free milk and 5% non-immune goat serum in PBS for



Fig. 2. TR146 (a and b) and TR146/MUC1 (c and d) cells observed by SEM. Scale bars 1 μ m.

15 min. For MUC1 immunostaining, a mouse monoclonal anti-MUC1 antibody clone 4A5 (OriGene Technologies) was used (1:200 in PBS, 1 h). For MUC5B immunostaining, a mouse monoclonal anti-MUC5B antibody F2 (kind gift from Prof. Veerman, Free University of Amsterdam) was used (1:25 in PBS, 1.5 h). Negative controls were obtained by omitting primary antibodies in the incubation medium. Alexa 488 Goat anti-mouse IgG (Invitrogen) was used as the secondary antibody (1:400 in PBS, 1 h). The samples were mounted into Prolong Gold antifade reagent with DAPI (Invitrogen). Fluorescence was observed with a Nikon Eclipse E600 microscope (Nikon Instruments) equipped with UV-2A (excitation 330-380 nm, emission 400 nm) and B-2A (excitation 450-490 nm, emission 505 nm) filters. Images were acquired using a Nikon Dxm1200C camera. The Nikon NIS-Br software was used for data acquisition. MUC5B were semi-quantified using ImageJ software on 5 images of either TR146 or TR146/MUC1 samples, extracting the raw integrated density values of the green channel. Results were expressed in arbitrary units (AU). The difference between TR146 and TR146/MUC1 cells was tested by ANOVA.

2.8. Semi-quantification of MUC5B in cellular extracts by Dot-Blot

Dot Blot was performed on lysates of TR146 and TR146/MUC1 cells with a salivary pellicle. Three biological replicates were produced and analysed. Cells were lysed in 150 µl of RIPA buffer (Sigma–Aldrich) and proteins were quantified using the DC protein assay (Bio-Rad). The volume of lysate containing 5 µg of proteins was deposited per well on nitrocellulose membranes, in triplicate for each biological replicate. For detection of MUC5B, the primary antibody F2 (1:400 in PBS, 1 h) and the secondary antibody goatanti mouse IgG coupled to HRP (LifeTechnologies, 1:2000, 1 h) were used. Non-specific binding was prevented using 0.3% fat-free milk. HRP activation was performed using the Clarity Western ECL Substrate Kit (Bio-Rad). Blot images were acquired using the

Chemidoc imaging system (Bio-Rad). Semi-quantification of chemiluminescence detected within boundaries of each dot was performed using the ImageLab software. Results were expressed in arbitrary units (AU). The median values of technical replicates were calculated for each biological replicate, and the difference between TR146 and TR146/MUC1 cells was tested by ANOVA.

2.9. Scanning electron microscopy

Fixation of TR146 cells and TR146/MUC1 cells was carried out with 2.5% glutaraldehyde in PBS for 30 min, followed by 0.4% osmium tetroxide in PBS for 30 min. Dehydration was done through graded baths of ethanol (from 30 to 100%). Drying was performed by the critical point drying (CPD) method using Leica CPD 030. Samples were then coated with a thin carbon layer using a CRESSINGTON 308R and observed with a scanning electron microscope JEOL JSM 7600F (JEOL, Ltd.). SEM was operated at 2 kV and samples were observed at a working distance of 5 mm.

2.10. Immuno-scanning electron microscopy

Fixation of cells was achieved with 4% (v/v) paraformaldehyde for 20 min at 4 °C. Blocking and incubation with the antibody anti-MUC5B were performed as described for fluorescence immunostaining. The primary antibody was detected with 15 nm goldlabeled Goat Anti Mouse (GAM) IgG (Aurion, 1:15 in PBS, 1 h). After immunological reactions, samples were fixed with 2.5% glutaraldehyde in PBS. Finally, samples were dehydrated with ethanol, dried with CPD and carbon coated as described above. Samples were observed with a Hitachi SU5000 Schottky Field Emission scanning electron microscope and gold particles were detected with a Backscattered Electron (BSE) detector. SEM was operated at 5 kV and samples were observed at a working distance of 8 mm.



Fig. 3. MUC5B immunostaining of (a) TR146 cells, (b) TR146/MUC1cells, (c) TR146 cells incubated for 2 h with human saliva, (d) TR146/MUC1 cells incubated for 2 h with human saliva. Scale bars 100 μ m.



Fig. 4. Semi-quantification (mean \pm STD) of MUC5B retained on TR146 and TR146/MUC1 cells after incubation for 2 h with human saliva by Dot-Blot chemiluminescence assay (a) and immunocytochemistry followed by image analysis (b).

3. Results

3.1. Expression of MUC1 in transfected cells

In order to confirm the efficiency of MUC1 transfection, RT-PCR and fluorescence immunostaining of MUC1 were carried on native TR146 cells and transfected TR146/MUC1 cells (Fig. 1). After amplification, the sequences AB and AC measuring 436 and 795 pb respectively were detected only in transfected cells (Fig. 1a), indicating that MUC1 was not detectable at the mRNA level in native cells and that transcription of the recombinant MUC1 gene was efficiently performed in the transfected cells. Compared to TR146 native cells (Fig. 1b), transfected TR146/MUC1 cells showed Alexa fluorescent green staining (Fig. 1c) that confirmed expression of MUC1 membrane-associated mucin at the protein level. Only some cells were stained, probably because superficial cells are not necessarily at the same stage of growth, inducing differences in MUC1 expression or MUC1 integration into the membrane.

3.2. Morphology of TR146 and TR146/MUC1 cells

After five days of growth, *i.e.*, three days after confluence was reached, cells formed a multi-layer culture whose thickness was approximated to 12.7 μ m. No dead cells were observed (data not shown).

The cells surface was investigated by SEM and observations are presented in Fig. 2. The cells surface exhibited numerous membrane folds (microplicae) (Fig. 2a and c). These microplicae were clearly visualized at higher magnification (see arrows in Fig. 2b and d). The density and size of microplicae showed some cell-to-cell variability within one culture. However, overall, there was no substantial morphological difference between the two cell types.

3.3. Binding of saliva and MUC5B to TR146 and TR146/MUC1 cells

First, cell viability assays revealed that diluted clarified saliva was not toxic to cells for up to 24 h of exposure. Then, the ability of salivary mucins MUC5B to adsorb onto cells was evaluated by Dot-Blot which was performed on cells lysates, and by fluorescent immunostaining of cells. Fig. 3 shows immunostaining of MUC5B on cells and revealed that, expectedly, no fluorescence was detected in the absence of saliva (Fig. 3a and b). In contrast, MUC5B was detectable after incubation of cells with saliva for 2 h (Fig. 3c and d) on both cell types but not after incubation for 10 min (data not shown). TR146/MUC1 presented a higher fluorescent intensity than TR146, translating a higher amount of salivary MUC5B retained on the cells surface (Fig. 3c and d). Similarly to what was observed for MUC1 staining, clear between-cells variability was observed in the TR146/MUC1 culture while the lining appeared more homogenous in TR146 cells. From a semiquantitative point of view (Fig. 4), TR146/MUC1 cells showed a significantly higher retention of salivary MUC5B than native TR146 cells indicated both by the Dot-Blot method (+34.1%, p < 0.05) and by immunocytochemistry (+44%, p < 0.001).

SEM allowed to observe the structure of the salivary deposit (Fig. 5a and b) and revealed that it was made of a loose filamentous network. No major differences were observed between transfected and native cells. Membrane folds were still visible under this network indicating that the saliva deposit was overall thin. However, some thicker and larger aggregates were also observed translating an uneven structure. SEM coupled to immunostaining of MUC5B was carried out (Fig. 5c) and it confirmed that the deposits contained MUC5B. The mesh size was approximated to a maximum of 0.5 μ m.

4. Discussion

The objective of the present study was to evaluate the role of MUC1 in the anchoring of MUC5B onto oral epithelial cells, and more generally to obtain a deeper understanding of its involvement in the formation of the mucosal pellicle. Overall, we found that MUC5B binding was quantitatively enhanced when oral epithelial cells expressed MUC1. An in vitro model constituted of



Fig. 5. SEM observations of TR146 (a) and TR146/MUC1 (b) cells, both incubated for 2 h with human saliva (scale bars 1 µm), and immuno-SEM detection of salivary MUC5B on salivary aggregates (scale bars 500 nm). Gold particles are coloured in pink. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

epithelial cells lined with a mucosal pellicle is proposed, based on the use of transfected TR146/MUC1 cells.

The experimental choice of using the TR146 cell line was guided by considerations on the structure of membrane-bound mucins and on the morphology of oral cells. Some epithelial cell lines are able to secrete membrane-bound mucins. For example, Gibbins et al. (2015) recently used HT29-MTX intestinal cells, which produce the membrane-bound mucins MUC5AC, to study mucosal pellicle formation. However, MUC5AC mucins can form a layer gel whose thickness varies from approximately 100-300 µm along the gastro-intestinal tract (Pelaseyed et al., 2014), which differs from the situation in the oral cavity where the pellicle thickness has been evaluated to a maximum of 100 nm (Morzel et al., 2014). Moreover, MUC5AC mucins do not possess the MUC1 amino-acid sequence which is thought to interact with MUC5B (Wang et al., 2004). Other human epithelial cell lines naturally express MUC1. MUC1 mRNAs were for example detected in several intestinal cell lines such as Caco-2 (Van Klinken et al., 1996). However, the morphology of intestinal cells differs quite substantially from that of oral cells, for example regarding their shape (columnar vs squamous) and the presence of microvilli at the apical surface of intestinal cells. In order to model closely the in vivo surface of oral mucosae, in particular that of soft tissues which represent the largest area in the oral cavity, we therefore opted for a wellcharacterized non-keratinized cell line, the TR146 cell line. TR146 also exhibits high similarity in terms of permeability with human oral cells (Jacobsen et al., 1995; Teubl et al., 2013). However, experiments performed in the present study indicated that MUC1 were not detectable in TR146 cells at the mRNA or protein level. Therefore, in order to study the involvement of MUC1 in oral mucosal pellicle formation, we stably transfected the TR146 cell line.

In the oral cavity, the thickness of the mucosa can vary from 500 and 800 µm (Wertz & Squier, 1991) with epithelial thickness varying from approximately 100 µm on the floor of the mouth to 300 µm on buccal surfaces (Prestin, Rothschild, Betz, & Kraft, 2012). The present model is thinner than oral epithelium and we suggest that it could represent the upper layer of mucosa, which directly interacts with compounds diluted in saliva. From a morphological point of view, non-keratinized surfaces of cheeks, lips or soft palate are made of cells characterised by membrane folds termed microplicae (Asikainen, Mikkonen, Ruotsalainen, Koistinen, & Kullaa, 2014, Kullaa-Mikkonen, 1986). Such folds were clearly present either on TR146 or on TR146/MUC1 cell membranes. This is particularly interesting knowing that these structures have been described as the basis for mucosal pellicle formation in vivo(Asikainen et al., 2012). Overall, SEM observations demonstrate that the morphologies of both types of cells are suitable for a model including a mucosal pellicle layer.

The ability of mucins MUC5B to bind to cells surface was demonstrated in both types of cells, and we showed that adsorption of salivary components to the mucosa is not immediate as indicated by undetectable MUC5B on cells incubated with saliva for 10 min. Furthermore, we noticed that with a longer incubation (24 h of incubation, data not shown), mucins formed dense and patchy aggregates, possibly due to local acidification by the cells. On synthetic surfaces also, time appears to be a determinant factor for mucin retention: MUC5B was detected on silica after 1 h incubation with saliva (Aroonsang et al., 2014) but was not after 20 min (Gibbins, Yakubov et al., 2014). The time used in the present study (2 h) was chosen to be compatible with the in vivo situation since the time of turnover of the superficial layer of oral epithelium was calculated to be 2.7 h (Dawes, 2003).

The specific mechanism of adsorption of MUC5B to oral surfaces is not fully elucidated to date. Some studies have demonstrated that MUC5B are retained better on hydrophobic than hydrophilic surfaces (Aroonsang et al., 2014; Cardenas et al., 2007) suggesting a role of hydrophobic effects. Moreover, the involvement of the membrane bound mucins MUC1 has also been proposed (Gibbins, Yakubov et al., 2014; Offner & Troxler, 2000). For example, Gibbins, Yakubov et al., 2014 and Gibbins, Proctor et al., 2014 pointed out that retention of MUC5B was limited on hydrophobic surfaces, and suggested that MUC1 is essential to pellicle formation. With regards to the possible biochemical interaction between the two mucins, an in vitro assay showed that multiple MUC5B domains could bind to the N-terminal domain of MUC1, especially with the last 107 amino acids (Wang et al., 2004). Here, our results provide an argument in favour of MUC1 implication, since TR146/MUC1 cells retained better MUC5B. Furthermore, the observation of between-cell variability in binding of salivary MUC5B to TR146/ MUC1 cells may be correlated to the expression of MUC1 that was also observed to be uneven among the cells. However, bioadhesion of salivary mucins to epithelial cells, even if reduced, also occurred in TR146 cells. Thus the binding of MUC5B to epithelial cells is probably a multimodal process enhanced by the presence of membrane-associated mucins MUC1.

From a structural point of view, the salivary deposits observed by SEM both on TR146 and TR146/MUC1 cells were somehow comparable to the observations of human dried saliva (Teubl et al., 2013) where mucins form a filamentous network. However, the spatial organisation of mucins was different. In particular, the apparent mesh size is smaller in our model (up to $0.5 \,\mu\text{m}$) than in dried saliva (up to 0.9 µm), which may be due to specific interactions of MUC5B with the underlying cell surface. The distribution of MUC5B over the surface of individual cells was comparable to the in vivo situation, where MUC5B appeared clustered on sections of buccal cells sampled on healthy subjects (Morzel et al., 2014). This clustering was all the more visible on TR146/MUC1 cells. In addition, although we did not observe by SEM structural differences of mucins network between TR146 and TR146/MUC1, the higher amount of MUC5B on TR146/MUC1 may have an impact on the pellicle functionality such as its lubricating properties. For example, Pramanik et al. (2010) related the reduction of oral lubrication in dry mouth patients with a lower expression of MUC1. Altogether, the model developed using TR146/ MUC1 appeared to mimic more faithfully a healthy physiological situation compared to a TR146-based model.

As any in vitro model, the model presented in this study shows some limitations. First, no dead cells were observed and the nuclei integrity was preserved, which differs from the cell status in the superficial layer of a squamous non-keratinized epithelium previously described (Squier, 1991). Second, the MUC1/Y isoform of MUC1 expressed by TR146/MUC1 is a shorter form of the fulllength human membrane-bound mucin that lacks the variable number tandem repeat (VNTR) region (Hanisch & Muller, 2000). Although the function of this region is not clearly described in epithelial oral cells, a correlation between its length and lubrication has been reported in eye epithelium (Imbert et al., 2006). The expression of MUC1 as a single isoform may therefore be a limitation to this model. Nevertheless, the model also presents several advantages. First, compared to synthetic surfaces, a cellbased model ensures that surface properties (e.g., hydrophobicity, wettability, topography) are close to those found on oral mucosa and that salivary proteins can adopt a realistic spatial conformation. Second, it allows studying the biochemical interactions between cell membrane constituents and exogenous molecules, which would not be possible with a synthetic surface. Considering now cell-based models, to our knowledge, only one model based on oral cell cultures had previously taken into account the presence of a mucus layer lining the cells (Teubl et al., 2013). In that model, the mucus layer was dried prior to being deposited onto cells, which may affect its physico-chemical properties. In addition,

the mucus layer measured between 120 and $150 \,\mu$ m, *i.e.*, much thicker than the mucosal pellicle. In contrast, the present model is suitable to focus on the function and properties of the mucosal pellicle, especially since our model takes into consideration the expression of the membrane-bound MUC1, which enhanced the anchoring of MUC5B.

To conclude, the main advantage of the present model is to include a mucosal pellicle, *i.e.*, the layer at the interface between the oral epithelium and saliva. Its physico-chemical properties can control different mechanisms such as adsorption onto or diffusion through the mucosa. Therefore, this model is a promising tool to investigate molecular phenomena occurring at the surface of oral mucosae. As a perspective of this work, this model will be used to study the complex molecular interactions between flavour compounds, epithelial cells and the mucosal pellicle.

Acnowledgements

Prof Veerman (Free university of Amsterdam) is gratefully acknowledged for providing the MUC5B F2 antibody. The authors thank Christine Arnould (INRA, UMR1347 Agroécologie, ERL CNRS 6300, Plateforme DImaCell, Centre de Microscopie INRA/Université de Bourgogne) for confocal microscopy observations and Frédéric Herbst (Institut Carnot de Bourgogne, Université de Bourgogne) for training and assistance in SEM experiments. Hitachi High-Technologies Europe (Roland Schmidt) and Elexience (Thierry Grenut) are acknowledged for obtaining SEM images. Franck Ménétrier and Claire Fenech (Centre des Sciences du GoÛt et de l'Alimentation) are thanked for advice on sample preparation prior to microscopy and on RT-PCR, respectively. This study was funded by the French National Research Agency (Grant ANR-10-ALIA-001 MUFFIN). The French Ministry of Higher Education and Research provided the PhD fellowship for Sarah Ployon.

References

- Aroonsang, W., Sotres, J., El-Schich, Z., Arnebrant, T., & Lindh, L. (2014). Influence of substratum hydrophobicity on salivary pellicles: organization or composition? *Biofouling*, 30(9), 1123–1132.
- Asikainen, P., Mikkonen, J. J., Ruotsalainen, T. J., Koistinen, A. P., & Kullaa, A. M. (2014). Microstructure of the superficial epithelial cells of the human oral mucosa. Ultrastructural Pathology, 38(1), 6–12.
- Asikainen, P., Ruotsalainen, T. J., Mikkonen, J. J. W., Koistinen, A., ten Bruggenkate, C., & Kullaa, A. M. (2012). The defence architecture of the superficial cells of the oral mucosa. *Medical Hypotheses*, 78(6), 790–792.
- Boegh, M., & Nielsen, H. M. (2015). Mucus as a barrier to drug delivery understanding and mimicking the barrier properties. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 116(3), 179–186.
- Bradway, S. D., Bergey, E. J., Jones, P. C., & Levine, M. J. (1989). Oral mucosal pellicle: adsorption and transpeptidation of salivary components to buccal epithelial cells. *Biochemical Journal*, 261(3), 887–896.
- Bradway, S. D., Bergey, E. J., Scannapieco, F. A., Ramasubbu, N., Zawacki, S., & Levine, M. J. (1992). Formation of salivary mucosal pellicle: the role of transglutaminase. *Biochemical Journal*, 284, 557–564.
- Cardenas, M., Elofsson, U., & Lindh, L. (2007). Salivary mucin MUC5B could be an important component of in vitro pellicles of human saliva: an in situ ellipsometry and atomic force microscopy study. *Biomacromolecules*, 8(4), 1149– 1156.
- Chang, W.-I., Chang, J.-Y., Kim, Y.-Y., Lee, G., & Kho, H.-S. (2011). MUC1 expression in the oral mucosal epithelial cells of the elderly. *Archives of Oral Biology*, 56(9), 885–890.
- Dawes, C. (2003). Estimates, from salivary analyses, of the turnover time of the oral mucosal epithelium in humans and the number of bacteria in an edentulous mouth. Archives of Oral Biology, 48(5), 329–336.

- Gibbins, H. L., Proctor, G. B., Yakubov, G. E., Wilson, S., & Carpenter, G. H. (2014). Concentration of salivary protective proteins within the bound oral mucosal pellicle. Oral Diseases, 20(7), 707–713.
- Gibbins, H. L., Proctor, G. B., Yakubov, G. E., Wilson, S., & Carpenter, G. H. (2015). SIgA binding to mucosal surfaces is mediated by mucin–mucin interactions. *PLoS* One, 10(3), 13. http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0119677.
- Gibbins, H. L., Yakubov, G. E., Proctor, G. B., Wilson, S., & Carpenter, G. H. (2014). What interactions drive the salivary mucosal pellicle formation? *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, 120, 184–192.
- Hanisch, F. G., & Muller, S. (2000). MUC1: the polymorphic appearance of a human mucin. Glycobiology, 10(5), 439–449.
- Hannig, M., & Joiner, A. (2006). The structure, function and properties of the acquired pellicle. *Monographs in Oral Science*, 19, 29–64.
- Hay, D. I. (1967). The adsorption of salivary proteins by hydroxyapatite and enamel. Archives of Oral Biology, 12(8), 937–946.
- Imbert, Y., Darling, D. S., Jumblatt, M. M., Foulks, G. N., Couzin, E. G., Steele, P. S., et al. (2006). MUC1 splice variants in human ocular surface tissues: possible differences between dry eye patients and normal controls. *Experimental Eye Research*, 83(3), 493–501.
- Jacobsen, J., Van Deurs, B., Pedersen, M., & Rassing, M. R. (1995). TR146 cells grown on filters as a model for human buccal epithelium: I. Morphology, growth, barrier properties, and permeability. *International Journal of Pharmaceutics*, 125 (2), 165–184.
- Kullaa, A. M., Asikainen, P., Herrala, M., Ukkonen, H., & Mikkonen, J. J. W. (2014). Microstructure of Oral Epithelial Cells as an Underlying Basis for Salivary Mucosal Pellicle. Ultrastructural Pathology, 38(6), 382–386.
- Kullaa-Mikkonen, A. (1986). Scanning electron microscopic study of surface of human oral mucosa. European Journal of Oral Sciences, 94(1), 50–56.
- Morzel, M., Tai, S., Brignot, H., & Lherminier, J. (2014). Immunocytological detection of salivary mucins (MUC5B) on the mucosal pellicle lining human epithelial buccal cells. *Microscopy Research and Technique*, 77(6), 453–457.
- Nayak, A., & Carpenter, G. H. (2008). A physiological model of tea-induced astringency. *Physiology & Behavior*, 95(3), 290–294.
- Offner, G. D., & Troxler, R. F. (2000). Heterogeneity of high-molecular-weight human salivary mucins. Advances in Dental Research, 14, 69–75.
- Pelaseyed, T., Bergstrom, J. H., Gustafsson, J. K., Ermund, A., Birchenough, G. M. H., Schutte, A., et al. (2014). The mucus and mucins of the goblet cells and enterocytes provide the first defense line of the gastrointestinal tract and interact with the immune system. *Immunological Reviews*, 260(1), 8–20.
- Pramanik, R., Osailan, S. M., Challacombe, S. J., Urquhart, D., & Proctor, G. B. (2010). Protein and mucin retention on oral mucosal surfaces in dry mouth patients. *European Journal of Oral Sciences*, 118(3), 245–253.
- Prestin, S., Rothschild, S. I., Betz, C. S., & Kraft, M. (2012). Measurement of epithelial thickness within the oral cavity using optical coherence tomography. *Head and Neck-Journal for the Sciences and Specialties of the Head and Neck*, 34(12), 1777– 1781.
- Rat, P., Korwinzmijowska, C., Warnet, J. M., & Adolphe, M. (1994). New in-vitro fluorimetric microtitration assays for toxicological screening of drugs. *Cell Biology and Toxicology*, 10(5–6), 329–337.
- Rupniak, H. T., Rowlatt, C., Lane, E. B., Steele, J. G., Trejdosiewicz, L. K., Laskiewicz, B., et al. (1985). Characteristics of 4 new human cell lines derived from squamous cell carcinomas of the head and neck. *Journal of the National Cancer Institute*, 75 (4), 621–635.
- Sengupta, A., Valdramidou, D., Huntley, S., Hicks, S. J., Carrington, S. D., & Corfield, A. P. (2001). Distribution of MUC1 in the normal human oral cavity is localized to the ducts of minor salivary glands. *Archives of Oral Biology*, 46(6), 529–538.
- Squier, C. A. (1991). The permeability of oral mucosa. Critical Reviews in Oral Biology and Medicine, 2(1), 13–32.
- Tabak, L. A., Levine, M. J., Mandel, I. D., & Ellison, S. A. (1982). Role of salivary mucins in the protection of the oral cavity. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, 11(1), 1– 17.
- Teubl, B. J., Absenger, M., Froehlich, E., Leitinger, G., Zimmer, A., & Roblegg, E. (2013). The oral cavity as a biological barrier system: design of an advanced buccal in vitro permeability model. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 84(2), 386–393.
- Van Klinken, B. J. W., Oussoren, E., Weenink, J. J., Strous, G. J., Buller, H. A., Dekker, J., & Einerhand, A. W. C. (1996). The human intestinal cell lines Caco-2 and LS174T as models to study cell-type specific mucin expression. *Glycoconjugate Journal*, 13 (5), 757–768.
- Wang, L., Li, X., Bruno, L., Oppenheim, F. G., Troxler, R. F., & Offner, G. D. (2004). MUC1 and MUC5B can form a protective mucin scaffold. *Paper presented at the international association for dental research annual meeting*, Hawai Convention Center, Honolulu.
- Wertz, P. W., & Squier, C. A. (1991). Cellular and molecular basis of barrier function in oral epithelium. Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 8(3), 237– 269.

CHAPITRE 2 – ETUDE DU ROLE DE LA MUQUEUSE ORALE DANS LE PHENOMENE DE PERSISTANCE AROMATIQUE

1. INTRODUCTION

1.1. CONTEXTE ET PROBLEMATIQUE

La persistance aromatique correspond à une perception aromatique qui se prolonge dans le temps. Cette perception prolongée pourrait être due à une libération en bouche plus longue, comme cela a été montré pour certaines molécules d'arôme (Wright, Hills et al. 2003). Les mécanismes à l'origine de cette sensation sont encore peu compris à ce jour. Il est proposé dans la littérature que des interactions entre muqueuse orale et molécules d'arôme seraient à l'origine d'une rétention de certains composés à l'intérieur de la cavité orale, impactant ainsi sur le taux de libération au cours du temps de ces molécules vers la cavité nasale.

La capacité des molécules d'arôme à interagir avec la muqueuse orale a été étudiée *in vivo* grâce à la technique de Spitt-Off Odorant Measurement (SOOM) consistant à mesurer la quantité d'arôme retenue en bouche par quantification différentielle dans des solutions expectorées (Hussein, Kachikian et al. 1983, Buettner, Beer et al. 2002). Des méthodes *in vivo* ont aussi permis de suivre la libération intra orale de molécules d'arôme : la technique de Buccal Odor Screening développée par Buttner et Well (2004) (Buettner and Welle 2004) et plus récemment l'utilisation d'une fibre SPME intra-orale (Esteban-Fernandez, Rocha-Alcubilla et al. 2016). Cependant, l'étude *in vivo* de la libération d'arôme du vin de cette dernière étude a révélé des profils de libération et des pourcentages de rétention très différents selon les sujets et les molécules étudiées (Esteban-Fernandez, Rocha-Alcubilla et al. 2016). Ces différences pourraient être attribuables aux différences physiologiques individuelles, telles que le volume et la surface orale ou le flux salivaire. Cependant dans ces études, le nombre de sujets est relativement faible (2 ou 3 panelistes). Il est donc difficile de dresser un schéma général à partir de ces observations et de comprendre les mécanismes impliqués dans les interactions muqueuse orale/ molécules d'arôme, qui restent méconnus.

D'autre part, la pellicule salivaire tapissant la surface orale est constituée de protéines, notamment les mucines, dont la capacité à interagir avec les molécules d'arôme a été démontrée (van Ruth, Roozen et al. 1995, Pages-Helary, Andriot et al. 2014). Les protéines de la pellicule étant adsorbées en surface des cellules épithéliales et par conséquent non dégluties, des interactions

CHAPITRE 2

moléculaires entre protéines de la pellicule et molécules d'arôme pourraient être à l'origine de la rétention des molécules d'arôme dans la cavité orale.

Partant de ces constats, deux hypothèses ont été formulées :

- o Les molécules d'arôme interagissent avec les protéines de la pellicule
- Ces interactions impactent la libération des molécules d'arôme et par conséquent jouent un rôle dans le phénomène de persistance aromatique

Les objectifs de cette étude étaient d'étudier ces deux hypothèses. Pour cela, dans un premier temps, la capacité de la muqueuse orale et de la pellicule mucosale à retenir les molécules d'arôme a été étudiée en prenant en compte l'effet de la structure des molécules d'arôme. Dans un second temps, des expériences ont mesuré l'effet de la muqueuse et de la pellicule salivaire sur la dynamique de libération des molécules d'arôme.

1.2. STRATEGIE

Lors des études *in vivo*, il n'est pas possible d'isoler un seul paramètre physiologique afin d'étudier son seul impact sur un phénomène observé. De plus, il existe une forte variabilité interindividuelle entre tous les paramètres physiologiques intervenant dans la libération des molécules d'arôme en bouche (Taylor 2002, Pionnier, Chabanet et al. 2004). Ainsi afin d'étudier le rôle de la muqueuse orale dans le phénomène de rémanence aromatique, le modèle *in vitro* de muqueuse orale développé dans le chapitre 1 a été utilisé et adapté à l'étude de la libération des molécules d'arôme. Pour cela, les cellules ont été cultivées dans des flacons en verre dédiés à l'analyse de l'espace de tête.

Deux approches ont été mises en œuvre afin de répondre aux deux objectifs définis ci-dessus.

Une approche par analyse de l'espace de tête statique par GC-FID a été employée afin de mettre en évidence la capacité de la muqueuse orale à retenir les molécules d'arôme.

Une seconde approche d'analyse de l'espace de tête dynamique par injection directe par spectrométrie de masse été mise en œuvre afin d'évaluer l'influence de la muqueuse sur la libération dynamique des molécules d'arôme.

2. MATERIELS ET METHODES

2.1. MODELE CELLULAIRE DE MUQUEUSE ORALE

Les cellules de la lignée TR146/MUC1 ont été utilisées dans cette étude. Les cellules ont été ensemencées à une densité de 4x10⁴ cellules/cm² dans des flacons de 10 ml à fond plats en verre, recouvert avec de la Cell-Tak[™] (Corning) et cultivées selon le protocole décrit dans le chapitre 1 paragraphe 2.1 pendant 5 jours. Pour les analyses par PTR-MS, les flacons ont été préalablement stérilisés par autoclave afin d'éviter toute trace d'éthanol qui pourrait perturber l'ionisation des molécules d'arôme. Afin de former la pellicule mucosale, les cellules ont ensuite été incubées avec de la salive clarifiée diluée selon le protocole décrit dans le chapitre 1 paragraphe 2.2.

2.2. MOLECULES D'AROME

Les molécules d'arôme utilisées ont été achetées chez Sigma-Aldrich (St Quentin Fallavier, France). Les molécules ainsi que certaines de leurs propriétés chimiques sont listées dans le Tableau 11.

Composó	Numéro M ^a		Log Dh	Sol. ^c	Pvap ^d	Temp.
compose	CAS	(g/mol)	LUG La	(mg/l)	(mmHg)	four GC
Pentan-2-one	107-87-9	86	0,91	2,1.10 ⁴	39,4	70
Hexan-2-one	591-78-6	100 1,38		7,7.10 ³	11,6	80
Heptan-2-one	110-43-0	114	1,98	2,1.10 ³	3,86	95
Octan-2-one	111-13-7	128	2,37	884,2	1,35	100
Nonan-2-one	821-55-6	142	3,14	170,6	0,62	125
Decan-2-one	693-54-9	156	3,73	46,43	0,27	135
Hexan-3-one	589-38-8	100	1,24	1,0.104	13,90	80
Octan-3-one	106-68-3	128	2,22	1,2. 10 ³	2,00	95
Pentan-2,3-dione	600-14-6	100	-0,85	6,2.10 ⁵	31,1	80
Linalol	78-70-6	154	2,97	1,5.10 ³	0,16	135
Gaïacol	90-05-1	124	1,32	2,8.104	0,10	rampe
Trans-2-Hexen-1-al	6728-26-3	98	1,58	1,6.104	4,72	95
Hexanoate d'éthyle	123-66-0	144	2,83	629	1,8	95
Pyrazine	290-37-9	80	-0,26	2,2.10 ⁵	10,8	100
2,3-diméthylpyrazine	5910-89-4	108	0,54	3,8.10 ⁴	2,74	100

Tableau 11 : Liste et propriétés chimiques des molécules d'arômes utilisées

^a Masse moléculaire

^b Coefficient de partage octanol/eau Episuit

° Solubilité dans l'eau à 25°C

^d Pression de vapeur saturante

^e Température de four du GC

La série linéaire des cétones 2-méthylées a été choisie du fait que ces molécules ont déjà montré une aptitude à interagir avec les protéines salivaires en solution (notamment les mucines) de façon croissante avec l'augmentation de la longueur de la chaîne carbonée, permettant de mettre en évidence des interactions de type effets hydrophobes. Deux composés (3-hexanone et 3-octanone) ont permis d'évaluer l'effet de la position de la fonction cétone dans la capacité des composés à interagir avec la muqueuse modèle et les protéines salivaires. Enfin, d'autres molécules ont été choisies pour leur persistance, qui a déjà été démontrée dans la littérature.

Les molécules utilisées pour l'analyse de la libération dynamique sont surlignées en bleu.

Des solutions mères ayant une concentration en dessous du seuil de solubilité des molécules ont été préparées par pesée dans de l'eau distillée et conservées au réfrigérateur.

2.3. EVALUATION DE LA TOXICITE DES MOLECULES D'AROME

Des cellules TR146/MUC1 à confluence dans une plaque 96 puits ont été incubées avec des solutions d'arômes à 10⁻⁴ M dans du PBS pour tous les composés, sauf le gaïacol pour lequel la concentration était de 10⁻³ M, pendant 1 h. Chaque molécule a été testée deux fois. La toxicité des molécules a été évaluée à l'aide du test fluorimétrique développé par Rat *et al.* (1994) (Rat, Korwin-Zmijowska et al. 1994). Un taux de survie de 80% des cellules par rapport aux cellules non traitées a été considéré comme indicateur de non-toxicité de la molécule à la concentration testée.

2.4. EVALUATION DE LA QUANTITE D'EAU RETENUE PAR LES CELLULES

Après rinçage au PBS, la surface des cellules reste recouverte par un mince film de PBS résiduel. Afin d'évaluer le volume de liquide retenu en surface des cellules, cinq flacons contenant l'épithélium modèle ont été pesés après rinçage avec la solution de PBS. Les flacons ont ensuite été laissés à évaporer 30 minutes à température ambiante puis pesés à nouveau. La quantité d'eau retenue par les cellules a été estimée par la différence entre les deux pesées et a été évaluée à 24,9 \pm 5,6 mg. Afin de prendre en compte cette hydratation de la surface de la muqueuse dans nos mesures, 25 µl de PBS ont été ajouté dans les flacons contrôles. Ces flacons contrôles sont nommés contrôles hydratés (CH) par la suite.

2.5. ANALYSES A L'EQUILIBRE THERMODYNAMIQUE PAR ANALYSE DE L'ESPACE DE TETE STATIQUE PAR GC-FID

2.5.1. Préparation des échantillons

L'effet de l'épithélium modèle avec ou sans pellicule mucosale (« Cellules + pellicule » ou « Cellules») a été évalué. Deux conditions contrôles ont été testées : un contrôle sec (CS), qui est un flacon en verre de 10 ml vide, et un contrôle hydraté (CH) qui consiste en un flacon de 10 ml contenant un volume 25 µl de PBS égal à la quantité de tampon retenue par les cellules après rinçage.

Des solutions d'arôme à une concentration finale de 10⁻⁴ M ont été préparées à partir des solutions mères. Pour le gaïacol, une concentration de 10⁻³ M a été utilisée, la molécule n'étant pas détectée à 10⁻⁴M. Le pH des solutions a été ajusté à 7,4. Afin d'éviter toute compétition entre composés d'arôme, chacun d'entre eux a été testé individuellement.

Trois cent μ l de solution d'arôme à 10⁻⁴ M ont été placés dans les flacons qui ont été fermés hermétiquement avec des bouchons magnétiques avec septum en silicone (Supelco, Bellefont, PA,

115

CHAPITRE 2

USA).

Afin d'évaluer l'effet de la salive clarifiée diluée sur les coefficients de partage des molécules d'arômes, deux conditions ont été testées : une condition contrôle et une condition salive clarifiée diluée. Les flacons contrôles ont été préparés en mélangeant 150 μ l de PBS et 150 μ l de solution d'arôme à 2.10⁻⁴ M, soit une concentration finale d'arôme de 10⁻⁴ M dans du tampon. Cent cinquante μ l de solution d'arôme à 2.10⁻⁴ M ont été ajoutés à 150 μ l de salive clarifiée pour la condition « salive clarifiée diluée », soit une concentration finale d'arôme de 10⁻⁴ M dans de la salive clarifiée diluée au $\frac{1}{2}$.

2.5.2. Principe du système

La chromatographie en phase gazeuse est couramment utilisée pour l'analyse des arômes qui sont des composés facilement vaporisables. L'échantillon prélevé est vaporisé au niveau de l'injecteur. Il existe deux modes d'injection : split, où seulement une fraction du volume prélevé est injectée dans la colonne et splitless, où la totalité de l'échantillon est injectée. Le mode splitless est le mode le plus adapté à l'analyse de solutions diluées, ainsi qu'aux analyses quantitatives. Les composés vaporisés sont entrainés à travers la colonne capillaire par un gaz vecteur, hélium ou hydrogène, et sont séparés en fonction de leur affinité pour la phase stationnaire. Lors de l'utilisation d'un détecteur à ionisation de flamme (FID), en sortie de colonne, le gaz effluant traverse une flamme air-hydrogène où la combustion des composés organiques forme des ions et des particules chargées. Ceux-ci sont à l'origine du passage d'un courant ionique entre deux électrodes. Un électromètre assure ensuite l'amplification du signal en une tension mesurable, dont l'intensité est proportionnelle à la masse (m) du composé traversant le détecteur.

2.5.3. Conditions expérimentales de l'étude

Les flacons ont été placés dans l'incubateur d'un sampler automatique (GERSTEL MPS 2, Gerstel Inc., Mülheim an der Ruhr, Germany) et incubés à 37°C pendant 40 minutes. Une étude préliminaire a confirmé que l'équilibre thermodynamique était atteint après cette durée d'incubation dans la condition contrôle.

Cent µl de l'espace de tête ont été prélevés automatiquement à l'aide d'une seringue pour gaz préchauffée (Gerstel) à 42°C et analysés en mode splitless par chromatographie gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme (GC-FID) (Agilent 7890B; Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA).

116

Un liner de 250 µl a été utilisé pour analyse de l'espace de tête. La température de l'injecteur a été réglée à 240°C et celle du détecteur FID à 250°C. Une colonne capillaire DB-Wax (30 m, 0.32 mm i.d., 0.5 µm; Agilent Technologies) a été utilisée avec pour gaz vecteur de l'hélium à une vélocité de 21 cm/s. Pour chaque composé, la température du four a été fixée de façon à avoir un temps de rétention du composé entre 2 et 4 minutes. Les températures sont données dans le Tableau 11. Chaque condition a été testée trois fois pour chacune des molécules étudiées. Les échantillons ont été analysés dans un ordre aléatoire.

2.5.4. Calcul des coefficients de partage

Des courbes de calibration ont été réalisées pour les six cétones méthylées en utilisant le GC-FID décrit dans le paragraphe précédent. Des injections liquides de 1µl d'arômes concentrés à 10⁻⁵ M à 2.10⁻⁴ M dans du dichlorométhane ont été réalisées en utilisant un liner droit split/splitless. La température du four débute à 40°C et augmente jusqu'à 130°C à un taux de 5°C/minute.

Les concentrations de chaque molécule dans l'espace de tête ont été déterminées à partir des courbes. Le coefficient de partage air/liquide de chaque molécule i dans la condition c, Kic, a été calculé.

2.6. ANALYSE DE LA DEGRADATION DES MOLECULES D'AROME PAR ANALYSES GC-MS

Les organismes ont la capacité de métaboliser de nombreux composés ; ainsi l'utilisation de matériel biologique nécessite de prendre en compte une éventuelle conversion des molécules étudiées par des enzymes cellulaires et/ou salivaires en de nouveaux composés. La formation de nouveaux composés nécessite de déterminer leur identité afin de mieux comprendre le mécanisme ou la réaction enzymatique impliquée.

2.6.1. Préparation des échantillons

Seules les molécules pour lesquelles un effet de la muqueuse par rapport aux conditions témoins a été observé ont été testées. Pour chacune des molécules affectées par la présence du modèle de muqueuse, cinq flacons contenant la muqueuse modèle ont été incubés durant 40 minutes avec 300 µl de solution d'arôme. Après incubation, les surnageants ont été mis en commun puis extraits avec 750 µl de dichlorométhane. Le même volume (1,5 ml) de solution d'arôme non exposée aux cellules a été extrait avec 750 µl de dichlorométhane. Un µl de chaque extrait a été analysé par GC-MS.

CHAPITRE 2

2.6.2. Principe du système

Les composés sont injectés, puis séparés par chromatographie en phase gazeuse. En sortie de colonne un spectromètre de masse (MS) mesure le ratio m/z des molécules éluées au cours du temps. Une source d'ionisation par impact électronique (IE) a été utilisée. La molécule M est irradiée par un faisceau d'électrons pour former l'ion moléculaire M+• selon la réaction suivante : M + e⁻ \rightarrow M+• + 2 e⁻. L'ionisation par impact électronique donne lieu à une fragmentation des molécules et produit des ions fragments de masses inferieures. Les fragments générés sont séparés par l'analyseur selon leur rapport m/z. Le pattern de fragmentation étant typique de la molécule fragmentée, le spectre de masse des ions fragment apporte donc des informations structurales sur l'ion précurseur. Chaque molécule possède un indice de rétention et un spectre IE-MS caractéristique permettant leur identification.

2.6.3. Conditions expérimentales de l'étude

Un système Agilent 5975 a été utilisé. La température de l'injecteur a été réglée à 240°C. Une colonne capillaire B-wax (30 m, 0.32 mm i.d., 0.5 μ m; Agilent Technologies) a été utilisée. De l'hélium à la vélocité de 44 cm/sec a été utilisé comme gaz vecteur. La température initiale du four est réglée et maintenue à 40°C pendant 5 minutes puis augmente jusqu'à 240°C à un taux de 5°C/minute.

2.7. ANALYSE DYNAMIQUE DE LA LIBERATION PAR PTR-TOF-MS

2.7.1. Principe du système

La spectrométrie de masse à ionisation par transfert de proton (PTR-MS) est une technique permettant exclusivement la détection de composés volatils organiques. Le principe du PTR est l'ionisation chimique d'une molécule M en phase gazeuse par le transfert de proton d'un ion donneur vers cette molécule selon l'équation :

$H_30^+ + M \rightarrow MH^+ + H_20$

Selon le second principe de la thermodynamique, cette réaction est spontanée, sous réserve que l'affinité du proton soit plus importante pour la molécule cible que pour l'ion donneur, c'est à dire que l'enthalpie libre de la réaction soit négative. Classiquement, H₃O⁺ est utilisé comme ion réactant. En effet une grande majorité des composés organiques possèdent une affinité pour le proton plus importante que H₂O (Blake, Monks et al. 2009), contrairement aux composés inorganiques de l'air. Ainsi, les composés de l'air ne perturbent pas la réaction. De plus, l'excès d'énergie produit par la

réaction d'ionisation est en général relativement faible, ce qui évite la fragmentation des molécules ionisées.

Un analyseur de type Time of Flight (ToF) est un analyseur à haute résolution, dans lequel les ions sont d'abord accélérés par une différence de potentiel puis séparés en fonction de leur vitesse de déplacement dans une zone de champ libre, ou drift-tube, qui dépend de leur rapport m/z. Plus le rapport m/z d'un ion est important et plus celui-ci met de temps à atteindre le détecteur. Lors de l'accélération, les ions de même rapport m/z acquièrent la même énergie cinétique. Les analyseurs de type ToF offrent une meilleure précision et résolution que ceux de type quadripôle (résolution unitaire). Il permet de différencier les molécules isobares jusqu'à 2 ou 3 chiffres après la virgule en fonction de sa résolution (Hansel, Jordan et al. 1995), ce qui s'avère intéressant pour l'étude de mélanges aromatiques complexes. Il ne permet cependant pas la séparation de molécules isomères. La transmission des analyseurs de type ToF étant plus efficace pour les composés de faibles poids moléculaires, son utilisation est donc particulièrement adaptée à l'analyse des molécules d'arômes.

De par les caractéristiques décrites précédemment, le système PTR-ToF-MS est conçu pour l'analyse de composés volatils organiques. Il permet, contrairement à la chromatographie gazeuse, un suivi en temps réel des composés. Il présente aussi l'avantage d'être sensible et permet la détection de composés volatils dans des concentrations de l'ordre du ppbv. Le système utilisé dans cette étude est celui décrit par Jordan et *al.* (2009) (Jordan, Haidacher et al. 2009).

2.7.2. Paramètres expérimentaux de l'étude

Un PTR-ToF-MS (PTR-ToF-MS 8000, Ionicon Analytik, Innsbruck, Austria) a été utilisé avec une vitesse de balayage de 108 ms pour une gamme de masse allant de 0 à 250. La calibration de la masse a été réalisée en suivant les ions m/z = 21,022086 [H₃¹⁸O⁺], m/z = 39,03265 [H₂O¹⁸OH₃⁺] et m/z = 59,042141 [acétone].

 H_30^+ a été utilisé comme ion réactant. Les analyses ont été menées à une pression du drift tube de 2,3 mbar, une température de 80°C et un voltage 490 V et un ratio E/N de 110 Td. Le débit d'air à l'entrée du système a été fixé à 100 ml/min.

Le bruit de fond a été soustrait en utilisant les 60 premières secondes d'acquisition. Les courbes de calibration n'ont pas été réalisées, de ce fait, les données sont exprimées en unités arbitraires.

2.7.3. Dispositif

Un bouchon en aluminium avec trois entrées/sorties contenant un septum en silicone adapté à nos flacons en verre a été usiné au laboratoire. Le montage utilisé pour les analyses est représenté

119

en Figure 28. Une entrée du flacon a été connectée à un sac Tedlar® contenant de l'air humide. La deuxième entrée du bouchon a été connectée au PTR. Les injections d'arôme ont été effectuées par la troisième entrée. Un système comprenant 2 vannes trois voies automatisées a été utilisé. Ce système comporte deux circuits : un circuit dit « direct» où l'air du sac est directement injecté dans le PTR, et un circuit dit « indirect» où l'air du sac traverse l'espace de tête du flacon et l'entraine vers le PTR.



Figure 28 : Schéma du montage PTR-ToF-MS utilisé dans l'étude.

Le protocole d'injection et de bACulement des vannes est schématisé en Figure 29. L'injection de l'échantillon dans le flacon à t0 a initié le début de la procédure. L'acquisition des données a été lancée après 60s (t0 + 60s). Après 120s (t0 + 120s), le circuit a été bACulé en circuit indirect et l'acquisition a duré au total 360s (t0 + 480s).

CHAPITRE 2

t0	60s	120s	480s
Circuit direct		Circuit indirect	
Injection			
arôme			
	Début de	Ouverture	Fin de
	l'acquisition	circuit indirect	l'acquisition

Figure 29 : Protocole d'injection et de basculement des circuits connectés au PTR-ToF-MS.

2.7.4. Protocoles expérimentaux

Le modèle cellulaire, placé dans le montage décrit précédemment, a été exposé à des molécules d'arôme soit sous forme de gaz aromatisé, soit sous forme de solution aqueuse aromatisée.

2.7.4.1. Exposition à un échantillon aromatisé gazeux

Un premier protocole a consisté à utiliser des échantillons aromatisés gazeux. L'introduction de molécules d'arôme sous forme gazeuse a déjà été utilisée lors d'études *in vivo* étudiant les interactions des composés d'arôme avec la muqueuse orale (Déléris, Saint-Eve et al. 2015, Deleris, Saint-Eve et al. 2016, Sanchez-Lopez, Ziere et al. 2016).

Des solutions d'arôme ont été préparées dans de l'eau distillée et placées dans des flacons en verre fermés par des bouchons hermétiques avec septum en silicone. Les concentrations des solutions sont données dans le Tableau 12 (2). Elles ont été choisies de façon à obtenir une concentration théorique du gaz se situant dans l'espace de tête du flacon de 10⁻⁶ M (3) calculée à partir du coefficient de partage théorique de la molécule à température ambiante calculé avec le logiciel Episuit (1).

Cinq cent µl de gaz aromatisé ont été injectés manuellement à l'aide une seringue à gaz de 1000 µl. Pour chaque condition et chacune des molécules d'arôme, l'injection a été répétée 3 fois.

Molécules	K théorique 25°C (1)	Concentration solution	Concentration gaz		
	(Episuit)	aqueuse (2)	aromatisé (3)		
Pentan-2-one	3,37.10 ⁻³	3,0.10 ⁻⁴ M	10 ⁻⁶ M		
Octan-2-one	7,68.10-3	1,3.10 ⁻⁴ M	10 ⁻⁶ M		

Tableau 12 : K théoriques et concentrations de solutions d'arômes utilisées pour les injections sous forme de gaz aromatisé.

2.7.4.2. Exposition à un échantillon aqueux aromatisé

Un second protocole a été réalisé, consistant cette fois ci à exposer le modèle cellulaire à des solutions aqueuses d'arôme.

Des solutions mères d'arôme ont été préparées par pesée dans de l'eau distillée à une concentration inférieure à la limite de solubilité des composés d'arôme. Des solutions filles individuelles concentrées à 10⁻⁵ M ont été préparées dans du PBS.

Trois cent µl de solution d'arôme à 10⁻⁵ M ont été ajoutés dans les flacons. La concentration a été choisie de manière à ne pas être en limite de saturation du détecteur. Pour chaque condition et chacune des molécules, l'injection a été répétée 3 fois.

2.7.5. Acquisition et traitement des spectres

Les données ont été extraites et traitées avec le logiciel IgorPro 6.36 (Igor Pro Wavemetrics, USA).

2.7.5.1. Cinétique de libération

L'abondance relative de l'ion m/z a été extraite à partir des spectres de masse acquis à une fréquence de 9,26 spectres/s (1 spectre toutes les 108 ms). Les valeurs de m/z des composés étudiés ainsi que les bornes utilisées pour l'intégration des aires sous pic sont données dans le Tableau 13. Les bornes ont été ajustées manuellement à partir des spectres moyens de chaque composé.

Tableau 13 : Suivi et d'analyse des ions moléculaires par PTR-MS.

Composé	Formule brute ion moléculaire	m/z	Borne d'intégration 1	Borne d'intégration 2
	ion moleculaire			

Pentan-2-one	$(C_5H_{10}O)H^+$	87,14	87,00	87,20
Octan-2-one	$(C_8H_{16}O)H^+$	129,22	128,96	129,33

Les valeurs des aires extraites ont ensuite été corrigées en fonction des courbes de transmission des ions et normalisées par la concentration en ions réactants au cours du temps puis multipliées par 10⁶ en accord avec la nomenclature internationale. Les courbes obtenues permettent le suivi de la libération de la molécule d'arôme cible au cours du temps, comme illustré sur la Figure 30.



Figure 30 : Suivi et obtention des courbes de libération de l'ion m/z.

A partir des courbes de libération, les courbes des aires cumulées sous la courbe en fonction du temps ont été tracées (Figure 31). La valeur du cumul total des aires correspond à la quantité totale d'arôme libérée en 180 secondes d'acquisition.



Figure 31 : Courbe des aires cumulées.

2.7.5.2. Paramètres étudiés

La persistance aromatique pourrait être la conséquence d'une rétention des molécules d'arôme par la muqueuse orale. Partant de l'hypothèse que cette rétention influence la libération des molécules d'arôme, nous nous sommes donc intéressés à différents paramètres de libération.

Les paramètres extraits sont illustrés sur la Figure 32.

- L'intensité maximale de libération des composés étudié a été extraite à partir des courbes de libération.
- L'aire totale sous la courbe qui correspond à la **quantité totale d'arôme libéré** à différents instants t a été nommée AC(t). Elle a été déterminée à partir des courbes cumulées.
- La vitesse moyenne de libération V du composé durant la période t₁-t₂ correspond à la pente entre deux instants t1 et t2 sur les courbes d'aires cumulés. Elle a été calculée selon l'équation :

$$V(t2-t1) = \frac{(ASCt2 - ASCt1)}{t2 - t1}$$

Il est donc possible de déduire une variation de vitesse moyenne de libération des composés à partir des aires sous la courbe des aires cumulées. Ainsi, par la suite, on assimilera une différence d'AC entre deux conditions à une différence au niveau de la vitesse moyenne de libération du composé. La vitesse instantanée de libération correspond, quant à elle, à la dérivée de la courbe des aires cumulées. Graphiquement, elle correspond à la tangente en chacun des points de la courbe.



Figure 32 : Paramètres extraits des courbes de libération (gauche) et de la courbe des aires cumulées (droite).

2.7.6. Evaluation de la métabolisation des composés par la muqueuse modèle

La production d'éventuels métabolites issus de la métabolisation des molécules d'arôme a pu être suivie à l'aide des spectres de masse enregistrés. Parmi les potentiels métabolites formés, les ions correspondant aux alcools associés à la réduction des cétones étudiées (pentan-2-one et octan-2-one), à savoir le pentan-2-ol (M= 88,15 g/mol) et l'octan-2-ol (M= 130,23 g/mol), ont été suivis. Il est important de noter que le rapport m/z correspondant aux alcools protonés (MH+) issus de la réduction des cétones étudiées est égal à au rapport m/z de l'isotope M+2 de ces dernières.

Rappel:

Les éléments chimiques sont présents dans la nature sous forme d'un mélange d'isotopes. Par exemple, le carbone possède deux isotopes naturels, ¹²C et ¹³C dont l'abondance relative est respectivement 98,89% et 1,107%. La spectrométrie de masse séparant les ions en fonction de leur rapport m/z, une même molécule apparaît donc sous la forme d'un massif de pics correspondant à ses différents isotopes, et appelé massif isotopique. La distance entre les différents pics correspond à une valeur de m/z égale à la masse d'un neutron divisé par le nombre de charge de l'ion (soit environ 1/z). L'octan-2-one, qui présente 8 atomes de carbones, a environ 8 % de ses molécules qui possèdent un carbone ¹³C.

Le pic de l'ion $(M + 2)^+$ peut être dû à la présence de deux ¹³C, d'un ¹³C et un ²H, isotope naturel de l'hydrogène dont l'abondance relative est de 0,015 %, ou d'un ¹⁸O, isotope naturel de l'oxygène d'abondance relative 0,2 %, sur la molécule.

L'abondance relative (AR) théorique des isotopes M+1 et M+2 pour une molécule contenant les atomes C, H et O peut être calculée à l'aide la formule suivante (Sperkman 2010) :

AR(M + 1) = 1,1% * nC + 0,015% * nH

 $AR(M + 2) = 0,006\% x nC^{2} + 0,2\% * nO + 1,1\% x nC * 0,015\% x nH$

Avec nC = nombre d'atomes de carbone, nH = nombre d'atomes d'hydrogène et nO = nombre d'atomes d'oxygène de la molécule.

Ainsi pour chacune des cétones étudiées, l'abondance relative des ions au cours du temps a été suivi pour l'ion moléculaire et les isotopes M+1 et M+2. L'abondance relative de ces isotopes a été comparée à leur abondance théorique. Le massif isotopique théorique de chaque cétone a été simulé à l'aide du logiciel mMass (Strohalm, Hassman et al. 2008) et a été comparé au spectre moyen acquis durant les analyses de la condition témoin « Contrôle Hydraté » (CH) et de la condition « Cellules ».

Tableau 14 : Bornes d'intégrations utilisées pour l'extraction des données de libération de l'octan-2-one et des isotopes M + 1 et M + 2.

Pentan-2-one		Octan	Octan-2-one			
Ion suivi	m/z	Ion suivi	m/z			
$M + = (C_5 H_8 O) H +$	87,14	$M + = (C_8 H_{16} O) H +$	129,22			
(M + 1)+	88,14	(M + 1)+	130,22			
(M + 2)+	89,14	(M + 2)+	131,22			

2.8. ANALYSES STATISTIQUES

Les valeurs de coefficients de partage ont été soumises à un test de Kruskal-Wallis associé à une comparaison multiple par paires de Conovan-Iman (p< 0,05) à l'aide du logiciel XLSTAT.

Pour l'étude par PTR-MS, les paramètres extraits des deux conditions contrôles ont été soumis à des tests non paramétriques de Mann-Whitney (p< 0,05). Les paramètres extraits du CH et des conditions « Cellules » et « Cellules + pellicules » ont été soumis à un test de Kruskal-Wallis associés à une comparaison multiple par paires de Conovan-Iman (p< 0,05).

3. RESULTATS

3.1. EVALUATION DE LA TOXICITE DES MOLECULES D'AROME

Cette étude a pour but d'étudier le rôle de la muqueuse orale dans la libération des molécules d'arôme. Les molécules d'arôme étudiées ont été mises en présence du modèle de muqueuse orale développé dans la partie 1, afin de s'assurer qu'elles n'étaient pas toxiques pour les cellules du modèle.



Figure 33 : Evaluation de la viabilité des cellules exposée 1 h à une solution d'arôme préparée dans du PBS.

La Figure 33 présente le pourcentage de viabilité des cellules en fonction de la molécule d'arôme étudiée à une concentration de 10⁻⁴ M et de 10⁻³ M pour le gaïacol. Il apparaît qu'aucune des molécules testées n'est toxique pour les cellules.

3.2. ETUDE IN VITRO DES INTERACTIONS ENTRE MUQUEUSE ORALE ET MOLECULES D'AROME

3.2.1. Effet de la muqueuse orale et de la salive sur les coefficients de partage des molécules d'arôme

3.2.1.1. Série des cétones méthylées

Afin d'étudier l'effet du modèle de muqueuse sur la libération des molécules d'arôme, des expériences de détermination des coefficients de partage à l'équilibre ont été réalisées. Les coefficients de partage sont définis comme le ratio de la concentration de l'espace de tête et de la concentration initiale de la solution. Pour chaque molécule et pour chaque condition, l'analyse par GC-FID a permis de déterminer la concentration des molécules dans l'espace de tête à l'aide des courbes de calibration préalablement établies. Les coefficients de partage obtenus pour les conditions « Contrôle Sec », « Contrôle Hydraté », « Cellules » et « Cellules + pellicule » sont représentés sur la Figure 34.



Figure 34 : Coefficients de partage des cétones en présence de l'épithélium modèle avec et sans pellicule mucosale.

CHAPITRE 2

• Contrôle Sec vs Contrôle Hydraté

Une différence significative entre les valeurs des coefficients de partage du CS et du CH a pu être observée pour la pentan-2-one, l'hexan-2-one et l'octan-2-one. Le coefficient de partage de l'heptan-2-one dans le CH est aussi inférieur à celui du CS bien que la différence ne soit pas statistiquement significative. Il n'a pas été observé de différence significative au niveau des coefficients de partage entre les conditions CS et CH pour les arômes les plus hydrophobes, la nonan-2-one et la decan-2-one, même si la même tendance est observée. Ces observations nous ont mené à la conclusion que l'hydratation de la muqueuse doit être prise en considération pour l'étude de l'effet du modèle de muqueuse orale et que le contrôle hydraté est le plus adapté.

• Effet de la muqueuse sur le coefficient de partage des cétones méthylées linéaires

La comparaison des coefficients de partage CH vs « Cellule » ou « Cellule + pellicule » n'a pas mis en évidence de différence pour la pentan-2-one, de l'hexan-2-one, de l'heptan-2-one et de la octan-2one. Par contre, la présence de la muqueuse modèle influe significativement sur les coefficients de partage de la nonan-2-one et de la decan-2-one. Il a été observé une diminution de respectivement 16 % et 37 % des coefficients de partage de ces deux composés en présence des cellules, avec ou sans pellicule salivaire.

Un effet de la pellicule salivaire a été observé uniquement sur le coefficient de partage de la pentan-2-one, pour laquelle le coefficient de partage en présence de la muqueuse modèle avec pellicule salivaire est supérieur à celui de la muqueuse sans pellicule salivaire.

• Effet de la salive clarifiée diluée sur le coefficient de partage des cétones méthylées linéaires

En l'absence d'effet de la pellicule sur la libération des molécules d'arôme, l'effet de rétention de la salive clarifiée diluée sur les molécules d'arôme a été testé pour la nonan-2-one et la decan-2-one, qui sont les deux molécules les plus susceptibles de se lier aux protéines salivaires du fait de leur hydrophobie (Pages-Helary, Andriot et al. 2014).



Figure 35 : Effet de la salive clarifiée diluée au demi sur le coefficient de partage de la nonan-2-one et de la decan-2-one.

La Figure 35 montre les coefficients de partage de la nonan-2-one et de la decan-2-one en présence de tampon et de salive clarifiée. Il n'y a pas de différence entre les 2 conditions indiquant que la salive clarifiée diluée au ½ n'impacte pas les coefficients de partage de ces molécules.

3.2.1.2. Autres molécules d'arôme

L'effet de la muqueuse modèle a également été testé sur d'autres molécules : hexan-3-one, octan-3-one, pentan-2,3-dione, linalol, gaïacol, hexanoate d'éthyle et trans-2-hexenal. La pyrazine et la 2,3-diméthylpyrazine ont également été étudiées. Ces deux molécules sont très hydrophiles et peu volatiles. Dans nos conditions expérimentales et à la concentration étudiée, il n 'a pas été possible de quantifier ces deux molécules dans l'espace de tête.

Les résultats sont présentés en normalisant la quantité d'arôme libérée en présence du modèle de muqueuse orale par rapport à la condition CH pour les conditions « Cellules » ou « Cellules + pellicule », et par rapport au « tampon » pour la condition « salive clarifiée diluée » (Figure 36).

Une diminution significative des coefficients de partage de la pentan-2,3-dione, la trans-2hexen-1-al et de l'hexanoate d'éthyle (-83 %, -69% et -16%) a été observée en présence de la muqueuse modèle, avec et sans pellicule mucosale. Il n'a été observé aucun effet de la salive clarifiée diluée.

CHAPITRE 2



Figure 36 : K normalisés (par rapport à la condition contrôle hydraté pour les conditions « Cellules » ou « Cellules + pellicule », et par rapport au « tampon » pour la condition « salive clarifiée diluée ») de différentes molécules d'arôme.

3.2.2. Mécanisme à l'origine de l'effet de la muqueuse modèle sur le coefficient de partage des molécules d'arôme

Plusieurs mécanismes peuvent être à l'origine des effets observés de la muqueuse sur la libération des molécules d'arôme. Ainsi les hypothèses suivantes ont été formulées:

- Des interactions non-covalentes de type effet hydrophobe entre les cellules et les molécules d'arôme affectent la concentration de molécules d'arôme libres en solution et par conséquence la concentration de molécules d'arôme en phase gazeuse.
- Des réactions enzymatiques sont à l'origine d'une dégradation des molécules d'arôme présentes en solution entrainant une diminution de la concentration de molécules d'arôme libres en solution et par conséquence de la concentration de molécules d'arôme en phase gazeuse.

Afin de tester la première hypothèse, le rapport des coefficients de partage K_{i,c}/ K_{i,CH} a été exprimé en fonction de l'hydrophobie des molécules (Figure 37). Une corrélation négative

(respectivement $R^2 = 0.89$ et $R^2 = 0.93$ pour la condition « Cellules » et la condition « Cellules + pellicule ») est observée entre ces deux paramètres pour la série des cétones linéaires méthylées. Cela suggère que des effets hydrophobes seraient à l'origine d'un effet de rétention de la muqueuse orale les molécules d'arôme modifiant leur concentration en phase gazeuse.



Figure 37 : K en présence de la muqueuse modèle normalisés par K_{CH} et exprimés en fonction de l'hydrophobie des molécules

Par contre si l'on considère l'ensemble des molécules testées, il n'y a pas de corrélation entre le rapport des coefficients de partage K_{i,c}/ K_{i,CH} et l'hydrophobie des molécules, suggérant que l'hydrophobie des molécules n'influe pas sur leur comportement par rapport au modèle de muqueuse. On constate que deux molécules (la pentan-2,3-dione logP=-0,85 et le trans-2-hexenal logP=1,58) sont particulièrement affectées par la présence des cellules de notre modèle. Ce comportement singulier suggère l'existence d'un autre mécanisme affectant la libération des molécules d'arôme en phase gazeuse et nous a amenés à considérer la seconde hypothèse énoncée ci-dessus.

3.2.3. Dégradation des molécules d'arôme par la muqueuse modèle

Afin de tester l'hypothèse d'une dégradation enzymatique, les molécules pour lesquelles un effet significatif de la muqueuse a été observé ont été testées, soit la nonan-2-one, la decan-2-one, la

pentan-2,3-dione, la trans-2-hexen-1-al et l'hexanoate d'ethyle. Les molécules ont été incubées individuellement avec les cellules dans les mêmes conditions que précédemment. Les surnageants ont ensuite été extraits au dichlorométhane et analysés par GC-MS. Les spectres ont été comparés à des solutions de molécules d'arôme pures diluées dans du dichlorométhane.

L'exemple de l'analyse de la nonan-2-one est présenté ici.



Figure 38 : A. Chromatogramme GC-MS de la nonan-2-one pure ; B. Chromatogramme de l'extrait obtenu à partir du surnageant après incubation des cellules par la nonan-2-one.



Figure 39 : A. Spectres de fragmentation du composé produit ; B. Spectre de fragmentation de la nonan-2-ol.

Sur la Figure 38A est présenté le chromatogramme GC-MS obtenu lors de l'analyse de la nonan-2-one pure. Un pic est présent à environ 13 min et correspond à la nonan-2-one. Une solution aqueuse de nonan-2-one a été incubée en présence des cellules puis extraite à l'aide de dichlorométhane. Le chromatogramme obtenu après injection de l'extrait est présenté en Figure 38B. Sur ce second chromatogramme, la molécule éluée à 13 min peut être identifiée comme la nonan-2-one. On remarque la présence d'un second pic à 16,5 min, indiquant la production d'un nouveau composé en présence des cellules. Ce second pic n'a pas été observé après incubation dans la solution tampon. Le spectre de fragmentation MS du composé produit est présenté sur la Figure 39A. Ce spectre a été comparé avec ceux de la base de données interne du laboratoire (INRAMASS). La présence de fragments de rapports m/z = 45, m/z = 69 et m/z = 98 ainsi que leurs abondances respectives ont permis d'identifier le composé comme étant la nonan-2-ol, dont le spectre de fragmentation est donné en Figure 39B.

La démarche décrite ci-dessus a été réalisée pour chacun des composés pour lesquels il a été observé un effet de la muqueuse modèle sur le coefficient de partage des molécules.

Pour chacun des composés, il a été observé la présence d'au moins deux pics sur les chromatogrammes issus des extractions des solutions incubées en présence de cellules, traduisant

la production d'un composé par les cellules. Les analyses d'extraits de solution exposées au modèle cellulaire par GC-MS ont permis d'identifier différents produits de dégradation en fonction de la molécule étudiée (Tableau 15), confirmant que ces nouveaux composés sont spécifiques de la molécule considérée. La nonan-2-one et la decan-2-one sont métabolisées en leur alcool correspondant, à savoir respectivement le nonan-2-ol, le decan-2-ol. Il en est de même pour la pentan-2,3-dione, qui est métabolisée en deux produits distincts correspondant à la réduction de chacune des fonctions cétones, la 2-hydroxy-pentan-3-one et la 3-hydroxy-pentan-2-one. L'hexanoate d'éthyle est hydrolysé pour former l'ac

ide hexanoïque et le trans-2-hexenal est oxydé en son acide associé, l'acide hexenoïque. Il est important de souligner le fait que l'observation d'une dégradation enzymatique n'exclut pas l'existence d'interactions non-covalentes entre les molécules étudiées et la muqueuse orale.

Composé produit identifié				
2-nonanol				
2-décanol				
2-hydroxy-pentan-3-one				
+ 3-hydroxy-pentan-2-one				
Acide hexenoïque				
Acide hexanoïque				

Tableau 15: identification des métabolites.

CHAPITRE 2

3.3. ETUDE *IN VITRO* DE LA CINETIQUE DE LIBERATION DES MOLECULES D'AROMES EN PRESENCE DE LA MUQUEUSE ORALE MODELE

En parallèle, des expériences de coefficient de partage à l'équilibre, des expériences de cinétique de libération des molécules d'arôme ont été réalisées à l'aide du PTR-MS. Les molécules d'arôme ont été introduites soit sous la forme d'un gaz aromatisé soit sous forme d'une solution aqueuse aromatisée.

3.3.1. Choix du contrôle et rôle de l'hydratation de la muqueuse

Avant d'étudier la cinétique de libération des molécules d'arôme et l'impact du modèle de muqueuse orale sur cette cinétique, un volume d'air aromatisé ou de liquide aromatisé ont été injectés dans les flacons des flacons vides (Contrôle Sec = CS) et des flacons contenant 25 μ l de PBS (Contrôle Hydraté = CH).

Les courbes de libération et de cumul des aires sous courbe au cours du temps sont présentées pour la pentan-2-one et l'octan-2-one sur les Figures 40 et 41 respectivement pour les deux conditions et les deux méthodes d'introduction. Il est important de souligner que les données ne sont pas calibrées, de ce fait les deux composés ne peuvent pas être comparés quantitativement. Des profils de libération (courbes à gauche) similaires sont observés pour les deux composés, avec un pic de libération dans les premières secondes après ouverture du circuit suivi par une diminution de l'intensité. L'aire cumulée ACt sous la courbe a été extraite à différents temps t (toutes les 5 secondes) pour chacun des contrôles et chacune des molécules. Les données ont été soumises à un test de Mann-Whitney (p< 0,05).

La comparaison des deux méthodes d'introduction montre sur les courbes d'aire cumulée au cours du temps que pour les deux composés, la libération est globalement plus lente lorsque les composés sont injectés sous forme liquide (courbes de droite). Lorsque que les composés sont introduits sous forme gazeuse, on observe une phase de libération rapide avant d'atteindre une phase de plateau. Lorsque les composés sont introduits sous forme liquide, on observe également une première phase de libération rapide, mais moins qu'en condition gazeuse, puis une deuxième phase de libération plus lente mais sans atteindre de plateau au bout de 3 min d'acquisition.



Figure 40 : Courbes de libération (gauche) et de cumul des aires (droite) de la pentan-2-one.



Figure 41 : Courbes de libération (gauche) et de cumul des aires (droite) de l'octan-2-one.

La comparaison des conditions CS vs CH montre de légères variations entre les deux. Afin de discuter de ces différences et de pouvoir comparer les deux molécules entre elles, les valeurs des Aires Cumulée sous la courbe au cours du temps (ACt) du CH ont été normalisées par rapport à celles du CS pour chacune des deux molécules et nommées Aires Cumlées Normalisées au cours du Temps (ACnt). Les valeurs normalisées sont données dans le Tableau 16 pour t = 5, 15, 30, 60, 90, 120 et 150 s, ainsi que l'Imax normalisé. La plupart des valeurs obtenues se situent entre 0,9 et 1,1. Ainsi, la présence d'une fraction aqueuse influe peu sur la libération dynamique des molécules d'arôme. Seule la pentan-2-one lorsqu'elle est injectée sous forme d'une fraction d'air aromatisé semble influencée par la présence de tampon dans le flacon contrôle. On observe alors un Imax plus faible dans le cas du CH. La libération initiale (AC5) est aussi plus faible dans le CH mais cet effet

n'est plus observable après 60 s. L'analyse statistique des valeurs non-normalisées (CS vs CH) indique qu'aucune des différences observées n'est significative (p < 0,05).

Malgré cette absence de différence significative, afin d'éviter tout biais lié à l'hydratation de la muqueuse et dans un souci d'homogénéité des expériences, le CH a été utilisé comme référence.

Tableau 16 : Paramètres moyens de libération des conditions Contrôle Hydraté (CH) normalisés par rapport au Contrôle Sec (CS) – Les données brutes ont été soumises à un test non paramétrique de Mann Whitney (p< 0,05).

	Imax	ACn5	ACn15	ACn30	ACn60	ACn90	ACn120	ACn150
Pentan-2-one	0.00	0.72	0.70	0.00	0.00	1.00	1.00	1.00
(gaz)	0,66	0,73	0,79	0,89	0,99	1,02	1,02	1,02
Octan-2-one								
(gaz)	1,01	0,98	0,92	0,92	0,96	0,98	0,99	1,00
Pentan-2-one								
(liquide)	0,99	0,90	0,91	0,92	0,93	0,93	0,93	0,94
Octan-2-one			1.00		4.0.0			4.05
(liquide)	0,90	0,98	1,00	1,02	1,03	1,05	1,06	1,07

3.3.2. Libération des molécules d'arôme en présence de la muqueuse modèle

3.3.2.1. Exposition de la muqueuse modèle à une fraction d'air aromatisé

Les courbes de libération et de cumul des aires de la pentan-2-one et de l'octan-2-one injectée sous forme de gaz aromatisé pour les conditions CS, « Cellules» et «Cellules + pellicule » sont présentées dans la Figure 42.

Pour les deux composés, on observe des courbes de libération similaires. Un pic correspondant à la libération maximale apparaît dans les premières secondes. Le sommet du pic correspond à l'intensité maximum Imax de libération. Ce pic est suivi d'une phase de décroissance ayant l'allure d'une fonction exponentielle inverse. La quantité d'arôme libérée diminue pour finalement atteindre une valeur proche de 0 indiquant un épuisement du flacon en arôme. La, comparaison des deux molécules montre que le temps pour atteindre Imax est plus court $(2,1\pm 0,2 \text{ s})$ pour la pentan-2-one que pour l'octan-2one $(3,3\pm 0,4 \text{ s})$. En moyenne, 90% de la quantité totale d'arôme libérée au bout de 160 s (0,9*AC160) sont libérés après 49,8± 5,9 s dans le cas de la pentan-2-one tandis que

pour l'octan-2-one, le temps moyen pour libérer 90 % de la quantité finale d'arôme libéré est de 61,8± 2,8 s, indiquant une vitesse de libération plus lente de cette dernière.



Figure 42 : Courbes de libération et courbes des aires cumulées de la pentan-2-one (haut) et de l'octan-2-one (bas) injectées sous forme d'une fraction de gaz aromatisé.

Afin d'évaluer l'influence de la muqueuse sur la cinétique de libération des molécules d'arôme, l'aire cumulée ACt sous la courbe a été extraite à différents temps t (toutes les 5 secondes) et les données été soumises à un test de Kruskal-Wallis (p< 0,05) suivi d'une comparaison multiple par paires suivant la procédure de Conover-Iman. Afin de comparer les deux conditions au CH, les ACt
des conditions « Cellules » et « Cellules + pellicule » ont été normalisées par rapport à l'ACt de la condition CH. Les ratios, appelé ACnt, sont donnés dans le Tableau 17 pour les valeurs de t = 5, 15, 30, 60, 90, 120 et 150 s et pour l'Imax.

Dans le cas de la pentan-2-one, les courbes d'aire cumulée au cours du temps sont relativement similaires pour les 3 conditions (Figure 42). La comparaison des données normalisées montre que ce sont les paramètres liés aux temps de libération court (Imax, ACn5 et ACN 15) qui montrent le plus de différence par rapport au CH (>1,10). Il est en particulier observé un Imax significativement plus important en présence de la muqueuse modèle avec pellicule salivaire par rapport au CH. L'Imax est également significativement différent de la condition « Cellules ».

Aucune différence significative n'a été observée au niveau de la quantité de pentan-2-one libérée entre 0 et 150 s de libération entre les conditions « Cellules » et « Cellules + pellicule » Vs CH ainsi qu'entre les conditions « Cellules » Vs « Cellules ».

Tableau 17 : Paramètres de libération de la pentan-2-one injectée sous forme de gaz aromatisé. Les valeurs de la condition (Cellules ou Cellules + pellicule) sont normalisées par rapport à la condition Contrôle Hydraté. Les valeurs en rose indiquent une différence significative entre le CH et la condition, l'étoile indique une différence significative entre la condition Cellules et la condition Cellules + pellicule pour le paramètre étudié.

	Pentan-2-one							
	Imax	ACn5	ACn15	ACn30	ACn60	ACn90	ACn120	ACn150
Cellules	1,08	1,24	1,18	1,07	0,98	0,95	0,96	0,96
Cellules + pellicule	1,34 *	1,23	1,11	1,03	0,98	0,96	0,95	0,95

Dans le cas de la libération d'octan-2-one (Figure 42), et comme pour la pentan-2-one, le Imax est plus important en présence de la muqueuse modèle et cette différence est significative entre les conditions « Cellules + pellicule » Vs CH et « Cellules + pellicule » Vs « Cellules ».

Concernant la quantité d'arôme libéré au cours du temps, les courbes d'aires cumulées au cours du temps (Figure 42) ont des allures similaires pour les 3 conditions mais montrent des différences d'aires entre les 3 conditions. Il apparaît que la plus grande quantité d'arôme est libérée pour la condition « Cellules ». A l'inverse la quantité d'arôme la plus faible est libérée dans la condition CH. La condition « Cellules + pellicules » montre un comportement intermédiaire. L'analyse de ces différences de libération (Tableau 18) montre que cette différence est significative pour la condition « Cellules » vs CH entre 0 et 120 s, pour la condition « Cellules + pellicule » vs CH à 5 s et entre les conditions « Cellules » vs « Cellules + pellicules » entre 15 et 120 s.

Tableau 18 : Paramètres de libération de l'octan-2-one injectée sous forme de gaz aromatisé. Les valeurs de la condition (Cellules ou Cellules + pellicule) sont normalisées par rapport à la condition Contrôle Hydraté (CH). Les valeurs en rose indiquent une différence significative entre le CH et la condition, l'étoile indique une différence significative entre la condition Cellules et la condition Cellules + pellicule pour le paramètre étudié.

	Octan-2-one								
	Imax	ACn5	ACn15	ACn30	ACn60	ACn90	ACn120	ACn150	
Cellules	1,23	1,21	1,21 *	1,21 *	1,19 *	1,18 *	1,18 *	1,18	
Cellules +	1 29 *	1 1 7	1 1 5	1 1 2	1 1 0	1.09	1.08	1.08	
pellicule	1,29	1,17	1,15	1,12	1,10	1,09	1,00	1,00	

3.3.2.1. Exposition de la muqueuse modèle à une solution aromatisée

Les courbes de libération et de cumul des aires de la pentan-2-one et de l'octan-2-one injectée sous forme de solutions aqueuses aromatisées sont présentées en Figure 43.

Une meilleure répétabilité des analyses est observée par rapport au protocole précédent. Le profil de libération est similaire à celui des injections d'arôme gazeux. Un pic correspondant à la libération maximale (Imax) est observé dans les premières secondes de libération. Le temps pour atteindre le Imax est plus court pour la pentan-2-one ($2,12\pm0,4$ s) que pour l'octan-2one ($3,7\pm0,3$ s).

Après 160 s d'acquisition, il n'y a pas de retour à la ligne de base, ce qui indique que des molécules sont toujours libérées et que l'épuisement en molécules n'est pas atteint. En moyenne, 90% de la quantité totale d'arôme libéré (0,9*AC160) est libéré au bout de 126,8± 1,7 s dans le cas de la pentan-2-one et au bout de 123,1± 3,1 s pour l'octan-2-one. Une libération plus lente des composés est observée que dans le cas d'une injection d'arôme gazeux.



Figure 43 : Courbes de libération et courbes des aires cumulées de la pentan-2-one (haut) et de l'octan-2-one (bas) injectées sous forme d'une solution aqueuse aromatisée.

De la même manière que pour les injections de fraction d'air aromatisé, l'aire cumulée ACt sous la courbe a été extraite à différents temps t (toutes les 5 secondes) pour les trois conditions (CH, « Cellules » et « Cellules + pellicule »). Les données ont été soumises à un test de Kruskal-Wallis (p< 0,05) suivi d'une comparaison multiple par paires suivant la procédure de Conover-Iman. Les ACt des conditions « Cellules » et « Cellules + pellicule » ont été normalisées par rapport à l'ACt de la condition CH. Les ratios, appelé ACnt, sont donnés dans le Tableau 19 pour les valeurs de t = 5, 15, 30, 60, 90, 120 et 150 s.

Les courbes de libération de la pentan-2-one introduit en une solution montrent un Imax significativement supérieur en présence de la muqueuse modèle avec et sans pellicule salivaire par rapport à la condition CH. Les Imax des conditions « Cellules » vs « Cellules + pellicule » ne sont pas significativement différentes.

Pour les deux molécules, les courbes d'aires cumulées (Figure 43) ont des allures similaires pour les 3 conditions. Les courbes se superposent pour les temps de libération courts puis se détachent les unes des autres. Pour les deux molécules, la quantité maximale d'arôme est libérée dans la condition CH. Dans le cas de la pentan-2-one, la plus faible quantité d'arôme est libérée pour la condition « Cellules + pellicule » alors que dans le cas de l'octan-2-one, c'est dans la condition « Cellules » qu'il est le moins libéré de molécules.

Le Tableau 19 montre que dans le cas de la pentan-2-one, la quantité d'arôme libérée devient significativement différente au bout de 60 s (changement significatif dès 40 s) en présence de la muqueuse avec pellicule par rapport au deux autres conditions et au bout de 120 s (changement significatif dès 110 s) en présence de la muqueuse sans pellicule salivaire par rapport au CH. Cela traduit une vitesse de libération moindre de la molécule en présence du modèle.

Tableau 19 : Paramètres de libération de la pentan-2-one injectée sous forme de solution aqueuse aromatisée. Les valeurs de la condition (Cellules ou Cellules + pellicule) sont normalisées par rapport à la condition Contrôle Hydraté (CH). Les paramètres en rose indiquent une différence significative entre le CH et la condition, l'étoile indique une différence significative entre la condition Cellules et la condition Cellules + pellicule pour le paramètre étudié.

	Pentan-2-one								
	Imax	ACn5	ACn15	ACn30	ACn60	ACn90	ACn120	ACn150	
Cellules	1,06	1,06	1,04	1,01	0,98	0,96	0,94	0,93	
Cellules +	1 1 2	1 04	1.00	0.97	093*	0 91 *	0.89 *	0.88 *	
pellicule	1,12	1,04	1,00	0,77	0,20	0,91	0,09	0,00	

Le Tableau 20 illustre l'effet de la muqueuse modèle sur la libération de l'octan-2-one. On constate un effet significatif de la muqueuse après 90 s d'acquisition lorsque celle-ci est dépourvue de pellicule par rapport au CH, et au bout de 115 s avec la pellicule par rapport au CH. Les conditions « Cellules » et « Cellules + pellicule » sont significativement différentes à 90 s. Il est libéré significativement moins d'octan-2-one en présence des cellules seules et des cellules avec la pellicule salivaire.

Tableau 20 : Paramètres de libération de la octan-2-one injectée sous forme de solution aqueuse aromatisée. Les valeurs de la condition (Cellules ou Cellules + pellicule) sont normalisées par rapport à la condition Contrôle Hydraté. Les paramètres en rose indiquent une différence significative entre le CH et la condition, l'étoile indique une différence significative entre la condition Cellules et la condition Cellules + pellicule pour le paramètre étudié.

	Octan-2-one								
	Imax	AC5	AC15	AC30	AC60	AC90	AC120	AC150	
Cellules	1,11	1,05	1,02	0,97	0,91	0,88 *	0,85	0,83	
Cellules + pellicule	1,01	1,08	1,06	1,01	0,95	0,92	0,91	0,90	

3.3.3. Mécanisme à l'origine de l'effet de la muqueuse modèle/ molécules d'arôme

Deux hypothèses ont été énoncées précédemment afin d'expliquer les mécanismes à l'origine des différences de coefficients de partage à l'équilibre des composés en présence de la muqueuse modèle. Ces hypothèses sont toujours effectives pour expliquer des différences dans la cinétique de libération des molécules en présence de la muqueuse.

- Des interactions non-covalentes entre la muqueuse modèle et les molécules d'arôme pourraient être à l'origine d'une quantité totale d'arôme libéré inférieure. Ces interactions influeraient par conséquent sur la vitesse de libération des arômes.
- Une absorption ou métabolisation des composés par les cellules réduirait la concentration en cétones de la solution et par conséquent diminuerait leur vitesse de libération.

Afin de tester ces hypothèses, les ions de rapport m/z correspondant aux métabolites des composés identifiés dans les expériences de coefficient de partage ont été extraits, soit pour les nommer la pentan-2-ol (M= 88,15 g/mol) et l'octan-2-ol (M= 130,23 g/mol)).

Les courbes de cumul des aires sont tracées en Figure 44. Comme nous le montre la courbe, des ions de rapport m/z = 89,14 et m/z = 131,22 sont présents en phase gazeuse lors de l'analyse de la pentan-2-one et de l'octan-2-one. Il n'y a pas de différence de quantité de ces ions entre les deux conditions.

CHAPITRE 2



Figure 44 : Suivi de la libération des ions m/z = 89,14 et m/z = 131,22.

Comme il a été expliqué précédemment (paragraphe 2.7.6), les alcools associés aux deux cétones étudiées ont un rapport m/z égal au rapport m/z de l'isotope M+2 de la cétone. Ainsi, l'ion de rapport m/z détecté peut-être attribuable en partie à la contribution isotopique de l'ion $(M+2)^+$ de l'octan-2-one mais également à l'alcool issu de sa dégradation enzymatique. Les abondances relatives théorique de isotopes M+1 et M+2 des deux molécules étudiées ont été comparées à l'abondance réelle des ions $(M+1)^+$ et $(M+2)^+$ extraits des spectres.

Sur la Figure 45, le spectre théorique de l'octan-2-one, tracé en rouge, est comparé au spectre moyen obtenu dans les conditions CH (témoin) et « Cellules » (respectivement tracés en bleu et rose). Sur le spectre théorique de l'octan-2-one (rouge), 3 pics sont visibles, correspondant à l'octan-2-one (M⁺) et aux ions (M + 1)⁺ et (M + 2)⁺. Pour des raisons pratiques, l'intensité de l'ion M⁺ a été rapportée à une intensité de 100. Les spectres du bas sont un agrandissement en ordonnée des spectres du haut. On remarque que l'ion de rapport m/z = 130,22 présent sur les spectres du CH et de la condition « Cellules » présente une intensité d'environ 9, soit 9 % de l'intensité de l'octan-2-one. Par contre, on constate une abondance supérieure de l'ion m/z = 131,22 sur les spectres du CH et de la condition « Cellules » par rapport au spectre théorique.



Figure 45 : Comparaison du spectre théorique de l'octan-2-one et des spectres moyens obtenus avec le CH (Témoin) ou en présence des cellules.

Ceci est confirmé en quantifiant les abondances relatives des ions $(M+1)^+$ et $(M+2)^+$ (Tableau 21).

En ce qui concerne l'analyse de la pentan-2-one, les abondance relatives des ions m/z = 88,14 et m/z = 89,14 sont supérieures aux abondances relatives théoriques des ions $(M+1)^+$ et $(M+2)^+$, que ce soit dans la condition contrôle ou en présence de cellules.

Tableau 21 : Comparaison des abondances relatives théoriques des isotopes M et M +1 et des abondances réelles mesurées.

Pentan-2-one				Octan-2-one				
Ions	AR isotopique	sotopique AR calculée Ions AR isotopiqu		AR isotopique	AR ca	lculée		
m/z	théorique	СН	Cellules	m/z	théorique	СН	Cellules	
88,14	5,65 %	9,00%	9,35%	130,22	9,04 %	9,50 %	9,61 %	
89,14	0,15%	1,81%	1,85	131,22	0,38 %	1,72 %	1,84 %	

4.1. EFFET DE LA MUQUEUSE MODELE SUR LA LIBERATION DES MOLECULES A L'EQUILIBRE THERMODYNAMIQUE

4.1.1. Observations générales

Les expériences d'analyse de l'espace de tête à l'équilibre ont permis de mesurer les valeurs de K des différentes cétones méthylées, qui ont pu être comparées aux valeurs relevées dans la littérature. Les températures auxquelles les mesures ont été réalisées ainsi que les méthodes utilisées sont décrites dans le Tableau 20. Les valeurs de K ont été représentées en fonction du log P des molécules (Figure 46). Sur la figure, les valeurs obtenues dans cette étude sont représentées par la série « K(PBS) 37°C ».

D'un point de vue théorique, la volatilité des molécules et donc leur coefficient de partage augmente avec la température du système et augmente linéairement avec l'hydrophobie des molécules. Les valeurs de K de notre étude sont en accord avec les valeurs de la littérature pour la pentan-2-one, l'hexan-2-one, l'heptan-2-one, notamment avec l'étude de Van Ruth et al. (2002) (Van Ruth, De Vries et al. 2002) qui ont aussi réalisé leurs mesures à 37 °C. Cependant, on observe un décrochage à partir de l'octan-2-one qui s'amplifie pour les deux molécules les plus hydrophobes.

Ce décrochage des valeurs de K pour les molécules les plus hydrophobes pourrait être dû à nos conditions expérimentales. A 37°C, la concentration utilisée de 10⁻⁴ M ne nous permet pas de nous placer dans un état de dilution infini ; de ce fait, la loi de Henry ne peut s'appliquer. D'autre part, en l'absence d'agitation pendant le temps d'équilibre, il est possible que les molécules les plus hydrophobes, utilisées à une concentration proche de la limite de solubilité dans l'eau, coalescent. Un début de plateau a déjà été observé par Pagès *et al.* (2014) pour la nonan-2-one à 30°C (Pages-Helary, Andriot et al. 2014) à cette même concentration.

	17	Méthode	T.		Dífí
Molecule	К	d'analyse	(°C)	Conditions	References
Hexan-2-one	2,41.10-3				
Heptan-2-one	3,28.10 ⁻³		2000	5 ml de solution aqueuse à	(Pages-Helary,
Octan-2-one	4,42.10-3	SH-GC-FID	30°C	10 ⁻⁴ M + Propylene glycol	Andriot et al.
Nonan-2-one	4,57.10 ⁻³			dans flacon de 20mi	2014)
Pentan-2-one	4.1.10-3				
Hexan-2-one	5.3.10-3			40 ml de solution aqueuse à	
Heptan-2-one	6.2.10-3	SH-GC-FID	30°C	250 ppm dans flacon de	(Nawar 1971)
Octan-2-one	7.3.10-3			125ml	
Nonan-2-one	1,0.10-2				
Heptan-2-one	1,0.10-2			2ml de solution à 0,01ppm	(Van Ruth, De
Octan-2-one	1,3.10-2	SH-GC-FID	37°C	dans eau + tween 20 dans	Vries et al.
Decan-2-one	2,7.10-2			flacon de 20ml	2002)
Pentan-2-one	2,6.10-3	Chromato.			
Heptan-2-one	5,9.10 ⁻³	gazeuse en		100 ml de solution aqueuse	(Buttery Ling
Octan-2-one	7,7.10-3	phase	25°C	C< limite solubilité, dans	(buttery, bing
Nonan-2-one	1 5 10-2	liquide		flacon de 250 ml	et al. 1909)
Nonan-2-one	1,5.10	(GLC)			
Pentan-2-one	2,6.10-3				
Hexan-2-one	3,0.10-3			100 ml de solution aqueuse	(Avison, van
Heptan-2-one	4,0.10-3	APCI-MS	21°C	< 10 mg/m ³ + DMSO dans	Gruijthuijsen et
Octan-2-one	5,2.10 ⁻³			flacon de 250 ml	al. 2015)
Nonan-2-one	6,5.10 ⁻³				

Tableau 22 : Quelques valeurs et conditions expérimentales de mesures de K de cétones



Figure 46: Valeurs de K des cétones linéaires méthylées dans l'eau trouvées dans la littérature exprimées en fonction du log P des molécules (croix) et K des cétones dans le PBS calculés dans cette étude (points)

4.1.2. Effet de l'hydratation de la muqueuse sur le coefficient de partage des molécules

La comparaison des valeurs de K montre une diminution du coefficient de partage de la pentan-2-one, de l'hexan-2-one, de l'heptan-2-one et de l'octan-2-one pour la condition CH vs CS. Cette différence n'est pas observée pour les deux molécules les plus hydrophobes, la nonan-2-one et la decan-2-one. Ceci peut s'expliquer par un effet de dilution d'une fraction des deux solutions d'arômes dans les 25 µl de PBS ajoutés dans le CH, ce qui représente 8,3 % du volume de solution finale. Dans l'hypothèse où les conditions de solubilité à l'infini ne sont pas atteintes pour les molécules les plus hydrophobes, ce volume supplémentaire n'impacte probablement pas de la même manière la quantité totale de molécules hydratées puisqu'une partie a probablement coalescé.

L'hydratation de la surface de la muqueuse modèle influe donc sur le coefficient de partage des molécules et doit être prise en compte comme un paramètre important influant sur la libération des molécules d'arôme. Cela a mené à la conclusion que le CH était le plus adapté.

4.1.3. Effet de la muqueuse orale et la salive clarifiée sur le coefficient de partage des molécules

Les résultats obtenus n'ont pas montré d'effet de la muqueuse modèle sur la libération du gaïacol et du linalol, bien que ces deux composés semblent être fortement retenus dans la cavité orale *in vivo* (Esteban-Fernandez, Rocha-Alcubilla et al. 2016). La surface de la muqueuse modèle utilisée dans ce travail est faible (2,54 cm²), et la concentration des solutions (10⁻³ M et 10⁻⁴ M) plus élevée que celles utilisées dans la littérature (de l'ordre de 10⁻⁵ M). Le nombre de molécules d'arôme par unité de surface est peut-être trop important ce qui provoquerait un effet de « saturation » de la surface. Dans le même temps, la quantité de molécules d'arômes interagissant avec la surface des cellules pourrait être négligeable devant la quantité totale de molécules en solution ne permettant pas de voir un effet sur le nombre de molécules en phase gazeuse.

Il n'a pas été observé d'effet de la salive clarifiée diluée sur le coefficient de partage de ces deux composés, alors que d'autres études ont montré un effet des protéines salivaires sur la libération des molécules d'arôme. Ceci pourrait provenir du fait que lors de la centrifugation de la salive, une partie des mucines est éliminée. Le dosage des protéines totales du pool de salive clarifié a révélé une concentration de 0,6 mg/ml. Dans la littérature, les salives artificielles utilisées contiennent 2,16 mg/ml de mucines (Pages-Helary, Andriot et al. 2014) (van Ruth, Roozen et al. 1995) soit une concentration plus de trois et demi fois supérieure. De ce fait, il n'est pas surprenant de ne pas observer d'effet de rétention de la salive clarifiée et diluée ainsi qu'un rôle spécifique de la pellicule mucosale.

4.1.4. Dégradation des molécules d'arôme en présence de la muqueuse modèle

Une importante diminution de la valeur des coefficients de partage de la nonan-2-one, de la decan-2-one, de pentan-2,3-dione, du trans-2-hexen-1-al et de l'hexanoate d'éthyle a été constatée en présence de la muqueuse modèle par rapport au CH avec et sans pellicule salivaire. L'extraction des composés présents en solution après exposition à la muqueuse modèle a permis de montrer que la diminution des coefficients de partage était due à une métabolisation des molécules d'arôme par les cellules de la lignée TR146/MUC1.

La dégradation des molécules d'arôme par les enzymes de la salive (Buettner 2002, Buettner 2002) (Pages-Helary, Andriot et al. 2014) et par le microbiote oral (Munoz-Gonzalez, Cueva et al. 2015) a été reportée dans la littérature avec notamment des réactions d'oxydation des aldéhydes ou l'hydrolyse des esters. Par contre, il n'a pas été rapporté de conversion enzymatique des cétones. La

dégradation des molécules observée dans la présente étude semble être attribuable à la présence des cellules et non à celle de la salive. Cette observation a été confirmée par les mesures des coefficients de partage réalisées dans les conditions « salive clarifiée diluée », pour lesquels il n'a pas été observé de dégradation des composés.

La capacité des cellules épithéliales à métaboliser les composés organiques volatils a déjà été observée sur des cultures primaires de cellules de la muqueuse nasale humaine, avec la métabolisation de dicétones (diacétyle et pentan-2,3-dione), convertis en 3-hydroxybutanone et 2-hydroxy-3-pentanone respectivement (Zaccone, Goldsmith et al. 2015). Les microsomes et différentes fractions cellulaires obtenues à partir de muqueuses olfactives de rats ont montré une capacité à métaboliser la quinoline (hétérocycle) et la coumarine (lactone) en métabolites oxygénés et l'acétate d'isoamyle (ester) en alcool isoamyllique (Thiebaud, Veloso Da Silva et al. 2013).

Ces réactions sont catalysées par une série d'enzymes regroupées sous l'appellation d'enzymes de métabolisation des xénobiotiques (EMXs). Ces enzymes sont spécialisées dans le catabolisme de composés extrinsèques au métabolisme normal de l'organisme dans le but de faciliter leur élimination par l'organisme (Croom 2012). La métabolisation des xénobiotiques peut être divisée en trois étapes. Dans une première étape, appelée phase I, les composés sont métabolisés par des réactions de natures diverses (epoxydation, hydroxylation, desalkylation, oxydation, réduction, etc.). Les métabolites formés sont généralement plus polaires et disposent alors de sites fonctionnels permettant des réactions de conjugaisons. Les composés les plus lipophiles sont généralement métabolisés en premier. Durant la phase II, des enzymes de conjugaison catalysent la conjugaison des métabolites avec des molécules polaires telles que le glutathion, l'acide glucuronique ou un sulfate. Les métabolites formés sont alors facilement excrétés par transport actif ou passif (Croom 2012).

Il existe une large variété d'EMXs dont plusieurs ont été identifiées dans la métabolisation des composés d'arômes au niveau de la muqueuse olfactive du rat. Ainsi, la réduction des composés α -dicarbonylés est catalysée par la dicarbonyl/L-xylulose réductase (DCXR) (Ebert, Kisiela et al. 2015) (Zaccone, Goldsmith et al. 2015). Le cytochrome P450 a été identifié comme catalyseur des réactions d'hydroxylation de la coumarine et de la quinoline et une carboxyesterase semble être à l'origine de l'hydrolyse de l'acétate d'isoamyle (Thiebaud, Veloso Da Silva et al. 2013).

La muqueuse orale constitue aussi un site préférentiel d'exposition à des composés exogènes potentiellement toxiques. Les ARMm codant pour le cytochrome P450 ont été détectés au niveau des glandes salivaires (Kragelund, Hansen et al. 2008) et de la muqueuse orale humaine (Vondracek, Xi et al. 2001), suggérant une aptitude de celles-ci à métaboliser les xénobiotiques. L'activité de carboxyesterases a déjà été observée au niveau de la cavité orale de rat et souris (Robinson, Bogdanffy et al. 2002).

La réduction des cétones linéaires par la muqueuse orale n'a pas été reportée dans la littérature à notre connaissance. Cependant, cette réaction pourrait être catalysée par le NADH-cytochrome P450 dont l'activité céto-réductase a déjà été reportée (Lehr, Fabian et al. 2015). La corrélation observée avec le log P dans la série des cétones linéaires pourrait s'expliquer par une meilleure perméabilité des cellules pour les molécules les plus hydrophobes (Nielsen and Rassing 2000).

Dans le cas de la pentan-2,3-dione, nous avons observé la réduction des deux fonctions cétones, ce qui suggère que la DCXR n'est pas (ou n'est pas la seule) enzyme responsable de la catalyse, celleci produisant uniquement la 2-hydroxy-3-pentanone (Zaccone, Goldsmith et al. 2015).

Bien qu'il existe une aldéhyde oxydase impliquée dans le métabolisme des xénobiotiques, celleci est présente majoritairement au niveau du foie. Elle a été aussi été détectée au niveau de l'intestin, des voies respiratoires et des reins mais son activité n'est pas rapportée au niveau de la muqueuse orale (Garattini, Fratelli et al. 2009). L'oxydation de la trans-2-hexenal pourrait donc aussi être imputable à l'activité métabolique du cytochrome P450 qui catalyse aussi des réactions d'oxydation. L'hydrolyse de l'hexanoate d'éthyle pourrait quant à elle être catalysée par une carboxyesterase.

Les résultats obtenus doivent cependant être interprétés avec réserve. Bien que la perméabilité membranaire des TR146 puisse être corrélée à celle observée dans la muqueuse orale, une étude comparative de perméabilité des TR146 et de la muqueuse orale humaine a montré une perméabilité dix fois supérieure des TR146 pour certains composés (testostérone, mannitol) (Nielsen and Rassing 2000). En bouche, il se produit une desquamation naturelle de la surface de la muqueuse, phénomène non observable avec notre muqueuse modèle (voir chapitre 1), qui pourrait limiter la diffusion des molécules.

4.2. EFFET DE LA MUQUEUSE ORALE SUR LA CINETIQUE DE LIBERATION DES MOLECULES D'AROME

4.2.1. Observations générales

4.2.1.1. Injection d'une fraction de liquide vs une fraction de gaz aromatisé

Afin d'étudier la cinétique de libération des molécules d'arôme en présence de la muqueuse orale, le modèle de muqueuse a été exposé à deux molécules d'arôme, la pentan-2-one et l'octan-2-one, sous 2 états différents: sous forme d'un gaz aromatisé ou sous forme d'une solution aqueuse aromatisée. Il doit également être souligné que les quantités totales de molécules d'arôme n'étaient pas les mêmes avec n= 0.5×10^{-9} moles dans le cas de l'air aromatisé et n= 3×10^{-9} moles dans le cas

de la solution aromatisée. Le débit d'aspiration du PTR-MS était le même pour les 2 conditions. La comparaison des aires cumulées au bout de 160 s indique qu'il y a d'avantage de molécules libérées quand les molécules sont introduites sous forme de gaz que lorsqu'elles sont introduites sous forme liquide dans les premières minutes de libération (Pentan-2-one : 65 000 A.U. condition gaz et 50 000 A.U. condition liquide ; Octan-2-one : 65 000 A.U. condition gaz et 30 000 A.U. condition liquide ; Octan-2-one : 65 000 A.U. condition gaz et 30 000 A.U. condition aromatisée. Les différences de libération entre les deux molécules peuvent être expliquées par leur différence de volatilité. La comparaison des courbes de libération et d'aire cumulée pour les deux conditions d'introduction montre des allures similaires, avec une phase de libération rapide et une phase de libération plus lente. Cependant, la phase de libération rapide est beaucoup plus intense dans le cas de l'air aromatisé, alors qu'à l'inverse la deuxième phase de libération est plus importante dans le cas de la solution aromatisée.

Dans le cas de l'injection d'air aromatisé, il n'a pas été observé d'effet de la muqueuse modèle sur la libération de la pentan-2-one. Dans le cas de l'octan-2-one, il a été observé une vitesse de libération plus importante en présence du modèle de muqueuse pour les premières secondes de libération. A l'inverse, lorsque la muqueuse est exposée aux molécules d'arôme introduites en solution, il n'est pas observé de différence sur les premiers temps de libération, alors qu'une diminution significative de la libération des composés est observée après 180 s ou plus de contact avec l'épithélium modèle (incluant les 120 s d'équilibre avant l'analyse de la libération). Il doit également être noté que dans le cas de l'introduction des molécules sous forme gazeuse, la quantité d'arôme libéré au bout de 160 s après l'ouverture de la vanne tend vers 0 alors que l'épuisement n'est pas atteint dans le cas de l'introduction en solution.

Il apparaît donc que l'état (gaz ou liquide) sous lequel les molécules d'arômes sont introduites, influe sur le comportement des arômes. Lors de l'injection de fraction d'air aromatisé, il se produit un premier phénomène de solubilisation des molécules dans la fraction aqueuse contenue dans les flacons. L'absence d'effet de la muqueuse lors de l'injection d'arôme gazeux peut être expliquée par le fait qu'un premier équilibre doit s'établir entre la phase gazeuse et la phase aqueuse et que seule une faible quantité des molécules passe en phase liquide durant les 120 s d'exposition de la muqueuse à la fraction gazeuse aromatisée, comme nous le montre la comparaison des CS et CH. Pour voir un effet de la muqueuse sur la quantité d'arôme libéré, un deuxième équilibre soit ensuite s'établir entre la fraction de molécules d'arôme libres en solution et la fraction de molécules liées à l'épithélium. De plus, la constante de dissociation doit être de l'ordre du micromolaire. Ainsi, la concentration de molécules d'arôme présentes en solution est probablement trop faible pour déplacer les molécules vers l'état lié. Cette forme d'exposition à de l'air aromatisé a été récemment utilisé *in vivo* afin de limiter les interactions de la matrice avec les molécules d'arôme (Déléris, Saint-Eve et al. 2015) (Deleris, Saint-Eve et al. 2016) (Sanchez-Lopez, Ziere et al. 2016). Dans la présente étude, travaillant en solution aqueuse, l'influence de la matrice est négligeable. Il semble donc que l'introduction sous forme liquide soit à privilégier.

4.2.1.2. Profils de libération observés

La libération des molécules, qu'elles soient injectées sous forme d'une fraction gazeuse ou aqueuse, peut se décomposer en 2 étapes. Le pic de libération observé constitue la première étape et correspond à la purge de l'espace de tête contenant les molécules libérées pendant 120 s d'équilibre. Il a été relevé des temps pour atteindre Imax plus courts lors de l'analyse de la pentan-2-one que pour l'octan-2-one, ce qui peut s'expliquer par la volatilité plus importante du premier composé.

Lors de l'ouverture du circuit indirect, le flux d'air humide traverse le flacon et l'espace de tête est alors entrainé vers le détecteur. Puis on observe une lente libération qui correspond à la libération des composés. Le renouvellement de l'espace de tête par le flux d'air crée un déplacement d'équilibre permanent. Cette seconde étape semble influencée par la présence de la muqueuse modèle.

4.2.2. Effet de la muqueuse modèle sur la cinétique de libération

Lors de l'ajout d'une solution aqueuse de pentan-2-one, il est observé une Imax de libération importante en présence de la muqueuse, traduisant une libération initiale (lors des 5 premières secondes d'acquisition) plus importante. Par la suite, une diminution de la libération est observée, en particulier en présence de la pellicule salivaire. Ceci suggère une rétention de la pentan-2-one par les protéines salivaires.

La libération de l'octan-2-one n'est pas différente dans les premières secondes de l'analyse entre les différentes conditions puis après 60 s d'acquisition, elle diminue en présence de la muqueuse modèle (ce qui correspond à 180 s de contact avec les cellules). Concernant, l'effet de la pellicule salivaire, aucune différence significative n'est observée entre les conditions « Cellules » et « Cellules + pellicules ».

L'utilisation de cellules épithéliales orales TR146 a déjà été mise en œuvre par Rabe *et al.* (2004) afin d'étudier l'effet de la muqueuse orale sur la libération dynamique de composés d'arôme. Contrairement à nous, ils n'ont pas observé d'effet des cellules sur la libération initiale des molécules d'arôme. Il faut cependant noter que les composés utilisés dans leur étude sont différents

CHAPITRE 2

de ceux testés dans la présente étude, et que leur étude *in vitro* incluait d'autres paramètres, comme le flux de salive, la variation du flux d'air et l'agitation qui peuvent être des facteurs interférant dans l'établissement d'interactions entre les cellules et les molécules d'arôme.

Concernant l'origine des effets observés dans notre étude, l'effet observé étant légèrement plus important dans le cas de l'octan-2-one (ACn150= 0,83) que pour la pentan-2-one (ACn150= 0,93), l'hypothèse d'une rétention des composés par des effets hydrophobes semble envisageable.

L'autre hypothèse pouvant expliquer ces résultats est la métabolisation des molécules d'arôme par les cellules. En effet, nous avons montré dans la première partie de ce chapitre que les cellules utilisées pouvaient métaboliser certaines cétones, et que la métabolisation augmentait avec la longueur de la chaîne aliphatique des composés. La métabolisation de la pentan-2-one et de l'octan-2-one n'a cependant pas été observée en GC-FID, mais la méthode est moins sensible que le PTR-MS.

L'étude des spectres acquis par le PTR-MS a montré la présence en phase gazeuse de composés avec des rapports m/z correspondant à la fois aux produits de métabolisation des molécules testées et aux isotopes M+2 des molécules étudiées. Les abondances relatives de ces ions sont supérieures à celles des abondances relatives théoriques des isotopes M+2. Cependant, ces ions sont à la fois observés dans les conditions « cellules » et « CH », à des abondances relatives similaires. Il n'est donc pas non plus possible de confirmer qu'il s'agit des alcools issus de la réduction de la fonction cétone par des enzymes cellulaires. Du fait de la faible intensité du signal observé, l'ion m/z détecté pourrait être dû à un signal résiduel, aux isotopes M+2 présents à des abondances relatives supérieures à celles attendues du fait que l'on soit en dehors des limites de quantification ou à la présence d'un composé de même formule brute que la pentan-2-ol et l'octan-2-ol dans les solutions.

Il n'est à ce stade pas possible de conclure quant à la métabolisation des deux cétones par la muqueuse modèle. L'augmentation du temps d'équilibre et donc d'exposition des molécules aux cellules pourrait permettre d'accumuler le nombre de molécules de métabolite formées et de confirmer ou non la production des alcools associés.

4.2.3. Effet de la pellicule mucosale sur la cinétique de libération

Lors des expériences d'introduction des molécules d'arôme sous forme de solution aromatisée, un effet de la pellicule mucosale est observé pour les deux molécules étudiées. La diminution de la libération de l'octan-2-one en présence de la muqueuse orale modèle est un peu plus marquée lorsque cette dernière est dépourvue de pellicule salivaire. Au contraire, la libération de la pentan-2-one est plus faible lorsque la pellicule mucosale est présente à la surface des cellules.

La pellicule mucosale est une couche de protéines salivaires ancrées à la surface des cellules de l'épithélium oral, qui est à priori hydrophobe. Il a été proposé un modèle structural de la pellicule salivaire en deux couches (Cardenas, Arnebrant et al. 2007), soit une couche d'ancrage, constituée des régions hydrophobes des protéines, et une couche externe, constituée des régions glycosylées hydrophiles. Les mucines sont les protéines majoritaires composant la pellicule mucosale. Ces protéines présentent à la fois des régions hydrophiles et des régions hydrophobes. L'ancrage des mucines à la surface des cellules épithéliales leur confère une organisation particulière : les régions hydrophobes sont orientées vers la surface cellulaire alors que les régions hydrophiles sont orientées vers le milieu extracellulaire.

Il a précédemment été proposé dans la littérature que des interactions non-covalentes de type effet hydrophobe pourraient être à l'origine d'interactions entre les protéines salivaires et les molécules d'arôme (Pages-Helary, Andriot et al. 2014). Partant de cette l'hypothèse (Figure 47), l'organisation spatiale supposée des mucines limiterait la disponibilité des régions hydrophobes des mucines salivaires pouvant interagir avec les molécules d'arôme, contrairement aux mucines libres en solution (Pages-Helary, Andriot et al. 2014). Nous avons observé dans le chapitre 1 que la pellicule salivaire formée sur les cellules de la lignée TR146/MUC1 présentait une répartition hétérogène en surface des cellules. Ainsi, le modèle de muqueuse orale avec pellicule salivaire présenterait des zones avec pellicule salivaire, formant une couche externe au caractère plus hydrophile, et des zones sans pellicule, au caractère plus hydrophobe. Ainsi, la rétention des molécules les plus hydrophobes, cas de l'octan-2-one, serait réduite au niveau de ces zones recouvertes par la pellicule.

Les cétones linéaires présentent une charge partielle négative au niveau de la fonction carbonyle, qui pourrait participer à l'établissement d'interactions électrostatiques. Ceci pourrait expliquer la diminution plus importante de la libération de la pentan-2-one en présence de la pellicule salivaire. En effet, outre les mucines, d'autres protéines telles que les protéines riches en proline basiques (bPRP) participent à la formation de la pellicule mucosale. Ces protéines sont chargées positivement et pourraient participer à l'établissement d'interactions électrostatiques avec les cétones. Par contre, on n'observe pas de diminution significative de la quantité de molécule d'octan-2-one libérée en présence de la pellicule salivaire. L'encombrement stérique plus important de cette molécule pourrait limiter son accès aux régions chargées positivement de la pellicule salivaire.

Ainsi, deux types d'interaction pourraient coexister : des interactions de type effet hydrophobe avec la surface des cellules et des interactions de type électrostatique avec les protéines de la pellicule salivaire. La pentan-2-one, molécule peu hydrophobe, ne serait pas encline à des interactions de type effet hydrophobe comme vu précédemment (Pages-Helary, Andriot et al. 2014), mais pourrait établir des liaisons de type électrostatique. En revanche, les interactions impliquant l'octan-2-one seraient majoritairement dues à des effets hydrophobes. En effet, l'accès de la

molécule aux régions chargées positivement de la pellicule pourrait être limité par sa taille, plus importante que celle de la pentan-2-one.



Epithélium oral

Figure 47: Rétention des molécules d'arôme par la muqueuse orale et de la pellicule mucosale. 1. Rétention des cétones en surface de la muqueuse orale via des effets hydrophobes ; 2. Rétention de la pentan-2-one par des protéines de la pellicule salivaire par des interactions électrostatiques. Interactions limitées de l'octan-2-one (stérique).

Considérant maintenant l'hypothèse d'une métabolisation des composés par les enzymes cellulaires (Figure 48), la présence en surface des cellules des régions hydrophiles des mucines pourrait limiter la diffusion des molécules les plus hydrophobes. Ces molécules seraient par contre mieux absorbées par les cellules. La pellicule salivaire jouerait ainsi un rôle de barrière stérique sélective, bloquant la diffusion de certains composés vers les cellules (Lieleg and Ribbeck 2011).



Epithélium oral

Figure 48 : Métabolisation des molécules d'arôme par les EMX cellulaires et production de nouveaux composés aromatiques. 1. Absorption et métabolisation des molécules d'arômes par les EMX cellulaires; 2. Diffusion des molécules à travers la pellicule salivaire; 3. Diffusion à travers la pellicule facilitée pour les petites molécules hydrophiles; 4. Meilleure perméabilité membranaire pour les molécules hydrophobes.

5. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'objectif de ce travail était d'étudier la capacité des molécules d'arôme à interagir avec la muqueuse orale et la pellicule salivaire, en utilisant un modèle *in vitro* de muqueuse, et d'évaluer l'effet de ces interactions sur la cinétique de libération des molécules.

L'hypothèse initialement formulée était que des interactions moléculaires pouvaient s'établir entre la muqueuse orale et les molécules d'arôme et provoquer une rétention des composés qui seraient ensuite progressivement libérés.

L'hydratation de la surface de la muqueuse orale impacte le coefficient de partage des molécules les plus hydrophiles ainsi que leur cinétique de libération initiale bien qu'une partie des résultats observés ne soit pas significative. Une libération moindre de ces composés est observée par rapport à la condition du contrôle sec. Elle peut être imputée à la solubilisation de ces molécules dans la salive résiduelle. Ceci pourrait expliquer la plus grande persistance de ces molécules observée *in vivo*, en particulier pour les molécules de la famille des pyrazines (Linforth and Taylor 2000, Buffo, Rapp et al. 2005).

Les analyses à l'équilibre thermodynamique n'ont pas permis de mettre en évidence l'aptitude de la muqueuse orale et des protéines de la pellicule mucosale à retenir les molécules odorantes pour les molécules étudiées. Il apparaît que les effets observés sur certaines molécules seraient avant tout dus à des réactions de dégradation enzymatique. Cependant, peu de molécules ont été testées. Nous avons été confrontés à deux facteurs limitants liés à l'affinité des molécules pour la phase aqueuse. Le premier facteur concerne les molécules très hydrophiles (pyrazines, gaïacol...), qui ont une forte affinité pour la phase aqueuse. Ainsi, leur concentration en phase gaz est faible à la concentration utilisée, et elle se situe en dessous de la limite de détection des composés. Augmenter la concentration des molécules n'est pas apparu une solution judicieuse pour deux raisons. Du fait de la faible surface du modèle cellulaire, l'effet de rétention par la muqueuse serait négligeable face à la quantité d'arôme en solution. D'autre part, l'utilisation de solutions plus concentrées risque de poser un problème de toxicité des molécules pour les cellules. Le second facteur porte sur les molécules les plus hydrophobes, qui sont difficilement solubilisées dans le l'eau et le tampon. L'utilisation d'un tensioactif pourrait faciliter leur solubilisation, cependant, cela implique l'utilisation d'un composé potentiellement toxique pour les cellules. Une solution alternative serait l'utilisation de système PTR-MS ou ACPI-MS dont les seuils de sensibilité peuvent atteindre quelques ppbv (Avison, van Gruijthuijsen et al. 2015) (Jordan, Haidacher et al. 2009). Des méthodes d'analyse par PTR-MS (Wieland, Neff et al. 2015) et par APCI-MS (Avison, van Gruijthuijsen et al. 2015) ont récemment été développées mais nécessitent l'utilisation de grands volumes (flacons de 100 ml et plus). Il serait intéressant de voir si celles-ci peuvent être applicables et/ou adaptables à notre modèle, en prenant en compte la limitation de taille de flaconnage imposée par le matériel biologique pour des raisons de coût et de temps de culture.

Le suivi en temps réel de la libération a permis de mettre en évidence un effet de la muqueuse orale modèle sur la cinétique de libération des deux cétones linéaires, la pentan-2-one et l'octan-2one. Il est apparu que pour suivre ces cinétiques de libération courtes, il était plus pertinent d'introduire les molécules sous forme de solutions aromatisées. Lorsque les molécules ont été introduites sous cet état, la diminution de la quantité d'arôme libéré est visible après 180 s de contact entre les cellules et les molécules.

L'analyse par PTR-ToF-MS offre une bonne sensibilité, il a donc été possible de travailler avec des concentrations plus faibles que pour les analyses d'espace de tête par GC-FID. Le signal détecté étant élevé, les conditions pourraient être encore optimisées afin de mieux nuancer les observations entre la condition contrôle et la condition en présence de muqueuse. Il serait intéressant de tester la nonan-2-one et la decan-2-one pour lesquelles une métabolisation importante a été observée dans la première partie de ce chapitre ainsi que d'autres composés dont la solubilité dans le tampon est faible ou des molécules qui n'étaient pas détectée en GC-FID aux concentrations utilisées.

Il pourrait être intéressant de procéder *in vitro* à un protocole similaire à celui proposé récemment *in vivo* par Esteban *et al.* (2016), qui consiste à exposer la muqueuse à une solution aromatisée qui est ensuite recrachée par le sujet. Le fait de retirer l'excédent de solution d'arôme permettrait de réduire l'épaisseur de la phase liquide et donc le transfert de masse entre la muqueuse et l'air.

La capacité des cellules épithéliales à métaboliser les composés d'arôme a été démontrée *in vitro* et constitue le principal mécanisme influant le coefficient de partage des molécules à l'équilibre. En effet, pour atteindre l'équilibre, les molécules sont incubées plusieurs dizaines de minutes avec les cellules, permettant l'accumulation de métabolites au cours du temps. Les analyses par PTR-MS n'ont pas permis de confirmer l'hypothèse d'une métabolisation des molécules étudiées par les cellules sur des temps courts. Cependant, cette hypothèse ne peut être exclue et devra être testée. Il serait intéressant de confirmer l'implication des EMXs, par exemple avec l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques, afin d'identifier les enzymes responsables de dégradations enzymatiques observées.

Comme avec toute utilisation de modèle, les résultats doivent être interprétés avec prudence, et les mécanismes observés doivent être testés *in vivo*, plus particulièrement la métabolisation des arômes en bouche par la muqueuse orale puisque cela n'a à notre connaissance pas été étudié. Afin de vérifier si le même phénomène se produit *in vivo*, il pourrait être intéressant de suivre en temps réel les molécules dégradées et de leurs métabolites à l'aide d'un dispositif d'analyse *in vivo* tels qu'un spectromètre de masse de type PTR-MS ou APCI-MS.

CHAPITRE 3 - ETUDE DES INTERACTIONS ENTRE PROTEINES SALIVAIRES, PELLICULE MUCOSALE ET TANINS

1. INTRODUCTION

1.1. CONTEXTE ET PROBLEMATIQUE

L'astringence est décrite comme une sensation d'assèchement et de rugosité de la muqueuse orale, que l'on ressent lors de la consommation de produits d'origine végétale et de leurs dérivés. Les tanins sont les composés responsables de cette sensation. Les mécanismes à son origine suscitent l'intérêt de la communauté scientifique depuis de nombreuses années. L'astringence est traditionnellement assimilée à une mécanosensation provoquée par la précipitation des protéines de la salive entrainant une diminution des propriétés lubrifiantes de cette dernière (Green 1993). Cependant, un argument en faveur de l'implication du système trigéminal chimiosensoriel a également été récemment apporté (Schobel, Radtke et al. 2014).

Cette partie porte sur les interactions entre protéines salivaires et tanins. Plusieurs mécanismes sont proposés quant au rôle de la salive dans la perception de l'astringence. Il est important pour comprendre cela de différencier la salive libre, qui est déglutie, de la pellicule mucosale, constituée essentiellement de protéines salivaires ancrées à la surface des cellules épithéliales (Bradway, Bergey et al. 1989).

Une première théorie postule que la sensation d'astringence impliquerait les protéines libres de la salive selon deux mécanismes qui ne s'excluent pas l'un l'autre. Dans le premier mécanisme la précipitation des protéines de la salive libres, notamment les PRP, modifierait les propriétés rhéologiques de la salive et diminuerait ses capacités de lubrification, provoquant la sensation de rugosité propre à l'astringence (Green 1993, Bajec and Pickering 2008). Dans le second mécanisme, c'est la précipitation des agrégats protéine-tanin formés qui serait perçue.

Une seconde théorie avance que la sensation résulterait plutôt de l'interaction des tanins avec la muqueuse orale (Nayak and Carpenter 2008), soit en altérant les propriétés lubrifiantes de la pellicule mucosale, soit en se fixant directement à des récepteurs chimiosensoriels activant le système trigéminal (Gibbins and Carpenter 2013, Schobel, Radtke et al. 2014).

Partant de l'hypothèse que les tanins pourraient modifier la structure de la pellicule mucosale, ces modifications structurales seraient susceptibles d'influer sur les propriétés mécaniques de la

CHAPITRE 3

pellicule. Par ailleurs, les PRP, peu présentes dans la pellicule (Gibbins, Proctor et al. 2014), piégeraient les tanins dès leur contact avec la salive libre et ainsi limiteraient l'accès de ces derniers à la muqueuse et à la pellicule.

A ce jour, aucune étude n'a mis en évidence l'effet des tanins sur la structure de la pellicule. Les objectifs de ce travail ont été dans un premier temps d'évaluer *in vitro* l'effet de différents tanins sur la structure de la pellicule mucosale, puis dans en second temps, de vérifier si les PRP étaient capables de capter les tanins et limiter leur accès à la muqueuse et à la pellicule.

1.2. STRATEGIE

Le modèle cellulaire a été exposé à deux tanins modèles : l'épigallocatéchine (EgC) et l'épigallocatéchine gallate (EgCG). Ces deux composés diffèrent par la présence d'un acide gallique en position C3 de l'EgCG. Les propriétés astringentes des tanins sont liées à leur structure et le caractère astringent augmente avec la présence d'unité d'acide gallique (Scharbert, Holzmann et al. 2004). En effet, il semble que la présence d'un acide gallique permette au monomère de catéchine de ponter deux protéines et ainsi de les agréger (Poncet-Legrand, Cartalade et al. 2003).

Afin d'étudier le rôle des PRP dans la protection de la muqueuse, la PRP basique IB5 a été utilisée. Cette protéine forme des complexes solubles avec les tanins EgC et EgCG, susceptibles de d'agréger et de précipiter (Canon, Pate et al. 2009, Canon, Giuliani et al. 2010, Canon, Pate et al. 2013).

Les MUC5B ont été choisies comme indicateur de la présence de la pellicule dont elles sont le composant majoritaire (Gibbins, Proctor et al. 2014). Ces protéines sont en grande partie responsables des propriétés lubrifiantes de la salive et de la pellicule salivaire. Leur précipitation par les tanins pourrait réduire cette capacité de lubrification. L'effet des tanins sur la structure de la pellicule a été observé grâce aux techniques microscopiques utilisées dans le premier chapitre.

Un immuno-marquage des MUC5B, avant et après exposition aux tanins a été réalisé afin d'observer l'effet des composés astringents sur la structure et le tapissage des cellules par les MUC5B, en présence ou non d'IB5.

La microscopie électronique a été utilisée afin d'observer à l'échelle moléculaire l'effet des tanins sur la structure des mucines constituant la pellicule salivaire

2. MATERIELS ET METHODES

2.1. MODELE CELLULAIRE DE MUQUEUSE ORALE

Les cellules épithéliales de la lignée TR146/MUC1 ont été utilisées. Les cellules ont été cultivées sur des lames de verres à 8 chambres.

2.2. TOXICITE DES MOLECULES

La toxicité des tanins a été testée en utilisant le test fluorimétrique décrit par Rat *et al.* (Rat, Korwin-Zmijowska et al. 1994). Les cellules confluentes cultivées dans des plaques 96 puits ont été incubées 1 h avec une solution de tanins aux concentrations de 0,3 mM, 1 mM, 3 mM, 6 mM et 10 mM dilués dans du PBS. Les résultats sont exprimés en pourcentage de cellules vivantes, en fixant à 100% la valeur obtenue pour les cellules non traitées. Une substance a un effet toxique lorsque le pourcentage de viabilité est inférieur à 80% par rapport aux cellules non traitées.

2.3. TANINS ET PRP

Les deux tanins EgC et EgCG ont été achetés chez Santa Cruz (ref. sc-205673 et sc-200802). Des solutions à 50 mM ont été préparées dans du PBS acidifié à pH 3. Les solutions ont été aliquotées et conservées à -20°C.

La PRP utilisée est IB-5. Il s'agit d'une PRP basique produite par clivage protéolytique de la PRP salivaire humaine PRBS4. Le second produit de ce clivage est la PRP glycosylée II-2 (Pascal, Bigey et al. 2006) (Figure 49).



Figure 49 : Clivage enzymatique de PRB4S (d'après PACal et al., 2006)

Les PRP ont été produites par *Pichia pastoris* puis purifiées selon la méthode décrite par Boze *et al.* (2010) (Boze, Marlin et al. 2010) et ont été fournies par le Dr Véronique Cheynier (UMR SPO Montpellier). Nous avons choisi de travailler à une concentration de 0,33 mM en IB5, soit 2,1 mg/ml

dans du PBS, concentration à laquelle la formation d'agrégats en présence d'EgCG 0,2 mM a été rapportée (Canon, Pate et al. 2013).

2.4. PRECIPITATION DES PROTEINES SALIVAIRES PRP PAR LES TANINS

Dans un premier temps, le seuil de précipitation d'IB5 par EgCG a été évalué. Pour cela, différentes solutions d'IB5 et d'EgCG ont été préparées dans du PBS (pH 7,4). Les solutions d'IB5 ont été préparées dans des microtubes de 500 µl. L'EgCG a été ajouté aux solutions d'IB5 selon les protocoles décrits dans le Tableau 23. L'apparition du précipité a été évaluée à l'œil nu.

Concentration initiale		Concentr	ation finale	
EgCG (mM)	IB5 (mM)	EgCG (mM)	IB5 (mM)	Protocole
				Ajouts successifs de 0,5 μ l de solution
40	0,33	1,8	0,31	de tanin dans 252 μl de solution d'IB5
				(volume final ajouté = 12 μl)
1	0,66	0,5	0,33	Mélange de 166 μ l de solution de PRP
2	0,66	1	0,33	avec 166 μl de solution d'EgCG

Tableau 23 : Protocoles d'évaluation du seuil de précipitation d'IB5 par l'EgCG.

2.5. EXPOSITION DE LA MUQUEUSE MODELE AUX TANINS

2.5.1. Tanins seuls

Des solutions de tanins EgC et EgCG ont été préparées à partir des solutions mères à 50 mM. Nous avons choisi de tester deux concentrations, à savoir 0,05 mM et 1 mM, préparées dans du PBS. Ces concentrations se situent en dessous et en dessus des seuils de perception de l'astringence des deux composés dont une valeur moyenne a été estimée à 0,52 mM pour l'EgC et 0,19 mM pour l'EgCG (Scharbert, Holzmann et al. 2004).

Cent vingt cinq µl de solution de tanins ont été ajoutés dans les puits contenant le modèle cellulaire avec pellicule salivaire. Après 5 min, l'excédent de liquide a été retiré et les cellules ont été fixées selon le protocole décrit dans le paragraphe 2.6.1.

2.5.2. EgCG en présence d'IB5

Deux concentrations en EgCG ont été utilisées, 0,5 mM et 1 mM, qui correspondent à des concentrations respectivement en dessous et au dessus du seuil d'apparition d'un précipité dans une solution de PRP à 0,33 mM.

Des solutions deux fois plus concentrées ont été préparées dans du PBS, soit 0,66 mM pour IB5 et 1 mM et 2 mM pour EgCG. Le protocole d'exposition du modèle cellulaire aux différentes conditions est décrit dans le Tableau 24. Après 5 min, l'excédent de liquide a été retiré. Chaque condition a été réalisée 3 fois.

	Concentr	ations finales te	Protocole			
	EgC (mM)	EgCG (mM)	IB5 (mM)			
	0,05	-	-			
	1	-	-	Aigut do 125 ul do colution do		
Tanins seuls	-	0,05	-	Ajour de 125 μi de solution t		
	-	0,5	-	tanni par putt		
	-	1	-			
	-	-	0,33	Ajout de 62,5 µl de PBS puis 62,5		
				µl de solution de PRP par puit		
EgCG en	-	0,5	0,33	Aiout de 625 ul de solution de		
présence d'IB5	-	1	0.33	tanin 2X (1 ou 2 mM) puis 62.5 µl		
			0,00	de solution de PRP 2X (0,66 mM)		

Tableau 24 : Différentes conditions d'exposition aux tanins et aux PRP testées.

2.6. MICROSCOPIE

2.6.1. Immunomarquage des MUC5B

Après exposition aux solutions de tanins et/ou d'IB5, le modèle cellulaire a été fixé pendant 30 min avec 500 μl de paraformaldéhyde (PFA) à 4%. L'autofluorescence du PFA a été bloquée avec une solution de NH₄Cl 50 mM pendant 15 min. Les cellules ont été incubées à température ambiante avec une solution d'anticorps de souris F2 anti-MUC5B dilué au 1/400^e dans du PBS pendant 1 h. Un anticorps de chèvre Alexa 488 anti-souris (Invitrogen) a été utilisé comme anticorps secondaire (1/400^e dans du PBS, 1 h). Après retrait des chambres, les lames ont été montées sous une lamelle

dans du milieu Prolong Gold antifade contenant du DAPI (Invitrogen). La fluorescence a été observée au microscope Nikon Eclipse E600 (Nikon Instruments) équipé de filtres UV-2A (excitation 330-380 nm, émission 400 nm) et B-2A (excitation 450-490 nm, émission 505 nm). Les images ont été acquises avec le logiciel NIS-Br de Nikon. 3 images ont été acquises pour chacune des 3 répétitions de chaque condition.

2.6.2. Microscopie Electronique à Balayage

Le protocole est le même que celui décrit dans le chapitre 1.

2.7. ANALYSE DES IMAGES

Le logiciel Image J a été utilisé pour l'analyse d'image. Les images ont été converties en images 8-bits. Un seuillage automatique a été effectué, préalablement à la détection des zones marquées par l'anticorps anti-MUC5B.



Image originale (32-bit color) Image niveau de gris (8-bit) Seuillage

Figure 50 : Analyse d'image et détection de la fluorescence avec le logiciel ImageJ.

Une analyse des particules a été réalisée en excluant les particules en contact avec les bords de l'image. Pour chacune des 3 répétitions de chaque condition, les données des 3 images ont été conservées. Les mesures extraites des images étaient les aires des particules et leur « *Integrated Density* », qui est égale au produit du nombre de pixels par le niveau moyen de gris et qui permet donc de quantifier la fluorescence d'un échantillon ou d'une zone sélectionnée.

A partir de l'analyse des particules, plusieurs paramètres ont été calculés :

- La taille moyenne des dépôts de mucines.
- Le tapissage des cellules par les MUC5B, calculé comme le ratio de la somme des aires des particules par la surface totale des images. Il est exprimé en pourcentage.

 L'intensité de la fluorescence des images, celle-ci étant proportionnelle à la quantité de MUC5B.

2.8. ANALYSE STATISTIQUE

Les paramètres extraits ont été soumis à des tests non paramétriques de Kruskal-Wallis (p< 0,05) associés à une comparaison multiple par paires de Conovan-Iman.

3. RESULTATS

3.1. TOXICITE DES TANINS

La toxicité des tanins pour les cellules a été testée. Comme on peut le voir sur la Figure 51, après 1 h d'incubation avec la solution de tanins, seul l'EgCG est toxique à partir d'une concentration située entre 6 et 10 mM.

Pour la suite de l'étude, les deux tanins ont été utilisés à une concentration maximum de 1 mM, soit en dessous de la concentration toxique pour les cellules.



Figure 51 : Toxicité des tanins à différentes concentrations.

3.2. EFFET DES TANINS SUR LA STRUCTURE DE LA PELLICULE

Afin, d'étudier l'effet des tanins sur la structure de la pellicule, le modèle cellulaire a été exposé à des solutions à différentes concentration d'EgC et d'EgCG. Après retrait de l'excédent de liquide, les échantillons ont été fixés et les MUC5B détectées par immunofluorescence.

Un exemple d'image obtenue pour l'EgC et l'EGCG à 0,05 et 1 mM est présenté en Figure 52. D'un point de vue qualitatif, on observe un tapissage hétérogène de la surface de l'échantillon par les MUC5B pour chaque condition. Lors de l'ajout des tanins à la plus forte concentration (1 mM), on remarque la présence de dépôts de MUC5B de fluorescence plus intense.



Figure 52 : Immunomarquage des MUC5B après exposition du modèle cellulaire à une solution de tanins EgCG ou EgCG à différentes concentrations. A. Témoin, B. EgCG 0,05 mM, C. EgCG 1 mM, D. EgC 0,05 mM, E. EgC 1 mM. Barre d'échelle 100 μm.

3.2.1. Effet des tanins EgC et EgCG sur le tapissage des cellules par les MUC5B

Le tapissage de la surface des cellules par les MUC5B a été évalué comme le ratio entre la surface recouverte par les MUC5B et la surface totale de l'échantillon. Les résultats sont présentés en Figure 53.





Dans la condition contrôle (exposée à une solution de PBS), le tapissage des cellules par les MUC5B est de 12,02 (± 5,46) %.

On observe une diminution du pourcentage de surface recouvert par les mucines, qui passe alors à 8,98 (±4,33) % et 3,86 (±1,13) % lors de l'ajout d'EgCG à 0,05 mM et 1 mM. Cette diminution n'est significative que pour la concentration testée de 1 mM.

Lors de l'exposition du modèle cellulaire à l'EgC, le tapissage des cellules par les MUC5B est de $8,25 (\pm 6,72)$ et $5,15 (\pm 1,32)$ % pour les concentrations respectives de 0,05 mM et 1 mM.

L'ajout de tanins provoque une diminution du tapissage de la surface des cellules par les mucines. L'effet est d'autant plus marqué que la concentration est forte et n'est significatif que pour la concentration de 1 mM. L'exposition de la pellicule à l'EgCG 1 mM induit une diminution de 67,9 % du tapissage par rapport au témoin. La diminution du tapissage est un peu moins marquée avec l'EgC à même concentration, pour lequel on observe une diminution du tapissage de 57,2 % par rapport au témoin.

3.2.2. Effet des tanins EgC et EgCG sur la taille moyenne des dépôts de mucines

La taille moyenne des dépôts de mucines a été mesurée avant et après l'ajout de solutions de tanins à différentes concentrations.

Il n'a pas été observé de différences significatives de la taille des dépôts de mucines dans les différentes conditions testées par rapport au témoin non exposé aux tanins (Figure 54). Une tendance à l'augmentation de la taille moyenne des dépôts de mucines en augmentant la concentration en tanins EgC et EgCG est observée. La taille moyenne des dépôt de MUC5B est de 1,27 μ m² et augmente à 1,60 μ m² lors de l'ajout d'EgCG à 1 mM et à 1,45 μ m² lors de l'ajout d'EgC à 1 mM. Bien que les différences observées ne soient pas significatives, l'effet des tanins sur la taille des dépôts de MUC5B est aussi plus important pour l'EgCG que l'EgC.



Figure 54 : Taille moyenne des dépôts de mucines (MUC5B) lors de l'exposition du modèle cellulaire à des solutions d'EgC et d'EgCG de différentes concentrations.

3.2.3. Effet des tanins EgC et EgCG sur l'intensité de fluorescence des échantillons

La fluorescence des échantillons a été mesurée. D'un point de vue théorique, l'intensité de fluorescence est proportionnelle à la quantité d'antigène et donc de protéine ciblée par l'anticorps.

Comme nous le montre la Figure 55, l'ajout d'EgCG, tend à faire diminuer l'intensité de fluorescence des échantillons. Cette diminution est significative uniquement pour la concentration

de 1 mM en EgCG, pour laquelle on observe une diminution de plus de 40 % de l'intensité de fluorescence par rapport au témoin.

Une diminution non significative de 28,6 % de l'intensité de fluorescence est aussi observée lors de l'exposition du modèle à l'EgC 1mM. Aucune différence n'a été observée entre les deux concentrations testées.



Figure 55 : Evaluation de l'intensité de la fluorescence des échantillons lors de l'exposition du modèle cellulaire à des solutions d'EgC et d'EgCG de différentes concentrations.

3.2.4. Effet des tanins sur la structure des protéines de la pellicule

L'effet des deux tanins a été étudié sur la structure de la pellicule salivaire. Pour cela, des observations ont été réalisées en MEB, qui permet d'obtenir des images à haute résolution (de l'ordre de quelques nm) de la surface d'un échantillon.

Le Figure 56 montre que, dans la condition témoin, les cellules sont recouvertes d'une fine structure constituée en partie de mucines (voir chapitre 1), se présentant sous la forme d'un réseau fibreux fin et lâche.

Lors de l'exposition de la muqueuse modèle à l'EgCG 0,05 mM, on constate que la structure des dépôts de salive change, le réseau semble plus dense et serré (Figure 56B). Cette observation est moins marquée avec l'EgC 0,05 mM (Figure 56C).

Lors de l'ajout de tanins à une concentration de 1 mM, on remarque sur la Figure 56 (D et E) que la salive forme des amas plus denses et compacts dont la taille atteint quelques μ m.



Figure 56 : Observation MEB du modèle cellulaire après exposition à des solutions de tanins. A. Témoin ; B. EgCG 0,05 mM ; C. EgC 0,05 mM ; D. EgCG 1mM ; E. EgC 1 mM. Barre d'échelle 1 μm.

3.3. EFFET DES TANINS SUR LA STRUCTURE DE LA PELLICULE EN PRESENCE D'IB5

3.3.1. Précipitation d'IB5 par EgCG

Le seuil de précipitation d'IB5 par EgCG a été évalué par des observations à l'œil nu.

Lors de l'ajout goutte par goutte d'une solution d'EgCG à 40 mM dans une solution d'IB5 à 0,33 mM, un précipité apparaît à chaque goutte puis se solubilise. Après avoir ajouté la totalité de la solution d'EgCG, soit 12 μ l dans 252 μ l de solution d'IB5 (concentration finale d'EgCG = 1,8 mM), la solution est trouble mais il n'a pas été possible d'évaluer la concentration seuil induisant la précipitation des protéines.

Dans le second protocole, deux concentrations finales d'EgCG ont été testées, 0,5 mM et 1 mM. Il n'a pas été observé de précipitation d'IB5 à 0,33 mM par l'EgCG à 0,5 mM. Par contre, la formation d'un précipité insoluble est observée lors de l'ajout d'EgCG à 1 mM final. Le seuil de précipitation d'IB5 0,33 mM se situe donc entre 0,5 mM et 1 mM en EgCG.

3.3.2. Effet d'EgCG sur la structure de la pellicule salivaire en présence d'IB5

Afin d'évaluer le rôle des PRP dans la protection de la muqueuse, le modèle cellulaire a été exposé à des solutions contenant 0.33 mM PRP et 0, 0,5 ou 1mM d'EgCG. L'excédent de liquide a été éliminé et les échantillons fixés. Les MUC5B ont été détectées par immunofluorescence.

La Figure 57 présente deux images d'immunofluorescence du modèle de muqueuse en présence de la PRP IB5 et de deux concentration en EgCG : 0,5 mM (A) et 1mM (B). Lors de l'ajout d'EgCG à une concentration finale de 1 mM (B), on observe une modification de l'aspect de la pellicule par rapport à la concentration finale de 0,5 mM (A). Le marquage est plus diffus, l'aspect global du tapissage plus flou. L'image 57B est également à rapprocher de l'image 52C (ajout d'EgCG à 1mM mais sans IB5) : cet aspect « flou » est bien caractéristique de l'ajout conjoint d'IB5 et d'EgCG, à des concentrations où l'on attend une précipitation d'IB5 par l'EgCG.



Figure 57 : A. IB5 0,33 mM + EgCG 0,5 mM, B. IB5 0,33 mM + EgCG 1 mM. Barre d'échelle = 100 μm.

Les images obtenues ont été analysées avec ImageJ. Le tapissage des cellules par les MUC5B, la taille des dépôts de MUC5B et la fluorescence totale ont été mesurés. Les données ont été comparées à la condition témoin et à la condition tanin seul.

3.3.3. Effet d'EgCG sur le tapissage des cellules par les MUC5B en présence d'IB5

La Figure 58 illustre le fait que l'ajout d'IB5 seul n'influe pas sur le tapissage des cellules par les MUC5B, 11,58 % de la surface étant recouverte de MUC5B, soit une valeur très proche de celle de la condition témoin (12,02 %).
L'ajout d'EgCG à 0,5mM, que ce soit avec ou sans IB5, induit une diminution de tapissage mais qui n'est pas significative par rapport à la condition témoin. Les deux conditions (EgCG seul / EgCG + IB5) ne sont donc pas significativement différentes entre elles.

Nous avons vu précédemment (paragraphe 3.2.1) que lors de l'exposition du modèle cellulaire à EgCG 1 mM, le tapissage des cellules par les MUC5B diminue de manière significative (- 67,9 % par rapport au témoin). En revanche, en présence d'IB5, lorsque l'on ajoute de l'EgCG 1 mM, le tapissage des cellules par les MUC5B est comparable à et non significativement différent de la condition témoin.



Figure 58 : Effet d'IB5 sur le tapissage de cellules par les MUC5B lors de l'ajout d'EgCG.

3.3.4. Effet d'EgCG sur la taille des dépôts de MUC5B en présence d'IB5

Les tailles moyennes des dépôts de mucines présents sur l'épithélium modèle après ajout d'EgCG, en présence ou non d'IB5, sont présentées en Figure 59.

L'ajout d'une solution d'IB5 n'a pas d'effet sur la taille des dépôts de MUC5B.

L'ajout d'EgCG tend à faire augmenter la taille des amas de mucines, proportionnellement à la concentration d'EgCG, et ceci que ce soit en présence ou non d'IB5. Toutefois globalement, il n'a pas été observé de différence significative de taille moyenne des dépôts de mucines en surface des cellules lors de l'ajout d'EgCG à 0,5 mM et 1 mM lorsque les cellules ont été préalablement recouvertes d'une solution d'IB5, par rapport à la condition sans IB5 et par rapport au témoin sans ajout de tanins.



Figure 59 : Effet d'IB5 sur la taille moyenne des dépôts de MUC5B lors de l'ajout d'EgCG.

3.3.5. Effet d'EgCG sur la quantité de MUC5B présente dans la pellicule en présence d'IB5

La Figure 60 montre que ni l'ajout de PRP ni celui d'EgCG 0,5 mM en présence ou non d'IB5, n'a d'effet significatif sur l'intensité de florescence des échantillons.

Comme nous l'avons vu dans le paragraphe 3.2.3, il a été observé une diminution significative de la fluorescence de l'échantillon lorsque celui-ci est exposé à 1 mM d'EgCG. Lorsque la muqueuse modèle est préalablement recouverte d'une solution d'IB5, cette différence n'est plus significative : l'intensité de fluorescence est plus importante pour l'EgCG 1mM/ IB5 que pour l'EgCG seul, même si la différence entre ces deux conditions n'est pas significative.





4.1. EFFET DES TANINS EGC ET EGCG SUR LA PELLICULE MUCOSALE

4.1.1. Formation d'agrégats protéiques : observations à l'échelle d'une cellule

L'observation de la pellicule par MEB a permis de mettre en évidence une modification de sa structure en présence des tanins EgC et EgCG.

Ainsi, lors de l'exposition du modèle cellulaire aux deux tanins concentrés, nous avons pu observer l'apparition d'amas protéiques compacts. Les mucines étant largement représentées dans la pellicule mucosale, ce phénomène résulterait d'une précipitation des mucines par les tanins. La taille des agrégats observés était de l'ordre de quelques µm. Nos observations sont cohérentes avec la modification de la structure des mucines observée par Davies *et al.* (2014) sous l'effet de tanins. En effet, l'ajout d'EgCG 1 mM à une solution de mucines purifiées provoque l'augmentation du taux de sédimentation des MUC5B, traduisant la formation de structures plus denses (Davies, Pudney et al. 2014). Leurs observations par AFM ont révélé la formation d'agrégats de quelques µm de diamètre pour des concentrations en EgCG de 0,3 mM. Toutefois le phénomène semble débuter par la formation d'agrégats plus petits, de quelques centaines de nm.

A faible concentration (0,05 mM), nous avons aussi observé la présence d'agrégats denses et compacts ; cependant le phénomène semble moins prononcé, notamment dans le cas de l 'EgC. Une constriction du réseau des MUC5B en solution a été observé pour des concentrations de 0,075 mM en EgCG (Davies, Pudney et al. 2014). Ces résultats indiquent que même une faible concentration d'EgCG peut être suffisante pour induire une réorganisation du réseau de protéines (mucines en particulier).

L'EgCG présente une substitution d'un groupement hydroxyle par un acide gallique par rapport à l'EgC. Ce cycle aromatique supplémentaire permet à l'EgCG de ponter deux protéines ensemble et de les précipiter plus efficacement (Haslam, Lilley et al. 1992). D'un point de vue qualitatif, nous n'avons cependant pas observé de différence évidente entre la structure des agrégats formés par les deux tanins testés à forte concentration. A la plus faible concentration, en revanche, l'altération du réseau protéique en surface des cellules était plus marquée pour l'EgCG comme attendu.

Il a été observé au MEB des zones où la pellicule semble conserver sa structure initiale, suggérant que les mucines dans ces zones ne sont pas agrégées. Cette réorganisation hétérogène a aussi été observée par Davies *et al.* (2014). Il a été proposé que la liaison de l'EgCG aux mucines est

178

initiée par des effets hydrophobes, suivi d'interactions hydrogène avec les groupements phénoliques des tanins (Haslam, Lilley et al. 1992, Zhao, Chen et al. 2012). Les tanins ne semblent pas se lier aux régions glycosylées des mucines (Zhao, Chen et al. 2012, Davies, Pudney et al. 2014), de ce fait, une grande partie des complexes formés non-agrégés.

4.1.2. Modification de la structure globale de la pellicule : observations à l'échelle du tapis cellulaire

En parallèle, nous avons évalué l'effet des deux tanins sur la pellicule salivaire, en quantifiant le tapissage des cellules par les MUC5B, la taille moyenne des dépôts de mucines et la quantité de MUC5B retenues en surface des cellules.

Quand la muqueuse modèle est exposée à une concentration en tanins de 1 mM, il a été observé une diminution du tapissage de plus de 68 % avec l'EgCG et de 57 % avec l 'EgC par rapport au témoin non traité avec les tanins. Pour les concentrations faibles, une diminution du tapissage, non significative, a aussi été observée. Ces observations sont à mettre en relation avec l'agrégation des mucines décrite précédemment. En effet, le passage d'un réseau lâche de mucine à la formation d'agrégats compacts induirait une rétractation de la pellicule.

Cette diminution du tapissage est associée à une diminution de l'intensité de fluorescence des échantillons que l'on peut associer à une quantité de mucines réduite. Deux hypothèses peuvent être proposées pour expliquer cette fluorescence moindre. La formation d'agrégats compacts MUC5B-tanin pourrait limiter la fixation de l'anticorps. Cependant l'anticorps utilisé reconnaît un épitope situé au niveau des glycosylations (Veerman, Bolscher et al. 1997), qui, a priori, ne sont pas affectées par la fixation des tanins (Zhao, Chen et al. 2012). La seconde hypothèse que l'on peut proposer est que l'agrégation des mucines par les tanins provoquerait leur décrochage des cellules. Les agrégats ainsi détachés seraient éliminés lors du retrait de l'excédent de solution de tanins et des différentes étapes de l'immunomarquage, ce qui expliquerait en même temps la diminution du tapissage par les mucines.

Deux études *in vitro* semblent en apparente contradiction avec nos résultats. Ainsi, Joiner *et al.* (2004) ont observé qu'une pellicule formée *in vitro* sur une surface hydrophobe devenait moins éluable après traitement par l'EgCG 0,015 % (Joiner, Muller et al. 2004). Il a aussi été montré que lorsqu'elles étaient mélangées avec de l 'EgCG à 0,1 %, les mucines adhéraient mieux sur un substrat en verre, mais subissait aussi une désorption plus rapide lors d'un rinçage à l'eau que lorsqu'elles sont pures (McColl, Horvath et al. 2009).

In vivo, après rinçage de la bouche avec un mélange commercial de tanins, Lee *et al*. (2012) ont rapporté qu'ils n'observaient pas de décrochage des mucines des muqueuses (évalué en dosant les

mucines dans la salive recrachée) (Lee, Ismail et al. 2012). Cependant, on ne connaît pas la composition exacte du mélange (« > 65 % de phénols »). Par contre, nos résultats sont cohérents avec ceux de Zadoroznyj et al. (2012) qui observaient aussi une diminution de l'intensité de fluorescence (traduisant une moindre quantité de MUC5B retenues) sur des cellules buccales prélevées après rinçage de la bouche avec une solution d'acide tannique à 0,5 mM par rapport à après un rinçage à l'eau. Ces exemples illustrent bien que la structure et de la concentration des tanins d'une part, et la surface d'adhésion (surface synthétique vs cellules) d'autre part peuvent conduire à des effets différents sur la rétention des mucines.

Bien qu'aucune différence significative n'ait été observée, nous avons constaté que l'EgCG avait un effet plus marqué sur la pellicule que l'EgC, ce qui peut s'expliquer par la présence d'un acide gallique supplémentaire sur le premier des deux composés qui permettrait le pontage de deux protéines entre elles et la formation d'agrégats.

4.1.3. Implications sensorielles

Une sensation en bouche « normale » se caractérise par une absence de sensation d'abrasion entre les surfaces de frottement (palais et langue). Elle est permise par la salive, dont une des fonctions premières est de maintenir l'hydratation de la muqueuse orale et de limiter l'abrasion (Dawes, Pedersen et al. 2015). Les propriétés de lubrification de la salive sont dues à sa composition, majoritairement de l'eau, mais aussi de nombreuses protéines dont des mucines MUC5B et MUC7 (Inoue, Ono et al. 2008).

Il existe différents régimes de lubrification selon que l'on parle de la salive « libre » présente dans la bouche, du film recouvrant les surfaces, ou de la salive adsorbée aux surfaces orales (muqueuse et dents) (Coles, Chang et al. 2010). La lubrification des surfaces orales s'inscrit dans un régime de lubrification mixte (film) ou d'interface (pellicule) (Figure 8). Veeregonda *et al.* (2012) ont montré le rôle primordial de la structure et de la glycosylation des protéines adsorbées dans la lubrification orale (Veeregowda, Busscher et al. 2012).

L'origine de la sensation d'astringence est un sujet controversé mais il est généralement admis qu'il s'agit d'un mécanisme multimodal (Gibbins and Carpenter 2013). Parmi les mécanismes impliqués, Green a proposé qu'il s'agirait d'une sensation d'origine tactile induite par un changement de la texture de la surface orale (Green 1993).

Peu d'études sensorielles se sont intéressées au rôle de la pellicule mucosale dans la sensation d'astringence. Dans l'étude réalisée par Nayak *et al.* (2008), les sujets ont rapporté une intensité

d'astringence perçue plus importante après rinçage de la bouche. Dans cette situation, les protéines de la salive « libre » interagissant habituellement avec les tanins (PRP, histatines) sont éliminées, ce n'est donc pas la précipitation des protéines par les tanins qui serait responsable de la sensation (Nayak and Carpenter 2008).

In vitro, nous avons observé une modification de la structure de la pellicule en présence des tanins à une concentration supérieure au seuil de perception de l'astringence.

Des études tribologiques ont été réalisées sur des films pre-adsorbés (incubation avec de la salive pendant laquelle les protéines s'adsorbent, mais pas de rinçage pour éliminer le film) formés *in vitro* sur des surfaces hydrophobes. Ces études ont montré que l'exposition à des solutions de polyphénols entrainait une augmentation du module viscoélastique de la structure (Rossetti, Ravera et al. 2013) et de son coefficient de friction (Rossetti, Bongaerts et al. 2009). L'importance de la présence d'unités galloyles dans ces modifications a été soulignée.

Bien qu'on ne considère pas ici uniquement les protéines adsorbées, on peut, par analogie, proposer qu'*in vivo* ces modifications structurales du réseau de mucines ainsi que la diminution du tapissage de la muqueuse par les MUC5B induiraient des modifications des propriétés de surface de la pellicule mucosale. D'autre part, une diminution du tapissage des cellules par les protéines de la pellicule permettrait un accès des polyphénols aux cellules épithéliales, et la possibilité d'interagir, par exemple, avec les lipides de la membrane (Sun, Hung et al. 2009) (Sirk, Friedman et al. 2011), ou avec des récepteurs situés au niveau de l'épithélium.

Pour les concentrations en dessous du seuil de perception de l'astringence des composés, un effet (bien que moindre) des deux tanins sur la structure de la pellicule a été observé. Cette apparente discordance entre observations structurales et sensorielles peut avoir plusieurs explications. Il est d'abord important de noter que les seuils oro-sensoriels reportés dans la littérature sont des valeurs moyennes pour un groupe de sujets, pouvant varier d'un individu à l'autre. De plus, les mesures ont été faites sur des sujets ayant en bouche de la salive libre, ainsi qu'un film salivaire résiduel, et donc une quantité de protéines en bouche plus importante. Ce mécanisme de protection de la pellicule mucosale par la salive libre a donc été étudié plus avant dans la suite du travail.

4.2. PRP ET PROTECTION DE LA MUQUEUSE

Pour rappel, à une concentration d'EgCG (0,5 mM) en dessous du seuil de précipitation d'IB5, la présence d'IB5 ne modifiait pas l'effet du tanin sur la pellicule (en termes de tapissage, taille des dépôts et quantité de mucines retenues). Par contre, si l'on ajoute une solution d'EgCG 1 mM, soit une concentration au dessus du seuil de précipitation d'IB5, deux choses ont été constatées.

Premièrement d'un point de vue semi-quantitatif, le tapissage des cellules par MUC5B augmente pour se retrouver à une valeur proche de la condition témoin, alors qu'une diminution significative de cette mesure avait été constatée en présence d'EgCG 1 mM seul. Dans le même sens, l'intensité de fluorescence des échantillons en présence d'IB5 n'est pas significativement différente de la valeur témoin alors qu'elle l'était avec le tanin seul. Ces observations indiquent qu'IB5 intervient dans la prévention des interactions entre EgCG et la pellicule.

Deuxièmement, d'un point de vue qualitatif, l'aspect visuel de la pellicule en présence d'IB5 et d'EgCG 1 mM est très différent du témoin, d'IB5 + EgCG 0,5 mM et d'EgCG 1 mM. Dans ces conditions, nous nous situons à un ratio tanins/IB5 élevé. L'interaction entre IB5 et EgCG peut alors se décomposer en plusieurs étapes : la saturation des sites d'interactions de la protéine est suivi d'une agrégation métastable puis de la précipitation des agrégats formés lorsque le ratio tanin/protéine augmente (Pascal, Poncet-Legrand et al. 2007). En moyenne 3 tanins par protéines sont nécessaire pour réaliser le pontage et induire la formation d'agrégats (Canon, Pate et al. 2013). Le fait que l'on puisse observer un précipité alors que seules les MUC5B sont immuno-détectées peut se traduire par une agrégation des complexes IB5-EgCG avec les mucines de la pellicule. Un tel phénomène pourrait expliquer l'absence de mucines dans les solutions expectorées de tanins observée dans l'étude de Lee *et al.* (Lee, Ismail et al. 2012), ainsi que l'augmentation de la quantité de protéines salivaires adsorbée sur l'hydroxypatite après l'ajout d'EgCG (Joiner, Muller et al. 2004).

Les complexes PRP-EgCG formés lorsque la concentration en tanins est élevée sont insolubles et précipitent (Pascal, Poncet-Legrand et al. 2007, Canon, Pate et al. 2013), ainsi, leur fixation à la surface de la muqueuse pourrait perturber le réseau protéique et réduire la lubrification et augmenter la friction entre les surfaces orales.

5. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'étude menée ici a permis d'apporter des informations sur l'effet des polyphénols sur la structure de la pellicule mucosale. *In vitro*, les tanins EgC et EgCG diminuent le tapissage des cellules par les MUC5B et diminuent la quantité de MUC5B présente dans la pellicule. Cette modification de la structure de la pellicule peut s'expliquer notamment par la précipitation d'une partie des MUC5B constituant la pellicule. Il est possible que la contraction du réseau de mucine lors de sont agrégation avec les tanins fragilise son adhésion avec les cellules.

D'un point de vue sensoriel, cette altération de la structure des mucines et de la pellicule salivaire pourrait se traduire par une diminution de leurs propriétés de lubrification, et d'une augmentation de la friction entre les surfaces orales. La rétractation de la pellicule et la diminution du tapissage de la muqueuse par les mucines pourrait aussi permettre aux tanins excédentaires de venir interagir directement avec l'épithélium oral, soit directement avec les lipides membranaires, soit au niveau de chimiorécepteurs.

Pour confirmer ces observations, le modèle cellulaire pourrait être exposé à d'autres tanins, non galloylés notamment, présentant aussi un caractère astringent mais n'ayant pas la capacité à précipiter les protéines salivaires (Schwarz and Hofmann 2008).

D'autre part la présence d'une PRP basique, IB5, a permis de mettre en évidence un effet protecteur de cette protéine sur la pellicule vis à vis des tanins. La formation d'agrégats IB5-EgCG insolubles à forte concentration induit leur précipitation. Ces derniers venant s'adsorber à la surface de la muqueuse pourraient être à l'origine de la sensation de rugosité propre à l'astringence.

Si les bPRP ont été largement étudiées, la salive contient d'autres protéines capables d'interagir avec les tanins. Les PRP glycosylées semblent avoir un rôle important dans la lubrification de la muqueuse orale, mais il a été rapporté une interaction moindre avec les tanins, de même que pour les PRP acides (Lu and Bennick 1998). Une autre étude a montré qu'en réalité, les gPRP pouvaient interagir avec les tanins, mais sans être précipitées (Pascal, Poncet-Legrand et al. 2008). Il a aussi été observé que les alpha-amylase et les histatines pouvaient interagir avec les tanins (Yan and Bennick 1995). Au sein de la cavité orale, toutes ces protéines sont présentes, ainsi les interactions et la disponibilité des tanins pour accéder à la muqueuse dépendent de la quantité de chaque protéine et de son affinité pour les tanins. Le modèle *in vitro* développé pourrait permettre d'évaluer plus précisément le rôle de chaque protéine dans le piégeage des tanins et la protection de la muqueuse.

183

CHAPITRE 3

Le tapissage des cellules par les mucines et l'intensité de fluorescence des échantillons semblent les paramètres les plus pertinents pour mettre en évidence quantitativement l'effet des tanins sur la pellicule. Une tendance allant dans le sens d'une augmentation de la taille moyenne des dépôts de MUC5B avec l'augmentation de la concentration en tanin a été observée. Il serait intéressant de développer une méthode intégrant un seuillage des particules, en fonction de leur intensité de fluorescence puisque les agrégats formés semblent avoir une intensité de fluorescence plus intense afin de mettre en évidence l'apparition spécifique de ces derniers.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Les recherches portant la pellicule mucosale se multiplient depuis quelques années (Aroonsang, Sotres et al. 2014, Gibbins, Proctor et al. 2014, Gibbins, Yakubov et al. 2014, Morzel, Tai et al. 2014, Gibbins, Proctor et al. 2015). Cet engouement s'explique notamment par l'attribution de diverses propriétés à la pellicule. Les plus étudiées sont ses propriétés mécaniques et son rôle dans la lubrification orale (Yakubov, McColl et al. 2009, Veeregowda, Busscher et al. 2012) un déficit de lubrification étant associé à la sensation de bouche sèche ou xérostomie (Pramanik, Osailan et al. 2010, Pailler-Mattei, Vargiolu et al. 2015). Plus récemment, un rôle de la pellicule mucosale dans la perception de l'astringence et dans le phénomène de rémanence aromatique a été envisagé (Nayak and Carpenter 2008, Esteban-Fernandez, Rocha-Alcubilla et al. 2016).

Cette problématique globale, qui est de comprendre comment les molécules de la flaveur sont susceptibles d'interagir avec la muqueuse orale et comment ces interactions pourraient moduler leur perception, présente des enjeux de différentes natures.

Dans un premier temps, comprendre l'implication de la pellicule mucosale et de la muqueuse orale dans la perception est un enjeu d'ordre sociétal dans le sens où perception sensorielle d'une part et choix et prises alimentaires d'autre part sont intimement liés. Par exemple, la sécheresse orale et l'hyposalivation, qu'elles soient liées à l'âge ou à une pathologie, peuvent être la cause d'une altération de la perception (Logemann, Smith et al. 2001, Seow, Ong et al. 2016). La perte de la perception sensorielle des aliments peut entrainer la perte du plaisir de manger et des conséquences plus grave peuvent en découler : diminution de la prise alimentaire, perte de poids, dépression (Schiffman and Graham 2000). Mieux caractériser le rôle de la pellicule mucosale pourrait à terme conduire la communauté dentaire ou médicale à développer des stratégies (salive artificielle tapissante par exemple) prenant en compte ce rôle spécifique de la pellicule mucosale dans la perception.

La compréhension des paramètres en amont de la perception est aussi essentiel à la formulation de produits. Aujourd'hui, les interactions des molécules d'arôme avec les constituants de la matrice et avec les composants de la salive sont largement étudiées. Ces interactions sont maintenant prises en compte lors de l'évaluation de la libération de composés et de la perception des produits, mais les interactions avec la muqueuse restent encore peu étudiées. Il s'avère pourtant intéressant de considérer ce nouveau facteur du fait de l'utilisation croissante d'arômes dans la formulation alimentaire, par exemple pour compenser diverses réductions (sel, sucre, gras) (Syarifuddin, Septier et al. 2016). Les interactions entre pellicule mucosale et tanins sont également importantes à considérer dans le cadre de la formulation de produits enrichis en composés bénéfiques pour la santé tels que les polyphénols. Les polyphénols ont longtemps été associés à leurs propriétés antinutritionnelles. Pourtant, les recherches sur leurs effets positifs se sont considérablement développées, apportant des preuves en faveur de leur rôle bénéfique dans la prévention des maladies dégénératives, notamment les maladies cardiovasculaires, les cancers ou encore le diabète (Chung, Wong et al. 1998, Scalbert, Johnson et al. 2005). Néanmoins, la richesse en polyphénols peut impacter sur la palatabilité de l'aliment (Duffy, Rawal et al. 2016) et limiter leur consommation. Une meilleure compréhension de l'impact des tanins sur la muqueuse orale et la perception de l'astringence pourrait permettre de guider des choix de reformulation de produits.

Afin de répondre à la problématique globale de la thèse, un modèle *in vitro* de muqueuse orale est proposé au terme de ce travail. Ce modèle est constitué de cellules épithéliales orales recouvertes d'une pellicule mucosale constituée par l'ancrage spontané de protéines salivaire par incubation des cellules confluentes avec de la salive humaine totale clarifiée.

Les mécanismes de formation de la pellicule ont été étudiés à plusieurs reprises sur de surfaces synthétiques (Aroonsang, Sotres et al. 2014, Gibbins, Yakubov et al. 2014), mais ces surfaces diffèrent structuralement des cellules épithéliales, d'une part par l'absence des replis de la membrane et d'autre part par l'absence des protéines transmembranaires que l'on trouve en surface des cellules épithéliales utilisées dans cette étude. L'expression de la mucine membranaire MUC1 par la lignée cellulaire TR146 a permis d'apporter un argument en faveur du rôle de cette protéine dans l'ancrage des mucines salivaires aux cellules épithéliales en permettant une meilleure rétention des MUC5B salivaires par rapport aux cellules n'exprimant par MUC1. Ces résultats ont permis d'améliorer notre modèle, dans le sens où nous nous rapprochons un peu plus de la situation *in vivo* dans laquelle MUC1 est exprimée par les cellules de la muqueuse orale. Enfin, l'incubation des cellules avec de la salive humaine confère aux protéines salivaires une conformation spatiale réaliste. L'absence de séchage ou de fixation de la pellicule, comme cela a déjà été proposé dans un autre modèle (Teubl, Absenger et al. 2013), permet de ne pas modifier sa structure et ses propriétés qui sont probablement des paramètres influant sur les interactions avec les molécules de la flaveur.

Des études supplémentaires doivent être mises en œuvre pour mieux caractériser le modèle, notamment les propriétés de surfaces : hydrophobie, charges de surface... Un tel travail peut être mis en œuvre par AFM, qui en plus d'informations topographiques, peut apporter de nombreuses informations sur les propriétés de surface. Cela permettrait entre autres de voir comment l'ancrage des protéines salivaires se répercute sur ses propriétés de surfaces, de mieux comprendre les mécanismes d'adsorption des protéines salivaires, et les mécanismes d'interactions avec les composés de la flaveur.

Le choix d'utiliser un modèle cellulaire présente aussi des contraintes : entretien des lignées cellulaires, contraintes techniques (température, taux de CO₂, toxicité des composés utilisés vis-à-vis des cellules)... A ce stade et avant de poursuivre, il sera donc judicieux d'évaluer l'apport d'un tel modèle par rapport à une surface synthétique, plus simple d'usage. Pour ce faire, des études comparatives pourraient être envisagées. Néanmoins, le modèle développé a permis d'apporter des éléments de réponse sur l'objet de la thèse et plus globalement celui du projet MUFFIN, à savoir l'interaction entre muqueuse, pellicule mucosale et molécules de la flaveur.

La persistance aromatique a tout d'abord été étudiée. Celle-ci se caractérise par une libération prolongée de molécules d'arôme vers la cavité nasale. Elle serait associée à une persistance intraorale des molécules d'arôme (Buettner, Beer et al. 2002, Esteban-Fernandez, Rocha-Alcubilla et al. 2016). Ainsi, le second objectif de ce travail était de mettre en évidence la capacité des molécules d'arôme à interagir avec la muqueuse orale et la pellicule salivaire et d'évaluer l'effet de ces interactions sur la cinétique de libération des molécules. Pour cela, la muqueuse modèle, avec et sans pellicule salivaire a été exposée à différentes molécules d'arôme, et son effet sur le coefficient de partage des molécules et sur leur cinétique de libération a été étudié.

Deux mécanismes impactant sur la libération des molécules ont été observés :

 Le premier phénomène est lié à l'hydratation de la muqueuse. Nous avons en effet observé une diminution du coefficient de partage et des paramètres de libération des composés les plus hydrophiles en présence de la muqueuse ou du contrôle hydraté par rapport au contrôle sec. Ce phénomène s'explique par un effet de dilution de ces molécules dans la surface hydratée de la muqueuse et pourrait expliquer le comportement de composés hydrophiles tels que les pyrazines et le gaiacol dont la persistance importante a été reportée in vivo (Linforth and Taylor 2000, Sanchez-Lopez, Ziere et al. 2016). Le deuxième phénomène se rattache de façon large aux interactions directes entre molécules d'arôme et muqueuse et/ou pellicule mucosale. Bien que cela n'ait pas pu être mis en évidence, un effet de rétention des composés par des effets hydrophobes avec la surface des cellules et des interactions électrostatiques avec les régions chargées des protéines telle que les glycosylations des mucines de la pellicule salivaire ne sont pas à exclure. Toutefois, les interactions que nous avons observées entre muqueuse modèle et molécules d'arôme consistent principalement en des réactions enzymatiques. Ces réactions sont très probablement catalysées par des enzymes de métabolisation des xénobiotiques (EMX), telles que les cytochromes P450, la DXCR ou les carboxyesterases. L'identification des enzymes pourrait être réalisée grâce à l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques. Par exemple, l'aminobenzotriazole (ABT) est un inhibiteur connu du cytochrome P450 (Sun, Harper et al. 2011) et le Bis(4-nitrophenyl)phosphate (BNPP) inhibe les carboxyesterases (Hatfield and Potter 2011).

En termes de conséquences sensorielles, ces interactions, de quelque nature qu'elles soient, diminuent la quantité de molécules libérées. *In vivo*, une libération lente et prolongée pourrait participer à la rémanence de certains composés. Par ailleurs, la dégradation enzymatique des molécules observée dans l'étude est à l'origine de la production de nouvelles molécules d'arôme, qui pourraient elles aussi être à l'origine de la perception prolongée de certaines notes aromatiques.

Ces observations nous amènent à nous poser une question essentielle : un tel phénomène se produit-il *in vivo* ? Les muqueuses orales et nasales sont des sites d'exposition privilégiés aux xénobiotiques. L'action d'EMX a déjà été observée dans des cultures de muqueuse olfactive humaine (Zaccone, Goldsmith et al. 2015) et des ARNm du cytochrome P450 ont été identifiés au niveau de la muqueuse orale humaine (Vondracek, Xi et al. 2001) laissant penser que le phénomène peut se produire. Si ce n'est pas le cas, l'utilisation d'inhibiteurs pourrait permettre d'inhiber ces réactions « parasites » tout en conservant l'intérêt de l'utilisation de cellules.

Il semble donc intéressant d'étudier ce phénomène de métabolisation des molécules d'arôme, soit *in vitro* sur des cultures primaires de cellules épithéliales orales humaines, soit *in vivo* par des analyses de l'air de la cavité orale chez des sujets ayant consommé des solutions aromatisées, par APCI-MS ou PTR-MS. Déterminer un facteur de corrélation *in vitro - in vivo* permettrait pour la suite d'utiliser le modèle et de transposer les observations à l'homme, comme cela a déjà été fait avec les cellules TR146 pour divers composés (mannitol, testostérone, nicotine) (Nielsen and Rassing 2000, Nielsen and Rassing 2002).

Pour la suite dans le but d'établir un modèle mettant en lien les propriétés structurales de la molécule avec ses paramètres de libération de type « Quantitative Structure-Affinity Relationship » (QSAR), les futures molécules analysées devront être choisies à la fois sur des critères bibliographiques (molécules précédemment choisies dans des études portant sur la rémanence aromatique) et sur des critères établis à partir de descripteurs structuraux des molécules (Stanton and Jurs 1990, Stanton and Jurs 1992).

Une deuxième application du modèle était la compréhension des mécanismes intervenant dans la sensation d'astringence. L'astringence, cette sensation particulière de sècheresse et rugosité orale ressentie lors de la consommation d'aliments riches en tanins (thé, vin, fruit rouges), est une sensation trigéminale (Schobel, Radtke et al. 2014) attribuée en partie à la précipitation des protéines de la salive et plus particulièrement les PRP (Lu and Bennick 1998, Bajec and Pickering 2008). Des recherches ont suggéré que d'autres interactions, notamment avec la pellicule mucosale et la muqueuse orale interviendraient dans la perception de la sensation (Gibbins and Carpenter 2013).

En exposant la muqueuse modèle à l'EgC et l'EgCG, des modifications structurales de la pellicule par les deux polyphénols ont été mises en évidence. En effet, il a été observé une diminution du tapissage des cellules par les MUC5B associée à une diminution de la quantité de mucine retenue en surface des cellules suite à l'ajout de tanin. La présence d'agrégats de salive de quelques µm en surface de la pellicule a aussi été observée en présence de tanin. Ces modifications sont d'autant plus importantes que la concentration en tanins augmente, et significatives uniquement pour des concentrations situées au dessus des seuils orosensoriels de perception de l'astringence des composés. De plus, l'effet de l'EgCG qui est décrit comme plus astringent est plus marqué que celui de l'EgC.

De ces observations, nous avons proposé plusieurs implications sensorielles. La diminution du tapissage et la formation d'agrégats pourraient altérer les propriétés de lubrification de la pellicule, résultant en une augmentation de la friction entre les surfaces orales. Elles pourraient aussi permettre un accès direct des tanins à la muqueuse. Dans cette dernière configuration, la pellicule jouerait le rôle d'une « barrière biologique » protégeant l'épithélium oral.

In vivo, les tanins entrent dans un premier temps en contact avec la salive libre et/ou le film salivaire avant d'atteindre la pellicule salivaire et la muqueuse. Les sécrétions salivaires contiennent

189

notamment des PRP, connues pour leur capacité à fixer et complexer les tanins (Baxter, Lilley et al. 1997). En présence d'une PRP basique, IB5, nos observations suggèrent que l'ajout d'une concentration en tanins supérieure au seuil de précipitation de d'IB5 provoque la précipitation des complexes PRP-tanins sur la surface de l'épithélium oral. Le tapissage de la muqueuse par les protéines de la salive n'est pas altéré, appuyant l'hypothèse du rôle de piégeage et de protections de la muqueuse par les PRP basiques. La fixation des agrégats PRP-tanins précipités à la muqueuse pourrait être responsable de la sensation de friction.

Une stratégie pour vérifier ces hypothèses serait ici encore l'utilisation de l'AFM. Celle-ci propose différents modes de fonctionnement. On pourra citer le mode modulation de force (« peak force ») qui pourrait permettre de mesurer les différences de propriétés viscoélastiques de la pellicule. L'utilisation d'une pointe spécifique, telle qu'une pointe colloïdale (Berg, Rutland et al. 2003) serait envisageable pour évaluer les modifications des propriétés de lubrification de la pellicule en présence de tanins.

Il est important de garder en tête que certains polyphénols sont astringents alors qu'ils ne précipitent pas les protéines salivaires, c'est par exemple le cas de l'épicatéchine (Schwarz and Hofmann 2008). Cependant, la formation de complexes peut entrainer des changements de conformation des protéines salivaires et modifier leurs propriétés de lubrification. Ainsi, l'absence de précipitation n'est pas en contradiction avec la théorie d'une modification des propriétés rhéologiques de la salive, la formation de petites particules pouvant elle aussi induire une sensation de friction.

Pour conclure sur ce travail, le modèle *in vitro* d'épithélium oral développé a pu être appliqué à l'étude des mécanismes d'interactions entre la muqueuse orale et les molécules de la flaveur en prenant en compte le rôle de la pellicule mucosale.

Nous avons cependant été confrontés à des limites, difficultés et points à approfondir :

- La métabolisme des cellules TR146/MUC1 impacte les interactions avec les molécules d'arôme. Il est nécessaire de comparer la physiologie de cette lignée à celle des cellules orales *in vivo* pour établir des corrélations.
- Les composés utilisés peuvent s'avérer toxiques à certaines concentrations, il n'est donc pas toujours possible de trouver le juste équilibre entre paramètres analytiques (limites de détection et de quantification) et viabilité cellulaire.

- La dimension du modèle (surface du modèle/volume du flaconnage) est aussi limitée, ce qui limite la quantité de molécules d'arôme dans l'espace de tête.
- De façon générale en microscopie, nous avons constaté un certain manque de répétabilité des images, qui pourrait être dû à une variabilité biologique (ex : stade du cycle cellulaire) ou expérimentale.

Néanmoins, ce travail s'est avéré être un travail préliminaire essentiel, particulièrement dans l'étude de la contribution spécifique de la pellicule mucosale aux phénomènes étudiés. Ce modèle a en effet permis de s'affranchir d'une partie de la complexité de la situation *in vivo*, par exemple l'apport en continu de nouvelle salive sécrétée, ou la variabilité physiologique en termes de flux, volume de cavité orale, composition salivaire et flux respiratoire.

Pour poursuivre ce travail, il serait intéressant d'étudier comment la variabilité individuelle de la composition de salive influe sur la composition de la pellicule, par une approche protéomique, et sur sa structure, par une approche microscopique.

Les potentielles différences pourraient avoir un impact sur les libérations des arômes puisque la variabilité individuelle de composition salivaire semble être responsable de différence de libération (Munoz, Feron et al. 2016). Cela pourra être appliqué à l'étude de populations spécifiques pour lesquelles des différences ont déjà été rapportées dans la littérature (Piombino, Genovese et al. 2014).

L'effet des tanins sur les différents modèles ainsi constitués pourrait aussi être étudié. En parallèle, il serait aussi intéressant de tester différentes compositions de salives modèles recouvrant la muqueuse avant l'ajout des tanins (par exemple des solutions d'aPRP gPRP, histatines, protéines seules ou en mélanges..). Au final, tous ces résultats pourront être mis en relation avec des données obtenues par analyses sensorielles sur la sensibilité individuelle à l'astringence.

Pourraient aussi être étudiées les interactions entre les deux modalités, astringence et persistance aromatique. La longueur en bouche du vin est un aspect essentiel de la qualité d'un vin. Comme nous l'avons vu dans l'état de l'art, les polyphénols exercent un effet sur la libération des arômes, à la fois en interagissant directement avec les molécules d'arôme (Lorrain, Tempere et al. 2013) mais également probablement par le biais de co-interactions avec les protéines salivaires. D'autre part la fixation des tanins aux protéines salivaires est influencée par la présence d'éthanol (Pascal, Poncet-Legrand et al. 2008), qui semble aussi avoir un effet sur la persistance de certaines

notes aromatiques dans les vins rouges (Baker and Ross 2014). Il serait donc intéressant d'étudier ce paramètre tout en prenant en compte la viabilité du matériel cellulaire.

Enfin, les pellicules salivaires sont le siège de la formation des biofilms (Scannapieco 1994) et l'étude de la possibilité d'intégrer le microbiote oral au modèle pourra être considéré.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Adler, E., M. A. Hoon, K. L. Mueller, J. Chandrashekar, N. J. Ryba and C. S. Zuker (2000). "A novel family of mammalian taste receptors." <u>Cell</u> **100**(6): 693-702.

Aframian, D. J., T. Davidowitz and R. Benoliel (2006). "The distribution of oral mucosal pH values in healthy saliva secretors." <u>Oral Dis</u> **12**(4): 420-423.

Amerongen, A. V. and E. C. Veerman (2002). "Saliva--the defender of the oral cavity." <u>Oral Dis</u> **8**(1): 12-22.

Andriot, I., M. Harrison, N. Fournier and E. Guichard (2000). "Interactions between Methyl Ketones and Beta-Lactoglobulin: Sensory Analysis, Headspace Analysis, and Mathematical Modeling." <u>Journal of Agricultural and Food Chemistry</u> **48**: 4246-4251.

Aronson, J. and S. E. Ebeler (2004). "Effect of polyphenol compounds on the headspace volatility of flavors." <u>American Journal of Enology and Viticulture</u> **55**(1): 13-21.

Aroonsang, W., J. Sotres, Z. El-Schich, T. Arnebrant and L. Lindh (2014). "Influence of substratum hydrophobicity on salivary pellicles: organization or composition?" <u>Biofouling</u> **30**(9): 1123-1132.

Asikainen, P., J. J. Mikkonen, T. J. Ruotsalainen, A. P. Koistinen and A. M. Kullaa (2014). "Microstructure of the Superficial Epithelial Cells of the Human Oral Mucosa." <u>Ultrastructural</u> <u>Pathology</u> **38**(1): 6-12.

Asikainen, P., T. J. Ruotsalainen, J. J. Mikkonen, A. Koistinen, C. Ten Bruggenkate and A. M. Kullaa (2012). "The defence architecture of the superficial cells of the oral mucosa." <u>Med Hypotheses</u> **78**(6): 790-792.

Asikainen, P., E. Sirvio, J. J. Mikkonen, S. P. Singh, E. A. Schulten, C. M. ten Bruggenkate, A. P. Koistinen and A. M. Kullaa (2015). "Microplicae--Specialized Surface Structure of Epithelial Cells of Wet-Surfaced Oral Mucosa." <u>Ultrastruct Pathol</u> **39**(5): 299-305.

ASTM (1989). Standard definitions of terms relating to sensory evaluation of materials and products. <u>Annulal Book of ASTM Standards</u>. Philadelphia, American Society of Testing and Materials. **15.070**: 2.

Athes, V., M. P. Y. Lillo, C. Bernard, R. Perez-Correa and I. Souchon (2004). "Comparison of experimental methods for measuring infinite dilution volatilities of aroma compounds in water/ethanol mixtures." Journal of Agricultural and Food Chemistry **52**(7): 2021-2027.

Avison, S., K. van Gruijthuijsen, M. Pascu, A. Parker and I. Bodnar (2015). "Novel Methodology for Measuring Temperature-Dependent Henry's Constants of Flavor Molecules." <u>J Agric Food Chem</u> **63**(28): 6313-6318.

Baek, I., R. S. T. Linforth, A. Blake and A. J. Taylor (1999). "Sensory perception is related to the rate of change of volatile concentration in-nose during eating of model gels." <u>Chemical Senses</u> **24**(2): 155-160.

Bajec, M. R. and G. J. Pickering (2008). "Astringency: mechanisms and perception." <u>Crit Rev Food Sci</u> <u>Nutr</u> **48**(9): 858-875. Baker, A. K. and C. F. Ross (2014). "Wine finish in red wine: The effect of ethanol and tannin concentration." <u>Food Quality and Preference</u> **38**: 65-74.

Bansil, R. and B. S. Turner (2006). "Mucin structure, aggregation, physiological functions and biomedical applications." <u>Current Opinion in Colloid & Interface Science</u> **11**(2-3): 164-170.

Bate-Smith, E. and T. Swain (1962). "Flavonoid compounds." <u>Comparative biochemistry</u> **3**: 755-809.

Baxter, N. J., T. H. Lilley, E. Haslam and M. P. Williamson (1997). "Multiple interactions between polyphenols and a salivary proline-rich protein repeat result in complexation and precipitation." <u>Biochemistry</u> **36**(18): 5566-5577.

Bennick, A. (1982). "Salivary proline-rich proteins." <u>Mol Cell Biochem</u> **45**(2): 83-99.

Berg, I. C. H., M. W. Rutland and T. Arnebrant (2003). "Lubricating properties of the initial salivary pellicle - an AFM Study." <u>Biofouling</u> **19**(6): 365-369.

Biasioli, F., C. Yeretzian, T. D. Märk, J. Dewulf and H. Van Langenhove (2011). "Direct-injection mass spectrometry adds the time dimension to (B)VOC analysis." <u>TrAC Trends in Analytical Chemistry</u> **30**(7): 1003-1017.

Blake, R. S., P. S. Monks and A. M. Ellis (2009). "Proton-transfer reaction mass spectrometry." <u>Chem</u> <u>Rev</u> **109**(3): 861-896.

Boegh, M., S. G. Baldursdottir, A. Mullertz and H. M. Nielsen (2014). "Property profiling of biosimilar mucus in a novel mucus-containing in vitro model for assessment of intestinal drug absorption." <u>Eur</u> <u>J Pharm Biopharm</u> **87**(2): 227-235.

Boegh, M. and H. M. Nielsen (2015). "Mucus as a Barrier to Drug Delivery – Understanding and Mimicking the Barrier Properties." <u>Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology</u> **116**: 179-186.

Bohren, K. M., B. Bullock, B. Wermuth and K. H. Gabbay (1989). "The aldo-keto reductase superfamily - cDNA and deduced amino-acid sequences of human aldehyde and aldose reductases." Journal of Biological Chemistry **264**(16): 9547-9551.

Boisard, L., I. Andriot, C. Martin, C. Septier, V. Boissard, C. Salles and E. Guichard (2014). "The salt and lipid composition of model cheeses modifies in-mouth flavour release and perception related to the free sodium ion content." <u>Food Chem</u> **145**: 437-444.

Boisard, L., C. Tournier, E. Sémon, E. Noirot, E. Guichard and C. Salles (2014). "Salt and fat contents influence the microstructure of model cheeses, chewing/swallowing and in vivoaroma release." Flavour and Fragrance Journal **29**(2): 95-106.

Boland, A. B., K. Buhr, P. Giannouli and S. M. van Ruth (2004). "Influence of gelatin, starch, pectin and artificial saliva on the release of 11 flavour compounds from model gel systems." <u>Food Chemistry</u> **86**(3): 401-411.

Boze, H., T. Marlin, D. Durand, J. Perez, A. Vernhet, F. Canon, P. Sarni-Manchado, V. Cheynier and B. Cabane (2010). "Proline-rich salivary proteins have extended conformations." <u>Biophys J</u> **99**(2): 656-665.

Bradway, S. D., E. J. Bergey, P. C. Jones and M. J. Levine (1989). "Oral mucosal pellicle : adsorption and transpeptidation of salivary components to buccal epithelial cells." <u>Biochemical Journal</u> **261**(3): 887-896.

Bradway, S. D., E. J. Bergey, F. A. Scannapieco, N. Ramasubbu, S. Zawacki and M. J. Levine (1992). "Formation of salivary mucosal pellicle : the role of transglutaminase." <u>Biochemical Journal</u> **284**: 557-564.

Brossard, N., H. Cai, F. Osorio, E. Bordeu and J. Chen (2016). ""Oral" Tribological Study on the Astringency Sensation of Red Wines." Journal of Texture Studies **47**(5): 392-402.

Buck, L. and R. Axel (1991). "A Novel Multigene Family May Encode Odorant Receptors - A Molecular-Basis For Odor Recognition." <u>Cell</u> **65**(1): 175-187.

Buettner, A. (2002). "Influence of Human Saliva on Odorant Concentrations. 2. Aldehydes, Alcohols, 3-Alkyl-2-methoxypyrazines, Methoxyphenols, and 3-Hydroxy-4,5-dimethyl-2(5H)-furanone." Journal of Agricultural and Food Chemistry **50**: 7105-7110.

Buettner, A. (2002). "Influence of Human Salivary Enzymes on Odorant Concentration Changes Occurring in Vivo. 1. Esters and Thiols." Journal of Agricultural and Food Chemistry **50**: 3283-3289.

Buettner, A. (2004). "Investigation of Potent Odorants and Afterodor Development in Two Chardonnay Wines Using the Buccal Odor Screening System (BOSS)." <u>Journal of Agricultural and Food Chemistry</u> **52**: 2339–2346.

Buettner, A., A. Beer, C. Hannig and M. Settles (2001). "Observation of the swallowing process by application of videofluoroscopy and real-time magnetic resonance imaging-consequences for retronasal aroma stimulation." <u>Chemical Senses</u> **26**(9): 1211-1219.

Buettner, A., A. Beer, C. Hannig, M. Settles and P. Schieberle (2002). "Quantitation of the In-Mouth Release of Heteroatomic Odorants." **826**: 296-311.

Buettner, A. and M. Mestres (2005). "Investigation of the Retronasal Perception of Strawberry Aroma Aftersmell Depending on Matrix Composition." Journal of Agricultural and Food Chemistry **53**: 1661-1669.

Buettner, A. and P. Schieberle (2000). "Exhaled Odorant Measurement (EXOM) — A New Approach to Quantify the Degree of In-mouth Release of Food Aroma Compounds." <u>LWT - Food Science and</u> <u>Technology</u> **33**(8): 553-559.

Buettner, A. and P. Schieberle (2000). "Infuence of mastication on the concentrations of aroma volatiles and some aspects of favour release and favour perception." <u>Food Chemistry</u> **71**: 347-354.

Buettner, A. and F. Welle (2004). "Intra-oral detection of potent odorants using a modified stir-bar sorptive extraction system in combination with HRGC-O, known as the buccal odour screening system (BOSS)." <u>Flavour and Fragrance Journal</u> **19**(6): 505-514.

Buffo, R. A., J. A. Rapp, T. Krick and G. A. Reineccius (2005). "Persistence of aroma compounds in human breath after consuming an aqueous model aroma mixture." <u>Food Chemistry</u> **89**(1): 103-108.

Burger, K. S., M. A. Cornier, J. Ingebrigtsen and S. L. Johnson (2011). "Assessing food appeal and desire to eat: the effects of portion size & energy density." <u>Int J Behav Nutr Phys Act</u> **8**: 101.

Buttery, R. G., L. C. Ling and D. G. Guadagni (1969). "Volatilities of Aldehydes, Ketones, and Esters in Dilute Water Solution." Journal of Agricultural and Food Chemistry **17**: 385-389.

Bylaite, E., J. Adler-Nissen and A. S. Meyer (2005). "Effect of xanthan on flavor release from thickened viscous food model systems." <u>J Agric Food Chem</u> **53**(9): 3577-3583.

Canon, F., A. Giuliani, F. Pate and P. Sarni-Manchado (2010). "Ability of a salivary intrinsically unstructured protein to bind different tannin targets revealed by mass spectrometry." <u>Analytical and Bioanalytical Chemistry</u> **398**(2): 815-822.

Canon, F., A. R. Milosavljević, G. van der Rest, M. Réfrégiers, L. Nahon, P. Sarni-Manchado, V. Cheynier and A. Giuliani (2013). "Photodissociation and dissociative photoionization mass spectrometry of proteins and noncovalent protein-ligand complexes." <u>Angewandte Chemie (International ed. in English)</u> **52**(32): 8377-8381.

Canon, F., S. Pages-Helary and E. Guichard (2015). "In nose concentration of aroma compounds is modified by salivary protein composition and saliva stimulation." <u>Chemical Senses</u> **40**(3): 237-237.

Canon, F., F. Pate, V. Cheynier, P. Sarni-Manchado, A. Giuliani, J. Perez, D. Durand, J. Li and B. Cabane (2013). "Aggregation of the Salivary Proline-Rich Protein IB5 in the Presence of the Tannin EgCG." Langmuir **29**(6): 1926-1937.

Canon, F., F. Pate, E. Meudec, T. Marlin, V. Cheynier, A. Giuliani and P. Sarni-Manchado (2009). "Characterization, stoichiometry, and stability of salivary protein-tannin complexes by ESI-MS and ESI-MS/MS." <u>Anal Bioanal Chem</u> **395**(8): 2535-2545.

Cardenas, M., T. Arnebrant, A. Rennie, G. Fragneto, R. K. Thomas and L. Lindh (2007). "Human saliva forms a complex film structure on alumina surfaces." <u>Biomacromolecules</u> **8**(1): 65-69.

Cardenas, M., U. Elofsson and L. Lindh (2007). "Salivary mucin MUC5B could be an important component of in vitro pellicles of human saliva: An in situ ellipsometry and atomic force microscopy study." <u>Biomacromolecules</u> **8**(4): 1149-1156.

Carpenter, G. H. (2013). "Do transient receptor protein (TRP) channels play a role in oral astringency?" Journal of Texture Studies **44**(5): 334-337.

Chana, A., A. Tromelin, I. Andriot and E. Guichard (2006). "Flavor release from iota-carrageenan matrix: A quantitative structure-property relationships approach." <u>Journal of Agricultural and Food</u> <u>Chemistry</u> **54**(10): 3679-3685.

Chang, W.-I., J.-Y. Chang, Y.-Y. Kim, G. Lee and H.-S. Kho (2011). "MUC1 expression in the oral mucosal epithelial cells of the elderly." <u>Archives of Oral Biology</u> **56**(9): 885-890.

Chastrette, M. (1997). "Trends in structure-odor relationships." <u>SAR QSAR Environ Res</u> **6**(3-4): 215-254.

Chauney, H. H., F. Lionetti, A. R. Winer and V. F. Lisanti (1954). "Enzymes of human saliva. I. The determination, distribution, and origin of whole saliva enzymes." Journal of Dental Research **33**: 321-334.

Chen, J. (2007). "Surface texture of foods: perception and characterization." <u>Crit Rev Food Sci Nutr</u> **47**(6): 583-598.

Chung, K. T., T. Y. Wong, C. I. Wei, Y. W. Huang and Y. Lin (1998). "Tannins and human health: a review." <u>Crit Rev Food Sci Nutr</u> **38**(6): 421-464.

Clydesdale, F. M. (2009). "Color as a factor in food choice." <u>Critical Reviews in Food Science and</u> <u>Nutrition</u> **33**: 83-101.

Codipilly, D. and I. Kleinberg (2008). "Generation of indole/skatole during malodor formation in the salivary sediment model system and initial examination of the oral bacteria involved." <u>J Breath Res</u> 2(1): 017017.

Coles, J. M., D. P. Chang and S. Zauscher (2010). "Molecular mechanisms of aqueous boundary lubrication by mucinous glycoproteins." <u>Current Opinion in Colloid & Interface Science</u> **15**(6): 406-416.

Collins, L. M. C. and C. Dawes (1987). "The surface area of the adult human mouth and thickness of the salivary film covering the teeth and oral mucosa." Journal of Dental Research **66**(8): 1300-1302.

Croom, E. (2012). "Metabolism of xenobiotics of human environments." <u>Prog Mol Biol Transl Sci</u> **112**: 31-88.

D'Agostino, E. M., D. Rossetti, D. Atkins, D. Ferdinando and G. E. Yakubov (2012). "Interaction of tea polyphenols and food constituents with model gut epithelia: the protective role of the mucus gel layer." J Agric Food Chem **60**(12): 3318-3328.

Davies, H. S., P. D. A. Pudney, P. Georgiades, T. A. Waigh, N. W. Hodson, C. E. Ridley, E. W. Blanch and D. J. Thornton (2014). "Reorganisation of the salivary mucin network by dietary components: insights from green tea polyphenols." <u>PloS one</u> **9**(9): e108372.

Dawes, C. (1969). "The effects of flow rate and duration of stimulation on the concentrations of protein and the main electrolytes in human parotid saliva." <u>Archives of Oral Biology</u> **14**(3): 277-294.

Dawes, C. (2003). "Estimates, from salivary analyses, of the turnover time of the oral mucosal epithelium in humans and the number of bacteria in an edentulous mouth." <u>Archives of Oral Biology</u> **48**(5): 329-336.

Dawes, C. and C. Dong (1995). "The flow rate and electrolyte composition of whole saliva elicited by the use of sucrose containing and sugar free chewing gum." <u>Archives of Oral Biology</u> **40**(8): 699-705.

Dawes, C., A. M. Pedersen, A. Villa, J. Ekstrom, G. B. Proctor, A. Vissink, D. Aframian, R. McGowan, A. Aliko, N. Narayana, Y. W. Sia, R. K. Joshi, S. B. Jensen, A. R. Kerr and A. Wolff (2015). "The functions of human saliva: A review sponsored by the World Workshop on Oral Medicine VI." <u>Arch Oral Biol</u> **60**(6): 863-874.

de Freitas, V. and N. Mateus (2001). "Structural Features of Procyanidin Interactions with Salivary Proteins." J. Agric. Food Chem. **49**: 940-945.

de Loubens, C., A. Magnin, M. Doyennette, I. C. Trelea and I. Souchon (2011). "A biomechanical model of swallowing for understanding the influence of saliva and food bolus viscosity on flavor release." J <u>Theor Biol</u> **280**(1): 180-188.

Degrace-Passilly, P. and P. Besnard (2012). "CD36 and taste of fat." <u>Curr Opin Clin Nutr Metab Care</u> **15**(2): 107-111.

Déléris, I., A. Saint-Eve, M. Kauffmann, G. Feron and I. Souchon (2015). "Experimental Approaches To Better Understand the Retention of Aroma Compounds in Oro-Naso-Pharyngeal Cavities." **1191**: 147-170.

Deleris, I., A. Saint-Eve, A. Saglio, I. Souchon and J. C. Trelea (2016). "Insights in aroma compound retention by mucosa during consumption through mathematical modelling." <u>Journal of Food</u> <u>Engineering</u> **190**: 123-138.

Deleris, I., A. Saint-Eve, E. Semon, H. Guillemin, E. Guichard, I. Souchon and J. L. Le Quere (2013). "Comparison of direct mass spectrometry methods for the on-line analysis of volatile compounds in foods." Journal of Mass Spectrometry **48**(5): 594-607.

Denny, P., F. K. Hagen, M. Hardt, L. Liao, W. Yan, M. Arellanno, S. Bassilian, G. S. Bedi, P. Boontheung, D. Cociorva, C. M. Delahunty, T. Denny, J. Dunsmore, K. F. Faull, J. Gilligan, M. Gonzalez-Begne, F. Halgand, S. C. Hall, X. Han, B. Henson, J. Hewel, S. Hu, S. Jeffrey, J. Jiang, J. A. Loo, R. R. Ogorzalek Loo, D. Malamud, J. E. Melvin, O. Miroshnychenko, M. Navazesh, R. Niles, S. K. Park, A. Prakobphol, P. Ramachandran, M. Richert, S. Robinson, M. Sondej, P. Souda, M. A. Sullivan, J. Takashima, S. Than, J. Wang, J. P. Whitelegge, H. E. Witkowska, L. Wolinsky, Y. Xie, T. Xu, W. Yu, J. Ytterberg, D. T. Wong, J. R. Yates and S. J. Fisher (2008). "The Proteomes of Human Parotid and Submandibular/Sublingual Gland Salivas Collected as the Ductal Secretions." Journal of Proteome Research **7**(5): 1994-2006.

DiSabato-Mordarski, T. and I. Kleinberg (1996). "Measurement and comparison of the residual saliva on various oral mucosal and dentition surfaces in humans." <u>Archives of Oral Biology</u> **41**(7): 655-665.

Doyennette, M., C. de Loubens, I. Deleris, I. Souchon and I. C. Trelea (2011). "Mechanisms explaining the role of viscosity and post-deglutitive pharyngeal residue on in vivo aroma release: A combined experimental and modeling study." <u>Food Chem</u> **128**(2): 380-390.

Doyennette, M., I. Déléris, A. Saint-Eve, A. Gasiglia, I. Souchon and I. C. Trelea (2011). "The dynamics of aroma compound transfer properties in cheeses during simulated eating conditions." <u>Food</u> <u>Research International</u> **44**(10): 3174-3181.

Duffy, V. B., S. Rawal, J. Park, M. H. Brand, M. Sharafi and B. W. Bolling (2016). "Characterizing and improving the sensory and hedonic responses to polyphenol-rich aronia berry juice." <u>Appetite</u> **107**: 116-125.

Dufour, C. and C. L. Bayonove (1999). "Interactions between Wine Polyphenols and Aroma Substances. An Insight at the Molecular Level." Journal of Agricultural and Food Chemistry **47**(2): 678-684.

Ebert, B., M. Kisiela and E. Maser (2015). "Human DCXR - another 'moonlighting protein' involved in sugar metabolism, carbonyl detoxification, cell adhesion and male fertility?" <u>Biol Rev Camb Philos</u> <u>Soc</u> **90**(1): 254-278.

Eren, A. M., G. G. Borisy, S. M. Huse and J. L. Mark Welch (2014). "Oligotyping analysis of the human oral microbiome." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **111**(28): E2875-2884.

Esteban-Fernandez, A., N. Rocha-Alcubilla, C. Munoz-Gonzalez, M. V. Moreno-Arribas and M. A. Pozo-Bayon (2016). "Intra-oral adsorption and release of aroma compounds following in-mouth wine exposure." <u>Food Chem</u> **205**: 280-288.

Ettre, L. S., C. Welter and B. Kolb (1993). "Determination of gas-liquid partition coefficients by automatic equilibrium headspace-gas chromatography utilizing the phase ratio variation method." <u>Chromatographia</u> **35**(1): 73-84.

Fabre, M., V. Aubry and E. Guichard (2002). "Comparison of different methods: Static and dynamic headspace and solid-phase microextraction for the measurement of interactions between milk proteins and flavor compounds with an application to emulsions." Journal of Agricultural and Food Chemistry **50**(6): 1497-1501.

Fares, K., P. Landy, R. Guilard and A. Voilley "Physicochemical Interactions Between Aroma Compounds and Milk Proteins: Effect of Water and Protein Modification." <u>Journal of Dairy Science</u> **81**(1): 82-91.

Fenoll-Palomares, C., J. V. Munoz Montagud, V. Sanchiz, B. Herreros, V. Hernandez, M. Minguez and A. Benages (2004). "Unstimulated salivary flow rate, pH and buffer capacity of saliva in healthy volunteers." <u>Rev Esp Enferm Dig</u> **96**(11): 773-783.

Feron, G., C. Ayed, E. M. Qannari, P. Courcoux, H. Labouré and E. Guichard (2014). "Understanding aroma release from model cheeses by a statistical multiblock approach on oral processing." <u>PLoS</u> <u>One</u> **9**(4): e93113 (93115 p.).

Ferrer-Gallego, R., J. M. Hernandez-Hierro, J. C. Rivas-Gonzalo and M. T. Escribano-Bailon (2014). "Sensory evaluation of bitterness and astringency sub-qualities of wine phenolic compounds: synergistic effect and modulation by aromas." <u>Food Research International</u> **62**: 1100-1107.

Ferry, A. L., J. Hort, J. R. Mitchell, S. Lagarrigue and B. V. Pamies (2004). "Effect of amylase activity on starch paste viscosity and its implications for flavor perception." Journal of Texture Studies **35**(5): 511-524.

Flores, M. and A. Olivares (2008). "Release of aroma compounds from dry-fermented sausages as affected by antioxidant and saliva addition." <u>European Food Research and Technology</u> **228**(2): 283-290.

Flower, D. R. (1996). "The lipocalin protein family: Structure and function." <u>Biochemical Journal</u> **318**: 1-14.

Frank, D., G. T. Eyres, U. Piyasiri, M. Cochet-Broch, C. M. Delahunty, L. Lundin and I. M. Appelqvist (2015). "Effects of Agar Gel Strength and Fat on Oral Breakdown, Volatile Release, and Sensory Perception Using in Vivo and in Vitro Systems." <u>J Agric Food Chem</u> **63**(41): 9093-9102.

Friel, E. N. and A. J. Taylor (2001). "Effect of salivary components on volatile partitioning from solutions." Journal of Agricultural and Food Chemistry **49**(8): 3898-3905.

Furlan, A. L., A. Castets, F. Nallet, I. Pianet, A. Grélard, E. J. Dufourc and J. Géan (2014). "Red Wine Tannins Fluidify and Precipitate Lipid Liposomes and Bicelles. A Role for Lipids in Wine Tasting?" Langmuir **30**(19): 5518-5526.

Gaillet, M., C. Sulmont-Rossé, S. Issanchou, C. Chabanet and S. Chambaron (2013). "Priming effects of an olfactory food cue on subsequent food-related behaviour." <u>Food Quality and Preference</u> **30**(2): 274-281.

Galindo, M. M., N. Voigt, J. Stein, J. van Lengerich, J. D. Raguse, T. Hofmann, W. Meyerhof and M. Behrens (2012). "G protein-coupled receptors in human fat taste perception." <u>Chem Senses</u> **37**(2): 123-139.

Garattini, E., M. Fratelli and M. Terao (2009). "The mammalian aldehyde oxidase gene family." <u>Human Genomics</u> **4**(2): 119-130.

Genovese, A., N. Caporaso, A. Civitella and R. Sacchi (2014). "Effect of human saliva and sip volume of coffee brews on the release of key volatile compounds by a retronasal aroma simulator." <u>Food</u> <u>Research International</u> **61**: 100-111.

Genovese, A., L. Moio, R. Sacchi and P. Piombino (2015). "Sip volume affects oral release of wine volatiles." <u>Food Research International</u> **77**: 426-431.

Genovese, A., P. Piombino, A. Gambuti and L. Moio (2009). "Simulation of retronasal aroma of white and red wine in a model mouth system. Investigating the influence of saliva on volatile compound concentrations." Food Chemistry 114(1): 100-107.

Gerhold, K. A. and D. M. Bautista (2009). Molecular and Cellular Mechanisms of Trigeminal Chemosensation. <u>International Symposium on Olfaction and Taste</u>. T. E. Finger. Oxford, Blackwell Publishing. **1170**: 184-189.

Gibbins, H. L. and G. H. Carpenter (2013). "ALTERNATIVE MECHANISMS OF ASTRINGENCY - WHAT IS THE ROLE OF SALIVA?" Journal of Texture Studies **44**(5): 364-375.

Gibbins, H. L., G. B. Proctor, G. E. Yakubov, S. Wilson and G. H. Carpenter (2014). "Concentration of salivary protective proteins within the bound oral mucosal pellicle." <u>Oral Diseases</u> **20**(7): 707-713.

Gibbins, H. L., G. B. Proctor, G. E. Yakubov, S. Wilson and G. H. Carpenter (2015). "SIgA Binding to Mucosal Surfaces Is Mediated by Mucin-Mucin Interactions." <u>Plos One</u> **10**(3): 13.

Gibbins, H. L., G. E. Yakubov, G. B. Proctor, S. Wilson and G. H. Carpenter (2014). "What interactions drive the salivary mucosal pellicle formation?" <u>Colloids and Surfaces B-Biointerfaces</u> **120**: 184-192.

Giebultowicz, J., R. Wolinowska, A. Sztybor, M. Pietrzak, P. Wroczynski and J. Wierzchowski (2009). "Salivary Aldehyde Dehydrogenase: Activity towards Aromatic Aldehydes and Comparison with Recombinant ALDH3A1." <u>molecules</u> **14**: 2363-2372.

Gierczynski, I., E. Guichard and H. Laboure (2011). "Aroma perception in dairy products: the roles of texture, aroma release and consumer physiology. A review." <u>Flavour and Fragrance Journal</u> **26**(3): 141-152.

Goldner, M., P. di Leo Lira, C. van Baren and A. Bandoni (2011). "Influence of polyphenol levels on the perception of aroma in Vitis vinifera cv. Malbec wines." <u>S. Afr. J. Enol. Vitic.</u> **32**: 21-27.

Gothefors, L. and S. Marklund (1975). "Lactoperoxidase activity in human milk and in saliva of newborn infants." <u>Infection and Immunity</u> **11**(6): 1210-1215.

Green, B. G. (1993). "Oral astringency: A tactile component of flavor." <u>Acta Psychologica</u> 84: 119-125.

Griffin, M., R. Casadio and C. M. Bergamini (2002). "Transglutaminases: nature's biological glues." <u>Biochem J</u> **368**(Pt 2): 377-396.

Guichard, E. (2006). "Flavour retention and release from protein solutions." <u>Biotechnology</u> <u>Advances</u> **24**(2): 226-229.

Guichard, E., S. Issanchou, A. Descourvieres and P. Etievant (1991). "Pectin concentration, molecular-weight and degree of esterification - influence on volatile composition and sensory characteristics of strawberry jam." Journal of Food Science **56**(6): 1621-1627.

Hagerman, A. E. and L. G. Butler (1981). "The specificity of proanthocyanidin-protein interactions." <u>J</u> <u>Biol Chem</u> **256**(9): 4494-4497.

Hahn Berg, I. C., L. Lindh and T. Arnebrant (2004). "Intraoral lubrication of PRP-1, statherin and mucin as studied by AFM." <u>Biofouling</u> **20**(1): 65-70.

Hanisch and Müller (2000). "MUC 1 : the polymorphic appearance of a human mucin." <u>Glycobiology</u> **10**: 439-449.

Hannig, M. and A. Joiner (2006). "The structure, function and properties of the acquired pellicle." <u>Monographs in oral science</u> **19**: 29-64.

Hansel, A., A. Jordan, R. Holzinger, P. Prazeller, W. Vogel and W. Lindinger (1995). "Proton transfer reaction mass spectrometry: on-line trace gas analysis at the ppb level." <u>International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes</u> **149/150** 609-619.

Hansson, A., P. Giannouli and S. Van Ruth (2003). "The influence of gel strength on aroma release from pectin gels in a model mouth and in vivo, monitored with proton-transfer-reaction mass spectrometry." Journal of Agricultural and Food Chemistry **51**(16): 4732-4740.

Hara, K., M. Ohara, I. Hayashi, T. Hino, R. Nishimura, Y. Iwasaki, T. Ogawa, Y. Ohyama, M. Sugiyama and H. Amano (2012). "The green tea polyphenol (-)-epigallocatechin gallate precipitates salivary proteins including alpha-amylase: biochemical implications for oral health." <u>Eur J Oral Sci</u> **120**(2): 132-139.

Haslam, E., T. H. Lilley, E. Warminski, H. Liao, Y. Cai, R. Martin, S. H. Gaffney, P. N. Goulding and G. Luck (1992). "Polyphenol complexion - A study in molecular recognitionP." <u>Acs Symposium Series</u> **506**: 8-50.

Hatfield, M. J. and P. M. Potter (2011). "Carboxylesterase inhibitors." <u>Expert opinion on therapeutic</u> <u>patents</u> **21**(8): 1159-1171.

Hay, D. I. (1967). "The adsorption of salivary proteins by hydroxyapatite and enamel." <u>Archives of oral biology</u> **12**(8): 937-946.

Heenan, S., C. Soukoulis, P. Silcock, A. Fabris, E. Aprea, L. Cappellin, T. D. Märk, F. Gasperi and F. Biasioli (2012). "PTR-TOF-MS monitoring of in vitro and in vivo flavour release in cereal bars with varying sugar composition." <u>Food Chemistry</u> **131**(2): 477-484.

Heilig, A., A. Sonne, P. Schieberle and J. Hinrichs (2016). "Determination of Aroma Compound Partition Coefficients in Aqueous, Polysaccharide, and Dairy Matrices Using the Phase Ratio Variation Method: A Review and Modeling Approach." J Agric Food Chem **64**(22): 4450-4470.

Heinisch, J. J., P. N. Lipke, A. Beaussart, S. El Kirat Chatel, V. Dupres, D. Alsteens and Y. F. Dufrêne (2012). "Atomic force microscopy – looking at mechanosensors on the cell surface." <u>Journal of Cell</u> <u>Science</u> **125**(18): 4189-4195.

Hodgson, M., R. S. Linforth and A. J. Taylor (2003). "Simultaneous real-time measurements of mastication, swallowing, nasal airflow, and aroma release." <u>J Agric Food Chem</u> **51**(17): 5052-5057.

Hodgson, M., R. S. T. Linforth and A. J. Taylor (2003). "Simultaneous Real-Time Measurment of Mastication, Swallowing, Nasal Airflow, and Aroma Release." Journal of Agricultural and Food <u>Chemistry</u> **51**: 5052-5057.

Hollowood, T. A., R. S. Linforth and A. J. Taylor (2002). "The effect of viscosity on the perception of flavour." <u>Chem Senses</u> **27**(7): 583-591.

Hori, Y., H. Sugiyama, T. Soma and K. Nishida (2007). "Expression of membrane-associated mucins in cultivated human oral mucosal epithelial cells." <u>Cornea</u> **26**(9): S65-S69.

Hsu, L. C., W. C. Chang, L. Hiraoka and C. L. Hsieh (1994). "Molecular-cloning, genomic organization, and chromosomal localization of an additional human aldehyde dehydrogenase gene, ALDH6." <u>Genomics</u> **24**(2): 333-341.

Humphrey, S. P. and R. T. Williamson (2001). "A review of saliva: Normal composition, flow, and function." Journal of Prosthetic Dentistry **85**(2): 162-169.

Hussein, M. M., Kachikian and A. M. Pidel (1983). "Analysis for Flavor Residuals In the Mouth by Gas Chromatography." Journal of Food Science **48**: 1884-1885.

Hussein, M. M., R. Kachikian and A. R. Pidel (1983). "Analysis for Flavor Residuals in the Mouth by Gas Chromatography." Journal of Food Science **48**(6): 1884-1885.

Inoue, H., K. Ono, W. Masuda, T. Inagaki, M. Yokota and K. Inenaga (2008). "Rheological Properties of Human Saliva and Salivary Mucins." Journal of Oral Biosciences **50**(2): 134-141.

Jacobsen, J., B. Van Deurs, M. Pedersen and M. R. Rassing (1995). "TR146 cells grown on filters as a model for human buccal epithelium: I. Morphology, growth, barrier properties, and permeability." International Journal of Pharmaceutics **125**(2): 165-184.

Jean Blain, C. (1998). "Nutritional and toxicological aspects of tannins." <u>Revue de Medecine</u> <u>Veterinaire (France)</u>.

Jehmlich, N., K. H. Dinh, M. Gesell-Salazar, E. Hammer, L. Steil, V. M. Dhople, C. Schurmann, B. Holtfreter, T. Kocher and U. Volker (2013). "Quantitative analysis of the intra- and inter-subject variability of the whole salivary proteome." J Periodontal Res **48**(3): 392-403.

Jeleń, H. H., K. Wlazły, E. Wąsowicz and E. Kamiński (1998). "Solid-Phase Microextraction for the Analysis of Some Alcohols and Esters in Beer: Comparison with Static Headspace Method." Journal of Agricultural and Food Chemistry **46**(4): 1469-1473.

Joiner, A., D. Muller, U. M. Elofsson and T. Arnebrant (2004). "Ellipsometry analysis of the in vitro adsorption of tea polyphenols onto salivary pellicles." <u>European Journal of Oral Sciences</u> **112**(6): 510-515.

Jordan, A., S. Haidacher, G. Hanel, E. Hartungen, L. Märk, H. Seehauser, R. Schottkowsky, P. Sulzer and T. D. Märk (2009). "A high resolution and high sensitivity proton-transfer-reaction time-of-flight mass spectrometer (PTR-TOF-MS)." <u>International Journal of Mass Spectrometry</u> **286**(2-3): 122-128.

Kandra, L. and G. Gyémánt (2000). "Examination of the active sites of human salivary α -amylase (HSA)." <u>Carbohydrate Research</u> **329**(3): 579-585.

Kawamura, Y., M. Funakoshi, Y. Kasahara and T. Yamamoto (1969). "A neurophysiological study on astringent taste." <u>The Japanese journal of physiology</u> **19**(6): 851-865.

Khanbabaee, K. and T. van Ree (2001). "Tannins: classification and definition." <u>Natural product</u> reports **18**(6): 641-649.

Kinsella, J. E. (1988). "Flavor Binding by Food Components Particularly Proteins." <u>Journal of the</u> <u>American Oil Chemists Society</u> **65**(4): 506-506.

Kragelund, C., C. Hansen, L. A. Torpet, B. Nauntofte, K. Brosen, A. M. Pedersen, C. Buchwald, M. H. Therkildsen and J. Reibel (2008). "Expression of two drug-metabolizing cytochrome P450-enzymes in human salivary glands." <u>Oral Dis</u> **14**(6): 533-540.

Krespi, Y. P., M. G. Shrime and A. Kacker (2006). "The relationship between oral malodor and volatile sulfur compound-producing bacteria." <u>Otolaryngology-Head and Neck Surgery</u> **135**(5): 671-676.

Kullaa, A. M., P. Asikainen, M. Herrala, H. Ukkonen and J. J. W. Mikkonen (2014). "Microstructure of Oral Epithelial Cells as an Underlying Basis for Salivary Mucosal Pellicle." <u>Ultrastructural Pathology</u> **38**(6): 382-386.

Kullaa-Mikkonen, A. (1986). "Scanning Electron Microscopic Study of surface of Human Oral Mucosa." <u>European Journal of Oral Sciences</u> **94**(1): 50-56.

Kurkivuori, J., V. Salaspuro, P. Kaihovaara, K. Kari, R. Rautemaa, L. Gronroos, J. H. Meurman and M. Salaspuro (2007). "Acetaldehyde production from ethanol by oral streptococci." <u>Oral Oncol</u> **43**(2): 181-186.

Labouré, H., M. Repoux, P. Courcoux, G. Feron and E. Guichard (2014). "Inter-individual retronasal aroma release variability during cheese consumption: Role of food oral processing." <u>Food Research International</u> **64**: 692-700.

Lacroix, M. (2008). "Persistent use of "false" cell lines." Int J Cancer 122(1): 1-4.

Lasekan, O. (2013). "A comparative analysis of the influence of human salivary enzymes on odorant concentration in three palm wines." <u>Molecules</u> **18**(10): 11809-11823.

Le Thanh, M., P. Thibeaudeau, M. A. Thibaut and A. Voilley (1992). "Interactions between volatile and non-volatile compounds in the presence of water." <u>Food Chemistry</u> **43**: 129-135.

Lee, C. A., B. Ismail and Z. M. Vickers (2012). "The Role of Salivary Proteins in the Mechanism of Astringency." Journal of Food Science **77**(4): C381-C387.

Lee, S., M. Muller, K. Rezwan and N. D. Spencer (2005). "Porcine gastric mucin (PGM) at the water/poly(dimethylsiloxane) (PDMS) interface: Influence of pH and ionic strength on its conformation, adsorption, and aqueous lubrication properties." Langmuir **21**(18): 8344-8353.

Lehr, M., J. Fabian and W. Hanekamp (2015). "Involvement of microsomal NADPH-cytochrome P450 reductase in metabolic reduction of drug ketones." <u>Biopharm Drug Dispos</u>.

Lieleg, O. and K. Ribbeck (2011). "Biological hydrogels as selective diffusion barriers." <u>Trends Cell</u> <u>Biol</u> **21**(9): 543-551.

Lindinger, W., A. Hansel and A. Jordan (1998). "On-line monitoring of volatile organic compounds at pptv levels by means of Proton-Transfer-Reaction Mass Spectrometry (PTR-MS) Medical applications, food control and environmental research." <u>International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes</u> **173**: 191-241.

Lindqvist, L. and K. B. Augustinsson (1975). "Esterases in human saliva." Enzyme **20**(5): 277-291.

Lindqvist, L. and K. B. Augustinsson (1980). "Esterase patterns in human-saliva established by chromatography on con-a-sepharose and by isoelectric-focusing." <u>Archives of Oral Biology</u> **25**(6): 363-368.

Linforth, R., F. Martin, M. Carey, J. Davidson and A. J. Taylor (2002). "Retronasal transport of aroma compounds." <u>J Agric Food Chem</u> **50**(5): 1111-1117.

Linforth, R. S. T. and A. J. Taylor (2000). "Persistence of Volatile Compounds in the Breath after Their Consumption in Aqueous Solutions." Journal of Agricultural and Food Chemistry **48**: 5419–5423.

Liu, B., J. R. Lague, D. P. Nunes, P. Toselli, F. G. Oppenheim, R. V. Soares, R. F. Troxler and G. D. Offner (2002). "Expression of Membrane-associated Mucins MUC1 and MUC4 in Major Human Salivary Glands." Journal of Histochemistry & Cytochemistry **50**(6): 811-820.

Logemann, J. A., C. H. Smith, B. R. Pauloski, A. W. Rademaker, C. L. Lazarus, L. A. Colangelo, B. Mittal, E. MacCracken, J. Gaziano, L. Stachowiak and L. A. Newman (2001). "Effects of xerostomia on perception and performance of swallow function." <u>Head Neck</u> **23**(4): 317-321.

Loomis, R. E., A. Prakobphol, M. J. Levine, M. S. Reddy and P. C. Jones (1987). "Biochemical and biophysical comparison of two mucins from human submandibular-sublingual saliva." <u>Arch Biochem Biophys</u> **258**(2): 452-464.

Loret, C., M. Walter, N. Pineau, M. A. Peyron, C. Hartmann and N. Martin (2011). "Physical and related sensory properties of a swallowable bolus." <u>Physiol Behav</u> **104**(5): 855-864.

Lorrain, B., S. Tempere, N. Iturmendi, V. Moine, G. de Revel and P. L. Teissedre (2013). "Influence of phenolic compounds on the sensorial perception and volatility of red wine esters in model solution: an insight at the molecular level." <u>Food Chem</u> **140**(1-2): 76-82.

Lu, Y. and A. Bennick (1998). "Interaction of tannin with human salivary proline-rich proteins." <u>Archives of Oral Biology</u> **49**(9): 717-728.

Lubbers, S., P. Landy and A. Voilley (1998). "Retention and release of aroma compounds in foods containing proteins." <u>Food Technology</u> **52**(5): 68, 70, 72, 74, 208, 210, 212, 214.

Luck, G., H. Liao, N. J. Murray, H. R. Grimmer, E. E. Warminski, M. P. Williamson, T. H. Lilley and E. Haslam (1994). "Polyphenols, astringency and proline-rich proteins." <u>Phytochemistry</u> **37**(2): 357-371.

Lund, C. M., L. Nicolau, R. C. Gardner and P. A. Kilmartin (2009). "Effect of polyphenols on the perception of key aroma compounds from Sauvignon Blanc wine." <u>Australian Journal of Grape and Wine Research</u> **15**(1): 18-26.

Macakova, L., G. E. Yakubov, M. A. Plunkett and J. R. Stokes (2010). "Influence of ionic strength changes on the structure of pre-adsorbed salivary films. A response of a natural multi-component layer." <u>Colloids and Surfaces B: Biointerfaces</u> **77**(1): 31-39.

Macakova, L., G. E. Yakubov, M. A. Plunkett and J. R. Stokes (2011). "Influence of ionic strength on the tribological properties of pre-adsorbed salivary films." <u>Tribology International</u> **44**(9): 956-962.

Mark Welch, J. L., B. J. Rossetti, C. W. Rieken, F. E. Dewhirst and G. G. Borisy (2016). "Biogeography of a human oral microbiome at the micron scale." <u>Proceedings of the National Academy of Sciences</u> **113**(6): E791-E800.

Marsh, P. D., T. Do, D. Beighton and D. A. Devine (2016). "Influence of saliva on the oral microbiota." <u>Periodontology 2000</u> **70**: 80-92.

McColl, J., R. Horvath, A. Aref, L. Larcombe, I. Chianella, S. Morgan, G. E. Yakubov and J. J. Ramsden (2009). "Polyphenol Control of Cell Spreading on Glycoprotein Substrata." <u>Journal of Biomaterials</u> <u>Science-Polymer Edition</u> **20**(5-6): 841-851.

Medinsky, M. A. and J. A. Bond (2001). "Sites and mechanisms for uptake of gases and vapors in the respiratory tract." <u>Toxicology</u> **160**(1): 165-172.

Mehansho, H., S. Clement, B. T. Sheares, S. Smith and D. M. Carlson (1985). "Induction of Proline-rich Glycoprotein Synthesis in Mouse Salivary Glands by Isoproterenol and by Tannins." <u>The Journal of Biological Chemistry</u> **260**(7): 4418-4423.

Mejean, C., M. Morzel, E. Neyraud, S. Issanchou, C. Martin, S. Bozonnet, C. Urbano, P. Schlich, S. Hercberg, S. Peneau and G. Feron (2015). "Salivary Composition Is Associated with Liking and Usual Nutrient Intake." <u>PLoS One</u> **10**(9): e0137473.

Miller, M. E. and J. D. Stuart (1999). "Comparison of gas-sampled and SPME-Sampled static headspace for the determination of volatile flavor components." <u>Analytical Chemistry</u> **71**(1): 23-27.

Mishellany-Dutour, A., A. Woda, H. Laboure, P. Bourdiol, P. Lachaze, E. Guichard and G. Feron (2012). "Retro-nasal aroma release is correlated with variations in the in-mouth air cavity volume after empty deglutition." <u>PLoS One</u> **7**(7): e41276.

Mitropoulou, A., E. Hatzidimitriou and A. Paraskevopoulou (2011). "Aroma release of a model wine solution as influenced by the presence of non-volatile components. Effect of commercial tannin extracts, polysaccharides and artificial saliva." <u>Food Research International</u> **44**(5): 1561-1570.

Morzel, M., S. Tai, H. Brignot and J. Lherminier (2014). "Immunocytological detection of salivary mucins (MUC5B) on the mucosal pellicle lining human epithelial buccal cells." <u>Microsc Res Tech</u> **77**(6): 453-457.

Mounayar, R., C. Septier, C. Chabanet, G. Feron and E. Neyraud (2013). "Oral Fat Sensitivity in Humans: Links to Saliva Composition Before and After Stimulation by Oleic Acid." <u>Chemosensory</u> <u>Perception</u> **6**(3): 118-126.

Munoz, C., G. Feron and F. Canon (2016). Inter-individual differences in human saliva composition affect the partition of food and beverages aroma compounds. <u>4th international conference on food oral processing, Lausanne (Suisse) - (2016-07-03 - 2016-07-06) / Congrès</u>. Lausanne, Swizerland.

Munoz-Gonzalez, C., C. Cueva, M. Angeles Pozo-Bayon and M. Victoria Moreno-Arribas (2015). "Ability of human oral microbiota to produce wine odorant aglycones from odourless grape glycosidic aroma precursors." <u>Food Chem</u> **187**: 112-119.

Muñoz-González, C., C. Cueva, M. Á. Pozo-Bayón and M. V. Moreno-Arribas (2015). "Ability of human oral microbiota to produce wine odorant aglycones from odourless grape glycosidic aroma precursors." <u>Food Chemistry</u> **187**(15): 112-119.

Munoz-Gonzalez, C., G. Feron, E. Guichard, J. J. Rodriguez-Bencomo, P. J. Martin-Alvarez, M. V. Moreno-Arribas and M. A. Pozo-Bayon (2014). "Understanding the Role of Saliva in Aroma Release from Wine by Using Static and Dynamic Headspace Conditions." Journal of Agricultural and Food Chemistry **62**(33): 8274-8288.

Naknean, P. and M. Meenune (2010). "Factors affecting retention and release of flavour compounds in food carbohydrates." <u>International Food Research Journal</u> **17**: 23-34.

Narukawa, M., C. Noga, Y. Ueno, T. Sato, T. Misaka and T. Watanabe (2011). "Evaluation of the bitterness of green tea catechins by a cell-based assay with the human bitter taste receptor hTAS2R39." <u>Biochem Biophys Res Commun</u> **405**(4): 620-625.

Nasidze, I., J. Li, D. Quinque, K. Tang and M. Stoneking (2009). "Global diversity in the human salivary microbiome." <u>Genome Res</u> **19**(4): 636-643.

Naurato, N., P. Wong, Y. Lu, K. Wroblewski and A. Bennick (1999). "Interaction of Tannin with Human Salivary Histatins." Journal of Agricultural and Food Chemistry **47**(6): 2229-2234.

Nawar, W. W. (1971). "Variables affecting composition of headspace aroma." <u>Journal of Agricultural</u> <u>and Food Chemistry</u> **19**(6): 1057-1059.

Nayak, A. and G. H. Carpenter (2008). "A physiological model of tea-induced astringency." <u>Physiology & Behavior</u> **95**(3): 290-294.

Neyraud, E. (2014). "Role of saliva in oral food perception." <u>Monographs in oral science</u> 24: 61-70.

Nicolas, G. (1991). "Advantages of fast-freeze fixation followed by freeze-substitution for the preservation of cell intergrity." Journal of Electron Microscopy Technique **18**: 395-405.

Nielsen, H. M. and M. R. Rassing (2000). "TR146 cells grown on filters as a model of human buccal epithelium: IV. Permeability of water, mannitol, testosterone and β -adrenoceptor antagonists.

Comparison to human, monkey and porcine buccal mucosa." <u>International Journal of Pharmaceutics</u> **194**(2): 155-167.

Nielsen, H. M. and M. R. Rassing (2002). "Nicotine permeability across the buccal TR146 cell culture model and porcine buccal mucosa in vitro: effect of pH and concentration." <u>European Journal of Pharmaceutical Sciences</u> **16**(3): 151-157.

O'Neill, T. E. (1996). "Flavor Binding by Food Protens : An Overview." <u>American Chemical Society</u>.

O'Neill, T. E. and J. E. Kinsella (1987). "Binding of Alkanone Flavors to Beta-Lactoglobulin - Effect of Conformational and Chemical Modification." Journal of Agricultural and Food Chemistry **35**(5): 770-774.

Odake, S., J. P. Roozen and J. J. Burger (1998). "Effect of saliva dilution on the release of diacetyl and 2-heptanone from cream style dressings." <u>Nahrung</u> **6**: 385-391.

Offner, G. D. and R. F. Troxler (2000). "Heterogeneity of High-molecular-weight Human Salivary Mucins." <u>Advances in Dental Research</u> **14**(1): 69-75.

Pages-Helary, S., I. Andriot, E. Guichard and F. Canon (2014). "Retention effect of human saliva on aroma release and respective contribution of salivary mucin and alpha-amylase." <u>Food Research International</u> **64**: 424-431.

Pailler-Mattei, C., R. Vargiolu, S. Tupin and H. Zahouani (2015). "Ex vivo approach to studying bioadhesive and tribological properties of artificial salivas for oral dryness (xerostomia)." <u>Wear</u> **332**-**333**: 710-714.

Pappa, A., T. Estey, R. Manzer, D. Brown and V. Vasiliou (2003). "Human aldehyde dehydrogenase 3A1 (ALDH3A1): biochemical characterization and immunohistochemical localization in the cornea." <u>Biochem J</u> **376**(Pt 3): 615-623.

Pascal, C., F. Bigey, R. Ratomahenina, H. Boze, G. Moulin and P. Sarni-Manchado (2006). "Overexpression and characterization of two human salivary proline rich proteins." <u>Protein Expr</u> <u>Purif</u> **47**(2): 524-532.

Pascal, C., C. Poncet-Legrand, B. Cabane and A. Verhnet (2008). "Aggregation of a Proline-Rich Protein Induced by Epigallocatechin Gallate and Condensed Tannins: Effect of Protein Glycosylation." Journal of Agricultural and Food Chemistry **56**: 6724-6732.

Pascal, C., C. Poncet-Legrand, A. Imberty, C. Gautier, P. Sarni-Manchado, V. Cheynier and A. Vernhet (2007). "Interactions between a non glycosylated human proline-rich protein and flavan-3-ols are affected by protein concentration and polyphenol/protein ratio." J Agric Food Chem **55**(12): 4895-4901.

Payne, C., P. K. Bowyer, M. Herderich and S. E. P. Bastian (2009). "Interaction of astringent grape seed procyanidins with oral epithelial cells." <u>Food Chemistry</u> **115**(2): 551-557.

Pedersen, A. M., A. Bardow, S. B. Jensen and B. Nauntofte (2002). "Saliva and gastrointestinal functions of taste, mastication, swallowing and digestion." <u>Oral Diseases</u> **8**(3): 117-129.

Pelaseyed, T., J. H. Bergstrom, J. K. Gustafsson, A. Ermund, G. M. H. Birchenough, A. Schutte, S. van der Post, F. Svensson, A. M. Rodriguez-Pineiro, E. E. L. Nystrom, C. Wising, M. E. V. Johansson and G. C.

Hansson (2014). "The mucus and mucins of the goblet cells and enterocytes provide the first defense line of the gastrointestinal tract and interact with the immune system." <u>Immunological Reviews</u> **260**(1): 8-20.

Peleg, H., K. Gacon, P. Schlich and A. C. Noble (1999). "Bitterness and astringency of flavan-3-ol monomers, dimers and trimers." Journal of the Science of Food and Agriculture **79**(8): 1123-1128.

Pelletier, E., K. Sostmann and E. Guichard (1998). "Measurement of interactions between betalactoglobulin and flavor compounds (esters, acids and pyrazines) by affinity and exclusion size chromatography." Journal of Agricultural and Food Chemistry **46**(4): 1506 - 1509.

Pelosi, P. (2001). "The role of perireceptor events in vertebrate olfaction." <u>Cell Mol Life Sci</u> **58**(4): 503-509.

Pevsner, J., P. B. Sklar and S. H. Snyder (1986). "Odorant-binding protein: localization to nasal glands and secretions." <u>Proceedings of the National Academy of Sciences</u> **83**(13): 4942-4946.

Piombino, P., A. Genovese, S. Esposito, L. Moio, P. P. Cutolo, A. Chambery, V. Severino, E. Moneta, D. P. Smith, S. M. Owens, J. A. Gilbert and D. Ercolini (2014). "Saliva from obese individuals suppresses the release of aroma compounds from wine." <u>PLoS One</u> **9**(1): e85611.

Pionnier, E., C. Chabanet, L. Mioche, J. L. Le Quere and C. Salles (2004). "1. In vivo aroma release during eating of a model cheese: Relationships with oral parameters." Journal of Agricultural and Food Chemistry **52**(3): 557-564.

Poncet-Legrand, C., D. Cartalade, V. Cheynier, J.-L. Putaux and A. Vernhet (2003). "Flavan-3-ol Aggregation in Model Ethanolic Solutions: Incidence of Polyphenol Structure, Concentration, Ethanol Content, and Ionic Strength." Langmuir **19**: 10563-10572.

Pramanik, R., S. M. Osailan, S. J. Challacombe, D. Urquhart and G. B. Proctor (2010). "Protein and mucin retention on oral mucosal surfaces in dry mouth patients." <u>European Journal of Oral Sciences</u> **118**(3): 245-253.

Prestin, S., S. I. Rothschild, C. S. Betz and M. Kraft (2012). "Measurement of epithelial thickness within the oral cavity using optical coherence tomography." <u>Head and Neck-Journal for the Sciences and Specialties of the Head and Neck</u> **34**(12): 1777-1781.

Rabe, S., U. Krings and R. G. Berger (2004). "In vitro Study of the Influence of Physiological Parameters on Dynamic In-mouth Flavour Release from Liquids." <u>Chemical Senses</u> **29**(2): 153-162.

Ranc, H., A. Elkhyat, C. Servais, S. Mac-Mary, B. Launay and P. Humbert (2006). "Friction coefficient and wettability of oral mucosal tissue: Changes induced by a salivary layer." <u>Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects</u> **276**(1-3): 155-161.

Rat, P., C. Korwin-Zmijowska, J. M. Warnet and M. Adolphe (1994). "New in vitro fluorimetric microtitration assays for toxicological screening of drugs." <u>Cell Biology and Toxicology</u> **10**: 329-337.

Reiners, J., S. Nicklaus and E. Guichard (2000). "Interactions between beta-lactoglobulin and flavour compounds of different chemical classes. Impact of the protein on the odour perception of vanillin and eugenol." <u>Le Lait</u> **80**: 347-360.

Repoux, M., H. Labouré, P. Courcoux, I. Andriot, É. Sémon, C. Yven, G. Feron and E. Guichard (2012). "Combined effect of cheese characteristics and food oral processing onin vivoaroma release." <u>Flavour and Fragrance Journal</u> **27**(6): 414-423.

Repoux, M., E. Sémon, G. Feron, E. Guichard and H. Labouré (2012). "Inter-individual variability in aroma release during sweet mint consumption." <u>Flavour and Fragrance Journal</u> **27**(1): 40-46.

Richard, H. and J.-L. Multon (1992). Les arômes alimentaires, Tec & Doc-Lavoisier Paris.

Robinson, D. A., M. S. Bogdanffy and C. J. Reed (2002). "Histochemical localisation of carboxylesterase activity in rat and mouse oral cavity mucosa." <u>Toxicology</u> **180**(3): 209-220.

Rossetti, D., J. H. H. Bongaerts, E. Wantling, J. R. Stokes and A. M. Williamson (2009). "Astringency of tea catechins: More than an oral lubrication tactile percept." <u>Food Hydrocolloids</u> **23**(7): 1984-1992.

Rossetti, D., F. Ravera and L. Liggieri (2013). "Effect of tea polyphenols on the dilational rheology of human whole saliva (HWS): Part 2, polyphenols-HWS interaction." <u>Colloids and Surfaces B-Biointerfaces</u> **110**: 474-479.

Rossetti, D., G. E. Yakubov, J. R. Stokes, A. M. Williamson and G. G. Fuller (2008). "Interaction of human whole saliva and astringent dietary compounds investigated by interfacial shear rheology." <u>Food Hydrocolloids</u> **22**(6): 1068-1078.

Running, C. A., B. A. Craig and R. D. Mattes (2015). "Oleogustus: The Unique Taste of Fat." <u>Chemical</u> <u>Senses</u> **40**(7): 507-516.

Rupniak, H. T., C. Rowlatt, E. B. Lane, J. G. Steele, L. K. Trejdosiewicz, B. Laskiewicz, S. Povey and B. T. Hill (1985). "Characteristics of 4 new human cell lines derived from squamous cell carcinomas of the head and neck." Journal of the National Cancer Institute **75**(4): 621-635.

Saenz-Navajas, M. P., E. Campo, P. Fernandez-Zurbano, D. Valentin and V. Ferreira (2010). "An assessment of the effects of wine volatiles on the perception of taste and astringency in wine." <u>Food</u> <u>Chemistry</u> **121**(4): 1139-1149.

Salles, C., M. C. Chagnon, G. Feron, E. Guichard, H. Laboure, M. Morzel, E. Semon, A. Tarrega and C. Yven (2011). "In-Mouth Mechanisms Leading to Flavor Release and Perception." <u>Critical Reviews in Food Science and Nutrition</u> **51**(1): 67-90.

Sanchez-Lopez, J. A., A. Ziere, S. I. Martins, R. Zimmermann and C. Yeretzian (2016). "Persistence of aroma volatiles in the oral and nasal cavities: real-time monitoring of decay rate in air exhaled through the nose and mouth." <u>I Breath Res</u> **10**(3): 036005.

Sander, R. (2015). "Compilation of Henry's law constants (version 4.0) for water as solvent." <u>Atmospheric Chemistry and Physics</u> **15**(8): 4399-4981.

Sarni-Manchado, P., J.-M. Canals-Bosch, G. Mazerolles and V. Cheynier (2008). "Influence of the Glycosylation of Human Salivary Proline-Rich Proteins on Their Interactions with Condensed Tannins." Journal of Agricultural and Food Chemistry **56**(20): 9563-9569.

Scalbert, A., I. T. Johnson and M. Saltmarsh (2005). "Polyphenols: antioxidants and beyond." <u>American Journal of Clinical Nutrition</u> **81**(1): 215S-217S.

Scannapieco, F. A. (1994). "Saliva-bacterium interactions in oral microbial ecology." <u>Crit Rev Oral</u> <u>Biol Med</u> **5**(3-4): 203-248.

Scharbert, S., N. Holzmann and T. Hofmann (2004). "Identification of the Astringent Taste Compounds in Black Tea Infusions by Combining Instrumental Analysis and Human Bioresponse." J. Agric. Food Chem. **52**: 3498-3508.

Schiffman, S. S. and B. G. Graham (2000). "Taste and smell perception affect appetite and immunity in the elderly." <u>Eur J Clin Nutr</u> **54 Suppl 3**: S54-63.

Schobel, N., D. Radtke, J. Kyereme, N. Wollmann, A. Cichy, K. Obst, K. Kallweit, O. Kletke, A. Minovi, S. Dazert, C. H. Wetzel, A. Vogt-Eisele, G. Gisselmann, J. P. Ley, L. M. Bartoshuk, J. Spehr, T. Hofmann and H. Hatt (2014). "Astringency Is a Trigeminal Sensation That Involves the Activation of G Protein-Coupled Signaling by Phenolic Compounds." <u>Chemical Senses</u> **39**(6): 471-487.

Schwarz, B. and T. Hofmann (2008). "Is there a direct relationship between oral astringency and human salivary protein binding?" <u>European Food Research and Technology</u> **227**(6): 1693-1698.

Seow, Y. X., P. K. Ong and D. Huang (2016). "Odor-Specific Loss of Smell Sensitivity with Age as Revealed by the Specific Sensitivity Test." <u>Chem Senses</u> **41**(6): 487-495.

Simon, S. A., W. L. Hall and S. S. Schiffman (1992). "Astringent-Tasting Compounds Alter Ion Transport Across Isolated Canine Lingual Epithelia." <u>Pharmacology, Biochemistry and Behavior</u> **43**: 271-283.

Sinding, C., T. Thomas-Danguin, A. Chambault, N. Beno, T. Dosne, C. Chabanet, B. Schaal and G. Coureaud (2013). "Rabbit neonates and human adults perceive a blending 6-component odor mixture in a comparable manner." <u>PLoS One</u> **8**(1): e53534.

Sirk, T. W., M. Friedman and E. F. Brown (2011). "Molecular Binding of Black Tea Theaflavins to Biological Membranes: Relationship to Bioactivities." Journal of Agricultural and Food Chemistry **59**(8): 3780-3787.

Soares, S., R. Vitorino, H. Osorio, A. Fernandes, A. Venancio, N. Mateus, F. Amado and V. de Freitas (2011). "Reactivity of human salivary proteins families toward food polyphenols." <u>J Agric Food</u> <u>Chem</u> **59**(10): 5535-5547.

Solms, J., F. Osman-Ismail and M. Beyeler (1973). "The Interaction of Volatiles with Food Components." <u>Canadian Institute of Food Science and Technology Journal</u> **6**(1): A10-A16.

Sørensen, L. B., P. Møller, A. Flint, M. Martens and A. Raben (2003). "Effect of sensory perception of foods on appetite and food intake: a review of studies on humans." <u>International Journal of Obesity</u> **27**: 1152-1166.

Sperkman, D. O. (2010). "The Role of Isotope Peak Intensities Obtained Using MS in Determining an Elemental Composition, Part 1." <u>MS Solutions</u>.

Squier, C. A. (1991). "The permeability of oral mucosa." <u>Critical Reviews in Oral Biology and</u> <u>Medicine</u> 2(1): 13-32.

Sreerama, L., M. W. Hedge and N. E. Sladek (1995). "Identification of a class 3 aldehyde dehydrogenase in human saliva and increased levels of this enzyme, glutathione S-transferases, and

DT-diaphorase in the saliva of subjects who continually ingest large quantities of coffee or broccoli." Clin Cancer Res 1(10): 1153-1163.

Stanton, D. T. and P. C. Jurs (1990). "Development and Use of Charged Partial Surface Area Structural Descriptors in Computer-Assisted Quantitative Structure-Property Relationship Studies." <u>Anal.</u> <u>Chem</u> **62**.

Stanton, D. T. and P. C. Jurs (1992). "Computer-Assisted Study of the Relationship between Molecular Structure and Surface Tension of Organic Compounds." J. Chem. Inf. Comput. Sci. **32**: 109-115.

Starkenmann, C., B. Le Calvé, Y. Niclass, I. Cayeux, S. Beccucci and M. Troccaz (2008). "Olfactory Perception of Cysteine–S-Conjugates from Fruits and Vegetables." <u>Journal of Agricultural and Food Chemistry</u> **56**(20): 9575-9580.

Stevens, S. S. (1960). "The psychophysics of sensory function." <u>American Scientist</u> **48**(2): 226-253.

Strohalm, M., M. Hassman, B. Kosata and M. Kodicek (2008). "mMass data miner: an open source alternative for mass spectrometric data analysis." <u>Rapid Commun Mass Spectrom</u> **22**(6): 905-908.

Sun, Q., T. W. Harper, E. A. Dierks, L. Zhang, S. Chang, A. D. Rodrigues and P. Marathe (2011). "1-Aminobenzotriazole, a known cytochrome P450 inhibitor, is a substrate and inhibitor of N-acetyltransferase." <u>Drug Metab Dispos</u> **39**(9): 1674-1679.

Sun, Y., W. C. Hung, F. Y. Chen, C. C. Lee and H. W. Huang (2009). "Interaction of Tea Catechin (-)-Epigallocatechin Gallate with Lipid Bilayers." <u>Biophysical Journal</u> **96**(3): 1026-1035.

Svensson, B. E. (1988). "Abilities of peroxidases to catalyse peroxidase-oxidase oxidation of thiols." <u>Biochemistry Journal</u> **256**: 757-762.

Syarifuddin, A., C. Septier, C. Salles and T. Thomas-Danguin (2016). "Reducing salt and fat while maintaining taste: An approach on a model food system." <u>Food Quality and Preference</u> **48, Part A**: 59-69.

Tabak, L. A. (1990). "Structure and function of human salivary mucins." <u>Critical Reviews in Oral</u> <u>Biology and Medicine</u> **1**: 229-234.

Tabak, L. A. (1995). "In defense of the oral cavity: Structure, Biosynthesis, and Function of Salivary Mucins." <u>Annu. Rev. Physiol.</u> **57**: 547-564.

Tabak, L. A., M. J. Levine, I. D. Mandel and S. A. Ellison (1982). "Role of salivary mucins in the protection of the oral cavity." Journal of Oral Pathology & Medicine **11**(1): 1-17.

Takahashi, N. (2015). "Oral Microbiome Metabolism: From "Who Are They?" to "What Are They Doing?"." Journal of Dental Research **94**(12): 1628-1637.

Tanaka, J., H. Sadanari, H. Sato and S. Fukuda (1991). "Sodium butyrate-inducible replication of human cytomegalovirus in a human epithelial cell line." <u>Virology</u> **185**(1): 271-280.

Tavel, L., C. Moreau, S. Bouhallab, E. C. Y. Li-Chan and E. Guichard (2010). "Interactions between aroma compounds and [beta]-lactoglobulin in the heat-induced molten globule state." <u>Food</u> <u>Chemistry</u> **119**(4): 1550-1556.
Taylor, A. J. (1998). "Physical chemistry of flavour." <u>International Journal of Food Science and</u> <u>Technology</u> **33**: 53-62.

Taylor, A. J. (2002). "Release and Transport of Flavors In Vivo: Physicochemical, Physiological, and Perceptual Considerations." <u>Comprehensive Review s in Food Science and Food Saftey</u> **1**: 45-57.

Taylor, A. J. and R. S. T. Linforth (2003). "Direct mass spectrometry of complex volatile and non-volatile flavour mixtures." <u>International Journal of Mass Spectrometry</u> **223–224**: 179-191.

Teubl, B. J., M. Absenger, E. Froehlich, G. Leitinger, A. Zimmer and E. Roblegg (2013). "The oral cavity as a biological barrier system: Design of an advanced buccal in vitro permeability model." <u>European</u> Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics **84**(2): 386-393.

Teubl, B. J., M. Absenger, E. Fröhlich, G. Leitinger, A. Zimmer and E. Roblegg (2013). "The oral cavity as a biological barrier system: Design of an advanced buccal in vitro permeability model." <u>European</u> <u>Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics</u> **84**(2): 386-393.

Thiebaud, N., S. Veloso Da Silva, I. Jakob, G. Sicard, J. Chevalier, F. Menetrier, O. Berdeaux, Y. Artur, J. M. Heydel and A. M. Le Bon (2013). "Odorant metabolism catalyzed by olfactory mucosal enzymes influences peripheral olfactory responses in rats." <u>PLoS One</u> **8**(3): e59547.

Thomas-Danguin, T., C. Sinding, S. Romagny, F. El Mountassir, B. Atanasova, E. Le Berre, A. M. Le Bon and G. Coureaud (2014). "The perception of odor objects in everyday life: a review on the processing of odor mixtures." <u>Front Psychol</u> **5**: 504.

Thorngate, J. and A. Noble (1995). "Sensory evaluation of bitterness and astringency of 3R (–) – epicatechin and 3S (+) – catechin." Journal of the Science of Food and Agriculture **67**(4): 531-535.

Tromelin, A., Y. Merabtine and I. Andriot (2010). "Retention–release equilibrium of aroma compounds in polysaccharide gels: study by quantitative structure–activity/property relationships approach." <u>Flavour and Fragrance Journal</u> **25**(6): 431-442.

van der Bilt, A., L. Engelen, J. Abbink and L. J. Pereira (2007). "Effects of adding fluids to solid foods on muscle activity and number of chewing cycles." <u>Eur J Oral Sci</u> **115**(3): 198-205.

van der Mei, H. C., D. J. White and H. J. Busscher (2004). "On the wettability of soft tissues in the human oral cavity." <u>Archives of Oral Biology</u> **49**(8): 671-673.

van Ruth, S., E. Boscaini, D. Mayr, J. Pugh and M. Posthumus (2003). "Evaluation of three gas chromatography and two direct mass spectrometry techniques for aroma analysis of dried red bell peppers." <u>International Journal of Mass Spectrometry</u> **223–224**: 55-65.

Van Ruth, S. M., G. De Vries, M. Geary and P. Giannouli (2002). "Influence of composition and structure of oil-in-water emulsions on retention of aroma compounds." Journal of the Science of Food and Agriculture **82**: 1028-1035.

van Ruth, S. M., I. Grossmann, M. Geary and C. M. Delahunty (2001). "Interactions between artificial saliva and 20 aroma compounds in water and oil model systems." <u>Journal of Agricultural and Food</u> <u>Chemistry</u> **49**(5): 2409-2413.

van Ruth, S. M. and C. King (2003). "Effect of starch and amylopectin concentrations on volatile flavour release from aqueous model food systems." <u>Flavour and Fragrance Journal</u> **18**(5): 407-416.

van Ruth, S. M. and J. P. Roozen (2000). "Influence of mastication and saliva on aroma release in a model mouth system." <u>Food Chemistry</u> **71**(3): 339-345.

van Ruth, S. M., J. P. Roozen and J. L. Cozijnsen (1995). "Changes in flavor release from rehydrated diced bell peppers (capriscum annum) by artificial saliva components in 3 mouth model systems." Journal of the Science of Food and Agriculture **67**(2): 189-196.

van Ruth, S. M., J. P. Roozen and J. L. Cozijnsen (1995). "Changes in flavour release from rehydrated diced bell peppers (*Capsicum annuum*) by artificial saliva components in three mouth model systems." Journal of the Science of Food and Agriculture **67**(2): 189-196.

Vassilakos, N., T. Arnebrant and P. O. Glantz (1993). "AN INVITRO STUDY OF SALIVARY FILM FORMATION AT SOLID-LIQUID INTERFACES." <u>Scandinavian Journal of Dental Research</u> **101**(3): 133-137.

Veeregowda, D. H., H. J. Busscher, A. Vissink, D.-J. Jager, P. K. Sharma and H. C. van der Mei (2012). "Role of Structure and Glycosylation of Adsorbed Protein Films in Biolubrication." <u>Plos One</u> **7**(8).

Veerman, E. C. I., J. G. M. Bolscher, B. J. Appelmelk, E. Bloemena, T. K. van den Berg and A. V. N. Amerongen (1997). "A monoclonal antibody directed against high Mr salivary mucins recognizes the S03-3Gal β 1-3GlcNAc moiety of sulfo-Lewisa: a histochemical survey of human and rat tissue." <u>Glycobiology</u> **7**(1): 37-43.

Vickers, Z. and M. C. Bourne (1976). "A Phsychooacoustical Theory of Crispness." Journal of Food Science **41**: 1158-1164.

Vidal, S. p., L. Francis, S. Guyot, N. Marnet, M. Kwiatkowski, R. Gawel, V. r. Cheynier and E. J. Waters (2003). "The mouth-feel properties of grape and apple proanthocyanidins in a wine-like medium." Journal of the Science of Food and Agriculture **83**(6): 564-573.

Vondracek, M., Z. Xi, P. Larsson, V. Baker, K. Mace, A. Pfeifer, H. Tjalve, M. T. Donato, M. J. Gomez-Lechon and R. C. Grafstrom (2001). "Cytochrome P450 expression and related metabolism in human buccal mucosa." <u>Carcinogenesis</u> **22**(3): 481-488.

Wang, K. and S. D. Arntfield (2016). "Probing the molecular forces involved in binding of selected volatile flavour compounds to salt-extracted pea proteins." <u>Food Chemistry</u> **211**: 235-242.

Wang, L., X. Li, L. Bruno, F. G. Oppenheim, R. F. Troxler and G. D. Offner (2004). MUC1 and MUC5B Can Form a Protective Mucin Scaffold <u>International Association for Dental Research Annual meeting</u>. Hawai Convention Center, Honolulu.

Wieland, F., A. Neff, A. N. Gloess, L. Poisson, S. Atlan, D. Larrain, D. Prêtre, I. Blank and C. Yeretzian (2015). "Temperature dependence of Henry's law constants: An automated, high-throughput gas stripping cell design coupled to PTR-ToF-MS." <u>International Journal of Mass Spectrometry</u> **387**: 69-77.

Williams-Ashman, H. G. and Z. N. Canellakis (1980). "Transglutaminase-mediated covalent attachment of polyamines to proteins: mechanisms and potential physiological significance." <u>Physiol</u> <u>Chem Phys</u> **12**(5): 457-472.

Wilson, S. M. and A. Bacic (2012). "Preparation of plant cells for transmission electron microscopy to optimize immunogold labeling of carbohydrate and protein epitopes." <u>Nat. Protocols</u> **7**(9): 1716-1727.

Wright, K. M., B. P. Hills, T. A. Hollowood, R. S. T. Linforth and A. J. Taylor (2003). "Persistence effects in flavour release from liquids in the mouth." <u>International Journal of Food Science and Technology</u> **38**(3): 343-350.

Yakubov, G. E., J. McColl, J. H. H. Bongaerts and J. J. Ramsden (2009). "Viscous Boundary Lubrication of Hydrophobic Surfaces by Mucin." <u>Langmuir</u> **25**(4): 2313-2321.

Yan, Q. and A. Bennick (1995). "Identification of histatins as tannin-binding proteins in human saliva." <u>Biochem J **311 (Pt 1)**</u>: 341-347.

Yao, J. W., C. J. Lin, G. Y. Chen, F. Lin and T. Tao (2010). "The interactions of epigallocatechin-3-gallate with human whole saliva and parotid saliva." <u>Arch Oral Biol</u> **55**(7): 470-478.

Yao, Y., M. S. Lamkin and F. G. Oppenheim (2000). "Pellicle precursor protein crosslinking characterization of an adduct between acidic proline-rich protein (PRP-1) and statherin generated by transglutaminase." <u>J Dent Res</u> **79**(4): 930-938.

Zaccone, E. J., W. T. Goldsmith, M. J. Shimko, J. R. Wells, D. Schwegler-Berry, P. A. Willard, S. L. Case, J. A. Thompson and J. S. Fedan (2015). "Diacetyl and 2,3-pentanedione exposure of human cultured airway epithelial cells: Ion transport effects and metabolism of butter flavoring agents." <u>Toxicol Appl Pharmacol</u> **289**(3): 542-549.

Zadoroznyj, M., H. Brignot, M.-A. Maire, E. Noirot, C. Arnould and M. Morzel (2012). Adhesion of salivary mucins (MUC5B) to human buccal cells as affected by a taste solution. <u>2nd International Conference on Food Oral Processing (FOP)</u>. Beaune.

Zafeiropoulou, T., V. Evageliou, C. Gardeli, S. Yanniotis and M. Komaitis (2012). "Retention of selected aroma compounds by gelatine matrices." <u>Food Hydrocolloids</u> **28**(1): 105-109.

Zhao, G. Q., Y. Zhang, M. A. Hoon, J. Chandrashekar, I. Erlenbach, N. J. Ryba and C. S. Zuker (2003). "The receptors for mammalian sweet and umami taste." <u>Cell</u> **115**(3): 255-266.

Zhao, Y. Y., L. J. Chen, G. Yakubov, T. Aminiafshar, L. J. Han and G. P. Lian (2012). "Experimental and Theoretical Studies on the Binding of Epigallocatechin Gallate to Purified Porcine Gastric Mucin." Journal of Physical Chemistry B **116**(43): 13010-13016.

ANNEXE

Annexe 1 : Alignement des séquences (CLC Viewer)

UniprotMUC1isoforme1 = séquence de l'isoforme 1 de MUC1 (= forme entière) OrigeneMUC1variant2-1 = séquence de l'isoforme 2 de chez Origene, utilisé pour la transfection Séquencesignal = Séquence signale de MUC1

RégionTransmembranaire = Séquence de la région transmembranaire de MUC1







RESUME / ABSTRACT

Interactions entre muqueuse orale, salive et molécules de la flaveur

Le rôle de la salive dans la perception sensorielle est de plus en plus reconnu, notamment par le biais des interactions physico-chimiques pouvant s'établir entre protéines salivaires et constituants alimentaires. Ce travail s'intéresse à la pellicule salivaire, la couche de protéines salivaires ancrées aux cellules épithéliales, et vise à caractériser les interactions pouvant s'établir d'une part entre ces protéines et épithélium oral, et d'autre part entre ces protéines et les molécules de la flaveur. Pour cela, un modèle *in vitro* de muqueuse orale a été développé. Une lignée cellulaire stable (TR146/MUC1) a été obtenue par transfection de la lignée cellulaire TR146 de manière à exprimer la mucine membranaire MUC1. Afin de former une pellicule salivaire, les cellules confluentes ont été incubées avec de la salive humaine. La rétention des mucines salivaires MUC5B par les cellules TR146/MUC1 est augmentée par rapport aux TR146, apportant ainsi un argument en faveur de l'implication de MUC1 dans l'ancrage des MUC5B aux cellules épithéliales. Le modèle développé a été appliqué à l'étude des interactions entre la muqueuse orale et les molécules d'arôme et les tanins. L'analyse des coefficients de partage par GC-FID a mis en évidence 1- l'importance de l'hydratation de la muqueuse sur la libération des composés les plus hydrophiles, 2- la capacité des cellules à métaboliser certaines molécules d'arôme, 3- l'absence d'effet de la pellicule sur la libération des molécules d'arôme à l'équilibre. En revanche, l'analyse par PTR-MS a révélé un effet de la muqueuse et de la pellicule sur la cinétique de libération des molécules d'arôme. Les interactions entre les protéines de la pellicule salivaire et les tanins modifient les caractéristiques structurales de la pellicule, en particulier le tapissage des cellules par les MUC5B. Les possibles implications sensorielles, respectivement dans les phénomènes de persistance aromatique et d'astringence, sont discutées.

Mots clé : muqueuse orale, protéines salivaires, pellicule mucosale, mucines, MUC1, MUC5B, arômes, tanins, astringence, persistance aromatique

Interactions between oral mucosa, saliva and flavour compounds.

The role of saliva in food sensory perception is increasingly recognized, especially through physicochemical interactions occurring between salivary proteins and food components. This work focuses on the mucosal pellicle, a layer of salivary proteins anchored onto epithelial cells, and aims at characterizing interactions that may occur between the proteins of the mucosal pellicle and flavour compounds. For that purpose, an *in vitro* model of oral mucosa was developed. A stable cell line (TR146/MUC1) was obtaining by transfecting the TR146 cell line in order to express the membrane bound mucin MUC1. In order to form a salivary pellicle, confluent cells were incubated with human saliva. A higher retention of salivary MUC5B by TR146/MUC1 cells was observed compared to TR146 cells, emphasising the involvement of MUC1 in MUC5B anchoring to epithelial cells. The model was applied to the investigation of interactions between the oral mucosa and aroma molecules and tannins. Measurements of partition coefficients by GC-FID revealed 1- the role of hydration of the mucosa on the release of the most hydrophilic compounds, 2- the ability of cells to metabolize some aroma compounds, 3- the absence of effect of the mucosal pellicle itself on aroma release at the thermodynamic equilibrium. Oppositely, analyses by PTR-MS evidenced an effect of the mucosa and of the pellicle on aroma release kinetic. Interactions between proteins of the mucosal pellicle and tannins modified structural characteristics of the pellicle, especially the coating of cells by salivary MUC5B. Sensory relevance for the phenomena of aroma persistence and astringency, respectively, are discussed.

Keywords: oral mucosa, salivary proteins, mucosal pellicle, mucins, MUC1, MUC5B, tannins, aroma molecules, astringency, aroma persistence