



HAL
open science

Études et caractérisations tribologiques des mécanismes biophysiques de la lubrification orale

Ianis Ammam

► **To cite this version:**

Ianis Ammam. Études et caractérisations tribologiques des mécanismes biophysiques de la lubrification orale. Autre. Ecole Centrale de Lyon, 2024. Français. NNT : 2024ECDL0042 . tel-04850493

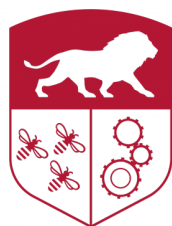
HAL Id: tel-04850493

<https://theses.hal.science/tel-04850493v1>

Submitted on 20 Dec 2024

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.



**CENTRALE
LYON**



SIS
SCIENCES
INGÉNIERIE SANTÉ
UNIVERSITÉ DE LYON

N° d'ordre NNT : 2024ECDL0042

Thèse de Doctorat de l'Université de Lyon opérée au sein de l'École Centrale de Lyon

École Doctorale N°488
Sciences Ingénierie Santé

Spécialité de doctorat :
Mécanique et Ingénierie

Soutenue publiquement le 28/10/2024 par :
Ianis Ammam

Études et caractérisations tribologiques des mécanismes biophysiques de la lubrification orale

Devant le jury composé de :

ZAIDI HAMID	Pr	Institut Pprime, Université de Poitiers	Rapporteur
LIRUSSI FRÉDÉRIC	PU-PH	Laboratoire de Toxicologie, CHU de Dijon	Rapporteur
MINFRAY CLOTILDE	Pr	LTDS ECL	Examinatrice
THIEULIN-PRIVET CORALIE	MCF	ECE Lyon	Examinatrice
NEIERS FABRICE (PRÉSIDENT)	Pr	INRAE, Université de Bourgogne	Examinateur
SRIVASTAVA ROHIT	Dr	CSGA, INRAE	Examinateur
ZAHOUANI HASSAN	Pr	LTDS ECL-ENISE	Directeur
PAILLER-MATTEI CYRIL	Pr	Université Claude Bernard Lyon 1	Co-encadrant
VARGIOLU ROBERTO	Dr	LTDS ECL	Co-encadrant

À Jade, ma mère, mon père et mes soeurs...

Des nains sur des épaules de géants.

Bernard de Chartres

REMERCIEMENTS

Conformément à l'usage, ce prologue est consacré à l'expression de ma reconnaissance. Il n'est pas toujours facile de trouver les mots justes pour traduire toute ma gratitude. Ces quelques phrases ne sauraient donc rendre pleinement hommage au soutien et à l'aide inestimables que m'ont offerts toutes les personnes mentionnées.

En premier lieu, je tiens à exprimer ma profonde gratitude aux professeurs Frédéric Lirussi et Hamid Zaidi pour avoir accepté de rapporter mes travaux de thèse. Merci d'avoir lu ce manuscrit avec intérêt et pour l'évaluation attentive de mes recherches. J'adresse également mes sincères remerciements à Clotilde Minfray, Coralie Thieulin, Rohit Srivastava et Fabrice Neiers pour leur présence en tant qu'examineurs lors de ma soutenance. Un merci particulier à Fabrice d'avoir présidé la soutenance avec autant de bienveillance. Merci à vous pour l'attention portée à ces travaux et pour les questions d'une grande pertinence qui, j'en suis convaincu, permettront à ce projet de progresser considérablement.

Je souhaite aussi exprimer toute ma reconnaissance au Professeur Hassan Zahouani, mon directeur de thèse, sans qui ce travail n'aurait pu voir le jour. Je lui suis reconnaissant pour sa bienveillance, ses conseils scientifiques, son soutien indéfectible et sa grande générosité. Je le remercie de m'avoir offert l'opportunité de participer à des conférences internationales où j'ai pu m'épanouir tant sur le plan professionnel que personnel. Ma gratitude va également au Docteur Roberto Vargiolu, mon co-encadrant, pour ses précieux conseils techniques, sa constante gentillesse et son soutien inébranlable. Enfin, je remercie chaleureusement le Professeur Cyril Pailler-Mattéi, mon second co-encadrant, pour tous ses conseils avisés et nos échanges enrichissants sous le cadre d'une porte.

En dehors de l'encadrement de cette thèse, je tiens à exprimer ma reconnaissance à tout le personnel du Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation pour leur précieuse contribution à ces travaux. Merci pour votre bienveillance, votre gentillesse, vos conseils techniques et biologiques sans lesquels je n'aurais pu avancer. Un merci particulier à Fabrice Neiers, Francis Canon, Noémie Herrmann, Mélanie Lelièvre, Alix Rollinat, Carole Tournier et Nicolas Poirier. Merci à Noémie, Mélanie et Alix pour votre présence le jour de ma soutenance, témoignant ainsi de votre bienveillance et de votre grande générosité. Enfin, je souhaite adresser un remerciement tout particulier à Clément Nivet, qui m'a formé et accompagné au début de ma thèse, et qui a suivi l'avancement de ce travail même après sa propre soutenance.

Je tiens à adresser un immense merci à tous les membres du LTDS pour leur bienveillance quotidienne, pour tous ces moments sportifs et toutes ces discussions. Un merci particulier à Isabelle, Sophie, Nazario. Merci d'avoir créé un environnement professionnel propice à mon épanouissement personnel. Venir au TMM était un véritable plaisir chaque matin.

Ce plaisir était, bien sûr, décuplé par la présence de mes collègues doctorants, qui sont devenus

de véritables amis. . .

Je pense bien sûr en premier à Lucas. Merci d'être toujours aussi bienveillant. Je ne vais pas énumérer tout ce que tu as fait pour moi. Merci pour le sport, pour toutes ces discussions, et surtout pour tous ces moments de rire, espèce de frappeur farceur ! Je ne vais pas faire un message trop émouvant, surtout en sachant qu'on restera amis et qu'on se verra chaque semaine, j'en ai aucun doute. On a un 100 km à faire et un voyage au Cap Vert à planifier, quand même ! Comme mon père l'a si bien dit : Lucas, c'est vraiment un mec super ! Je vais rectifier : c'est un ami super !

Émilie, un grand merci pour tous ces rires et nos échanges sur nos vies à la villa. Je sais que tu vas stresser jusqu'au bout malgré mes conseils et mon soutien, mais rappelle-toi que ton travail est exceptionnel et que tu réussiras ta thèse haut la main. Tu le mérites vraiment ! Souviens-toi de nos discussions sur tes amis : avec Jade et moi, tu en as maintenant deux fidèles. Nous serons là le jour de ta soutenance, entourée de tous tes amis.

Meriem, merci de m'avoir accueilli dès le premier jour de mon arrivée au laboratoire. Je te suis reconnaissant pour la relecture de mon manuscrit, tes conseils, ta grande gentillesse et ta bienveillance. Et désolé pour toutes ces images de cristallins que tu as dû endurer. . .

Rexhina, merci pour tous les bons moments passés ensemble ! Tu as été un véritable exemple de courage pour nous tous. Je te souhaite tout le bonheur du monde !

Guillaume, je suis ravi de savoir qu'il existe des supporters des Verts à Alençon. Merci d'être mon fidèle acolyte de course à pied et pour toutes nos discussions pendant les longues sorties. Merci également pour tous tes réels envoyés, ça enrichit mes références ! Tout comme Lucas, je n'ai aucun doute que nous continuerons à nous voir chaque semaine.

Merci, Timothée, d'avoir apporté ton sourire et le soleil occitan durant mes trois années de thèse. Heureusement que tu étais là pour parler un peu de rap ; tu as vraiment relevé le niveau musical ! Je te souhaite le meilleur pour la fin de ta thèse. Je serai présent à ta soutenance, et même après !

Cloé, merci pour ta gentillesse et ton sourire quotidien ! Pour les après-midis et soirées de jeux de société mémorables, tu es vraiment la plus fair-play de nous tous, merci pour ça. Merci aussi pour les balades en Haute-Loire, j'ai beaucoup aimé et je reviendrai ! Je te souhaite également le meilleur pour ta thèse, et je serai bien sûr là le jour de la soutenance.

Merci, Marina, pour ton sourire et ta bonne humeur contagieuse ! Merci également pour ta gentillesse et ta bienveillance.

Merci, Théo, pour ton humour. Tu as été un modèle de travail tout au long de ma thèse. J'espère que tout se passe pour le mieux à Toulouse.

Chaque personne mériterait un remerciement dédié, c'est certain, mais j'aurais besoin d'un second manuscrit pour cela, et je pense que celui-ci est déjà bien assez long. Alors, un merci particulier à : Amaury, Hussein, Jolan, Maxime, Louise, Mathilde C., Mathilde V., Thomas, Antoine M., Vito,

Marjolaine. Vous êtes tous des personnes exceptionnelles, et je vous souhaite le meilleur.

Je tiens à remercier mes amis de longue date, ceux qui me soutiennent et me suivent depuis le début de cette thèse, et même bien avant. Mathieu, Melvy, Azad, Corentin, Gabin et Clément, merci d'être ma famille, d'avoir plus confiance en moi que je n'en ai en moi-même. Merci d'être venus me soutenir le jour de ma soutenance. Merci pour tous ces moments passés ensemble où je ris plus souvent que je respire. Merci pour tout ce que nous avons partagé et pour tout ce qui nous attend encore. Vous êtes mes frères, et rien ne me rend plus heureux que de vous voir, vous aussi, évoluer.

Pour terminer, je remercie infiniment ma famille : mes tantes, mes oncles, mes cousins et cousines, qui m'ont soutenu à chaque instant. Avoir une armée de supporters rend la vie tellement plus simple. Merci également à mes grands-parents. À mon grand-père, qui est pour moi un modèle, j'espère que je t'ai rendu fier.

Merci à mes sœurs, Léa et Ynes, mes repères, mes piliers. Merci d'être mon pain de mie ! J'espère que vous êtes fières de moi, autant que je le suis de vous. C'est nous trois, ou rien.

Merci à mon père et à ma mère, à qui je dois tout. Merci pour tout ce que vous m'avez donné, pour tous les sacrifices, les valeurs, l'amour et la bienveillance. Merci à mon père, qui a sacrifié tant de nuits pour nous ; tu restes mon plus grand modèle. Merci à ma mère, pour tout son amour. Vous rendre fiers est ma plus grande victoire.

Enfin, je tiens à remercier mon soleil : merci, Jade, pour tout ce que tu fais pour moi. Merci de rendre mon quotidien si lumineux, de m'inonder de ton amour. La vie devient tout de suite plus douce dans du coton. Merci pour absolument tout.

اللَّهُ

AVANT PROPOS

Cette thèse a été réalisée dans le Laboratoire de Tribologie et Dynamique des Systèmes (LTDS) de l'École Centrale de Lyon. Ces travaux de thèse font partie du projet multidisciplinaire MACARON (MucosAl pellicle flAvouR interactiOn & perceptioN), soutenu par l'ANR (ANR, Grant ANR-20-CE21-0002). Nous avons travaillé en collaboration avec le Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation (CSGA) de l'INRAE à Dijon.



Table des matières

Avant propos	ix
Table des matières	xi
Liste des acronymes	xvii
Introduction	1
1 État de l'art	5
I Physiologie orale	7
I.1 La muqueuse orale	7
I.1.1 Anatomie	8
I.1.2 Histologie	8
I.2 La salive	12
I.2.1 Les composants de la salive	12
I.2.2 Fonctions de la salive	14
I.3 La pellicule mucoale	15
I.3.1 Composition et structure	15
I.3.2 Formation de la pellicule	16
I.3.3 Les fonctions de la pellicule mucoale	17
II Les acteurs de la lubrification	18
II.1 Les mucines	18
II.1.1 Généralités	18
II.1.2 Les mucines transmembranaires	19
II.1.3 Mucines sécrétées	22
II.2 Les perturbateurs de la lubrification : les composés astringents	24
II.2.1 Les tanins	24
II.2.2 Les protéines végétales	26
II.3 L'astringence et ses mécanismes moléculaires	29
II.3.1 Généralités	29
II.3.2 Des mécanismes moléculaires	29
II.3.3 Les protéines impliquées dans la perception de l'astringence	31
III Études de la tribologie orale <i>in vitro</i>	33
III.1 Paramètres physico-chimiques influençant les mesures	34
III.1.1 Le type de mouvement	34
III.1.2 Les propriétés de surfaces	35
III.1.3 Effet de la charge normale et de la pression de contact	37

III.1.4	Effet de l'élasticité des matériaux utilisés	38
III.2	Les systèmes de mesure <i>in vitro</i>	39
III.2.1	Les dispositifs de laboratoire	40
III.2.2	Les dispositifs industriels	40
III.3	Surfaces et matériaux utilisés	42
III.3.1	Les matériaux synthétiques	43
III.3.2	Les matériaux <i>ex vivo</i>	43
III.3.3	Des nouveaux matériaux multimodaux	44
III.4	Les perspectives des études de tribologie orale <i>in vitro</i>	46
2	Mise en place de la démarche expérimentale	47
I	Élaboration d'un environnement <i>in vitro</i> simulant le contact oral	49
I.1	Construction des épithéliums <i>in vitro</i>	50
I.1.1	Présentation des quatre isoformes	50
I.1.2	Protocole de culture cellulaire	53
I.2	Les substrats utilisés	55
I.2.1	Les lames de verre	55
I.2.2	Les hydrogels	56
I.3	Sélection des matériaux en contact avec les modèles d'épithélium	56
II	Méthodes de caractérisation <i>in vitro</i> de la lubrification orale	57
II.1	Description du biotribomètre	57
II.1.1	Conception du dispositif	57
II.1.2	Tests mécaniques	59
II.1.3	Pilotage du système et acquisition des données	61
II.2	Analyse des essais d'indentation	62
II.2.1	Théorie de Hertz : analyse élastique	63
II.2.2	Théorie de JKR : effet de l'adhésion	66
II.3	Analyse des essais tribologiques	68
II.3.1	Généralités	68
II.3.2	Mesure du coefficient de frottement	70
II.3.3	Mesure et calcul de l'énergie dissipée par frottement	72
II.4	Démarches des analyses statistiques	73
II.4.1	Test de normalité	73
II.4.2	Test de significativité	73
II.4.3	Analyse en composantes principales	74
II.5	Validation du dispositif	74
II.5.1	Validation des essais d'indentation	75
II.5.2	Validation des essais tribologiques	76
III	Méthodes de caractérisation des surfaces des modèles d'épithélium oral :	
	Endommagement, Topographie et Chimie de surface	78
III.1	Visualisation et quantification de l'endommagement <i>post mortem</i> des modèles d'épithélium	78
III.1.1	L'interférométrie	78
III.1.2	Analyse de l'endommagement	79
III.2	Topographie multi-échelles des modèles d'épithélium	81

III.2.1	Préparation des échantillons pour la décomposition en ondelettes	81
III.2.2	Décomposition en ondelettes : Méthodologie	81
III.2.3	Application de la décomposition en ondelettes	85
III.3	Compositions moléculaires et chimiques de surface	86
III.3.1	La spectroscopie Raman	86
III.3.2	Préparation des échantillons et acquisition des spectres	87
III.3.3	Analyses chimiométriques	88
IV	Conclusions et bilan du chapitre	91
3	Exploration du rôle de la mucine MUC1 dans la lubrification orale humaine	93
I	Introduction	95
I.1	Problématique	95
I.2	Stratégie de recherche	96
II	Protocoles	97
II.1	Collection de la salive	97
II.2	Les modèles d'épithélium	97
II.2.1	Reconstitution de la pellicule mucoale	97
II.3	Protocole tribologique	98
II.4	Protocole d'indentation : mesure de la force d'adhésion	99
II.5	Analyses physico-chimiques	99
II.5.1	Étude de l'endommagement	99
II.5.2	Analyses des profils chimiques de surface	100
II.6	Analyses statistiques	100
III	Études expérimentales	101
III.1	Étude de la fonction de MUC1 dans la lubrification intrinsèque des modèles d'épithélium oral	101
III.1.1	Problématique	101
III.1.2	Résultats et Discussions	101
III.1.3	Conclusions intermédiaires	103
III.2	Évaluation du rôle de MUC1 sur les propriétés de lubrification de la pellicule mucoale	104
III.2.1	Problématique	104
III.2.2	Résultats et Discussions	104
III.2.3	Conclusions intermédiaires	108
III.3	Analyse de l'effet de la structure de MUC1 sur la lubrification	109
III.3.1	Étude de la fonction du domaine VNTR dans les propriétés lubrifiantes de la pellicule mucoale	109
III.3.2	L'implication du domaine SEA dans les fonctions lubrifiantes de la PM	111
III.3.3	Conclusions intermédiaires	113
III.4	Étude des propriétés globales de lubrification de la pellicule mucoale	114
III.4.1	Problématiques	114
III.4.2	Résultats et Discussions	114
III.4.3	Conclusions intermédiaires	117
IV	Conclusions et bilan du chapitre	117

4	Influence des composés astringents et rôle protecteur des protéines riches en proline	121
I	Introduction	123
I.1	Problématique	123
I.2	Stratégie de recherche	124
II	Protocoles	125
II.1	Collection de la salive	125
II.2	Modèles d'épithélium	125
II.2.1	Reconstruction de la pellicule mucoale	126
II.2.2	Solution de tanins et exposition au modèle d'épithélium.	126
II.2.3	Solution de protéines végétales et animales et exposition au modèle d'épithélium	127
II.2.4	Exposition d'une solution de protéines riches en prolines (PRP)	127
II.3	Protocoles de mesures mécaniques	127
II.3.1	Essais tribologiques	127
II.4	Analyses physico-chimiques	128
II.4.1	Étude de l'endommagement	128
II.4.2	Analyse topographique multi-échelle	128
II.4.3	Examen des profils chimiques des surfaces	128
II.5	Indice de tension	128
II.5.1	Les quatre étapes du modèle	129
II.6	Analyses statistiques	132
III	Études expérimentales	132
III.1	Impact de l'ajout de tanins sur la lubrification	132
III.1.1	Problématique	132
III.1.2	Analyse des résultats	133
III.1.3	Conclusions intermédiaires	148
III.2	Corrélation de nos résultats tribologiques avec un modèle d'intensité de l'astringence	149
III.3	Étude de l'influence des protéines végétales sur la lubrification et comparaison avec une protéine d'origine animale	151
III.3.1	Problématique	151
III.3.2	Analyses et interprétations	152
III.3.3	Conclusions intermédiaires	156
III.4	Exploration du rôle protecteur des protéines riches en prolines (PRP)	157
III.4.1	Problématique	157
III.4.2	Résultats et analyses	157
III.4.3	Conclusions intermédiaires	162
IV	Conclusions et bilan du chapitre	163
5	Corrélation entre tribologie orale <i>in vitro</i> et évaluation sensorielle	167
I	Introduction	169
I.1	Problématiques	169
I.2	Stratégie de recherche	170
II	Protocoles expérimentaux	171

II.1	Construction des groupes de sensibilité	171
II.1.1	Choix des participants	171
II.1.2	Solution d'acide tannique pour les tests sensoriels	171
II.1.3	Protocole de détermination des seuils de perception	172
II.1.4	Classification des individus	172
II.1.5	Collection de la salive	174
II.2	Protocole de préparation des échantillons	174
II.2.1	Préparation des modèles d'épithélium	174
II.2.2	Reconstruction de la pellicule mucoale	175
II.2.3	Solution d'acide tannique pour les essais de frottement	175
II.3	Protocoles expérimentaux	176
II.3.1	Essais tribologiques	176
II.3.2	Analyse de l'endommagement	176
II.4	Analyses statistiques	176
III	Études expérimentales	176
III.1	Niveau 1 : Étude globale incluant le panel complet	177
III.1.1	Problématique	177
III.1.2	Analyses et discussions des résultats	177
III.1.3	Conclusions intermédiaires	178
III.2	Niveau 2 : Différentiation des deux catégories de sensibilité	178
III.2.1	Problématique	178
III.2.2	Résultats et discussions	179
III.2.3	Conclusions intermédiaires	180
III.3	Niveau 3 : Identification des sous-groupes	181
III.3.1	Problématique	181
III.3.2	Résultats et discussions	181
III.3.3	Conclusions intermédiaires	183
IV	Conclusion du chapitre	184
6	Nouvelle approche de la simulation de la tribologie orale <i>in vivo</i>	187
I	Introduction	189
I.1	Problématique	189
I.2	Stratégie de recherche	189
II	Protocoles	190
II.1	Collection de la salive	190
II.2	Construction d'un nouveau modèle de muqueuse orale	191
II.2.1	Les isoformes de MUC1	191
II.2.2	Nouveau substrat : l'hydrogel	191
II.2.3	Reconstruction de la pellicule mucoale	192
II.2.4	Solution d'EgCG et exposition au modèle d'épithélium	192
II.3	Protocoles de mesure mécanique	192
II.3.1	Tests de friction	192
II.3.2	Caractérisation par indentation	194
II.4	Analyse de l'endommagement	194
II.5	Étude de la mouillabilité	195

II.6	Analyses statistiques	195
III	Études expérimentales	195
III.1	Caractérisations des hydrogels	195
III.1.1	Problématique	195
III.1.2	Observations et Analyses des résultats	196
III.1.3	Conclusions intermédiaires	199
III.2	Étude de la lubrification sur les hydrogels seuls	199
III.2.1	Problématique	199
III.2.2	Analyse et interprétation des résultats	199
III.2.3	Conclusions intermédiaires	201
III.3	Le rôle de la protéine MUC1 dans les propriétés lubrifiantes de la pellicule mucosale	201
III.3.1	Problématique	201
III.3.2	Discussion des observations	201
III.4	L'effet de l'EgCG sur la lubrification des modèles d'épithélium	203
III.4.1	Problématique	203
III.4.2	Analyse des données et réflexions	204
III.5	Mécanismes moléculaires de l'astringence intégrant la mucine MUC1	206
III.5.1	Problématique	206
III.5.2	Interprétation des Résultats et Discussions	206
IV	Conclusion du chapitre	207
	Conclusions générales et perspectives	209
	Liste des figures	217
	Liste des tableaux	225
	Références Bibliographiques	229
A	Annexes	269
I	Annexe A : Protocole de comptage des cellules avec cellule de Malassez	271
II	Annexe B : Calcul de la pression de contact entre la bille en silicone et les modèles cellulaires sur <i>les modèles hard</i>	273
III	Annexe C : Spectres Raman utilisés pour les ACP	274
IV	Annexe D : Images <i>post mortem</i> des épithéliums en présence des pro- téines riches en prolines (PRP)	276

LISTE DES ACRONYMES

EgCG (-)-Épigallocatechine gallate

FBPP protéine de fève

IgA Immunoglobuline A

MUC1 mucine 1

MUC5B mucine 5B

MUC7 mucine 7

PBP produits à base de plantes

PBS Tampon phosphate salin

PDMS polydiméthylsiloxane

PID régulateur Proportionnel Intégral Dérivé

PM pellicule mucosale

POA produits d'origine animale

PP protéine de pois

PRP protéines riches en prolines

SEA Protéine de sperme d'oursin entérokinase et agrine

VNTR Répétition en tandem à nombre variable

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Avec une population mondiale en constante augmentation et des projections qui prédisent 10 milliards d'habitants d'ici 2050 [1], l'urgence de trouver de nouvelles approches pour produire et consommer des aliments devient plus en plus évidente. Dans ce contexte, l'exploration de nouvelles sources alimentaires est impérative. La pression exercée sur l'approvisionnement alimentaire actuel pousse les fabricants et les chercheurs à élaborer des stratégies visant à limiter la surconsommation d'aliments polluants, tels que les produits riches en protéines animales. En 2005, l'industrie de la viande était responsable de 14.5% des émissions de gaz à effet de serre d'origine anthropique [2]. La recherche en sciences alimentaires a donc pour objectif de trouver des substituts aux protéines d'origine animale. Cependant, ces produits de substitution peuvent souvent se révéler désagréables en bouche et présenter des caractéristiques astringentes en raison de leur composition riche en tanins. L'astringence est caractérisée par une perception de sécheresse et de rugosité dans la cavité buccale après la consommation d'aliments riches en tanins [3]. La problématique principale est donc d'améliorer l'acceptabilité de ces nouveaux produits pour les consommateurs. Ainsi, au cours des dernières années, de nombreux chercheurs se sont penchés sur les processus de transformation alimentaire afin de développer de nouveaux produits qui allient expériences sensorielles satisfaisantes et qualités nutritives [4]. Cette démarche exige une compréhension approfondie des mécanismes impliqués dans la transformation des aliments et notamment la lubrification orale.

Plusieurs études [5, 6] ont montré que l'analyse rhéologique seule des aliments ne suffit pas à appréhender pleinement les processus oraux. Par conséquent, ces recherches ont proposé d'intégrer la tribologie dans l'analyse. La tribologie, discipline dédiée à l'étude du frottement, de la lubrification et de l'usure, offre un cadre idéal pour explorer les mécanismes et les interactions impliquées dans le processus oral. En effet, la dynamique complexe des mouvements entre les différentes surfaces (palais, langue, dents, muqueuse buccale) génère des forces de frottement significatives. L'objectif est donc d'établir des liens entre les paramètres physiques et sensoriels afin de développer une méthodologie permettant de caractériser et de quantifier la perception de ces nouveaux produits alimentaires, tout en tenant compte des impératifs du développement durable. De plus, la tribologie buccale offre des méthodologies permettant d'analyser les mécanismes de lubrification dans la cavité orale.

Le projet de recherche MACARON s'inscrit dans ce contexte et aborde une problématique inédite : le rôle de la muqueuse buccale dans la perception sensorielle. Il examine également le rôle de la protéine transmembranaire mucine 1 (MUC1) dans la lubrification de la muqueuse buccale en mettant l'accent sur la perception de l'astringence. Dans ce contexte, ces travaux de thèse se focalisent sur l'étude de ces problématiques d'un point de vue mécanique et tribologique.

La problématique de ce travail est donc liée à la lubrification orale et ses mécanismes moléculaires à travers une approche tribologique *in vitro*. Cela inclut notamment l'étude du rôle joué par la protéine MUC1 dans la lubrification et également l'étude des effets des tanins. Parallèlement, nous examinerons les divers mécanismes de protection mis en place par l'organisme pour contrer ces effets et notamment le rôle des protéines riches en proline (PRP). En collaboration avec le Laboratoire des Sciences du Goût et de l'Alimentation de l'INRAE, notre travail explore également les corrélations entre des paramètres physiques et la perception effective de l'astringence. Cette thèse propose une nouvelle méthodologie où des essais tribologiques sont menés sur des modèles d'épithélium oral, basés sur la transfection de cellules épithéliales orales (ligne cellulaire TR146) avec quatre gènes codant pour différentes isoformes de MUC1. Ces modèles ont été développés dans le cadre de deux thèses, celle de Clément Nivet issue du même projet de recherche que ces travaux de thèse [7], ainsi que celle de Sarah Ployon issue du projet ANR précédent (MUFFIN) [8]. Mes travaux de thèse s'inscrivent dans le cadre du projet multidisciplinaire MACARON (MucosAI pelliCle fIAvouR interactiOn & perceptiON), financé par l'ANR (Agence Nationale de la Recherche, subvention ANR-20-CE21-0002).

Ce manuscrit de thèse est structuré autour de 6 chapitres qui présentent différents aspects de mon travail.

Le premier chapitre, de manière conventionnelle, consistera en une revue bibliographique présentant la physiologie orale et les acteurs de la lubrification, ainsi qu'une synthèse des études de tribologie orale *in vitro*.

Le deuxième chapitre sera consacré à la description des outils utilisés dans le cadre de cette thèse pour aborder les différentes problématiques. Nous y détaillerons la mise en place des modèles d'épithélium ainsi que le développement du dispositif tribologique. De plus, nous expliquerons les méthodes d'analyse des résultats mécaniques et de caractérisations *post mortem*.

Le chapitre 3 se penchera sur le rôle de la mucine MUC1 dans la lubrification des modèles d'épithélium, en évaluant son impact et en analysant les effets de sa structure spécifique, notamment les fonctions des domaines VNTR et SEA.

Le chapitre 4 examinera l'effet des tanins sur la lubrification des épithéliums *in vitro*, en mettant en lumière le rôle actif de MUC1 et sa structure en présence de tanins, ainsi que les mécanismes protecteurs de MUC1. De plus, nous étudierons *in vitro* l'effet protecteur des protéines riches en prolines. Nous élargirons notre étude à d'autres types de tanins et à des protéines végétales, lesquels seront comparés au comportement tribologique des protéines d'origine animale.

Le chapitre 5 proposera une analyse de la relation entre la perception sensorielle de l'astringence et des paramètres physiques, avec pour objectif d'identifier différents groupes de sujets plus ou moins sensibles à l'astringence procuré par l'acide tannique à

partir de mesures tribologiques utilisant leur salive. L'objectif est d'établir une corrélation entre les paramètres tribologiques et une classification sensorielle.

Enfin, **le dernier chapitre**, le sixième de ce manuscrit de thèse sera consacré à une nouvelle approche de nos travaux, en améliorant la méthodologie développée au cours de ces recherches. L'objectif est de créer un nouveau modèle de muqueuse orale permettant une approche plus fidèle des tissus oraux, en optimisant la physico-chimie de surface et la rigidité pour obtenir des paramètres de rugosité, de mouillabilité et de module d'élasticité fidèles. Nous validerons ensuite ce nouveau modèle en validant les résultats obtenus dans nos études précédentes.

Pour conclure, nous présenterons une section finale de conclusions et perspectives qui évaluera notre travail et proposera des directions futures en utilisant les méthodologies développées au cours de cette thèse. Ces travaux se concentrent principalement sur l'évaluation de l'astringence. Dans le futur, d'autres sensations orales pourront être étudiées, telles que l'effet du gras sur la lubrification. De plus, nous proposerons des approches liées à la santé orale, en particulier pour les pathologies associées à la lubrification.

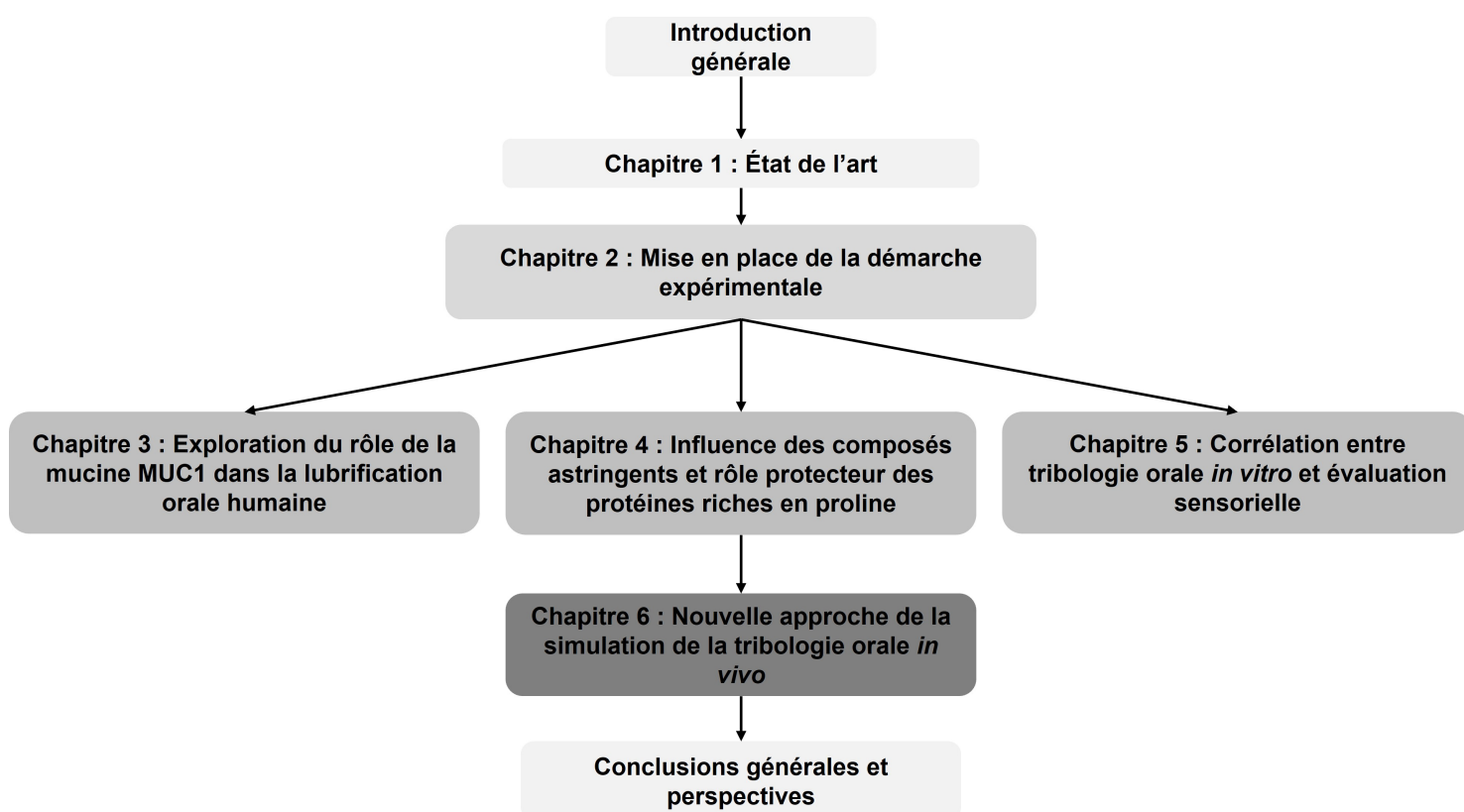


FIGURE 1 – Organigramme du manuscrit

Chapitre 1

État de l'art

SOMMAIRE

I	PHYSIOLOGIE ORALE	7
I.1	La muqueuse orale	7
I.2	La salive	12
I.3	La pellicule mucoale	15
II	LES ACTEURS DE LA LUBRIFICATION	18
II.1	Les mucines	18
II.2	Les perturbateurs de la lubrification : les composés astringents	24
II.3	L'astringence et ses mécanismes moléculaires	29
III	ÉTUDES DE LA TRIBOLOGIE ORALE <i>in vitro</i>	33
III.1	Paramètres physico-chimiques influençant les mesures	34
III.2	Les systèmes de mesure <i>in vitro</i>	39
III.3	Surfaces et matériaux utilisés	42
III.4	Les perspectives des études de tribologie orale <i>in vitro</i>	46

I Physiologie orale

L'une des voies d'accès au corps humain, en particulier aux voies aériennes supérieures et au système digestif, est la cavité orale, figure 1.1. Cet espace représente une combinaison d'organes et de tissus essentiels pour différentes fonctions physiologiques telles que la mastication, l'insalivation des aliments, ainsi que la respiration, la phonation et l'expression faciale. La cavité orale, en raison des nombreux besoins physiologiques auxquels elle répond, est l'une des zones les plus innervées du corps humain, présentant une densité élevée de fibres nerveuses et de récepteurs sensoriels [9]. Grâce à cette riche innervation, la cavité buccale est un lieu crucial pour la perception sensorielle des aliments et pour la protection de ses constituants, car les récepteurs permettent un contrôle précis de l'utilisation des dents et de la langue. Un exemple frappant de cette abondante innervation se trouve dans les lèvres, qui abritent plus de thermorécepteurs que l'ensemble du corps (environ 20 récepteurs / cm^2). Ces récepteurs assurent la préservation de la cavité orale contre les conséquences de l'ingestion d'aliments trop chauds ou trop froids [10].

En outre, plusieurs mécanismes de protection opèrent pour maintenir un environnement sain et garantir le bon fonctionnement de cet organe. À titre d'exemple, la salive, en particulier la pellicule mucoale (PM) ancrée à la surface de la muqueuse orale, préserve l'intégrité des muqueuses.

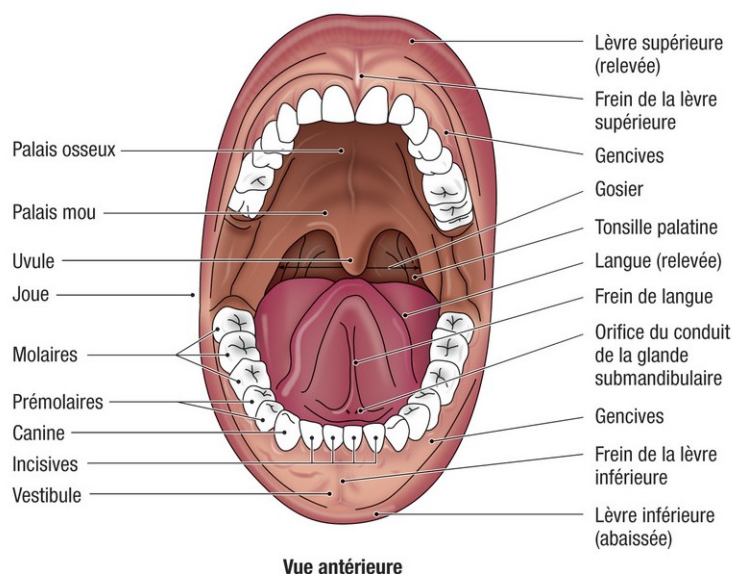


FIGURE 1.1 – Représentation de la cavité orale, vue antérieure d'après l'ouvrage de G.J Tortora et B.Derrickson [11]

I.1 La muqueuse orale

Les muqueuses sont des tissus qui revêtent les cavités du corps humain et qui sont en continuité avec la peau. Elles se divisent en deux composants tissulaires : un épithélium malpighien pavimenteux stratifié et un tissu conjonctif sous-jacent (chorion ou lamina propria) [12].

Ces muqueuses sont présentes dans trois systèmes corporels :

- Respiratoire
- Urogénital
- Digestif

Les muqueuses présentes dans les systèmes digestif, reproducteur, respiratoire et buccal comportent des glandes qui produisent du mucus, maintenant ainsi une hydratation constante. La cavité buccale est hydratée en permanence grâce à la salive. Le flux salivaire permet également de réguler la prolifération de la microflore buccale [12]. La muqueuse buccale constitue donc un écosystème stable qui contribue également à protéger la cavité buccale contre les micro-organismes pathogènes [13].

La muqueuse orale, qui tapisse la cavité buccale, présente une structure hétérogène qui se subdivise en trois catégories : muqueuse masticatoire, muqueuse de recouvrement et muqueuse spécialisée (recouvrant la face dorsale de la langue) [14]. De manière générale, les muqueuses présentent une perméabilité nettement supérieure à celle de la peau [13]. En conclusion, les muqueuses servent d'interface entre l'environnement extérieur et l'intérieur du corps, assurant la protection de l'organisme contre les agressions extérieures [15].

I.1.1 Anatomie

La cavité orale est recouverte de 3 types de muqueuses : de recouvrement, la spécialisée qui correspond à la muqueuse linguale et la masticatoire [16, 17] :

- La muqueuse de recouvrement qui recouvre 60% de la cavité buccale est composée de la muqueuse alvéolaire, la muqueuse buccale (qui recouvre les joues) et la muqueuse labiale (qui recouvre l'intérieur des lèvres) ;
- La muqueuse spécialisée est située sur la langue et est composée d'un épithélium papillaire, présentant notamment des papilles gustatives ;
- La muqueuse masticatoire est située près des dents. Elle recouvre 20% de la cavité buccale. Ces muqueuses subissent des efforts causés par la mastication et sont impactées directement par l'entrée de micro-organismes.

I.1.2 Histologie

La muqueuse masticatoire tapisse la gencive et le palais dur (ou palais osseux, voir figure 1.1). Elle est soumise aux forces mécaniques de la mastication, provoquant de l'abrasion et du cisaillement [18].

La muqueuse de recouvrement correspond à 60 % de la cavité orale [12] et tapisse les joues, les lèvres, le palais mou, la partie ventrale de la langue et le plancher buccal, voir figure 1.1. Elle constitue une surface élastique et déformable capable de s'étirer lors de mouvements tels que la mastication et la parole [19]. La structure de ces muqueuses est la même. un épithélium malpighien repose sur une lame basale [20], et en dessous, un tissu conjonctif maintient le tout (lamina propria). Sous la muqueuse de recouvrement repose une sous-muqueuse [21]. La figure 1.2 présente les différentes strates de la muqueuse orale en fonction de leur type.

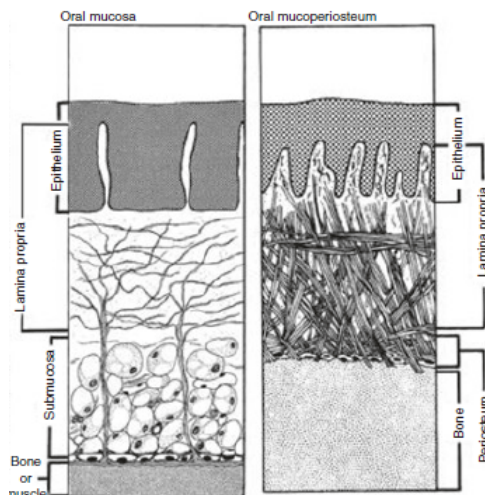


FIGURE 1.2 – Schéma de coupes histologiques des muqueuses orales - (Droite) : Muqueuse masticatoire (Gauche) : Muqueuse de revêtement. [16]

I.1.2.1 L'épithélium oral

L'épithélium oral représente la première frontière avec l'environnement buccal. Comme pour l'épithélium cutané, c'est une couche caractérisée par un empilement de cellules riches en kératine, avec des interactions fortes entre elles [21]. La couche épithéliale de la muqueuse buccale est un épithélium pavimenteux stratifié. L'épithélium constitue une barrière protectrice contre les agressions mécaniques, biologiques, chimiques ou microbiennes et même contre les réactions inflammatoires [22]. L'empilement des cellules n'est pas aléatoire et d'un point de vue histologique (figure 1.3), il existe 4 strates, composées notamment de kératinocytes [13, 17]. La couche la plus profonde de l'épithélium oral est la couche basale. Elle est le siège de la mitose, donc considérée comme une couche germinative. Les kératinocytes se multiplient dans cette strate puis migrent vers la surface. Plus en surface, se trouve la couche épineuse, où les kératinocytes produisent des lipides et des céramides qui se logent entre la couche granuleuse et la couche cornée. Ces éléments lipidiques permettent de créer une véritable barrière protectrice. En fonction du type d'épithélium (kératinisé ou non), les deux dernières couches ne sont pas les mêmes. Dans le cas d'un épithélium kératinisé, c'est-à-dire pour la muqueuse masticatoire, nous retrouvons deux couches superficielles (figure 1.3) :

- Une couche granuleuse au sein de celle-ci, les cellules ont perdu leur noyau et deviennent donc anucléées. Elles se perméabilisent et renforcent les protéines membranaires ;
- La couche la plus superficielle est la couche cornée construite de cellules imbriquées les unes sur les autres par un complexe lipidique. C'est une strate riche en kératine (environ 90% de kératinocytes) et donc une couche rigide [12, 13, 17].

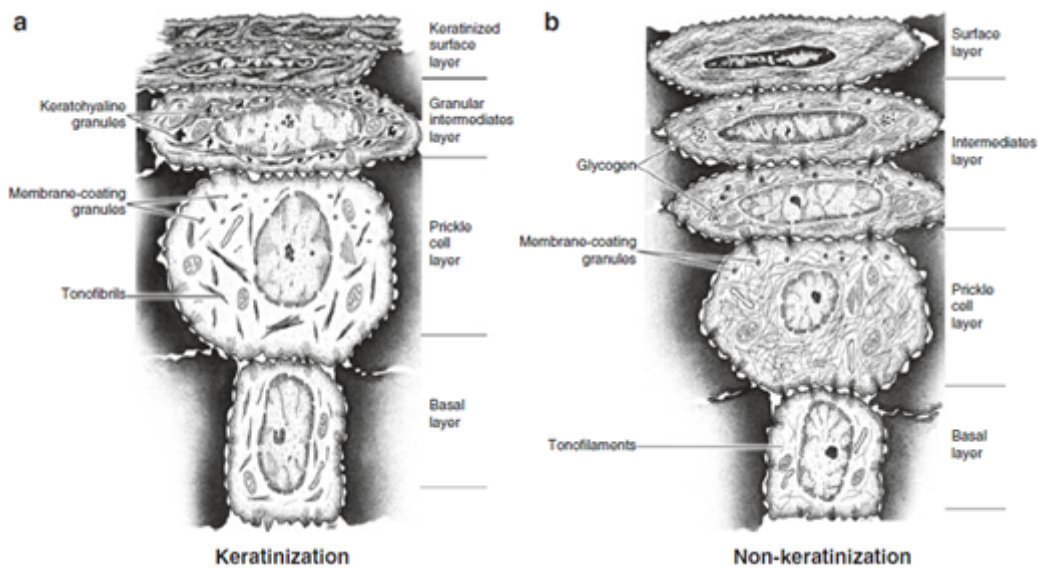
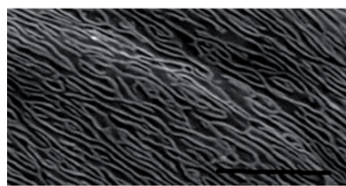


FIGURE 1.3 – Description histologique de l'épithélium oral. (a) Kératinisé (b) Non kératinisé - Mise en évidence des différences structurelles entre les épithéliums - Issue de [13]

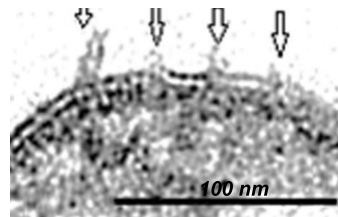
Ainsi, dans le cadre de la muqueuse masticatoire, les kératinocytes de la lame basale migrent vers la surface en s'aplatissant et se différencient en cellules sans noyau. Ce processus augmente l'imperméabilité et la résistance de l'épithélium face aux corps étrangers. Pour les zones non-kératinisées, comme la muqueuse de recouvrement, la couche granuleuse n'existe pas. De plus, les cellules de la couche superficielle conservent leur noyau.

D'autres types cellulaires sont présents dans l'épithélium oral : les mélanocytes, les cellules de Langerhans, les cellules de Merkel et les lymphocytes pour en illustrer quelques-uns. Les mélanocytes produisent de la mélanine et protègent contre les rayons UV ; ils sont caractéristiques de la couleur de la muqueuse. Les cellules de Langerhans et les lymphocytes font partie du système immunitaire et sont chargés de répondre au défi antigénique si nécessaire. Les cellules de Merkel sont des mécanorécepteurs sensibles aux déformations mécaniques [13].

Les cellules de l'épithélium présentent des replis membranaires appelés microplicae, voir figure 1.4a. Ces plis augmentent la surface d'interface de l'épithélium avec l'environnement extérieur. La hauteur de ces replis varie entre 200 et 800 nm , pour une largeur de 100 à 200 nm en fonction de la région de la cavité buccale [15, 23]. En plus de l'augmentation de la surface, ce sont sur ces microplicae que sont exprimées les protéines transmembranaires mucine 1 (MUC1) (figure 1.4b) [24, 25]. Cette mucine permet la formation d'une couche de protéines salivaires ancrée à la surface de l'épithélium, appelée pellicule muqueuse (PM). Elle permet d'une part de maintenir la lubrification et l'hydratation de la cavité buccale et d'autre part de constituer une barrière de défense par rapport aux éléments extérieurs.



(a) Micrographie électronique à balayage des microplicae sur l'épithélium oral (Bar = 10 μ m) [24]



(b) Membrane cellulaire avec présence de protéines transmembranaires (MUC1) (Bar = 100 nm) [24]

FIGURE 1.4 – Images des microplicae et de MUC1 à la surface des cellules épithéliales de la muqueuse orale

I.1.2.2 La lamina propria

La lamina propria est une couche sous-jacente à l'épithélium oral (voir figure 1.2). C'est une couche de tissu conjonctif composée d'une matrice extracellulaire, constituée de fibres et de substance fondamentale (SF). La lamina propria est donc composée de la matrice extracellulaire, elle-même constituée de fibres (collagène, élastine) et d'une SF composée de protéoglycanes, de glycoprotéines, etc [13]. Cette couche sous-jacente possède également des cellules dites fixes (fibroblastes, adipocytes) ainsi que des cellules immunitaires. Son rôle, similaire au derme pour la peau, est de fournir un soutien mécanique (à travers les fibres et la SF) et une défense immunitaire. De nombreux échanges se produisent entre l'épithélium et la lamina propria, notamment de nutriments et d'oxygène vers l'épithélium [26]. En cas d'agression, la réaction inflammatoire et immunitaire se manifeste dans cette couche car elle est richement vascularisée. Il existe également une différence entre la muqueuse de recouvrement et la muqueuse masticatoire. En effet concernant la muqueuse masticatoire, la lamina propria est directement attachée à l'os via un réseau de fibres, tandis que pour la muqueuse de recouvrement, il existe une couche encore plus profonde composée d'acide gras, présente sous la lamina propria.

Finalement, nous retrouvons de grandes similitudes entre l'architecture de la peau et celle de la muqueuse orale. Un épithélium composé en grande majorité de kératinocytes surplombe un tissu conjonctif viscoélastique. Cet épithélium constitue l'épiderme, et le tissu conjonctif sous-jacent forme le derme. [20]. La cavité orale est constamment soumise à des efforts, des dégâts et des changements d'environnement qui peuvent être causés par la mastication ou la parole. Ainsi, la muqueuse orale a pour rôle de protéger et de défendre les tissus sous-jacents. Elle fournit une résistance aux agressions mécaniques et à la prolifération de microorganismes. Elle apporte également une barrière à la perméabilité des substances nocives [12]. Ce rôle de protection est permis grâce à la structure de l'épithélium et à la présence de plusieurs cellules immunitaires (cellules de Langerhans et des lymphocytes) et de cellules épithéliales. Elles permettent de détecter des agents pathogènes et de sécréter des substances antimicrobiennes. De plus, les fonctions sensorielles de la muqueuse orale sont très importantes et sont gérées par de nombreuses terminaisons nerveuses, cellules (cellules de Merkel) et structures cellulaires comme les bourgeons gustatifs présents dans différentes zones de la muqueuse [12].

I.2 La salive

La production de salive est essentielle au bien-être et permet de prémunir le développement de nombreuses pathologies plus graves. Une réduction (hyposalivation) de la production de salive, voire une absence de production (asialie), entraîne une xérostomie qui se caractérise par la sensation de bouche sèche. La xérostomie a de nombreuses conséquences [27], comme l'augmentation du risque de caries dentaires, le développement de maladies parodontales, l'augmentation des infections buccales, des problèmes de déglutition (dysphagie) ou encore une altération des sensations gustatives.

Ces complications montrent l'importance d'une sécrétion salivaire normale. À l'inverse, une hypersalivation entraînera également différentes conséquences pour le sujet. La salive est donc essentielle pour maintenir une santé buccale saine. C'est pourquoi la cavité buccale, et plus particulièrement la muqueuse orale, est constamment hydratée et humidifiée par la salive. La salive est le fluide biologique le plus abondant de notre corps, avec environ 1 litre de salive produite par jour [13, 28].

La salive est sécrétée par des glandes salivaires réparties dans la cavité buccale en deux types [29] :

- Les glandes principales (parotide, sous-maxillaire et sublinguale) : leur sécrétion est réflexe et prandiale ;
- Les glandes salivaires accessoires présentes au sein de la muqueuse orale, sous les lèvres, la langue ou encore le palais. Leur sécrétion est continue.

L'ensemble des sécrétions de toutes les glandes salivaires produit la salive pure. La salive totale représente la somme entre toutes les salives pures directement issues des glandes salivaires avec tous les éléments d'origine buccale : le fluide gingival, les cellules desquamées par la muqueuse orale, les mucosités d'origine pulmonaire, les débris alimentaires, le tartre, la flore commensale (microorganismes, virus et champignons, etc.), et enfin les dépôts exogènes (causés par le tabac, le cannabis, les médicaments, etc.), voir figure 1.5 [29]. Le flux salivaire varie en fonction des conditions de stimulation. Par exemple, une étude datant de 2003 a démontré sur 22 sujets que le flux salivaire en condition non stimulée était plus faible que dans des conditions de mastication (donc avec une stimulation) [30]. Or, après centrifugation, les éléments en suspension dans la salive peuvent être éliminés, tels que les bactéries, les débris alimentaires et les cellules desquamées, ce qui correspond à la salive mixte. Elle peut être analysée plus facilement.

I.2.1 Les composants de la salive

La composition salivaire (figure 1.5) est très riche et est évidemment très liée à ses nombreuses fonctions. La salive est composée essentiellement d'eau, environ 95 à 99%. Les pourcentages restants correspondent à des composants soit organiques soit inorganiques : des électrolytes, des enzymes ou des glycoprotéines [31, 32]. Nous retrouvons une grande variété d'électrolytes comme du sodium, du potassium, du calcium ou encore du thiocyanate [33]. Les principaux éléments organiques qui composent la salive sont les protéines. La concentration en protéines salivaires est généralement comprise entre 1 et 2 mg/mL (cette concentration augmente avec le débit salivaire) [34, 35], avec plus de 3000 protéines différentes identifiées. Elles sont classées en deux groupes en fonction

de leur origine [32] : les protéines intrinsèques (synthétisées par les glandes salivaires directement dans la cavité orale) et extrinsèques (arrivant du sang par plusieurs voies de transport) :

- Les protéines extrinsèques proviennent du sang par différentes voies de diffusion. Les hormones ou les molécules immunologiques sont notamment classées dans cette catégorie [32, 36]. Elles assurent une défense immunitaire contre les micro-organismes au sein de la cavité buccale. Parmi elles se trouvent les albumines (5% des protéines totales), les α - et β -globulines ainsi que des immunoglobulines [37].
- Les protéines intrinsèques sont sécrétées par les glandes salivaires [32, 36].

Les enzymes salivaires qui permettent la dégradation des nutriments et la protection microbienne. Notamment l' α -amylase (représentant 30% des protéines), la lipase, le lysozyme et les peroxydases. Les α -amylases permettent, par exemple, la dégradation des amidons alimentaires [36]. De nombreuses autres enzymes sont également présentes pour métaboliser les composés exogènes potentiellement toxiques et, en même temps, ont un effet sur la modulation de la perception [38].

Les protéines riches en prolines (PRP) représentent 70% des protéines salivaires sécrétées par les glandes parotidiennes et submandibulaires. Les PRP basiques maintiennent la lubrification orale et les PRP acides maintiennent la calcémie [36]. Ces protéines se caractérisent par une prédominance de proline (un acide aminé).

Les mucines qui constituent 16% des protéines intrinsèques, telles que mucine 7 (MUC7) et mucine 5B (MUC5B) [31]. Ce sont des glycoprotéines qui polymérisent en présence d'eau, ce qui permet de créer la PM en surface de la muqueuse orale. Cette pellicule augmente la lubrification orale et la protection contre les bactéries et les agressions [36]. Cette pellicule est visqueuse et sa viscosité, liée à la lubrification orale, est proportionnelle au taux de mucines [36].

D'autres composants moins importants en termes de proportion sont présents dans la salive. Comme les hormones qui modulent la synthèse des protéines, des traces d'ARN, de lipides ou même de glucose. Beaucoup de ces protéines sont libres dans la salive, tandis que d'autres, plus spécifiques, sont ancrées à la surface buccale. Ainsi, un film mince de protéines salivaires, appelé la pellicule mucosale, couvre la muqueuse orale, permettant à la muqueuse d'être constamment lubrifiée [25, 34]. Les nombreux composants salivaires, qu'ils soient organiques ou inorganiques, endogènes ou exogènes, fournissent à la salive ses fonctions essentielles au bon fonctionnement de la cavité orale, notamment la protection, la lubrification, la digestion et le goût.

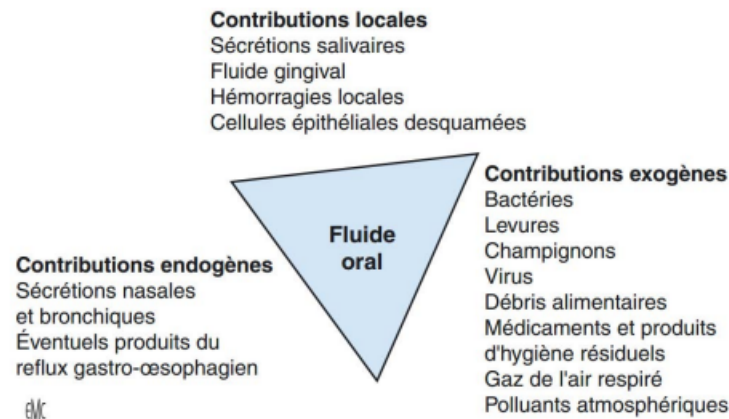


FIGURE 1.5 – Constituants de la salive [32]

1.2.2 Fonctions de la salive

La salive est un fluide précieux qui permet de préserver le bon état de la cavité buccale. Ses fonctions sont multiples et peuvent se diviser en plusieurs catégories qui contribuent à maintenir un écosystème oral sain [31, 39] :

- **La lubrification et la protection** sont les premiers grands rôles de la salive, grâce aux mucines et aux PRP. En effet, la salive tapisse la surface des tissus oraux, formant un film lubrificateur qui facilite la parole et le passage de la nourriture, tout en réduisant le frottement entre les tissus. Ainsi, elle favorise l'autonettoyage de la cavité buccale, l'humidification, la lubrification des tissus, la protection antibactérienne et la cicatrisation des muqueuses buccales, ce qui confère une grande résistance de la cavité buccale aux infections [32, 36].
- **La digestion** constitue le second grand rôle de la salive. Elle prépare la digestion en formant un "bolus" alimentaire, plus facile à avaler et à ingérer, facilitant ainsi la digestion ultérieure [27].
- **La perception du goût** est régulée en partie grâce à la salive, car elle solubilise des composants de la nourriture et agit comme un milieu permettant l'interaction entre les récepteurs gustatifs et les composants de la nourriture [27].
- Elle maintient **l'intégrité des dents** en facilitant la déminéralisation et la reminéralisation [27].
- La salive est composée de cellules immunitaires, ce qui lui confère une **activité antimicrobienne** importante. Ces cellules immunitaires identifient, limitent la prolifération des agents pathogènes et favorisent leur élimination. Les enzymes et les mucines participent également au rôle immunitaire de la salive. De plus, la salive favorise la cicatrisation [32, 36].
- La salive **tapisse et protège** la muqueuse buccale contre les agressions mécaniques, thermiques ou chimiques extérieures. De plus, la salive est un fluide non newtonien, ce qui lui permet de rester ancrée sur l'épithélium oral même après la déglutition. C'est-à-dire que la viscosité salivaire varie en fonction de la contrainte appliquée sur celle-ci [13, 32, 36].

- Certains composants de la salive, tels que les enzymes ou les bicarbonates, permettent de réguler le pH et de **protéger** la cavité buccale. Ce pouvoir tampon maintient l'équilibre de la flore buccale [13, 32, 36].

I.3 La pellicule mucoale

Dans la cavité buccale, toutes les structures sont recouvertes d'une fine couche organique acellulaire [8] : la PM, figure 1.6. C'est une couche mince ancrée à la surface de l'épithélium oral, composée d'une première couche interne riche en protéines et d'une couche externe mobile composée de protéines, d'ions et de corps étrangers [40, 41]. Ses propriétés permettent la lubrification, la protection et la défense de la muqueuse buccale [42, 43].

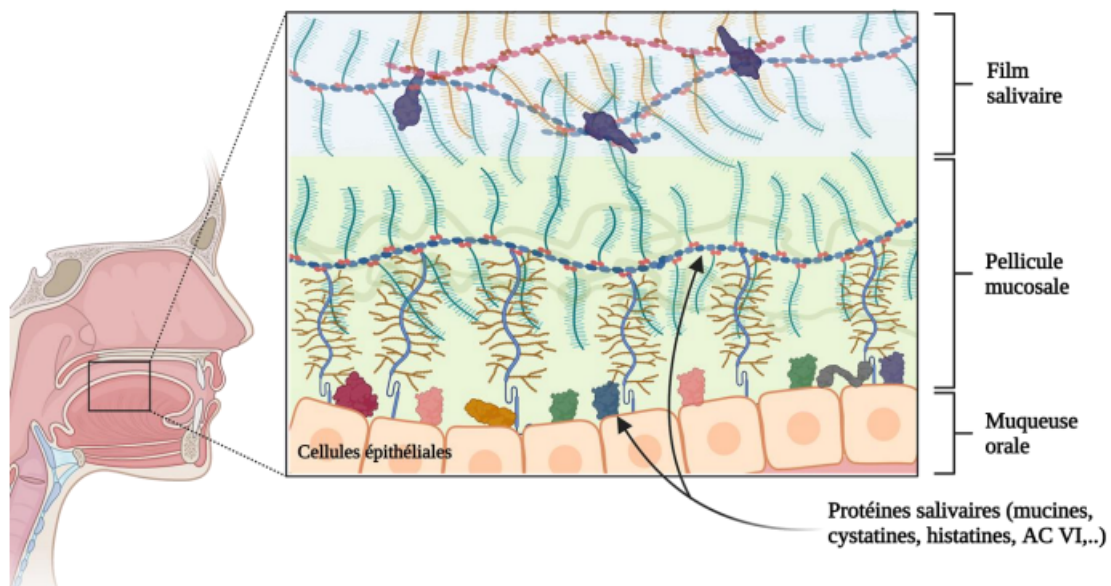


FIGURE 1.6 – Schéma représentant la structure de la pellicule mucoale ancrée à la surface de la muqueuse orale [7]

I.3.1 Composition et structure

Afin de caractériser la structure de la pellicule mucoale, différentes approches ont été utilisées, telles que la microscopie électronique à balayage et à transmission, la cryomicroscopie ou encore la mesure d'effort en surface [42]. Cependant, des variations ont été observées en fonction de la méthode utilisée.

D'autres approches *in vivo* et *in vitro*, comme l'immunohistologie ou la spectrométrie de masse ont permis d'identifier certaines protéines connues telles que les mucines MUC5B et MUC7, ainsi que des PRP et des Immunoglobuline A (IgA) [44-47]. Une étude récente a révélé des différences de composition entre la pellicule mucoale étudiée et la salive totale, illustrant ainsi une particularité dans l'adsorption des protéines sur l'épithélium oral [48]. Les composants principaux sont les IgA, MUC5B et MUC7 avec un fort

taux d'ancrage à la surface de l'épithélium. Selon Ranc et al. [49], la capacité des protéines à s'ancrer à l'épithélium oral dépendrait de la présence de domaines hydrophobes accessibles. Par exemple, la protéine MUC5B possède des propriétés amphiphiles qui lui permettent de s'ancrer plus facilement à la surface de la muqueuse [49]. D'autres travaux ont été réalisés *in vitro*, pour étudier la quantité de protéines salivaires adsorbées sur des surfaces visant à mimer la muqueuse orale. Sur le polydiméthylsiloxane (PDMS), la masse de protéines a été estimée à 3.6 mg/m^2 [50] et sur l'alumine, visant plutôt à mimer la surface dentaire, la quantité a été mesurée à 5.4 mg/m^2 [51]. L'épaisseur de cette pellicule a été mesurée à 20 nm sur le PDMS [50]. Un groupe de chercheurs a observé avec un microscope électronique à transmission (MET) la présence des MUC5B sur des coupes de cellules buccales et une épaisseur de la pellicule *in vivo* allant de 0 à 100 nm [52]. Santos et al. [53] ont également mesuré l'épaisseur de la pellicule *in vitro* en accord avec la littérature (environ 30 nm). Cette épaisseur avait été mesurée *in vivo* (entre 30 et 100 nm) par Lendenmann et al. [54]. Hannig et al. [55] ont observé que la pellicule était composée d'une couche externe globulaire et d'une couche interne basale plus dense, par microscopie électronique à transmission sur des films salivaires *in vivo* formés sur de l'émail bovin. Une autre étude [53] a confirmé la structure en deux parties de la pellicule sur des surfaces d'hydroxyapatite et de silice. Cette étude explique qu'une couche interne, dense en protéines, est ancrée à la surface, tandis que la couche externe est plus flexible, moins dense, avec une plus grande quantité d'eau.

Ainsi, les études *in vitro* et *in vivo* (peu nombreuses au vu de la difficulté de prélèvement et d'analyse) ont permis d'étudier et de mieux comprendre la composition de cette pellicule [8]. La PM s'organise en deux couches (voir Figure 1.7) :

- La première est une couche d'ancrage entre les protéines et l'épithélium constitué de mucines transmembranaires et des protéines salivaires. Sur cette couche, ce sont les régions hydrophobes et non glycosylées des mucines [7, 24, 43, 56].
- La seconde est une couche externe de lubrification [8, 51] composée des zones glycosylées des mucines.

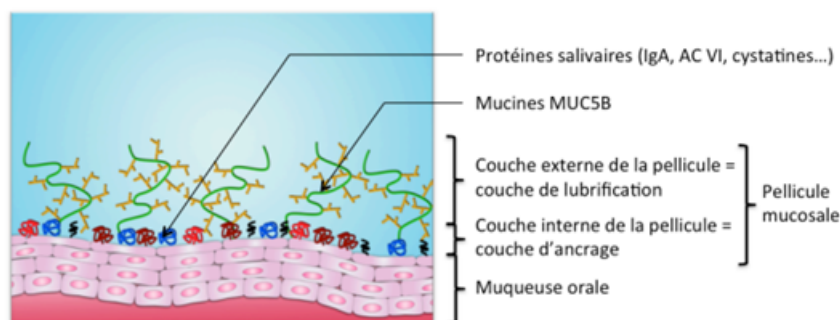


FIGURE 1.7 – Représentation schématique de la structure et de la composition de la pellicule muqueuse [8]

I.3.2 Formation de la pellicule

Les surfaces de la muqueuse orale sont considérées comme hydrophobes [57]. Des études *in vitro* ont révélé l'adhésion des protéines salivaires à des surfaces synthétiques

[8, 46, 47, 58]. Ces recherches ont démontré que les mucines jouent un rôle central dans l'interaction entre les protéines salivaires et les cellules épithéliales [46]. Ceci suggère que la pellicule mucosale émerge de l'adhésion des protéines salivaires, en particulier la protéine MUC5B, sur la muqueuse orale. Ce phénomène est facilité par la présence de domaines hydrophobes agissant comme sites d'ancrage pour les protéines [58, 59]. Les constituants prédominants sont les IgA, MUC5B et MUC7, qui présentent une forte affinité pour la surface de l'épithélium. Cependant, ces observations proviennent exclusivement d'expérimentations *in vitro*, c'est-à-dire réalisées sur des surfaces artificielles. De plus, certaines études ont révélé une faible adhésion de MUC5B aux surfaces synthétiques hydrophobes au vu de la concentration élevée de MUC5B dans la salive [46, 60].

Plusieurs travaux avancent l'existence d'un mécanisme additionnel dans l'adsorption des protéines salivaires aux cellules épithéliales [25, 61]. Selon cette théorie, des interactions entre des mucines salivaires secrétées (MUC5B) et des mucines transmembranaires (MUC1) ont lieu et entraîneraient l'ancrage spécifique de MUC5B à l'épithélium oral grâce à son interaction avec MUC1, figure 1.8. Ployon et al. [8] ont démontré que l'expression de MUC1 favorisait la fixation de MUC5B à la surface de la muqueuse. De plus, des interactions mucine-protéine participeraient à la formation de la pellicule muco-sale. MUC7 et IgA seraient capables de s'associer, favorisant ainsi sa constitution [62].

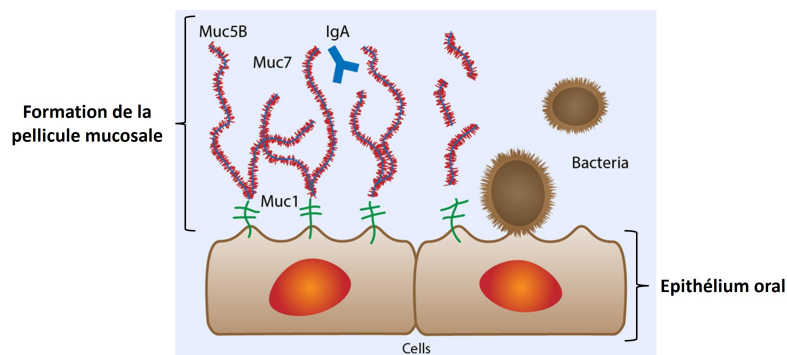


FIGURE 1.8 – Représentation des mécanismes de formation de la pellicule mucosale, impliquant les composants principaux : MUC1, MUC5B, IgA et MUC7. Schéma adapté de [63]

I.3.3 Les fonctions de la pellicule mucosale

Les rôles de cette pellicule sont similaires à ceux de la salive :

- La lubrification est attribuable à sa composition riche en mucines (MUC5B et MUC7) et en PRP [64, 65]. Des études *in vitro* ont montré une diminution du coefficient de frottement en présence d'une pellicule salivaire [50]. Néanmoins, sa fine épaisseur et sa viscosité inscrivent la pellicule mucosale dans un régime tribologique d'interface contrairement à la salive qui s'inscrit dans un régime tribologique hydrodynamique (voir Figure 1.9). Cela se caractérise par des différences de coefficient de friction avec un coefficient plus élevé dans le cas de la pellicule mucosale [66]. Ces observations ont été faites sur des pellicules salivaires formées sur des surfaces synthétiques. Enfin, Ranc et al. [49] ont observé sur la langue de porc

une diminution du coefficient de frottement en présence d'une pellicule salivaire ainsi qu'une augmentation du caractère hydrophile de la surface.

- La pellicule mucosale joue aussi un rôle de barrière biologique en offrant une perméabilité dite "sélective" [8, 67], en créant un filtre à partir des pores du réseau de mucines. De plus, la présence des IgA montre que la pellicule mucosale joue également un rôle dans la protection immunitaire et protège la muqueuse des agressions microbiennes [46]. Pärssinen et al. [63] ont notamment travaillé sur le rôle de la pellicule mucosale dans la protection de la muqueuse orale contre les micro-organismes pathogènes, notamment ceux impliqués dans la stomatite aphteuse [63, 68].
- Plusieurs groupes de chercheurs ont émis l'hypothèse que la pellicule mucosale jouerait un rôle dans la perception sensorielle [8]. En effet, les protéines de la pellicule interagiraient avec les arômes [69] ou les tanins [70].

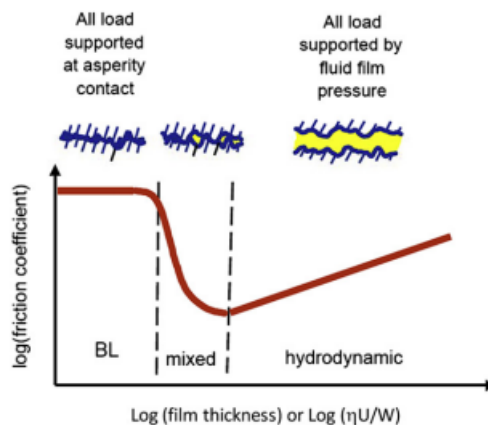


FIGURE 1.9 – Courbe de Stribeck présentant les 3 régimes tribologiques : d'interface, mixte et hydrodynamique [71]

Pour comprendre comment se forme cette pellicule nous devons nous adapter à une échelle d'analyse nanométrique, et s'intéresser à l'interaction protéique.

II Les acteurs de la lubrification

II.1 Les mucines

II.1.1 Généralités

Les couches épithéliales non-kératinisées du corps humain sont protégées de leur environnement (agents pathogènes, stress mécaniques, etc.) par une couche appelée le mucus. Les composants majeurs de cette strate sont les mucines. Ce sont des glycoprotéines hautement glycosylées qui participent à la formation du mucus et donc à la protection des épithéliums de l'organisme [7, 72]. Les mucines sont une famille de protéines qui se divisent en 2 sous-familles en fonction de leur localisation [73] : les mucines transmembranaires ancrées à la surface des cellules épithéliales et les mucines sécrétées (gélifiantes ou non-gélifiantes). Ces glycoprotéines sont exprimées dans l'organisme principalement au niveau des différentes muqueuses [74]. La combinaison de mucines exprimées dans un tissu va permettre de moduler les paramètres physico-chimiques de

l'épithélium en fonction des besoins biologiques. Par exemple elles permettent un faible frottement au niveau de l'épithélium cornéen. Leur localisation est illustrée dans la figure 1.10. Comme mentionné précédemment, les mucines sont des protéines hautement glycosylées, ce qui leur confère des propriétés particulières, notamment celles d'hydratation et de lubrification [75, 76]. Les mucines présentent deux types de glycosylations différentes : la N-glycosylation et l'O-glycosylation.

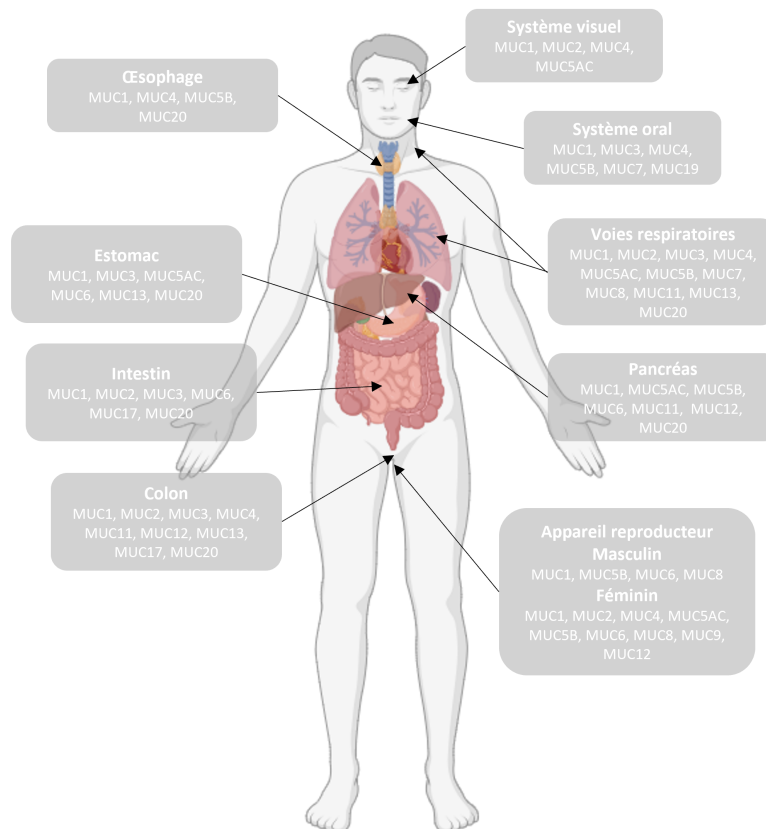


FIGURE 1.10 – Représentation de la localisation de l'expression des mucines sécrétées et transmembranaires chez l'humain adulte - Adapté et inspiré de [7, 74]

II.1.2 Les mucines transmembranaires

II.1.2.1 La structure et les fonctions des mucines transmembranaires

Les mucines transmembranaires présentent une proximité structurale notable entre elles, comme illustré dans la Figure 1.11. Ces mucines sont ancrées à la surface des cellules épithéliales et sont des protéines multifonctionnelles composées de deux sous-unités (α et β) étroitement liées par des liaisons non covalentes au niveau d'un domaine nommé SEA (Protéine de sperme d'oursin entérokinase et agrine (SEA)) [34, 77], voir (figure 1.11). La sous-unité α , localisée entièrement à la surface de la cellule, se compose principalement d'un Répétition en tandem à nombre variable (VNTR), hautement glycosylé [78]. Ce segment inclut la partie N-terminale, ainsi qu'une portion du domaine SEA (figure 1.11). La sous-unité β comprend un domaine extracellulaire concis qui inclut

une partie du domaine SEA, un domaine transmembranaire et une région intracellulaire variable selon la mucine (figure 1.11). La partie cytoplasmique possède des sites de phosphorylation capables d'activer une voie intracellulaire.

La figure 1.11 présente les structures de différentes mucines dites membranaires. Elle révèle que certaines possèdent des spécificités qui leur sont propres. Par exemple, MUC4 ne possède pas de domaine SEA et expose trois autres domaines spécifiques [7].

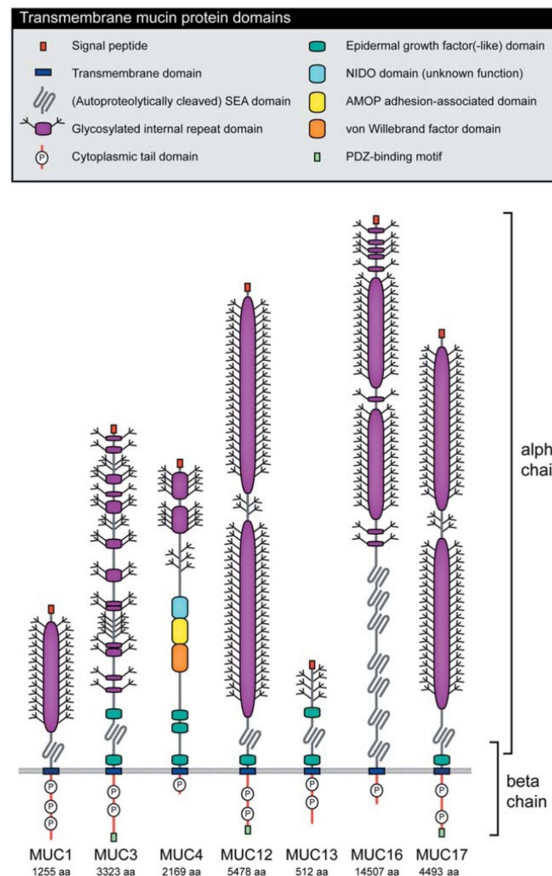


FIGURE 1.11 – Représentation des structures protéiques des différentes mucines transmembranaires : MUC1, MUC3, MUC4, MUC12, MUC13, MUC16, MUC17 - D'après [79] et inspiré de [7].

II.1.2.2 La mucine transmembranaire impliquée dans la formation de la pellicule mucoale : MUC1

La mucine qui nous intéresse plus particulièrement dans ce travail est la mucine MUC1, car c'est elle qui est impliquée dans la formation de la PM orale.

MUC1 joue un rôle crucial dans la formation de la PM et dans la protection des épithéliums muqueux [56]. Son importance pour les fonctions biologiques des muqueuses est telle que sa présence est ubiquitaire sur les épithéliums muqueux (voir Figure 1.10) [80]. La structure de MUC1 présente des similitudes avec celle des mucines transmembranaires, figure 1.12.

La sous-unité α est entièrement extracellulaire, formant une structure rigide s'étendant de

200 à 500 nm [81] à partir de la surface apicale des cellules [82, 83]. Elle se compose de deux domaines distincts. Un domaine non-glycosylé situé au niveau du N-terminal, composé de 107 acides aminés. Il favorise les interactions avec les protéines, notamment les protéines salivaires sécrétées telles que MUC5B. Le deuxième domaine de cette sous-unité est le domaine VNTR, contenant une séquence consensus répétée de 20 acides aminés GSTAPPAHGVTSAPDTRPAP [61]. Cette séquence est répétée de 20 à 120 fois selon les individus. Le domaine VNTR est un site important de glycosylation, lui conférant une charge négative qui facilite l'interaction avec les molécules d'eau [75, 76].

La seconde sous-unité β est structurée en trois parties distinctes. La première consiste en un petit domaine extracellulaire, comprenant environ cinquante acides aminés, attaché au domaine transmembranaire de 28 acides aminés correspondant à la seconde partie de β [61]. La dernière partie est la queue cytoplasmique, qui renferme des motifs de signalisation et sept sites de phosphorylation, étayant le rôle de MUC1 en tant que protéine de signalisation.

Entre les deux sous-unités, un domaine SEA, composé d'environ une centaine d'acides aminés, délimite leurs frontières. Ce domaine présente la particularité de posséder un site de clivage autoprotéolytique. Initialement issues de la même protéine, les deux sous-unités peuvent subir une hydrolyse du site de clivage dans le domaine SEA, conduisant à leur séparation tout en maintenant leur liaison par des interactions non covalentes. Lindèn et al. [84] ont suggéré que cette dissociation pourrait constituer un mécanisme de défense contre les agressions épithéliales, pouvant potentiellement induire la phosphorylation de la queue cytoplasmique de MUC1 et ainsi activer une voie intracellulaire [34]. Outre son potentiel rôle de signalisation, MUC1 joue un rôle essentiel dans la lubrification de la surface épithéliale grâce à sa glycosylation [8, 78, 85, 86].

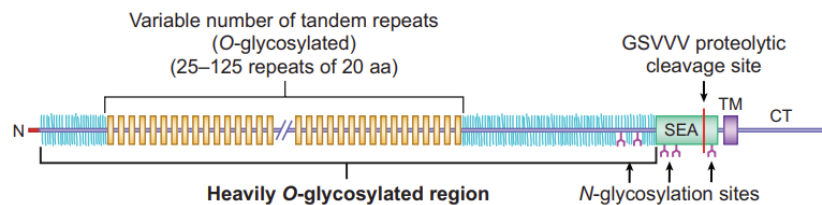


FIGURE 1.12 – Schéma représentant la structure de la protéine MUC1 - D'après [73]

MUC1 joue plusieurs rôles et fonctions biologiques dans le corps humain. Tout d'abord, elle participe à la formation de la PM. Cette protéine est attachée à la surface de l'épithélium oral, facilitant ainsi l'ancrage des protéines salivaires [48]. Des études *in vitro* ont montré qu'en présence de la protéine MUC1, la quantité de protéines salivaires, en particulier les MUC5B, augmentait de plus de 44% [8]. Le domaine VNTR, fortement glycosylé de MUC1, pourrait potentiellement contribuer à la rétention des molécules d'eau et à la formation d'un gel muqueux [75], favorisant ainsi un environnement hydrophile optimal pour l'hydratation et la lubrification des épithéliums [73, 81].

Le deuxième rôle de MUC1 correspond à une protection immunitaire contre les agents pathogènes. Sa structure particulière (voir Figure 1.12), avec sa sous-unité α s'étendant jusqu'à 500 nm au-dessus de la surface des cellules épithéliales, et composée d'un domaine VNTR richement glycosylé, crée un système difficilement franchissable pour les agents pathogènes, grâce à un fort encombrement stérique. Cette structure, et

donc cet environnement, devient une barrière physique empêchant l'adhésion des micro-organismes pathogènes [7, 81].

Enfin, MUC1 semble également jouer un rôle dans la protection contre les agrégations de molécules telles que les polyphénols. MUC1 possède une structure clivable au niveau de son domaine SEA (voir Figure 1.12). Le processus de rupture de ce domaine agit comme une mesure de protection pour prévenir la rupture cellulaire lors des phénomènes d'agrégation [87]. Cette rupture constitue un mécanisme de défense permettant de libérer les agrégats, qui sont des sources de dommages pour les épithéliums. De plus, il a également été suggéré que la cellule peut détecter une contrainte mécanique à la surface de la muqueuse si la dissociation est signalée par une signalisation cellulaire suite à la rupture du domaine SEA, comme le proposent Macao et al. [87]. Ce mécanisme pourrait jouer un rôle dans la sensation d'astringence lors de l'agrégation de la PM par les tanins, comme le suggère le consortium de recherche dans lequel ce travail de thèse s'inscrit [34].

II.1.3 Mucines sécrétées

Les mucines sécrétées se divisent en deux sous-catégories en fonction de leur capacité à former un gel. Les mucines MUC2, MUC5B, MUC5AC ou MUC6 sont considérées comme gélifiantes, tandis que MUC7 ou MUC8 ne le sont pas [88]. Dans cette section, nous nous intéresserons particulièrement à deux mucines qui participent à la formation de la pellicule mucoale : MUC5B et MUC7.

II.1.3.1 La mucine gélifiante : MUC5B

La mucine MUC5B est une mucine gélifiante, contribuant ainsi aux propriétés visco-élastiques du mucus et de la pellicule mucoale [7, 48]. Elle est principalement exprimée dans les épithéliums muqueux par les glandes submandibulaires et sublinguales [89]. Sa structure comprend trois principaux domaines (figure 1.13). Les domaines N- et C-terminaux, riches en cystéine et situés aux extrémités de la protéine. Et le domaine central, riche en acides aminés et contenant un nombre variable de répétitions en tandem appelé domaine VNTR [88]. La région centrale de MUC5B, contenant le domaine VNTR, est fortement glycosylée, conférant ainsi d'importantes propriétés hydrophiles [90, 91].

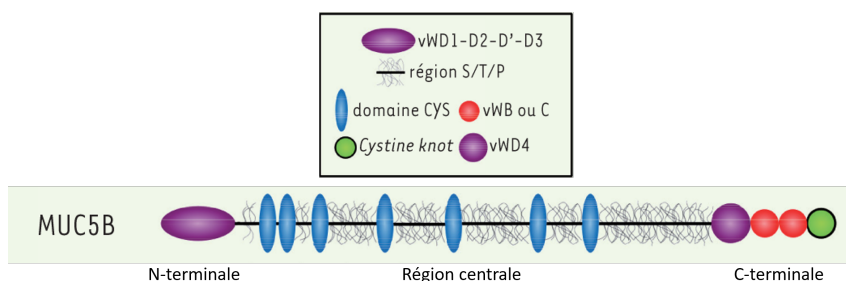


FIGURE 1.13 – Représentation de la structure protéique de MUC5B - Les 3 régions sont représentées : N et C-terminale et la région centrale - La région centrale présente plusieurs domaines VNTR (région S/T/P) richement glycosylés - Schéma adapté de Demouveau et al. [92]

La structure particulière de la mucine MUC5B (figure 1.13) lui confère des fonctions

essentiels, notamment sa forte glycosylation qui participe à la formation et aux propriétés viscoélastiques du mucus [88, 93]. Le mucus de la cavité buccale forme un gel qui assure la protection de la muqueuse orale, facilitant ainsi la mastication et la déglutition des aliments [94]. Il contribue également à la lubrification et à l'hydratation, réduisant les forces de friction à la surface de l'épithélium oral [43, 50, 76, 95]. Ainsi, la présence de MUC5B confère au mucus toutes les propriétés nécessaires pour remplir son rôle. Par exemple, une étude de Pramanik et al. [96] a montré que la diminution de MUC5B sur certaines régions de la muqueuse orale entraînait une sécheresse buccale importante, soulignant ainsi l'importance de cette mucine dans la lubrification et l'hydratation orale. De plus, des modifications de sa structure singulière, telles que des altérations dans sa glycosylation, peuvent entraîner des changements dans ses propriétés lubrifiantes (voir figure 1.14). Par exemple nous pouvons observer une perte de son caractère hydrophile ou une diminution de l'élasticité du mucus oral, ce qui peut conduire à une sécheresse buccale [89, 97, 98]. Enfin, tout comme pour MUC1, les longues chaînes oligomériques formées par un réseau de MUC5B contribuent à construire un réseau de protéines dense qui empêche les agents pathogènes d'approcher la muqueuse orale.

Ainsi, les propriétés structurelles de MUC5B confèrent à cette protéine ses fonctions de lubrification, d'hydratation et de protection de la muqueuse orale. Comme précisé précédemment dans cette section, l'interaction entre MUC5B et la protéine transmembranaire MUC1 permet la formation de la pellicule mucosale.

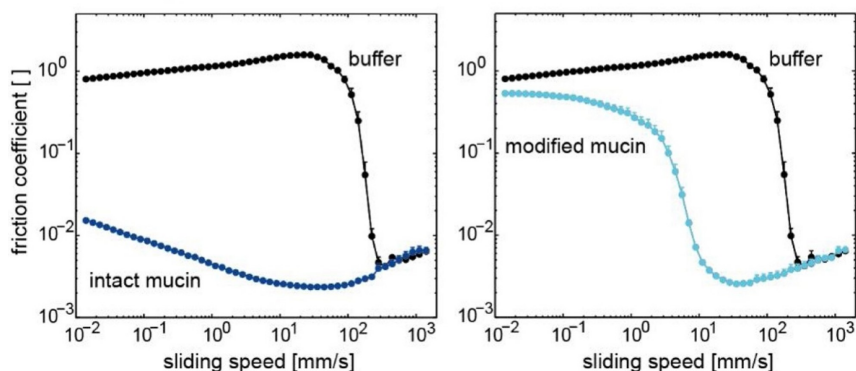


FIGURE 1.14 – Exemple d'essai tribologique sur des solutions de mucines MUC5B intactes et modifiées (modifications dans leur schéma de glycosylation) montrant l'impact favorable de MUC5B et de sa structure non modifiée dans la lubrification - D'après [76]

II.1.3.2 La mucine non-gélifiante : MUC7

MUC7 est une mucine sécrétée non gélifiante, caractérisée par une seule chaîne peptidique de 377 acides aminés [99]. Sa structure peut être divisée en quatre régions distinctes (voir Figure 1.15). La première section, située à l'extrémité N-terminale de la protéine, favorise notamment l'agrégation des monomères [100, 101]. La deuxième région est une zone glycosylée comportant plusieurs sites de N- et O-glycosylation [99, 102]. La troisième section, au centre de la protéine, est fortement glycosylée et composée d'une séquence spécifique d'acides aminés [99, 102]. Enfin, la quatrième région correspond à l'autre extrémité de la protéine, modérément glycosylée, constituant l'extrémité C-terminale.

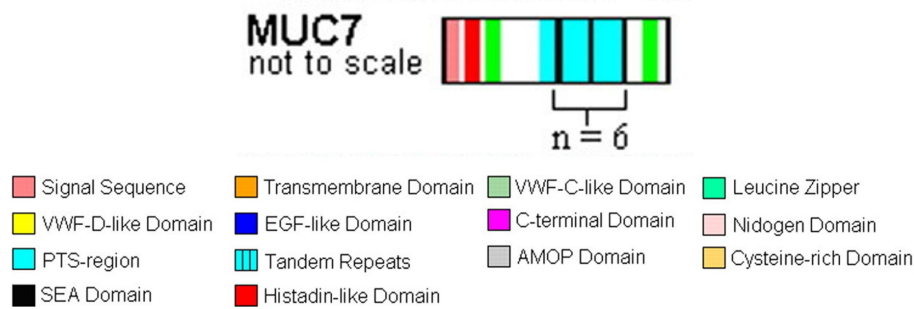


FIGURE 1.15 – Représentation de la structure protéique de MUC7 - Les 4 régions sont représentées - Schéma adapté de Rose et Voynow [103]

MUC7, en tant que protéine non gélifiante, ne participe pas à la formation du mucus ni à ses propriétés viscoélastiques. Cependant, elle joue un rôle crucial dans la protection immunitaire de la muqueuse orale [7]. Son domaine N-terminale confère à MUC7 des propriétés antimicrobiennes et antifongiques. MUC7 a même démontré son efficacité contre certains champignons [104, 105].

II.2 Les perturbateurs de la lubrification : les composés astringents

II.2.1 Les tanins

Les tanins sont des molécules organiques synthétisées par les végétaux appartenant à la famille des polyphénols. Ils sont présents dans les fruits, les graines, les feuilles et participent aux fonctions biologiques et même physiologiques de la plante [106]. Chez l'homme, les tanins peuvent avoir des effets favorables sur la santé, mais aussi être néfastes.

II.2.1.1 Classification des tanins

Les tanins sont classifiés selon leurs propriétés structurales et chimiques [107]. Ils se répartissent en trois catégories distinctes (voir figure 1.16) : les tanins hydrolysables, les tanins non hydrolysables (ou tanins condensés) et les tanins complexes. Leurs fonctions et leurs effets biologiques sont évidemment déterminés par leur structure [108].

Les tanins hydrolysables ont pour fonction l'hydrolyse, libérant ainsi des acides galiques ou des acides ellagiques [109]. Ils se subdivisent en deux sous-groupes en fonction de l'acide libéré lors de l'hydrolyse : les gallotanins et les ellagitanins respectivement [107].

Les tanins condensés (ou non hydrolysables, ou proanthocyanidines) font partie de la famille des flavonoïdes [8]. Ils présentent une diversité structurale importante selon leur degré de polymérisation et la présence éventuelle d'acide gallique [7]. Ce sont les tanins les plus répandus dans le règne végétal [110].

Les tanins complexes se forment à partir d'une unité de gallotanins ou d'ellagitanins liée à une unité de catéchine via une liaison glycosidique.

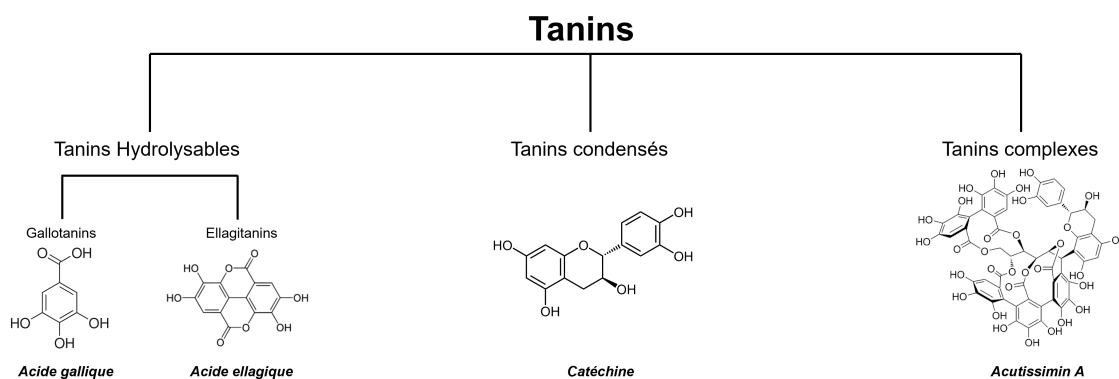


FIGURE 1.16 – Classification des différentes familles structurales des tanins - Inspiré de Nivet et al. et Ployon et al. [7, 8]

II.2.1.2 Les effets des tanins

La structure des tanins leur confère des fonctions essentielles pour la survie des plantes. En effet de nombreux tanins sont des substances actives qui peuvent avoir des effets plus ou moins bénéfiques en fonction de la dose sur l'organisme humain. Le tableau 1.1 présente les effets des tanins sur l'organisme. En effet, les mécanismes de défense des plantes contre les prédateurs sont assurés par les tanins. Leur capacité à précipiter les protéines permet de repousser les herbivores [111, 112]. Par exemple, les plantes riches en tanins sont beaucoup moins consommées par les herbivores que celles synthétisant moins de tanins. Ces molécules organiques permettent aux plantes de cicatrifier leurs tissus, mais entraînent de nombreux troubles chez ceux qui les consomment, tels que des insuffisances rénales et des dommages au niveau des muqueuses gastro-intestinales [113-115]. Plusieurs études ont montré qu'un régime alimentaire riche en tanins entraîne un ralentissement de la croissance et une toxicité rénale [116, 117]. Tous ces effets nocifs peuvent même entraîner la mort de l'animal [117-119].

Les tanins ne possèdent pas que des caractéristiques délétères. À faible concentration, ils sont aussi reconnus pour leurs bienfaits pour la santé humaine. En limitant les lésions cellulaires et le stress oxydatif, les tanins ont montré des effets antioxydants importants [120-122]. Les composés tanniques peuvent également prévenir les pathologies neurodégénératives telles que Parkinson ou Alzheimer en protégeant les neurones [123, 124]. Les effets positifs sont donc très variés, allant de la protection contre le cholestérol ou l'hypertension à des effets cardioprotecteurs, anti-diabétiques, anti-obésité et anti-cancéreux [121, 125, 126]. Les tanins condensés en particulier possèdent des fonctions immunitaires et anti-inflammatoires en stimulant l'activité des macrophages et les voies moléculaires anti-inflammatoires [7].

À faible concentration, les tanins peuvent avoir des effets bénéfiques sur l'organisme. A plus forte concentration l'effet est délétère. Ainsi leur détection permet de prémunir les Hommes d'une trop forte ingestion grâce notamment à la sensation d'astringence [127, 128]. Les tanins confèrent donc aux plantes leur caractère astringent, et cette sensation est perçue comme désagréable, conduisant ainsi au rejet de l'aliment, ce qui constitue un mécanisme de protection contre les tanins pour l'Homme.

TABLEAU 1.1 – Exemple d'effets de tanins sur l'organisme humain

Effets Bénéfiques		Effets indésirables	
Effets	Références	Effets	Références
Traitement contre le diabète	[129]	Facteurs antinutritionnels	[130, 131]
Cicatrisation	[132]	Réduction de la digestibilité	[113, 125, 133-136]
Prévient les maladies cardiovasculaires.	[137]	Migraines	[138]
Antimutagène et anticarcinogène	[139-142]	Mutagène et carcinogène	[126]
Antioxydant	[120-122]	Hepatotoxicité (toxicité rénale)	[116, 125]
Antivirale et Antimicrobien	[107, 125, 140, 143, 144]		
Anti-diabétique, anti-obésité	[121, 125, 126]		
Anti-inflammatoire	[7]		

II.2.1.3 L'interaction tanins-protéines

Il existe de fortes interactions entre les tanins et les protéines salivaires qui conduisent à la précipitation des protéines sous forme de complexes tanins-protéines. Ces réactions peuvent être divisées en trois étapes selon Nivet [7] : la formation des complexes tanins-protéines solubles, la formation d'agrégats tanins-protéines, et la précipitation des agrégats. Les protéines riches en prolines (PRP), par exemple, présentent une forte affinité avec les tanins en raison de la structure particulière des PRP. Les éléments rigides présents sur certaines protéines pourraient servir de points d'ancrage privilégiés [145]. Cette grande affinité permet de protéger l'épithélium oral de l'attaque des tanins, car les PRP se lient à eux avant qu'ils n'atteignent l'épithélium.

De manière générale, les nombreuses interactions entre les protéines et les tanins conduisent à la formation de complexes, considérés comme responsables de la sensation de sécheresse et de rugosité associée à l'astringence [146].

II.2.2 Les protéines végétales

Les protéines, qui font partie des trois principaux macronutriments avec les lipides et les glucides, sont indispensables pour assurer la santé et la longévité humaine. Une insuffisance de leur consommation peut entraîner une forme de malnutrition appelée malnutrition protéique, particulièrement préoccupante. Elle est la principale cause de mortalité infantile dans diverses régions du globe [147]. Les protéines fournissent les 9 acides aminés essentiels nécessaires au bon fonctionnement du corps, acides aminés qui ne sont pas produits par le métabolisme humain. Ainsi, il est impératif de les inclure dans notre alimentation.

Dans le mode de vie actuel des sociétés riches, une majorité de la population trouve ses sources de protéine dans les produits d'origine animale (POA). Toutefois, en raison

des enjeux économiques, écologiques et démographiques de notre siècle, les sociétés modernes poussent à remplacer les protéines animales par des alternatives : des produits à base de plantes (PBP), figure 1.17. Cette évolution sociale entraîne un changement dans les habitudes alimentaires, avec une augmentation du nombre de personnes adoptant une alimentation flexitarienne (réduisant leur consommation de viande). Pour compenser le manque de protéines animales, la consommation de protéines végétales augmente, et le marché mondial devrait atteindre 162 milliards de dollars d'ici 2030 [148].

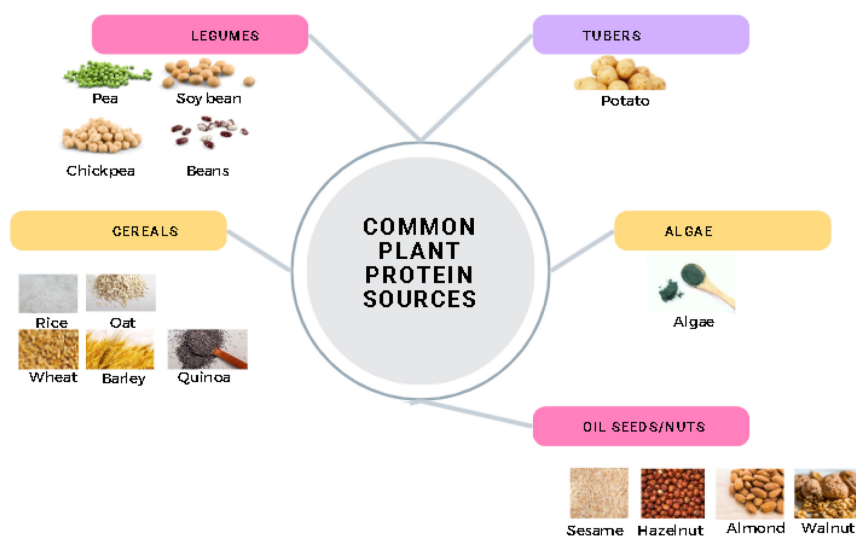


FIGURE 1.17 – Sources courantes de protéines d'origine végétale - D'après [149]

II.2.2.1 Le rôle des protéines dans l'alimentation

La principale source de ces protéines est d'origine animale, dont les propriétés physiologiques ont été largement étudiées et ont démontré leur capacité à prévenir les maladies et à favoriser la santé, notamment en régulant la pression artérielle et en ayant des effets antimicrobiens [110, 150-152].

Parallèlement, les PBP ont également été reconnus pour leurs propriétés bénéfiques pour la santé [153]. Par exemple, les protéines de soja sont associées à une réduction du taux de cholestérol [148, 154]. Les PBP sont promus pour leur potentiel sur la santé, leur coût de production relativement bas et leur moindre impact environnemental par rapport aux POA. Ainsi, elles se présentent comme une alternative de plus en plus attractive pour les consommateurs et les scientifiques. Toutefois, leur utilisation nécessite une attention particulière de la part des industriels et des formulateurs alimentaires, notamment en termes d'allergènes, de composition en acides aminés, de facteurs antinutritionnels et de qualité nutritionnelle [148, 155, 156]. Pour être considérés comme une alternative viable aux protéines animales, les PBP doivent présenter des propriétés nutritionnelles, fonctionnelles et physiologiques équivalentes, voire supérieures. Les protéines végétales les plus couramment utilisées incluent celles de soja, de pois, de riz et de gluten de blé [148]. Cependant, il est important de noter que les protéines d'origine végétale peuvent présenter des lacunes en certains acides aminés, nécessitant ainsi des mélanges de différentes sources pour assurer une valeur nutritionnelle adéquate [148, 157, 158].

Dans l'ensemble, les PBP jouent un rôle croissant dans la transition des régimes alimentaires mondiaux et dans la promotion d'une économie plus durable.

II.2.2.2 La valeur nutritionnelle et les fonctions physiologiques des PBP

Un aspect essentiel de l'évaluation de la valeur nutritionnelle de toute source de protéines réside dans sa composition en acides aminés. Les protéines fournissent ces éléments essentiels au corps, y compris les 9 acides aminés indispensables qui ne sont pas produits en quantités adéquates par les cellules et doivent donc être fournis par l'alimentation. En général, les protéines végétales présentent des niveaux plus bas d'acides aminés essentiels par rapport aux protéines animales [159], notamment en ce qui concerne la lysine et la méthionine [148]. Ainsi, une seule source de protéines végétales ne suffit généralement pas pour répondre aux besoins en acides aminés [157], ce qui nécessite un mélange de différentes protéines végétales pour approcher les fonctionnalités offertes par les protéines animales. Par exemple, la combinaison de protéines laitières avec celles de soja et de pois a été largement étudiée à cet effet. Des tentatives ont également été faites pour développer de nouvelles formes de protéines végétales, génétiquement modifiées afin d'augmenter leur teneur en acides aminés et de compenser les lacunes des protéines végétales d'origine [160]. Ces modifications ont permis d'améliorer les qualités des protéines végétales en termes de valeur nutritionnelle, de fonctionnalité et d'efficacité. Aujourd'hui, les protéines végétales sont reconnues pour leurs nombreux bienfaits pour la santé, notamment en termes de réduction de l'inflammation, de l'oxydation et des maladies cardiovasculaires.

II.2.2.3 L'acceptation par les consommateurs

Pour que les protéines végétales puissent réellement s'imposer comme une alternative viable, il est crucial qu'elles soient perçues comme appétissantes par la majorité des consommateurs. Cependant, en plus des différences de valeur nutritionnelle entre les protéines végétales et animales, l'une des distinctions majeures réside dans l'acceptation par les consommateurs des protéines végétales. Ces dernières années, de nombreuses études scientifiques se sont concentrées sur des sources de protéines végétales plus durables, telles que la protéine de pois (PP), de soja, etc. [4, 161]. Le défi consiste à évaluer et à améliorer la perception sensorielle des protéines en identifiant leurs propriétés de texture et de goût [162]. L'objectif est de comparer les sensations en bouche de différentes sources de protéines. Par exemple, une étude a montré que le remplacement de protéines laitières par des PP avait un impact très négatif sur la perception et l'acceptabilité des aliments étudiés [163]. En effet, les PP, par exemple, sont des mélanges complexes d'agrégats de protéines telles que la légumine, la viciline et la convicilline. Des similitudes existent avec les protéines laitières grâce à la présence de β -lactoglobuline [164]. Cependant, les protéines de pois sont souvent associées à une perception désagréable en bouche, notamment une sensation de rugosité et d'astringence [165]. Cette sensation d'astringence est liée aux tanins présents dans le mélange de protéines, qui interagissent avec les protéines salivaires, entraînant une diminution de la lubrification [166]. En effet, les protéines végétales considérées comme astringentes provoquent des

agrégations à la surface de la cavité buccale, perturbant ainsi le film salivaire et entraînant une sensation de sécheresse en bouche que nous appelons l'astringence [3]. Le principal défi pour l'acceptation des aliments riches en protéines végétales est donc de réduire la sensation d'astringence, en comprenant ses effets et ses mécanismes [167].

II.3 L'astringence et ses mécanismes moléculaires

II.3.1 Généralités

L'astringence correspond à une perception sensorielle définie comme la sensation de sécheresse et de rugosité des tissus oraux et intervient après l'ingestion d'aliments riches en tanins tels que le thé, le vin, les fruits et les légumes, les graines ou les protéines végétales [40]. C'est une sensation complexe et méconnue qui a récemment fait l'objet de nombreuses études [167-170]. La situation alimentaire actuelle pousse les fabricants et les chercheurs à trouver des solutions pour limiter la surconsommation de protéines animales. Cependant, les substituts d'aliments tels que les protéines végétales peuvent être très désagréables en bouche et très astringents car composés de tanins. Cependant, l'astringence peut être considérée comme une sensation agréable ou désagréable selon l'acceptation et l'intensité. Dans le vin, par exemple, c'est un attribut important qui peut être apprécié par les consommateurs. Cette sensation est complexe, sa définition et son origine varient selon les hypothèses scientifiques [171]. Cependant, les composants responsables de l'astringence sont connus, ce sont les polyphénols [127].

Il existe une hypothèse dans la littérature qui tente d'expliquer les mécanismes sous-jacents à la sensation d'astringence. Ce modèle propose d'expliquer l'astringence comme une sensation basée sur une stimulation gustative activant les récepteurs sensoriels de la muqueuse orale [170, 172], car les composés astringents peuvent activer le nerf gustatif, donnant ainsi naissance à cette perception de sécheresse et de rugosité [127, 173]. De plus, une étude menée par Simon, Hall et Schiffman [174] a montré que certains composés astringents pouvaient inhiber le transport intracellulaire d'ions dans l'épithélium lingual canin, un mécanisme qui pourrait contribuer à l'astringence chez l'homme. Cependant, une étude menée par Green et al. [175] a montré que cette sensation peut être perçue sur les surfaces buccales sans récepteur gustatif, indiquant que l'astringence ne se limite pas uniquement à cette hypothèse [175, 176]. D'autres travaux ont suggéré que l'anesthésie des nerfs trigéminaux peut altérer la sensation, laissant entendre que le système trigéminal participe également aux mécanismes d'astringence [176].

II.3.2 Des mécanismes moléculaires

Dans la littérature, deux hypothèses proposent d'expliquer l'astringence à travers une approche moléculaire. Ces hypothèses sont présentées et schématisées sur la figure 1.18, adaptée de Nivet et al. [7].

La première hypothèse considère que la précipitation des protéines salivaires, surtout les PRP, par les tanins entraînerait la formation d'agrégats à la surface de l'épithélium

oral. Ces agrégats seraient responsables de la rupture du film salivaire et causeraient donc une augmentation des forces de friction à la surface de la muqueuse orale. Cependant, des études ont prouvé que les PRP joueraient un rôle plutôt protecteur. En s'associant aux tanins, ils assurent la préservation des protéines de la muqueuse buccale et empêchent ainsi la rupture de la PM [177-180]. Ainsi, d'après ces travaux, les PRP participeraient aux mécanismes de défense de la muqueuse contre les tanins [181]. La deuxième hypothèse suppose que les tanins réagissent directement avec les protéines ancrées à la surface de la muqueuse orale, telles que MUC5B. De la même manière, ces interactions conduisent à la formation d'agrégats qui mènent à la rupture du film salivaire et donc à une perte de lubrification. Autrement dit, la capacité des tanins à agréger les protéines MUC5B a pour conséquence d'augmenter les forces de friction à la surface de l'épithélium oral [7, 128].

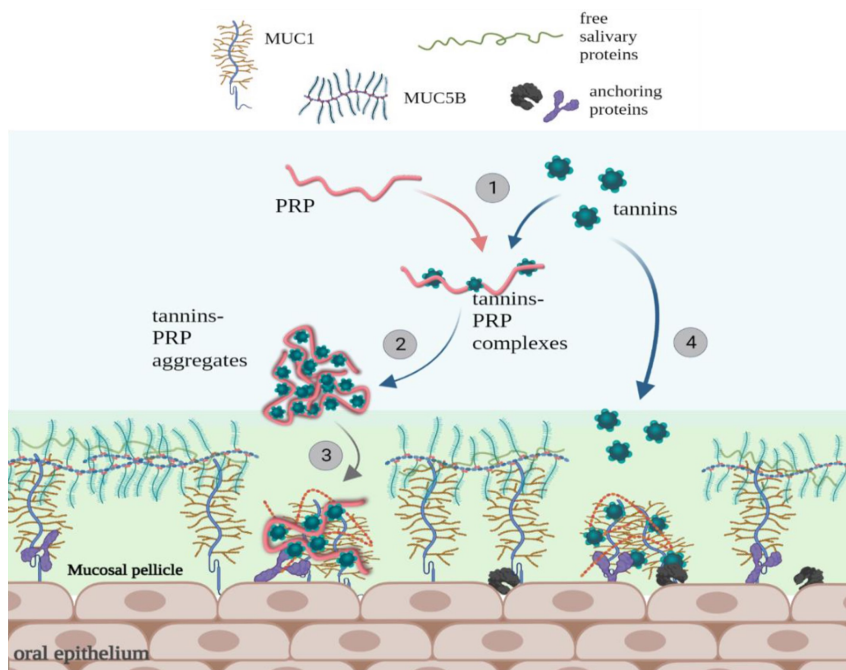


FIGURE 1.18 – **Représentation schématique des interactions entre tanins et protéines salivaires à l'origine des mécanismes moléculaires d'astringence** **Hypothèse 1** : (1) Formation des complexes PRP/Tanins. (2) Agrégation des complexes. (3) Précipitation des complexes à la surface de l'épithélium oral. **Hypothèse 2** : (4) Formation d'agrégation directe entre les tanins et les protéines salivaires secrétées. Adapté de Nivet et al. [7]

En résumé, ces deux hypothèses suggèrent que les tanins perturbent la lubrification. De nombreux travaux ont montré que l'ajout de tanins isolés comme l'(-)-Épigallocatechine gallate (EgCG) ou de produits alimentaires directement composés de tanins, comme le vin [182], entraînait une augmentation des forces de friction [183] et une perturbation du film salivaire, notamment de son élasticité [167], causée par la création d'agrégats : tanins/protéines salivaires. Des corrélations positives ont même été trouvées entre le coefficient de frottement et l'intensité d'astringence perçue [182]. En revanche, d'autres études ont trouvé que l'ajout de tanins non galloylés comme l'EC n'entraînait pas de modification du coefficient de frottement [167, 183], ni de précipitation de mucines secrétées [82]. Des résultats *in vivo* ont même montré que la consommation de

certaines tanins n'a pas entraîné d'altération de l'épithélium oral [178]. Cela implique donc que la précipitation des protéines salivaires, notamment les mucines sécrétées, n'est pas le mécanisme prédominant dans la perception de l'astringence [128]. Ployon et al. et Canon et al. [34, 128] ont avancé un mécanisme moléculaire additionnel pour expliquer l'astringence, impliquant les mucines MUC1 ancrées à la surface de l'épithélium oral. Ce serait la perturbation de MUC1 et de la PM qui serait à l'origine de la perception de l'astringence [60, 70].

II.3.3 Les protéines impliquées dans la perception de l'astringence

II.3.3.1 Le rôle de MUC1 dans l'astringence

Au cœur de la nouvelle hypothèse qui tente d'expliquer les mécanismes moléculaires de l'astringence se trouve la protéine MUC1. Comme préalablement exposé, MUC1 joue un rôle actif dans la lubrification et la protection de diverses surfaces hydratées. Par exemple, dans la cavité orale, elle intervient dans la formation de la PM en s'associant aux protéines salivaires libres comme MUC5B ou MUC7. Ces interactions donnent lieu à la création d'une pellicule qui assure la lubrification et l'hydratation, conférant une protection à la muqueuse orale. De plus, MUC1 possède un pouvoir lubrifiant inhérent grâce à ses propriétés structurales et sa riche glycosylation [7]. De nombreuses études ont montré que la perturbation de l'expression de MUC1 ou de sa structure entraînait des anomalies et des pathologies liées à l'hydratation et/ou à la lubrification [85, 184] comme le syndrome de la bouche brûlante. MUC1 est donc une protéine grandement impliquée dans les fonctions biologiques d'hydratation et de lubrification des surfaces qu'elle recouvre, en facilitant la formation de la PM grâce à ses propriétés structurales telles que son domaine SEA et VNTR.

En considérant ces éléments, une nouvelle hypothèse a été présentée dans la littérature pour expliquer les mécanismes moléculaires de l'astringence en intégrant la mucine MUC1 [34]. Cette hypothèse suggère que les composés astringents forment des agrégats avec MUC1, entraînant la rupture des deux sous-unités au niveau de son domaine SEA, voir figure 1.19. Cette rupture donne naissance à un mécanisme potentiellement lié à la perception de l'astringence. Lorsque les agrégats de tanins exercent une contrainte sur les protéines MUC1, cela engendre la dissociation de la PM. En effet, l'ancrage des protéines salivaires est assuré par la sous-unité α de MUC1, dont la dissociation conduit à la rupture de la PM. Cette séparation induit une diminution de la lubrification, générant ainsi une augmentation des forces de friction, caractéristique des systèmes mécaniques. Cette amplification des forces à la surface de l'épithélium déclenche l'activation des mécanorécepteurs présents dans les cellules épithéliales, contribuant aux symptômes de la sensation d'astringence.

Comme indiqué précédemment, les cellules pourraient détecter une contrainte mécanique à la surface mucosale via des signalisations cellulaires grâce à la dissociation des domaines SEA de MUC1 comme l'ont rapporté Macao et al. [87]. Ce processus serait en partie responsable de la sensation d'astringence provoquée par l'agrégation des tanins sur la PM, selon Canon et al. [34].

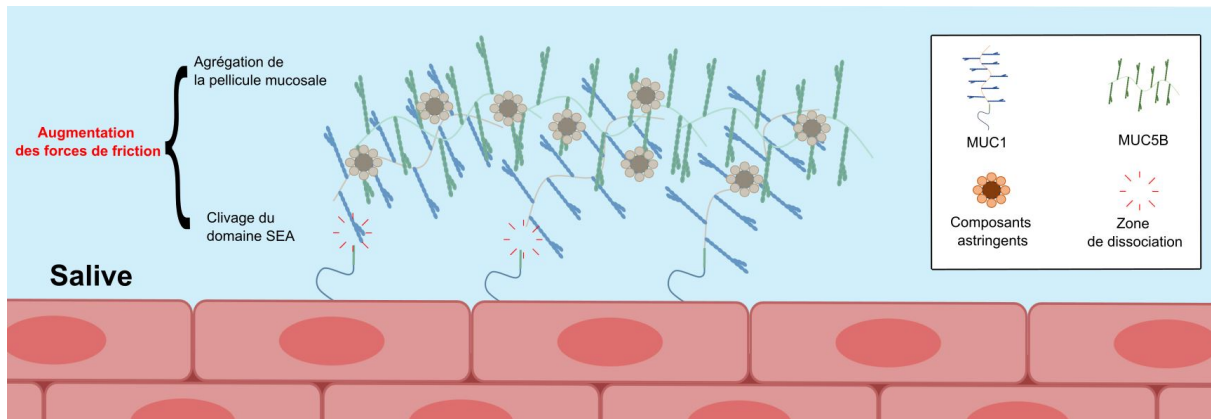


FIGURE 1.19 – Représentation schématique des mécanismes moléculaires de l'astringence, mettant en jeu MUC1 - Ce schéma représente l'hypothèse alternative qui est vérifiée dans ce travail de thèse

II.3.3.2 Le rôle protecteurs des bPRPs

Divers mécanismes de protection ont permis aux organismes de s'adapter aux tanins afin de pouvoir continuer à les ingérer. La forte affinité des PRP pour les tanins donne naissance à des complexes protéiques stables. Ces associations restent intactes tout au long du tube digestif, assurant ainsi la préservation de l'organisme des effets délétères des tanins. Les PRP constituent environ 25% de l'ensemble des protéines salivaires [185]. Ces protéines sont présentes chez d'autres mammifères comme les rongeurs ou les primates. Des travaux ont même montré qu'un régime riche en tanins entraîne une production de PRP accrue chez des souris afin de protéger l'organisme contre les effets indésirables des tanins [119]. En effet, les PRP, avec leur forte affinité pour les tanins, permettent de créer des complexes insolubles et stables limitant l'effet des tanins sur les muqueuses, notamment la perte de lubrification [8].

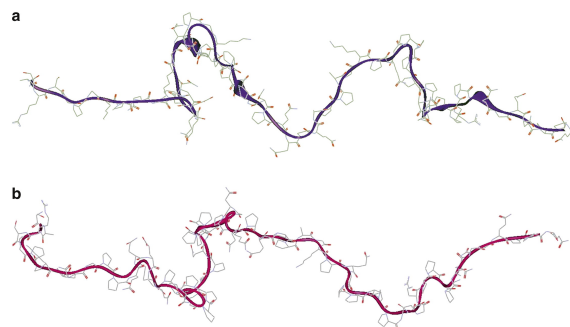


FIGURE 1.20 – Représentation de deux conformations de PRP - Adapté de [186]

Les PRP sont riches en proline, un acide aminé qui représente près de 25 à 40% des acides aminés totaux de la protéine [7]. Elles sont composées de nombreuses charges qui leur permettent d'avoir une structure étendue (figure 1.20) [7, 186]. Les PRP se classent en 3 catégories : les PRP acides (aPRP), les PRP basiques (bPRP) et les PRP glycosylées (gPRP). Parmi ces 3 groupes, ce sont les bPRP, produites par les glandes parotidiennes et submandibulaires, qui possèdent l'affinité la plus forte avec les tanins [187], confirmant leur rôle dans l'interaction avec les polyphénols. Le complexe tanins/PRP se forme à partir des groupements hydroxyles des tanins avec les liaisons

hydrogènes des bPRP aussi appelée IB5 [7, 188], formant ainsi des complexes stables et insolubles protégeant les surfaces épithéliales des muqueuses des tanins, limitant les effets indésirables.

Les aPRP consistent plutôt à la régulation de l'homéostasie calcique. Les gPRP semblent participer à la lubrification de la muqueuse orale [64, 189].

D'autres protéines salivaires s'associent également à la protection des tissus contre les tanins : les histatines, présentes dans la salive humaine [190]. Ces molécules défensives présentent une affinité encore plus prononcée avec les tanins (supérieure à celle des PRP), mais elles ne représentent qu'une faible proportion des protéines salivaires. Ainsi, bien que les histatines soient des agents de protection, elles occupent un rôle secondaire par rapport aux PRP plus nombreuses en proportion (2.6% pour les histatines et 25% pour les PRP [191]). Cependant, les PRP et les histatines constituent les deux principaux groupes au sein de la famille des protéines salivaires liant les tanins, désignées également sous le terme de protéines salivaires se liant aux tanins (Tanins-Binding Salivary Protein, TBSP) [7]. D'autres protéines sont considérées comme des TBSP chez les mammifères, c'est-à-dire qui participent à la protection orale contre les tanins, telles que les stathérines ou les cystatines [70, 192]. De manière générale, plus l'alimentation des mammifères comprend des tanins, plus la présence de TBSP est importante [193].

III Études de la tribologie orale *in vitro*

Traditionnellement, l'évaluation des processus oraux, en particulier la perception sensorielle, repose sur un panel d'évaluateurs formés. Malheureusement, les résultats obtenus sont sensibles à de nombreuses variables, telles que le contexte et les biais perceptifs des sujets [194]. De plus, ce genre de pratique prend du temps et est très souvent coûteuse à mettre en place. Ainsi, de nouvelles méthodes d'analyse quantitative des processus oraux, basées sur la tribologie, ont largement émergé [194]. Ces méthodes permettent la quantification de la perception sensorielle des aliments à partir du coefficient de frottement entre deux surfaces simulant les surfaces orales. En effet, des essais tribologiques entre deux matériaux imitant le contact oral (souvent avec l'ajout de salive) permettent de mesurer les forces de friction entre les surfaces. Ces forces de friction sont utilisées comme des indicateurs mécaniques de l'état de lubrification. En effet, plusieurs groupes de recherche ont trouvé une corrélation entre le coefficient de frottement μ et la perception sensorielle [195] de l'onctuosité [196], de l'astringence [167, 182], de la sensation dite "pâteuse" [197] ou même pour la prise de médicament par voie orale [198]. Une étude a examiné les propriétés sensorielles du chocolat à travers une approche tribologique en simulant le contact oral avec un couple de surfaces : poly(tétrafluoroéthylène) (PTFE)/zircone (ZrO₂) [199]. Ainsi, la tribologie fournit un aperçu du comportement tribologique oral des aliments, qui est ensuite lié à la perception orale. Cela peut fournir des informations essentielles pour la recherche en agroalimentaire afin de concevoir des aliments meilleurs pour la santé tout en gardant des propriétés sensorielles acceptables [41].

Cependant, l'étude de la tribologie orale se heurte à plusieurs défis importants. En effet, la tribologie dépend de nombreux facteurs, tels que les propriétés des matériaux étudiés et le protocole de l'essai. Dans ce cas, la question principale qui se pose est

donc : comment simuler, *in vitro*, ce qui se produit *in vivo* pendant le processus oral ? Dans cette optique, des efforts ont été déployés pour créer des matériaux imitant d'un point de vue mécanique les tissus oraux, tels que le caoutchouc [200], la langue de porc [201, 202], l'acier, le PDMS [203, 204], l'hydrogel [205], ou encore l'agarose [201], en modifiant ces matériaux pour obtenir une rugosité, une rigidité et une mouillabilité similaires aux matériaux *in vivo*. De plus, les études tribologiques des processus oraux se basent sur l'utilisation de différents tribomètres industriels [206] ou conçus spécifiquement en laboratoire [207]. Les études tribologiques orales sont également très sensibles aux protocoles expérimentaux, tels que la forme du contact (comme "*pin-on-disk*", "*ball-on-disk*", "*plane-on-plane*", etc.) ainsi que les différents types de mouvements (linéaires, rotatifs, etc.). D'autres paramètres sont également sujets à débat, tels que les forces à appliquer lors des essais et la vitesse à utiliser.

En d'autres termes, l'approche tribologique associée à la tribologie orale nous permet d'étudier *in vitro* les mécanismes physiques qui induisent certaines sensations en bouche [208], notamment l'astringence. Dans cette section, nous avons répertorié les paramètres influençant les essais de tribologie *in vitro*, ainsi que les travaux réalisés dans le domaine de la tribologie orale *in vitro*. Nous discutons également des choix techniques qui ont été faits pour simuler ce processus. Enfin, nous proposons des perspectives pour l'avenir de ce domaine, notamment en ce qui concerne les matériaux à utiliser.

III.1 Paramètres physico-chimiques influençant les mesures

Afin de simuler de manière optimale le processus oral avec un instrument de mesure *in vitro*, il est impératif de contrôler de manière précise les paramètres du test afin de se rapprocher des conditions orales physiologiques. Les tests tribologiques sont en effet extrêmement sensibles à ces paramètres, et il n'existe actuellement aucun consensus pour fixer les paramètres expérimentaux. Il est essentiel de les adapter à chaque étude tout en gardant à l'esprit l'objectif de reproduire au mieux les conditions *in vivo*. Il est établi que des facteurs tels que le type de mouvement, la vitesse de mouvement, les matériaux du tribopaire, les paramètres physico-chimiques des surfaces, ainsi que la force normale (pression de contact) [209], jouent un rôle déterminant dans les essais de friction.

III.1.1 Le type de mouvement

L'étude des mouvements oraux durant le processus oral revêt une grande importance pour appréhender la complexité de la dynamique de ces mouvements. Cette compréhension facilite la sélection des mouvements appropriés pour reproduire les conditions du processus oral dans un contexte *in vitro*. Une étude échographique réalisée par De Wijk et al. [210] a cherché à caractériser les mouvements buccaux d'un panel de participants lors de l'application d'un stimulus. Cependant, elle a révélé une forte variation des mouvements en fonction du stimulus, rendant leur quantification difficile. C'est pour cela que la simulation des processus oraux *in vivo* s'avère complexe.

De Wijk et al. [211] ont identifié cinq mouvements buccaux distincts et ont étudié leurs effets sur la perception en bouche. Ces manipulations, allant du simple placement du stimulus sur la pointe de la langue à des mouvements énergiques en bouche, ont montré

que l'intensité de la perception en bouche du stimulus augmentait en fonction de la complexité du mouvement [211], montrant le rôle important du mouvement dans la perception sensorielle. De plus, Van Stee et al. [209] expliquent même que la relation entre le mouvement buccal et la perception est une bijection : les mouvements buccaux permettent la perception et certains attributs sensoriels influencent les mouvements oraux. Ainsi l'étude du mouvement des surfaces orales est très complexe et compliquée à reproduire, car il dépend de nombreux paramètres. Le mouvement actuel qui semble reproduire au mieux les mouvements physiologiques est l'ellipse [209].

La vitesse constitue également un facteur déterminant, étroitement lié au type de mouvement. En conditions *in vivo*, la langue peut se déplacer jusqu'à 200 mm/s (avec une moyenne variant de 5 mm/s à 30 mm/s) [209, 212]. D'autre part, travailler à faible vitesse permet d'observer des phénomènes à plus petite échelle, mais ne couvre pas l'intégralité du processus oral. Ainsi, il est nécessaire de prendre en compte la vitesse et de sélectionner la plage de mesure appropriée sur le tribomètre afin d'étudier le phénomène tribologique souhaité.

En somme, les méthodes et protocoles tribologiques destinés à étudier la lubrification orale doivent choisir un type de mouvement cohérent, rotatif, linéaire ou ellipsoïdal. Même si le mouvement buccal *in vivo* est beaucoup plus complexe et ne peut être entièrement reproduit, Dresselhuis et al. [202] explique qu'un mouvement linéaire réciproque simule mieux les interactions entre la langue et le palais qu'un mouvement de rotation. Cette approche simplifiée entre la langue et le palais, bien que linéaire, permet de modéliser le mouvement de manière précise avec le tribomètre.

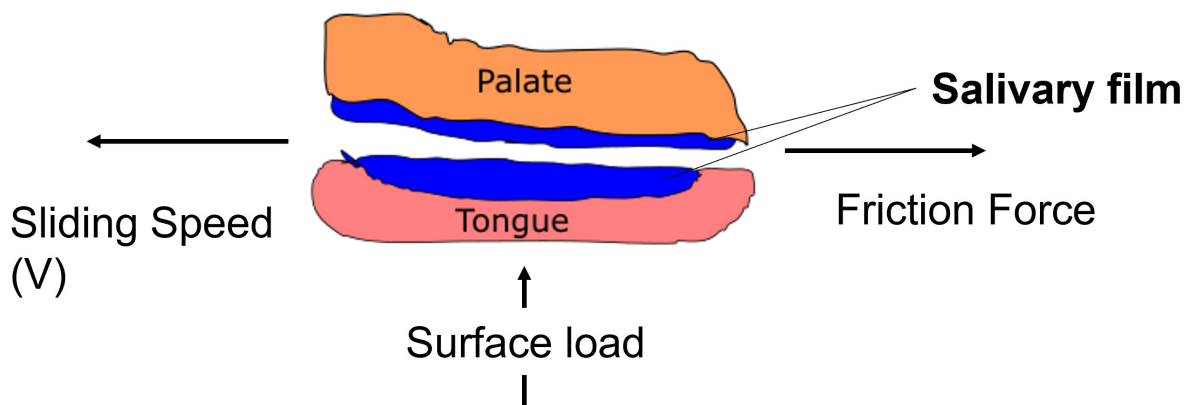


FIGURE 1.21 – Schéma représentant le mouvement oral simplifié entre la langue et le palais, avec les forces de friction, la force normale et la vitesse du mouvement - Reproduit et basé sur un travail de Laguna et al [168]

III.1.2 Les propriétés de surfaces

Les propriétés physico-chimiques de la muqueuse orale *in vivo*, et en particulier de la langue, sont très particulières, figure 1.22. La surface de la langue n'est pas lisse, elle est hérissée de papilles qui créent une multitude de rugosités selon les zones [212]. Sur les 2/3 avant de la langue humaine, sont ancrées des papilles filiformes qui ne possèdent pas de bourgeons gustatifs, elles sont connues pour contribuer à la friction et à la perception mécanique [9]. Les papilles, ancrées à la surface de la langue, créent

une rugosité unique à la langue, très complexe à reproduire *in vitro* [9, 83, 212, 213]. La topographie de la surface de la langue dépend fortement de la forme de ses papilles, ce qui crée une texture de la langue de nature plus grossière que celle d'un papier de verre de 100 grains, correspondant à une rugosité *in vivo* de 20 à 200 μm [49, 203, 212]. De plus, la langue est recouverte d'une pellicule mucosale ancrée, composée principalement de mucines et d'eau (Section I.3 de la partie précédente de ce chapitre) [202].

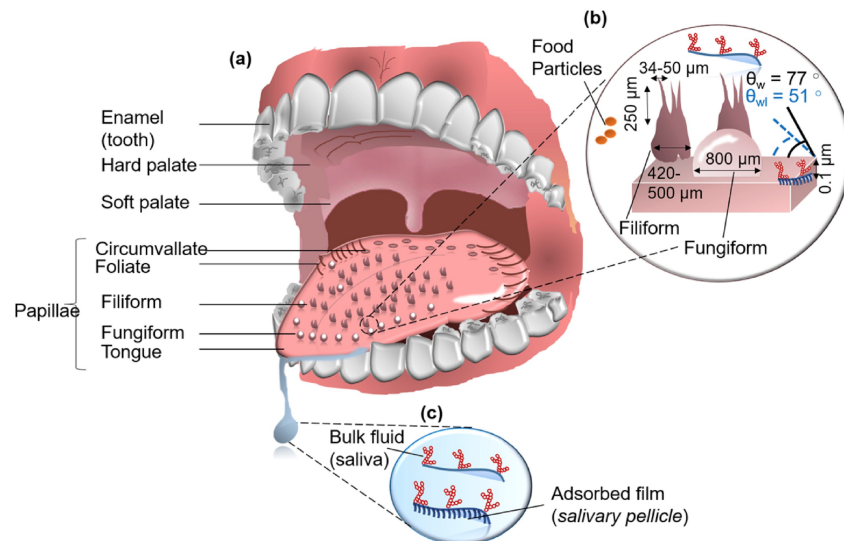


FIGURE 1.22 – Illustration schématique des caractéristiques physico-chimiques de la langue, mettant en avant divers aspects tels que sa rugosité élevée, ses propriétés de mouillabilité, et la présence de la pellicule mucosale composée de mucines [212].

En dehors de la langue, la muqueuse orale est recouverte de replis membranaires appelés les microplicae, qui donnent à la muqueuse orale sa rugosité naturelle. Ils ont une hauteur de 200 à 800 nm et une largeur de 100 à 200 nm [15, 23]. Ces replis offrent aux surfaces orales une plus grande surface d'interface avec l'environnement. Ainsi, la présence des papilles sur la langue et des microplicae à la surface de la muqueuse confère une organisation particulière.

Les tissus de la cavité buccale sont hydrophobes (77°) et fortement polaires [57]. Néanmoins, une fois recouverts par la pellicule mucosale [8], ils deviennent hydrophiles (51°) [212]. Les propriétés physico-chimiques particulières de la muqueuse orale (rugosité, mouillabilité) influencent grandement le coefficient de frottement à sa surface, et cela a été largement étudié dans la littérature : la rugosité [199, 202, 203, 214-216] et la mouillabilité [49, 199, 202, 209, 215, 217]. Ranc et al. [49] ont observé sur une langue de porc qu'en présence d'un revêtement qui rend la surface hydrophile, le coefficient de friction diminue de 40%. Dans un autre travail, Ranc et al. [217] ont observé la grande influence de la rugosité de la surface sur l'évolution du coefficient de friction. En conditions lubrifiées, le coefficient de friction augmente avec la rugosité car les aspérités perturbent l'homogénéité du film lubrifiant.

Par conséquent, afin de simuler les tissus de la muqueuse orale *in vivo* pour des tests de tribologie *in vitro*, il est absolument nécessaire de prendre en compte ces deux ca-

ractéristiques mécaniques de surface. En effet, les matériaux utilisés, comme le PDMS ou d'autres caoutchoucs, doivent être modifiés pour obtenir les bonnes caractéristiques de rugosité et de mouillabilité. Dresselhuis et al. [202] ont comparé la rugosité de surface et la mouillabilité de leur PDMS avec une langue de porc (très similaire à la langue humaine) et ont étudié leur comportement tribologique. Cependant, le PDMS est très différent en termes de rugosité (langue de porc : $65 \mu m$ et PDMS : $5 nm$) et de mouillabilité (langue de porc sèche : 115° et PDMS : 160°), ainsi leur PDMS utilisé est beaucoup plus hydrophobe et beaucoup moins rugueux que la langue de porc. [202, 212]. Krzeminski et al. [215] ont travaillé sur des tampons élastiques qui se rapprochent de la rugosité de la langue d'un porc, et ont observé la forte dépendance du coefficient de friction à la rugosité des surfaces mises en jeu. Ranc et al. [217] ont étudié les effets de la structure de la surface sur les propriétés de friction d'un modèle de contact langue/palais. Ils ont conclu qu'un des matériaux du modèle doit être hydrophile pour permettre la formation d'un film salivaire, et que la mouillabilité et la rugosité sont des facteurs influençant le comportement tribologique d'un modèle de contact.

En résumé, la rugosité et la mouillabilité sont des propriétés physico-chimiques de surface qui influencent grandement le coefficient de friction. De plus, ces paramètres pour la muqueuse buccale sont très spécifiques et assez complexes. Ainsi, dans le cas où nous devons reproduire la muqueuse afin de simuler le contact oral, il est absolument nécessaire de prendre en compte ces deux paramètres et de se rapprocher des conditions *in vivo*.

III.1.3 Effet de la charge normale et de la pression de contact

La charge normale est un paramètre clé dans les essais tribologiques. Sa variation a un impact direct sur le coefficient de frottement. En pratique, lorsque la charge normale augmente, les aspérités de surface diminuent, ce qui a pour effet de lisser les surfaces en réduisant leur rugosité, entraînant ainsi une diminution du coefficient de frottement, comme le met en évidence l'étude de van Stee et al. de 2017 [209].

Prenons l'exemple de la langue de porc : sous pression, les papilles abondamment présentes en surface se déforment, laissant place à une surface beaucoup plus lisse, tel que décrit dans l'étude de De Hoog [218]. La charge normale est étroitement liée à la pression de contact entre les surfaces sollicitées lors de l'essai. Il est donc primordial de choisir la charge normale adéquate pour reproduire au mieux le contact oral *in vivo*. En effet, la pression entre la langue et le palais varie de 10 à 70 *kPa* selon diverses études [206, 209, 219]. Ainsi, afin de reproduire cette pression *in vitro*, il est nécessaire d'appliquer une charge normale correspondante, simulant ainsi au plus près la pression de contact entre le palais et la langue.

Cependant, il est important de noter que cette démarche peut poser des défis pour certains tribomètres industriels qui ne disposent pas d'une gamme de forces suffisamment large pour travailler avec de faibles charges. Étant donné l'impact de ces paramètres sur le coefficient de frottement, il devient évident qu'approcher au plus près des valeurs *in vivo* est essentiel pour obtenir des résultats cohérents par rapport au processus oral.

Dans le cadre de cette thèse, nous avons utilisé un biotribomètre *in vitro* que nous

avons développé. Nous l'avons utilisé pour étudier l'effet de la charge normale sur le coefficient de frottement (voir figure 1.23). En utilisant une bille d'acier de rayon de 3 mm et un silicone industriel considéré comme très souple ($E = 300 \text{ kPa}$), nous avons observé que, dans ces conditions, l'augmentation de la charge normale entraîne une diminution du coefficient de frottement pour chaque vitesse étudiée. Ces résultats viennent renforcer les conclusions présentées dans cette section ainsi que dans la littérature scientifique.

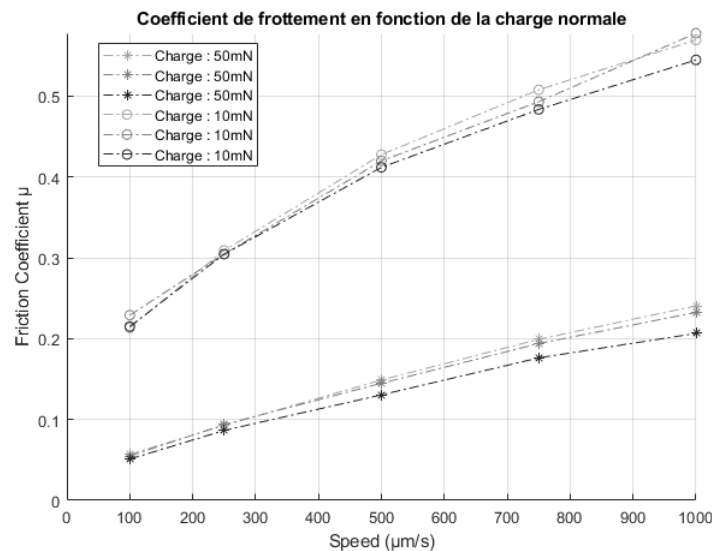


FIGURE 1.23 – *Effet de la charge normale sur le coefficient de frottement*

La pression de contact entre les surfaces mise en jeu pendant l'essai va dépendre donc, à la fois de l'effort normal appliqué mais également des propriétés mécaniques des matériaux utilisés dans l'essai. Ainsi, l'élasticité des matériaux est également un paramètre à prendre en considération.

III.1.4 Effet de l'élasticité des matériaux utilisés

Pour modéliser le contact oral, il est essentiel de trouver des matériaux capables de simuler le comportement mécanique de la muqueuse orale *in vivo*. C'est le défi majeur de la tribologie orale *in vitro*. Les matériaux *in vivo* sont extrêmement complexes à reproduire en termes de rugosité, de mouillabilité, et de rigidité. Par exemple, le module élastique de la langue humaine *in vivo*, mesuré par élastographie, est de $2,5 \text{ kPa}$, [220]. D'autres travaux l'ont mesuré à 12 kPa [207, 221]. Ces différences résultent de la technique de caractérisation utilisée.

Pour simuler la muqueuse buccale, des matériaux tels que le polydiméthylsiloxane (PDMS) [161, 201-205, 216, 222-226], les hydrogels [205], l'agarose [201], ou même la langue de porc [49, 201, 202] sont couramment utilisés. Cependant, tous ces matériaux présentent des limites, notamment en ce qui concerne leur rigidité. Les essais tribologiques sur des surfaces rigides sont moins représentatifs que ceux réalisés sur des surfaces souples se rapprochant du comportement *in vivo* de la muqueuse orale [205, 218].

La rigidité des matériaux est un paramètre essentiel en tribologie, car elle influe sur

la pression de contact. La pression de contact *in vivo* entre la langue et le palais varie de 10 à 70 *kPa* [209, 218, 219], ce qui nécessite une maîtrise précise lors des essais *in vitro*. Des surfaces plus rigides se déforment moins sous une charge normale, créant ainsi une plus petite surface de contact et une pression de contact plus élevée. Ainsi, pour reproduire une pression de contact similaire à celle des conditions buccales, il est nécessaire d'utiliser des matériaux souples avec des charges normales faibles.

Carpenter et al. [201] ont étudié la lubrification d'un film salivaire sur différents matériaux visant à imiter la surface orale, tels que le PDMS, l'agarose et la langue de porc. Ils ont constaté que le PDMS imite bien la langue en termes d'adhésion du film salivaire, mais reste plus rigide (2,2 *MPa*) que la langue de porc (3,5 *kPa*) ou l'agarose (66-174 *kPa*), loin de la muqueuse orale *in vivo*.

Pour simuler efficacement la muqueuse orale, il est crucial de maîtriser 3 caractéristiques mécaniques : la mouillabilité, la rugosité et la rigidité des matériaux [227].

Pour obtenir des résultats cohérents dans les tests de friction, il est essentiel de respecter le comportement *in vivo*, en prenant en compte des paramètres tels que le type de mouvement, la vitesse, les caractéristiques mécaniques des matériaux, la charge et le tribomètre utilisé. Ainsi, les résultats *in vitro* peuvent au mieux refléter le comportement *in vivo*.

III.2 Les systèmes de mesure *in vitro*

Au cours des dernières années, de nombreux dispositifs de friction dédiés à l'étude de la tribologie orale ont été utilisés, comme illustré dans le tableau 1.2.

TABLEAU 1.2 – Résumé de tous les dispositifs utilisés pour étudier la tribologie orale

Nom du système	Références
<i>MTM (Mini Traction Machine, PCS Instrument, UK)</i>	[167, 168, 196, 197, 216, 224, 228-244]
Basé sur un rhéomètre	[4, 170, 171, 205, 215, 245-253]
Texture analyzer	[182, 254-257]
Dispositif développé par un laboratoire dans le cadre d'un projet	[204, 207, 218, 258-261]
Tribomètre UMT2 (Universal Material Tester, Bruker)	[162, 201]
SFA (Surface Force Apparatus)	[262-264]
OTC - Optical Tribological Configuration	[202, 265-268]
HFRR (PCS Instrument, UK)	[269]
BTM (PCS Instrument, UK)	[198, 270]
FFM (Friction Force Microscopy)	[218, 271, 272]

III.2.1 Les dispositifs de laboratoire

L'une des premières études visant à explorer les sensations en bouche à travers une approche tribologique a été réalisée par Kokini et al. [259]. Dans cette recherche, un tribomètre très simple a été utilisé pour établir un lien entre la perception sensorielle et le coefficient de frottement. De Wijk et ses collègues ont également utilisé un tribomètre "fait maison" pour établir une corrélation entre les caractéristiques texturales des aliments et le coefficient de frottement, notamment la relation entre un coefficient de frottement élevé et les sensations de rugosité et d'astringence [258].

De Wijk et Prinz [258] ont utilisé un dispositif appelé "friction tester", développé pour étudier la lubrification de la salive et des aliments. Son fonctionnement est très simple : il consiste en une bande de silicone fixée à une cellule de force d'un côté et à une roue de l'autre. Le lubrifiant est placé entre le silicone et la roue. Ce système est peu coûteux et très simple à mettre en œuvre, mais la gamme de matériaux à utiliser est très réduite. Dans le même type de mouvement, des travaux ont été menés en utilisant un arbre tournant par rapport à une lame en verre où sont positionnées des surfaces similaires à des muqueuses [218].

Certaines études ont développé leur propre système expérimental combinant la mesure de la friction avec des observations au microscope confocal à balayage laser (OCT) [202, 273]. L'objectif de Dresselhuis et al. [202] était d'identifier les paramètres importants qui influencent la perception sensorielle tels que la rugosité, la mouillabilité ou encore l'élasticité. Le dispositif se compose de deux surfaces en silicone et d'un microscope confocal à laser (CLSM). Les surfaces d'essai peuvent être changées, et le microscope permet de prendre des images pendant l'essai pour visualiser les changements dus à la friction. Cependant, la plage de réglage de la force et de la vitesse est très réduite, ce qui limite considérablement son utilisation. D'autres auteurs ont conçu leurs propres tribomètres selon leurs spécifications, comme Sadowski et al. [274], qui ont développé un tribomètre avec une bille reposant sur un disque rotatif où un mince film de lubrifiant est maintenu constant pendant le test. La bille ne tourne pas, ce qui permet au point de contact d'avoir un mouvement purement linéaire. L'objectif était d'étudier l'effet de la configuration du contact durant un essai tribologique, Mou-Dur, Mou-Mou, etc. Ranc et al. [49] ont proposé un tribomètre développé eux-mêmes, consistant en un mouvement réciproque d'une bille et d'un plan avec une température imposée. Récemment, un groupe de chercheurs [207] a développé un nouveau système de friction impliquant un contact plan. Le modèle de langue est placé dans une cavité, en contact avec un modèle de palais, entre se trouve le lubrifiant à tester. Le dispositif effectue un mouvement de cisaillement transversal pour mieux simuler le mouvement de contact entre la langue et la mâchoire supérieure.

III.2.2 Les dispositifs industriels

D'autres études ont fait appel à des dispositifs industriels basés sur des rhéomètres, ce qui s'avère très intéressant car ces équipements sont couramment utilisés dans les laboratoires agroalimentaires. Il est relativement simple de développer un système complémentaire à coupler à l'équipement existant pour mener des tests de friction. Heyer et al. [275] ont utilisé un rhéomètre comme base et y ont ajouté une cellule de mesure des

forces de friction. Cette cellule est composée d'une bille (en rotation) en contact avec trois plans. La mesure de la force tangentielle et le contrôle de la force normale permettent de calculer le coefficient de frottement. Des variantes de ce dispositif ont été élaborées, avec deux billes en contact avec un disque [205, 251], trois billes sur un plan [205, 239] ou un anneau sur un plan [252], ce qui améliore la stabilité du système. L'avantage de ces tribomètres réside dans leur large gamme de paramètres : charge normale, vitesse, température, etc. Cependant, ces dispositifs, qui combinent un rhéomètre et un tribomètre, présentent quelques inconvénients. Les données de sortie sont parfois complexes à traiter et à interpréter [194]. De plus, les forces normales disponibles sont relativement élevées, conduisant à des pressions de contact élevées qui diffèrent quelque peu des pressions de contact orales *in vivo*. Cette limitation empêche également l'utilisation de matériaux "fragiles" comme les langues de porc, alors que ces matériaux sont des options intéressantes pour simuler les tissus oraux.

La "*Mini Tracion Machine*" (MTM, PCS Instruments, UK) se positionne comme un tribomètre industriel largement répandu pour l'évaluation des propriétés tribologiques entre deux surfaces. Ce système consiste en une bille en acier et un disque, éventuellement immergés dans un lubrifiant, ce qui engendre un mouvement de roulement glissement. Son atout réside dans sa capacité à fonctionner à différentes vitesses, ce qui lui permet de couvrir divers régimes de lubrification tout en contrôlant la température. De nombreux groupes de recherche ont adopté le dispositif MTM pour caractériser les propriétés tribologiques d'interfaces simulées pour reproduire le contact oral. Par exemple, Rossetti et al. [167] ont utilisé le MTM pour mesurer les propriétés lubrifiantes de la salive mélangée à du thé, afin d'étudier l'évolution de la lubrification induite par l'effet astringent du thé, en employant un contact mou PDMS/PDMS. Une autre étude a évalué la relation entre les propriétés sensorielles et tribologiques d'hydrogels [197].

Toujours en se basant sur des équipements préexistants, le "*texture analyzer*" est souvent adopté. Par exemple, Chen et al. [255] ont apporté des modifications au dispositif initial en introduisant un contact à trois billes sur un plan avec un mouvement linéaire. Cette configuration permet de tester divers matériaux tels que la langue de porc et de contrôler des paramètres tels que la température, la vitesse de glissement et les forces de friction. Wang et al. [257] ont ensuite optimisé cette configuration en améliorant la connexion entre les surfaces de friction et les capteurs. De même, Brossard et al. [182] ont exploité ce dispositif pour étudier l'effet des tanins du vin sur les propriétés lubrifiantes de la salive. D'autres systèmes de friction avec un mouvement linéaire ont également été employés. Par exemple, Tsui et al. [269] ont utilisé une configuration bille sur disque basée sur le banc d'essai alternatif à haute fréquence (HFRR) de PCS Instrument (UK). De la même manière, un dispositif BTM avec un contact "pin-on-disk" a été utilisé pour étudier la lubrification du chocolat et ainsi réaliser un mouvement linéaire réciproque [270].

Une autre technique qui a été utilisée est la "*surface force apparatus*" (SFA), permettant d'étudier les forces de frottement d'un fluide entre deux plans [263]. Ce dispositif permet de mesurer les forces d'interaction entre les deux surfaces en présence d'un fluide et d'observer le contact. Par exemple, Watrelot et al. [264] ont réalisé des essais tribologiques avec un dispositif SFA pour étudier les effets du comportement tribologique en présence de composants astringents pour deux lubrifiants : salive et mucines. Ils ont

observé une modification des forces de friction après l'ajout de tanins. Les surfaces ont été mises en contact à charge nulle, et les forces de frottement ont été mesurées avec un dispositif de friction en appliquant une charge croissante de $0,6 \text{ mN}$ à 18 mN et une vitesse croissante de $0,124$ à $12,4 \mu\text{m/s}$. Le dispositif SFA est un appareil de mesure très sensible permettant de mesurer les forces normales et tangentielles entre deux surfaces en contact ou séparées par un film mince à des échelles micrométriques et nanométriques.

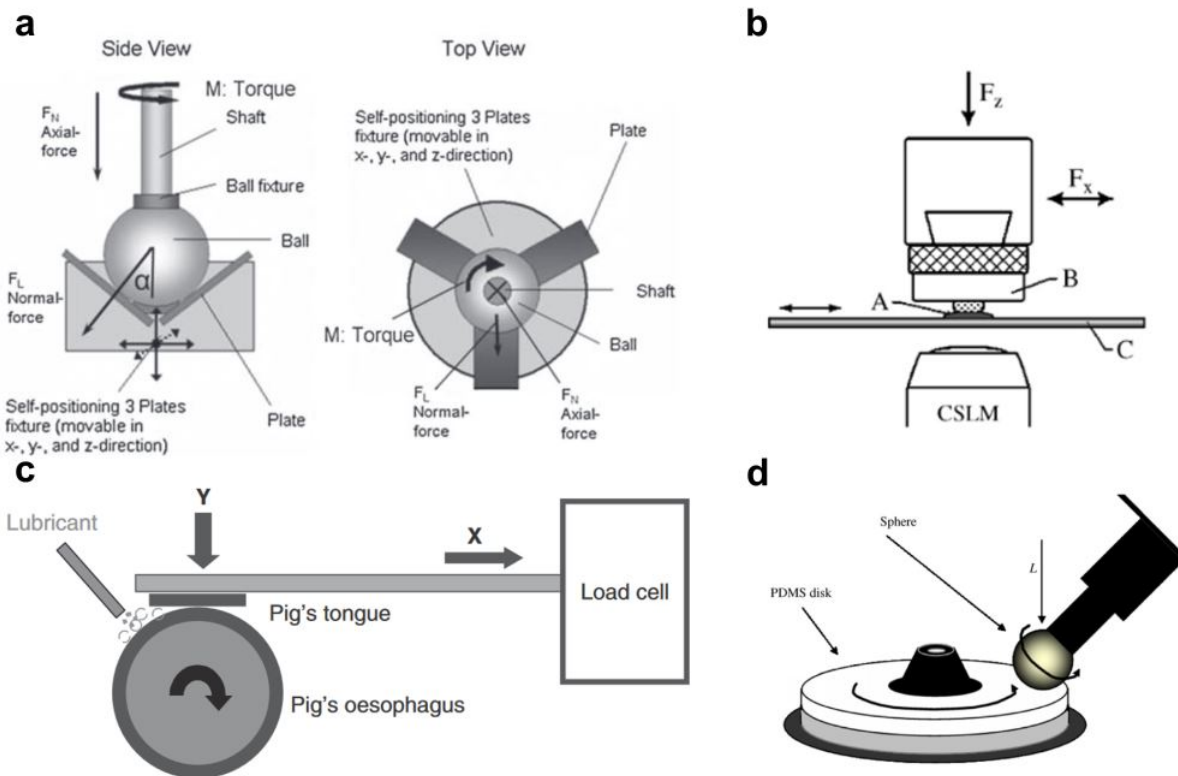


FIGURE 1.24 – Exemple de tribomètre utilisé dans la littérature pour étudier la tribologie orale *in vitro* - (a) Tribomètre basé sur un rhéomètre de Heyer et al. [275] - (b) Tribomètre optique couplant tribomètre et un dispositif d'imagerie dispositif de Dresselhuis et al. [202] - (c) "Friction analyzer" de Prinz et de Wijk [271] - (d) Dispositif MTM (PCS Instrument, UK) le schéma ici est de Bongaert et al., [203]

III.3 Surfaces et matériaux utilisés

Lorsqu'il s'agit d'étudier la tribologie orale *in vitro*, le choix des matériaux du tribopaire est crucial. En effet, pour simuler les phénomènes tribologiques buccaux, il est nécessaire de trouver des tribopaires mimant au mieux les conditions *in vivo*. Dans le cadre de la simulation de la tribologie orale, des substrats élastiques doivent être utilisés afin de reproduire de manière plus réaliste le comportement mécanique de la muqueuse orale. L'objectif est de réduire la pression de contact entre les deux surfaces, en visant toujours à se rapprocher de la pression de contact en bouche *in vivo*, qui est entre $2\text{-}70 \text{ kPa}$ [206, 219, 243, 276-278]. En effet, l'utilisation de matériaux durs tels que l'acier ou certains polymères associés à des forces élevées, fixées par des tribomètres industriels comme le MTM, peut rapidement entraîner des pressions de contact atteignant le MPa ou le GPa

[194] (~ 700 *kPa* dans cette étude [279]). La problématique commune pour l'ensemble des chercheurs dans ce domaine est donc de reproduire le comportement mécanique de la langue humaine ou de la muqueuse orale *in vivo*. La rigidité de la langue *in vivo* étant de 2 à 12 *kPa* au repos [207, 212, 221, 280] à environ 120 *kPa* en contraction [207, 221]. Pour sa rugosité, les nombreuses papilles qui recouvrent la langue génèrent une rugosité importante entre 20 et 300 μm [203, 212]. Enfin, la langue *in vivo* est hydrophobe lorsqu'elle est sèche et devient hydrophile en présence d'un film salivaire [57, 212].

III.3.1 Les matériaux synthétiques

Actuellement, le PDMS est le matériau de référence pour la simulation des paramètres viscoélastiques des surfaces orales. Sa facilité de fabrication et sa grande flexibilité en fait un matériau très apprécié. En effet, il est possible de modifier sa forme, sa rugosité et même ajuster ses propriétés mécaniques. Le PDMS est donc largement utilisé dans la recherche sur la lubrification orale. Par exemple, Bongaerts et al. [203] ont modélisé un contact mou en PDMS-PDMS, dans le but de se rapprocher du contact mou que nous retrouvons dans le corps (y compris le contact oral) et de s'émanciper de matériaux tels que l'acier, dont le module d'Young est beaucoup trop élevé. Le module de Young du PDMS utilisé était de $E = 2,4$ *MPa* et la rugosité maximale de 3,6 μm . Ils ont rendu le PDMS hydrophile au moyen d'un traitement de surface au plasma. Rossetti et al. [167] ont étudié l'effet de composés astringents sur le coefficient de friction en utilisant le PDMS comme substrat imitant la muqueuse orale. Ils ont observé que le coefficient de friction augmentait en présence d'EgCG en raison d'une rupture du film salivaire sur le substrat PDMS. Ils ont également observé que la salive s'adsorbait sur la surface du PDMS, ce qui est un très grand avantage à accorder à ce matériaux. Le PDMS utilisé avait une rugosité comprise entre 9 *nm* et 12 *nm*.

D'autres matériaux synthétiques ont été utilisés, proposant une alternative au PDMS et des paramètres physico-chimiques différents comme les élastomères [200, 215, 230, 243, 281] et des hydrogels [205].

III.3.2 Les matériaux *ex vivo*

Pour reproduire davantage les surfaces orales, la langue de porc a été utilisée dans certains travaux. Elle possède les mêmes paramètres physico-chimiques de surface (rugosité et mouillabilité), mais aussi la même rigidité que la muqueuse orale (de 2 à 12 *kPa*). Des groupes de recherche [202, 218] ont obtenu des résultats très intéressants sur la lubrification des surfaces orales. Cependant, l'utilisation de la langue de porc comme échantillon pose des problèmes logistiques, notamment la disponibilité des langues, leur fraîcheur, mais aussi l'effet du stockage sur leurs paramètres mécaniques. De plus, une équipe de chercheurs a comparé les performances tribologiques du PDMS avec celles de la langue de porc [201]. Ils ont observé que l'absorption des protéines salivaires sur le PDMS était proche de l'absorption de la langue de porc, ce qui est une caractéristique essentielle dans la formation de la PM. Cela montre que le PDMS est une bonne alter-

native sur cet aspect et que la langue de porc est un substrat comportant de nombreux défauts.

III.3.3 Des nouveaux matériaux multimodaux

Ainsi, il est nécessaire de trouver de nouveaux matériaux imitant les surfaces orales *in vivo* de manière plus efficace, tout en répondant à l'ensemble des problématiques. De plus, bien que certains matériaux synthétiques soient modulables et puissent se rapprocher des paramètres physico-chimiques des surfaces orales, ils ne tiennent pas compte des nombreux composants et interactions impliqués dans la lubrification orale. En effet, la lubrification orale est un mécanisme très complexe qui ne se limite pas à l'interaction tribologique entre deux surfaces, de nombreuses autres interactions se produisent, telles que les interactions protéine-protéine et protéine-molécules. C'est pourquoi, dans le domaine de la biologie, de nombreuses études se consacrent au développement de modèles cellulaires permettant de simuler l'épithélium oral en vue de l'étude de la lubrification orale. Par exemple, Nivet et al. [282] ont proposé des modèles cellulaires basés sur la transfection de la lignée cellulaire TR146, exprimant différentes isoformes de la protéine MUC1. Ces modèles ont permis d'analyser l'impact de la structure de MUC1 sur la formation de la PM et sur les mécanismes liés à l'astringence. Ils se rapprochent considérablement de l'épithélium oral en présentant des microplicae et en exprimant MUC1 avec ses domaines SEA et VNTR. Les travaux de Ployon et al. [8], appartenant au même groupe de recherche que nous, ont tenté de développer un modèle cellulaire basé sur la lignée cellulaire TR146, exprimant une forme tronquée de MUC1. Ces modèles ont également servi à étudier la formation de la PM et les mécanismes moléculaires de l'astringence. Cependant, ces modèles n'exprimaient qu'une forme tronquée de MUC1, sans les domaines VNTR ni SEA, ce qui les éloignent des protéines MUC1 *in vivo*.

Dans ce contexte, il serait très intéressant de développer un modèle de muqueuse orale capable d'associer les avantages des matériaux synthétiques ainsi que les atouts des modèles cellulaires. Un tel modèle permettrait de mener des études tribologiques en vue de comprendre de nombreux phénomènes liés à la lubrification orale, tels que la formation de la pellicule mucosale ou encore les phénomènes physiques à l'origine de la sensation d'astringence.

TABLEAU 1.3 – Matériaux utilisés dans la littérature pour étudier la tribologie orale - Les "-" correspondent à des grandeurs mécaniques qui ne sont pas précisées dans la littérature

Matériaux	Module d'Young (kPa)	Rugosité (Ra) (μm)	Mouillabilité ($^\circ$)	Références
Langue Humaine <i>in vivo</i>	2-10	20-300	51-80	[212, 220]
Langue de porc <i>ex vivo</i>	2-10	20-300	39.8 - 77.3	[162, 201, 202, 212, 218, 266, 283]
PDMS	820 - 170 000	0.01 - 3.6	39 - 151	[50, 161, 162, 167, 170, 171, 197, 201-205, 216, 222-227, 232-234, 237, 238, 248, 249, 253, 256, 257, 264, 265, 267, 269, 270, 272, 284-287]
Caoutchouc/Silicone	1200 - 21 000	0.7 - 100	30-155	[196, 200, 210, 215, 217, 228, 230, 231, 236, 239, 243, 244, 246, 251, 253, 255, 258, 274, 281, 288-290]
Hydrogel	120 - 740	0.3	-	[287]
Agarose	60 - 170	0.325	-	[201]
Gel de WPI (" <i>Whey protein isolate</i> ")	740	-	-	[205]
Polymère : polypropylène (PP*)	$1100 \cdot 10^3$ - $1300 \cdot 10^3$	0.070 - 0.090	107	[222]
Polymère : Polyamide (PA)	$2000 \cdot 10^3$	0.230 - 0.270	82	[222]
Teflon (PTFE)	30 000	-	79 - 108	[244, 253]
Polyurethane	-	-	-	[250, 253]
<i>PolyVinyl Alcohol</i> (PVA)	50	-	-	[207]
Acier/Aluminium	$200 \cdot 10^6$	0.06 - 3.2	79	[274, 275]

III.4 Les perspectives des études de tribologie orale *in vitro*

L'étude de la tribologie orale représente un défi fascinant pour les sciences de l'alimentation et de la perception. Ce type d'étude permet d'explorer les mécanismes moléculaires impliqués dans la formation de la PM, ainsi que les mécanismes physiques à l'origine de la sensation d'astringence. Une nouvelle hypothèse sur l'origine moléculaire de cette sensation est présentée par Canon et al. [34] dans leur revue intitulée "Perspectives on Astringency Sensation : An Alternative Hypothesis on the Molecular Origin of Astringency". Ils suggèrent que l'agrégation des tanins sur les protéines MUC1 entraîne la rupture de la pellicule mucoale, réduisant ainsi la lubrification orale et augmentant les forces de friction. Cette augmentation des forces de friction est responsable de la sensation de sécheresse et de contraction en bouche, communément appelée astringence.

L'Agence Nationale de la Recherche (ANR) soutient un projet de 5 ans débutant en 2021 appelé MACARON, pour "MucosAl pellicle flAvouR interactiOn & perceptiON". Ce projet MACARON explore comment la protéine MUC1 et sa structure influencent les propriétés tribologiques de l'épithélium oral en présence ou en l'absence de composants astringents.

Le plan du projet MACARON est divisé en trois parties : le développement d'une lignée cellulaire exprimant la protéine MUC1, le développement d'un modèle de muqueuse orale, et la mise au point d'un biotribomètre *in vitro* travaillant à des échelles micrométriques.

Les travaux de thèse présentés dans ce manuscrit s'inscrivent dans le cadre de ce projet. Les objectifs sont centrés sur l'étude de la lubrification de l'épithélium oral notamment l'évaluation du rôle de la protéine MUC1 dans les propriétés lubrifiantes de la PM, ainsi que dans les mécanismes physiques à l'origine de la sensation d'astringence. Pour répondre à ces objectifs, un modèle de contact oral a été développé en utilisant des modèles d'épithélium oral conçus dans les travaux de Nivet et al. [7]. Enfin, des essais tribologiques seront réalisés sur ces modèles à l'aide d'un dispositif mécanique développé dans le cadre de cette thèse, permettant d'étudier l'évolution de la lubrification de ces modèles d'épithélium.

MACARON représente donc une avancée majeure dans l'étude *in vitro* de la tribologie orale, en se focalisant particulièrement sur le rôle de la protéine MUC1 dans la lubrification de l'épithélium oral. Les avancées résident dans le développement d'un nouveau modèle d'épithélium et d'un dispositif inédit permettant d'étudier la lubrification des modèles d'épithélium à l'échelle micrométrique. Cela permet donc d'observer les effets des interactions protéine-protéine dans la lubrification tout en restant proche des comportements mécaniques de la muqueuse orale *in vivo*.

Chapitre 2

Mise en place de la démarche expérimentale

SOMMAIRE

I	ÉLABORATION D'UN ENVIRONNEMENT <i>in vitro</i> SIMULANT LE CONTACT ORAL	49
I.1	Construction des épithéliums <i>in vitro</i>	50
I.2	Les substrats utilisés	55
I.3	Sélection des matériaux en contact avec les modèles d'épithélium	56
II	MÉTHODES DE CARACTÉRISATION <i>in vitro</i> DE LA LUBRIFICATION ORALE .	57
II.1	Description du biotribomètre	57
II.2	Analyse des essais d'indentation	62
II.3	Analyse des essais tribologiques	68
II.4	Démarches des analyses statistiques	73
II.5	Validation du dispositif	74
III	MÉTHODES DE CARACTÉRISATION DES SURFACES DES MODÈLES D'ÉPI- THÉLIUM ORAL : ENDOMMAGEMENT, TOPOGRAPHIE ET CHIMIE DE SUR- FACE	78
III.1	Visualisation et quantification de l'endommagement <i>post mortem</i> des mo- dèles d'épithélium	78
III.2	Topographie multi-échelles des modèles d'épithélium	81
III.3	Compositions moléculaires et chimiques de surface	86
IV	CONCLUSIONS ET BILAN DU CHAPITRE	91

Introduction

L'objectif principal de cette thèse consiste à caractériser le rôle de la protéine MUC1 dans la lubrification de la muqueuse orale, en mettant particulièrement l'accent sur la formation de la pellicule mucosale (PM) et les mécanismes physiques de l'astringence. La protéine MUC1, étant une protéine ancrée à la surface de l'épithélium oral, a été présentée en détail dans le chapitre bibliographique de ce manuscrit (voir chapitre 1). Pour répondre à ces problématiques divers éléments ont été développés et utilisés, lesquels seront présentés dans ce chapitre. Notre approche repose sur la mise en œuvre d'essais tribologiques sur des modèles d'épithélium oral *in vitro*. Ces essais tribologiques permettent de mesurer des grandeurs mécaniques comme le coefficient de frottement μ et l'énergie dissipée par frottement Ed , qui nous offrent des informations sur l'état de lubrification des modèles d'épithélium. De plus, les traces de frottement laissées par l'indenteur sur l'épithélium permettent de suivre l'endommagement de la surface fournissant ainsi des informations supplémentaires sur la lubrification des épithéliums. Les analyses topographiques multi-échelles et chimiques par spectroscopie Raman apportent également des informations précieuses sur les mécanismes de lubrification. Ce chapitre détaille la création des modèles d'épithélium et expose les approches pour caractériser la lubrification *in vitro*. Il présente le dispositif mécanique employé lors des essais tribologiques ainsi que les méthodes d'analyse post-essais.

I Élaboration d'un environnement *in vitro* simulant le contact oral

L'approche adoptée dans le cadre de cette thèse repose sur le développement d'un environnement *in vitro* visant à simuler le contact entre les tissus oraux. Le premier élément de ce contact est le modèle de muqueuse orale, composé de deux parties distinctes :

- Un épithélium oral *in vitro*, correspondant à un tapis cellulaire monocouche, obtenu par la transfection de la lignée cellulaire TR146 avec différentes isoformes de MUC1.
- Un substrat sur lequel le tapis cellulaire est ancré. Deux types de substrats ont été utilisés : des lames de verre et des hydrogels mous reproduisant l'élasticité de la muqueuse orale *in vivo*.

Le second élément est l'indenteur, qui entre en contact avec le modèle pendant les essais.

Ces modèles de muqueuse orale nous permettent d'explorer la lubrification buccale en fournissant une structure *in vitro* capable de simuler les interactions entre les protéines mucosales et salivaires. Ils nous permettent ainsi d'analyser le rôle de la protéine MUC1 et de sa structure dans la formation de la pellicule mucosale, et par extension, dans la lubrification. De plus, nous examinons l'effet des composés astringents sur la lubrification et leurs interactions avec les protéines salivaires et mucosales.

I.1 Construction des épithéliums *in vitro*

Les lignées cellulaires ont été développées dans le cadre de deux thèses menées respectivement par S. Ployon et C. Nivet [7, 8] à l'INRAE, Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation (CSGA) à Dijon, France.

I.1.1 Présentation des quatre isoformes

Trois des quatre lignées cellulaires utilisées expriment chacune une forme distincte de la protéine MUC1, tandis que la dernière lignée ne l'exprime pas. Les différentes isoformes sont schématiquement représentées sur la figure 2.1. Dans cette étude, quatre isoformes sont comparées, ce qui nous permet d'analyser l'impact de MUC1 et de sa structure dans les mécanismes de la lubrification orale.

Les quatre lignées cellulaires sont issues d'un modèle utilisant la lignée épithéliale TR146 [291]. Cette lignée est dérivée d'un carcinome épidermoïde de la muqueuse orale et est largement caractérisée dans la littérature, souvent utilisée dans la création de modèles d'épithélium oral [292]. Les TR146 forment un épithélium stratifié non kératinisé, similaire aux caractéristiques de la muqueuse orale saine (voir la section I.1.2.1 du chapitre 1).

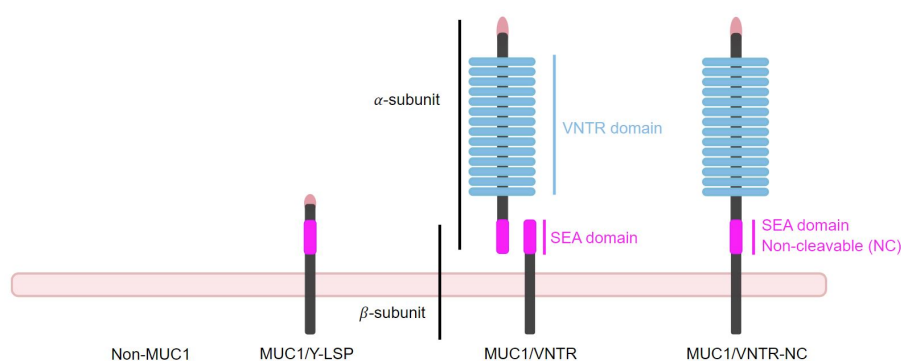


FIGURE 2.1 – Représentations schématiques des 4 isoformes de MUC1 étudiées dans ce travail - Non-MUC1 n'exprime pas la protéine MUC1 - MUC1/Y-LSP exprime une forme tronquée de MUC1 plus courte - MUC1/VNTR exprime une forme de MUC1 avec le domaine VNTR et le domaine SEA clivable - MUC1/VNTR-NC exprime MUC1 avec le domaine VNTR sans le domaine SEA

La première isoforme est la forme native des cellules TR146, désignée sous le nom de **Non-MUC1** en raison de son absence naturelle d'expression de la protéine MUC1, voir figure 2.1. Les résultats tribologiques de cette isoforme sont comparées à ceux des trois autres lignées qui expriment MUC1, nous offrant ainsi la possibilité d'examiner l'impact de la présence de MUC1 sur la formation de la PM.

La seconde isoforme est désignée comme **MUC1/Y-LSP**, et a été développée par S.Ployon [8] pour construire le premier modèle d'épithélium oral exprimant "naturellement" MUC1. Cette isoforme est une forme tronquée de la protéine MUC1, figure 2.1. Elle ne possède pas de domaine structural extra-cellulaire tels que le domaine VNTR, présent normalement dans la forme physiologique de MUC1. Cette structure tronquée correspond à un caractère pathologique de MUC1. Ces éléments manquants sont des limites pour cette isoforme car ces régions extra-cellulaires participent à l'interaction avec

les protéines salivaires et donc à la lubrification. Cependant, MUC1/Y-LSP présente une topographie de surface similaire à celle de la muqueuse orale *in vivo* puisque cette lignée forme des replis membranaires appelés *microplicae* existant *in vivo* [24]. L'absence des domaines extra-cellulaires nous permet de comparer leurs impacts sur la formation de la PM en les comparant avec les 2 autres isoformes qui seront présentées par la suite.

La troisième isoforme présentée est l'isoforme se rapprochant le plus de la forme physiologique de MUC1. Nous l'avons nommée **MUC1/VNTR**. Elle a été développée dans le cadre de la thèse de C.Nivet [7]. Sa structure se divise en deux parties liées par une liaison non-covalente : le domaine SEA, (figure 2.1). Le domaine SEA de cette isoforme est clivable, permettant la dissociation des deux sous-unités sous l'action d'effort mécanique. La première sous-unité α est entièrement extra-cellulaire et forme une structure rigide, nommée le domaine VNTR. Il est composé d'une séquence de 20 acides aminés entièrement hydrophiles qui participent au mécanisme de lubrification des tissus oraux. Au sommet de cette sous-unité, nous retrouvons l'extrémité N-terminale de 107 acides aminés. La sous-unité β est la deuxième sous-unité et correspond à la partie intracellulaire de la protéine. MUC1/VNTR est composé d'un domaine cytoplasmique avec 7 sites de phosphorylation. Les domaines biologiques d'intérêt présentés ici permettent de se rapprocher de l'état naturel de MUC1 (voir figure 1.12). La comparaison avec les autres isoformes peut être réalisée en étudiant les différences de comportement en présence ou en l'absence de ces domaines d'intérêt.

La dernière isoforme est appelée **MUC1/VNTR-NC** et a également été développée par C.Nivet [7]. Sa structure se rapproche grandement de celle de l'isoforme MUC1/VNTR précédemment décrite, (voir figure 2.1). Cependant, la séquence de clivage du domaine SEA a été retirée. C'est-à-dire que le domaine SEA n'est pas clivable. Cette différence est importante puisque cette partie permet la dissociation des sous-unités α et β jouant un rôle protecteur pour l'épithélium. Cette différence de structure nous donne la possibilité d'étudier l'effet d'un domaine clivable dans la lubrification de l'épithélium oral.

Pour plus de clarté les propriétés principales de chaque lignée sont présentées dans le tableau 2.1 ci-dessous :

TABLEAU 2.1 – Présentation des quatre lignées cellulaires utilisées pour développer le modèle d'épithélium oral

Isoformes	Caractéristiques	Références
Non-MUC1	Forme Native de la lignée TR146, sans aucune modification	Obtenu auprès de <i>European Collection of Authenticated Cell Cultures</i> (Salisbury, Wiltshire, UK)
MUC1/Y-LSP	Forme tronquée de la protéine MUC1, plus courte que la forme physiologique de MUC1	Développée par S.Ployon [8]
MUC1/VNTR	Forme la plus proche de la structure physiologique avec un domaine SEA clivable et un domaine VNTR	Développée par C.Nivet [7]
MUC1/VNTR-NC	Forme très proche de l'isoforme MUC1/VNTR, avec un domaine SEA non clivable et la domaine VNTR	Développée par C.Nivet [7]

Les travaux de Nivet et Ployon [7, 8] confirment la présence de MUC1 sur les modèles d'épithélium employés dans cette thèse. La localisation de MUC1 sur la membrane cellulaire des quatre lignées cellulaires a été confirmée par Nivet et al. [282] à l'aide d'un co-immunomarquage fluorescent de la membrane plasmique (en rouge), de MUC1 (en bleu) et d'une analyse par microscopie confocale (voir figure 2.2). Cette dernière montre l'image fusionnée des deux marquages pour chaque lignée cellulaire TR146. Aucune expression de MUC1 n'a été détectée dans les cellules Non-MUC1, produisant une image rouge seulement avec des cellules. En revanche, toutes les lignées cellulaires transfectées avec MUC1 ont révélé une co-fluorescence dominante (en magenta), indiquant une colocalisation de MUC1 et de la membrane cellulaire. Par conséquent, ces images démontrent que MUC1 est bien exprimée et est présente sur la membrane des lignées cellulaires transfectées, confirmant que les essais mécaniques sont effectués sur des modèles exprimant correctement la protéine. Les lignées cellulaires utilisées dans les travaux de Nivet et Ployon sont employées dans notre étude, comme illustré dans la figure 2.1.

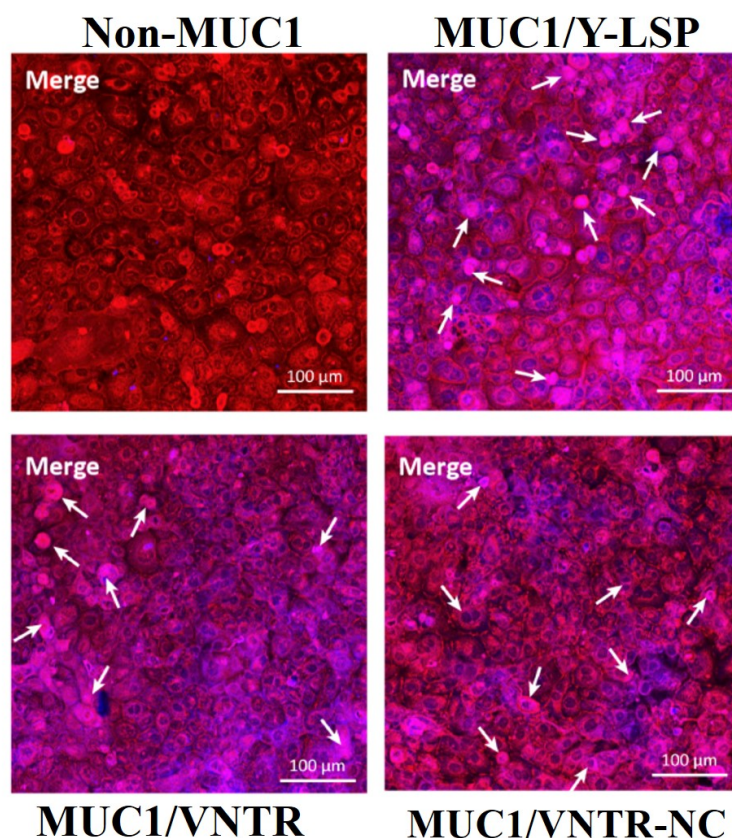


FIGURE 2.2 – Co-immunomarquage de la membrane cellulaire (en rouge) et de MUC1 (en bleu) observé par microscopie confocale sur les quatre lignées cellulaires - Les régions de colocalisation apparaissent en magenta, indiquant la présence de MUC1 sur la membrane cellulaire, comme souligné par les flèches blanches - Figures et résultats adaptés des travaux de Nivet et al. [282]

En résumé, dans nos études nous examinons les quatre isoformes de la protéine MUC1, bien que la première ne semble pas l'exprimer véritablement. L'isoforme Non-

MUC1 nous permettra d'étudier l'impact de la protéine sur la formation de la PM en comparant ses résultats avec les trois autres lignées cellulaires l'exprimant. De plus, l'isoforme MUC1/Y-LSP constitue une forme tronquée de la protéine. En comparant les résultats obtenus avec les deux dernières lignées, nous pourrions analyser le rôle du domaine VNTR dans la lubrification des modèles d'épithélium. En dernier lieu, l'isoforme MUC1/VNTR-NC, ne comportant pas le site de clivage du domaine SEA, facilitera notre exploration du rôle du domaine SEA clivable de MUC1.

I.1.2 Protocole de culture cellulaire

Les quatre lignées cellulaires stables nous ont été fournies par le laboratoire CSGA de l'INRAE, afin d'établir une routine de culture cellulaire directement sur site (au Laboratoire de Tribologie et Dynamique des Systèmes (LTDS)). Cela a facilité la réalisation des essais tribologiques. Les cellules ont été envoyées congelées et sont conservées dans l'azote liquide à -196°C .

I.1.2.1 Les milieux de culture

Les cellules sont cultivées quotidiennement en routine dans un milieu composé de DMEM/F12 + GlutaMax (1 :1,v :v, 11559726, *Gibco, ThermoFischer, Allemagne*), complété avec 10 % de sérum de veau fœtal (SVF, 10500064 et A5209402, *Gibco, ThermoFischer, Allemagne*) et 100 *units/ml* de pénicilline et 100 $\mu\text{g/ml}$ de streptomycine (15140122, *Gibco, ThermoFischer, Allemagne*). Ce milieu est qualifié de milieu de base. Il permet de cultiver les cellules TR146 natives, les Non-MUC1. Pour les lignées cellulaires exprimant MUC1, deux milieux différents sont utilisés. Pour l'isoforme MUC1/Y-LSP, le milieu de base est complété avec 2,5 mg/mL de Géniticine (10131027, *Gibco, ThermoFischer, Allemagne*). Quant aux isoformes MUC1/VNTR et MUC1/VNTR-NC, nous ajoutons 2 $\mu\text{g/mL}$ de Zéocine (ant-zn-05, *Invivogen, France*). Les trois milieux utilisés pour cultiver ces isoformes sont résumés schématiquement sur la figure 2.3.

I.1.2.2 Congélation et décongélation

Les cellules sont conservées dans de l'azote liquide, dans des cryotubes Nunc stériles de 1.8 *mL* remplis de 0.5 *mL* de milieu de culture (lequel dépend de l'isoforme congelée) et 5% de DMSO. Avant de mettre en place la routine de culture cellulaire, les cellules sont décongelées. La décongélation est une étape clé, qui peut être contraignante pour la croissance des cellules si elle est mal réalisée. Le DMSO est un agent cryoprotecteur qui, à des doses supérieures à 4 %, est toxique pour les cellules. Il faut donc procéder rapidement à la dilution du contenu du cryotube dans du milieu avec sérum pour diminuer le taux de DMSO. La dilution se fait dans des tubes Falcon stériles de 15 *mL* (352096, *Falcon, Corning, USA*), puis la solution décongelée est répartie dans des boîtes de maintien T75 ou T25. Les cellules ne sont utilisables pour les applications qu'après 2 ou 3 passages.

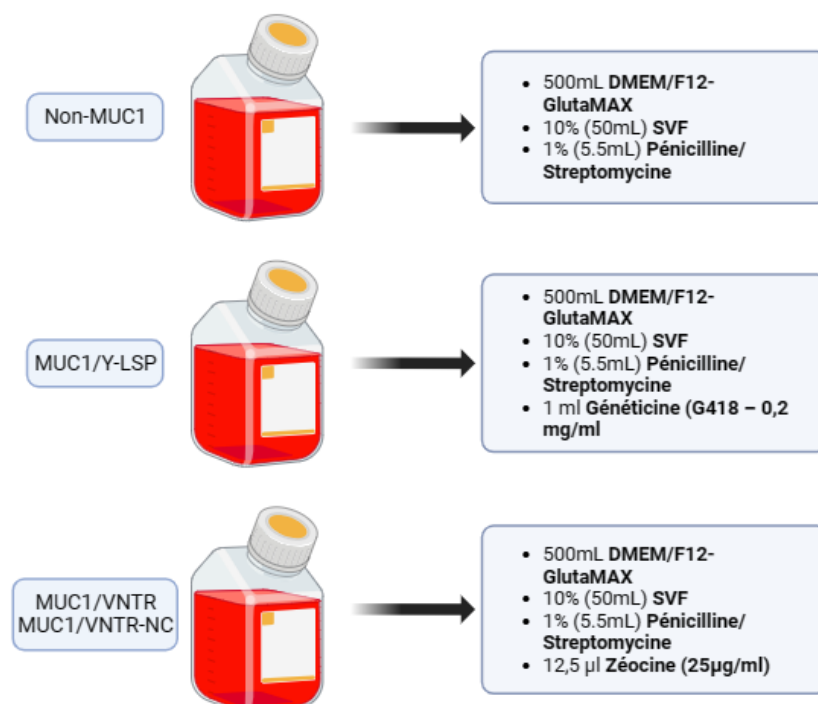


FIGURE 2.3 – Milieux de culture utilisés pour cultiver les quatre isoformes de MUC1 - Illustration réalisée avec BioRender

I.1.2.3 Protocole de routine

Ce protocole nous est fourni par le laboratoire CSGA de l'INRAE et est basé sur les travaux de C.Nivet et S.Ployon [7, 128]. Les quatre lignées sont cultivées en routine dans des boîtes de maintien T75 à bouche ventilée au LTDS, permettant de réaliser les essais tribologiques directement sur place sur des épithéliums vivants. Le maintien se fait à 37°C en atmosphère humidifiée avec 7.5% de CO₂. Le milieu de culture est changé tous les deux jours jusqu'à atteindre la confluence des cellules à la surfaces des boîtes (80-90% de la surface occupée). Une fois la confluence atteinte, les cellules sont repiquées dans les boîtes de maintien avec un mélange de Trypsine-EDTA (0.05%) et rouge de phénol (25300054, Gibco, TermoFischer, Allemagne). Dans le cas d'expérimentation, des cellules sontensemencées à 0.75×10^6 cellules / mL sur un substrat. La concentration est mesurée avec une cellule de Malassez, (protocole en l'annexe I). Les substrats utilisés sont variés et seront présentés dans la suite de cette section. La confluence est atteinte en 24 heures. Une représentation schématique du protocole est donnée sur la figure 2.4.

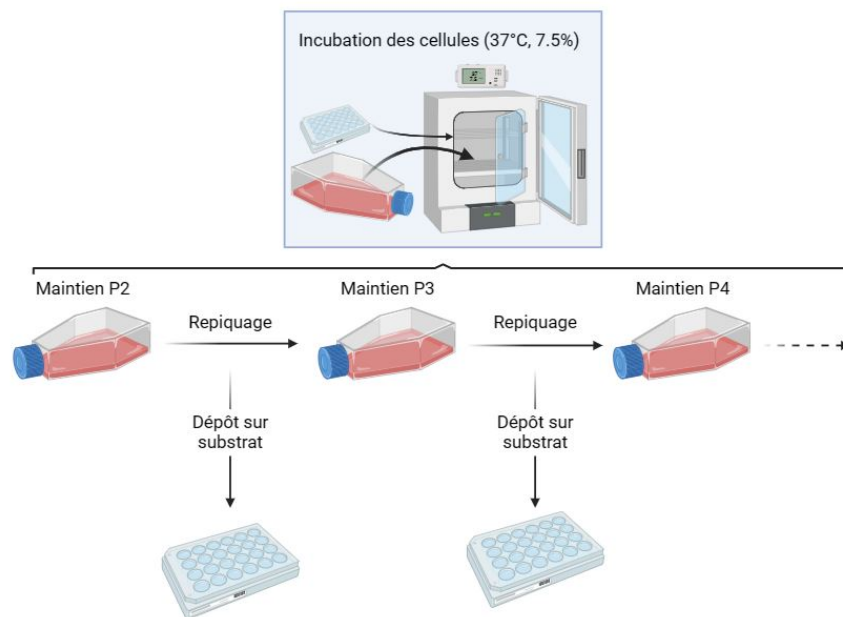


FIGURE 2.4 – Représentation schématique du protocole de routine de culture cellulaire

I.2 Les substrats utilisés

En raison de l'épaisseur très faible des épithéliums, il n'est pas possible de réaliser des essais directement sur le tapis cellulaire. Pour cela, il est nécessaire de les déposer sur un substrat. Par conséquent, la construction d'un modèle de muqueuse orale composé à la fois d'un modèle d'épithélium et de son substrat s'est avéré indispensable pour la réalisation des essais mécaniques. Deux types de substrat sont utilisés durant ces travaux de thèse : des lames de verre et des hydrogels.

I.2.1 Les lames de verre

Les substrats utilisés pour les essais présentés dans les Chapitre 3, 4 et 5 sont des lames de verre. Leur disponibilité abondante et leur coût modéré en ont fait un choix pratique. De plus, les quatre lignées cellulaires étudiées adhèrent parfaitement à ces lames, facilitant ainsi la construction de nombreux modèles de muqueuse buccale pour mener à bien les essais tribologiques.

Les cellules sontensemencées à une densité de 0.75×10^6 cellules/mL sur les lames de verre dans des plaques de culture à 24 puits. Préalablement, les lames de verre sont revêtues de poly-D-lysine (A38904-01, Gibco, ThermoFischer, Allemagne). Ce revêtement renforce l'ancrage des cellules à la surface, limitant l'arrachement cellulaire lors des essais de frottement, comme illustré sur la figure 2.5, où l'image avec Poly-D-Lysine révèle nettement moins de dommages que celle sans revêtement.

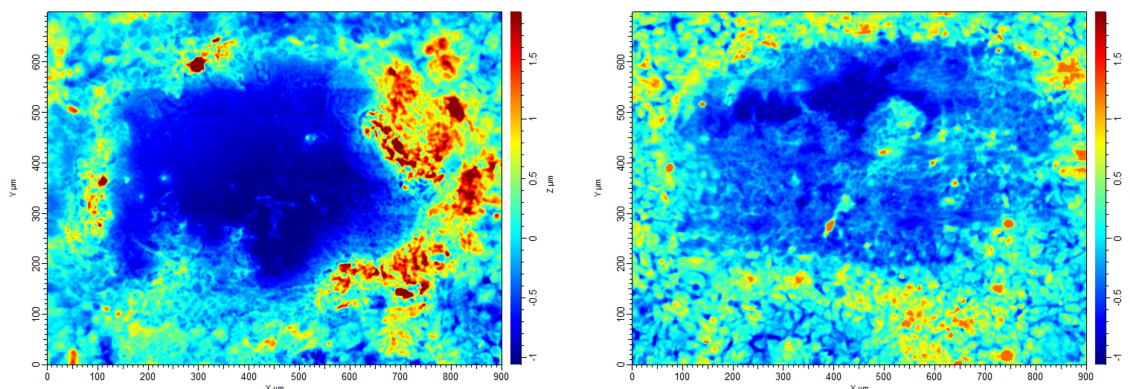


FIGURE 2.5 – Illustrations topographiques des cellules *Non-MUC1* après friction sur des lames de verre : à gauche sans *Poly-D-Lysine*, à droite avec *Poly-D-Lysine* - Images acquises par interférométrie à lumière blanche

Le principal inconvénient de ce type de substrat réside dans sa grande rigidité. En effet, la rigidité du verre est de l'ordre de 70 GPa [293], alors que celle de la muqueuse orale *in vivo* est d'environ une dizaine de kPa (voir tableau 1.3). Il était donc essentiel pour nous d'identifier un substrat de remplacement plus en adéquation avec les caractéristiques des tissus *in vivo*. C'est pourquoi nous avons choisi des hydrogels au cours de notre dernière étude, laquelle sera exposée dans le Chapitre 6.

I.2.2 Les hydrogels

Parallèlement aux lames de verre, des hydrogels ont été utilisés comme substrats pour nos épithéliums. Les hydrogels présentent l'avantage d'être transparents, ce qui permet de suivre l'évolution de l'épithélium pendant la culture. Leur rigidité est modulable et faible, ce qui permet de se rapprocher des propriétés de la muqueuse orale *in vivo*.

Nous avons opté pour les hydrogels SoftWell (Petrisoft 35, *Matrigen, USA*). Composés de polyacrylamide, ces hydrogels sont fournis directement dans des boîtes de Petri de 30 mm de diamètre et sont revêtus de collagène de type I. En d'autres termes, ils sont prêts à l'emploi, ce qui constitue un avantage majeur. Leur gamme de rigidité s'étend de 0.1 à 100 kPa , nous permettant ainsi de choisir une rigidité de 8 kPa , proche de celle de la muqueuse orale [212]. Les quatre lignées cellulaires ont adhéré parfaitement à leur surface grâce à la présence du revêtement en collagène, renforçant ainsi l'ancrage des cellules.

I.3 Sélection des matériaux en contact avec les modèles d'épithélium

Pour simuler le contact oral *in vitro*, une bille a été placée en contact avec le modèle de muqueuse buccale. Cette bille, constituant la seconde surface du contact, a servi d'indenteur lors des essais de tribologie. Comme expliqué précédemment, deux types de modèles de muqueuse ont été utilisés dans cette thèse en fonction du substrat : des lames de verre et des hydrogels. La principale différence entre ces modèles réside dans leur rigidité, ce qui nécessite de choisir la bille en conséquence.

En effet, pour que la pression de contact entre les deux surfaces soit proche de celle observée *in vivo* ($2\text{-}70 \text{ kPa}$ [278]), il est nécessaire d'utiliser une bille adaptée à la rigidité

du modèle de muqueuse utilisé. Ainsi, une bille plus souple a été privilégiée pour la majorité des essais réalisés avec le substrat en lame de verre. Quant à la nouvelle approche de la muqueuse buccale, une bille en acier simulant le palais a été utilisée. Ce nouveau modèle sera examiné plus en détail dans le Chapitre 6, où les résultats seront présentés.

II Méthodes de caractérisation *in vitro* de la lubrification orale

Afin de caractériser l'état de lubrification de nos modèles d'épithéliums un biotribomètre a été développé. Ce dispositif mécanique permet de réaliser des essais de frottement et d'indentation sur nos modèles cellulaires à une échelle micrométrique. Ces essais fournissent des indicateurs mécaniques de l'état de lubrification des modèles de muqueuse orale dans différentes conditions d'analyse. Les essais tribologiques fournissent notamment deux paramètres intéressants : le coefficient de frottement (μ) et l'énergie dissipée par frottement (Ed). Par exemple, l'effet des tanins sur la lubrification peut être observé en suivant l'évolution du coefficient de frottement. De même, nous pouvons examiner le rôle de MUC1 la lubrification orale en suivant l'évolution de ces marqueurs sur les quatre lignées cellulaires. À partir des essais d'indentation, il est possible d'accéder à la force d'adhésion entre l'indenteur et la surface indentée, ce paramètre pouvant être utilisé pour caractériser le film en surface des épithéliums. Ce paramètre est utilisé pour examiner l'évolution de la structure et des propriétés viscoélastiques après la formation de la PM ou après l'ajout de tanins.

Cette partie présente en détail le biotribomètre développé dans le cadre de ces travaux et explique comment les essais sont réalisés et analysés.

II.1 Description du biotribomètre

Le biotribomètre développé dans le cadre de ces travaux de thèse, permet de réaliser des essais d'indentation et de frottement à l'échelle micrométrique sur nos divers matériaux biologiques. Ce système est entièrement conçu en interne, ce qui nous donne la liberté de personnaliser les composants selon nos besoins spécifiques. En sélectionnant soigneusement les tables et les capteurs, nous avons la capacité de déterminer les paramètres optimaux pour nos études sur les modèles cellulaires d'épithéliums. Les détails concernant la conception, la programmation, le pilotage, l'acquisition et le traitement des données sont exposés dans cette section.

II.1.1 Conception du dispositif

Le biotribomètre peut être décomposé en 3 parties : le support, la composante normale et la composante tangentielle.

II.1.1.1 Le support

L'ensemble du dispositif est monté sur un socle massif (M-SA2-11, *Newport, MKS Instruments Photonics Solutions division, USA*), reposant sur quatre pieds en silicone

pour atténuer les vibrations extérieures susceptibles d'altérer les mesures (voir figure 2.6).

Une potence manuelle, composée d'une manivelle et d'une vis sans fin, permet un positionnement grossier à l'échelle macroscopique de l'indenteur par rapport à l'échantillon (voir figure 2.6).

II.1.1.2 La composante normale

Dans la direction perpendiculaire à l'échantillon, le dispositif accomplit deux actions : il met en mouvement l'indenteur et mesure la force normale exercée par celui-ci sur l'échantillon. Pour le déplacement, trois éléments de mouvement sont utilisés, voir figure 2.6 :

- La potence manuelle permet de déplacer grossièrement l'indenteur vers l'échantillon. La table micrométrique et la table piézo-électrique sont fixées sur cette potence
- Une table micrométrique avec moteur pas à pas (M111.1DG, *PI Physik Instrumente, Allemagne*), qui est consacrée à la détection du contact indenteur/échantillon. Sa course est de 5 mm avec une résolution de 0.05 μm et une vitesse comprise entre 0.01 et 1.5 mm/s
- Une table piézo-électrique (P629.1CD, *PI Physik Instrumente, Allemagne*) dédiée au déplacement de l'indenteur pendant les essais. Cette platine possède une course de 1500 μm avec une résolution de 3 nm

Concernant la mesure de l'effort, une cellule de force de type S (LSB200, 20 g, *Futek, USA*) permet des mesures de force en traction et en compression. Sa plage de mesure s'étend de $\pm 190 \text{ mN}$ avec une résolution de $\pm 0.1 \text{ mN}$. Un filetage permet de fixer un indenteur sur la partie inférieure du capteur. Différents indenteurs ont été utilisés et développés en fonction de l'application : sphérique, cylindrique, plat, avec différents matériaux tels que le silicone, l'acier et le PTFE. Ce type de capteur Futek se déforme pendant son chargement, il est donc essentiel de prendre en compte sa déflexion pour estimer le déplacement réel pendant la mesure, en particulier pour de faibles efforts comme les nôtres. Ainsi, cette déflexion, notée d_c [m/N], est mesurée pour estimer le déplacement total de l'indenteur, noté ϵ_i [m], en fonction de la charge F_N [N] et du déplacement de la table ϵ_N [m]. Le calcul de la déflexion du capteur est effectué à l'aide de la relation suivante :

$$\epsilon_i = \epsilon_N - d_c \cdot F_N \quad (2.1)$$

II.1.1.3 La composante tangentielle

La dernière composante de ce dispositif est la partie tangentielle. Tout comme l'élément normal, elle assure le déplacement ainsi que la mesure de l'effort tangentiel. Une table piézo-électrique (P629.1CD, *PI Physik Instrumente*) garantit le mouvement linéaire avec une course de 1500 μm . Sur cette table est fixée un montage mécanique préalablement conçu pour ce dispositif et réalisé par fabrication additive en résine polymère imprimé en 3D (RS-F2-GPBK-04, *Black Resin v4, Formlabs, USA*), par stéréolithogra-

phie (SLA). L'échantillon à tester est fixé sur ce montage. Ce support se déforme en flexion lors du test. Cette déformation tangentielle est mesurée par une cellule de charge piézo-électrique (9215A, *Kistler, Suisse*). Ce transducteur de force possède une haute sensibilité (configuré dans notre cas à $\pm 0.5 N$). Cette mesure de la déformation correspond aux forces de friction entre l'indenteur et l'échantillon, voir figure 2.6.

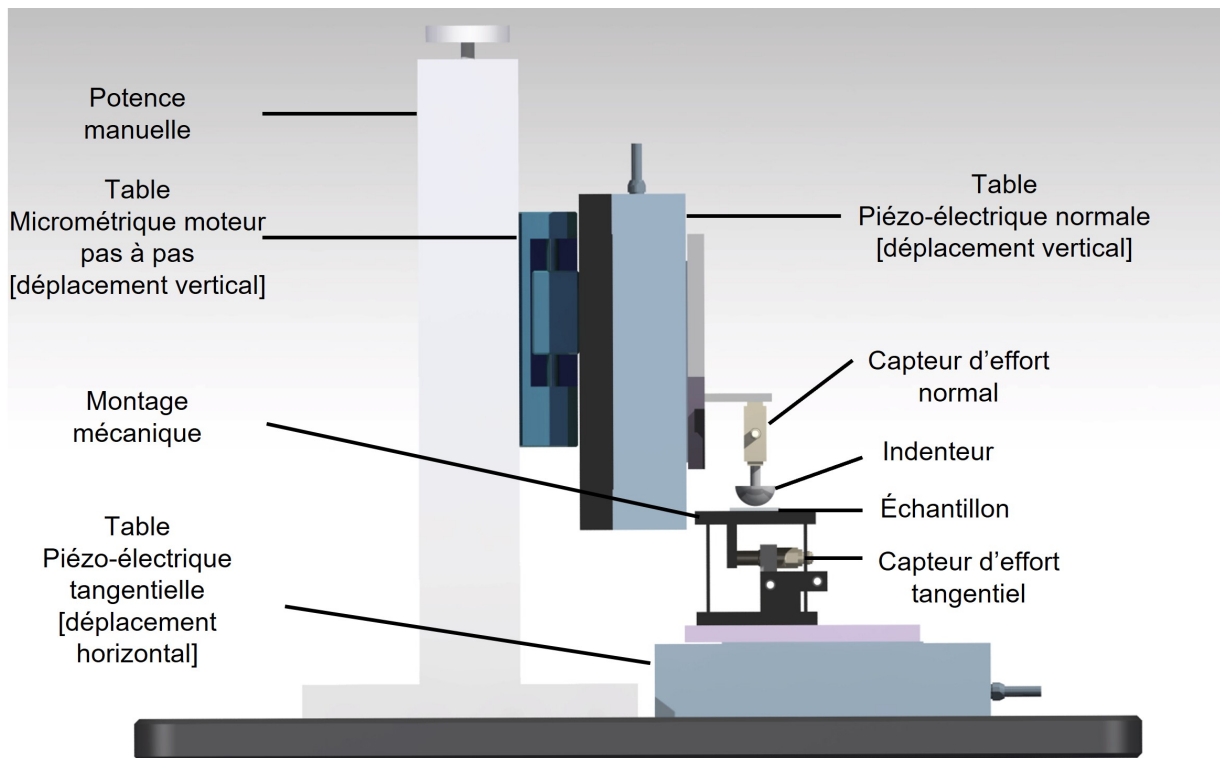


FIGURE 2.6 – Vue latérale du dispositif développé et utilisé dans ces travaux de thèse, montrant tous les composants détaillés du tribomètre

II.1.2 Tests mécaniques

La conception du dispositif décrit précédemment, offre la possibilité de mesurer à la fois l'effort normal et l'effort tangentiel, ce qui permet de réaliser des essais de frottement. En désactivant la partie tangentielle, il devient également possible d'effectuer des essais d'indentation. La précision des platines piézo-électriques assure un contrôle précis du mouvement à l'échelle micrométrique.

Cette section présente les différents essais disponibles ainsi que leurs étapes.

II.1.2.1 Essais d'indentation

La première étape consiste à rapprocher manuellement l'indenteur de l'échantillon à tester. L'utilisateur manipule donc la potence manuelle (voir figure 2.6) qui déplace verticalement la partie normale du dispositif.

L'étape suivante consiste en la détection automatique de la surface. Cette étape vise à positionner l'indenteur à une distance préétablie de l'échantillon. Pour y parvenir, la table micrométrique déplace l'indenteur vers l'échantillon à une vitesse très lente, laquelle peut

être choisie par l'utilisateur. La détection de la surface s'effectue dès que l'effort normal mesuré dépasse un effort seuil fixé à 0.02 mN . Après cette détection, l'indenteur remonte de 1 mm pour rompre le contact, puis retourne se placer à une distance de retrait x de l'échantillon, valeur également définie par l'utilisateur.

Enfin, l'essai d'indentation est effectué, la table piézo-électrique se déplace verticalement pour atteindre la consigne imposée par l'utilisateur : effort imposé ou déplacement imposé. Pendant le mouvement, le capteur de force normal mesure l'effort associé à l'enfoncement de l'indenteur dans l'échantillon. Ces mesures d'effort et de déplacement permettent de calculer les caractéristiques mécaniques du matériaux indenté (raideur de contact, module élastique réduit, force d'adhésion, etc.). Ensuite, l'indenteur revient en position initiale.

La figure 2.7 présente schématiquement le déroulement d'un test d'indentation avec notre dispositif.

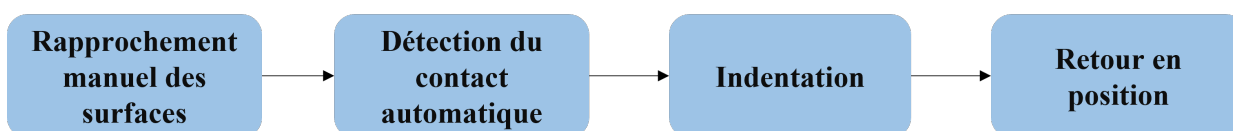


FIGURE 2.7 – Représentation schématique du déroulement d'un test d'indentation

II.1.2.2 Essais de frottement

La première étape est identique à celle de l'essai d'indentation : les deux surfaces se rapprochent manuellement pour entrer dans la course de la table micrométrique.

Ensuite, l'étape suivante consiste à effectuer la détection du contact automatique. De la même manière que pour les essais d'indentation, l'indenteur détecte la surface de l'échantillon en utilisant un seuil d'effort. Cette méthode de détection de l'échantillon permet de commencer les essais depuis la même position à chaque répétition du test et de démarrer à une distance précisément maîtrisée grâce à la mesure de la charge normale.

Par la suite, l'utilisateur définit une consigne : une force normale imposée ou un enfoncement imposé. La platine piézo-électrique verticale enfonce l'indenteur dans l'échantillon jusqu'à atteindre la valeur de force ou d'enfoncement souhaitée. Dès que la consigne est atteinte, la table piézo-électrique tangentielle se déclenche et démarre son mouvement linéaire alterné, permettant ainsi le début du frottement entre les deux surfaces. Pendant le frottement, le montage mécanique (voir figure 2.6) se déforme en flexion, et le capteur tangentiel mesure les forces de friction nécessaires pour mettre en mouvement l'indenteur en contact avec l'échantillon.

Durant l'essai de frottement, le système est asservi en position grâce à un régulateur Proportionnel Intégral Dérivé (PID), ce qui permet de maintenir la consigne d'entrée constante pendant toute la durée du frottement. Le régulateur PID est un système de contrôle qui adapte une variable de sortie en fonction de l'erreur dans le but de maintenir une variable de processus à son niveau de consigne. En effet, en raison de la viscoélasticité et de la rugosité des échantillons, la force normale peut largement évoluer au fil du

temps. Or, pour le calcul du coefficient de frottement, il est nécessaire de maintenir une charge normale constante durant l'essai. Dans le cas d'une consigne de déplacement imposée, aucun asservissement n'est déclenché car l'enfoncement reste constant.

L'utilisateur peut définir un nombre de cycles, une distance de course et une vitesse de frottement. À la fin du frottement, l'utilisateur peut enregistrer les données de force normale et de force tangentielle, ce qui permet de calculer le coefficient de frottement en fonction du temps. Enfin, les tables retournent à leur position de départ pour commencer un nouveau test si nécessaire.

La figure 2.8 présente schématiquement le déroulement, étape par étape, d'un essai tribologique avec le dispositif présenté précédemment.

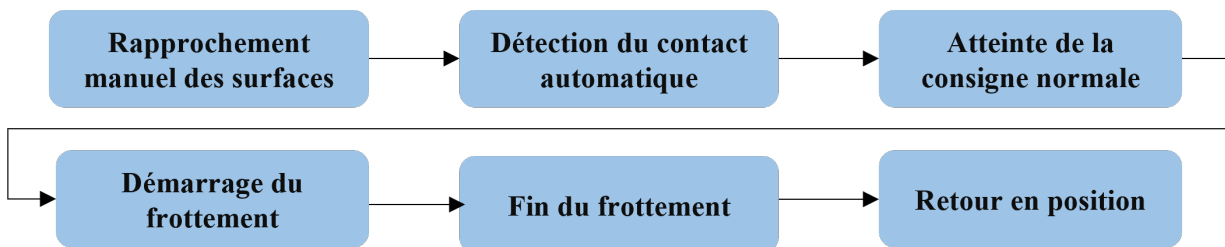


FIGURE 2.8 – Représentation schématique du déroulement d'un test de frottement

II.1.3 Pilotage du système et acquisition des données

La chaîne de pilotage et d'acquisition de notre système est schématiquement représentée sur la figure 2.9.

II.1.3.1 Pilotage

Notre système est contrôlé selon trois axes principaux :

- la table micrométrique assure la détection automatique du contact
- la table piézoélectrique permet le mouvement vertical (ou normal)
- la platine piézoélectrique génère le mouvement horizontal (ou tangentiel)

La table micrométrique est connectée à un ordinateur via un contrôleur USB (Carte C-863, *Physik Instrumente, Allemagne*), responsable du pilotage et de l'acquisition du déplacement de la table.

Les deux platines piézoélectriques sont pilotées de manière similaire. Un convertisseur analogique/numérique (NI USB-6229, *National Instrument, USA*) envoie une tension de 0-10V à travers un amplificateur piézo (E503.00, *Physik Instrumente, Allemagne*) intégré au contrôleur piézo (E501, *Physik Instrumente, Allemagne*). Cette tension garantit le mouvement des tables piézoélectriques, voir figure 2.9.

II.1.3.2 Acquisition

La tension de sortie du capteur de force normale (LSB200, *FUTEK, USA*) est transformée par un amplificateur à pont de charge (TS205, *Sedeme, France*), puis transmis au convertisseur analogique/numérique (NI USB-6229, *National Instrument, USA*). De même, le signal du capteur de force tangentielle (9215A, *Kistler, Suisse*) est amplifié par

son propre amplificateur de charge (5018A, Kistler, Suisse), qui envoie les données à la carte d'acquisition (NI USB-6229, *National Instrument, USA*). Pour l'acquisition du déplacement des deux tables piézoélectriques, les données sont collectées par un conditionneur de signal piézoélectrique (E509.C2A, *Physik Instrumente, Allemagne*), également intégré au contrôleur piézo (E501, *Physik Instrumente, Allemagne*), et transmises au convertisseur. Toutes ces données de force et de déplacement collectées par la carte d'acquisition sont ensuite transférées à l'ordinateur pour être enregistrées et traitées par l'utilisateur, figure 2.9.

La programmation du pilotage et de l'acquisition des données est réalisée en langage LabView™ (LabView™ 19.0, Licences École Centrale de Lyon). Ce programme enregistre un fichier texte comprenant les données expérimentales de force et de déplacement normal, ainsi que de force et de déplacement tangentiel. De plus, il enregistre les paramètres du test, tels que la taille de l'indenteur, la consigne de force ou de déplacement, la vitesse de déplacement tangentielle et normale, etc.

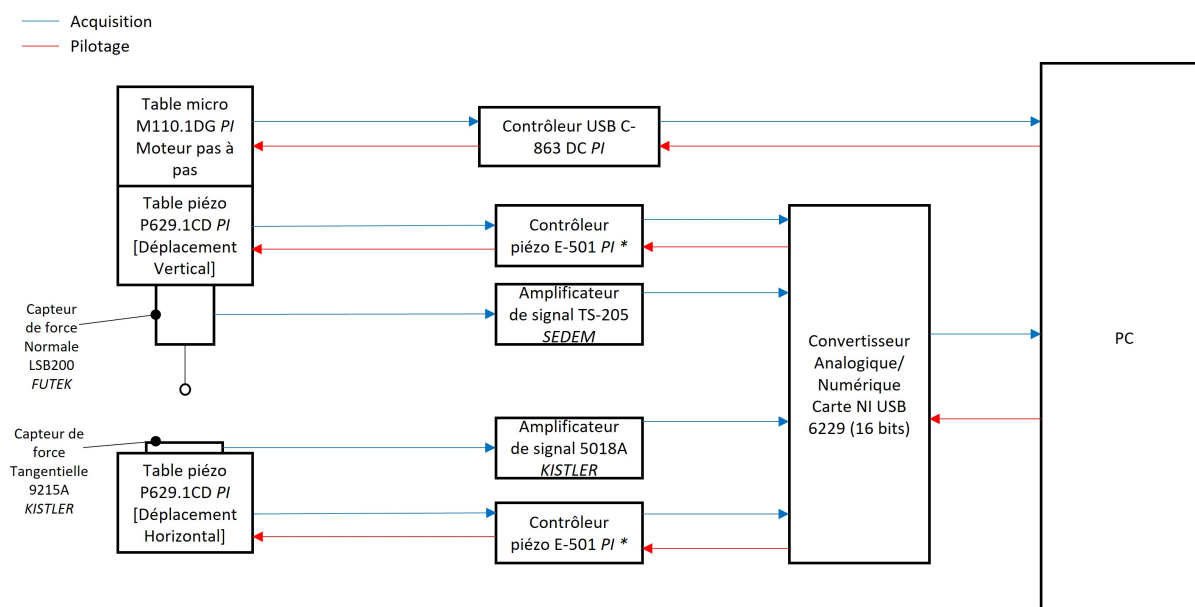


FIGURE 2.9 – Schéma illustrant la chaîne d'acquisition et de pilotage du système de mesure - L'astérisque apposé sur les blocs "Contrôleur piézo E-501 PI *" indique qu'il s'agit des mêmes composants, dupliqués dans le schéma pour des raisons de clarté

II.2 Analyse des essais d'indentation

À partir des essais effectués sur les échantillons à étudier, des programmes de traitement des données expérimentales d'indentation ont été élaborés. Ces scripts sont rédigés dans le logiciel MATLAB™ (R2021b, Licence École Centrale de Lyon) et sont basés sur les théories de Hertz et de JKR. Ces théories d'analyse des essais d'indentation sont présentées ci-dessous.

L'essai d'indentation consiste à enfoncer perpendiculairement un indenteur dans un matériau et de mesurer la variation de l'effort normal F_N [N] engendré en fonction du déplacement vertical δ [m]. Le déplacement du poinçon dans le matériau est réalisé de telle sorte que l'effort tangentiel F_t [N] est nul. Lorsqu'il atteint sa consigne d'effort ou de

déplacement, l'indenteur remonte vers sa position initiale. Les mesures de l'effort normal et du déplacement normal permettent de tracer la courbe effort-déplacement comme illustrée sur la figure 2.10. En analysant cette courbe, une caractérisation mécanique des matériaux peut être obtenue.

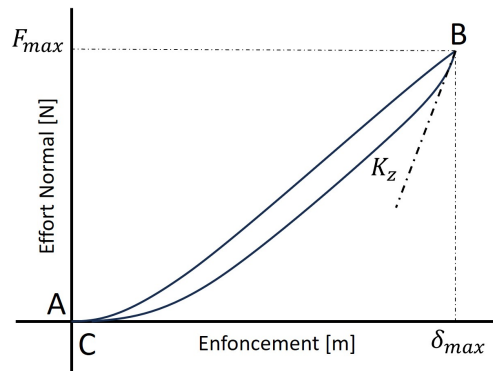


FIGURE 2.10 – Courbe d'indentation caractéristique d'un matériau visco-élastique

Sur la courbe, les éléments suivants sont distingués :

- la charge (AB) correspond à la pénétration de l'indenteur dans l'échantillon. La consigne souhaitée est atteinte au point B, où F_{max} et δ_{max} sont observés.
- la décharge (BC) constitue la seconde partie de la courbe, correspondant au retrait de l'indenteur. Cette partie revêt une grande importance, car en calculant la pente de la tangente à la décharge, nous obtenons la raideur de contact K_Z [N/m]. Cette raideur caractérise la raideur de contact entre l'indenteur et l'échantillon.

À partir du calcul de la raideur K_Z , il est possible d'analyser les caractéristiques mécaniques de l'échantillon, qu'il y ait adhésion ou non, tout dépendra du modèle sélectionné. Dans les sections suivantes, nous présentons toutes les grandeurs calculées à partir d'un essai d'indentation.

II.2.1 Théorie de Hertz : analyse élastique

Dans le cas d'un échantillon monocouche, supposé être un massif semi-infini, et d'un indenteur sphérique, infiniment rigide, il est démontré que la relation entre l'effort normal F_N et le déplacement δ est la suivante :

$$F_N = \frac{4}{3} E^* \sqrt{R} \delta^{3/2} \quad (2.2)$$

L'équation 2.2 présente une relation non linéaire entre F_N et δ , observable clairement sur la courbe d'indentation caractéristique de la figure 2.10. E^* [MPa] est le module élastique réduit, défini comme $\frac{1}{E^*} = \frac{1-\nu_1^2}{E_1} + \frac{1-\nu_2^2}{E_2}$, où E_1 [MPa], E_2 [MPa], ν_1 [] et ν_2 [] sont les modules d'Young et les coefficients de Poisson de l'indenteur (1) et de l'échantillon (2). R [m] correspond au rayon de courbure de l'indenteur. Si le module d'Young de l'indenteur peut être considéré comme étant très supérieur à celui de l'échantillon ($E_1 \gg E_2$), alors :

$\frac{1}{E^*} = \frac{1-\nu_1^2}{E_1}$. En revanche, il est possible de calculer le module élastique réduit E^* de manière expérimentale grâce à la raideur de contact K_Z , qui est elle-même calculée grâce à la courbe d'indentation expérimentale.

II.2.1.1 Raideur de contact

En se basant sur une courbe d'indentation expérimentale, il est possible de calculer la raideur de contact K_Z à partir de la courbe de décharge (BC) (voir la figure 2.10). En considérant le début de la décharge comme élastique [294], nous pouvons considérer que la décharge suit une loi de l'indenteur cylindrique plan [295] :

$$F_N = 2E^*a(\delta_{\max} - \delta_C) \quad (2.3)$$

Où a [m] correspond au rayon de contact de l'indenteur et δ_C [m] correspond à la position de l'indenteur au point C (voir figure 2.10).

Les équations de Sneddon [295, 296] permettent également d'exprimer le module réduit en fonction de la raideur de contact, donc de la courbe de décharge, en supposant toujours que l'élasticité prédomine sur cette partie de la courbe telle que :

$$E^* = \frac{K_Z}{2} \cdot \sqrt{\frac{\pi}{A_C}} \quad (2.4)$$

Où A_C [m²] correspond à l'aire de contact entre l'indenteur et l'échantillon.

L'équation 2.3 montre que E^* et δ sont linéairement proportionnels, avec a comme constante. En dérivant l'équation 2.3 par rapport à δ , nous obtenons la raideur K_Z , définie telle que :

$$K_Z = \frac{\partial F_N}{\partial \delta} \quad (2.5)$$

La raideur de contact K_Z se définit comme la tangente à la décharge au point B (figure 2.10). Avec l'équation 2.4, nous notons :

$$K_Z = 2E^*a \quad (2.6)$$

II.2.1.2 Aire de contact et rayon de contact

Pour calculer le module élastique réduit E^* selon l'équation 2.4, il est nécessaire de déterminer l'aire de contact A_C , laquelle est liée au rayon de contact a par l'expression suivante :

$$A_C = \pi a^2 \quad (2.7)$$

Le rayon de contact a d'un indenteur sphérique peut se calculer, d'après la loi de Hertz [297], à partir d'une approximation qui dépend du rayon de l'indenteur R et du déplacement maximal δ_{\max} , comme suit :

$$a = \sqrt{\delta_{\max} R} \quad (2.8)$$

Le rayon de contact peut également se calculer, d'après les équations 2.6 et 2.4, en fonction de la raideur de contact (K_Z) et de l'effort maximal (F_{max}), comme suit :

$$a = \sqrt{\frac{3F_{max} \cdot R}{2K_Z}} \quad (2.9)$$

Toutes les grandeurs géométriques sont présentées sur la figure 2.11.

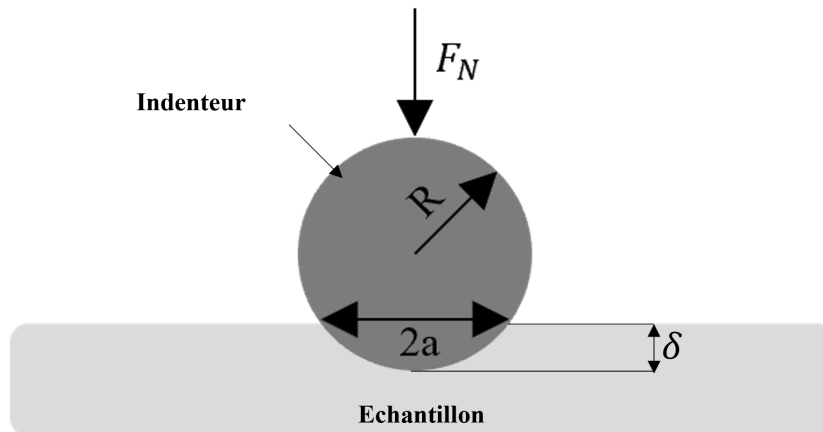


FIGURE 2.11 – Paramètres géométriques d'un essai d'indentation avec un indenteur sphérique - F_N [N] est l'effort normal engendré par l'enfoncement de l'indenteur sur l'échantillon - R [m] est le rayon de la bille - a [m] est le rayon de contact de l'indenteur sur l'échantillon engendré par l'enfoncement - δ [m] est l'enfoncement de l'indenteur dans l'échantillon

II.2.1.3 Pression de contact

La pression de contact correspond à la pression entre l'indenteur et l'échantillon considéré comme massif semi-infini. Hertz a proposé une relation permettant de modéliser le profil de pression dans la zone de contact [297, 298]. La relation entre la pression de contact p [Pa], le rayon r [m], le rayon de contact a ainsi que la force normale F_N est tel que :

$$p(r) = \frac{3 \cdot F_N}{2\pi a^2} \cdot \sqrt{1 - \left(\frac{r}{a}\right)^2} \quad (2.10)$$

La pression de contact devient maximale si $r = 0$, c'est à dire au centre du contact figure 2.14. Inversement la pression est nulle aux extrémités du contact pour $r = a$. Donc la pression maximale p_0 est :

$$p_0 = \frac{3 \cdot F_N}{2\pi a^2} \quad (2.11)$$

II.2.2 Théorie de JKR : effet de l'adhésion

L'analyse élastique selon la théorie de Hertz [297] ne prend pas en compte l'interaction adhésive entre l'indenteur et l'échantillon. Cependant, dans de nombreux cas, une adhésion se manifeste, ajoutant ainsi une force supplémentaire pour détacher les deux surfaces en contact. Ce phénomène est observé sur la courbe d'indentation expérimentale, notamment dans sa partie négative (C'C), comme illustré dans la figure 2.12. Cette adhésion est courante, notamment lorsqu'il s'agit d'échantillons biologiques, tels que la peau *in vivo* [283], ou des peaux reconstruites [296]. Entre C et D, les phénomènes restent incertains. Il y a souvent une rupture partielle du contact immédiatement après C.

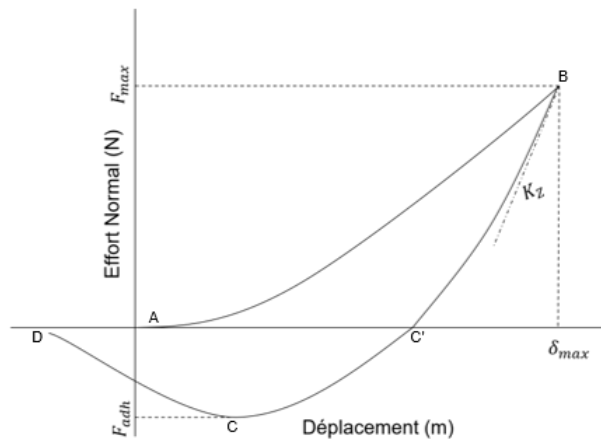


FIGURE 2.12 – Courbe d'indentation caractéristique d'un matériau visco-élastique avec adhésion

Pour se prémunir des effets d'adhésion, notamment causés par le film lipidique de la peau [299] ou par le milieu de culture cellulaire [296], il est envisageable de conduire les tests en immersion dans l'eau ou dans un milieu de culture, comme illustré dans la figure 2.13.

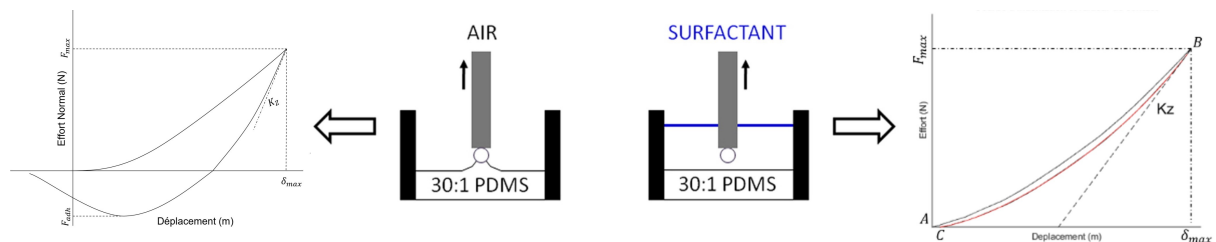


FIGURE 2.13 – Courbes d'indentation caractéristiques d'un matériau visco-élastique immergé ou dans l'air quand l'adhésion est liée à de la capillarité - D'après Khon et Ebenstein [300]

Afin de considérer l'effet de l'adhésion, la théorie de Johnson, Kendall et Roberts (JKR) [301] doit être appliquée dans le cas d'un indenteur sphérique. Cette théorie permet de corriger les effets de l'adhésion dans le calcul de grandeurs physiques telles que le rayon de contact a ou encore le module élastique réduit E^* .

II.2.2.1 Théorie de JKR

Pour estimer le rayon de contact a_{JKR} [m] entre un indenteur sphérique et massif élastique semi-infini en présence d'adhésion, la théorie de JKR propose l'approximation suivante :

$$a_{JKR} = \sqrt[3]{\frac{3R}{4E^*} \left(F_{\max} + 2F_{ad} + 2\sqrt{F_{ad}(F_{\max} + F_{ad})} \right)} \quad (2.12)$$

La grandeur F_{ad} [N] correspond à la force d'adhésion nécessaire pour séparer les deux surfaces. Elle peut être estimée expérimentalement à partir de la courbe d'indentation, comme illustré dans la figure 2.12, et elle peut également être évaluée à partir du travail d'adhésion $\Delta\gamma$.

$$F_{ad} = \frac{3}{2}\pi R\Delta\gamma \quad (2.13)$$

Enfin, le module élastique réduit dans le contexte de la théorie de JKR est déterminé en utilisant les équations de Hertz 2.4 et 2.7, ainsi que les équations de JKR 2.12 et 2.13, de manière à ce que :

$$E_{JKR}^* = \sqrt{\frac{K_Z}{6R(F_{\max} + 2F_{ad} + 2\sqrt{F_{ad}(F_{\max} + F_{ad})})}} \quad (2.14)$$

La théorie de JKR prévoit également de corriger le calcul du profil de pression en présence d'adhésion. En prenant en compte l'interaction énergétique entre les deux surfaces. Le profil de pression de contact devient :

$$p(r) = \frac{3 \cdot F_N}{2\pi a^2} \cdot \sqrt{1 - \left(\frac{r}{a}\right)^2} + \frac{F_{ad}}{2\pi a^2} \cdot \frac{1}{\sqrt{1 - \left(\frac{r}{a}\right)^2}} \quad (2.15)$$

La figure 2.14 illustre la différence de distribution de pression entre les modèles de JKR et de Hertz. Selon Wang et al. [302], la distribution selon le modèle JKR est similaire à celle de la pression de Hertz, à laquelle est soustraite la contribution de la partie adhésive. Ces travaux soulignent donc l'importance de prendre en compte l'adhésion dans le calcul de la pression.

La pression de contact maximale dans le cadre du modèle de JKR se trouve au centre du contact, avec une pression maximale p_0 égale à :

$$p_0 = \frac{3 \cdot F_N}{2\pi a^2} + \frac{F_{ad}}{2\pi a^2} \quad (2.16)$$

En supprimant la partie adhésion ($F_{ad} = 0$), nous retombons sur une pression maximale dans le domaine de Hertz, voir équation 2.11.

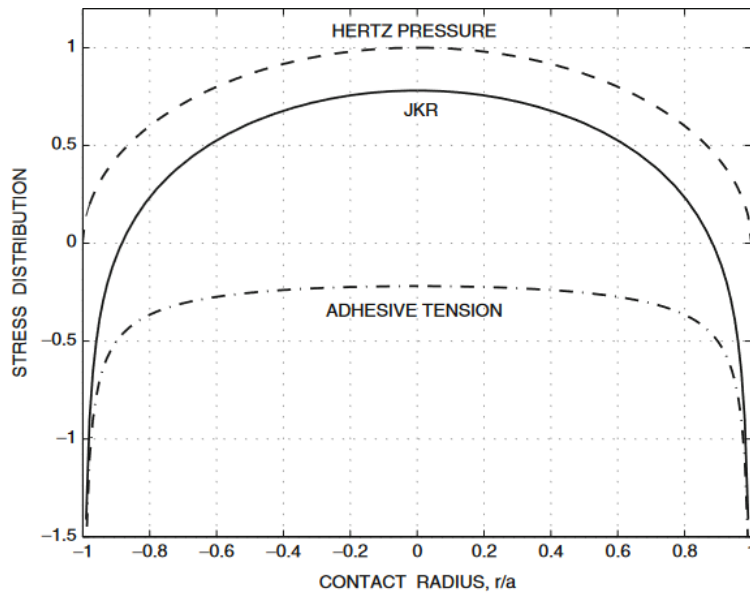


FIGURE 2.14 – Distribution de la pression de contact en fonction du modèle utilisé : JKR ou Hertz - D'après [302]

II.3 Analyse des essais tribologiques

II.3.1 Généralités

La tribologie, issu de *tribein* pour frottement et *logos* pour étude en grec, se focalise sur l'analyse des interactions entre des surfaces en contact, incluant les phénomènes de frottement, d'usure et de lubrification, ainsi que l'étude de leurs interfaces. Dans l'évaluation du comportement tribologique pendant le mouvement relatif de deux solides en contact, le coefficient de frottement est fréquemment employé. Il est défini comme le rapport entre la force de résistance au mouvement tangentiel et la force normale appliquée entre les surfaces. Cette force tangentielle représente l'effort nécessaire pour mettre en mouvement l'interface. Les premières observations sur le frottement, bien avant la proposition du terme tribologie, remontent au XV^e siècle, lorsque Léonard de Vinci étudia les forces de frottement entre des objets et une surface à différentes inclinaisons. Cependant, c'est en 1699 qu'Amontons devient le premier scientifique à formaliser les lois expérimentales concernant le frottement sec. Il a proposé trois lois de frottement :

- la force de frottement est indépendante de la surface apparente de contact si le poids reste constant
- la force de frottement est proportionnelle à la charge normale appliquée
- la force de frottement ne dépend pas de la vitesse de glissement

Plus tard, en 1795, Coulomb [303] formalisa ces lois sous forme d'équation par la relation :

$$F_T = \mu F_N \quad (2.17)$$

Où μ est le coefficient de frottement et F_N et F_T respectivement l'effort normal et tangentiel.

Coulomb a complété ces lois en introduisant la notion de frottement statique et de frottement dynamique. La force de frottement statique représente l'effort nécessaire pour mettre en mouvement un objet statique, tandis que la force de frottement dynamique est nécessaire pour maintenir un objet en mouvement.

$$F_S = \mu_d F_N \quad (2.18)$$

$$F_D = \mu_s F_N \quad (2.19)$$

Avec μ_s le coefficient de frottement statique et μ_d le coefficient de frottement dynamique.

Enfin, en 1950, Bowden et Tabor [304] ont proposé une nouvelle hypothèse basée sur la décomposition de la force de frottement en deux composantes distinctes. Selon cette théorie, la force de frottement peut être décrite comme une composante adhésive et une composante de déformation.

$$F_T = F_{int} + F_{def} \quad (2.20)$$

Dans cette équation, F_T représente la force de frottement totale, F_{int} est la composante de la force de frottement interfaciale, et F_{def} est la composante de la force de déformation. F_{int} correspond à la force nécessaire pour rompre les liaisons adhésives entre les aspérités des deux surfaces, tandis que F_{def} décrit la force nécessaire à la déformation des surfaces.

Il est possible de décrire la composante adhésive (interfaciale) comme le produit de la contrainte de cisaillement τ et de l'aire de contact réelle A entre les deux surfaces, tel que :

$$F_{int} = \tau \times A \quad (2.21)$$

La contrainte de cisaillement peut s'exprimer en fonction de la pression moyenne p dans la zone de contact. Cette relation s'applique, par exemple, lorsque des films organiques se trouvent entre les deux surfaces, comme par exemple la pellicule salivaire entre deux surfaces simulant le contact oral :

$$\tau = \tau_0 + \alpha \cdot p \quad (2.22)$$

τ_0 représente une constante correspondant à la contrainte de cisaillement minimale requise pour séparer les deux surfaces sous contrainte nulle [305], et α est le coefficient de pression.

Par conséquent, la force de frottement interfaciale peut être décomposée en deux termes de force : une force adhésive F_{adh} et une force de cisaillement interfacial F_{cis} , telles que :

$$\begin{cases} F_{adh} = \tau_0 \cdot A \\ F_{cis} = \alpha \cdot p \cdot A \end{cases}$$

Enfin, l'énergie dissipée due à la déformation des matériaux correspond à la composante de déformation F_{def} de la force de frottement. Tabor et Greenwood [306] décrivent cette force de frottement due à la déformation comme suit :

$$F_{def} = \beta \left(\frac{9}{128R} \right)^{2/3} \left(\frac{1 - \nu^2}{E} \right)^{1/3} F^{4/3} \quad (2.23)$$

L'équation 2.23 inclut plusieurs grandeurs : β la fraction dissipative définie comme $\beta = \tan \delta$, E le module d'Young, et ν le coefficient de Poisson.

Bowden et Tabor [304] ont également inclus le concept d'aire réelle dans leur analyse. Cela signifie que l'aire de contact apparente est subdivisée en plusieurs microcontacts, qui sont conditionnés par la rugosité des surfaces solides en contact. Par conséquent, l'aire de contact réelle (qui est la somme des microcontacts) est généralement inférieure à l'aire apparente. Ainsi, ils ont avancé l'hypothèse selon laquelle la rugosité de la surface affecte le frottement en raison de son impact sur l'aire de contact réelle.

Ce qui précède suggère que la force de frottement totale est la somme de divers phénomènes : de déformation, d'adhésion et de cisaillement entre les surfaces. En réalité, ces phénomènes semblent être interconnectés [307].

Dans les travaux de thèse présentés dans ce manuscrit, les efforts impliqués sont très faibles. Par conséquent, il est approprié de considérer la composante adhésive comme prédominante et d'ignorer la composante de déformation. Cependant du point de vue expérimental, c'est la force de frottement totale qui est généralement mesurée. Nous observons l'évolution des forces de frottement totales en tant que phénomène global, sans prendre en considération chaque composante individuellement.

II.3.2 Mesure du coefficient de frottement

À partir de l'acquisition des forces normale et de friction, ainsi que des déplacements normaux et tangentiels, comme illustré dans la figure 2.15, nous avons élaboré des programmes d'analyse. Ces programmes permettent de convertir les données expérimentales en deux grandeurs mécaniques qui dépendent de la force de friction mesurée. Ces grandeurs, le coefficient de frottement et l'énergie dissipée par frottement, peuvent servir d'indicateurs de l'état de lubrification de nos échantillons. Notre principal intérêt réside dans l'évolution de la force de friction. Ces forces de friction reflètent l'effort nécessaire pour mettre en mouvement les deux surfaces l'une par rapport à l'autre. Ces programmes sont développés via MATLAB™ (R2021b, Licence École Centrale de Lyon). Dans cette section, nous présentons la théorie utilisée dans les programmes d'analyse pour traiter les données expérimentales brutes obtenues après les essais tribologiques.

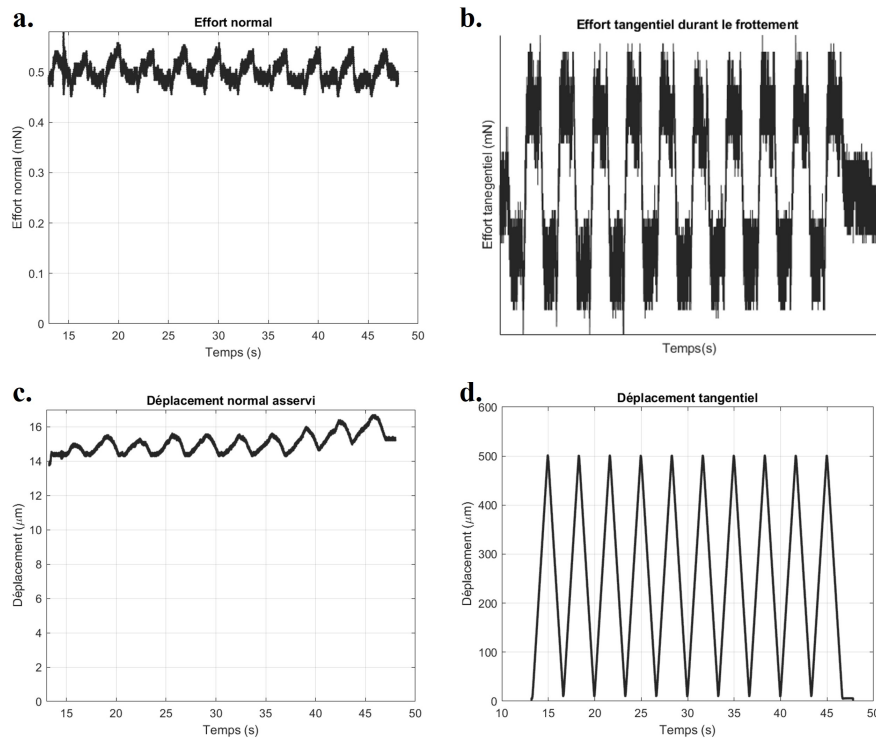


FIGURE 2.15 – Exemple des courbes expérimentales mesurées et utilisées dans l'analyse des essais tribologiques - a. Effort normal b. Effort tangentiel c. Déplacement normal d. Déplacement tangentiel

Le coefficient de frottement peut être défini comme le rapport entre la force de frottement totale et la force normale (voir équation 2.17). La figure 2.16.b présente un schéma illustrant la courbe des forces tangentielles mesurées lors d'un essai de frottement effectué avec notre dispositif. Les zones colorées en bas (grises) et en haut (rouges) représentent respectivement les zones de glissement pour l'aller et le retour de la bille. Ce sont ces régions que nous utilisons pour calculer la force tangentielle moyenne. Les zones de transition ne sont pas prises en compte car elles correspondent à la transition entre le frottement statique et dynamique. L'effort tangentiel moyen est calculé pour chaque cycle, où un cycle correspond à un aller-retour de l'indenteur sur l'échantillon, figure 2.16.a. $F_{T\text{moyen}}$ représente l'effort tangentiel pour un cycle, et la relation utilisée est la suivante :

$$F_{T\text{moyen}_i} = \frac{F_{T\text{moyenAller}} + |F_{T\text{moyenRetour}}|}{2} \quad (2.24)$$

Ici, i représente le nombre de cycle. $F_{T\text{moyenAller}}$ correspond à l'effort tangentiel moyen lors de l'aller (zone grise), et $F_{T\text{moyenRetour}}$ correspond à l'effort tangentiel moyen lors du retour (zone rouge) (voir figure 2.16.b) .

Enfin, de manière très conventionnelle, le coefficient de frottement μ de chaque cycle est calculé comme suit :

$$\mu = \frac{F_{T\text{moyen}}}{F_{N\text{moyen}}} \quad (2.25)$$

Ainsi, à partir d'un essai de frottement nous obtenons un coefficient de frottement cycle par cycle qui caractérise l'état de lubrification entre l'indenteur et l'échantillon.

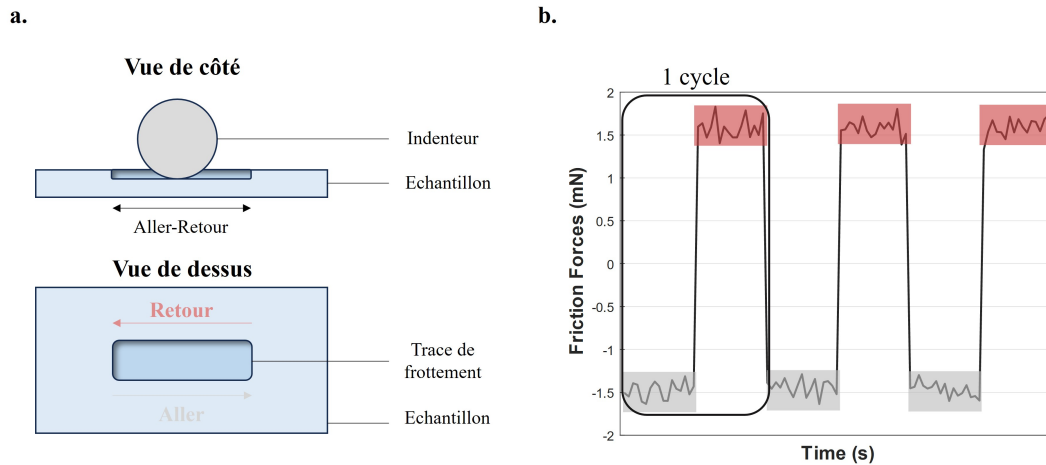


FIGURE 2.16 – Représentation schématique (a) d'un essai tribologique (b) des forces de frottement mesurées avec le tribomètre pendant l'essai - Les zones de glissement, représentées par les régions grises et rouge, sont utilisées pour calculer le coefficient de frottement

II.3.3 Mesure et calcul de l'énergie dissipée par frottement

Un autre paramètre qui caractérise les phénomènes tribologiques est l'énergie dissipée par frottement. Cette grandeur permet d'estimer l'usure causée par le frottement sur une base physique. Nous nous trouvons dans un régime de glissement total, sans zone collée entre les deux surfaces. Ainsi, l'usure due à la friction entraîne uniquement un enlèvement de matière et caractérise la dégradation causée par le frottement.

Pour calculer cette énergie dissipée, nous calculons l'aire à l'intérieur d'un cycle, comme illustré sur la figure 2.17, de la manière suivante :

$$E_d = \int_{-\delta}^{\delta} F_T(\delta) d\delta \quad (2.26)$$

Ainsi, plus l'hystérésis est importante, plus l'usure, la perte de matière et l'énergie dissipée par frottement sont significatives, caractérisant ainsi les dommages causés par le frottement entre les surfaces sur une base physique et quantitative.

L'énergie dissipée cumulée au cours de l'essai se calcule simplement comme la somme des énergies dissipées cycle par cycle :

$$E_{d_{tot}} = \sum_{i=1}^N E_d(i) \quad (2.27)$$

Cette grandeur devient donc un paramètre supplémentaire pour caractériser l'état de lubrification de nos échantillons.

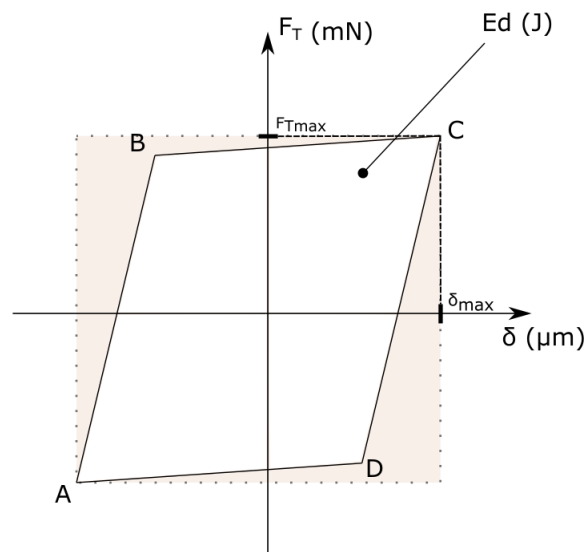


FIGURE 2.17 – Cycle de fretting en glissement totale avec l'énergie dissipée par frottement E_d

II.4 Démarches des analyses statistiques

Les données expérimentales sont analysées statistiquement en suivant un test de normalité puis un test de significativité des différences entre les échantillons de données. Ces analyses sont réalisées à l'aide de XLSTAT (version 2019.4.2, *Addinsoft, France*), une extension du logiciel Excel et MatlabTM (R2021b, Licence École Centrale de Lyon).

II.4.1 Test de normalité

Le test de normalité permet de vérifier l'adéquation de la distribution de nos données avec la loi normale. Dans cette étude, le test de Shapiro-Wilk a été employé à cet effet. Ce test est largement reconnu et couramment utilisé pour l'analyse statistique des mesures expérimentales présentant de fortes variations.

II.4.2 Test de significativité

Le test de significativité entre les échantillons permet d'évaluer et de comparer les moyennes de deux ou plusieurs échantillons. Pour une distribution normale, des tests paramétriques sont employés. En revanche, pour une distribution non normale, ce sont les tests non paramétriques qui sont utilisés. Avant les tests de significativités, un test de Kruskal-Wallis est effectué pour obtenir une première indication de la similarité globale entre les groupes de données supérieurs à deux.

II.4.2.1 Tests paramétriques

Dans notre étude le test paramétrique utilisé est le t-test de Student. Il permet d'évaluer s'il existe une différence statistiquement significative entre 2 groupes. Ce test exige cependant quelques conditions pour être utilisé :

- Les mesures sont indépendantes

- Les échantillons ont des variances égales
- Au moins 20 individus par échantillon, ou normalité des populations de chaque échantillon supposée ou vérifiée.

II.4.2.2 Tests non paramétriques

Les tests non paramétriques n'exigent pas de condition de distribution des données. Dans notre étude, les tests non paramétriques sont appliqués aux distributions non normales. Le test non paramétrique de Mann-Whitney est employé pour comparer deux échantillons. De plus, afin de minimiser les erreurs causées par la répétition des tests, une correction de Bonferroni est appliquée.

Pour ces deux types de tests, nous formulons deux hypothèses : H_0 et H_1 . L'hypothèse H_0 postule que la moyenne de la variable est identique quel que soit le groupe. À l'inverse, l'hypothèse H_1 suppose que la moyenne de la variable dépendante diffère entre les groupes. Pour décider de l'acceptation ou du rejet de l'hypothèse nulle (H_0), la p -value (p) est comparée au niveau de signification α choisi. Si p est inférieure à α , H_0 est rejetée, indiquant que les deux groupes sont statistiquement différents. Ces tests sont réalisés avec un niveau de signification de 5%. Ainsi le code de signification est le suivant $p = 0 < *** < 0,001 < ** < 0,01 < * < 0,05 < \circ < 0,1 < . < 1$, c'est-à-dire que plus p est faible plus la différence est significative.

II.4.3 Analyse en composantes principales

Dans cette étude, nous avons réalisé une Analyse en Composantes Principales (ACP) sur nos spectres Raman. Cette méthode vise à regrouper l'information en composantes principales afin de réduire la dimensionnalité des spectres vers une base en 2 ou 3 dimensions. Les composantes principales sont des combinaisons linéaires des variables initiales extraites des spectres, synthétisant l'information essentielle. Chaque point dans l'espace des composantes principales correspond à un spectre individuel. L'ACP permet également de visualiser les relations entre les variables sous forme d'ellipses : si plusieurs points se trouvent à l'intérieur d'une même ellipse, ils sont statistiquement similaires du point de vue de leurs caractéristiques spectrales. Cette méthode est expliquée plus en détail dans la section III.3.3.2 appliquée à nos spectres Raman.

II.5 Validation du dispositif

Dans cette section, nous présentons la validation du dispositif développé dans le cadre de cette thèse. Cette validation concerne les deux types d'essai précédemment décrits. Un traitement statistique des données nous a permis de discriminer les résultats obtenus et ainsi de valider le dispositif sur les tests mécaniques. Tout d'abord, nous avons effectué un test de Shapiro-Wilk pour déterminer si la distribution suivait une loi normale. Pour comparer les groupes, nous avons réalisé un test t de Student ou un test de Mann-Whitney dans le cas où la distribution ne suit pas une loi normale. Ces tests nous donnent, avec un risque de $\alpha \leq 5\%$, la valeur p qui nous indique le niveau de confiance accordé aux résultats.

II.5.1 Validation des essais d'indentation

Les résultats de validation présentés ici ont été obtenus sur cinq silicones différents (S1, S2, S3, S4 et S5).

II.5.1.1 Conditions des tests

Les essais ont été effectués dans une pièce maintenue à température et humidité contrôlées (22-24 °C et 30-40 %). Chaque test a été répété quinze fois pour chacun des cinq échantillons. En ce qui concerne les paramètres des essais, une charge normale de 5 *mN* a été appliquée à une vitesse de 25 $\mu\text{m/s}$.

II.5.1.2 Essais d'indentation

Les résultats présentés sur la figure 2.18 et dans le tableau 2.2 montrent que ces tests permettent de discriminer les cinq silicones en fonction de leur rigidité, avec des différences toutes statistiquement significatives ($p < 0.05$). L'utilisation du biotribomètre a confirmé cette capacité de distinction, validant ainsi l'efficacité du dispositif. Ces silicones, fournis avec une rigidité décroissante de S1 à S5, ont été correctement différenciés selon les attentes.

TABLEAU 2.2 – Module élastique réduit E^* pour les deux types de peau testés

Échantillons	Module élastique réduit E^* (kPa)
S1	693.5 ± 36.6
S2	219.0 ± 13.8
S3	31.1 ± 1.6
S4	8.9 ± 1.1
S5	2.1 ± 0.4

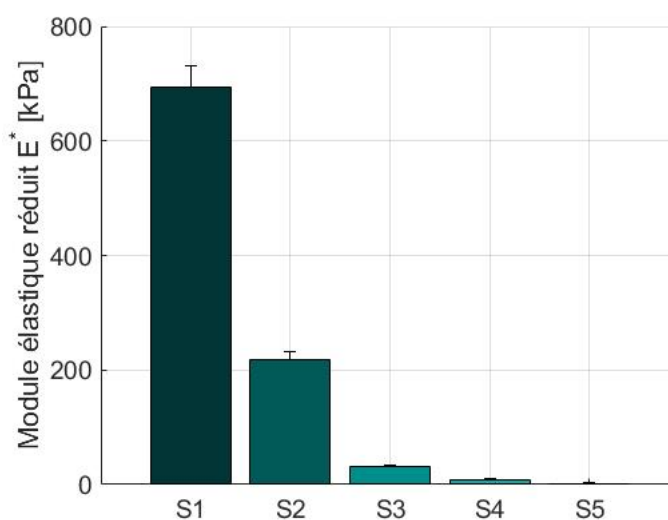


FIGURE 2.18 – Modules élastiques réduits pour les 5 silicones testés

II.5.2 Validation des essais tribologiques

Afin de confirmer la validité de notre dispositif pour des essais tribologiques, nous avons effectué des tests de frottement dans deux conditions opposées : l'une à sec et l'autre lubrifiée avec de la salive artificielle (Salive Artificielle Humaine BZ323, Biochemazone), entre une bille en acier et un silicone. L'objectif était d'évaluer la capacité du biotribomètre à discerner deux conditions de lubrification distinctes.

II.5.2.1 Conditions de l'essai

Les essais ont été réalisés dans les mêmes conditions de température et d'humidité que précédemment pour les essais d'indentation (22-24 °C et 30-40 %). Comme le montre la figure 2.16 le contact était une bille sur plan avec un mouvement linéaire alterné de 30 cycles. Chaque essai a été répété 10 fois pour chaque condition. En ce qui concerne les paramètres d'essai, une consigne d'enfoncement de 250 μm a été appliquée au dispositif avec une vitesse de 10 $\mu\text{m}/\text{s}$. La vitesse de frottement était de 1500 $\mu\text{m}/\text{s}$ et la longueur de frottement égale à 250 $\mu\text{m}/\text{s}$.

II.5.2.2 Essais tribologiques

Les résultats des essais, présentés dans la figure 2.19, démontrent que deux conditions de lubrification différentes entraînent deux réponses distinctes de notre dispositif. Ces réponses sont cohérentes, car la salive artificielle lubrifie le contact, entraînant ainsi une diminution significative du coefficient de frottement. Ainsi, cela confirme la validité de la partie frottement de notre dispositif, nous assurant que le biotribomètre est capable de discriminer différents états de lubrification, ce qui va être l'objectif principal de cette thèse.

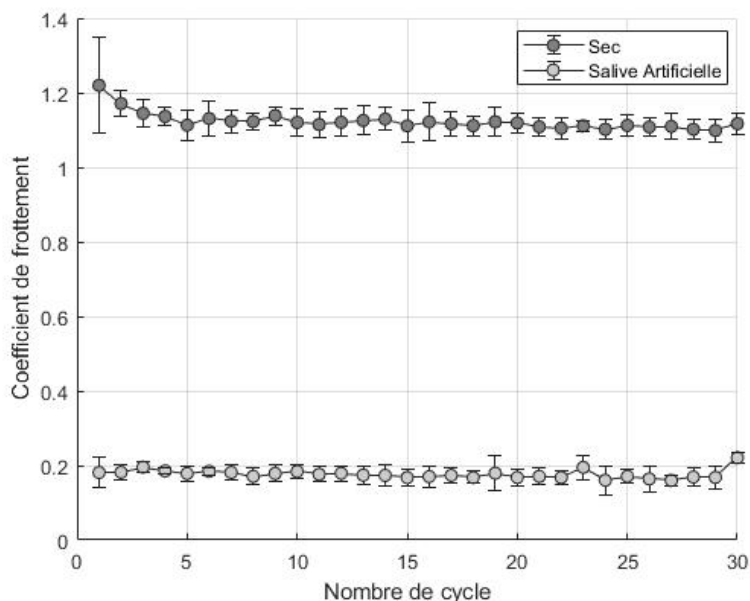


FIGURE 2.19 – Évolution du coefficient de frottement en fonction du temps pour les deux conditions de lubrification - Sec sans lubrifiant et avec une salive artificielle

II.5.2.3 Validation du régulateur PID

Tel que mentionné précédemment, le système est asservi par un régulateur PID permettant de maintenir la consigne d'entrée constante. Pour confirmer la validité de ce régulateur PID, trois essais tests ont été réalisés afin d'observer si le régulateur était correctement dimensionné. Chaque essai a été répété 3 fois. Nous avons suivi l'évolution de l'effort normal durant les cycles de frottement afin d'observer si la consigne est restée constante ou a varié.

- 1^{ère} condition : la consigne d'entrée est un effort normal $F_n = 0,5 \text{ mN}$ à maintenir durant 10 cycles de frottement à une vitesse de $300 \mu\text{m/s}$. Le contact consiste en une bille en silicone en contact avec un tapis cellulaire déposé sur une lame de verre.
- 2^{ème} condition : la consigne d'entrée est un effort normal $F_n = 2 \text{ mN}$ à maintenir durant 50 cycles de frottement à une vitesse de $300 \mu\text{m/s}$ avec comme contact une bille en acier de 0.5 mm de diamètre et un hydrogel.
- 3^{ème} condition : la force normale imposée est de $F_n = 1 \text{ mN}$ durant 1000 cycles à une vitesse de $1500 \mu\text{m/s}$. Les matériaux en contact sont les mêmes que pour la condition 2, une bille en acier sur un hydrogel.

La figure 2.20 présente l'évolution de l'effort normal lors des trois essais tribologiques, correspondant aux trois conditions distinctes. L'effort normal est la consigne d'entrée de notre régulateur, et notre objectif est de le maintenir constant. Nous observons que l'effort normal oscille autour de sa consigne, même lors de faibles sollicitations. Pour la troisième consigne, malgré le grand nombre de cycles, l'effort reste constant. Cette validation nous assure que la consigne d'entrée sera respectée tout au long des essais tribologiques pour les différentes études de ces travaux de thèse. C'est à dire que les paramètres PID du dispositif sont adaptés.

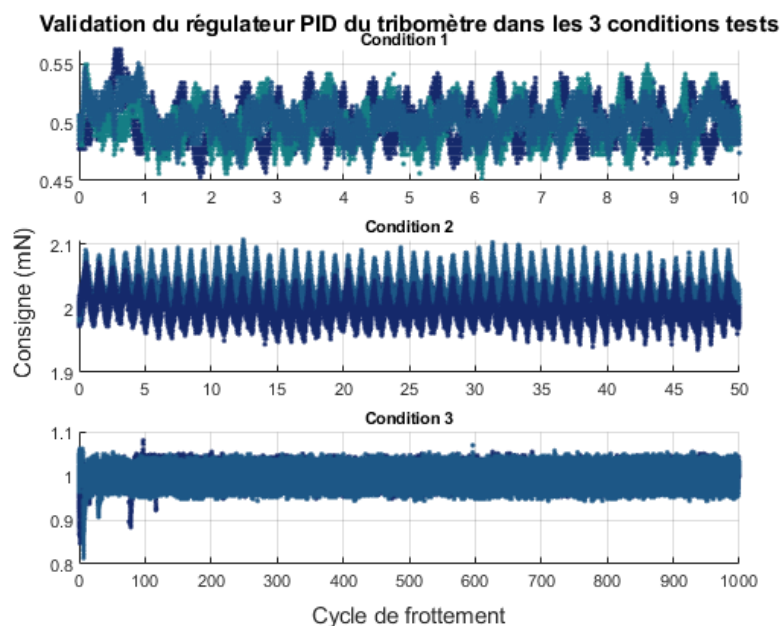


FIGURE 2.20 – Évolutions de la consigne F_N durant les essais tribologiques pour les 3 conditions tests

III Méthodes de caractérisation des surfaces des modèles d'épithélium oral : Endommagement, Topographie et Chimie de surface

Cette section expose les méthodes utilisées dans cette thèse pour caractériser les paramètres de surface des modèles d'épithélium oral. Comme mentionné précédemment dans ce manuscrit, les objectifs de cette thèse portent sur l'étude *in vitro* de la lubrification de la muqueuse orale.

Les caractérisations des propriétés de surface nous fournissent des critères précieux pour comprendre les phénomènes de lubrification. Par exemple, l'analyse de l'endommagement est un indicateur très intéressant pour évaluer la qualité de la lubrification. En effet, plus la lubrification est efficace, moins les dommages sont importants. Ainsi, le suivi des dégâts est un critère important, non seulement pour étudier le rôle de MUC1 dans la lubrification, mais également pour examiner les effets des composés astringents sur ce processus.

De plus, l'exploration de la topographie de surface, en particulier l'analyse topographique multi-échelles, nous fournit des indicateurs spécifiques. Comme cela a été souligné dans le chapitre 1 sur l'état de l'art, la présence de composés astringents entraîne la formation d'agrégats qui perturbent la pellicule mucoale et entraînent une perte de lubrification. L'analyse topographique constitue un excellent indicateur de la présence de ces agrégats. L'intérêt réside dans l'établissement de corrélations entre l'augmentation des forces de friction et l'augmentation des critères de rugosité à la surface des modèles d'épithélium. Cela nous permet de caractériser le rôle des agrégats dans la perte de lubrification.

Enfin, pour justifier ces changements de lubrification, nous supposons qu'il existe des différences de structure protéique, comme expliqué dans le chapitre 1. De manière générale, nous pensons que l'évolution de la lubrification est causée par l'ancrage de molécules ou de protéines à la surface des épithéliums. Cela entraîne soit une meilleure lubrification (dans le cas d'un ancrage amélioré de protéines salivaires), soit une perte de lubrification (ancrage des tanins à la surface). Ces modifications induisent, selon nous, des changements dans la chimie de surface des épithéliums qui peuvent être suivies par des analyses par spectroscopie Raman. Ces analyses fournissent, après traitement, des confirmations des différences chimiques à la surface de nos modèles, expliquant ainsi les variations de lubrification.

Cette section présente donc les outils utilisés dans cette thèse pour caractériser les paramètres de surface de nos modèles de muqueuse orale, afin de répondre à nos problématiques.

III.1 Visualisation et quantification de l'endommagement *post mortem* des modèles d'épithélium

III.1.1 L'interférométrie

L'interférométrie est une technique optique exploitant les interférences entre deux faisceaux lumineux issus d'une même source. Ces deux faisceaux sont séparés par un

diviseur optique. L'un sert de signal de référence projeté sur un miroir de référence, tandis que l'autre est un signal de mesure projeté sur l'échantillon à étudier. Les signaux réfléchis par le miroir et l'échantillon sont ensuite recombinaés et projetés sur un écran (détecteur), figure 2.21. Pendant la mesure, la position z de l'objectif varie par petits pas, altérant ainsi le chemin parcouru par chaque signal. Lorsque les chemins optiques du miroir de référence et de l'échantillon coïncident, une interférence constructive se produit, induisant une intensité maximale des pixels. En revanche, si les chemins sont différents, les signaux détectés par l'écran présentent un déphasage, ce qui diminue l'intensité des pixels. Ces mesures permettent, après reconstruction, d'obtenir une topographie de surface précise. L'interféromètre employé dans ce travail est un ContourGT-1 de Bruker, fonctionnant selon la technique Mirau.

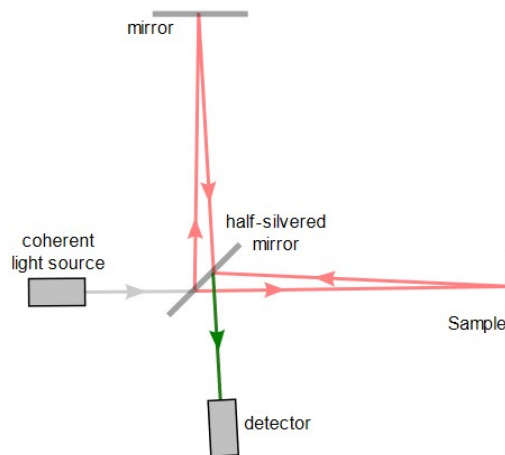


FIGURE 2.21 – Principe de fonctionnement de l'interférométrie - Illustration adaptée de [308]

III.1.2 Analyse de l'endommagement

Pour évaluer la surface endommagée après un essai de frottement, nous analysons la trace laissée par l'indenteur sur l'échantillon. Pendant le frottement, la surface subit une déformation et une perte de matière, et c'est cette perte de matière que nous cherchons à quantifier. Cette mesure de surface constitue un indicateur pertinent de l'état de lubrification de nos modèles de muqueuse orale. En effet, une meilleure lubrification se traduit par une réduction de la surface endommagée.

Les images topographiques ont été réalisées à l'aide d'un interféromètre optique à lumière blanche (ContourGT-1 de Bruker), comme mentionné précédemment.

III.1.2.1 Préparation des échantillons et mesure de la surface des modèles

La première étape pour analyser les dommages *post mortem* sur les modèles d'épithélium consiste à obtenir des images de leurs surfaces. Juste après le test de friction, les modèles d'épithélium oral ont été fixés à l'aide d'une solution à 4% de paraformaldéhyde (PFA, Thermo Fisher Scientific, USA) dans du Tampon phosphate salin (PBS) (Thermo Fisher Scientific, USA), puis déshydratés dans quatre bains successifs d'éthanol (70%, 80%, 90%, 100%). Une fois complètement secs, une image de la trace de friction a été capturée par interférométrie optique, comme illustré sur la figure 2.22.a.

L'objectif 5x avec un zoom oculaire de 1x ou 0.55x a été employé, en émettant un faisceau de lumière blanche et en activant le mode VSI (Vertical Scanning Interferometry). Ces réglages permettent d'acquérir des images de dimensions $950 \times 700 \mu\text{m}^2$ avec l'oculaire 1x, et de $1700 \times 1299 \mu\text{m}^2$ avec l'oculaire 0.55x et pour certaines des images de $1000 \times 1000 \mu\text{m}^2$. Ces paramètres ont été utilisés à la fois pour l'étude avec le substrat en lame de verre et également pour l'étude du substrat en hydrogel afin de visualiser toute la zone endommagée.

III.1.2.2 Traitement et binarisation des images

Pour quantifier les dommages, nous avons utilisé le logiciel de traitement d'images open-source ImageJ. Les images ont d'abord été filtrées par un filtre passe-bas, puis soumises à un seuillage pour réduire les effets du bruit, des artefacts d'image et des variations de forme, comme illustré dans la figure 2.22.b. Enfin, les images ont été binarisées (0 : noir et 255 : blanc) en appliquant un autre seuil, comme illustré dans la figure 2.22.c. La superficie des pixels noirs sur l'image a été mesurée, ils correspondent à la zone endommagée, comme illustré sur la figure 2.22.d. Cette région représente la zone de dommages utilisée dans cette étude comme indicateur mécanique de l'état de lubrification.

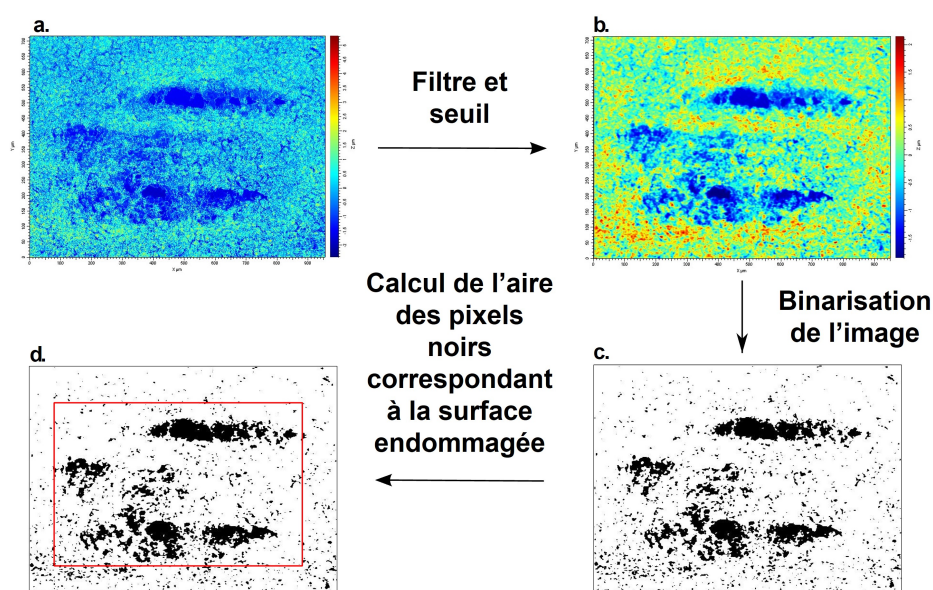


FIGURE 2.22 – (a) Image brute représentant une trace de friction obtenue sur un modèle d'épithélium oral (isoforme MUC1/Y-LSP) à l'aide de l'interférométrie optique - (b) Cette même image, une fois filtrée et soumise à un seuillage - (c) Image de la trace de friction après avoir été convertie en une image binaire noir et blanc avec un processus de binarisation et de seuillage - (d) Calcul de la superficie des pixels noirs sur cette image, qui correspondent aux zones dégradées - Issu de notre travail publié [309]

III.2 Topographie multi-échelles des modèles d'épithélium

L'utilisation de la décomposition en ondelettes continues de nos images de surface d'épithélium nous a permis d'obtenir une analyse topographique multi-échelles, introduisant de nouveaux paramètres d'analyse : le spectre de rugosité (SMA) et le spectre de normale à la surface (NAD).

Le principe de l'analyse en ondelettes repose sur l'utilisation de fenêtres d'analyse de tailles différentes. Ces tailles variables permettent d'effectuer une étude multi-résolutions de la surface des modèles d'épithélium, ce qui permet de quantifier localement les composantes fréquentielles de l'image topographique de surface [310, 311]. Pour des résolutions grossières, nous utilisons des ondelettes larges avec des coefficients faibles. Pour des résolutions plus précises, nous utilisons un grand nombre de petites ondelettes qui permettent d'analyser les données de manière plus fine. Cette analyse est similaire à l'utilisation d'un microscope optique : les ondelettes jouent le rôle des objectifs, et l'utilisation d'objectifs de plus en plus gros permet d'analyser les échantillons de manière de plus en plus fine [311].

III.2.1 Préparation des échantillons pour la décomposition en ondelettes

Afin de mettre en place une décomposition en ondelettes, il est nécessaire de préparer les échantillons. De la même manière que pour l'étude de l'endommagement, les modèles d'épithélium sont fixés avec une solution à 4 % de PFA (Thermo Fisher Scientific, USA) dans du PBS (Thermo Fisher Scientific, USA). Ensuite, les modèles sont déshydratés par bains successifs d'éthanol (70 %, 80 %, 90 %, 100 %). Les images par interférométrie sont réalisées sur les modèles fixés et déshydratés. Les paramètres de l'interféromètre sont légèrement différents de ceux de l'analyse d'endommagement. L'objectif utilisé est un x50 avec un oculaire 1x. Les images acquises ont des dimensions de $70 \times 90,2 \mu m^2$.

III.2.2 Décomposition en ondelettes : Méthodologie

Transformée en ondelette : La transformée en ondelettes d'une surface topographique $f(x, y)$ est définie par :

$$W_{\psi}^f(a, b) = \frac{1}{\sqrt{a_x a_y}} \int_{-\infty}^{+\infty} \int_{-\infty}^{+\infty} f(x, y) \psi^* \left(\frac{x - b_x}{a_x}, \frac{y - b_y}{a_y} \right) dx dy \quad (2.28)$$

les paramètres a_x et a_y contrôlent la contraction ou la dilatation dans les directions x et y , tandis que b_x et b_y régissent la translation dans les mêmes directions respectives. La relation 2.28 permet de réécrire la transformée en ondelettes 2D $W_{\psi}^f(a, b)$ sous forme d'un produit de convolution de la surface étudiée $f(x, y)$ avec la conjuguée de l'ondelette $\psi_{a,b}^*(x, y)$, de sorte que :

$$W_{\psi}^f(a, b) = f(x, y) \otimes \psi_{a,b}^*(x, y) \quad (2.29)$$

$W_{\psi}^f(a, b)$ n'a pas de signification physique directe, il correspond plutôt à un coefficient

de corrélation entre la surface $f(x, y)$ et les ondelettes 2D $\psi_{a,b}^*(x, y)$. Plus la similitude entre ces deux grandeurs est importante, plus le coefficient est élevé.

Les ondelettes 2D $W_{\psi}^f(a, b)$ sont engendrées par des translations et des dilatations à partir d'une fonction mère $\psi(x, y)$, appelée l'ondelette mère (voir figure 2.23), définie comme suit :

$$\psi_{a,b}(x, y) = \frac{1}{\sqrt{a_x a_y}} \psi\left(\frac{x - b_x}{a_x}, \frac{y - b_y}{a_y}\right) \quad (2.30)$$

où a_i et b_i sont les paramètres respectifs de dilatation et de translation.

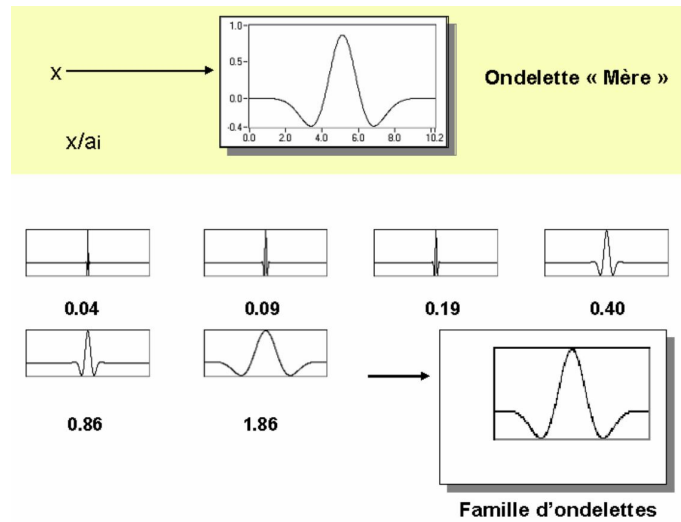


FIGURE 2.23 – Formation d'une famille d'ondelettes à partir de l'ondelette mère - Illustration tirée de [311]

Transformée de Fourier dans le domaine fréquentiel : Pour réaliser une analyse spectrale multi-échelles de la topographie des surfaces, il est intéressant d'effectuer une transformation dans le domaine fréquentiel à l'aide d'une transformée de Fourier afin d'accélérer le temps de calcul. La transformée de Fourier de l'ondelette $\psi(a_x u, a_y v)$ est ainsi définie comme suit :

$$\psi_{a,b}(a_x u, a_y v) = TF \left[\frac{1}{\sqrt{a_x a_y}} \psi\left(\frac{x - b_x}{a_x}, \frac{y - b_y}{a_y}\right) \right] = \sqrt{a_x a_y} e^{-ib_x(u+v)} \psi(a_x u, a_y v) \quad (2.31)$$

avec u et v variables dans le domaine fréquentiel.

L'expression 2.31 montre que les ondelettes 2D $\psi(x, y)$ dépendent des paramètres de contraction a_i . Les spectres des ondelettes obtenus par la transformée de Fourier sont centrés aux fréquences (u_0, v_0) avec $u_0 = a_x^{-1}$ et $v_0 = a_y^{-1}$. La largeur de bande du spectre est inversement proportionnelle aux paramètres de contraction des ondelettes. Les basses fréquences correspondent à une bande passante étroite, tandis que les hautes fréquences présentent une bande passante plus large. Enfin, de manière générale, les paramètres de dilatation a_i restent les mêmes, et le coefficient de normalisa-

tion $\sqrt{a_x a_y}$ maintient l'énergie constante indépendamment des paramètres a_x et a_y . Ainsi, la transformée 2D se développe dans le domaine des fréquences spatiales comme suit :

$$W_{\psi}^f(a, b) = \frac{1}{\sqrt{a_x a_y}} \int_{-\infty}^{+\infty} \int_{-\infty}^{+\infty} f(x, y) \psi_{a,b}^*(x, y) dx dy \quad (2.32)$$

$$W_{\psi}^f(a, b) = \int_{-\infty}^{+\infty} \int_{-\infty}^{+\infty} F(u, v) \psi_{a,b}^*(au, av) e^{-i2\pi b(u+v)} du dv \quad (2.33)$$

Avec $F(u, v)$ désignant la transformée de Fourier de $f(x, y)$. $\psi_{a,b}^*(au, av)$ la transformée de Fourier de $\psi_{a,b}^*(x, y)$, et $a_x = a_y = a$ ainsi que $b_x = b_y = b$.

Ondelette chapeau mexicain : Dans le cadre de cette thèse, nous avons utilisé une ondelette standard déjà employée dans d'autres études portant sur la topographie multi-échelles des tissus biologiques [305, 312] : l'ondelette "chapeau mexicain" dans sa version isotrope, illustrée dans la figure 2.24.

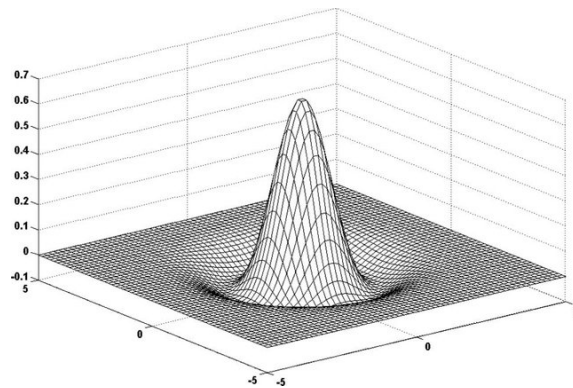


FIGURE 2.24 – Représentation de l'ondelette chapeau mexicain en 3D, utilisée dans le cadre de notre travail pour caractériser la topographie de surface des épithéliums [313]

Son expression mathématique est la suivante :

$$\psi(x, y) = (2 - r) e^{-\frac{r}{2}} \quad (2.34)$$

Avec $r = x^2 + y^2$

Cette ondelette est radiale et symétrique et possède de bonnes propriétés de localisation dans le domaine spatial et fréquentiel. L'expression de ces ondelettes en fonction de leur dilatation a et leur translation b est donnée, à partir de 2.34, telle que :

$$\psi_{a,b}(x, y) = \left(2 - \left(\frac{x-b}{a} \right)^2 \right) - \left(\frac{y-b}{a} \right)^2 \exp \left(- \left(\left(\frac{x-b}{a} \right)^2 + \left(\frac{y-b}{a} \right)^2 \right) / 2 \right) \quad (2.35)$$

Cube de reconstruction : À partir de la transformée de Fourier inverse, une décomposition de la surface est obtenue. Cette décomposition forme un cube de reconstruction où chaque "couche du cube" correspond à une échelle d'analyse, figure 2.25. Chaque nouvelle surface de décomposition se définit comme :

$$f_a(x, y) = FFT^{-1} [W_a(u, v) \times \tilde{\psi}(au, av)] \quad (2.36)$$

$f_a(x, y)$ représente la surface de décomposition pour une échelle d'analyse fixée : a . $\tilde{\psi}(au, av)$ correspond à la transformée de Fourier de l'ondelette. L'empilement de chaque surface $f_a(x, y)$ sur toute l'échelle d'analyse forme le cube de reconstruction, figure 2.25. Sur ce cube, les deux axes x et y représentent les coordonnées de la surface et l'axe vertical z représente les différentes échelles d'analyse, des grandes aux petites longueurs d'onde. Pour une échelle a donnée, les couleurs sur la surface donnent les modules des coefficients d'ondelettes en chaque point.

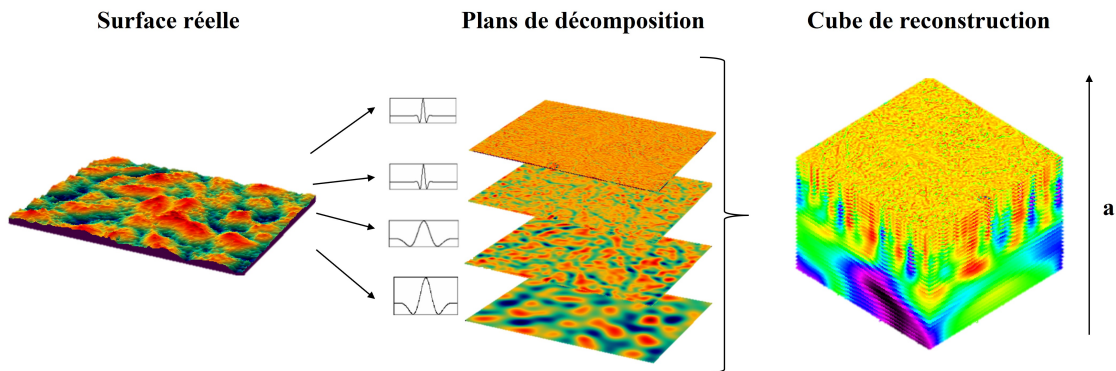


FIGURE 2.25 – Les trois étapes de la décomposition en ondelettes d'un modèle d'épithélium oral : de la surface initiale jusqu'au cube de reconstruction

La figure 2.25 présente les étapes de la décomposition en ondelettes d'un modèle d'épithélium oral jusqu'à obtenir le cube de reconstruction. La reconstruction de la fonction $f(x, y)$ à partir de la transformée $W_{\psi}^f(a, b)$ se fait suivant l'expression suivante :

$$f(x, y) = \frac{1}{C_{\psi}} \int_{-\infty}^{+\infty} \int_{-\infty}^{+\infty} \frac{W_{\psi}^f(a, b)}{a^2} \psi_{a,b}(x, y) da db \quad (2.37)$$

avec C_{ψ} une constante qui dépend de l'ondelette mère. Dans notre étude, pour une ondelette de type chapeau mexicain comme la notre, $C_{\psi} = 3.541$.

La décomposition en ondelettes permet de reconstruire le cube en le décomposant selon les échelles pertinentes pour notre analyse (voir figure 2.26). Par exemple, les petites longueurs d'onde correspondent à la rugosité de la surface, tandis que les grandes échelles représentent la forme de l'échantillon étudié (voir figure 2.26). Pour réaliser cela, nous utilisons la méthode de séparation, qui consiste à décomposer la surface analysée en différentes échelles. Un filtre passe-bande est appliqué sur le cube de reconstruction pour les échelles choisies, puis les données de cette bande de longueurs sont reconstruites. Cette approche permet de séparer les différentes composantes de la surface (rugosité, ondulation, forme) en sélectionnant la bande d'intérêt dans la fenêtre cubique.

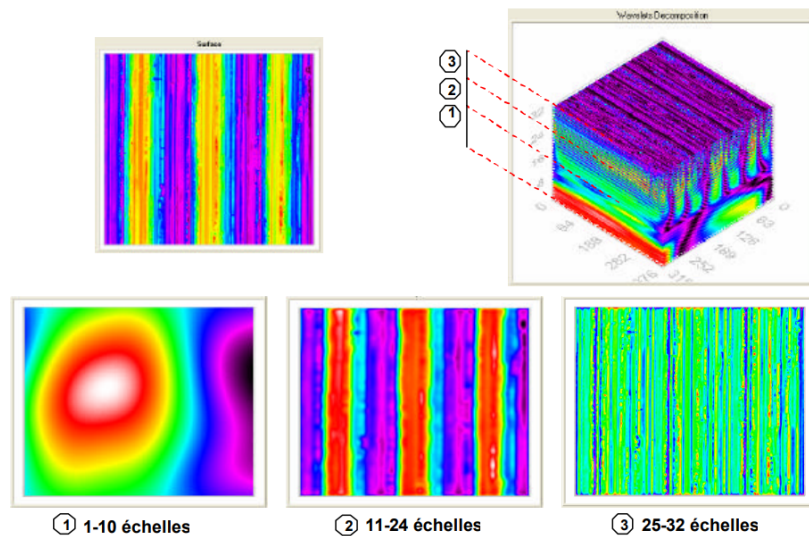


FIGURE 2.26 – Décomposition en ondelettes d'une surface pour une analyse multi-échelles [311]

III.2.3 Application de la décomposition en ondelettes

La décomposition en ondelettes nous permet d'effectuer une analyse de la topographie à haute résolution en étudiant les différentes échelles de l'image dans toutes les bandes de longueurs d'onde. Cette approche offre une analyse multi-échelles de la topographie, couvrant une gamme allant de la rugosité à la forme. Deux critères de rugosité ont été retenus et quantifiés pour chaque échelle décomposée : le SMA et le NAD. Le calcul de ces critères pour chaque échelle permet de tracer un spectre de rugosité pour chaque surface, sans nous limiter à une seule longueur d'onde.

Les images de surface des épithéliums ($72 \times 96 \mu m^2$) ont été obtenues par interférométrie et sont décomposées en 32 échelles, correspondant à 32 longueurs d'onde selon une progression logarithmique à l'aide du logiciel TopoLab développé en interne.

III.2.3.1 Spectre de rugosité SMA

Le SMA [m] est l'écart absolu moyen à chaque échelle a et est exprimé par :

$$SM_a(a) = \sum_{x=1}^M \sum_{y=1}^N \frac{|f_a(x,y)|}{MN} \quad (2.38)$$

avec $|f_a(x,y)|$ représentant le module de la surface de décomposition pour l'échelle donnée a . M est la résolution suivant x et N la résolution suivant y . Ainsi, le calcul de ce critère pour chaque longueur d'onde a permet de tracer un spectre formant la signature de rugosité de la surface.

III.2.3.2 Déviation de la normale locale NAD

Le second paramètre est un paramètre géométrique multi-échelles qui caractérise également la rugosité et plus particulièrement la déviation de la normale locale au som-

met de la surface, noté NAD. L'angle de déviation en un point de la surface, noté γ , est défini par :

$$\cos \gamma = \frac{1}{\sqrt{1 + \left(\frac{\partial z_s}{\partial x}^2 + \frac{\partial z_s}{\partial y}^2 \right)}} \quad (2.39)$$

Le paramètre NAD est alors défini comme l'écart type des angles γ aux sommets des aspérités de la surface à chaque échelle d'analyse a . NAD peut donc se définir comme un vecteur tel que :

$$NAD(a) = \frac{1}{\sqrt{\frac{1}{\text{Card}(S_a)} \sum_{(x,y) \in S_a} (\bar{\gamma}_a - \gamma_a)^2}} \quad (2.40)$$

avec $\bar{\gamma}_a$ représentant la moyenne des angles γ_a aux sommets des aspérités de la surface à l'échelle a , et $\text{Card}(S_a)$ désignant le nombre de sommets à l'échelle a sur la surface. Ce paramètre caractérise l'inclinaison des détails sur la surface analysée à chaque échelle d'analyse, ainsi que la fluctuation de l'angle normal des sommets de la surface. Le spectre NAD peut donc être tracé pour chaque surface, offrant ainsi une signature de la surface étudiée.

Ces deux paramètres, SMA et NAD, revêtent une grande importance dans le cadre de cette thèse. En effet, ils fournissent des informations précieuses sur la topographie et les détails de la surface des épithéliums. L'une de nos études porte sur l'effet de composés astringents sur la lubrification des épithéliums oraux. Or, selon la littérature, nous savons que ces composés perturbent la lubrification en induisant la formation d'agrégats à la surface de la muqueuse orale, ce qui rompt la pellicule mucosale [314]. Ainsi, les paramètres SMA et NAD sont pour nous des indicateurs pertinents de la formation des agrégats à la surface des épithéliums.

III.3 Compositions moléculaires et chimiques de surface

III.3.1 La spectroscopie Raman

La spectroscopie Raman est une technique de spectroscopie vibrationnelle qui utilise la lumière pour identifier la composition chimique d'un matériau en se basant sur la diffusion inélastique de la lumière. Cette méthode a été découverte pour la première fois par deux chercheurs indiens, Krishnan et Raman, en 1928, et leur a valu un prix Nobel pour cette découverte deux ans plus tard [315]. L'analyse Raman possède de grands avantages puisqu'elle est sans contact, non destructive et ne nécessite aucune préparation de l'échantillon [316-318]. Il est possible de travailler à l'état liquide, solide ou gazeux. De plus, son application dans des domaines biologiques et médicaux est possible car la diffusion Raman de l'eau est très faible, ce qui permet d'étudier des fluides biologiques ou des matériaux biologiques dans leur milieu de culture [319-321].

Le principe de la spectroscopie Raman se base sur l'interaction d'une source de lumière monochromatique avec les liaisons chimiques d'un échantillon. Si un échantillon est éclairé par une lumière monochromatique de fréquence ν_0 provenant d'un laser, la

lumière peut être absorbée, transmise, réfléchi ou diffusée. L'immense majorité de la lumière diffusée ne change pas de fréquence (elle garde la même énergie). Il n'y a pas d'échange d'énergie entre les photons et les atomes de l'échantillon, c'est une diffusion élastique ou diffusion de Rayleigh [322]. Une minorité de photons (un photon par million) sera diffusée avec une fréquence différente (une énergie différente), ce qui correspond à une diffusion inélastique causée par l'effet Raman [322]. Dans ce cas, il y a un échange d'énergie entre les photons et les molécules de l'échantillon. Deux types de diffusion inélastique sont créés en fonction du changement de fréquence. Pour une fréquence de diffusion $\nu_{RAS} = \nu_0 + \nu$, il y a une perte d'énergie vibrationnelle pour la molécule, ce qui correspond à un décalage anti-Stokes. Sinon, la fréquence vaut $\nu_{RS} = \nu_0 - \nu$, dans ce cas il y a un gain vibrationnel pour la molécule, c'est un décalage Stokes. Les fréquences varient selon les fréquences vibratoires des liaisons moléculaires présentes dans l'échantillon [316].

Ainsi, lorsque la lumière émise est déviée par l'échantillon, la majorité du signal concerne la diffusion Rayleigh. Dans la spectroscopie Raman, un filtre permet d'écarter ce rayonnement Rayleigh et de garder seulement la diffusion inélastique qui change de fréquence. Donc, quand un échantillon est excité avec un laser, seul les ondes diffusées par effet Raman sont récupérées. Elles se répartissent en plusieurs longueurs d'onde (ou gammes d'énergie) pour former le spectre Raman propre à l'échantillon. Chaque bande peut être attribuée à un groupement chimique de l'échantillon, fournissant une analyse qualitative. L'estimation de l'intensité de chaque bande fournit des informations quantitatives. Cette approche repose sur le principe physique selon lequel un environnement altère subtilement la fréquence de la lumière qui le traverse. Ce changement de fréquence traduit un transfert d'énergie entre le rayonnement lumineux et le milieu, fournissant ainsi des détails sur la nature du substrat lui-même.

Dans cette thèse, nous utilisons un microscope confocal Raman inViaTM (Renishaw, UK).

III.3.2 Préparation des échantillons et acquisition des spectres

Avant de réaliser les acquisitions de spectre Raman sur les modèles d'épithélium, il est nécessaire de préparer les échantillons, comme pour toutes les techniques d'analyse physico-chimiques présentées ici. Peu importe leur lignée, les cellules ont étéensemencées sur un substrat en silice qui présente une faible réponse à l'excitation Raman (un seul pic à $\approx 520 \text{ cm}^{-1}$). Une fois la confluence atteinte sur ces substrats, les modèles sont fixés avec du PFA et déshydratés par bains successifs d'éthanol, de la même manière que pour les analyses précédentes. C'est sur ces modèles d'épithéliums que les spectres sont réalisés. Le laser utilisé est un laser de 785 nm, avec un objectif x50 couvrant une plage de longueurs d'onde de 700 à 3200 cm^{-1} (ce qui permet d'éliminer le pic de la silice). Le temps d'exposition pendant la mesure est de 180 secondes avec une puissance laser de 100 % (300 mW). La résolution latérale est de $\approx 1 \mu\text{m}$ et axiale $< 2 \mu\text{m}$.

III.3.3 Analyses chimiométriques

III.3.3.1 Pré-traitement des données spectrales

Avant d'entreprendre toute analyse de classification des spectres Raman, il est impératif de passer par une étape de pré-traitement. Cette phase vise à éliminer les artefacts spectraux, les effets optiques, l'influence de l'appareil, ainsi que le bruit de fond du détecteur. Ces techniques sont cruciales pour établir des modèles de classification spectrale tels que l'analyse en composantes principales (ACP), l'analyse discriminante linéaire (LDA), les dendrogrammes, etc. En effet, les résultats obtenus après le pré-traitement influencent considérablement les résultats de ces modèles. Les spectres Raman utilisés dans le cadre de ce travail ont subi plusieurs traitements préalables à leur classification : élimination des rayons cosmiques, correction de la ligne de base, lissage, et enfin normalisation. Toutes ces étapes sont illustrées dans un exemple sur la figure 2.27.

1. **Élimination des rayons cosmiques** : un rayon cosmique est une particule de haute énergie capable d'interagir avec les molécules de l'atmosphère. Lorsqu'un rayon cosmique atteint le détecteur, il crée un faux signal en forme de pic net qui perturbe considérablement le spectre. Pour éliminer ces perturbations, chaque pixel est comparé à ses pixels voisins. Si la différence dépasse un certain seuil, il est identifié comme un rayon cosmique et est supprimé.
2. **Correction de la ligne de base** : cette étape du pré-traitement est indispensable car souvent, la ligne de base d'un spectre brut est inclinée ou présente une autre forme, ce qui perturbe fortement l'analyse du spectre. Pour corriger cela, un polynôme est ajusté au spectre en passant par ses minima, puis soustrait de ce dernier pour enlever la forme de la ligne de base. Cette ligne de base est souvent liée à la nature de l'échantillon et à la source lumineuse.
3. **Le lissage** : cette étape vise à réduire le bruit sur les spectres enregistrés. La méthode utilisée est le filtrage de Savitzky-Golay (SG), qui permet d'améliorer le rapport signal sur bruit sans déformer le signal. Le lissage est contrôlé par deux paramètres : l'ordre du polynôme et la fenêtre de lissage. Plus la fenêtre de lissage est large, plus le spectre sera lissé. Dans notre travail, les spectres ont été lissés avec un polynôme de degré 3 et une fenêtre de lissage de 5. Il est crucial de ne pas trop lisser le spectre pour ne pas perdre d'information.
4. **La normalisation** : ce traitement permet d'éliminer les facteurs liés aux variations de la source lumineuse et surtout, simplifie la comparaison entre les spectres. Cela garantit que chaque spectre ait une intensité maximale identique, de sorte que les variations d'intensité observées soient causées par des concentrations chimiques différentes. Les spectres sont ramenés à la même échelle d'intensité. Dans notre travail, la normalisation est réalisée en ajustant le pic à la longueur d'onde 2343 cm^{-1} , car ce pic est présent sur chaque échantillon avec la même intensité.

Toutes ces étapes de pré-traitement sont effectuées sur le logiciel WiRE (Renishaw, UK).

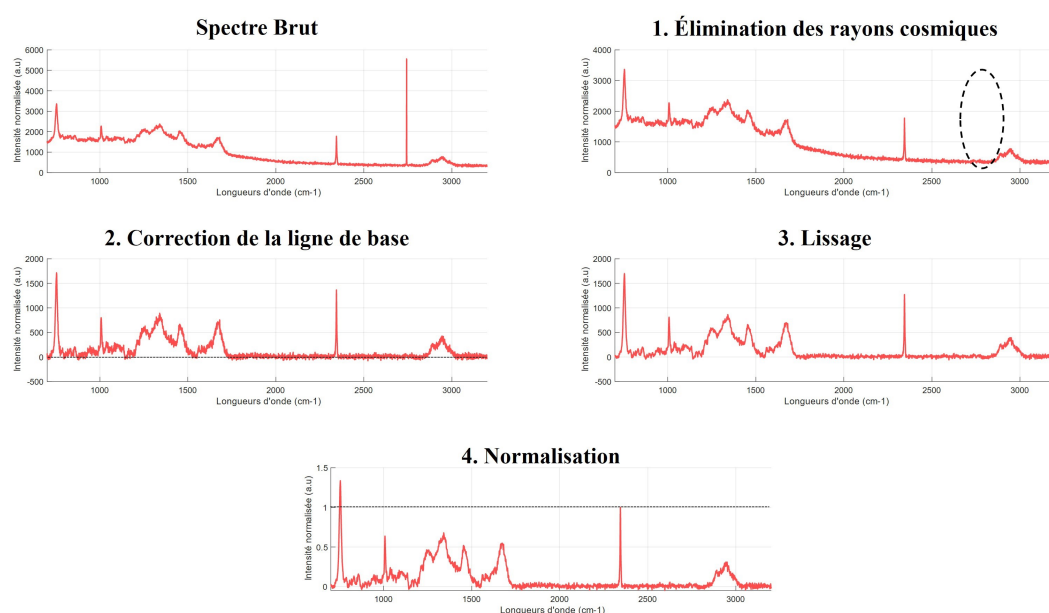


FIGURE 2.27 – Les différentes étapes de pré-traitement d'un spectre Raman sur MUC1/VNTR - Spectre brut, (1) Élimination des rayons cosmiques, (2) Correction de la ligne de base, (3) Lissage et (4) Normalisation

III.3.3.2 Analyses multivariées : Décomposition des données

L'utilisation de la spectroscopie Raman dans le cadre de cette thèse vise à comparer les lignées cellulaires entre elles, ainsi qu'à comparer une même lignée dans différentes conditions de travail : avec et sans pellicule mucosale reconstruite ou en présence de tanins. Cependant, la comparaison des spectres eux-mêmes est très complexe car les bandes Raman se chevauchent et il est difficile de valider une différence significative entre les spectres. De plus, une autre contrainte se pose : la taille des échantillons. En effet, les spectres s'étendent de 700 à 3200 cm^{-1} , et avec une douzaine de spectres par condition, nous obtenons des matrices de résultats immenses et pratiquement impossibles à traiter.

C'est dans ce contexte que les méthodes d'analyse multivariées apparaissent. Elles sont souvent utilisées pour analyser les spectres Raman et surtout pour faciliter leurs interprétations. Ces méthodes permettent de représenter synthétiquement cet ensemble de données vaste et de pouvoir comparer les résultats grâce à une représentation graphique. Elles réduisent le volume de données tout en conservant les informations essentielles. Ces méthodes d'analyse multivariées se décomposent en deux catégories : les méthodes supervisées et les méthodes non-supervisées. Dans les méthodes non-supervisées, aucune connaissance a priori de l'échantillon et des classes n'est nécessaire, car c'est précisément cette méthode qui les détermine. À l'inverse, dans les méthodes supervisées, le nombre de classes doit être connu à priori.

Dans le cadre de ce travail, nous utilisons l'ACP, qui est une méthode non-supervisée. Nous utilisons également l'analyse discriminante linéaire après une ACP (ACP-LDA) afin de classer les spectres qui ne se classent pas très bien avec seulement une ACP.

L'ACP est une méthode qui permet d'explorer les ressemblances et les différences

entre des spectres Raman qui paraissent à première vue plutôt similaires. La matrice \mathcal{M} (de dimension $M \times N$) contenant tous les spectres à étudier se décompose ainsi : M est le nombre de lignes correspondant au nombre de spectres à étudier, et N est le nombre de colonnes qui correspond au nombre de bandes par spectre. Ainsi, la matrice de spectres est immense et multidimensionnelle, avec une concentration d'informations très importante. Le grand avantage de l'ACP est la réduction de la concentration de l'information pour la représenter dans un espace à deux ou trois dimensions, ce qui est beaucoup plus simple à analyser. En fait, l'ACP redéfinit de nouveaux axes (composantes principales). Ces composantes principales (CP) sont des combinaisons linéaires des variables initiales définies en cherchant à maximiser la variance des variables projetées sur les CP. Le premier axe (CP1) représente la variance la plus élevée, la deuxième (CP2) représente la seconde variance la plus élevée, et ainsi de suite pour chaque CP jusqu'à obtenir autant de CP que d'échantillons initiaux. Les premières CP sont donc les axes qui concentrent la plus grande partie de l'information, donc de la variance. C'est avec ces CP qu'il est possible de faire ressortir les différences entre les spectres.

Les résultats d'une ACP permettent de visualiser la projection des spectres dans la base des composantes principales (cette base est très réduite, à deux ou trois dimensions, où l'information est maximale). Cela permet de visualiser les répartitions et de voir les rapprochements entre individus, figure 2.28.a.

En définitive, l'ACP est une méthode de projection qui permet de projeter les observations (les spectres Raman), qui étaient dans un espace multidimensionnel, dans une nouvelle base restreinte concentrant l'essentiel de l'information. Les observations peuvent être représentées sur un graphique, ce qui facilite grandement l'interprétation.

Dans certains cas, l'ACP ne suffit pas à différencier les groupes. Par conséquent, il est possible d'appliquer une analyse discriminante linéaire (LDA) aux composantes principales retenues afin de trouver la composante correspondante qui sépare au mieux les groupes. Tout comme l'ACP, la LDA fournit des vecteurs propres sur lesquels il est possible de projeter les CP conservées, permettant ainsi de trouver une classification et des différences. Cette procédure est l'ACP-LDA et elle permet de différencier les classes lorsque l'ACP n'y parvient pas, comme le montre la figure 2.28.b.

Pour améliorer la visualisation des résultats de l'ACP ou de l'ACP-LDA, il est possible de tracer des ellipses de confiance, qui représentent la dispersion des observations autour de leur moyenne dans un espace de projection défini par les composantes principales. Elles permettent d'identifier les tendances et les regroupements des données, tout en évaluant la fiabilité des représentations graphiques dans l'ACP. Nos ellipses sont calculées à partir des intervalles de confiance de 95%.

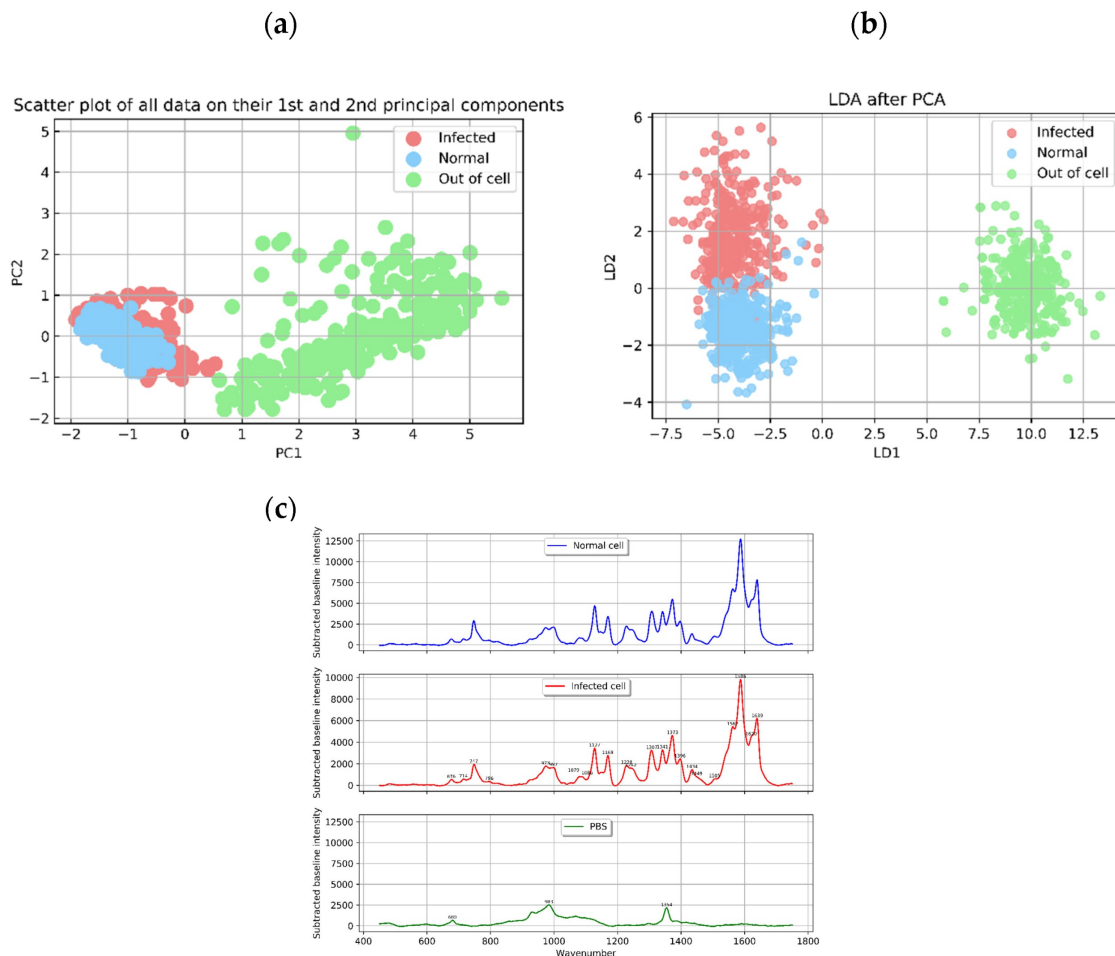


FIGURE 2.28 – Exemple de procédure ACP suivie de ACP-LDA dans le cadre d’une étude visant à différencier des cellules saines et infectées - (a) présente les résultats d’une ACP avec la représentation graphique des spectres dans la base des composantes principales - (b) montre les résultats de la procédure LDA sur les résultats de l’ACP dans la base des vecteurs propres de la LDA et (c) présente les spectres moyens pour les trois échantillons - Étude de Kongklad et al [323]

IV Conclusions et bilan du chapitre

Ce chapitre présente les outils développés et utilisés dans le cadre de cette thèse pour répondre aux problématiques principales.

Tout d’abord, un modèle de muqueuse orale *in vitro* a été élaboré à partir de quatre lignées cellulaires, chacune exprimant une forme distincte de la protéine MUC1 obtenue par la transfection de la lignée cellulaire TR146. Ce modèle permet d’explorer le rôle de la mucine transmembranaire MUC1 et de sa structure spécifique dans les propriétés lubrifiantes de la PM sur les modèles. Il permet également d’analyser l’effet des composés astringents sur la lubrification et de caractériser le rôle de MUC1 dans les mécanismes d’astringence.

Ensuite, pour étudier ces problématiques, un dispositif mécanique a été développé pour réaliser des essais de frottement et d’indentation à une échelle micrométrique sur

ces mêmes modèles cellulaires. Les essais tribologiques fournissent des paramètres clés, tels que le coefficient de frottement et l'énergie dissipée par frottement, permettant de suivre l'état de lubrification des modèles. Les essais d'indentation offrent des informations sur la force d'adhésion entre l'indenteur et la surface indentée, utilisée pour caractériser les propriétés du film salivaire de surface des épithéliums.

Enfin, des analyses de surface avant et après frottement ont été réalisées pour comprendre les phénomènes de lubrification. L'évaluation de l'endommagement *post mortem* constitue un critère supplémentaire pour évaluer l'efficacité de la lubrification des modèles dans diverses conditions expérimentales. Le but étant d'examiner à la fois le rôle de MUC1 et les effets des composés astringents. En outre, l'analyse topographique permet de quantifier et de caractériser la formation des agrégats causés par les tanins sur les surfaces épithéliales, avec l'objectif de corrélérer ces modifications topographiques aux propriétés physiques influençant la lubrification. Des analyses chimiques ont été mises en place pour établir des relations entre l'évolution de la chimie de surface et les paramètres physiques liés à la lubrification.

Ces approches combinées permettent une compréhension approfondie des mécanismes sous-jacents à la lubrification et des impacts des composés astringents, offrant des perspectives nouvelles pour l'étude des interactions au niveau de la muqueuse orale.

Chapitre 3

Exploration du rôle de la mucine MUC₁ dans la lubrification orale humaine

SOMMAIRE

I	INTRODUCTION	95
I.1	Problématique	95
I.2	Stratégie de recherche	96
II	PROTOCOLES	97
II.1	Collection de la salive	97
II.2	Les modèles d'épithélium	97
II.3	Protocole tribologique	98
II.4	Protocole d'indentation : mesure de la force d'adhésion	99
II.5	Analyses physico-chimiques	99
II.6	Analyses statistiques	100
III	ÉTUDES EXPÉRIMENTALES	101
III.1	Étude de la fonction de MUC1 dans la lubrification intrinsèque des modèles d'épithélium oral	101
III.2	Évaluation du rôle de MUC1 sur les propriétés de lubrification de la pellicule mucosale	104
III.3	Analyse de l'effet de la structure de MUC1 sur la lubrification	109
III.4	Étude des propriétés globales de lubrification de la pellicule mucosale	114
IV	CONCLUSIONS ET BILAN DU CHAPITRE	117

I Introduction

I.1 Problématique

La cavité buccale remplit diverses fonctions essentielles pour l'organisme, notamment le traitement alimentaire (ingestion, mastication et formation du bol alimentaire), la perception des saveurs, la parole, la défense et la respiration. Tous ces processus soumettent la muqueuse buccale à des contraintes mécaniques, telles que la friction et le cisaillement, pouvant potentiellement causer des dommages. En réponse à ces contraintes, la salive est continuellement sécrétée dans la cavité buccale et participe à la formation d'une couche protectrice, liée en surface à la muqueuse orale, connue sous le nom de pellicule mucoale (PM). La PM est principalement composée de protéines salivaires spécifiquement ancrées à la surface de l'épithélium oral, formant un mucus [324]. Les principaux composants organiques du mucus sont les mucines sécrétées dans la salive, qui favorisent sa formation [74]. Sa composition a été caractérisée par des études *in vivo* et *in vitro*, qui ont identifié des mucines salivaires sécrétées, MUC5B et MUC7, ainsi que des PRP et des IgA [44-47, 58, 324]. De plus, ces recherches ont révélé la présence d'une mucine transmembranaire MUC1, exprimée par les cellules épithéliales.

Malgré son importance, la compréhension du mécanisme derrière la formation de la PM reste incomplète. Des découvertes récentes suggèrent que les interactions moléculaires impliquant la mucine épithéliale MUC1 et les mucines salivaires MUC5B et MUC7 [63] jouent un rôle majeur dans la formation de la PM. Les études menées par Ployon et al. [25] ainsi que par Aybeke et al. [68] soulignent l'importance de MUC1 dans la facilitation de l'ancrage des protéines salivaires au modèle d'épithélium oral, en utilisant la lignée cellulaire TR146. D'autres recherches signalent l'implication de MUC1 dans la formation de la PM [48, 61], ainsi que dans la lubrification intrinsèque de la surface épithéliale [25, 78, 85, 86].

De nombreuses études démontrent que la tribologie offre une approche intéressante pour étudier les mécanismes et les interactions complexes impliqués dans les processus oraux, notamment les propriétés de lubrification de la salive [170, 201-203, 325, 326]. Le processus oral est dynamique et implique des mouvements complexes entre différentes surfaces telles que le palais, la langue, les dents et la muqueuse orale, entraînant des forces de friction entre ces composants. Plusieurs travaux utilisent la tribologie pour caractériser la lubrification orale, en utilisant divers matériaux pour imiter les tissus buccaux (PDMS, langue de porc *ex vivo*, hydrogel, etc.) [40, 201-203, 224, 262, 265]. Les essais de frottement ont pour objectifs de simuler les contacts et les mouvements oraux. Cependant, l'utilisation de ces matériaux pose des défis pour l'analyse de l'interaction entre les protéines salivaires et les protéines transmembranaires. En effet, dans ces recherches, les matériaux ne possèdent pas de protéines transmembranaires MUC1 ancrées à leur surface, ce qui limite considérablement l'étude des mécanismes de formation de la PM.

I.2 Stratégie de recherche

Ces travaux de thèse reposent sur les hypothèses de la littérature concernant le rôle essentiel joué par MUC1 dans la lubrification orale via la formation de la PM [34, 48, 61]. Afin de valider ces hypothèses, une stratégie basée sur une étude tribologique *in vitro* sur des modèles d'épithélium oral a été mise en place. Cette étude vise à mettre en lumière plusieurs points clés :

1. L'impact de MUC1 sur la lubrification intrinsèque des modèles d'épithélium.
2. La contribution de MUC1 aux propriétés lubrifiantes de la pellicule mucoale.
3. L'examen du rôle de la structure de MUC1, en se concentrant sur les domaines VNTR et SEA, dans le processus de lubrification.
4. L'étude des propriétés de lubrification de la PM.

Pour étudier ces points clés, la stratégie de recherche consiste à mener des études tribologiques *in vitro* en utilisant nos modèles d'épithélium oral exprimant MUC1 [7, 8]. Ces modèles sont composés de la lignée cellulaire TR146 exprimant différentes isoformes de MUC1. Une partie des modèles est incubée avec de la salive pour reconstruire la PM (voir figure 3.1). Les essais mécaniques et les caractérisations de surface post-essais fournissent des marqueurs permettant de suivre l'état de lubrification des modèles. Ces marqueurs sont présentés dans le chapitre 2. Le coefficient de frottement (μ), l'énergie dissipée par frottement (E_d), la surface endommagée par frottement ainsi que les signatures chimiques (Spectroscopie Raman) sont utilisés comme indicateurs de l'effet de MUC1 sur la lubrification. Ces tests sont réalisés à l'aide du dispositif spécialement conçu pour cette étude et précédemment présenté dans le chapitre 2.

La figure 3.1 représente schématiquement le plan d'expérience mis en place pour cette étude. Ce schéma illustre les deux conditions testées pour chaque isoforme de MUC1 : "brute", correspondant à l'épithélium sans PM reconstruite, et "PM", correspondant à l'épithélium avec une pellicule mucoale reconstruite. Ce plan nous permet d'étudier les points clés mentionnés précédemment.

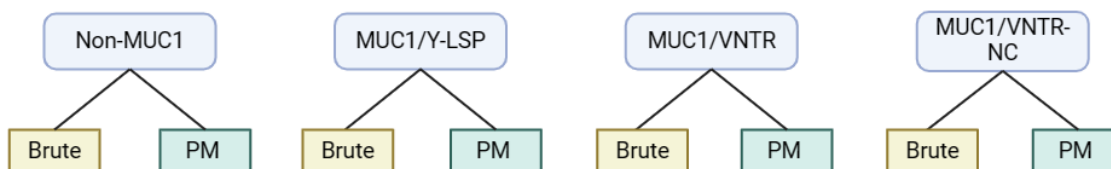


FIGURE 3.1 – Schéma du plan d'expérience de cette étude - Isoformes testées et conditions expérimentales - "Brute" correspond à un état sans ajout de PM, et "PM" correspond à un essai avec une pellicule mucoale reconstruite

II Protocoles

II.1 Collection de la salive

L'étude se déroule en conformité avec les directives de la Déclaration d'Helsinki. Les salives ont reçu l'approbation du Comité d'éthique pour la recherche (CPP Est I. Dijon, #14.06.03, ANSM #2014-A00071-46). La salive est prélevée auprès de volontaires en bonne santé ayant donné leur consentement éclairé par écrit. Une période de jeûne de deux heures, sans boire, fumer ou manger est respectée avant la collecte. Les volontaires laissent ensuite couler leur salive naturellement accumulée dans des tubes en plastique, fournissant ainsi de la salive non stimulée.

II.2 Les modèles d'épithélium

Les quatre modèles d'épithélium utilisés dans cette études sont les modèles présentés dans le Chapitre 2 section I.1.1. La figure 2.1 et le tableau 2.1 présentent et décrivent les structures des quatre isoformes. Un récapitulatif des quatres modèles est présenté ci-dessous.

- **Non-MUC1** : la forme native de la lignée TR146, qui n'exprime pas la mucine MUC1
- **MUC1/Y-LSP** : cellules TR146 transfectées qui expriment une forme tronquée de MUC1, plus courte que sa forme physiologique
- **MUC1/VNTR** : cellules TR146 transfectées qui expriment une forme de MUC1 proche de la structure physiologique avec des domaines biologiques d'intérêt tels que le domaine VNTR et le domaine SEA clivable
- **MUC1/VNTR-NC** : cellules TR146 transfectées qui expriment MUC1 avec une structure proche de l'isoforme MUC1/VNTR, avec un domaine SEA non clivable

Ces modèles ont été cultivés en routine précédemment décrite dans la section I.1.2 du Chapitre 2, puis une fois la confluence atteinte, les cellules de chaque lignée sontensemencées sur un substrat. Les substrats utilisés dans cette étude sont des lames de verre préalablement revêtues de Poly-D-lysine. Le protocole détaillé de chaque étape de la préparation des échantillons est expliqué dans la partie I.1 du Chapitre 2.

II.2.1 Reconstitution de la pellicule mucosale

Pour une partie des modèles, la pellicule mucosale est reconstituée à la surface des épithéliums avant la réalisation des essais tribologiques, voir figure 3.1. Les modèles cellulaires concernés sont incubés avec de la salive pendant 2 heures (37 °C, 7.5 % de CO₂ et 100 % d'humidité). Ensuite, les cellules sont rincées deux fois avec du PBS (TermoFischer, Allemagne) afin d'éliminer la salive qui n'avait pas adhéré à l'épithélium, laissant ainsi uniquement la PM ancrée au modèle de muqueuse.

II.3 Protocole tribologique

Les mesures sont réalisées à l'aide du tribomètre (bille sur plan avec un mouvement linéaire alterné) spécialement conçu pour cette étude, comme précédemment illustré figure 2.6. Ce tribomètre est équipé de deux capteurs : un capteur normal (LSB200 - 20g, Futek, USA) et un capteur tangentiel (9215A, Kistler, Suisse). Ces capteurs permettent respectivement de mesurer les forces normales et tangentielles lors du contact entre la bille en silicone sphérique et le modèle d'épithélium oral (voir figure 3.2). La bille a un rayon de courbure de 1.5 mm et un module de Young réduit E^* de $150 \pm 12 \text{ kPa}$, mesuré par indentation. Les essais sont effectués sous faible charge pour éviter tout dommage sur la couche cellulaire. Une charge normale de $0,5 \pm 0,02 \text{ mN}$ est appliquée sur les modèles d'épithélium oral avec la bille. La pression de contact dans ces conditions, entre la bille en silicone et les modèles d'épithélium est de $8,2 \pm 0,6 \text{ kPa}$, mesurée par indentation (cette analyse est présentée dans l'annexe II). La charge normale est maintenue constante par un régulateur PID tout au long du test pour éviter les effets visco-élastiques des matériaux. Une fois que la charge atteint sa consigne, les essais tribologiques commencent avec une vitesse linéaire de $300 \mu\text{m/s}$ pendant 10 cycles sur une course de $500 \mu\text{m}$. Ces paramètres ont été soigneusement sélectionnés pour préserver l'intégrité de la couche cellulaire et garantir que les tests soient effectués sur celle-ci et non sur le substrat. Le tableau 3.1 résume les paramètres utilisés durant les essais. Les essais sont réalisés dans des conditions de température et d'hygrométrie contrôlés ($21\text{-}23 \text{ }^\circ\text{C}$ et $30\text{-}40 \%$ respectivement).

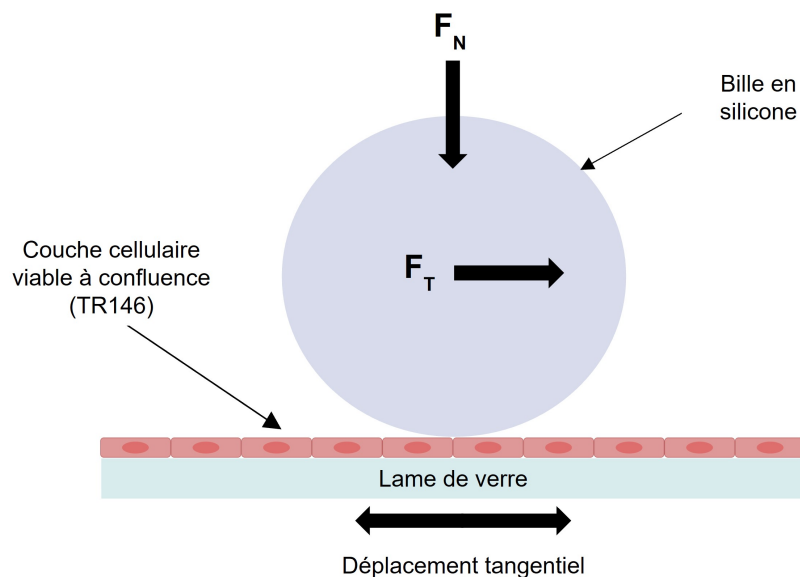


FIGURE 3.2 – Schéma du contact pendant le test tribologique entre la bille et un modèle d'épithélium - Avec F_N la force normale et F_T la force tangentielle

Le coefficient de frottement μ et l'énergie dissipée E_d sont mesurés pour les quatre isoformes de MUC1 selon les deux conditions expérimentales : brute (sans PM reconstituée) et avec PM reconstituée. La méthode de calcul de ces paramètres est décrite dans la section II.3 du Chapitre 2. Ces marqueurs fournissent des indicateurs mécaniques

permettant de comparer l'état de lubrification entre les isoformes pour chaque condition expérimentale.

TABLEAU 3.1 – Paramètres expérimentaux des tests tribologiques

Rayon de courbure de la bille	1.5 mm
Substrat	Lame de verre
Vitesse de la charge normale	1 $\mu\text{m}/\text{s}$
Charge normale imposée	0,5 mN
Course de frottement	500 μm
Vitesse de frottement	300 $\mu\text{m}/\text{s}$
Nombre de cycle	10
Seuil de contact	0,1 mN

II.4 Protocole d'indentation : mesure de la force d'adhésion

Les mesures d'indentation sont réalisées à l'aide du dispositif mécanique spécialement conçu pour cette étude, tel qu'illustré dans la figure 2.6. Une charge normale de 1 mN est appliquée sur les modèles d'épithélium avec une bille en silicone. La force d'adhésion est mesurée à partir de la courbe expérimentale, comme présenté figure 2.12. Les paramètres de l'essai sont détaillés dans le tableau 3.2 ci-dessous.

TABLEAU 3.2 – Paramètres expérimentaux des tests d'indentation

Rayon de courbure de la bille	1.5 mm
Substrat	Lame de verre
Vitesse de la charge normale	10 $\mu\text{m}/\text{s}$
Charge normale imposée	1 mN
Seuil de contact	0.05 mN

La force d'adhésion F_{ad} est calculée uniquement pour l'isoforme MUC1/VNTR dans les deux conditions : sans et avec PM reconstruite car c'est la forme la plus proche structurellement de la protéine *in vivo*. Le protocole de préparation des échantillons est le même que celui utilisé pour les essais tribologiques, pour les deux conditions expérimentales (voir partie II.3 du chapitre 3).

II.5 Analyses physico-chimiques

La caractérisation post-essais a permis de mettre en place des analyses physico-chimiques des modèles d'épithélium après le frottement.

II.5.1 Étude de l'endommagement

L'endommagement est décrit en calculant la surface dégradée après le frottement. Les images des traces sont obtenues par interférométrie à lumière blanche pour chaque

isoforme de MUC1 testée dans les différentes conditions expérimentales. Chaque image est traitée pour réduire les effets du bruit et de la forme. Ensuite, la surface de chaque trace de frottement est calculée à partir d'une image binarisée de la référence. Toute la procédure est détaillée section III.1 Chapitre 2.

II.5.2 Analyses des profils chimiques de surface

Des mesures par spectroscopie Raman sont réalisées sur deux isoformes : Non-MUC1 et MUC1/VNTR, considérées comme les plus opposées en termes de structure. Les spectres sont obtenus avec un microscope confocal Raman inViaTM (Renishaw, UK). Le protocole de préparation des échantillons et les paramètres utilisés sont présentés dans la section III.3 du Chapitre 2 et résumés dans le tableau 3.3 ci-dessous. Ces spectres nous permettent de comparer les compositions chimiques de surface des deux isoformes, afin de corrélérer les profils chimiques avec les variations de comportements tribologiques.

TABLEAU 3.3 – Paramètres utilisés pour la spectroscopie Raman sur les modèles d'épithélium

Laser	785 nm
Puissance Laser	300 mW
Objectif	x50
Plage de longueur d'onde	700-3200 cm ⁻¹
Temps d'exposition	180 s
Accumulation	1

II.6 Analyses statistiques

Pour garantir l'existence de différences statistiquement significatives, des tests statistiques sont mis en place sur les données expérimentales. Tout d'abord, un test de Kruskal-Wallis est effectué pour étudier une première indication de la similarité globale entre les groupes. Ensuite, des tests de t-Student ou Mann-Whitney sont réalisés comparant chaque paire d'échantillon deux à deux. Le choix du test se fait en fonction de l'adéquation de la distribution de nos données avec la loi normale (voir section II.4 du chapitre 2). L'objectif est de déterminer si des différences statistiquement significatives existent entre les groupes spécifiques. De plus, afin de minimiser les erreurs dans les valeurs de p causées par la répétition des tests, une correction de Bonferroni est appliquée. Ces tests fournissent la valeur de p , indiquant le niveau de confiance que nous pouvons accorder aux résultats, avec un niveau de risque $\alpha \leq 0,05$. Codes de signification : $p = 0 < *** < 0,001 < ** < 0,01 < * < 0,05 < \circ < 0,1 < . < 1$. La démarche est détaillée section II.4 Chapitre 2. Ces analyses sont réalisées à l'aide de XLSTAT (version 2019.4.2, Addinsoft, France), une extension du logiciel Excel et MatlabTM (R2021b, Licence École Centrale de Lyon).

III Études expérimentales

III.1 Étude de la fonction de MUC1 dans la lubrification intrinsèque des modèles d'épithélium oral

III.1.1 Problématique

La lubrification de l'épithélium oral figure parmi les fonctions cruciales de MUC1 [327, 328]. Avant d'explorer le rôle de cette mucine dans les propriétés lubrifiantes de la pellicule mucosale dans des conditions physiologiques. Nous examinons l'impact de MUC1 et de sa structure sur la lubrification des modèles d'épithélium **sans reconstitution de la PM**. Nous cherchons à déterminer si la présence de cette protéine influence la lubrification intrinsèque des épithéliums.

III.1.2 Résultats et Discussions

Nos recherches mettent en évidence que l'absence d'expression de MUC1 entraîne une augmentation des forces de friction par rapport aux isoformes exprimant MUC1. En effet, l'évaluation du coefficient de frottement et de l'énergie dissipée (figure 3.3 et tableau 3.4) appuie ces résultats. Les paramètres diminuent en présence de MUC1 ($p \leq 0,001$, tableau 3.5). Les coefficients de friction sont de $0,086 \pm 0,011$ pour l'isoforme Non-MUC1 et de $0,076 \pm 0,012$, $0,047 \pm 0,023$ et $0,050 \pm 0,027$ pour les lignées cellulaires exprimant MUC1 (MUC1/Y-LSP, MUC1/VNTR et MUC1/VNTR-NC, respectivement). Nous observons la même tendance pour l'énergie dissipée par frottement tableau 3.4.

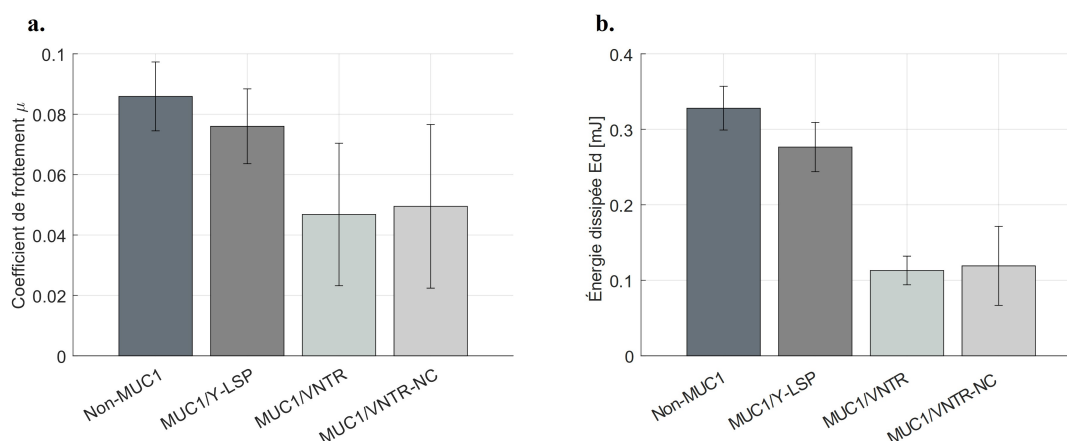


FIGURE 3.3 – (a) Coefficient de friction et (b) Énergie dissipée sur les quatre isoformes de MUC1 sans reconstruction de la PM

MUC1 joue donc un rôle essentiel dans la lubrification de la surface des cellules épithéliales [75]. Le domaine VNTR de MUC1, qui est fortement glycosylé, pourrait contribuer à la rétention des molécules d'eau et à la formation d'un gel (le mucus) [75], favorisant ainsi un environnement hydrophile optimal pour l'hydratation et la lubrification des épithéliums [73, 81]. De plus, en renforçant la lubrification [73], le domaine VNTR

protège l'épithélium sous-jacent. Par conséquent, des variations dans la lubrification des modèles d'épithélium étaient attendues en fonction de la structure de MUC1, en particulier en présence du domaine VNTR. La figure 3.3 illustre ces résultats ($p \leq 0,001$, tableau 3.5). L'isoforme MUC1/Y-LSP, qui ne possède pas le domaine VNTR, montre une lubrification moins efficace ($Ed = 0,28 \pm 0,03 \text{ mJ}$) que les lignées cellulaires composées d'un domaine VNTR fortement glycosylé : MUC1/VNTR et MUC1/VNTR-NC ($Ed = 0,11 \pm 0,02 \text{ mJ}$ et $Ed = 0,12 \pm 0,05 \text{ mJ}$ respectivement), voir tableau 3.4. Cette tendance s'observe aussi sur les résultats du coefficient de frottement tableau 3.4.

Les résultats de ces essais montrent que la protéine MUC1 contribue grandement à la lubrification des surfaces où elle est exprimée. Pour rappel, MUC1 est localisée à la surface apicale des cellules épithéliales, facilitant, avec les mucines sécrétées, la formation du mucus qui assure la lubrification des tissus [82]. Yakubov et al. [66] ont confirmé qu'une augmentation de la concentration de mucine dans un contact entraîne une diminution des forces de friction lors des tests de frottement. D'autres études ont examiné et démontré les effets lubrifiants des mucines sécrétées formant un gel lors d'essais tribologiques [65, 224].

TABLEAU 3.4 – Coefficient de frottement et Énergie dissipée moyens mesurés sans reconstruction de la PM pour chaque isoforme (moyenne \pm écart-type)

Isoformes	Coefficient de frottement	Énergie Dissipée [mJ]
Non-MUC1	$0,086 \pm 0,011$	$0,33 \pm 0,03$
MUC1/Y-LSP	$0,076 \pm 0,012$	$0,28 \pm 0,03$
MUC1/VNTR	$0,047 \pm 0,023$	$0,11 \pm 0,02$
MUC1/VNTR-NC	$0,050 \pm 0,027$	$0,12 \pm 0,05$

TABLEAU 3.5 – Test de Mann-Whitney sur les indicateurs mécaniques pour les 4 isoformes afin de comparer l'effet de la présence de MUC1 sur la lubrification sans reconstruction de la PM. Codes de signification : $0 \leq *** \leq 0.001 \leq ** \leq 0.01 \leq * \leq 0.05 \leq . \leq 0.1 \leq \leq 1$

Isoformes	Isoformes	Coefficient de frottement <i>pvalue</i>	Énergie Dissipée <i>pvalue</i>
Non-MUC1	MUC1/Y-LSP	***	**
Non-MUC1	MUC1/VNTR	***	***
Non-MUC1	MUC1/VNTR-NC	***	*
MUC1/Y-LSP	MUC1/VNTR	***	***
MUC1/Y-LSP	MUC1/VNTR-NC	***	*
MUC1/VNTR	MUC1/VNTR-NC	.	.

Notre étude révèle que la présence du domaine SEA entraîne une légère diminution des forces de friction (μ et Ed) (figure 3.3) sur les modèles d'épithélium, par comparaison avec les forces de friction observées entre les isoformes MUC1/VNTR (composées d'un domaine VNTR et SEA clivable) et MUC1/VNTR-NC (dotées d'un domaine SEA non clivable). Ces diminutions ne présentent pas de significativité (tableau 3.5) pour aucun des paramètres.

L'analyse ACP des spectres Raman (les spectres Raman moyens sont présentés en annexe III de ce manuscrit) distingue les deux isoformes, Non-MUC1 et MUC1/VNTR, ce qui révèle des différences de structure moléculaire et chimique à leur surface, comme le montre la figure 3.4. Ces distinctions sont causées par l'expression de MUC1 par l'isoforme MUC1/VNTR. Le contraste de composition chimique et de structure moléculaire explique les variations de lubrification entre Non-MUC1 et MUC1/VNTR figure 3.3.

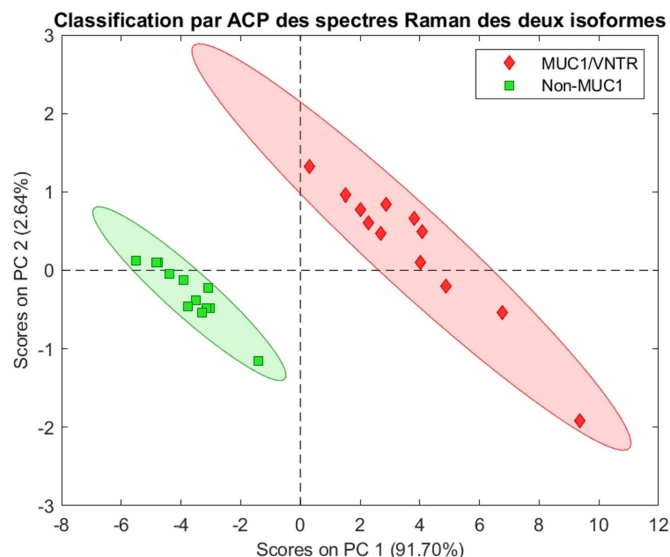


FIGURE 3.4 – ACP sur les spectres Raman des deux isoformes Non-MUC1 et MUC1/VNTR sans PM

III.1.3 Conclusions intermédiaires

Pour conclure sur ces résultats, notre étude montre que la protéine MUC1 participe à la lubrification, comme décrit dans la littérature [75]. Nous confirmons ici, par la tribologie, que l'absence de MUC1 induit un coefficient de frottement et une énergie dissipée plus importants que pour les essais présentant la protéine transmembranaire. Ce résultat signifie que la lubrification est améliorée par la présence de MUC1. De plus, notre travail met en évidence que la structure de MUC1 impacte la lubrification. La comparaison entre les isoformes (MUC1/Y-LSP et MUC1/VNTR - MUC1/VNTR-NC) révèle que le domaine VNTR hautement glycosylé favorise la lubrification, induisant des forces de friction plus faibles en sa présence. Enfin, l'existence d'un domaine SEA clivable semble également contribuer à une diminution des contraintes sur les épithéliums. Ces résultats doivent être confirmés dans le futur, compte tenu de la faible diminution des paramètres et de leur différence non significative. La comparaison entre l'analyse chimique, révélant des différences structurales, et l'analyse tribologique, indiquant des variations de lubrification entre les isoformes, semble confirmer que les structures protéiques de MUC1 participent à la lubrification des épithéliums, figure 3.4.

En conclusion, les variations observées dans la lubrification intrinsèque de chaque isoforme sont causées par des différences de structure. Par exemple, la présence ou l'absence de MUC1, ou encore l'expression ou non d'un domaine VNTR.

III.2 Évaluation du rôle de MUC1 sur les propriétés de lubrification de la pellicule muqueuse

III.2.1 Problématique

Cette partie, contrairement à la précédente, étudie les effets de MUC1 sur la lubrification des épithéliums **après la reconstruction de la PM**. En d'autres termes, elle examine l'impact de MUC1 sur les propriétés de lubrification de la PM à travers sa formation et ses interactions avec les protéines salivaires. Ainsi, nous comparons le comportement tribologique et les propriétés de lubrification des quatre modèles d'épithélium après la reconstruction de la PM.

III.2.2 Résultats et Discussions

La figure 3.5 et le tableau 3.6 présentent le coefficient de frottement, l'énergie dissipée et la surface endommagée par frottement. La figure 3.6 montre les surfaces après frottement de chaque isoforme dans le cas d'une pellicule muqueuse reconstruite.

Le coefficient de friction et l'énergie dissipée diminuent de manière significative ($p \leq 0,001$, voir tableau 3.7) en présence de MUC1, confirmant son rôle dans la promotion de la lubrification de la PM sur nos modèles d'épithélium oral. Pour la lignée cellulaire TR146 (Non-MUC1), le coefficient de friction (μ) et l'énergie dissipée (Ed) sont respectivement de $0,076 \pm 0,014$ et $0,29 \pm 0,03$ mJ. Pour les isoformes de MUC1 (MUC1/Y-LSP, MUC1/VNTR, MUC1/VNTR-NC), les valeurs sont toutes inférieures à celle de Non-MUC1 : ($0,065 \pm 0,011$), ($0,028 \pm 0,013$) et ($0,042 \pm 0,023$) pour μ . Pour Ed ($0,24 \pm 0,02$ mJ), ($0,08 \pm 0,03$ mJ) et ($0,10 \pm 0,03$ mJ), respectivement pour les trois isoformes, voir tableau 3.6. Ces valeurs plus basses indiquent que la présence de MUC1 améliore la lubrification de la pellicule muqueuse, entraînant une réduction des forces de friction.

TABLEAU 3.6 – Coefficient de frottement, Énergie dissipée et Surface endommagée moyens mesurés avec reconstruction de la PM pour chaque isoforme (moyenne \pm écart-type)

Isoformes	Coefficient de frottement	Énergie Dissipée [mJ]	Surface endommagée ($\cdot 10^5$) [μm^2]
Non-MUC1	$0,076 \pm 0,014$	$0,29 \pm 0,03$	$3,15 \pm 0,15$
MUC1/Y-LSP	$0,065 \pm 0,011$	$0,24 \pm 0,02$	$0,71 \pm 0,06$
MUC1/VNTR	$0,028 \pm 0,013$	$0,08 \pm 0,03$	$0,28 \pm 0,27$
MUC1/VNTR-NC	$0,042 \pm 0,023$	$0,10 \pm 0,03$	$0,69 \pm 0,38$

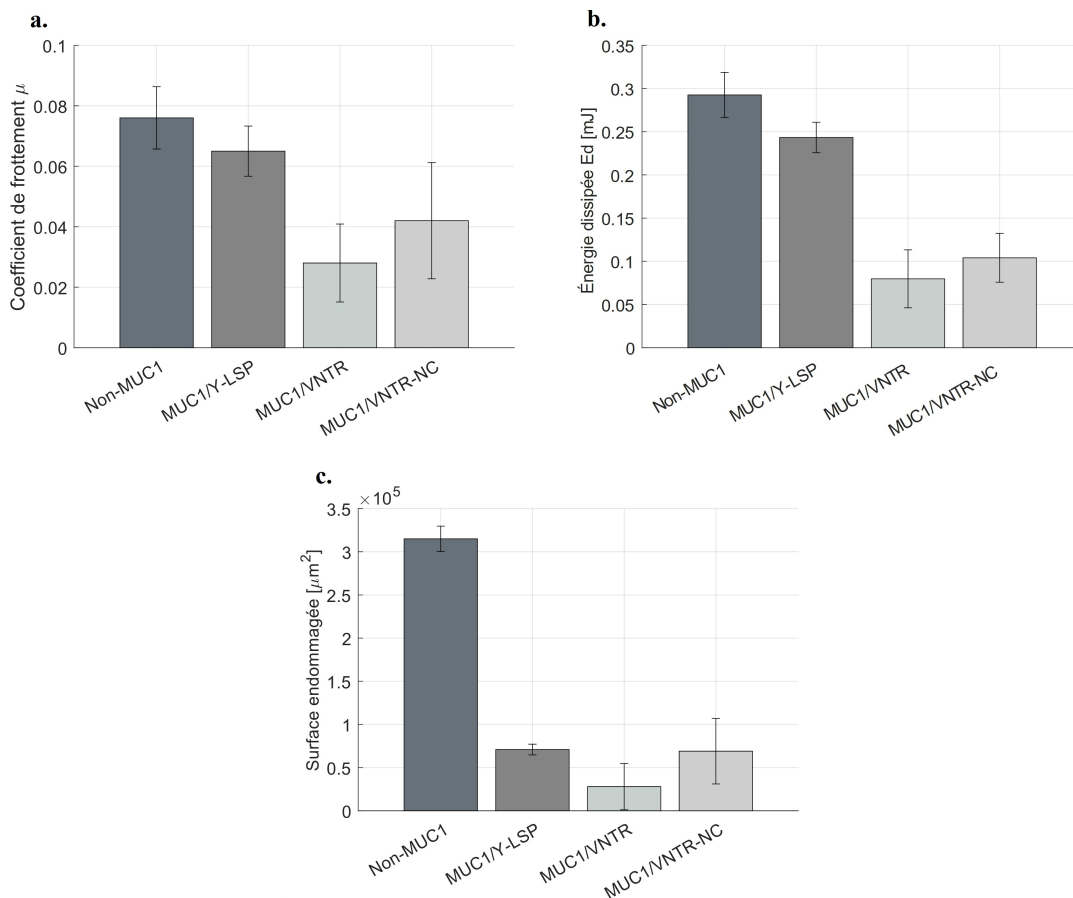


FIGURE 3.5 – (a) Coefficient de frottement, (b) Énergie dissipée et (c) Surface endommagée par frottement obtenus après la formation de la PM sur les modèles d'épithélium oral pour chaque isoforme de MUC1

TABEAU 3.7 – Test de Mann-Whitney sur les indicateurs mécaniques pour les 4 isoformes afin de comparer l'effet de la présence de MUC1 sur les propriétés lubrifiantes de la PM - Codes de signification : $0 \leq *** \leq 0.001 \leq ** \leq 0.01 \leq * \leq 0.05 \leq . \leq 0.1 \leq \leq 1$

Isoformes	Isoformes	Coefficient de frottement	Énergie Dissipée	Surface endommagée
		p_{value}	p_{value}	p_{value}
Non-MUC1	MUC1/Y-LSP	***	**	**
Non-MUC1	MUC1/VNTR	***	***	**
Non-MUC1	MUC1/VNTR-NC	***	***	**

L'évaluation de la surface endommagée après friction (présenté figure 3.5.c et 3.6) confirme ces résultats. Qualitativement, les images de la figure 3.6 révèlent des détériorations plus visibles pour la lignée cellulaire TR146 native (Non-MUC1) que pour les lignées cellulaires TR146 exprimant MUC1 (MUC1/Y-LSP, MUC1/VNTR, MUC1/VNTR-NC). Quantitativement, les dégâts diminuent en présence de MUC1 ($p \leq 0,01$, voir tableau 3.7). Plus précisément, la surface de dégât pour la lignée cellulaire TR146 native est de $(3,15 \pm 0,15) \cdot 10^5 \mu\text{m}^2$, tandis que pour les lignées cellulaires TR146 exprimant les isoformes de MUC1 (MUC1/Y-LSP, MUC1/VNTR, MUC1/VNTR-NC), elle est de

$(0,71 \pm 0,06) \cdot 10^5 \mu\text{m}^2$, $(0,28 \pm 0,27) \cdot 10^5 \mu\text{m}^2$, et $(0,69 \pm 0,38) \cdot 10^5 \mu\text{m}^2$, respectivement, voir tableau 3.6. Cette disparité significative met en évidence l'impact de MUC1 sur la réduction des dommages, soulignant son rôle dans l'amélioration de la fonction protectrice de la pellicule mucosale.

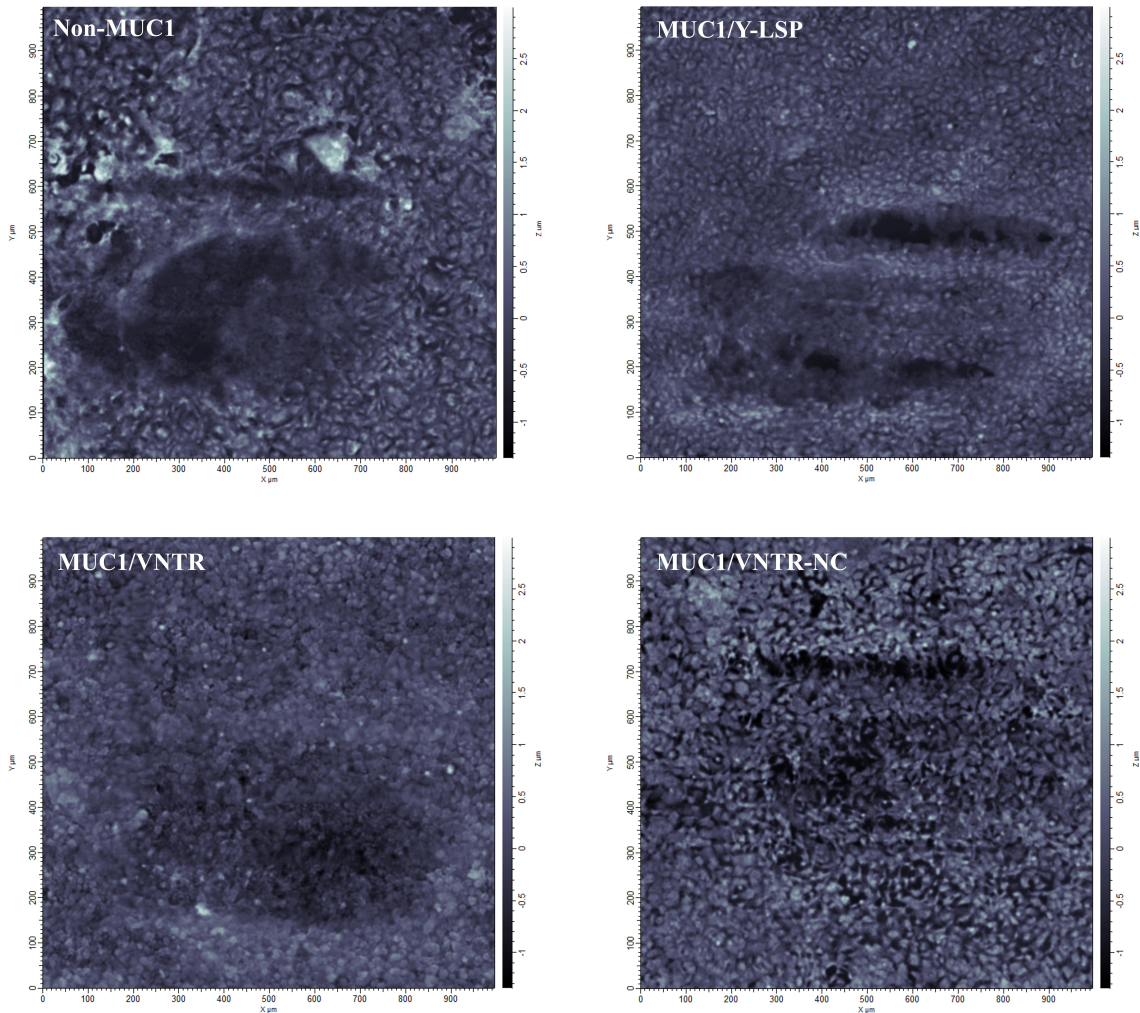


FIGURE 3.6 – Images des surfaces épithéliales après frottement pour chaque isoforme de MUC1 - Les images ont une dimension de $1 \times 1 \text{ mm}^2$.

Nos résultats révèlent des distinctions notables dans les propriétés de lubrification de la PM à travers les différentes lignées cellulaires, avec la lubrification la plus faible observée pour la lignée cellulaire parentale (Non-MUC1). Comme nous le savons, MUC1 améliore l'ancrage des protéines salivaires [25, 68, 282] et influence la composition [324], les propriétés physico-chimiques [68] et la structure de la PM, modulant ainsi la dynamique tribologique. Plus précisément, il a été rapporté que MUC1 augmente la fixation des protéines salivaires, en particulier la mucine MUC5B formant un gel [25, 48, 61, 282], modulant les propriétés lubrifiantes de la PM. Cet ancrage accru de MUC5B à la surface cellulaire épithéliale, facilité par MUC1, contribue probablement à l'augmentation observée des propriétés lubrifiantes de la PM [47, 88, 329-331]. En comparant nos résultats avec ceux d'Aybeke et al. [68], obtenus sur les mêmes modèles cellulaires, nous constatons une parfaite concordance. En effet, les forces de répulsion et d'attraction

(obtenues par mesures AFM) augmentent (en valeurs absolues) en présence de PM et de MUC1. Selon leurs conclusions, ces forces de répulsion et d'attraction sont associées à une meilleure rétention des protéines salivaires, ce qui se traduit par une lubrification améliorée. Ceci est cohérent avec l'évolution de nos coefficients de frottement dans nos essais tribologiques. Nos résultats soutiennent également l'hypothèse de Chang et al. [332], qui suggéraient qu'une diminution de l'expression de MUC1 pourrait entraîner une réduction de la défense de la muqueuse orale, peut-être due à une lubrification réduite. Enfin, les travaux de Nivet et al. [282] ont démontré, par immunomarquage de MUC5B sur les surfaces des mêmes modèles d'épithélium que les nôtres, que l'ancrage de ces mucines sécrétées est renforcé en présence de MUC1, figure 3.7. Nos conclusions tribologiques sont en parfaite cohérence avec ces résultats, indiquant une meilleure lubrification pour les isoformes avec un ancrage accru des protéines salivaires MUC5B. En résumé, nos résultats tribologiques permettent de corroborer les hypothèses de mécanismes moléculaires avancées dans la littérature.

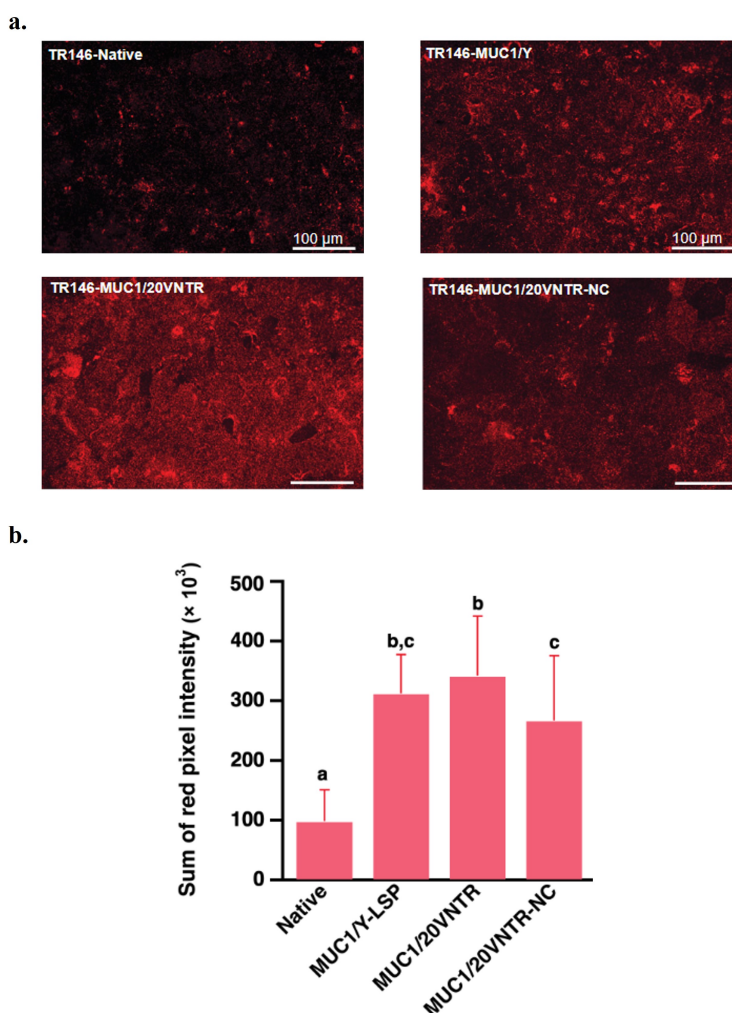


FIGURE 3.7 – (a) Immunomarquage de MUC5B sur les surfaces des cellules TR146 et TR146-MUC1 (b) Semi-quantification de l'immunomarquage via une analyse d'image - Les barres d'échelle représentent $100 \mu m$ - Figure issue des travaux de Nivet et al. [282]

Pour confirmer les conclusions selon lesquelles la présence de MUC1 améliore les propriétés lubrifiantes de la PM, nous comparons par spectroscopie Raman les compositions chimiques des deux isoformes Non-MUC1 et MUC1/VNTR avec une PM reconstruite. Les spectres Raman moyens sont présentés en annexe III de ce manuscrit. Nous observons sur la figure 3.8 que l'ACP différencie très bien les deux isoformes. Cette différenciation caractérise une structure chimique et moléculaire différente à la surface des épithéliums. Cette différence de structure est corrélée avec une différence de comportement tribologique entre les deux isoformes, puisque les indicateurs présentés sur les figures 3.5 et 3.6 ont diminué de manière significative en présence de MUC1. Ainsi, cette analyse Raman permet de confirmer que cette variation de la lubrification entre les isoformes MUC1/VNTR et l'isoforme native (Non-MUC1) est causée par une structure en surface qui est différente. Cette distinction en surface est causée par une meilleure rétention des protéines salivaires MUC5B, comme l'ont montré Nivet et al. et Ployon et al. [7, 8].

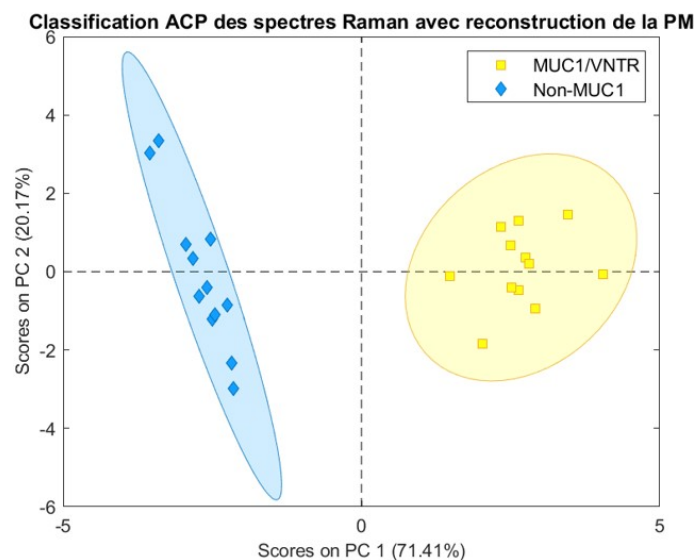


FIGURE 3.8 – Résultat de l'ACP des spectres des deux isoformes : Non-MUC1 et MUC1/VNTR dans le cas de la PM reconstruite

III.2.3 Conclusions intermédiaires

Ces résultats marquent une avancée dans l'étude de l'influence de MUC1 sur les propriétés lubrifiantes de la PM. Notamment, notre travail met en lumière la différence de comportement parmi les isoformes de MUC1, montrant que la lubrification la plus efficace concerne les isoformes qui expriment MUC1. À l'inverse, nous observons des forces de friction et un endommagement plus forts pour l'isoforme Non-MUC1. En effet, cela s'explique par l'amélioration de l'ancrage des protéines salivaires MUC5B par les protéines transmembranaires MUC1. Cette amélioration entraîne de meilleures propriétés lubrifiantes de la PM grâce à MUC1. Cela confirme l'hypothèse selon laquelle MUC1 contribue de manière active à la lubrification de la surface de la muqueuse buccale.

III.3 Analyse de l'effet de la structure de MUC1 sur la lubrification

III.3.1 Étude de la fonction du domaine VNTR dans les propriétés lubrifiantes de la pellicule mucosale

III.3.1.1 Problématique

Nous avons montré dans la partie précédente, l'impact de MUC1 sur les propriétés lubrifiantes de la PM. En sa présence, la lubrification est plus efficace. D'après la littérature l'une de structure de MUC1 qui améliore ces propriétés est le domaine VNTR. Ce domaine est hautement glycosylé et pourrait potentiellement participer à la rétention des protéines salivaires, améliorant ainsi la formation de la PM. Dans cette partie, nous souhaitons vérifier cette hypothèse en comparant la lubrification des isoformes MUC1/Y-LSP, qui n'expriment pas de domaine VNTR, avec les isoformes MUC1/VNTR et MUC1/VNTR-NC qui possèdent ce domaine biologique.

III.3.1.2 Résultats et Discussions

La figure 3.9 et le tableau 3.8 comparent le coefficient de frottement, l'énergie dissipée par frottement et la surface de dégâts entre l'isoforme MUC1/Y-LSP et les isoformes MUC1/VNTR et MUC1/VNTR-NC dans le cas d'une pellicule mucosale reconstruite.

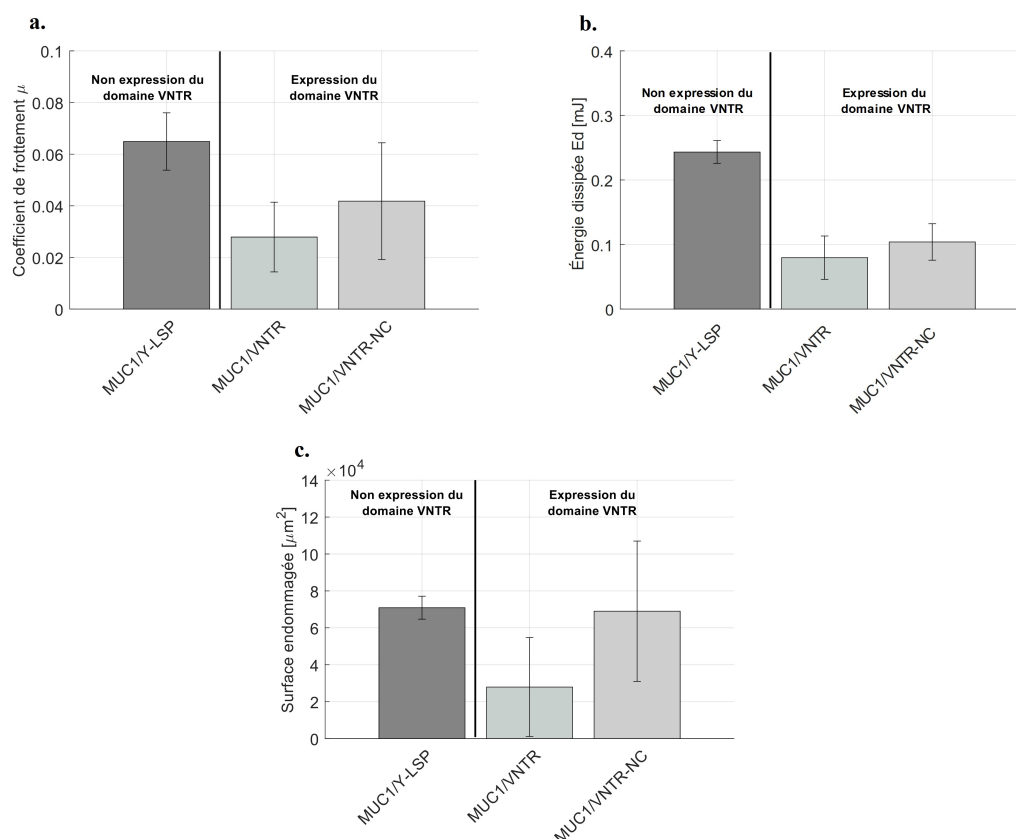


FIGURE 3.9 – Coefficient de frottement (a), Énergie dissipée par frottement (b) et Surface endommagée (c) entre les isoformes n'exprimant pas de domaine VNTR (MUC1/Y-LSP) et les isoformes exprimant ce domaine biologique (MUC1/VNTR et MUC1/VNTR-NC)

TABLEAU 3.8 – Coefficient de frottement, Énergie dissipée et Surface endommagée moyens mesurés avec reconstruction de la PM pour les isoformes exprimant MUC1 (moyenne \pm écart-type)

Isoformes	Coefficient de frottement	Énergie Dissipée [mJ]	Surface endommagée ($\cdot 10^5$) [μm^2]
MUC1/Y-LSP	$0,065 \pm 0,011$	$0,24 \pm 0,02$	$0,71 \pm 0,06$
MUC1/VNTR	$0,028 \pm 0,013$	$0,08 \pm 0,03$	$0,28 \pm 0,27$
MUC1/VNTR-NC	$0,042 \pm 0,023$	$0,10 \pm 0,03$	$0,69 \pm 0,38$

 TABLEAU 3.9 – Test de Mann-Whitney sur les indicateurs mécaniques pour les trois isoformes exprimant MUC1 afin de comparer l'effet de la présence du domaine VNTR sur les propriétés lubrifiantes de la PM. Codes de signification : $0 \leq *** \leq 0.001 \leq ** \leq 0.01 \leq * \leq 0.05 \leq . \leq 0.1 \leq \leq 1$

Isoformes	Isoformes	Coefficient de frottement p_{value}	Énergie Dissipée p_{value}	Surface endommagée p_{value}
MUC1/Y-LSP	MUC1/VNTR	***	***	.
MUC1/Y-LSP	MUC1/VNTR-NC	***	***	.

Le coefficient de frottement pour la lignée cellulaire MUC1/Y-LSP est de ($0,065 \pm 0,011$). En revanche, pour les deux lignées cellulaires exprimant le domaine VNTR (MUC1/VNTR et MUC1/VNTR-NC), les coefficients sont respectivement de ($0,028 \pm 0,013$) et ($0,042 \pm 0,023$). Ces différences sont statistiquement significatives, comme indiqué dans le tableau 3.9. En termes d'énergie dissipée, une tendance similaire se dégage où l'énergie dissipée est plus faible en présence du domaine VNTR : MUC1/Y-LSP présente une E_d calculée de $0,24 \pm 0,02$ mJ, tandis que pour les lignées cellulaires exprimant le domaine VNTR, E_d est de ($0,08 \pm 0,03$ mJ) et ($0,10 \pm 0,03$ mJ) (MUC1/VNTR et MUC1/VNTR-NC respectivement), voir tableau 3.8. Encore une fois, ces distinctions sont statistiquement significatives, comme indiqué dans le tableau 3.9.

En ce qui concerne la surface endommagée après frottement, une analyse qualitative des traces d'usure sur la figure 3.6 indique que le frottement sur la lignée cellulaire MUC1/Y-LSP (sans domaine VNTR) entraîne plus de dégradation que sur les lignées cellulaires exprimant un domaine VNTR (MUC1/VNTR et MUC1/VNTR-NC). La surface endommagée par frottement (présentée dans le tableau 3.8) est très faible et presque identique pour les isoformes MUC1/Y-LSP et MUC1/VNTR-NC. La zone de dégradation pour MUC1/Y-LSP est de ($0,71 \pm 0,06$) $\times 10^5 \mu m^2$. Pour les isoformes présentant le domaine VNTR (MUC1/VNTR et MUC1/VNTR-NC), les surfaces sont respectivement de ($0,28 \pm 0,27$) $\times 10^5 \mu m^2$ et ($0,69 \pm 0,38$) $\times 10^5 \mu m^2$. Les différences ne sont cependant pas significatives pour cet indicateur. Toutefois, une tendance similaire à celle observée pour le coefficient de frottement et l'énergie dissipée est remarquée, avec une diminution de ces paramètres pour les isoformes exprimant le domaine VNTR.

Les résultats présentés ici suggèrent que le domaine VNTR contribue aux propriétés lubrifiantes de la PM, que ce soit de manière indépendante ou de manière synergique avec MUC5B et MUC7. En effet, la nature hautement glycosylée du domaine VNTR

confère des propriétés lubrifiantes intrinsèques à MUC1 [78], comme confirmé précédemment dans ce chapitre section III.1. De plus, la charge négative du domaine VNTR participe à la formation de la pellicule mucosale avec MUC5B par interaction et rétention de molécules d'eau.

Bodega et al. [260] ont observé un coefficient de friction plus élevé dans les cellules tumorales, probablement en raison de l'expression d'une forme de MUC1 avec des anomalies structurelles, perturbant ainsi ses propriétés lubrifiantes (anomalies présentes sur l'isoforme MUC1/Y-LSP). Une autre étude, de Sumiyoshi et al. [86], a confirmé le rôle du domaine VNTR dans la lubrification. Ils démontrent que dans les cellules épithéliales cornéennes, le domaine de glycosylation contribue aux propriétés anti-adhésives du mucus. Des altérations dans ce domaine entraînent une sécheresse de la muqueuse, une condition caractérisée par une augmentation du frottement [86]. Ainsi, nos résultats présentés ici sont en accord avec la littérature et confirment que le domaine VNTR hautement glycosylé participe à la lubrification des épithéliums de manière indépendante (voir section section III.1), tout en contribuant aux propriétés de lubrification de la pellicule mucosale.

III.3.2 L'implication du domaine SEA dans les fonctions lubrifiantes de la PM

III.3.2.1 Problématiques

Pour terminer sur le rôle de la structure de MUC1, nous étudions les fonctions du domaine SEA clivable dans la régulation de la dynamique de la lubrification de nos modèles d'épithélium oral. Pour ce faire, nous avons effectué une analyse comparative entre les deux isoformes distinctes de MUC1 : MUC1/VNTR et MUC1/VNTR-NC. Ces deux isoformes diffèrent par une suppression des 15 acides aminés, correspondant à la séquence d'acides aminés suivante "GVSFFFLSFHISNLQ". Cette élimination des 15 acides aminés entrave la fonction clivable du domaine SEA [77]. MUC1/VNTR-NC et MUC1/Y-LSP partagent cette délétion de 15 acides aminés, formant une structure monomérique par rapport à la structure hétérodimérique de MUC1/VNTR, comme l'illustre la figure 2.1 du chapitre 2.

III.3.2.2 Résultats et Discussions

Les figures 3.10 et 3.6 et le tableau 3.10 illustrent l'évolution des trois paramètres mécaniques pour les deux isoformes étudiées. Nos résultats démontrent clairement une réduction des forces de friction et des niveaux d'endommagement en présence d'une isoforme de MUC1 à deux sous-unités, attribuable au domaine SEA clivable. Par exemple, le coefficient de frottement augmente de manière significative ($p \leq 0.05$, voir tableau 3.11), passant de $(0,028 \pm 0,013)$ pour MUC1/VNTR avec un domaine clivable à $(0,042 \pm 0,023)$ pour MUC1/VNTR-NC avec un domaine SEA non clivable. L'énergie dissipée et la surface de dégâts suivent la même tendance d'augmentation, or les différences ne sont pas significatives, voir tableau 3.11. L'énergie dissipée augmente de $(0,08 \pm 0,03 \text{ mJ})$ à $(0,10 \pm 0,03 \text{ mJ})$ et la surface d'endommagement croît de $(0,28 \pm 0,27) \times 10^5 \mu\text{m}^2$ à $(0,69 \pm 0,38) \times 10^5 \mu\text{m}^2$, ces valeurs sont présentées dans le tableau 3.10. Ces augmentations sont bien marquées et peuvent être attribuées à la perturbation des

forces non covalentes qui lient les deux sous-unités ensemble sous contrainte mécanique [87]. En effet, la présence d'un domaine SEA clivable facilite la division des deux sous-unités α et β . Cette séparation des deux sous-unités a probablement contribué à la dissipation des forces de friction lors de l'essai mécanique, comme suggéré précédemment par Levitin et al. [77].

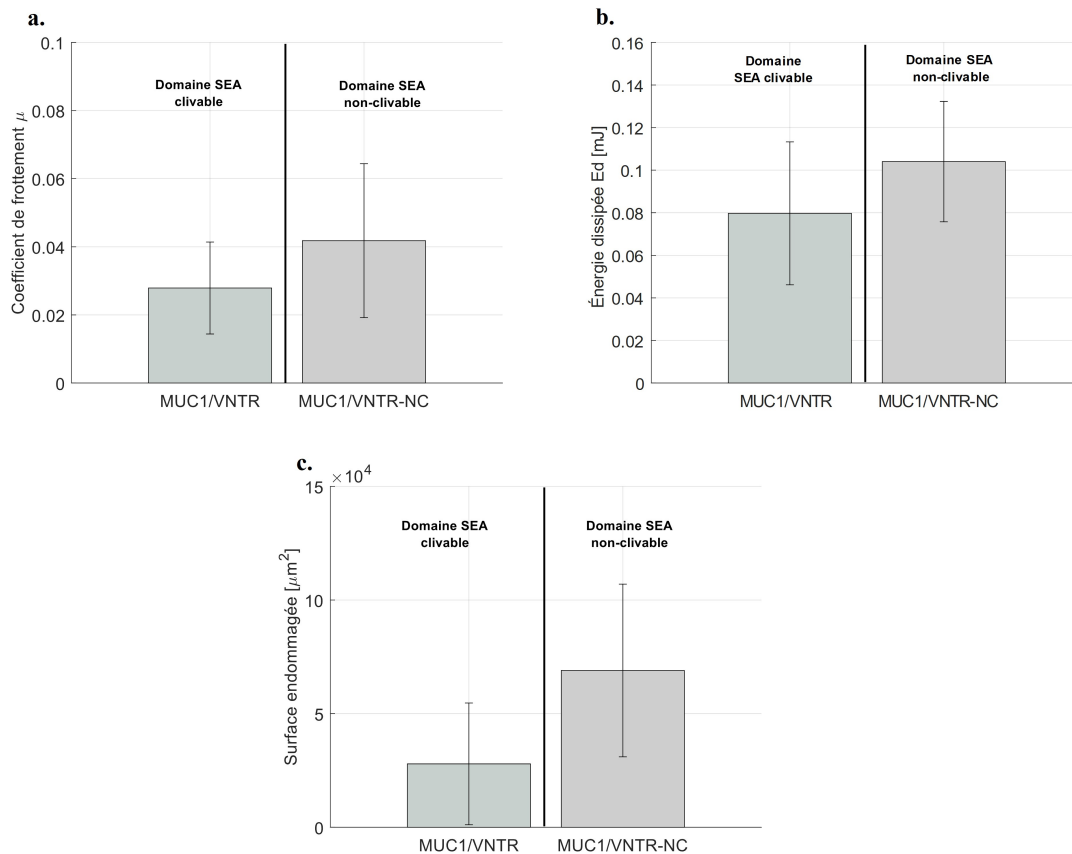


FIGURE 3.10 – Analyse comparative du coefficient de frottement (a), de l'énergie dissipée par frottement (b) et de la surface endommagée (c) entre les isoformes avec un domaine SEA clivable (MUC1/VNTR) et les isoformes avec un domaine SEA non-clivable (MUC1/VNTR-NC)

TABLEAU 3.10 – Coefficient de frottement, Énergie dissipée et Surface endommagée moyens mesurés avec reconstruction de la PM pour les isoformes exprimant un domaine VNTR (MUC1/VNTR et MUC1/VNTR-NC) (moyenne \pm écart-type)

Isoformes	Coefficient de frottement	Énergie Dissipée [mJ]	Surface endommagée ($\cdot 10^5$) [μm^2]
MUC1/VNTR	$0,028 \pm 0,013$	$0,08 \pm 0,03$	$0,28 \pm 0,27$
MUC1/VNTR-NC	$0,042 \pm 0,023$	$0,10 \pm 0,03$	$0,69 \pm 0,38$

TABLEAU 3.11 – Test de Mann-Whitney sur les indicateurs mécaniques pour les deux isoformes exprimant MUC1 avec un domaine VNTR afin de comparer l'effet d'un domaine SEA clivable sur les propriétés lubrifiantes de la PM. Codes de signification : $0 \leq *** \leq 0.001 \leq ** \leq 0.01 \leq * \leq 0.05 \leq . \leq 0.1 \leq \leq 1$

		Coefficient de frottement	Énergie Dissipée	Surface endommagée
Isoformes	Isoformes	<i>p</i> value	<i>p</i> value	<i>p</i> value
MUC1/VNTR	MUC1/VNTR-NC	***	.	.

Il est suggéré que le domaine SEA est clivable pour être capable de se dissocier en réponse à des contraintes mécaniques plutôt qu'à des contraintes chimiques au niveau de la membrane cellulaire apicale. Ce mécanisme sert de mesure de protection pour prévenir la rupture cellulaire, comme discuté par Macao et al. [87]. Pour aller plus loin, il est également suggéré que les cellules peuvent détecter la dissociation de MUC1 à la surface de la muqueuse grâce à des signaux cellulaires, comme le propose également Macao et al. [87]. Ce mécanisme pourrait jouer un rôle dans la sensation d'astringence lors de l'agrégation des tanins sur la pellicule mucosale, comme le propose Canon et al. [34]. Nos résultats valident l'efficacité de ce mécanisme dans la dissipation efficace des forces de friction sous contrainte mécanique à la surface de nos modèles cellulaires, réduisant ainsi les dommages cellulaires. En effet, l'isoforme contenant le domaine SEA clivable présente systématiquement le niveau de dommages le plus faible, associé à des forces de friction plus faibles à sa surface, en accord avec les travaux de la littérature précédemment cités [77, 87].

III.3.3 Conclusions intermédiaires

Cette partie vise à montrer le rôle de certains domaines biologiques de MUC1 dans les propriétés de lubrification de la pellicule mucosale. Ces domaines sont les domaines VNTR richement glycosylés et les domaines SEA clivables ou non. Nos résultats démontrent sans équivoque les rôles collaboratifs à la fois des domaines VNTR et SEA dans l'augmentation des propriétés lubrifiantes globales de la PM. Nous pouvons souligner que la présence d'un domaine VNTR permet une meilleure lubrification intrinsèque des modèles d'épithélium, voir figure 3.3. Il favorise également la rétention des molécules d'eau et la formation d'un gel muqueux [75]. Cela crée un environnement hydrophile optimal pour une synergie avec les protéines salivaires améliorant davantage l'efficacité globale de la lubrification de la PM [73, 81]. Nous constatons l'efficacité du domaine VNTR à travers nos résultats, qui montrent que l'isoforme MUC1/VNTR, exprimant un domaine VNTR, présente les valeurs mécaniques les plus faibles, témoignant d'une meilleure lubrification. Les résultats de Nivet et al. [282] montrent un meilleur ancrage des MUC5B sur les épithéliums exprimant un domaine VNTR par immunomarquage de MUC5B, comme illustré dans la figure 3.7. Ces différences d'ancrage de MUC5B confirment les fonctions de rétention du domaine VNTR, expliquant les meilleures propriétés de lubrification de l'isoforme MUC1/VNTR par rapport aux autres. De plus, le mécanisme d'auto-clivage du domaine SEA sous l'action d'une contrainte mécanique, facilite la division des deux sous-unités de MUC1. Ce mécanisme émerge comme une

stratégie efficace pour dissiper l'énergie résultant d'une sollicitation mécanique à la surface de la muqueuse buccale. Le mécanisme de rupture de ce domaine agit comme une mesure de protection contre la rupture cellulaire lors des phénomènes d'agrégation [87]. Enfin, ce mécanisme de protection est observé à travers nos résultats, l'isoforme présentant un domaine SEA clivable affiche les plus faibles valeurs mécaniques.

Ces essais complètent donc ceux réalisés précédemment. Dans la première partie de notre étude, nous avons mis en évidence les fonctions de lubrification et d'hydratation de MUC1 sur nos modèles d'épithélium. Cette section enrichit notre compréhension des mécanismes de lubrification des épithéliums buccaux en démontrant que la structure particulière de MUC1 est responsable de ses fonctions biologiques de lubrification, d'hydratation et même de protection des épithéliums.

III.4 Étude des propriétés globales de lubrification de la pellicule mucosale

III.4.1 Problématiques

Depuis le début de ce chapitre nous étudions la contribution de MUC1 et de sa structure dans la lubrification des modèles d'épithélium. Que ce soit à travers une lubrification intrinsèque, ou par le biais de l'amélioration des propriétés de lubrification de la PM. En réalisant cette étude, nous avons réalisé des essais avec et sans reconstruction de la PM, cela nous permet donc de comparer l'impact de la PM sur la lubrification des modèles d'épithélium.

III.4.2 Résultats et Discussions

III.4.2.1 Étude des forces de friction

Le tableau 3.12 et la figure 3.11 indiquent le taux de variation du coefficient de friction et de l'énergie dissipée ($\Delta\mu$, ΔEd respectivement) entre les deux conditions : avec et sans reconstruction de la PM. Ces résultats mettent en évidence les propriétés lubrifiantes de la PM en fonction des isoformes de MUC1. À la fois $\Delta\mu$ et ΔEd présentent des valeurs négatives significatives sur toutes les lignées cellulaires ($\Delta\mu < 0$, $\Delta Ed < 0$). Ces résultats établissent de manière indéniable que la PM impacte significativement la diminution des forces de friction à la surface des cellules épithéliales buccales. Cela confirme notre hypothèse initiale concernant son rôle lubrifiant, voir la section 1.3.3 du chapitre 1. Ces résultats sont en accord avec des recherches antérieures. Des investigations tribologiques précédentes sur des surfaces synthétiques (PDMS, agarose) ont également exploré les caractéristiques lubrifiantes d'un film salivaire, rapportant une diminution du coefficient de friction [201], [50]. En revanche, la plupart de ces recherches ont porté sur des matériaux synthétiques, ce qui omet complètement les interactions protéine/protéine. Ces interactions sont évidemment indispensables à la formation d'une pellicule mucosale, comme nous l'avons expliqué dans la section 1.3.2 du chapitre 1. Dans notre travail, la pellicule mucosale a été reconstruite grâce à l'interaction entre les protéines salivaires sécrétées et les protéines transmembranaires MUC1, nous permettant ainsi de former une PM se rapprochant des conditions *in vivo*.

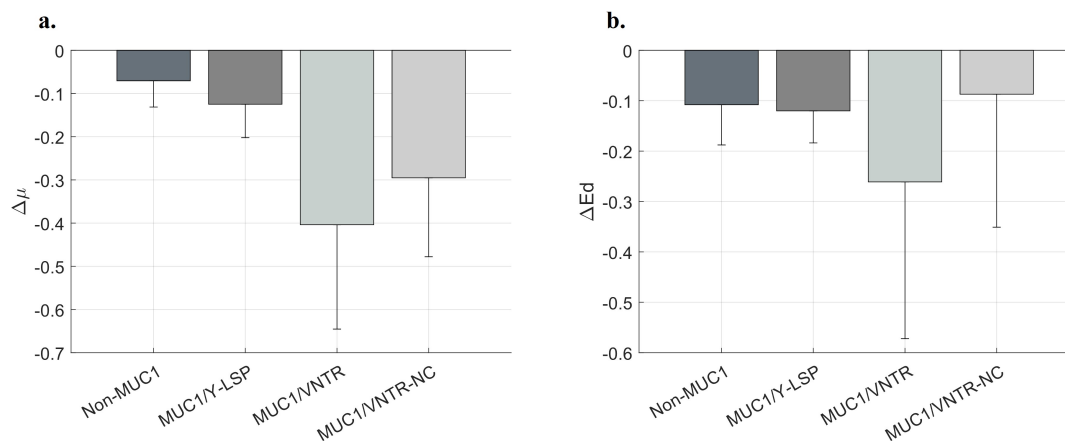


FIGURE 3.11 – Variation du (a) coefficient de frottement et de (b) l'énergie dissipée par frottement avec et sans reconstruction de la PM

Des variations sont observables entre les différentes lignées cellulaires. Les valeurs négatives les plus faibles pour $\Delta\mu$ et ΔEd sont observées pour la lignée cellulaire parentale TR146 (Non-MUC1), qui n'exprime pas MUC1, avec des valeurs de $-11,7\%$ et $-10,8\%$, respectivement. Les deuxièmes valeurs les plus basses ont été enregistrées pour MUC1/Y-LSP, exprimant une isoforme tronquée de MUC1 sans le domaine VNTR et avec un domaine SEA non clivable ($\Delta\mu = -14,6\%$ et $\Delta Ed = -12,0\%$). Les valeurs négatives les plus prononcées sont obtenues pour la lignée cellulaire TR146 MUC1/VNTR ($-40,4\%$ et $-29,4\%$, respectivement), comprenant le domaine VNTR et un domaine SEA clivable. En revanche, l'isoforme MUC1/VNTR-NC, caractérisée par un domaine SEA non clivable, présente les deuxièmes valeurs négatives les plus élevées ($-15,4\%$ et $-12,7\%$ respectivement). Ces résultats sont rapportés dans le tableau 3.12. Ils soulignent l'influence de la structure de MUC1 sur les propriétés lubrifiantes de la PM, et confirment la tendance que nous avons observé pour les conclusions précédentes. C'est-à-dire que la présence de MUC1 améliore la lubrification tout comme le domaine VNTR glycosylé. Enfin le caractère clivable du domaine SEA participe aussi à une meilleure lubrification.

TABLEAU 3.12 – Taux de variation du coefficient de friction ($\Delta\mu$) et de l'énergie dissipée (ΔEd) pour chaque lignée cellulaire entre les deux conditions : sans et avec la reconstruction de la PM

Isoforme	Variation du coefficient de frottement $\Delta\mu$ (%)	Variation de l'énergie dissipée ΔEd (%)
Non-MUC1	-11,7	-10,8
MUC1/Y-LSP	-14,6	-12,0
MUC1/VNTR	-40,4	-29,4
MUC1/VNTR-NC	-15,4	-12,7

III.4.2.2 Exploration de l'effet de la PM sur la force d'adhésion

La force d'adhésion (F_{ad}) peut être un paramètre très intéressant pour caractériser les propriétés physico-chimiques de surface. Pour cette étude, nous mesurons F_{ad} avec et sans reconstruction de la PM afin d'étudier son effet sur les propriétés de surface des

modèles d'épithélium. Ces essais sont réalisés uniquement sur l'isoforme MUC1/VNTR, car c'est la lignée cellulaire la plus proche de l'épithélium oral *in vivo*. F_{ad} peut être un marqueur intéressant pour indiquer la présence de la PM.

Le tableau 3.13 montre qu'en présence d'une PM reconstruite, la force d'adhésion est plus élevée, caractérisant une adhésion plus importante entre l'indenteur et le modèle d'épithélium. F_{ad} passe de -0.43 ± 0.09 mN dans le cas où la PM n'est pas reconstruite à -0.53 ± 0.13 mN pour une PM reconstruite. Cette différence permet de confirmer en premier lieu la présence de la PM, ses propriétés sont bien perçues par la mesure de la force d'adhésion. Cette variation montre également une différence des propriétés physico-chimiques de surface entre les deux conditions. Ces modifications sont causées par l'ancrage des protéines salivaires telles que MUC5B et MUC7, permettant la formation de la PM et donc créant un environnement de lubrification et d'hydratation [64, 65]. Ces résultats sont en cohérence avec les observations du coefficient de frottement et de l'énergie dissipée. La présence de la PM induit des modifications de la chimie de surface qui permettent d'améliorer la lubrification et l'hydratation des épithéliums.

Toutefois, pour valider ces résultats, il serait pertinent d'examiner l'énergie de surface après les tests d'indentation. Cette analyse permettrait de vérifier si les différences observées ne résultent pas d'effets d'adhérence liés à la présence d'eau à la surface.

TABLEAU 3.13 – Force d'adhésion calculée après essais d'indentation sur l'isoforme MUC1/VNTR dans deux conditions : avec et sans reconstruction de la PM

Conditions	Sans reconstruction de la PM	Avec reconstruction de la PM
F_{ad} (mN)	-0.43 ± 0.09	-0.53 ± 0.13

Ces modifications des paramètres de surface sont détectables par spectroscopie Raman, comme le montre la figure 3.12 (les spectres Raman moyens sont présentés en annexe III de ce manuscrit). En effectuant une analyse en composantes principales (ACP), nous distinguons les deux conditions expérimentales (avec et sans la PM reconstruite) pour les isoformes Non-MUC1 et MUC1/VNTR. Cette distinction des spectres Raman traduit une variation des profils chimiques à la surface des modèles cellulaires causé par la reconstruction de la PM et la présence de protéines salivaires.

Nivet et al. [7] ont montré également que la reconstruction de la PM induisait des modifications de composition chimique de surface (observées par nanospectroscopie infrarouge), comme nous l'avons remarqué par spectroscopie Raman. Ils ont démontré que la comparaison des spectres infrarouges entre les Non-MUC1 et les Non-MUC1 avec une PM reconstruite montrait des différences dans les profils chimiques. Ces résultats montrent une présence massive de protéines salivaires (comme MUC5B) ancrées à la surface après la formation de la PM.

Ces changements sont donc provoqués par l'ancrage des protéines salivaires, entraînant ainsi une meilleure lubrification que nous observons dans nos résultats tribologiques. En conclusion, nous pouvons affirmer que les modifications chimiques de surface entraînent des évolutions dans la lubrification des modèles d'épithélium.

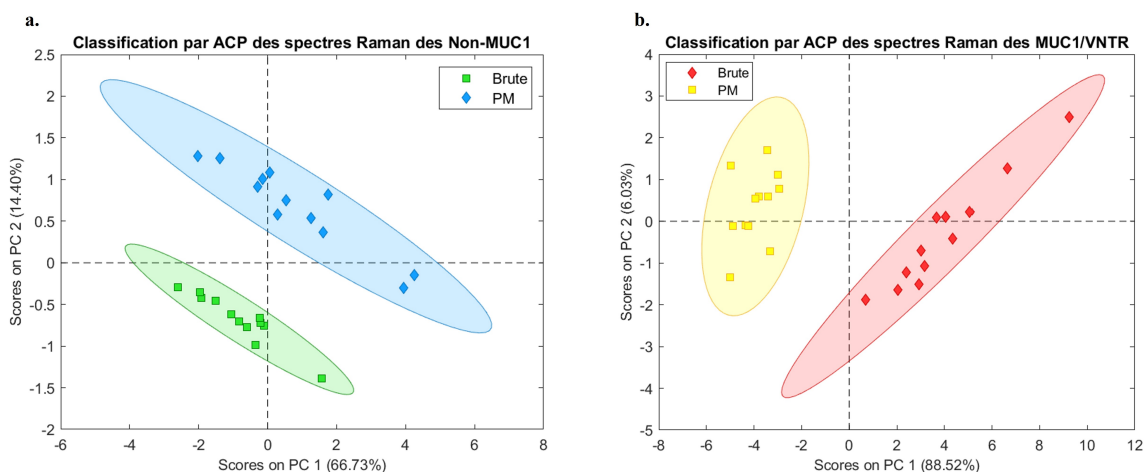


FIGURE 3.12 – ACP sur les spectres Raman des deux isoformes (a) Non-MUC1 et (b) MUC1/VNTR entre les conditions expérimentales : Brute (sans reconstruction de la PM) et PM (avec reconstruction de la PM)

III.4.3 Conclusions intermédiaires

Cette partie a permis de confirmer le rôle de la PM sur nos modèles d'épithélium. Plusieurs conclusions résultent de nos essais expérimentaux. La première consiste à valider les propriétés de lubrification de la PM. En comparant les indicateurs de lubrification entre les deux conditions d'essai (avec et sans PM), nous observons que les taux de variation ($\Delta\mu$ et ΔEd) sont toujours négatifs. Cela témoigne d'une diminution des forces de friction à la surface de nos modèles d'épithélium. Ces résultats confirment sans équivoque l'impact significatif de la PM sur la réduction des forces de friction, validant ainsi notre hypothèse initiale concernant son rôle de lubrification et d'hydratation. La deuxième conclusion concerne l'effet de la PM sur les propriétés physico-chimiques de surface. Nos résultats montrent qu'après la formation de la PM, la force d'adhésion à la surface des modèles d'épithélium augmente. Cette augmentation traduit une modification des propriétés de surface, due à l'ancrage spécifique des protéines salivaires formant la PM. Ces modifications sont confirmées par la variation des profils chimiques à la surface des modèles cellulaires après la reconstruction de la PM.

Ces deux conclusions se corroborent parfaitement car elles montrent que la formation de la PM des épithéliums entraîne une modification des paramètres de surface, ce qui induit une meilleure lubrification et hydratation.

IV Conclusions et bilan du chapitre

Cette étude a fourni des informations précieuses sur le rôle essentiel joué par MUC1 ainsi que ses domaines VNTR et SEA dans l'influence des propriétés de lubrification de la pellicule mucosale et de la lubrification intrinsèque de l'épithélium. De plus, ces résultats soulignent la fonction de la pellicule mucosale en tant que lubrifiant, atténuant efficacement les forces mécaniques agissant sur la muqueuse orale.

Les conclusions établies dans ce chapitre sont attribuées à plusieurs facteurs. Tout d'abord, l'amélioration de la lubrification implique une augmentation du nombre de pro-

téines salivaires ancrées, contribuant à la formation de la PM grâce à la présence de MUC1. En effet, MUC1 semble améliorer la rétention des molécules d'eau, augmentant ainsi l'ancrage des protéines salivaires, figure 3.7. L'amélioration de nos résultats tribologiques sont liées à la présence de MUC1 attribuées à une augmentation de l'ancrage des protéines salivaires. Ensuite, nos résultats démontrent de manière indéniable les rôles collaboratifs à la fois des domaines VNTR et SEA dans l'augmentation des propriétés de lubrification globales de la PM. La présence du domaine VNTR améliore les propriétés lubrifiantes, et semble également agir en synergie avec les protéines salivaires. Ces mécanismes améliorent l'efficacité globale de la lubrification de la pellicule mucoale. De plus, le mécanisme d'auto-clivage du domaine SEA, facilitant la dissociation des deux sous-unités de MUC1, apparaît comme une stratégie efficace pour dissiper l'énergie résultante des contraintes mécaniques à la surface de la muqueuse buccale. En résumé, notre travail met en avant le rôle de MUC1 et de sa structure dans les propriétés de lubrification de la PM. Enfin, les conclusions de ce travail confirment bien les fonctions biologiques d'hydratation et de lubrification de la PM.

Ce travail novateur repose sur l'utilisation de nouveaux modèles de muqueuse buccale composés de cellules exprimant diverses isoformes de MUC1. Les essais tribologiques réalisés sur ces modèles cellulaires ont permis d'observer des phénomènes et des mécanismes moléculaires, conduisant à des conclusions sur des symptômes et des marqueurs purement macroscopiques. L'intérêt principal de ces protocoles et du dispositif mécanique réside dans la possibilité d'étudier ces mécanismes purement moléculaires, tels que l'amélioration de l'ancrage des protéines salivaires ou le rôle des domaines VNTR et SEA, en observant les effets macroscopiques qui en découlent. Ces nouveaux protocoles ouvrent des perspectives très intéressantes pour l'étude de nombreux mécanismes moléculaires encore difficilement compris dans de nombreux domaines, notamment en santé. La comparaison des isoformes MUC1/Y-LSP a permis de montrer que nos protocoles sont capables d'étudier les effets de protéines à caractère pathologique. En effet, les formes pathologiques de MUC1 présentent des anomalies structurales comme MUC1/Y-LSP, réduisant grandement leurs fonctions de lubrification. Ces anomalies sont observées grâce à l'analyse des fonctions biologiques de MUC1/Y-LSP qui montre une diminution de sa lubrification par rapport aux isoformes se rapprochant des formes saines de MUC1 (MUC1/VNTR et MUC1/VNTR-NC). Ces modèles cellulaires de muqueuse buccale présentent également un potentiel prometteur dans le domaine de la perception et de l'agroalimentaire. Ils sont des outils précieux pour étudier les rôles multifacettes de MUC1 et de la pellicule mucoale, notamment dans l'astringence et aussi dans d'autres aspects de la perception des saveurs, tels que la persistance des arômes. Ces résultats approfondissent notre compréhension de l'interaction complexe entre les mucines, la lubrification buccale et les expériences sensorielles, ouvrant de nouvelles voies pour la recherche future dans ce domaine.

La figure 3.13 synthétise les étapes principales de ce chapitre, à savoir le dépôt de saliva sur les épithéliums, la formation de la pellicule mucoale, et les essais tribologiques.

Cette illustration résume les principales conclusions de ces travaux. Nous constatons dans la figure 3.13 Étape 2 que le nombre de protéines salivaires attachées à la surface

des épithéliums varie en fonction de l'isoforme. Il augmente avec la présence de MUC1 et il augmente davantage en présence de ses domaines biologiques d'intérêt. Par la suite, l'étape 3 démontre que la lubrification (quantifiée par le nombre de protéines salivaires sur le schéma) est plus importante en présence de MUC1. De plus, la forme tronquée montre une lubrification moindre lors du frottement, car la rétention des protéines salivaires est limitée par rapport aux protéines MUC1 exprimant des domaines VNTR et SEA. Ainsi, cette figure résume l'influence de MUC1 et de sa structure sur la lubrification des épithéliums.

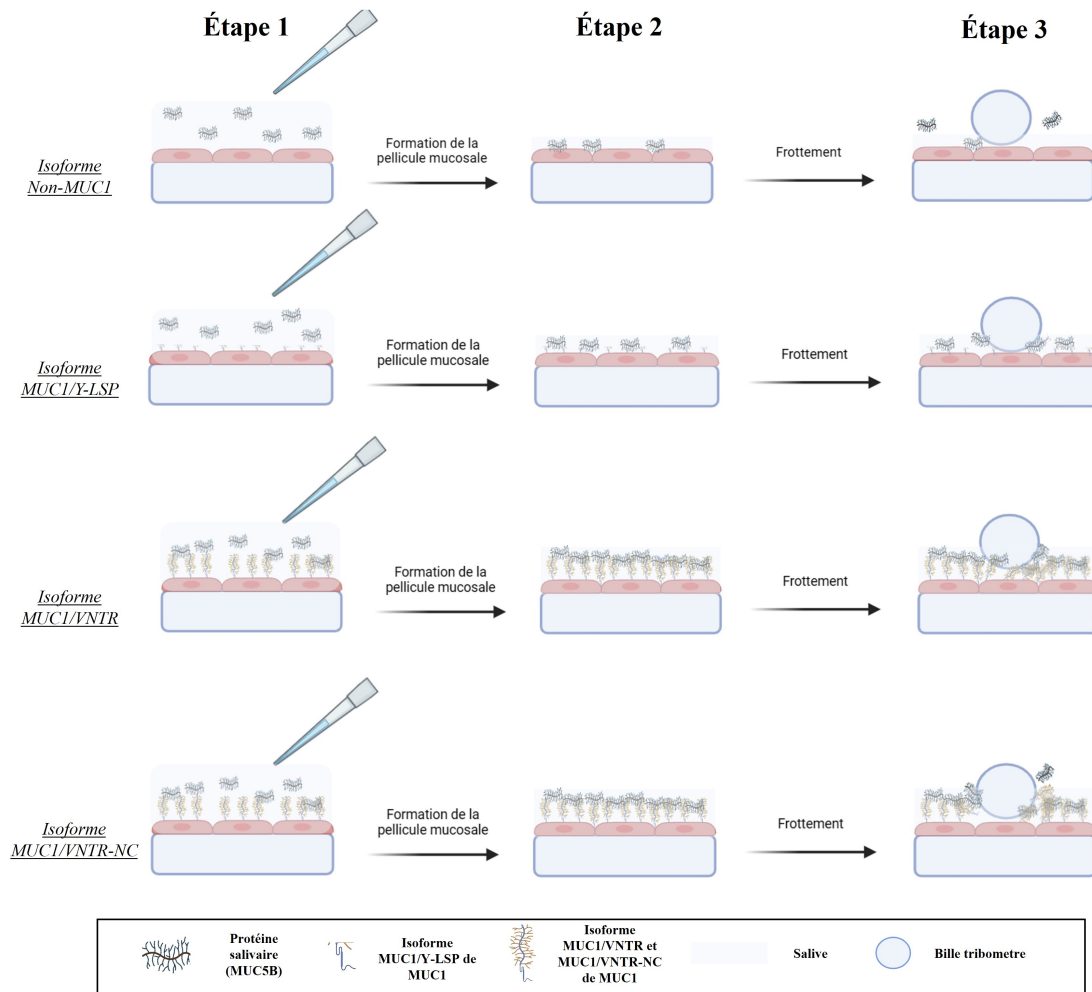


FIGURE 3.13 – Schéma de synthèse des conclusions obtenues dans le chapitre 3 du manuscrit

La suite de ce manuscrit présentera l'analyse des mécanismes moléculaires de l'astringence, avec pour objectifs de détailler et de comprendre les effets de l'astringence sur la lubrification, ainsi que de comprendre en détail le rôle joué par MUC1 et d'autres protéines.

Chapitre 4

Influence des composés astringents et rôle protecteur des protéines riches en proline

SOMMAIRE

I	INTRODUCTION	123
I.1	Problématique	123
I.2	Stratégie de recherche	124
II	PROTOCOLES	125
II.1	Collection de la salive	125
II.2	Modèles d'épithélium	125
II.3	Protocoles de mesures mécaniques	127
II.4	Analyses physico-chimiques	128
II.5	Indice de tension	128
II.6	Analyses statistiques	132
III	ÉTUDES EXPÉRIMENTALES	132
III.1	Impact de l'ajout de tanins sur la lubrification	132
III.2	Corrélation de nos résultats tribologiques avec un modèle d'intensité de l'astringence	149
III.3	Étude de l'influence des protéines végétales sur la lubrification et comparaison avec une protéine d'origine animale	151
III.4	Exploration du rôle protecteur des PRP	157
IV	CONCLUSIONS ET BILAN DU CHAPITRE	163

I Introduction

I.1 Problématique

Le contexte écologique mondial actuel incite les professionnels de l'industrie agro-alimentaire à réduire la consommation de viande, en la substituant par des protéines d'origine végétale. Cependant, l'usage de ces produits est freiné par leur arôme, leur amertume et surtout leur astringence [4]. Ainsi, il est crucial d'améliorer l'acceptabilité des produits alimentaires végétaux durables, afin de favoriser leur incorporation dans les régimes alimentaires.

L'astringence se caractérise par une sensation de sécheresse et de rugosité en bouche, particulièrement notable entre la langue et le palais après la déglutition [40]. Cette sensation complexe est étudiée en raison de son importance dans l'alimentation de produits d'origine végétale, comme le vin, le chocolat, le thé, les fruits et les produits à base de protéines végétales [168-170, 183]. La notion d'astringence est complexe, avec des définitions et des origines variables selon les hypothèses scientifiques [171]. Les composants responsables de cette sensation sont bien identifiés, principalement les polyphénols [127]. Les polyphénols sont des molécules organiques présentes dans les aliments d'origine végétale. Deux modèles expliquent les mécanismes sous-jacents à l'astringence.

Le premier modèle considère l'astringence comme une sensation dépendante de bio-récepteurs, où les composés phénoliques activent les cellules des nerfs trigéminaux ou gustatifs, engendrant ainsi cette sensation particulière [127, 170, 176]. Par exemple, des études ont montré que certains composés peuvent inhiber le transport intracellulaire des ions dans l'épithélium lingual canin, contribuant ainsi à la perception de l'astringence [174]. Cependant, d'autres recherches ont indiqué que l'astringence peut être perçue même en l'absence de récepteurs, suggérant que d'autres mécanismes interviennent [175].

Le deuxième modèle repose sur un phénomène mécanique qui propose que les mécanorecepteurs oraux interviennent. Selon cette hypothèse, les polyphénols se lient, s'agrègent et précipitent les protéines salivaires spécifiques de la PM, ce qui entraîne une réduction de son pouvoir lubrifiant à la surface de la muqueuse buccale [3, 192]. Pour rappel, la PM est une fine couche à la surface de la muqueuse orale, composée notamment de protéines salivaires telles que MUC5B, MUC7 et les protéines riches en prolines (PRP) [45, 48]. Ces protéines sont fixées à l'épithélium par interaction avec MUC1 [8, 34]. Bien que cette PM contribue à la lubrification de la muqueuse, son pouvoir lubrifiant diminue après exposition à des substances astringentes [70]. Ainsi, l'agrégation des composants astringents avec les protéines salivaires provoque une rupture de la PM à la surface de la cavité buccale conduisant à une réduction de la lubrification [52]. Cette perte de lubrification engendre la sensation d'astringence, pouvant se caractériser par une augmentation des forces de friction mesurées par les mécanorecepteurs oraux [127, 170, 183, 204, 210, 241]. Plusieurs auteurs ont étudié cette diminution de la lubrification sur des surfaces synthétiques [167, 170, 182, 262]. Par exemple, Agorastos et al. [171] ont observé que l'ajout de polyphénols entraîne une augmentation de la friction due à la

dégradation du film salivaire sur du PDMS. D'autres études ont également examiné l'effet direct de certains aliments tels que le vin, le thé ou le lait sans isoler le polyphénol sur des matériaux synthétiques à l'aide de tests tribologiques et de mesures de force pour surveiller les changements de lubrification [168]. Cependant, ces études se limitent à l'exploration de la lubrification sur des matériaux synthétiques, ne prenant pas en compte les différences entre le film salivaire adsorbé sur des surfaces telles que le PDMS et la PM humaine [34].

Parmi les protéines salivaires, les PRP apparaissent comme des acteurs majeurs dans l'interaction avec les composés astringents. Les PRP ont une forte affinité pour les tanins, ce qui leur permet de se lier à ces derniers et de former des complexes protéiques stables. Les études sur ces complexes tanin-PRP ont conduit à l'hypothèse que les PRP participent au mécanisme de défense de la muqueuse contre les tanins [193].

I.2 Stratégie de recherche

Les approches expérimentales développées dans ce travail reposent sur la nouvelle hypothèse présentée par Canon et al. [34]. Ils proposent d'intégrer le rôle de la protéine MUC1 dans les mécanismes physiques permettant la perception de l'astringence (figure 1.19). Cette protéine serait impliquée par le biais de modifications structurales, notamment le clivage de ses deux sous-unités α et β . MUC1 est organisée en deux domaines : une partie (β) ancrée dans la membrane et une partie extracellulaire (α) composée d'un domaine VNTR richement glycosylé séparé par une partie clivable (nommée domaine SEA).

L'objectif principal de l'étude présentée dans ce chapitre est d'explorer l'effet des tanins sur la lubrification de nos modèles d'épithélium et l'implication de la protéine MUC1 dans ces mécanismes physiques. Cela implique d'évaluer l'impact de la présence de MUC1, particulièrement sa structure. De plus, cette étude examine l'influence des protéines d'origine végétale en comparaison avec une protéine d'origine animale. Ce travail étudie également le rôle protecteur des PRP afin de déterminer leur influence sur l'effet des tanins. Le schéma de la figure 4.1 récapitule les différents axes de travail étudiés dans ce chapitre.

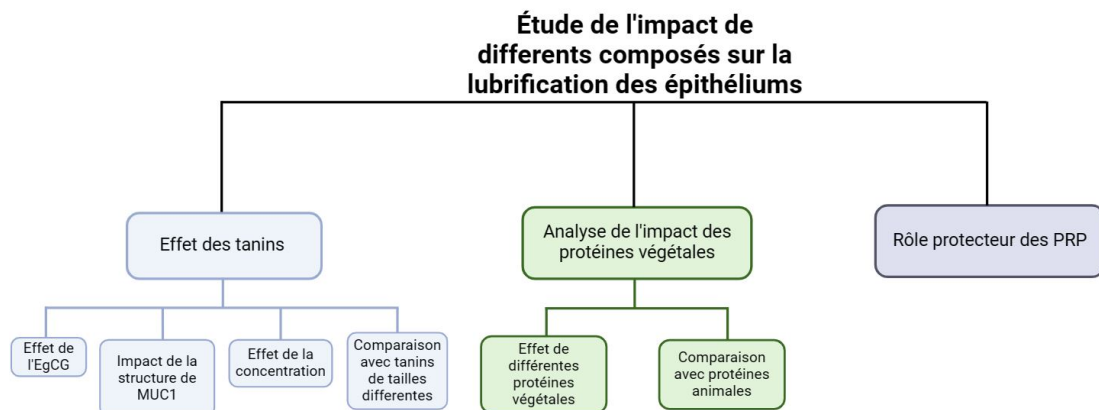


FIGURE 4.1 – Schéma du plan d'expérience du chapitre 4, illustrant les éléments étudiés et caractérisés - L'effet des tanins et des protéines d'origine végétale ainsi que l'impact des PRP sur la lubrification des épithéliums

Pour répondre à ces objectifs, des essais tribologiques *in vitro* sont réalisés sur les modèles de muqueuses orales. Comme décrit précédemment dans le tableau 2.1, ces modèles se composent d'une première couche qui est un épithélium oral *in vitro*, simulant un tapis cellulaire monocouche. Nous travaillons avec les quatre isoformes de MUC1 obtenues par transfection de la lignée cellulaire TR146. La seconde couche est constituée d'une lame de verre agissant comme substrat. Ces essais sont menés à l'aide du biotribomètre développé durant ces travaux de thèse, voir Chapitre 2 section II.1, permettant d'explorer les interactions complexes entre la PM et les composés astringents. Des paramètres tribologiques tels que le coefficient de frottement, l'énergie dissipée par le frottement et la surface endommagée sont mesurés et utilisés comme indicateurs de l'état de lubrification.

Deux nouveaux paramètres sont introduits pour caractériser l'agrégation des tanins à la surface des épithéliums. Le premier critère est le spectre SMA, qui fournit une signature de rugosité de la surface. Le second paramètre est le NAD qui caractérise également la rugosité et plus particulièrement les irrégularités de la surface épithéliale. Ainsi, les paramètres SMA et NAD fournissent des informations sur la topographie multi-échelle des surfaces, caractérisant la formation des agrégats à la surface des épithéliums. Ces informations nous permettent d'étudier la cohérence entre le comportement tribologique et la formation des agrégats dans les différentes conditions expérimentales étudiées ici, voir figure 4.1.

Enfin, la signature chimique est étudiée par spectroscopie Raman pour observer les effets des tanins sur la chimie de surface des épithéliums.

II Protocoles

II.1 Collection de la salive

La procédure de collecte de la salive est alignée sur le protocole détaillé dans le Chapitre 3. Elle est réalisée en stricte conformité avec les principes énoncés dans la Déclaration d'Helsinki, et avec le consentement éclairé des participants. Les salives ont reçu l'approbation du Comité d'éthique pour la recherche (CPP Est I. Dijon, #14.06.03, ANSM #2014-A00071-46). Des mesures sont prises pour garantir que les sujets ne consomment ni nourriture, ni boisson, ni tabac dans les deux heures précédant la collecte. Les échantillons de salive recueillis correspondent à des salives non-stimulées.

II.2 Modèles d'épithélium

Les quatre modèles d'épithélium utilisés dans cette étude expriment chacun l'une des quatre isoformes distinctes de MUC1, comme exposé dans la section I.1.1 du Chapitre 2.

- **Non-MUC1** : la forme native de la lignée TR146, qui n'exprime pas la mucine MUC1
- **MUC1/Y-LSP** : cellules TR146 transfectées qui expriment une forme tronquée de MUC1, plus courte que sa forme physiologique

- **MUC1/VNTR** : cellules TR146 transfectées qui expriment une forme de MUC1 proche de la structure physiologique avec des domaines biologiques d'intérêt tels que le domaine VNTR et le domaine SEA clivable
- **MUC1/VNTR-NC** : cellules TR146 transfectées qui expriment MUC1 avec une structure proche de l'isoforme MUC1/VNTR, avec un domaine SEA non clivable

Ces isoformes sont synthétisées sur la figure 2.1, répertoriées dans le tableau 2.1. Le processus détaillé de préparation des échantillons est décrit dans la section 1.1 du Chapitre 2.

II.2.1 Reconstruction de la pellicule mucosale

La pellicule mucosale est reconstituée à la surface des modèles suite à une incubation de 2 heures (37 °C, 7.5% CO2 et 100% d'humidité) avec une solution combinant de la salive et du milieu de culture (rapport 1 : 1). À la fin de cette incubation, les cellules sont lavées deux fois avec du PBS pour éliminer la salive non fixée à l'épithélium, laissant ainsi uniquement la pellicule mucosale ancrée à celui-ci.

II.2.2 Solution de tanins et exposition au modèle d'épithélium.

Deux tanins sont évalués dans cette étude : l'(-)-Épigallocatechine gallate (EgCG), considéré comme notre référence, et l'acide tannique dont les formules chimiques sont représentées par la figure 4.2.

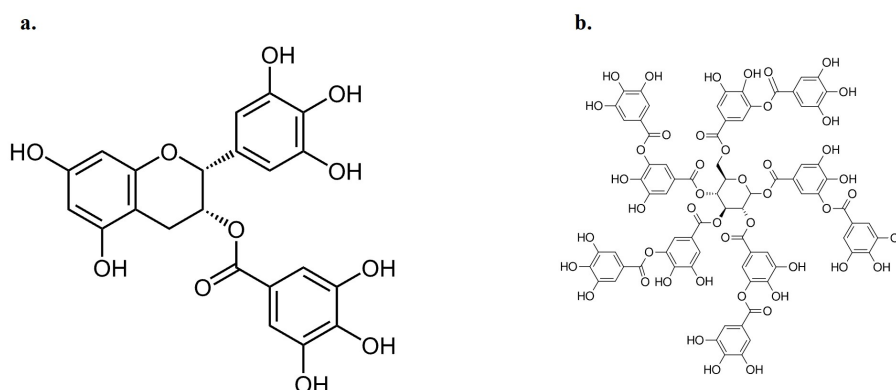


FIGURE 4.2 – Formules chimiques de (a) l'EgCG et de (b) l'acide tannique

L'EgCG est acheté auprès de Sigma Aldrich (E4143, *Sigma Aldrich, USA*). Pour les essais de friction, six concentrations d'EgCG sont testées : 0 - 0,1 - 0,25 - 0,5 - 0,75 - 1 *mM*. Ces concentrations sont sélectionnées pour se situer autour des seuils de détection sensorielle de l'EgCG, évalués à 0,54 *mM* [333].

L'acide tannique nous est fourni par le CSGA (Dijon, France). La concentration étudiée est de 1 *g/L*, dépassant ainsi le seuil de perception sensorielle établi à 0,1 *g/L* [334]. Ces tanins sont dilués dans du PBS pour obtenir une solution tannique.

Après la formation de la pellicule mucosale et avant les essais de friction, les solutions de tanins sont déposées sur les épithéliums pendant 10 minutes dans un incubateur réglé à 37 °C et 7,5% de CO2. Après cette période, les solutions sont retirées.

II.2.3 Solution de protéines végétales et animales et exposition au modèle d'épithélium

Dans ce chapitre, nous examinons l'effet de deux protéines végétales : la protéine de pois PP (W065B, *Roquette, France*) et la protéine de fève (FBPP) (062289, *AGT Poortman, UK*). Nous les comparons à une protéine d'origine animale, la gélatine porcine (04055, *Merck, Allemagne*) fournie par le CSGA (Dijon, France).

Les solutions protéiques sont préparées à une concentration massique de 2% dans du PBS. Après la formation de la pellicule mucosale, de la même manière que pour les solutions de tanins, la solution protéique est déposée sur les épithéliums pendant 10 minutes dans l'incubateur, puis retirée avant de procéder au test de friction.

II.2.4 Exposition d'une solution de protéines riches en prolines (PRP)

Ce chapitre évalue le rôle protecteur des PRP contre la toxicité de l'EgCG. Les PRP ont été produites, purifiées et fournies par Nicolas Poirier (CSGA, INRAE, Dijon).

Une solution de PRP est préparée dans du PBS à une concentration de 0.66 *mM*. Après la formation de la pellicule mucosale, les modèles d'épithéliums oraux sont recouverts d'1 *mL* de solution de PRP pendant 5 minutes [128]. Ensuite, une solution d'EgCG est ajoutée sur le modèle cellulaire également pendant 5 minutes. Trois concentrations d'EgCG sont étudiées : 0 (correspondant à la condition contrôle), 0,5 et 1 *mM*. Après ces 10 minutes, la solution contenant les PRP et l'EgCG est retirée de l'épithélium et le test de friction est réalisé.

II.3 Protocoles de mesures mécaniques

II.3.1 Essais tribologiques

Les mesures tribologiques sont effectuées à l'aide du biotribomètre développé dans ces travaux de thèse, comme illustré dans la figure 2.6. Le contact tribologique est établi entre les modèles d'épithélium et la même bille en silicone que dans le Chapitre 3. Les paramètres de l'essai demeurent identiques à ceux du chapitre 3. Une charge normale de 0,5 *mN* est appliquée sur le modèle de muqueuse, générant ainsi une pression de contact d'environ 8 *kPa* (voir Annexe II). Les tests de friction débutent avec une vitesse linéaire de frottement de 300 $\mu\text{m/s}$ pendant 10 cycles sur 500 μm .

Le tableau 3.1 résume les paramètres utilisés durant les essais, lesquels sont conduits dans des conditions de température et d'hygrométrie contrôlées (21-23 °C et 30-40% respectivement).

Le coefficient de frottement μ et l'énergie dissipée E_d sont mesurés dans toutes les conditions expérimentales : en présence de tanins, de protéines végétales et de PRP. La méthode de calcul de ces paramètres est exposée dans la section II.3 du Chapitre 2. Ces paramètres fournissent des indicateurs mécaniques permettant une analyse comparative de l'état de lubrification pour chaque condition expérimentale.

II.4 Analyses physico-chimiques

II.4.1 Étude de l'endommagement

L'endommagement est évalué à partir de la surface dégradée *post mortem*. Les images des traces sont obtenues par interférométrie pour chaque isoforme de MUC1 testée dans les différentes conditions expérimentales : avec tanins, protéines végétales ou animale et tanins + PRP. Chaque image est ensuite traitée, et la surface endommagée est calculée à partir d'une version binarisée de l'image de référence. Toute cette démarche est exposée dans la section III.1 du Chapitre 2.

II.4.2 Analyse topographique multi-échelle

La décomposition en ondelettes permet une analyse fine de la topographie des épithéliums, révélant les agrégations induites par les tanins ou les protéines végétales. Des images de $72 \times 96 \mu\text{m}^2$ de la surface épithéliale sont acquises en dehors des zones de frottement, puis traitées à l'aide d'un logiciel dont le protocole est détaillé dans la section III.1.2 du chapitre 2. Cette décomposition en ondelettes est effectuée à l'aide d'un logiciel interne, TopoLab. Cette étape génère deux spectres (SMA et NAD) pour chaque image, décrivant la topographie de la surface. Pour chaque condition expérimentale, huit spectres sont générés à partir de huit images différentes. Les moyennes sont comparées afin de détecter toute modification de la topographie suite à l'ajout de tanins, de protéines végétales ou par l'effet protecteur des PRP. Toute la procédure de préparation des échantillons et de calcul est présentée dans la section III.2.1 du Chapitre 2.

II.4.3 Examen des profils chimiques des surfaces

Des mesures par spectroscopie Raman sont réalisées sur deux des quatre isoformes : Non-MUC1 et MUC1/VNTR, considérées comme les plus divergentes en termes de structure, de manière similaire au Chapitre 3. Les spectres sont obtenus à l'aide du microscope confocal Raman inViaTM (Renishaw, UK). Le protocole de préparation des échantillons est détaillé dans la section III.3 du Chapitre 2, et les paramètres utilisés sont résumés dans le tableau 3.3. Les mesures spectroscopiques sont effectuées dans trois conditions expérimentales : Brute, avec une pellicule reconstruite seule et avec une pellicule mucosale reconstruite + EgCG. Ces spectres permettent de comparer les compositions chimiques de surface des deux isoformes, afin d'établir des cohérences entre les profils chimiques et les variations de comportement tribologique en présence de tanins.

II.5 Indice de tension

Une méthode permettant de quantifier l'état de cohésion d'un tissu a été développée [335], reposant sur l'analyse spectrale de la morphologie de la surface à partir d'images. Cette analyse permet de calculer des indices de cohésion qui caractérisent la tension du tissu analysé. Des valeurs élevées de ces indices indiquent une faible tension, tandis qu'un indice bas révèle une tension élevée du tissu.

Dans ce modèle, l'hypothèse fondamentale est basée sur la pré-tension naturelle d'un tissu biologique. Tout tissu ou organe de notre corps est soumis à une pré-tension naturelle de soutien. Pour analyser l'état d'équilibre de cette tension et la quantifier sous forme d'indices de cohésion le long des axes x et y de l'image, nous postulons que l'épithélium oral subit un état biaxial de tension. Cet état se manifeste le long des deux axes x et y . Dans la littérature, il existe plusieurs modèles mathématiques qui étudient l'équilibre des tensions à travers le modèle de tenségrité [336, 337]. Dans notre modèle, nous avons choisi d'étudier cet équilibre le long des deux directions orthogonales x et y de l'image en projetant l'équation de l'équilibre statique sur les deux axes. Pour l'étude de cet équilibre, nous ne connaissons pas les forces subies par le tissu, cependant, nous supposons que l'image du tissu est composée de motifs ayant une orientation, une fréquence spatiale et une longueur d'onde qui représentent l'effet de la pré-tension. L'orientation et la longueur d'onde de chaque motif représentent les paramètres importants pour étudier l'état d'équilibre.

À partir de l'image $f(x, y)$ de nos épithéliums oraux *in vitro*, nous procédons à une transformation de Fourier bidimensionnelle (Cooley et Tukey) (l'expression 4.1) et qui peut être notée par TF pour la transformation de Fourier directe qui transforme l'image en un spectre de fréquences spatiales en mm^{-1} . Dans l'espace de Fourier, les fréquences spatiales sont notées : $\nu_{x,i}$ et $\nu_{y,j}$, la transformation de Fourier discrète de l'image a donc l'expression suivante :

$$TF[f(x, y)] = F(\nu_{x,i}, \nu_{y,j}) = \sum_{x=0}^{N-1} \sum_{y=0}^{M-1} f(x, y) \exp \left[-j2\pi \left(x \frac{\nu_{x,i}}{N} + y \frac{\nu_{y,j}}{M} \right) \right] \quad (4.1)$$

Avec $j^2 = -1$

II.5.1 Les quatre étapes du modèle

II.5.1.1 Étape 1 : Séparation de l'orientation de l'image en deux sous-images $f_1(x, y)$ (0-90°) et $f_2(x, y)$ (90-180°)

À partir de la transformation de Fourier en coordonnées polaires de l'image, nous déterminons deux sous-images f_1 et f_2 dont les orientations des motifs θ sont comprises entre 0 et 90° et 90-180° : $f_{1(0-90^\circ)}$ et $f_{2(90-180^\circ)}$.

$$f_1(x, y)_{(0-90^\circ)} = [TF^{-1}(F(\nu, \theta))]_{0 \rightarrow 90} ; \text{ Pour } 0 \leq \theta \leq 90^\circ$$

$$f_2(x, y)_{(90-180^\circ)} = [TF^{-1}(F(\nu, \theta))]_{90 \rightarrow 180} ; \text{ Pour } 90 \leq \theta \leq 180^\circ$$

TF^{-1} est la transformation de Fourier inverse.

II.5.1.2 Étape 2 : Calcul du centre de gravité des longueurs d'onde : Centroïde

Sous l'effet des forces de cohésion, les centroïdes des fréquences spatiales des images décomposées sont les signatures des forces de cohésion de 0° à 90° et de 90°

à 180° . Le centroïde spectral représente la fréquence du centre de gravité spectral de l'image. Sa valeur correspond à une fréquence spatiale (mm^{-1}) de part et d'autre à laquelle l'énergie du spectre est également répartie. Les longueurs d'onde des centroïdes de l'image le long de l'axe x ou y sont données par :

$$\begin{aligned} \nu_{0-90^\circ}^{x,i} (m^{-1}) &= \frac{\sum_{i=1}^{N-1} \sum_{j=1}^{M-1} \nu_{x,0-90^\circ}^{x,i,j} (TF(f_1(x,y)_{0-90^\circ}))}{\sum_{i=1}^{N-1} \sum_{j=1}^{M-1} (TF(f(x,y)_{0-90^\circ}))} \\ \nu_{90-180^\circ}^{x,i} (m^{-1}) &= \frac{\sum_{i=1}^{N-1} \sum_{j=1}^{M-1} \nu_{x,90-180^\circ}^{x,i,j} TF(f_1(x,y)_{90-180^\circ})}{\sum_{i=1}^{N-1} \sum_{j=1}^{M-1} TF(f(x,y)_{90-180^\circ})} \\ \nu_{0-90^\circ}^{y,i} (m^{-1}) &= \frac{\sum_{i=1}^{N-1} \sum_{j=1}^{M-1} \nu_{x,0-90^\circ}^{y,i,j} (TF(f_2(x,y)_{0-90^\circ}))}{\sum_{i=1}^{N-1} \sum_{j=1}^{M-1} (TF(f(x,y)_{0-90^\circ}))} \\ \nu_{90-180^\circ}^{y,i} (m^{-1}) &= \frac{\sum_{i=1}^{N-1} \sum_{j=1}^{M-1} \nu_{x,90-180^\circ}^{y,i,j} TF(f_2(x,y)_{90-180^\circ})}{\sum_{i=1}^{N-1} \sum_{j=1}^{M-1} TF(f(x,y)_{90-180^\circ})} \end{aligned}$$

À partir des centroïdes spectraux, les centroïdes des longueurs d'onde sont déterminés comme suit :

$$\begin{aligned} \lambda_{0-90^\circ}^x (m) &= \frac{1}{\nu_{0-90^\circ}^{x,i}} \quad \text{et} \quad \lambda_{90-180^\circ}^x (m) = \frac{1}{\nu_{90-180^\circ}^{x,i}} \\ \lambda_{0-90^\circ}^y (m) &= \frac{1}{\nu_{0-90^\circ}^{y,j}} \quad \text{et} \quad \lambda_{90-180^\circ}^y (m) = \frac{1}{\nu_{90-180^\circ}^{y,j}} \end{aligned}$$

II.5.1.3 Étape 3 : Analyse des longueurs d'onde sur les axes x et y de l'image

La quantification des centroïdes de longueurs d'onde est fondamentale pour déterminer les indices de cohésion. En effet, nous considérons que les centroïdes des longueurs d'onde $\lambda_{0-90^\circ}^x$, $\lambda_{90-180^\circ}^x$ le long de l'axe x sont les conséquences des forces de cohésion dont nous ignorons la nature.

$\lambda_{0-90^\circ}^x$ est due à la force cohésive $F_{0-90^\circ}^x$ et $\lambda_{90-180^\circ}^x$ est due à la force cohésive $F_{90-180^\circ}^x$, de manière similaire le long de l'axe y : $\lambda_{0-90^\circ}^y$ est due à la force cohésive $F_{0-90^\circ}^y$ et $\lambda_{90-180^\circ}^y$ est due à la force cohésive $F_{90-180^\circ}^y$.

L'analyse se concentre sur les centroïdes des longueurs d'onde des images $f_1(x,y)_{0-90^\circ}$ et $f_2(x,y)_{90-180^\circ}$. Nous définissons l'écart à l'équilibre en analysant la différence de longueurs d'onde.

$$\begin{aligned} \overline{\Delta\lambda_x(\sum F_x)} &= \overline{\lambda_{x,0-90^\circ} - \lambda_{x,90-180^\circ}} \\ \overline{\Delta\lambda_y(\sum F_y)} &= \overline{\lambda_{y,0-90^\circ} - \lambda_{y,90-180^\circ}} \end{aligned}$$

Nous sommes dans un état parfaitement équilibré des forces de cohésion dans le cas où

il y a égalité des longueurs d'onde en x et y :

$$\Delta\lambda^x = \Delta\lambda^y$$

Cette égalité en termes de longueurs d'onde est le résultat d'un équilibre entre les forces cohésives mutuelles des sous-images $f_1(x, y)_{0-90^\circ}$ et $f_2(x, y)_{90-180^\circ}$:

$$F_{0-90^\circ}^x = F_{90-180^\circ}^{-x} \quad \text{et} \quad F_{0-90^\circ}^y = F_{90-180^\circ}^{-y}$$

Dans le cas où nous avons une égalité proche de zéro sur les deux axes x et y , nous sommes dans une situation d'un tissu très cohésif :

$$\Delta\lambda^x = \Delta\lambda^y \approx 0$$

Lorsque les valeurs de $\Delta\lambda^x$ et $\Delta\lambda^y$ sont différentes de zéro, cette situation indique un état de cohésion loin de l'équilibre, ce qui implique une anisotropie des forces de cohésion :

$$F_{0-90^\circ}^x \neq F_{90-180^\circ}^{-x} \quad \text{et} \quad F_{0-90^\circ}^y \neq F_{90-180^\circ}^{-y}$$

II.5.1.4 Étape 4 : Définition de l'indice de cohésion

Les indices de cohésion sont définis comme :

$$IC_X = \frac{\Delta\lambda^x}{\lambda_{\min}^x} \quad IC_Y = \frac{\Delta\lambda^y}{\lambda_{\min}^y} \quad (4.2)$$

Où λ_{\min}^x est la plus petite valeur parmi les deux longueurs d'onde $\lambda_{i(0-90)}^x$ et $\lambda_{j(90-180)}^x$, et λ_{\min}^y est la plus petite valeur parmi les deux longueurs d'onde $\lambda_{i(0-90)}^y$ et $\lambda_{j(90-180)}^y$.

Par conséquent, l'indice de tension complet des épithéliums étudiés est défini comme :

$$IC = \sqrt{IC_X^2 + IC_Y^2} \quad (4.3)$$

L'indice IC est très utile pour quantifier l'intensité de l'écart par rapport à l'équilibre de cohésion, et il peut être analysé sur une large plage de valeurs entre 0 et 100%. Il permet, dans différentes situations biologiques, d'étudier l'état de tension. Dans notre étude, cet indice s'est révélé intéressant pour étudier l'effet des tanins et des PRP sur la tension des épithéliums *in vitro*.

L'indice IC de tension est calculé à différentes échelles d'analyse à partir d'une image décomposée grâce à la transformation en ondelette continue comme illustré sur la figure 4.3. Cette approche nous permet d'étudier l'évolution de la tension mécanique de l'épithélium *in vitro* à différentes échelles cohérentes avec la taille des agrégats de tanins, prévenant ainsi l'effet de la forme, entre autres considérations. Des valeurs élevées de ces indices indiquent une faible tension, tandis qu'un indice bas révèle une tension élevée du tissu.

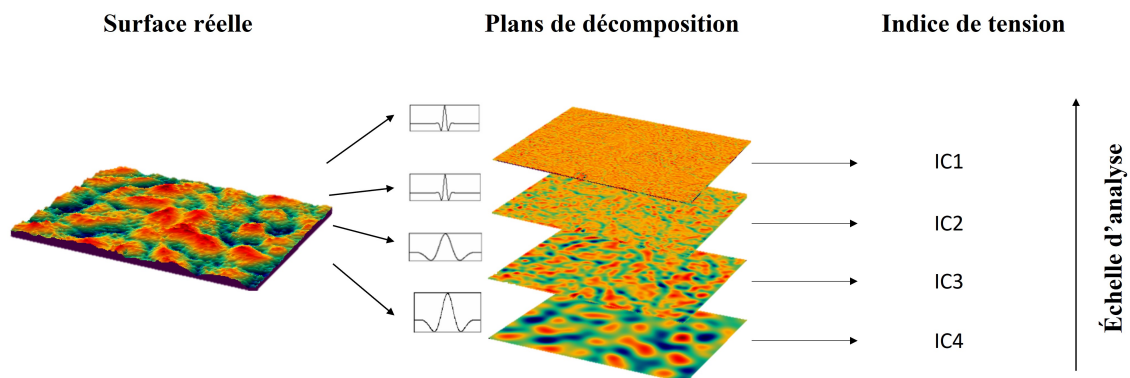


FIGURE 4.3 – Schéma représentant les étapes avant le calcul de l'indice de tension IC - Chaque IC_x est calculé à partir de la décomposition par ondelettes continues afin d'étudier la tension mécanique de l'épithélium oral *in vitro* à des échelles fines

II.6 Analyses statistiques

L'analyse statistique effectuée dans ce chapitre utilise la même méthodologie que celle présentée au Chapitre 3 et détaillée dans la section II.4 du Chapitre 2. Les niveaux de signification sont établis comme suit : $p = 0 < *** < 0,001 < ** < 0,01 < * < 0,05 < \circ < 0,1 < . < 1$. Ces analyses sont réalisées à l'aide du logiciel XLSTAT (version 2019.4.2, Addinsoft, France), une extension d'Excel, et de MatlabTM (R2021b, Licence École Centrale de Lyon).

Nous calculons également le coefficient de corrélation de Pearson r entre deux jeux de données afin de quantifier l'intensité de la corrélation linéaire entre deux grandeurs. Plus la valeur de r est proche de 1 ou de -1, plus la corrélation est forte, indiquant que les deux grandeurs augmentent ou diminuent simultanément. À l'inverse, si r est proche de 0, cela signifie qu'il n'y a pas de corrélation.

III Études expérimentales

III.1 Impact de l'ajout de tanins sur la lubrification

III.1.1 Problématique

Cette section vise à étudier l'impact des tanins sur les fonctions de lubrification et d'hydratation de la PM sur nos modèles d'épithélium. De plus, nous analysons le rôle de la protéine MUC1 dans les mécanismes physiques à l'origine de cette perturbation. Nous comparons les comportements tribologiques des quatre isoformes de MUC1 pour explorer l'impact potentiel de la présence et de la structure spécifique de MUC1 sur l'effet des tanins.

Cette section présente donc une étude du comportement tribologique des modèles d'épithélium après exposition aux tanins. Nous utilisons les paramètres mécaniques utilisés dans le Chapitre 3 comme indicateurs de l'état de lubrification des épithéliums. Les spectres de rugosité SMA et NAD sont utilisés pour quantifier les agrégats de tanins à la surface des muqueuses.

III.1.2 Analyse des résultats

III.1.2.1 Effet de l'ajout d'EgCG

III.1.2.1.1 L'impact sur la lubrification

Les tests tribologiques fournissent un aperçu de l'impact d'un tanin (ici l'EgCG) sur la lubrification des modèles d'épithélium oral. La concentration étudiée est de 1 *mM* bien au dessus du seuil de perception de l'EgCG (0.54 *mM*) [333]. La figure 4.4 et le tableau 4.1 présentent le coefficient de frottement, l'énergie dissipée et la surface endommagée pour les quatre isoformes de MUC1 dans deux conditions expérimentales : avec et sans EgCG.

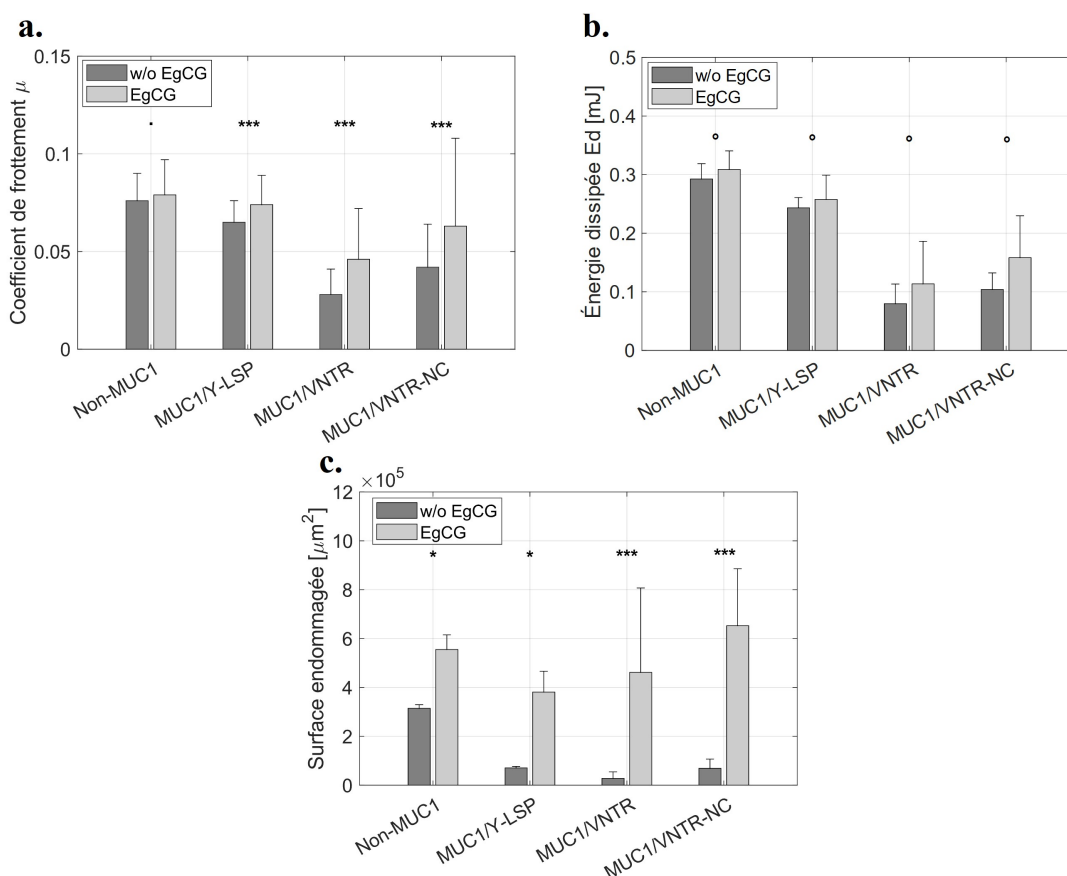


FIGURE 4.4 – (a) Coefficient de frottement (b) Énergie dissipée et (c) Surface endommagée post mortem sans et avec exposition à une solution d'EgCG pour les quatre isoformes de MUC1

Les résultats indiquent une augmentation des paramètres tribologiques suite à l'introduction de l'EgCG dans le contact. Pour la lignée cellulaire Non-MUC1, le coefficient de friction et l'énergie dissipée par frottement augmentent légèrement et de manière non significative ($p > 0.05$, figure 4.4). Le coefficient de friction évolue de $0,076 \pm 0,014$ à $0,079 \pm 0,018$. En ce qui concerne la surface endommagée, l'augmentation est plus prononcée et statistiquement significative ($p \leq 0,05$, figure 4.4), passant de $(3,15 \pm 0,15) \cdot 10^5 \mu\text{m}^2$ à $(5,55 \pm 0,60) \cdot 10^5 \mu\text{m}^2$, voir la figure 4.4.c.

Pour la lignée MUC1/Y-LSP exprimant une forme tronquée de MUC1, la tendance

est similaire, les paramètres augmentent significativement après l'ajout d'EgCG. Seule, l'énergie dissipée par frottement n'augmente pas de manière significative ($p > 0.05$, figure 4.4), passant de $0,24 \pm 0,02 \text{ mJ}$ à $0,26 \pm 0,04 \text{ mJ}$, voir figure 4.4.b.

Quant à l'isoforme MUC1/VNTR, structurellement proche de la forme physiologique de MUC1, l'inclusion d'EgCG entraîne une augmentation significative des paramètres mécaniques. La surface endommagée passe de $(0,28 \pm 0,27) \cdot 10^5 \mu\text{m}^2$ à $(4,62 \pm 3,45) \cdot 10^5 \mu\text{m}^2$ ($p < 0.001$, figure 4.4). Le coefficient de friction et l'énergie dissipée par frottement augmentent également, bien que cette dernière augmentation ne soit pas significative pour Ed ($p : ***$ pour μ et $^\circ$ pour Ed).

Enfin, la tendance demeure similaire pour la dernière isoforme MUC1/VNTR-NC, avec une lubrification en baisse, traduisant ainsi une augmentation des paramètres tribologiques, comme illustré dans la figure 4.4. Le coefficient de friction évolue de $0,042 \pm 0,023$ à $0,063 \pm 0,045$ ($p < 0.001$, figure 4.4). Les autres paramètres augmentent également après l'ajout d'EgCG, et ces augmentations sont statistiquement significatives pour les dommages ($p : ^\circ$ pour Ed et $***$ pour les dommages).

TABLEAU 4.1 – Coefficient de frottement (μ), Énergie dissipée (Ed) et Surface endommagée mesurés sur les quatre isoformes dans les deux conditions expérimentales PM reconstruite et PM reconstruite + EgCG (moyenne \pm écart-type)

Isoformes	μ		Ed [mJ]		Surface ($\cdot 10^5$) [μm^2]	
	w/o	EgCG	w/o	EgCG	w/o	EgCG
Non-MUC1	$0,076 \pm 0,014$	$0,079 \pm 0,018$	$0,29 \pm 0,03$	$0,31 \pm 0,03$	$3,15 \pm 0,15$	$5,55 \pm 0,60$
MUC1/Y-LSP	$0,065 \pm 0,011$	$0,074 \pm 0,015$	$0,24 \pm 0,02$	$0,26 \pm 0,04$	$0,71 \pm 0,06$	$3,81 \pm 0,86$
MUC1/VNTR	$0,028 \pm 0,013$	$0,046 \pm 0,027$	$0,08 \pm 0,03$	$0,11 \pm 0,07$	$0,28 \pm 0,27$	$4,62 \pm 3,4$
MUC1/VNTR-NC	$0,042 \pm 0,023$	$0,063 \pm 0,045$	$0,10 \pm 0,03$	$0,16 \pm 0,07$	$0,69 \pm 0,38$	$6,53 \pm 2,33$

En synthèse, l'impact de l'EgCG sur la lubrification est évident : il engendre une augmentation des paramètres tribologiques, qui pourrait refléter une diminution de la capacité lubrifiante de la PM. Cependant pour l'isoforme Non-MUC1 l'augmentation du coefficient de frottement est assez faible. La raison semble être que la valeur de μ sans tanin est déjà assez élevée ce qui ne permet pas d'observer une augmentation très significative. Pour observer des différences plus marquées, il serait intéressant d'augmenter la pression ou la charge mais cela risque d'endommager rapidement le tapis cellulaire.

Ces évolutions sont qualitativement observables sur les images *post mortem* des épithéliums, illustrées sur la figure 4.5. Les traces de frottement sur les quatre lignées TR146 révèlent des dommages plus marqués suite à l'ajout d'EgCG. La surface endommagée est calculée sur ces images, voir les valeurs dans le tableau 4.1. Ces observations sont cohérentes pour chaque lignée cellulaire par rapport aux résultats tribologiques présentés préalablement. La présence de tanins donne l'impression d'une diminution de la lubrification entraînant des forces de frictions et des dégâts supérieurs. De plus, ces évolutions varient selon l'isoforme étudiée. La divergence de comportement selon l'isoforme est approfondie dans les sections suivantes de ce chapitre.

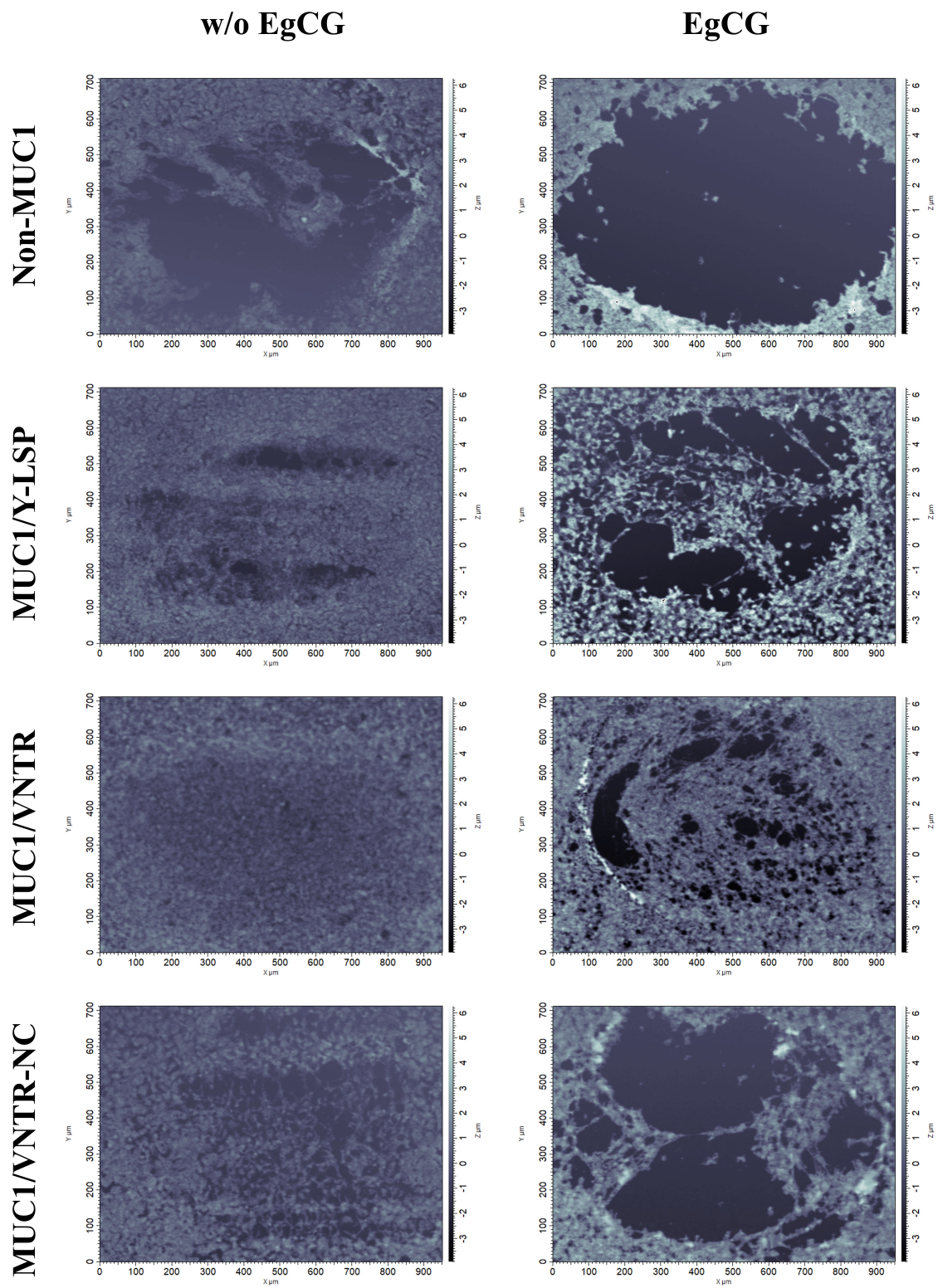


FIGURE 4.5 – Images des surfaces épithéliales post mortem pour chaque isoforme de MUC1 : Non-MUC1, MUC1/Y-LSP, MUC1/VNTR et MUC1/VNTR-NC

III.1.2.1.2 Exploration des agrégations formées par les tanins

La figure 4.6 illustre des exemples de surfaces d'épithélium obtenues sur l'isoforme MUC1/VNTR dans deux conditions expérimentales : avec une PM reconstruite seule et avec une PM reconstruite exposée à l'EgCG. Ces images surfaciques montrent que l'EgCG a un impact sur la surface des épithéliums. En effet, sans tanin, le tapis cellulaire est homogène et confluent, à l'inverse en présence d'EgCG, il paraît plus perturbé avec des agrégations.

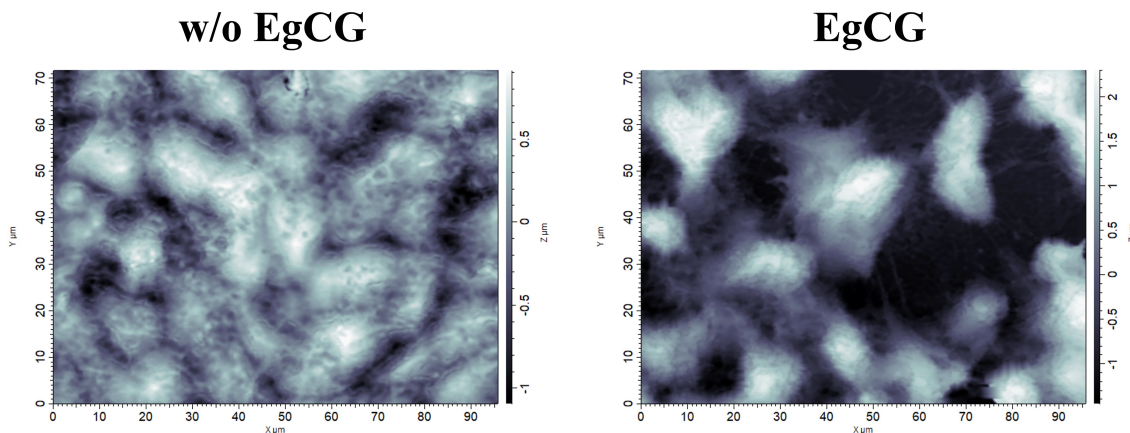


FIGURE 4.6 – Images des surfaces épithéliales de la lignée MUC1/VNTR avant frottement avec et sans EgCG

La figure 4.7 représente les spectres SMA et NAD moyens ainsi que leurs valeurs moyennes pour les deux conditions. L'analyse multi-échelle des spectres met en évidence des différences de topographie selon l'exposition aux tanins. Les spectres SMA et NAD révèlent clairement l'augmentation de la rugosité (SMA) et des irrégularités de surface (NAD) après l'addition d'EgCG avant le frottement. Les valeurs moyennes de ces paramètres augmentent de manière significative passant de $12,7\text{ nm}$ à $27,3\text{ nm}$ pour les paramètres SMA et $1,5^\circ$ à $4,9^\circ$ pour le NAD. Ces augmentations sont probablement dues à l'agrégation des tanins à la surface des modèles d'épithélium. Ces valeurs fournissent des informations supplémentaires en montrant l'impact physique des tanins sur l'épithélium qui affectent la PM. Cela explique l'augmentation des paramètres tribologiques présentés précédemment. Les travaux de Lei et al. [314] ont également montré une augmentation de la rugosité après l'ajout de polyphénols, qu'ils lient également à la formation des agrégats et l'augmentation du coefficient de frottement. Cette formation des agrégats a été mise en évidence par Ployon et al. [128] grâce à la microscopie à balayage électronique. Lorsqu'une concentration de 1 mM d'EgCG est ajoutée, des dépôts larges et denses apparaissent à la surface des cellules (figure 4.8). La taille de ces agrégats peut atteindre plusieurs μm . Pour les nôtres, ces agrégats gardent une taille d'une dizaine de nm . Nos observations topographiques, en particulier leurs changements après l'ajout de tanins, corroborent les résultats de la littérature.

Les paramètres tribologiques augmentent en parallèle avec la rugosité et les irrégularités de surface. Ce qui laisse sous entendre que les agrégations en surface des épithéliums, perturbent ainsi la PM et réduisent la lubrification.

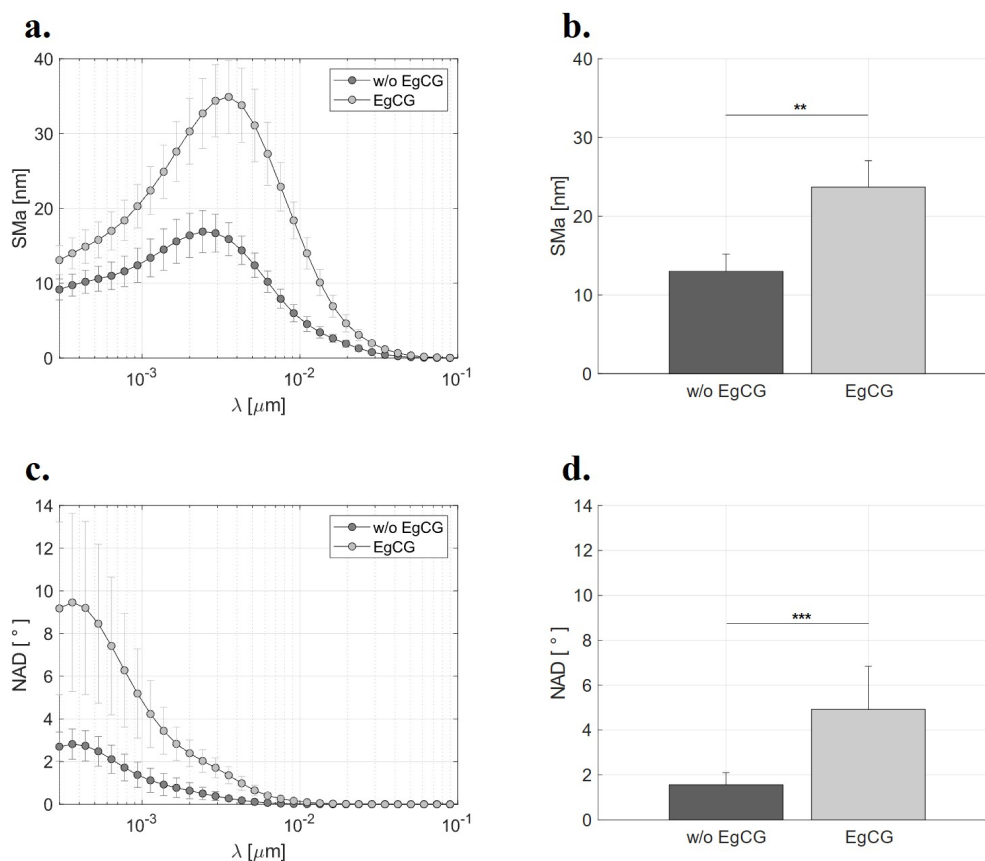


FIGURE 4.7 – (a) Spectres Sma moyens (b) Moyenne du Sma (c) Spectres NAD moyens et (d) Moyenne du NAD pour les deux conditions expérimentales étudiées : avec et sans exposition à l'EgCG sur l'isoforme MUC1/VNTR - Les courbes des figures a et c ont une échelle semi-logarithmique en x - Les moyennes sont calculées sur les petites longueurs d'onde (entre 10^{-3} et 10^{-2}) - Le code de significativité sur les figures (b) et (d) correspondent aux différences avec la condition PM seule

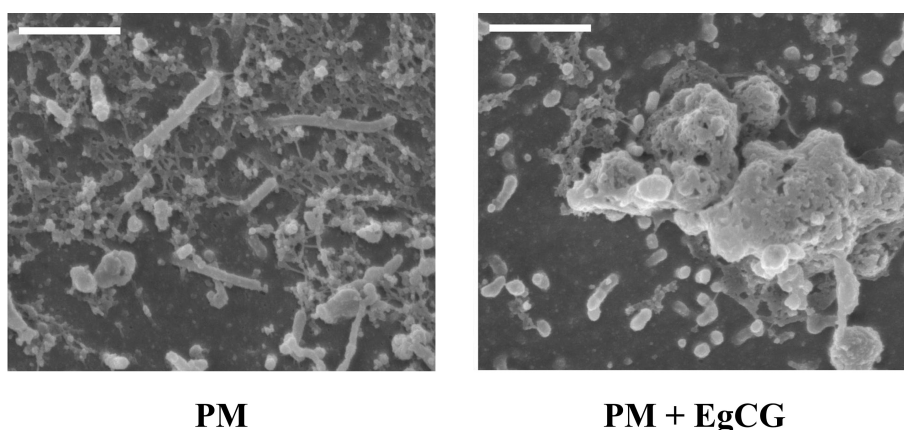


FIGURE 4.8 – Microscopie électronique à balayage de la PM et de son mélange avec l'EgCG - Issue de [128]

III.1.2.1.3 Des modifications de la chimie de surface

La figure 4.9 présente les analyses ACP-LDA des spectres Raman des deux isoformes Non-MUC1 et MUC1/VNTR dans trois conditions expérimentales : Brute, PM et PM + EgCG. L'examen des profils chimiques Raman par ACP-LDA des épithéliums a révélé des modifications chimiques de surface après l'exposition à des tanins sur les deux isoformes Non-MUC1 et MUC1/VNTR. La figure 4.9 illustre clairement les trois groupes correspondant aux trois conditions expérimentales : Brute, PM et avec EgCG. Cette distinction entre les conditions avec seulement la PM et celles avec la PM + EgCG suggère que la chimie de surface en présence de tanins évolue.. Ainsi, l'exposition à l'EgCG provoque des changements physico-chimiques des surfaces épithéliales. Cela induit des modifications tribologiques et topographiques importantes, notamment une formation d'agrégat et une perte de lubrification pouvant être à l'origine de la sensation d'astringence.

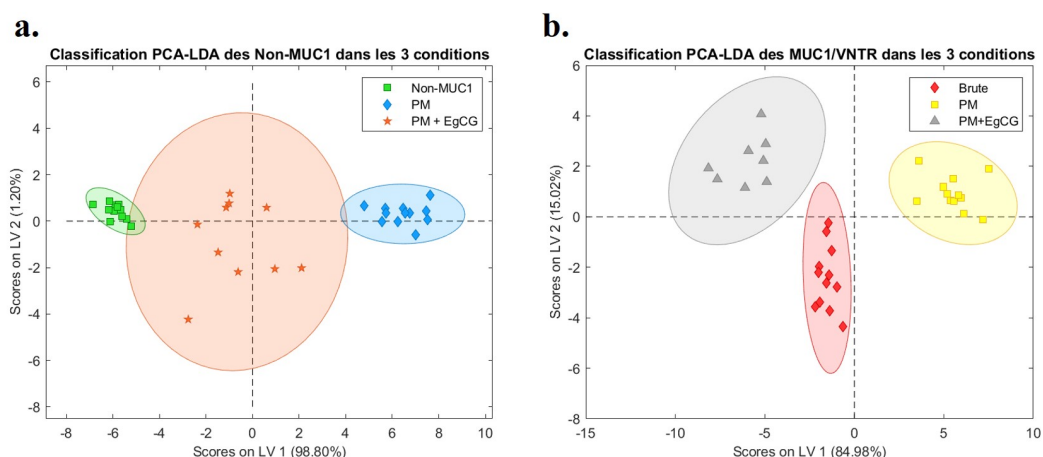


FIGURE 4.9 – Résultat de l'ACP-LDA des spectres Raman des deux isoformes : Non-MUC1 et MUC1/VNTR dans les trois conditions expérimentales : Brute, PM et PM + EgCG

III.1.2.1.4 Une perte de la tension mécanique

L'indice de tension IC, calculé sur les six plus petites longueurs d'onde (obtenu par transformée en ondelette), est représenté sur la figure 4.10 pour les deux conditions expérimentales, en utilisant les mêmes images que pour les calculs de SMA et NAD. Les indices sont calculés pour les six premières longueurs d'onde du cube de reconstruction (voir figure 2.25). Cela permet de se concentrer uniquement sur les échelles qui concernent la taille des agrégats de tanins. Cette figure démontre une augmentation des indices après l'exposition à l'EgCG. Un indice plus élevé indique une cohésion et une tension superficielle réduites. Ainsi, ces résultats confirment que l'EgCG perturbe l'épithélium, et notamment il semble modifier sa cohésion et sa tension, probablement à cause des agrégations des tanins à la surface des modèles de muqueuse.

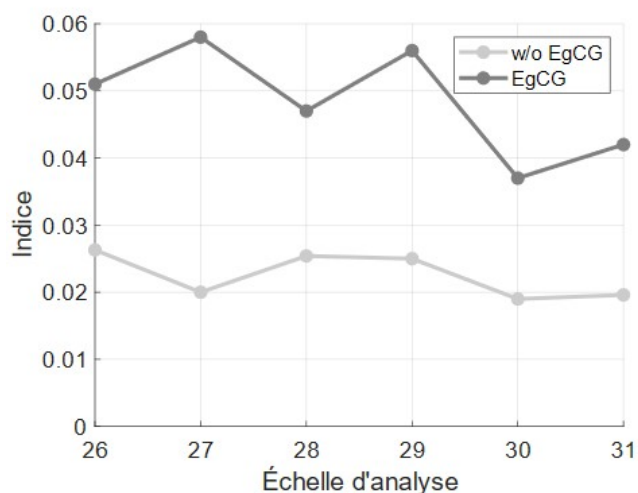


FIGURE 4.10 – Indices de tension IC pour les deux conditions expérimentales avec et sans tanins

III.1.2.1.5 La confirmation par microscopie à fluorescence

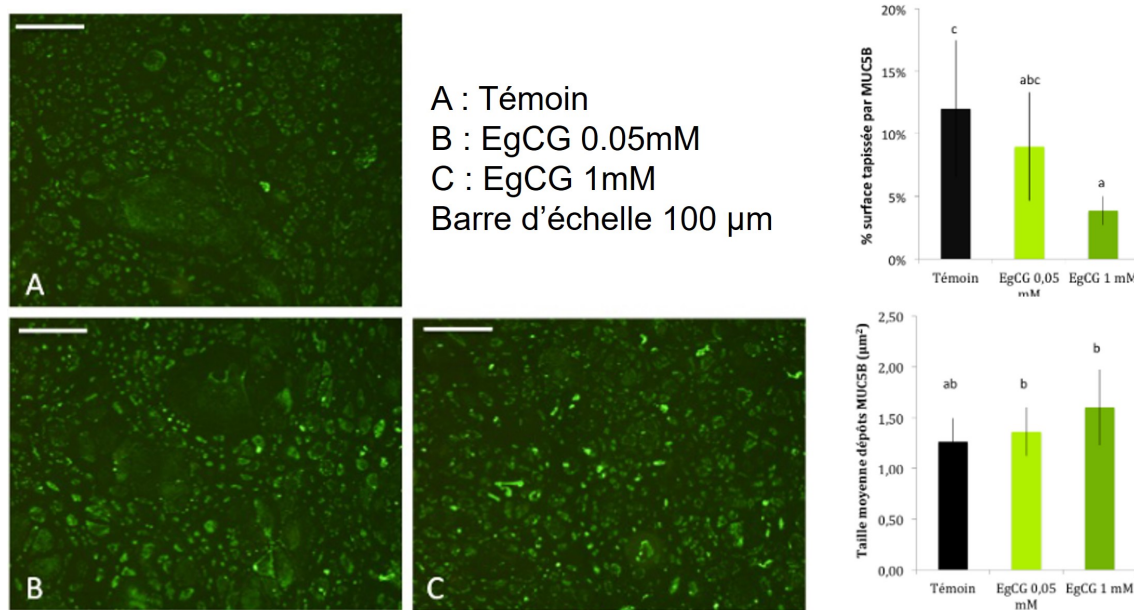


FIGURE 4.11 – Immunomarquage des MUC5B après exposition du modèle cellulaire à de l'EgCG - Tapissage de la surface par MUC5B et taille moyenne des dépôts de MUC5B pour les trois conditions - Issu des travaux de thèse de Ployon [8]

Les études de Ployon et al. [8] ainsi que celles de Nivet et al. [7] ont mis en lumière les effets des tanins sur la structure de la pellicule mucosale en utilisant des modèles d'épithélium similaires aux nôtres. À travers l'immunofluorescence de la protéine MUC5B, ils ont observé une diminution de la surface recouverte par la protéine salivaire MUC5B après l'addition d'EgCG. Cela indique le détachement des protéines salivaires de la surface cellulaire, comme illustré dans la figure 4.11. Cette diminution de l'intensité fluorescente témoigne également d'une réduction de la quantité de MUC5B. Nos propres résultats corroborent ces constatations : les paramètres tribologiques augmentent avec l'ajout d'EgCG. Les forces de friction et la surface endommagée *post mortem* traduisent

la diminution de la quantité de protéines salivaires et donc le détachement de la PM, comme illustré dans la figure 4.13 et présenté dans le tableau 4.1. De plus, les deux travaux [8, 282] ont observé une augmentation de la taille moyenne des dépôts des mucines MUC5B immunomarquées après l'ajout d'EgCG, comme illustré dans la figure 4.11. Cela révèle la formation d'agrégats à la surface des modèles d'épithélium après l'exposition à l'EgCG. Ces conclusions sont entièrement cohérentes avec nos résultats obtenus sur les spectres SMA et NAD. Nos spectres augmentent après l'ajout de tanins, ce qui caractérise la formation des agrégats. Ces agrégats sont évidemment à l'origine du détachement de la PM.

III.1.2.2 Étude de l'effet de la concentration en tanins

La section précédente expose l'effet de l'EgCG sur la lubrification des épithéliums pour une concentration de 1 *mM*. Cependant, dans des conditions physiologiques, la perception de l'astringence varie avec la concentration en EgCG consommée. Cette partie du manuscrit vise à rechercher une corrélation entre les résultats tribologiques et la concentration en EgCG. Plusieurs travaux de la littérature scientifique ont déjà démontré des corrélations positives entre la perception de l'astringence et la concentration en tanins [182, 338], ainsi que des corrélations entre la perception de l'astringence et le coefficient de frottement mesuré *in situ* [339]. Par conséquent, l'objectif de cette section est de montrer que notre protocole expérimental et nos modèles d'épithélium sont capables de détecter des variations de concentration de tanins. Cela nous permettra de proposer un modèle de relation entre nos mesures tribologiques *in vitro* et la perception physiologique de l'astringence, comme réalisé par Rossetti et al. [167] sur des surfaces en PDMS.

La figure 4.12 présente les relations entre la concentration en EgCG et nos deux indicateurs mécaniques : le coefficient de frottement (a) et la surface endommagée (b).

Indépendamment de l'isoforme étudiée, le coefficient de frottement et la surface endommagée augmentent globalement avec la concentration en EgCG. Pour illustrer cela, le coefficient de frottement de l'isoforme MUC1/VNTR évolue comme suit : $0,028 \pm 0,013$; $0,032 \pm 0,011$; $0,047 \pm 0,022$; $0,049 \pm 0,019$; $0,045 \pm 0,017$; $0,046 \pm 0,027$ (respectivement pour les concentrations suivantes : 0 ; 0,1 ; 0,25 ; 0,5 ; 0,75 ; 1 *mM*). En revanche, le coefficient de friction de Non-MUC1 reste plutôt constant, sachant qu'il était déjà bien plus élevé que les autres sans ajout de tanins. L'augmentation des indicateurs mécaniques en fonction de la concentration en tanins est visible, surtout pour les isoformes exprimant MUC1 et encore plus pour les lignées cellulaires exprimant une forme plus "complète" de la protéine (voir figure 2.1). Nous observons donc une corrélation positive entre les paramètres tribologiques et la concentration en EgCG pour les isoformes exprimant MUC1, tableau 4.2. Toutefois, ces résultats doivent être considérés avec circonspection, car les coefficients de corrélation de Pearson ne dépassent pas 0,8 pour les isoformes MUC1/Y-LSP et MUC1/VNTR. Il serait également pertinent d'incorporer des concentrations additionnelles afin d'approfondir l'analyse de ces corrélations de manière plus robuste.

La figure 4.12 montre que l'exposition à l'EgCG conduit à une augmentation des forces de friction et de l'usure des épithéliums, ce qui semble traduire un épuisement de la lubri-

fication pour toutes les concentrations même pour les plus faibles d'EgCG. Cette analyse des résultats semble étayer les conclusions avancées dans la section précédente, montrant un lien entre les tanins et la lubrification des épithéliums.

Les résultats présentés ici montrent la capacité de notre protocole à détecter l'évolution des paramètres tribologiques en fonction de la concentration en tanins. Le coefficient de corrélation de Pearson r est calculé pour chaque isoforme et pour les deux indicateurs mécaniques, présentés dans le tableau 4.2. Ce coefficient r caractérise la relation linéaire entre deux paramètres quantitatifs. Il est observé que les coefficients de corrélation r sont principalement positifs, ce qui confirme l'effet néfaste des tanins sur la lubrification même à faible concentration. Ces résultats semblent cohérents avec ceux observés dans la littérature [167, 182]. Étant donné la forte corrélation entre la concentration en tanins et la perception de l'astringence [167], il est possible d'envisager que nos mesures tribologiques puissent être liées à cette perception. Cela suggère que nos paramètres pourraient être intéressants pour évaluer la perception de l'astringence. *Cette question sera explorée dans le chapitre suivant de ce manuscrit.*

De plus, l'analyse comparative des r entre les quatre isoformes montre que le comportement n'est pas le même pour les quatre lignées cellulaires. Les coefficients des isoformes exprimant MUC1 (MUC1/Y-LSP, MUC1/VNTR et MUC1/VNTR-NC) révèlent une corrélation forte et positive entre le coefficient de frottement et la concentration de tanin avec r : 0,79 ; 0,95 et 0,72 respectivement. Les corrélations sont encore plus fortes pour les isoformes exprimant une forme "complète" de MUC1 (MUC1/VNTR) comme illustré dans la figure 4.12. En revanche, la corrélation est positive mais faible pour l'isoforme n'exprimant pas MUC1 avec r : 0,18. Ces résultats laissent à nouveau entendre que MUC1 joue un rôle dans les mécanismes de perte de lubrification causés par les tanins. En ce qui concerne les corrélations entre la quantité d'EgCG et la surface endommagée, elles sont également positives pour les quatre isoformes, ce qui traduit une fois encore la relation entre concentration et paramètres tribologiques. Ces corrélations sont très fortes pour les isoformes longues de MUC1 (MUC1/VNTR et MUC1/VNTR-NC). Elles sont plus faibles pour l'isoforme Non-MUC1 et pour la lignée MUC1/Y-LSP. Cela laisse à nouveau supposer que la structure de MUC1 influence l'effet des tanins sur la lubrification des épithéliums. En effet, les effets néfastes de l'EgCG paraissent adoucis en présence de MUC1 et cela pour toutes les concentrations, comme le montre la figure 4.12. Par ailleurs, la présence des domaines biologiques d'intérêt semble également influencer l'impact de l'EgCG. Par conséquent, une étude comparative du rôle de MUC1 dans les mécanismes de perte de lubrification causés par les tanins est explorée dans la suite de ce chapitre.

TABLEAU 4.2 – Coefficient de corrélation de Pearson entre la concentration en EgCG et : le coefficient de frottement ou la surface endommagée - ^a la corrélation est statistiquement significative

Coefficient de corrélation de Pearson		
Isoformes	Coefficient de frottement	Surface endommagée
Non-MUC1	0,18	0,63
MUC1/Y-LSP	0,79	0,46
MUC1/VNTR	0,95 ^a	0,9 ^a
MUC1/VNTR-NC	0,72 ^a	0,84 ^a

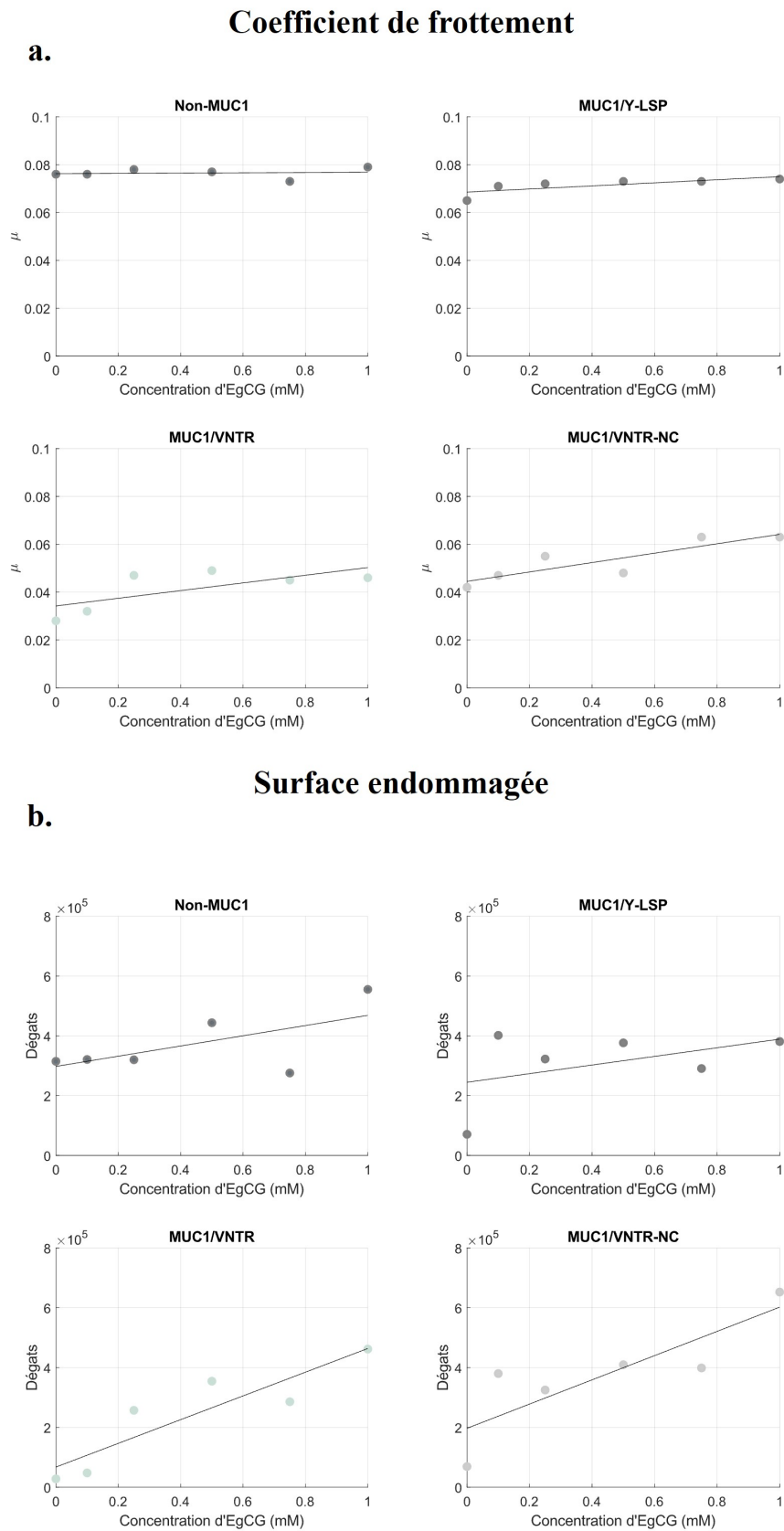


FIGURE 4.12 – Corrélation entre la concentration en EgCG et (a) le coefficient de frottement et (b) la surface endommagée post frottement

III.1.2.3 Comparaison de l'effet de l'EgCG en fonction de l'isoforme

Les résultats précédents montrent que MUC1 influence l'impact des tanins sur la lubrification. Les résultats tribologiques, après l'exposition aux tanins, suivent une tendance commune, c'est à dire une augmentation des paramètres tribologiques. En revanche, les forces de frottement et les dégâts *post mortem* varient selon les isoformes étudiées. Cette section est une étude comparative entre les isoformes après l'addition d'EgCG. L'objectif est d'analyser le rôle de la protéine MUC1 et de sa structure spécifique dans l'impact des tanins sur la lubrification, en particulier l'implication du domaine SEA clivable qui contribue à la protection épithéliale [34, 87].

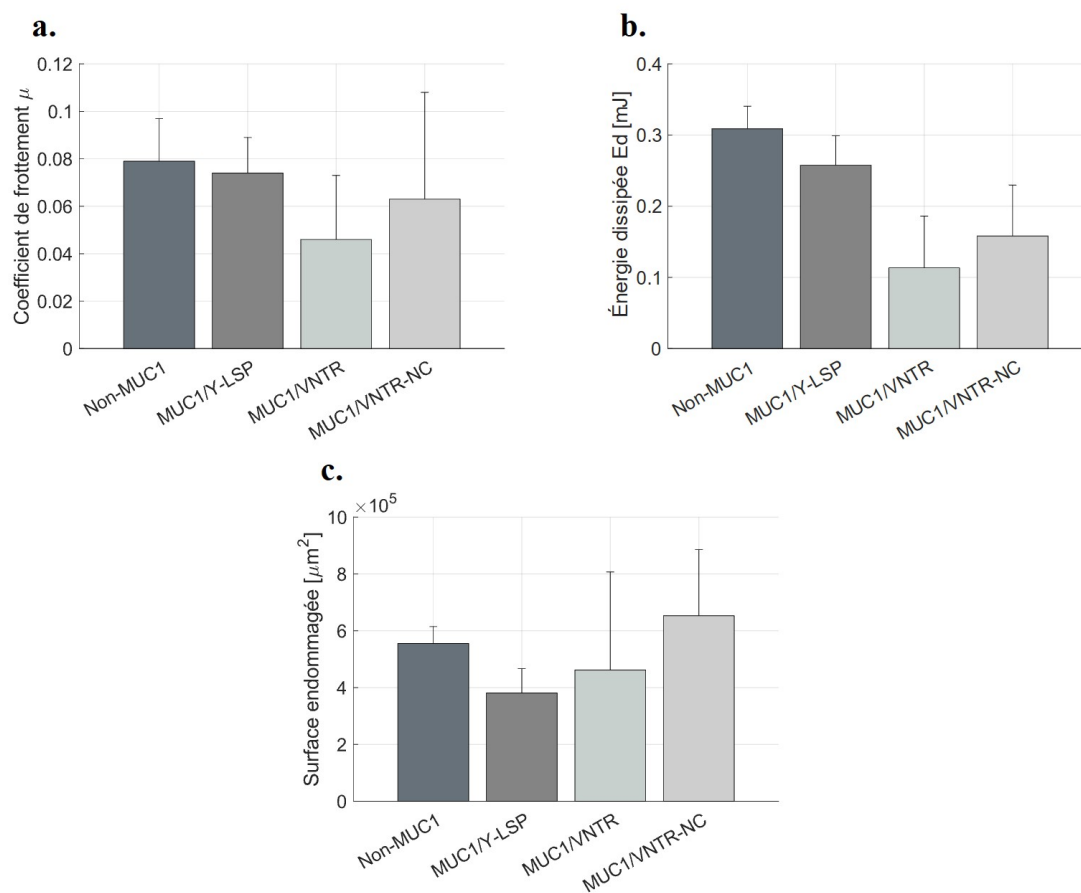


FIGURE 4.13 – (a) Coefficient de frottement, (b) Énergie dissipée et (c) Surface endommagée *post mortem* après exposition à une solution d'EgCG pour les quatre isoformes de MUC1

La figure 4.13 illustre le niveau des trois indicateurs mécaniques mesurés sur les quatre isoformes de MUC1 après exposition à 1 *mM* d'EgCG. Les valeurs du coefficient de frottement évoluent comme suit : $0,079 \pm 0,018$, $0,074 \pm 0,015$, $0,046 \pm 0,027$ et $0,063 \pm 0,045$ (respectivement pour les isoformes Non-MUC1, MUC1/Y-LSP, MUC1/VNTR et MUC1/VNTR-NC). Le coefficient de frottement et l'énergie dissipée sont moins élevés en présence de la protéine MUC1. Bien que la différence du coefficient de frottement entre les isoformes Non-MUC1 et MUC1/Y-LSP soit minime ($p > 0,05$, tableau 4.3), la tendance est la même. Les indicateurs des isoformes exprimant une forme plus complète de MUC1 avec un domaine VNTR (MUC1/VNTR et MUC1/VNTR-NC) affichent des valeurs encore plus basses ($p < 0,05$, tableau 4.3) que pour sa forme tron-

quée (MUC1/Y-LSP). Enfin, l'isoforme présentant les valeurs les plus faibles en termes de force de friction est celle exprimant en plus un domaine SEA clivable (MUC1/VNTR). Les valeurs de l'énergie dissipée suivent la même tendance, comme indiqué dans le tableau 4.1 et sur la figure 4.13.

TABLEAU 4.3 – Test de Mann-Whitney sur les indicateurs mécaniques pour les quatre isoformes de MUC1 comparant l'effet de MUC1 et de sa structure sur la perte de lubrification causé par l'EgCG - Code de signification : $0 \leq *** \leq 0.001 \leq ** \leq 0.01 \leq * \leq 0.05 \leq . \leq 0.1 \leq \leq 1$

		Coefficient de frottement	Énergie Dissipée	Surface endommagée
Isoformes	Isoformes	<i>p</i> value	<i>p</i> value	<i>p</i> value
Non-MUC1	MUC1/Y-LSP	○	**	***
Non-MUC1	MUC1/VNTR	***	***	○
Non-MUC1	MUC1/VNTR-NC	***	***	○
MUC1/Y-LSP	MUC1/VNTR	***	***	○
MUC1/Y-LSP	MUC1/VNTR-NC	***	***	**
MUC1/VNTR	MUC1/VNTR-NC	**	.	○

Les essais menés dans cette étude révèlent que l'isoforme dotée d'un domaine SEA clivable et d'un domaine VNTR richement glycosylé (MUC1/VNTR) présente des forces de friction statistiquement inférieures aux autres, comme illustré dans la figure 4.13. Ces résultats suggèrent que la structure spécifique de la mucine transmembranaire MUC1 contribue à renforcer la protection de la lubrification épithéliale après l'exposition à l'EgCG. En effet le clivage du domaine SEA, libérerait le domaine VNTR créant un mécanisme de protection [34, 87]. Comme mentionné précédemment, la dissociation de MUC1 en deux sous-unités pourrait jouer un rôle dans l'élimination d'une partie de la PM de la surface épithéliale. Cela empêche l'agrégation de l'EgCG sur l'épithélium, ce qui conserve une partie du pouvoir lubrifiant de la PM [84, 87]. MUC1 agit donc tel un fusible, se sacrifiant afin de préserver un niveau convenable de lubrification. Ces mécanismes préviennent la rupture de la PM et, par conséquent, réduisent les effets néfastes de l'EgCG par rapport aux autres isoformes. Par ailleurs, nos résultats indiquent que le domaine VNTR présent sur les isoformes MUC1/VNTR et MUC1/VNTR-NC semble également contribuer à la protection épithéliale. Le réseau glucidique, formé par les domaines VNTR, pourrait créer un obstacle pour les tanins grâce à un fort encombrement stérique empêchant les tanins d'atteindre la surface et de former les agrégations. Ce mécanisme invite à penser qu'il limite la rupture de la PM. Enfin, l'expression d'une forme tronquée de MUC1 semble également avoir une légère influence, étant donné que nous avons déjà démontré dans une étude antérieure que MUC1 favorise la lubrification [309]. Ainsi, malgré l'ajout d'EgCG, la présence de MUC1 favorise toujours une meilleure lubrification, ce qui permet d'atténuer l'effet des tanins par rapport à l'isoforme sans MUC1.

Concernant la surface de dégâts causés par la friction, les résultats sont moins concluants, suggérant d'éventuels mécanismes supplémentaires induits par le protocole expérimental. Néanmoins, une augmentation de la détérioration est toujours observée en présence de tanins, soutenant l'idée d'une perte de lubrification en général indépen-

demment des isoformes étudiées.

Les résultats sur les différentes concentrations en EgCG confirment ces conclusions, car μ est toujours plus faible pour les isoformes exprimant MUC1. En effet, nous observons une hiérarchie similaire dans les isoformes pour chaque concentration étudiée, ce qui nous permet d'avancer l'hypothèse de l'importance du rôle de MUC1 dans la protection des épithéliums après l'exposition à des EgCG. Plus précisément, la structure spécifique de MUC1, composée d'une sous-unité α s'étendant jusqu'à 500 nm au-dessus de la surface des cellules épithéliales et comprenant un domaine VNTR richement glycosylé, crée un environnement protecteur pour les épithéliums. Le clivage du domaine SEA pourrait entraîner l'éjection des agrégats de tanins. Ces deux domaines protègent les épithéliums de l'agrégation de l'EgCG, atténuant ainsi la perte de lubrification.

III.1.2.4 Influence d'un autre tanin : acide tannique

Depuis le début de ce chapitre, notre attention se porte sur l'effet des tanins, en particulier l'EgCG, sur la lubrification des épithéliums. Cependant, des études antérieures ont souligné que l'impact néfaste des tanins sur le pouvoir lubrifiant des films salivaires dépend de leur structure et de leur taille. Par exemple, Rossetti et al. [167] ont observé que l'épicatéchine (EC) n'altère pas les propriétés lubrifiantes de leur film salivaire, malgré une perception d'astringence des solutions d'EC. Ce tanin, présent dans le thé, se distingue de l'EgCG par sa structure chimique. D'autres recherches ont montré que l'étude de deux polyphénols de tailles et de structures différentes entraînaient des réponses tribologiques distinctes [314]. Ainsi, l'objectif de cette section est de mesurer l'effet d'un autre composé phénolique, l'acide tannique, qui diffère de l'EgCG par sa structure chimique et sa taille, voir figure 4.2. Nous souhaitons évaluer la capacité de notre méthode d'analyse à détecter des différences de lubrification avec d'autres composés phénoliques, qui sont perçus avec une astringence distincte. Une perspective importante de ces travaux de thèse est de mener des études sur des aliments entiers, considérés comme astringents, plutôt que seulement sur des composés phénoliques isolés. Pour ce faire, nous devons confirmer que notre système et notre protocole expérimental sont capables de détecter des variations tribologiques avec plusieurs composés considérés comme astringents, et pas seulement avec l'EgCG. Ces travaux sont réalisés seulement sur l'isoforme MUC1/VNTR, la forme la plus proche de la forme physiologique de la protéine mucine 1.

L'impact de l'acide tannique sur la lubrification des modèles d'épithélium MUC1/VNTR est illustré dans la figure 4.14 pour les trois indicateurs mécaniques : coefficient de frottement, énergie dissipée et surface endommagée. Après exposition à l'acide tannique, les niveaux du coefficient de frottement, de l'énergie dissipée et de la surface endommagée augmentent par rapport à la condition initiale avec seulement la PM. Le coefficient de frottement passe de $0,028 \pm 0,013$ à $0,047 \pm 0,026$. Cette tendance se retrouve également pour l'énergie dissipée et la surface endommagée *post mortem*. Cependant, cette augmentation est statistiquement significative uniquement pour le coefficient de frotte-

ment et la surface de dégât ($p < 0,05$), tandis qu'elle ne l'est pas pour l'énergie dissipée ($p > 0,05$).

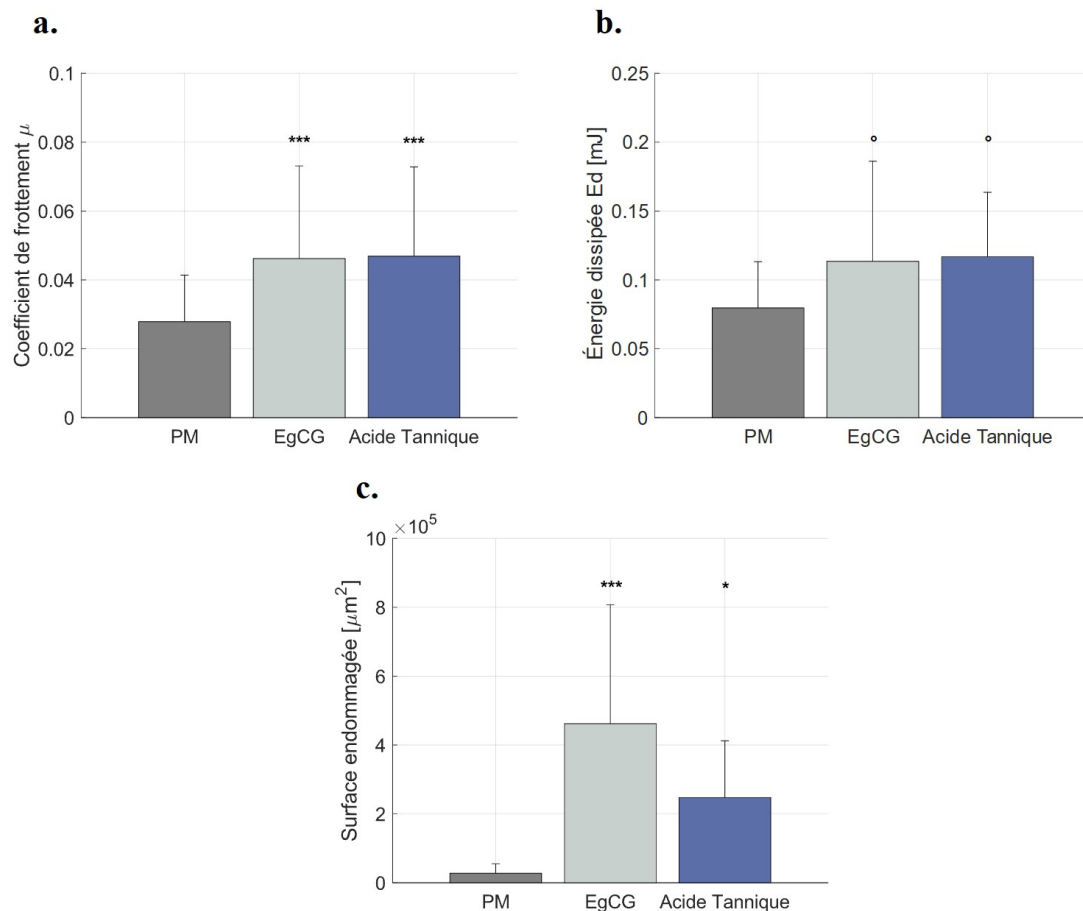


FIGURE 4.14 – Comparaison de l'effet de l'acide tannique sur la lubrification de l'isoforme MUC1/VNTR par rapport à l'EgCG sur les trois indicateurs mécaniques (a) Coefficient de frottement (b) Énergie dissipée et (c) Surface endommagée - Le code de signification statistique montre la comparaison par rapport à la condition "PM"

Cette étude révèle tout d'abord que l'acide tannique semble exercer également un effet néfaste sur la lubrification des épithéliums. En effet, l'augmentation des trois indicateurs mécaniques après l'exposition à ce composé phénolique traduit une diminution de la lubrification. Cette diminution semble être due, tout comme pour l'EgCG, à l'ancrage des composés phénoliques à la surface de nos modèles de muqueuse. Les spectres SMA et NAD, illustrés dans la figure 4.15, montrent à nouveau, comme pour l'EgCG, que l'exposition à l'acide tannique entraîne une augmentation de la rugosité et de l'irrégularité des surfaces. Les évolutions des paramètres moyens sont statistiquement significatives par rapport à l'état avec la PM seule. Cette augmentation est causée par la présence d'agrégats en surface formés par les polyphénols. D'après la littérature, ces conglo-mérats sont responsables de la rupture de la PM, ce qui réduit drastiquement son pouvoir lubrifiant et conduit à une augmentation des forces de friction et donc des dommages en surface [3]. Ces résultats sont caractéristiques de l'effet des tanins, Rudge et al. [170] ont démontré que l'acide tannique entraîne une augmentation du coefficient de frottement sur des surfaces synthétiques. Ils démontrent également l'augmentation de la taille des

particules, causée par la formation de complexe avec une taille moyenne d'une centaine de nm . Nos travaux montrent que l'acide tannique forme des complexes sur la surface de nos modèles cellulaires (une dizaine de nm figure 4.15) créant une perturbation de la lubrification. Ainsi, nous confirmons avec notre dispositif que nous sommes capables de détecter l'effet d'autres tanins sur la lubrification de nos modèles d'épithélium.

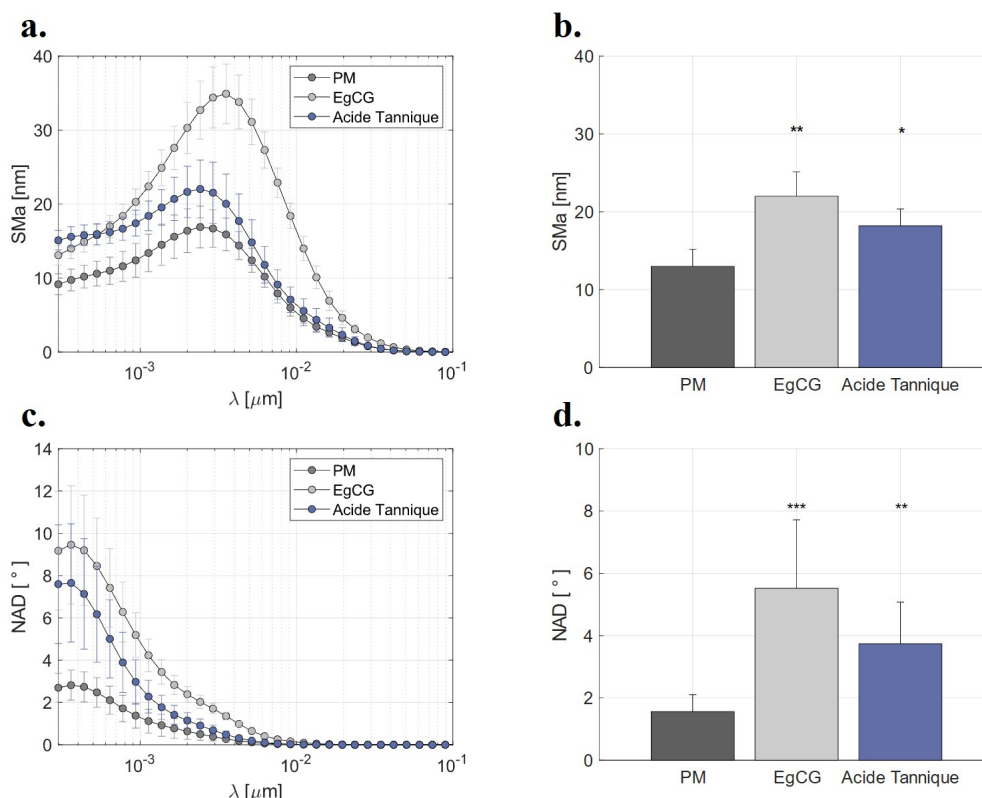


FIGURE 4.15 – (a) Spectres SMA moyens (b) Moyenne du SMA (c) Spectres NAD moyens et (d) Moyenne du NAD pour les conditions PM (sans tanin) et après exposition aux deux tanins étudiés : EgCG et Acide tannique - Les courbes des figures a et c ont une échelle semi-logarithmique en x - Les moyennes sont calculées sur les petites longueurs d'onde (entre 10^{-3} et 10^{-2}) - Le code de significativité sur les figures (b) et (d) correspondent aux différences avec la condition PM seule

La comparaison des résultats concernant l'acide tannique révèle qu'ils sont plus ou moins similaires à ceux de l'EgCG en ce qui concerne le coefficient de frottement et l'énergie dissipée, comme illustré dans la figure 4.14. Seul le niveau de dégât montre une différence entre les deux tanins. Notre étude comparative des effets de deux tanins structurellement différents (EgCG et acide tannique) révèle l'absence de différence sur les indicateurs liés aux forces de friction (coefficient de frottement et énergie dissipée). Contrairement aux observations de Rudge et al. [170], qui notent une disparité de coefficient de frottement entre ces mêmes tanins. Cependant, nous constatons des divergences dans la surface endommagée *post mortem*, où les dommages sont moindres pour l'acide tannique, suggérant peut-être un effet moins prononcé de l'acide tannique par rapport à l'EgCG. Ces hypothèses sont corroborées par les spectres SMA et NAD (voir figure 4.15), qui sont également moins prononcés pour l'acide tannique. Ce qui suggère une moindre présence d'agrégats en surface qui pourrait expliquer des dommages réduits. La tendance d'une lubrification moins impactée par l'acide tannique est

également évoquée par Rudge et al. [170] dans leurs travaux cités précédemment. Ils décrivent que l'EgCG entraîne une augmentation du coefficient de frottement plus significative que l'acide tannique.

Enfin, cette partie aborde un aspect intéressant de l'étude de l'impact des tanins. Notre modèle expérimental offre la possibilité d'étudier différents composés phénoliques ou même des aliments entiers, générant une perception de l'astringence différente. Cela peut être corrélé pour analyser l'aspect sensoriel de nouveaux produits de manière quantitative.

III.1.3 Conclusions intermédiaires

Cette partie confirme l'impact néfaste de l'EgCG sur la lubrification de nos modèles de muqueuse *in vitro*, comme en témoigne l'augmentation de nos paramètres tribologiques. Cette détérioration de la lubrification semble attribuable à l'agrégation des tanins à la surface épithéliale. Ce qui entraîne une rupture de la PM et diminue ses capacités lubrifiantes et hydratantes [146]. L'analyse comparative des spectres SMA et NAD avant et après l'exposition à l'EgCG met en évidence une augmentation de la rugosité et de l'irrégularité de surface en présence de tanins. Cela témoigne de la formation de ces agrégats perturbateurs de la PM [3]. L'agrégation des tanins à la surface entraînent également des perturbations de la chimie de surface et de la tension mécanique de l'épithélium qui peuvent être liées à la perte de lubrification des épithéliums.

Bien que la concentration initiale d'EgCG étudiée soit de 1 *mM*, nous constatons l'effet des tanins même à des concentrations plus faibles, avec des corrélations positives et fortes entre la concentration et les indicateurs mécaniques. Étant donné que la concentration en tanins est fortement liée à la perception de l'astringence, il est envisageable que nos mesures tribologiques soient associées à cette perception. Ces résultats montrent ainsi l'intérêt de ces paramètres pour évaluer l'astringence.

Par ailleurs, l'impact de l'EgCG n'est pas uniforme pour toutes les isoformes, suggérant que MUC1 jouerait un rôle dans la protection des épithéliums contre les tanins. Les niveaux des indicateurs mécaniques après exposition à l'EgCG varient selon l'isoforme étudiée. Les résultats présentés dans cette partie montrent que l'expression de la protéine MUC1 atténue l'effet des tanins. Cette atténuation paraît être renforcée par la structure spécifique de MUC1, qui forme un environnement protecteur efficace contre l'agrégation des tanins en surface [7]. Le domaine VNTR pourrait former un réseau glucidique qui crée un obstacle pour les composés phénoliques [81]. Enfin, il est suggéré que le domaine SEA clivable permet la dissociation de MUC1 en deux sous-unités, favorisant ainsi l'élimination d'une partie de la PM de la surface épithéliale et empêchant l'agrégation de l'EgCG [84, 87]. Nos résultats semblent être en cohérence avec ces mécanismes moléculaires, proposant un rôle crucial de MUC1 dans la lubrification des épithéliums en plus de ses fonctions de formation de la PM.

Enfin, nous démontrons le potentiel impact néfaste d'un autre tanin, l'acide tannique, qui diffère structurellement de l'EgCG et qui génère une intensité d'astringence différente. L'objectif est de montrer que notre méthodologie est capable de différencier le comportement de deux tanins différents. Ainsi, nous suggérons avec notre dispositif que nous sommes capables de détecter l'effet d'autres tanins sur la lubrification de nos modèles

d'épithélium, ouvrant ainsi des perspectives intéressantes pour l'étude d'aliments entiers considérés comme astringents.

III.2 Corrélation de nos résultats tribologiques avec un modèle d'intensité de l'astringence

L'objectif fondamental de la tribologie orale *in vitro* est d'établir des relations entre les paramètres tribologiques et la perception sensorielle, comme l'astringence. Cela permettrait de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents à la perception tactile orale. Malheureusement, dans le cadre de ces travaux, il n'a pas été possible de réaliser des tests sensoriels pour établir directement de telles corrélations. Cependant, la littérature scientifique offre des modèles prédictifs permettant d'estimer l'intensité perçue de l'astringence en fonction de différents paramètres (coefficient de frottement, concentration,...). Xu et al. [338] ont développé un modèle prédictif de l'intensité perçue de l'astringence en fonction de la concentration de différents catéchines, dont l'EgCG. Ce modèle présente des coefficients de détermination (R^2) supérieurs à 0,956 pour les huit catéchines étudiées (figure 4.16). Il permet d'estimer l'intensité d'astringence à partir de la concentration en EgCG. Le modèle est construit à partir de mesure d'intensité via une étude sensorielle.

En combinant nos résultats tribologiques obtenus avec différentes concentrations d'EgCG et le modèle prédictif d'astringence de Xu et al. [338], il est possible d'établir des corrélations entre nos paramètres mesurés et l'intensité d'astringence perçue par le modèle. L'équation du modèle pour l'EgCG est la suivante :

$$y = -0,2095x^3 + 0,8539x^2 + 2,593x + 0,1802 \quad (R^2 = 0,9976) \quad (4.4)$$

y est l'intensité de perception et x est la concentration d'EgCG en $mmol/L$ ou mM .

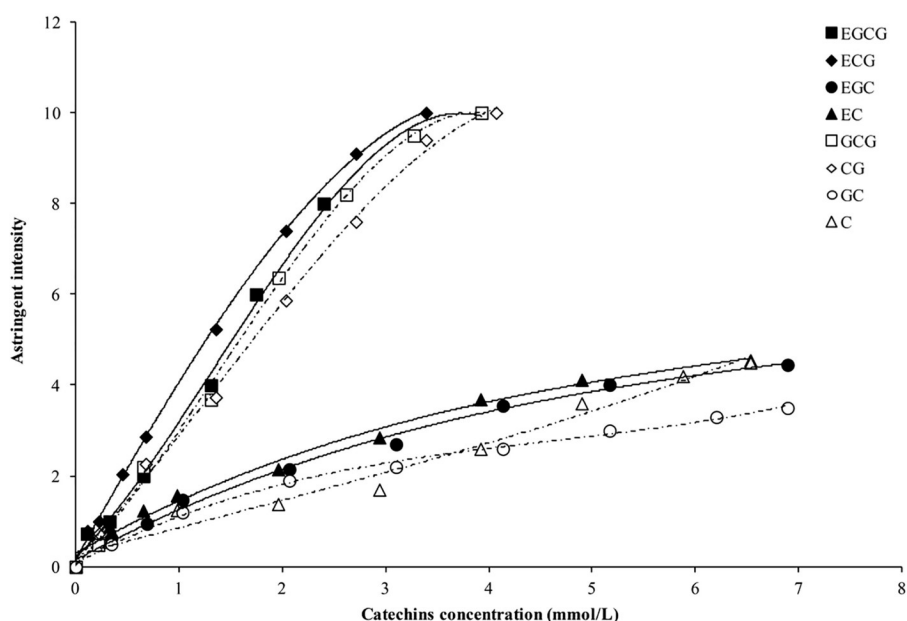


FIGURE 4.16 – Courbes concentration en catéchine en fonction de l'intensité d'astringence perçue - Graphique issu des travaux de Xu et al [338]

L'équation 4.4 nous permet d'estimer l'intensité d'astringence en fonction des concentrations en EgCG que nous testons dans notre étude. Les valeurs obtenues sont présentées dans le tableau 4.4. À partir de ces données, les coefficients de corrélation de Pearson sont déterminés entre les paramètres physiques mesurés sur nos modèles d'épithélium (μ , Ed, Surface de dégâts, SMA et NAD) et les intensités d'astringence prédites. L'objectif est d'évaluer la capacité de la méthodologie développée dans ces travaux à mettre en évidence des corrélations significatives entre nos propriétés tribologiques et la perception de l'astringence. Ces corrélations sont évaluées uniquement pour l'isoforme MUC1/VNTR, car elle présente la structure la plus similaire à la protéine physiologique.

TABLEAU 4.4 – Valeurs de l'intensité d'astringence calculées à partir du modèle prédictif proposé par Xu et al. [338]

Concentration EgCG (mM)	Intensité d'astringence d'après le modèle de Xu et al. [338]
0	0,1802
0,1	0,8499
0,25	1,2789
0,5	1,9330
0,75	2,5637
1	3,1838

Nous observons des corrélations positives et significatives entre l'intensité de l'astringence et les propriétés physiques mesurées sur nos modèles d'épithélium, voir tableau 4.5. L'intensité de l'astringence présente une forte corrélation avec les paramètres tribologiques tels que le coefficient de frottement et la surface de dégâts ($0,8^a$ et $0,92^a$ respectivement). Cela témoigne que la perte de lubrification et l'accroissement des forces de friction, sont liés à la perception de l'astringence. Les paramètres topographiques montrent également une corrélation avec l'intensité de l'astringence. Cependant, elle est moins forte que pour les propriétés tribologiques. Toutefois, cela suggère que l'agrégation des tanins en surface est corrélée à la perception de l'astringence. En résumé, ces résultats corroborent les conclusions précédentes de ce manuscrit. Ils démontrent que l'addition d'EgCG induit une perte de lubrification et une augmentation des forces de friction. Cela entraîne la perception de l'astringence due à la formation de conglomerats à la surface de nos modèles d'épithélium. Tous ces mécanismes sont observables à travers l'évolution des paramètres physiques considérés comme des indicateurs des mécanismes physiques sous-jacents de la perception de l'astringence. Cette confirmation est renforcée par les fortes corrélations obtenues, présentées dans le tableau 4.5.

Ces découvertes ouvrent des perspectives intéressantes, suggérant que notre méthodologie et nos indicateurs mécaniques peuvent être associés à des paramètres sensoriels dans le domaine agro-alimentaire sur des produits considérés comme astringents. Également ce travail offre des possibilités dans l'étude d'autres sensations en bouche comme la sensation de gras qui est à l'opposé de la perception de l'astringence. Ils pourraient également être utile dans le domaine de la santé pour contrer des pathologies telles que la xérostomie en créant des substituts salivaires visant à réduire la sensation de sécheresse buccale.

TABLEAU 4.5 – Coefficient de corrélation de Pearson entre les paramètres physiques et l'intensité d'astringence prédite - ^a la corrélation est statistiquement significative

Coefficient de corrélation de Pearson				
Paramètres	Coefficient de frottement	Surface endommagée	SMA	NAD
Intensité d'astringence	0,80 ^a	0,92 ^a	0,78	0,64

III.3 Étude de l'influence des protéines végétales sur la lubrification et comparaison avec une protéine d'origine animale

III.3.1 Problématique

Ces dernières années, de nombreuses études scientifiques se sont penchées sur des sources de protéines plus durables, pouvant remplacer les protéines animales, telles que les protéines végétales comme celles issues du pois ou du soja [4, 161]. Pour que les protéines végétales puissent réellement s'imposer comme une alternative viable, il est crucial d'améliorer leur acceptabilité pour la majorité des consommateurs. Le défi consiste à évaluer et à améliorer la perception sensorielle des protéines végétales en identifiant leurs propriétés de texture et de goût [162]. En effet, les protéines végétales telles que celles issues du pois sont souvent associées à une sensation désagréable en bouche, notamment la rugosité et l'astringence [165]. Cette astringence est liée aux tanins présents dans le mélange protéique, qui interagissent avec les protéines salivaires, entraînant une diminution de la lubrification [166].

Cette section s'intéresse à l'étude de l'effet de deux protéines végétales, celle de pois et celle de fève, sur la lubrification de nos modèles d'épithélium. Seule l'isoforme MUC1/VNTR est testée. L'objectif est d'étudier l'effet de ces agrégations sur les fonctions de lubrification et d'hydratation de la PM, et ainsi d'évaluer l'impact délétère des protéines végétales sur la lubrification, qui contribue à la perception de l'astringence. De plus, nous réalisons une analyse comparative de la lubrification des protéines végétales avec une protéine d'origine animale, la gélatine de peau de porc qui n'est pas astringente.

Cette section présente donc une étude du comportement tribologique à travers les paramètres mécaniques. Le coefficient de frottement, l'énergie dissipée et la surface d'endommagement traduisent l'évolution de l'état de lubrification des modèles d'épithélium après l'exposition aux protéines. De plus, nous utilisons les spectres de rugosité SMA et NAD pour quantifier les agrégats de protéines à la surface des modèles de muqueuse. Le protocole de préparation des échantillons et des solutions de protéine est expliqué dans la partie II.2.3 du chapitre 4.

III.3.2 Analyses et interprétations

III.3.2.1 L'impact des protéines d'origine végétale

Les conclusions exposées ici concernent spécifiquement l'isoforme MUC1/VNTR, étant donné sa similarité avec les protéines MUC1 présentes dans un contexte biologique. La figure 4.17 présente le coefficient de frottement, l'énergie dissipée et la surface endommagée après l'ajout de protéines végétales et animale. Les résultats révèlent que l'introduction de protéines végétales dans le système engendre une hausse statistiquement notable ($p < 0.05$) des forces de friction. Le coefficient de friction augmente de $0,028 \pm 0,013$ dans l'état initial, simplement avec la PM, à $0,052 \pm 0,022$ et $0,129 \pm 0,079$ respectivement pour FBPP et PP. De même, l'énergie dissipée par frottement augmente significativement ($p < 0.05$), figure 4.17.

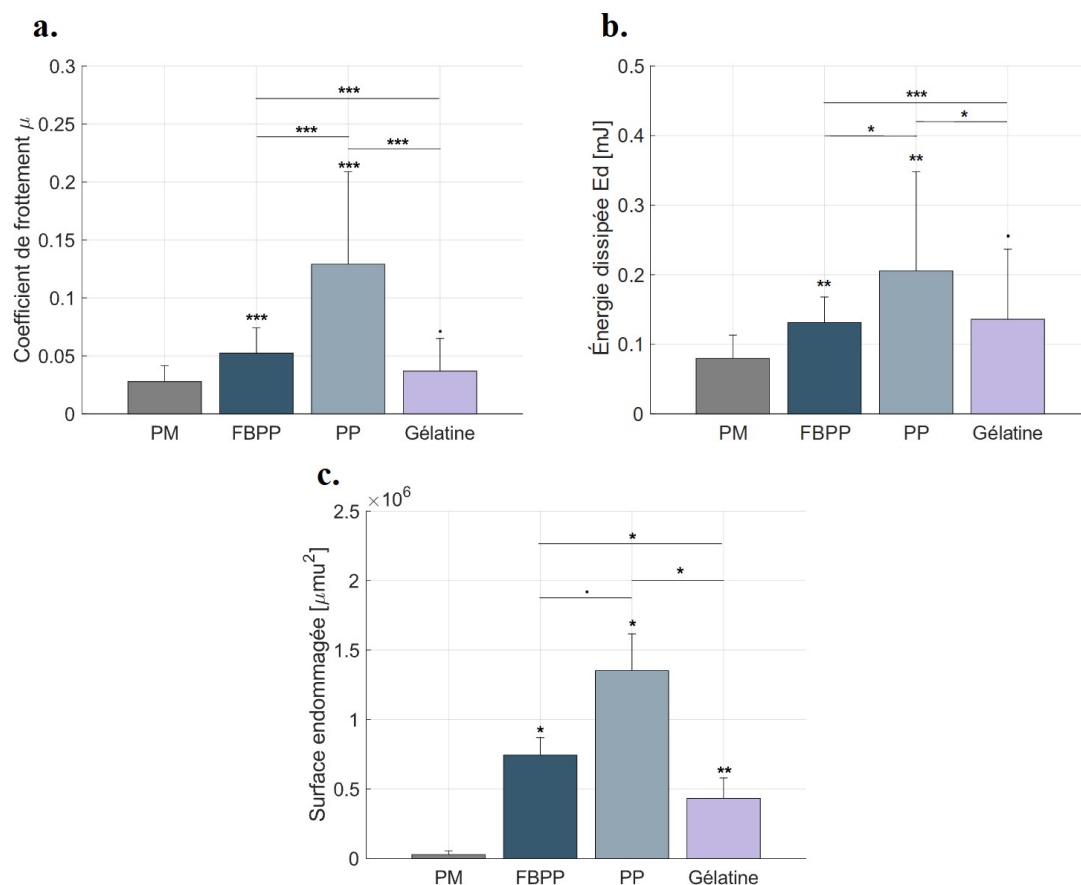


FIGURE 4.17 – Étude de l'effet des protéines végétales sur le comportement tribologique de l'isoforme MUC1/VNTR et comparaison avec une protéine d'origine animale la gélatine porcine sur les trois indicateurs mécaniques : (a) Coefficient de frottement (b) Énergie dissipée et (c) Surface endommagée - Les codes de significative au-dessus des bar plot compare avec l'état initial (PM)

La figure 4.18 illustre qualitativement les surfaces *post mortem* dans les deux conditions, avec ou sans protéines végétales. Ces images témoignent clairement d'une détérioration plus prononcée après exposition à ces protéines. La quantification de ces dommages (figure 4.17), issue de l'analyse des images *post mortem*, confirme ces

observations, révélant une augmentation ($p < 0,05$) des dégâts après frottement suite à l'ajout de FBPP et de PP. Les dégâts passent ainsi de $(0,28 \pm 0,27) \cdot 10^5 \mu m^2$ dans la condition initiale à $(7,45 \pm 1,27) \cdot 10^5 \mu m^2$ et $(13,50 \pm 2,65) \cdot 10^5 \mu m^2$ respectivement pour FBPP et PP. Ces résultats mettent en évidence une perturbation de la lubrification due à l'exposition aux protéines végétales. Par ailleurs, l'énergie dissipée augmente également de manière significative. Cette perturbation entraîne une augmentation des forces de friction et de l'endommagement.

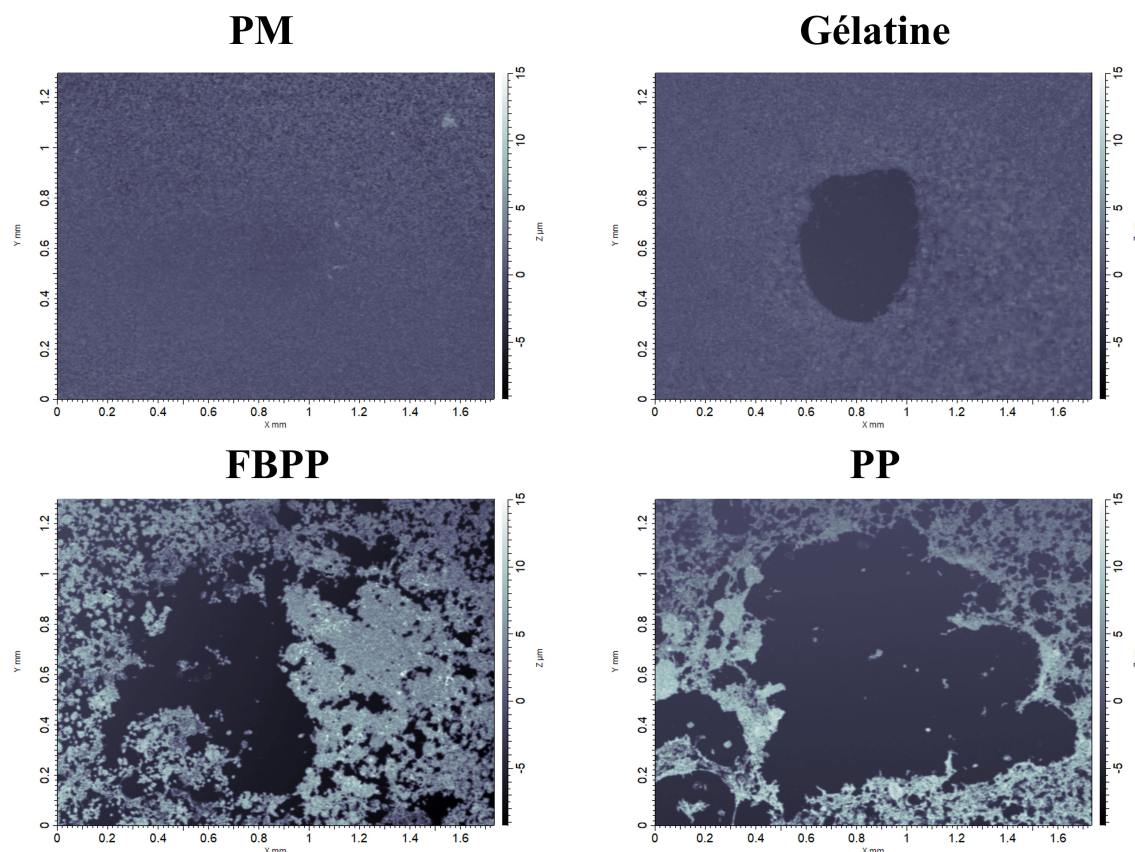


FIGURE 4.18 – Images des épithéliums post mortem après l'exposition à des protéines végétales et une protéine animale comparées à la condition initiale

L'analyse comparative des spectres SMA et NAD après exposition aux protéines végétales (figure 4.19) traduit une augmentation de la rugosité et des irrégularités de surface. Les valeurs de ces spectres pour les protéines végétales dépassent largement celles de la condition avec uniquement la PM ($p < 0,05$). Le paramètre SMA passe de $12,7 \text{ nm}$ avec la PM seule à $25,9 \text{ nm}$ et $22,1 \text{ nm}$ respectivement pour les FBPP et PP. Cette augmentation de la rugosité (SMA) et des irrégularités (NAD) est le reflet de la formation d'agrégats perturbant la lubrification des modèles d'épithélium. Ainsi, la hausse des forces de friction et de l'endommagement résulte de l'agrégation des protéines végétales à la surface des modèles. Finalement, ce comportement est similaire aux phénomènes observés avec les tanins (voir section III.1.2.1).

Des études antérieures ont également mis en évidence ces conclusions, démontrant que les protéines végétales altèrent la lubrification en raison de l'agrégation des pro-

téines et de leur interaction avec la salive [161, 166]. Ces recherches expérimentales utilisent des mesures tribologiques pour évaluer l'impact des protéines végétales sur la lubrification buccale. Ils observent les variations des forces de friction et s'appuient sur des évaluations sensorielles afin d'étudier les corrélations entre les résultats [4, 162, 272, 340].

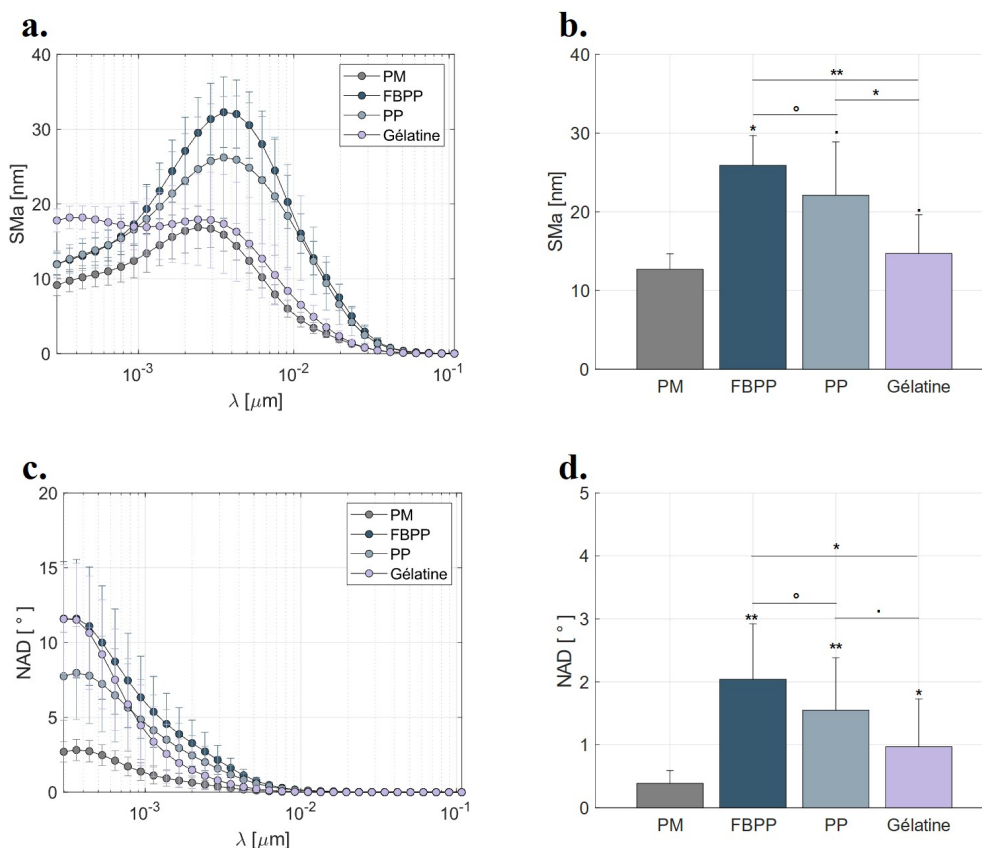


FIGURE 4.19 – (a) Spectres Sma moyens (b) Moyenne du Sma (c) Spectres NAD moyens et (d) Moyenne du NAD pour les conditions PM seule et après exposition à des protéines végétale : FBPP et PP et le gélatine porcine - Les courbes des figures a et c ont une échelle semi-logarithmique en x - Les moyennes sont calculées sur les petites longueurs d'onde (entre 10^{-3} et 10^{-2}) - Le code de significativité sur les figures (b) et (d) correspondent aux différences avec la condition PM seule

Bien que les PP soient réputées pour leurs bienfaits pour la santé, leur accessibilité et leur nature hypoallergénique [341]. Leurs effets astringents marqués peuvent restreindre leur adoption dans l'alimentation quotidienne [342]. Ces conclusions rejoignent les résultats de cette étude, confirmant le potentiel élevé des PP à perturber la lubrification de la surface épithéliale. De plus, l'impact des PP est plus prononcé que celui des FBPP ou même de l'EgCG (voir figure 4.17), à cause de leurs différences structurales. Ces observations suggèrent que les composés dits astringents provoquent des effets différents, probablement dus à leurs variations structurales. Cette intensité accrue pourrait être associée à une perception plus marquée de l'astringence, en accord avec les résultats de Troszynska et al. [166] qui ont observé que les PP présentaient un indice d'astringence plus élevé que les FBPP. Comme nous l'avons démontré précédemment (voir section III.1.2.4), des tanins différents ont des effets distincts sur la lubrification des modèles épi-

thélieux [170]. Ces variations ont également été constatées par Lei et al. [314], qui ont comparé l'impact de deux types de polyphénols sur la lubrification d'une pellicule salivaire ancrée à la surface d'un émail. Leur étude a révélé que le poids moléculaire a un impact sur l'effet des polyphénols. Nos résultats sont pertinents car ils illustrent que notre méthode est capable de discriminer l'effet de plusieurs composés astringents sur la lubrification de nos modèles d'épithélium. Ce qui ouvre ainsi des perspectives prometteuses pour l'étude de l'astringence et sa corrélation avec nos indicateurs mécaniques.

III.3.2.2 Comparaison avec l'effet des protéines d'origine animale

Nous comparons maintenant l'impact des protéines végétales avec celui des protéines d'origine animale, notamment la gélatine porcine. Les tests révèlent des différences significatives : les forces de friction et les dommages de surface augmentent moins avec la gélatine qu'avec les protéines végétales. Le coefficient de frottement augmente significativement ($p < 0,05$) de 87% et 362% respectivement pour les FBPP et les PP, tandis qu'il augmente seulement et de manière non significative ($p > 0,05$) de 32% pour la gélatine (voir figure 4.17). Les résultats qualitatifs des images *post mortem* des modèles d'épithélium confirment cette observation : l'impact de la gélatine est nettement moindre que celui des protéines végétales. Les analyses quantitatives confirment également cette tendance : la surface endommagée après frottement est significativement plus faible ($p < 0,05$) pour la gélatine que pour les protéines végétales. De plus, les spectres de rugosité et d'irrégularité SMA et NAD (voir figure 4.19) montrent des valeurs plus faibles pour la gélatine que pour les protéines végétales, indiquant des agrégations moins importantes et un impact réduit sur la lubrification des épithéliums. Le SMA moyen est de $25,9 \pm 3,8 \text{ nm}$ pour les protéines végétales FBPP et de $22,1 \pm 6,8 \text{ nm}$ pour les protéines végétales PP, tandis qu'il est de $14,7 \pm 4,1 \text{ nm}$ pour la gélatine porcine. Ces diminutions sont statistiquement significatives ($p < 0,05$). De plus, ces différences suivent la même tendance pour le NAD moyen.

Ces observations sont cohérentes avec les sensations perçues en bouche, car la gélatine n'est pas considérée comme astringente. Au contraire, elle est souvent utilisée comme agent gélifiant ou de revêtement pour atténuer l'effet astringent, comme dans le vin [343]. Cependant, une perspective demeure, car la gélatine utilisée dans cette étude n'a pas été chauffée et l'essai a été réalisé à température ambiante. Or, il est établi que la gélatine fond et acquiert une consistance gélifiée sous l'effet de la chaleur, ce qui lui confère ses propriétés lubrifiantes. Il serait donc plus pertinent, à l'avenir, de chauffer la gélatine avant les essais ou de les effectuer à température buccale afin d'obtenir la rhéologie réelle de la gélatine telle qu'elle est consommée. Le chauffage de la gélatine pourrait réduire les faibles rugosités observées sur le spectre SMA (voir figure 4.19).

Toutefois, ces résultats valident la fiabilité de nos modèles et protocoles. Nous pouvons envisager d'étudier plus en profondeur l'effet des protéines végétales et animales sur les différentes isoformes de MUC1, tout comme nous l'avons réalisé pour l'EgCG afin d'étudier le rôle joué par MUC1 et sa structure.

III.3.3 Conclusions intermédiaires

Dans cette section, nous exposons les résultats obtenus grâce à notre méthodologie, mettant en lumière l'effet néfaste des protéines végétales sur la lubrification des modèles de muqueuse orale. Nous démontrons que notre protocole permet de caractériser cet effet à travers divers indicateurs mécaniques. L'exposition aux protéines végétales entraîne une augmentation des forces de friction, ce qui semble traduire une diminution des performances en matière de lubrification. Également, nous observons une élévation de la rugosité et de l'irrégularité des surfaces. Ces observations reflètent l'agrégation des protéines sous forme de conglomerats à la surface des épithéliums. Ces agrégations conduisent donc à une rupture de la pellicule mucoale et à une diminution de la lubrification [161]. Cette modification de la topographie a également été observée par Kew et al. ainsi que Vladscu et al. [4, 162], qui ont également noté la formation d'agrégats après l'incorporation de protéines végétales mais sur des matériaux synthétiques.

Il convient de souligner que les protéines végétales utilisées dans cette étude ne sont pas isolées, mais elles font partie d'un mélange d'autres composés, ce qui permet de se rapprocher davantage des aliments réels. En effet, dans la vie quotidienne, nous ne consommons jamais des tanins ou des protéines sous une forme isolée. Ces essais offrent ainsi une perspective plus globale et plus fidèle aux aliments courants pouvant être considérés comme astringents.

Nous démontrons également que les protéines d'origine animale ont un impact nettement moindre sur la lubrification que les protéines végétales selon nos différents indicateurs mécaniques. Cette constatation est prometteuse pour l'avenir, car elle souligne la capacité de notre méthodologie à discriminer entre deux types de molécules dont les perceptions lors de la consommation diffèrent, étant donné que les protéines animales ne sont pas astringentes. Cette approche ouvre des perspectives passionnantes pour l'industrie alimentaire et le développement de nouveaux produits à base de protéines végétales.

L'objectif est de concevoir de nouveaux produits durables et sains tout en respectant les préférences des consommateurs. Notre méthodologie offre la possibilité d'évaluer quantitativement ces nouveaux aliments en complément des tests sensoriels traditionnels. Ces découvertes ouvrent des perspectives prometteuses dans l'étude des protéines végétales dans les produits alimentaires en utilisant des modèles d'épithélium qui reproduisent étroitement l'épithélium *in vivo*. Ces modèles, basés sur des cellules épithéliales TR146 exprimant une isoforme de la protéine MUC1 très similaire à sa forme physiologique, représentent une avancée significative dans la compréhension de l'astringence et des implications des protéines végétales pour l'industrie alimentaire.

III.4 Exploration du rôle protecteur des PRP

III.4.1 Problématique

Ce chapitre propose une analyse de l'impact des tanins sur la lubrification des modèles d'épithélium. Néanmoins, divers mécanismes de défense sont instaurés par l'organisme pour contrer leurs effets. Les PRP caractérisées par une forte affinité pour les tanins forment avec eux des complexes protéiques. Ils limitent ainsi l'impact sur les muqueuses, notamment en réduisant la perturbation de la lubrification [8]. L'objectif de cette section du chapitre est de proposer une nouvelle perspective sur l'influence des tanins et d'explorer les mécanismes de protection associés.

Pour examiner le rôle des PRP dans la protection des muqueuses, des bPRP IB5 sont utilisées. Ainsi, une solution de PRP est ajoutée avant l'EgCG afin de comparer les résultats tribologiques obtenus après une exposition uniquement aux tanins. L'objectif est d'étudier l'effet de la présence de PRP sur la lubrification des modèles d'épithélium.

Ces manipulations sont effectuées sur l'isoforme MUC1/VNTR en raison de sa similitude avec les protéines MUC1 physiologiques. Plusieurs indicateurs mécaniques sont utilisés : le coefficient de frottement, l'énergie dissipée et la surface endommagée, qui reflètent l'évolution de la lubrification. De plus, les spectres NAD et SMA sont examinés pour quantifier les agrégats en surface.

III.4.2 Résultats et analyses

III.4.2.1 La protection de la lubrification

Cette étude propose une approche pour examiner le rôle des PRP dans la préservation de la lubrification de nos modèles d'épithélium exposés à l'EgCG. Deux concentrations d'EgCG sont utilisées : 0,5 *mM* et 1 *mM* [8]. La figure 4.20 illustre l'effet des PRP à travers l'analyse des trois indicateurs mécaniques. A une concentration d'EgCG de 1 *mM*, le coefficient de frottement diminue de $0,046 \pm 0,027$ pour l'EgCG seul à $0,037 \pm 0,026$ pour l'EgCG + PRP, montrant ainsi une diminution de μ en présence de PRP ($p < 0,05$). Une tendance similaire est observée avec la concentration de 0,5 *mM* (une diminution de 20%). De même, une réduction de l'énergie dissipée est observée après l'ajout de PRP pour les deux concentrations de tanins étudiées. Cependant, cette réduction est plus marquée à une concentration de 1 *mM* (-25%) qu'à 0,5 *mM* (-7%).

De manière comparable, la surface endommagée après frottement diminue après l'addition de PRP pour les deux concentrations d'EgCG ($p > 0,05$). Ces conclusions peuvent être appréhendées qualitativement en observant les images *post-mortem* des épithéliums, consultables en Annexe IV. De plus, une analyse quantitative de ces images permet de calculer la surface endommagée et de confirmer ces observations.

Cependant, la diminution observée n'est pas uniforme en fonction de la concentration d'EgCG étudiée. À une concentration de 0,5 *mM*, la réduction de surface est plus prononcée qu'à 1 *mM*, contrairement à ce qui est observé pour l'énergie dissipée. Ainsi, il est difficile de tirer des conclusions sur l'effet de la concentration, car les trois indicateurs

présentent des comportements divergents. Toutefois, les résultats des trois indicateurs convergent vers une conclusion commune : la présence des PRP entraîne une diminution des paramètres tribologiques, qui semble indiquer un adoucissement de l'effet néfaste de l'EgCG. En d'autres termes, l'ajout de PRP atténue l'effet de l'EgCG, confirmant ainsi le rôle préventif qui leur est attribué dans la littérature scientifique [3, 344, 345]. Les PRP jouent un rôle crucial en tant que première ligne de défense contre la toxicité de l'EgCG, préservant la muqueuse en empêchant les tanins de pénétrer et de s'agréger, réduisant ainsi les dommages potentiels à la surface mucosale [3, 344, 345].

III.4.2.2 Un mécanisme contre les agrégations

L'analyse comparative de nos spectres SMA et NAD révèle une diminution des paramètres topographiques suite à l'ajout de PRP pour les deux concentrations d'EgCG (figure 4.21). En effet, pour une concentration de 0.5 mM d'EgCG avec des PRP, le SMA diminue significativement de 55% par rapport à la condition sans les PRP, le paramètre NAD diminue significativement également de 82%. Pour 1 mM, les paramètres diminuent également mais pas significativement. Nous considérons dans cette étude que ces spectres SMA et NAD représentent la rugosité et les irrégularités de surface de nos épithéliums, permettant ainsi de quantifier les agrégats de tanins en surface. Nous observons ainsi, à la fois sur les spectres et de manière significative sur les paramètres moyens, que la rugosité et les irrégularités diminuent en présence de PRP, voir figure 4.21.

Ces données traduisent efficacement l'effet des PRP qui réduisent les agrégats en surface. Par conséquent, une réduction des agrégats entraîne une atténuation des effets nocifs sur les propriétés lubrifiantes de la PM. Cette atténuation est bien reflétée par nos résultats tribologiques, à savoir des paramètres mécaniques minimales. En conclusion, nous pouvons supposer le rôle protecteur des PRP contre la toxicité de l'EgCG sur nos modèles d'épithélium, tant d'un point de vue tribologique que topographique, ces deux aspects étant intimement liés.

La corrélation positive entre les paramètres tribologiques et topographiques est calculée à l'aide du coefficient de corrélation de Pearson, comme présenté dans le tableau 4.6. Ainsi, nos conclusions montrent le lien entre la formation d'agrégats en surface et l'augmentation des paramètres tribologiques. Au niveau de l'énergie dissipée, les résultats présentent des coefficients de corrélation faibles et non significatifs comparés aux deux autres indicateurs, rendant l'interprétation difficile.

TABLEAU 4.6 – Coefficient de corrélation de Pearson entre les paramètres tribologiques et topographiques avec et sans ajout de PRP avant les tanins - ^a la corrélation est statistiquement significative

Coefficient de corrélation de Pearson			
Paramètres	Coefficient de frottement	Énergie dissipée	Surface endommagée
SMA moyen (0,5 mM)	0,89 ^a	0,48	0,99 ^a
SMA moyen (1 mM)	0,98 ^a	0,48	0,79 ^a
NAD moyen (0,5 mM)	0,98 ^a	0,64	0,99 ^a
NAD moyen (1 mM)	0,89 ^a	0,64	0,79 ^a

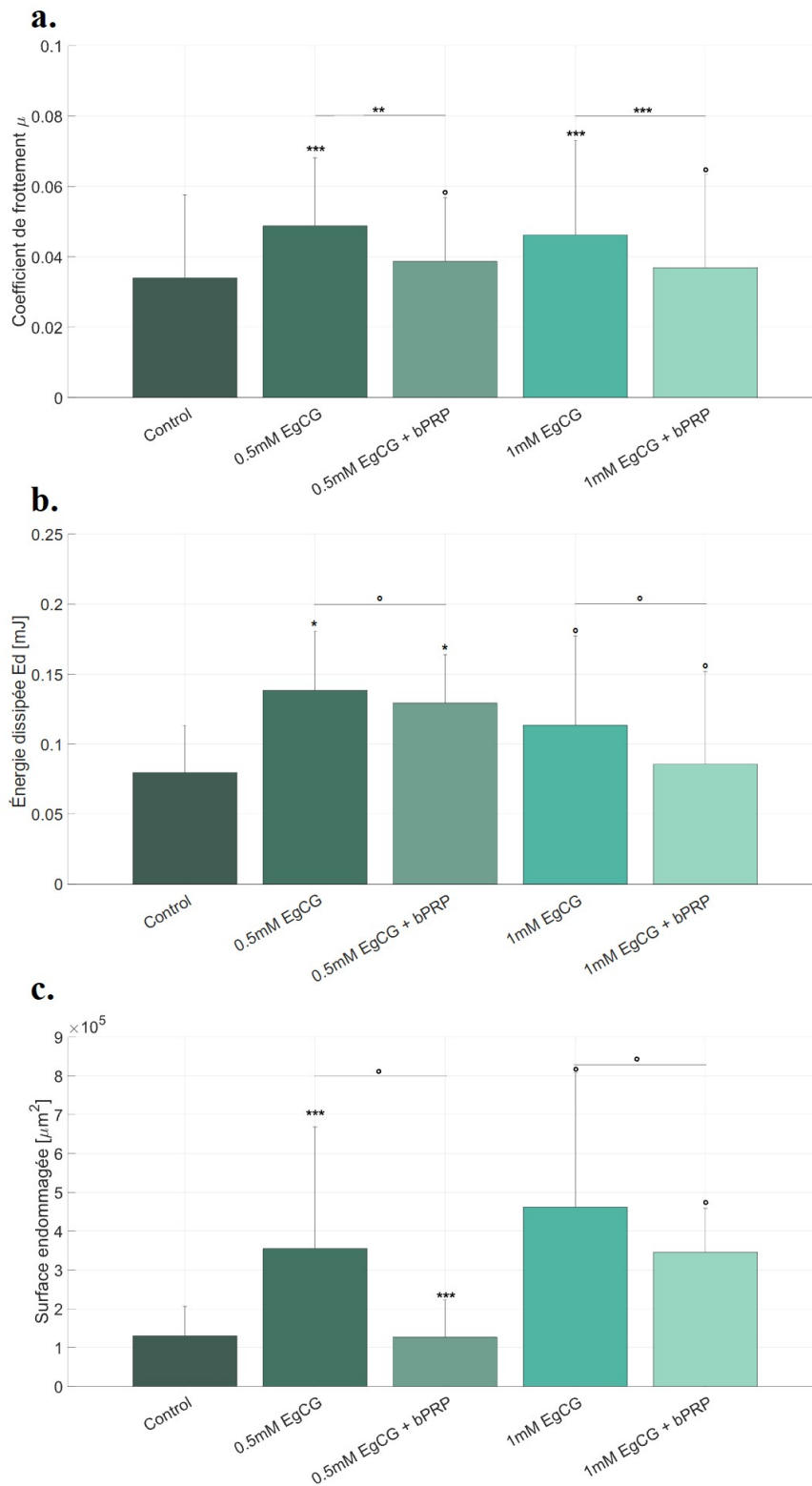


FIGURE 4.20 – Impact des PRP sur nos modèles cellulaires - (a) Coefficient de friction (b) Énergie dissipée et (c) Surface endommagée après exposition du modèle cellulaire à l'EgCG (0,5 mM et 1 mM), avec ou sans PRP (0,66 mM) - Le code de significativité au dessus des barres d'erreur explique la différence avec le test control - Le test control correspond à une condition : PM + PRP sans EgCG

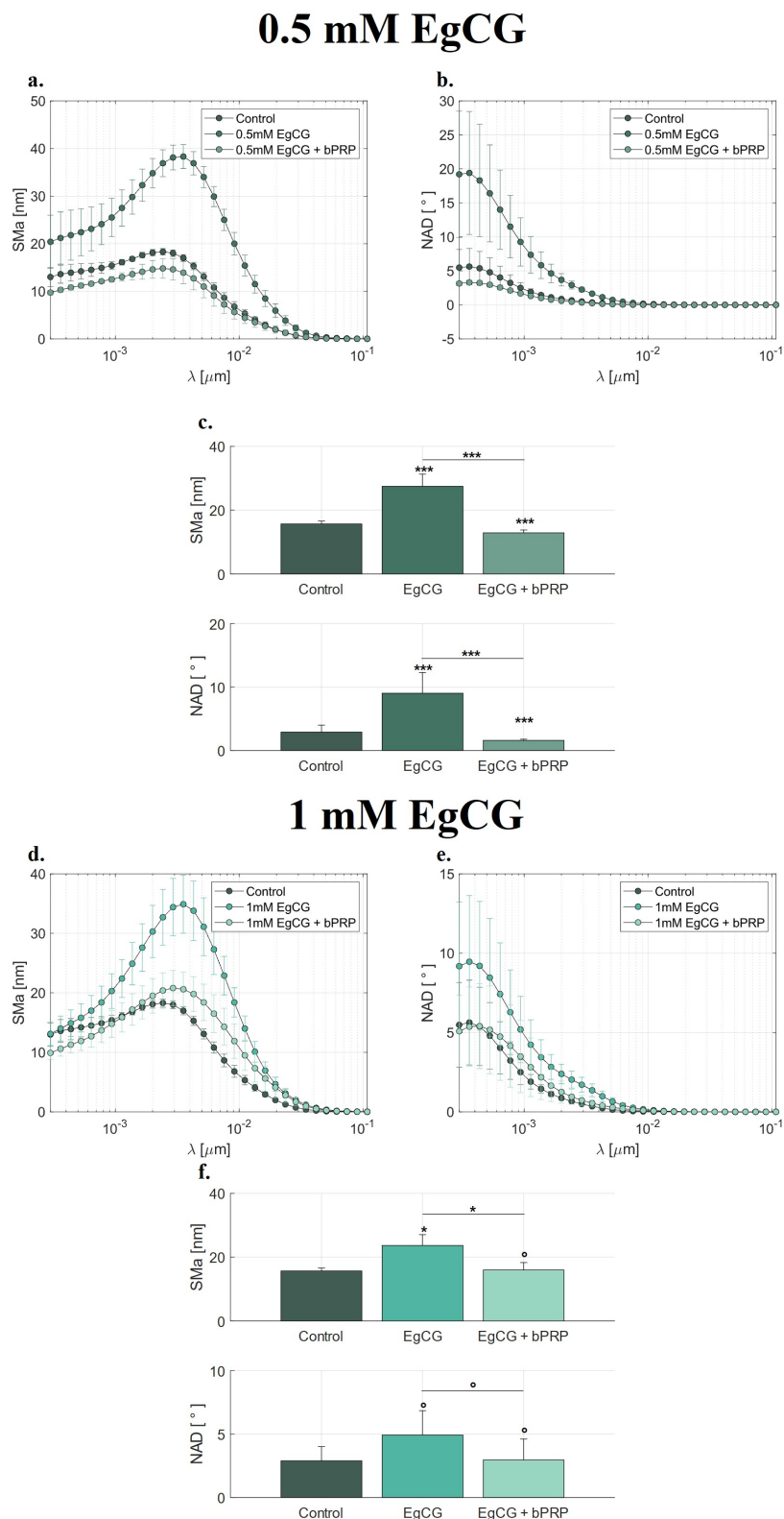


FIGURE 4.21 – Spectres SMA et NAD moyens pour les deux concentrations en EgCG étudiées dans les trois conditions expérimentales : Control (PM + PRP), PM + EgCG et PM + EgCG + PRP - Les figures (c) et (f) présentent les paramètres moyens sur les longueurs d'onde "moyenne" entre 10^{-3} et 10^{-2} μm - Le code de significativité sur les figures (c) et (f) au dessus des bars plot correspondent aux différences avec la condition Control (PM + PRP)

III.4.2.3 Une protection de la tension mécanique

En réexaminant le calcul de l'indice de tension IC avec l'ajout de PRP, nous observons sur la figure 4.22 que leur présence permet de réduire l'impact de l'EgCG. En effet, la tension mécanique du tissu est supérieure avec la présence des PRP qu'en leur absence, en présence de l'EgCG. Nous retrouvons des conclusions similaires à celles obtenues pour les paramètres tribologiques et topographiques. Ce calcul d'indice représente un nouvel indicateur caractérisant la tension du tissu et démontre que les PRP semblent atténuer les effets de l'EgCG. Ainsi, nous démontrons, à l'aide de plusieurs paramètres mécaniques, le rôle actif des PRP dans la protection des épithéliums.

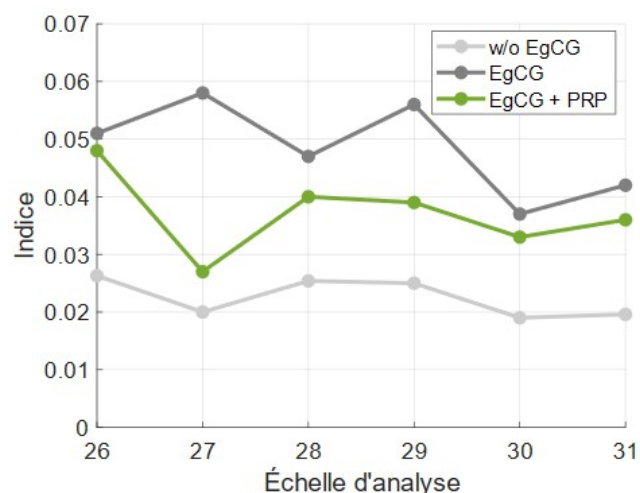


FIGURE 4.22 – Indices de tension pour les trois conditions expérimentales : sans EgCG, avec EgCG et EgCG + PRP

III.4.2.4 La confirmation par microscopie à fluorescence des PRP

Dans cette section, nous démontrons que l'addition des PRP atténue l'effet de l'EgCG sur la lubrification de nos modèles d'épithélium. Les augmentations de nos paramètres physiques sont bien moins prononcées avec les PRP qu'en leur absence. Ployon et al [8] ont abouti à des conclusions similaires aux nôtres (voir figure 4.23) : les PRP atténuent l'effet nocif de l'EgCG sur les mêmes modèles d'épithéliums oraux. Ils ont constaté qu'avec l'EgCG, le revêtement de MUC5B à la surface cellulaire diminue considérablement, révélant ainsi un détachement de la PM. Cependant, en présence de PRP, cette diminution est moins marquée, ce qui indique un moindre détachement de la PM sous l'effet protecteur des PRP. Ces résultats sont totalement cohérents avec les nôtres, car la préservation d'un revêtement plus important par MUC5B conduit à une meilleure lubrification, comme le montrent nos paramètres tribologiques. De plus, Ployon et al. [8] ont noté que l'effet des PRP se traduit par une réduction de la quantité de dépôts, c'est-à-dire qu'en présence de PRP, l'agrégation des tanins à la surface cellulaire est moindre (voir figure 4.23), limitant ainsi le détachement de la PM. Cela corrobore nos observations sur l'évolution des spectres de rugosité S_{Ma} et NAD : en présence de PRP, ces spectres sont moins prononcés, révélant une quantité moindre de conglomerats de tanins. Cette concordance avec nos résultats est évidente, car nous observons une diminution des

agrégations permettant de limiter la rupture de la PM et donc de maintenir une meilleure lubrification.

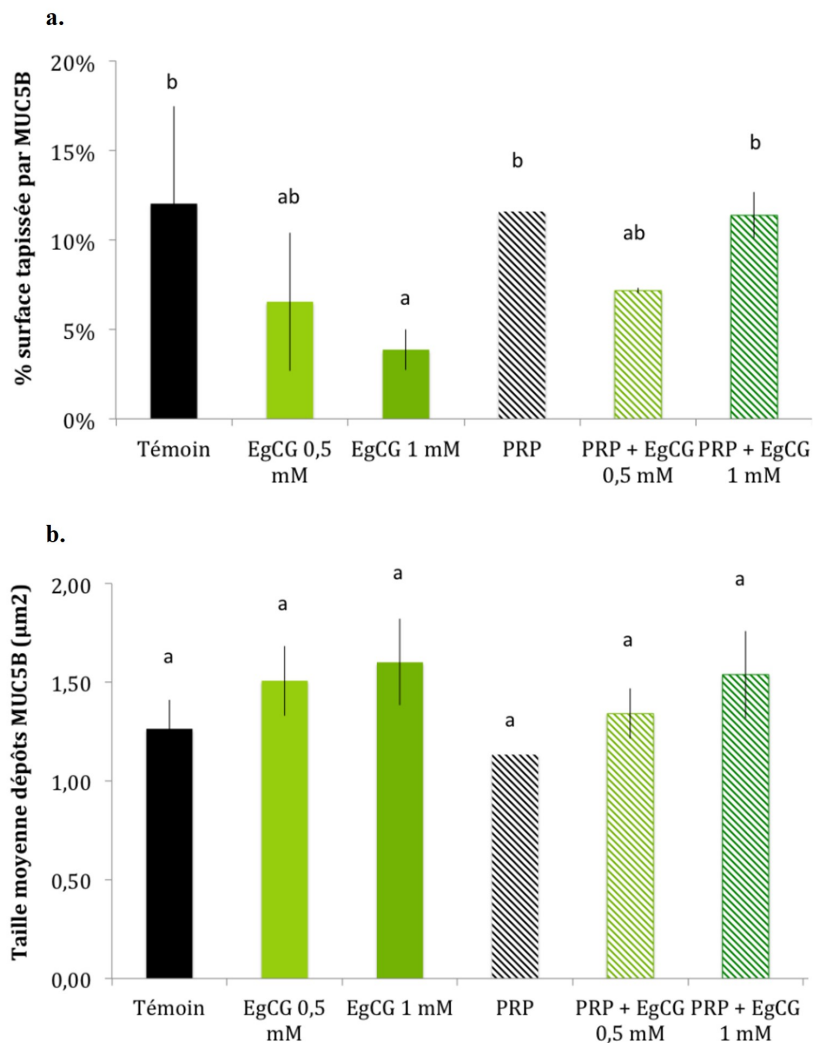


FIGURE 4.23 – Effet des PRP sur (a) le tapissage de la surface cellulaire par MUC5B et (b) la taille moyenne des dépôts - Images issues des travaux de Ployon et al [8]

Nos résultats sont donc, de nouveau fortement lié à la littérature, ce qui souligne la cohérence de l'évolution de nos paramètres physiques. En effet, l'augmentation ou la diminution de nos paramètres est justifiée par une explication moléculaire. Ces cohérences renforcent la fiabilité de nos résultats et de notre étude, d'autant plus que les résultats présentés ici sont obtenus sur les mêmes modèles cellulaires.

III.4.3 Conclusions intermédiaires

L'objectif de cette étude est d'examiner le rôle protecteur des PRP contre les tanins en mettant en place une méthodologie pour confirmer leurs effets bénéfiques. L'analyse tribologique et topographique a permis de démontrer cette protection, avec une diminution des paramètres suggérant une atténuation de l'effet de l'EgCG sur la lubrification de nos modèles d'épithélium. Après l'exposition à l'EgCG, les forces de friction mesurées

à la surface de nos modèles sont plus faibles en présence de PRP, ce qui confirme leur rôle protecteur pour l'épithélium. De même, l'analyse topographique a illustré les fonctions protectrices des PRP, les paramètres SMA et NAD diminuant en leur présence, indiquant ainsi une réduction du nombre d'agrégats en surface formés par l'EgCG. Cette diminution des agrégats a également été confirmée par Nivet et al. [7]. Un lien évident existe entre ces deux observations, car moins d'agrégats de tanins en surface réduisent l'effet sur la PM, préservant ainsi son pouvoir lubrifiant.

Ces interactions entre les PRP et les tanins sont étroitement liées à la sensation d'astringence, qui constituent en réalité un mécanisme de défense visant à prévenir les effets nocifs des tanins sur la santé. Par exemple, chez les rats et les souris, une augmentation de la concentration en PRP a été observée après une consommation excessive de tanins, soulignant ainsi leur importance dans la protection de la muqueuse [193]. Ces mécanismes de protection reposent sur l'affinité élevée des PRP pour les tanins, un aspect qui a été largement étudié par Canon et al. [3].

Il est intéressant de constater que notre méthodologie est capable d'identifier le pouvoir protecteur d'une protéine telle que la PRP. Ces résultats, en plus de démontrer cette fonction, offrent des perspectives intéressantes pour l'étude des fonctions protectrices d'autres protéines salivaires telles que les histatines.

IV Conclusions et bilan du chapitre

Ce chapitre explore les mécanismes moléculaires de l'astringence et ses effets sur la lubrification. Les analyses révèlent les impacts négatifs des tanins, exposant les divers mécanismes sous-jacents à cette sensation. De plus, il examine le rôle possible de MUC1 dans ces processus, incluant les fonctions des domaines SEA et VNTR. Cette section explore également le rôle protecteur des PRP dans la lubrification des épithéliums, mettant en lumière les mécanismes physiques associés à la sensation d'astringence et leur effet sur la lubrification de la muqueuse buccale. Les tests tribologiques sur nos modèles d'épithélium permettent d'évaluer l'état de lubrification et de reproduire les interactions spécifiques des mucines MUC1, facilitant ainsi l'étude de leur rôle dans la perception de l'astringence. Cette approche permet d'explorer des hypothèses biologiques à différentes échelles, corroborant diverses propositions de la littérature.

Les résultats révèlent l'impact néfaste des tanins et des protéines végétales sur la lubrification des épithéliums. L'application de composés astringents entraîne la formation d'agrégats à leur surface, quantifiés par nos spectres SMA et NAD qui augmentent après l'exposition aux tanins. Ces agrégations en surface entraînent le détachement de la PM des épithéliums, provoquant une diminution de la lubrification. Cette perte est quantifiée par nos paramètres tribologiques, montrant une augmentation des forces de friction et des dégâts *post mortem* avec l'ajout de tanins ou de protéines végétales. Ainsi, les composés astringents induisent des modifications physico-chimiques de surface entraînant une perte de lubrification, corrélée à une perception de l'astringence. Par ailleurs, les protéines d'origine animale ont un impact moindre sur la lubrification que les protéines végétales selon nos indicateurs mécaniques, ce qui est cohérent avec leur

non-astringence.

L'expression de MUC1 dans nos modèles permet d'analyser son rôle dans les mécanismes physiques liés à l'astringence. La structure de la mucine transmembranaire MUC1 renforce la protection de la lubrification épithéliale après l'exposition à l'EgCG, probablement par le clivage du domaine SEA libérant le domaine VNTR [34, 87]. La dissociation de MUC1 en deux sous-unités contribue à l'élimination d'une partie de la PM de la surface épithéliale, prévenant l'agrégation de l'EgCG [84, 87]. De plus, le domaine VNTR des isoformes MUC1/VNTR et MUC1/VNTR-NC semble contribuer à la protection en empêchant les tanins d'atteindre la surface épithéliale et de former des agrégats. Ces mécanismes préviennent la rupture de la pellicule mucoale (PM) et, par conséquent, réduisent les effets néfastes de l'EgCG par rapport aux autres isoformes.

En plus des mécanismes protecteurs de MUC1, nous étudions le rôle actif des PRP dans la protection des épithéliums contre les tanins. Les PRP lient les tanins avant qu'ils ne puissent agréger les protéines salivaires de la PM, préservant ainsi la lubrification. Nos essais montrent une diminution des paramètres tribologiques et topographiques en présence de PRP, traduisant une meilleure lubrification et une réduction des agrégats de tanins en surface. Notre méthodologie identifie le pouvoir protecteur des PRP et ouvre des perspectives dans l'étude d'autres protéines impliquées dans la lubrification des épithéliums.

Enfin, nous corrélons nos paramètres physiques avec des paramètres sensoriels, révélant des corrélations positives significatives. Ces découvertes offrent des perspectives dans l'utilisation de notre méthode pour le développement d'aliments atténuant l'astringence et pour l'étude d'autres sensations en bouche, comme la sensation de gras. Ce type de relation pourrait être utilisé dans le domaine de la santé pour analyser la perception de certains traitements oraux. Le chapitre suivant se base sur cette corrélation positive entre nos paramètres et la perception de l'astringence. L'objectif est d'identifier différents groupes de volontaire plus ou moins sensibles à l'astringence à partir de la collecte de leur salive.

Les figures 4.24 et 4.25 synthétisent conclusions établies et validées au cours de ce quatrième chapitre. La figure 4.24 illustre de façon schématique l'effet délétère des tanins sur les propriétés de lubrification, ainsi que le rôle crucial joué par MUC1 dans ces mécanismes. Par ailleurs, la figure 4.25 met en évidence l'impact des PRP sur la lubrification, en soulignant en particulier leur effet protecteur en présence de tanins.

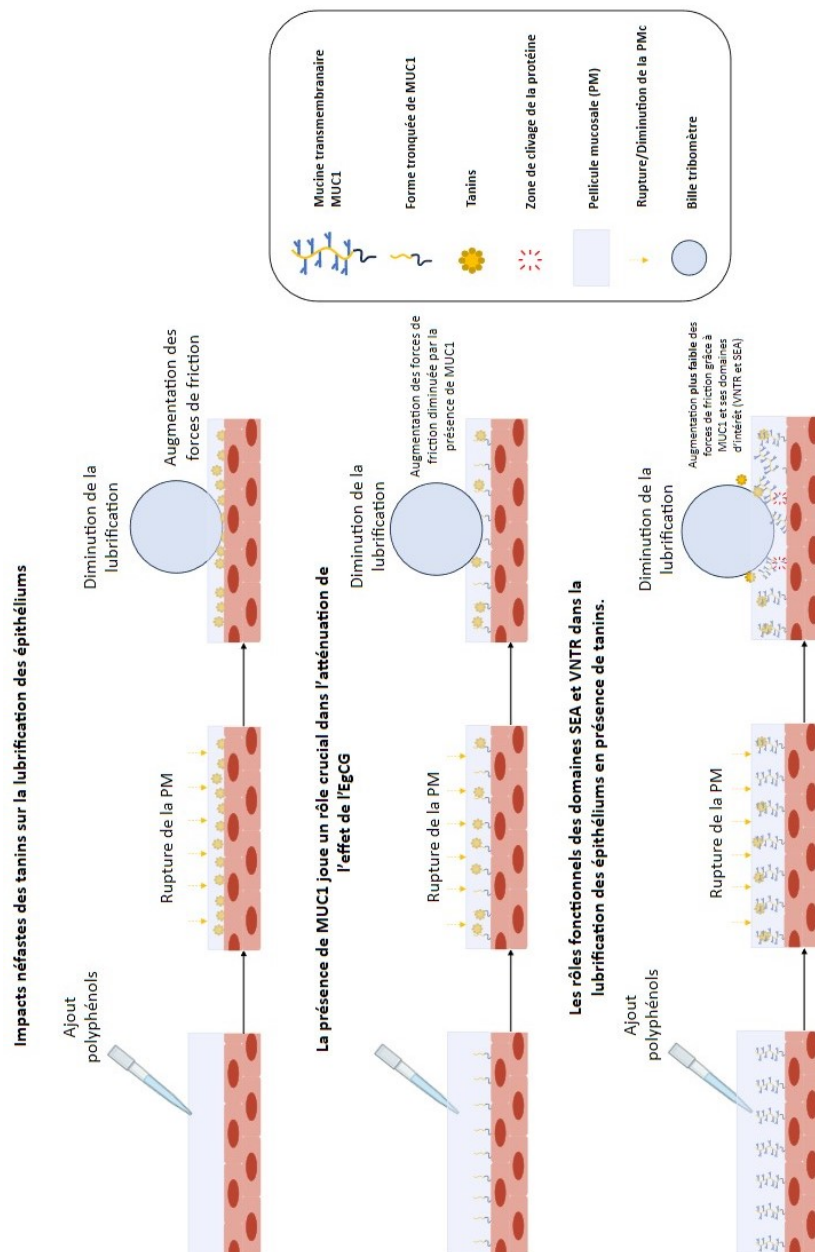


FIGURE 4.24 – Schéma récapitulatif des résultats et conclusions obtenues dans le cadre de ces travaux de thèse sur : (i) l'effet des tanins sur la lubrification des modèles d'épithélium (ii) le rôle de MUC1 et de sa structure

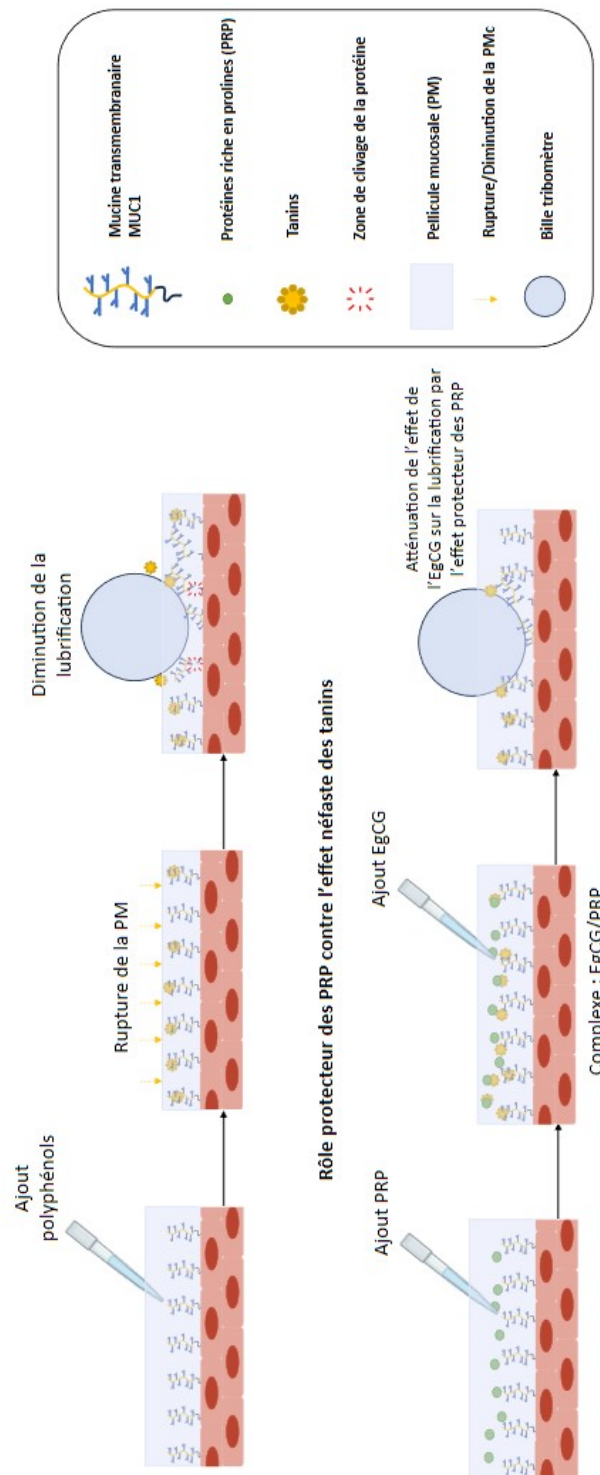


FIGURE 4.25 – Schéma récapitulatif des résultats et conclusions obtenus dans le cadre de ces travaux de thèse sur l'effet protecteur des PRP sur la lubrification des modèles d'épithélium en présence de tanins

Chapitre 5

Corrélation entre tribologie orale *in vitro* et évaluation sensorielle

SOMMAIRE

I	INTRODUCTION	169
I.1	Problématiques	169
I.2	Stratégie de recherche	170
II	PROTOCOLES EXPÉRIMENTAUX	171
II.1	Construction des groupes de sensibilité	171
II.2	Protocole de préparation des échantillons	174
II.3	Protocoles expérimentaux	176
II.4	Analyses statistiques	176
III	ÉTUDES EXPÉRIMENTALES	176
III.1	Niveau 1 : Étude globale incluant le panel complet	177
III.2	Niveau 2 : Différentiation des deux catégories de sensibilité	178
III.3	Niveau 3 : Identification des sous-groupes	181
IV	CONCLUSION DU CHAPITRE	184

I Introduction

I.1 Problématiques

La formulation de nouveaux produits alimentaires destinés à améliorer la qualité des régimes est une question importante. En effet, de nombreuses pathologies telles que l'obésité et le diabète sont directement liées à l'alimentation [346]. Ainsi, il devient impératif de proposer des alternatives bénéfiques pour la santé. Parallèlement, les produits ultra-transformés issus de pratiques d'élevage intensif soulèvent non seulement des préoccupations de santé publique, mais également écologiques et éthiques considérables. Comme exposé précédemment dans ce manuscrit, l'avenir de l'alimentation réside dans la reformulation de produits plus éthiques, écologiques et surtout sains. Cette démarche vise à substituer les ingrédients sur-consommés tels que les graisses et les protéines animales par des alternatives à faible teneur en graisse ou composées de protéines végétales durables. L'augmentation de la part des aliments d'origine végétale dans l'alimentation humaine permet de limiter la surconsommation de viande. Cependant, ces produits de substitution peinent à convaincre les consommateurs, notamment en raison de leur incapacité à reproduire les propriétés sensorielles des produits de base [347]. Ils sont liés à la sensation d'astringence due aux substances végétales présentes [4]. Cette perception peut être considérée comme désagréable et constitue un obstacle à l'adoption de régimes alimentaires plus sains.

Pour évaluer la perception des produits alimentaires, les industriels recourent traditionnellement à des panélistes qui caractérisent les produits par des analyses sensorielles approfondies. Cependant, cette méthode est sujette à de nombreux biais, en plus d'être coûteuse et chronophage [194]. Depuis des dizaines d'années, la rhéologie est employée comme méthode instrumentale permettant d'analyser et de prédire la texture perçue des produits alimentaires. En d'autres termes, l'objectif est de caractériser les propriétés rhéologiques globales des aliments et de les corrélérer avec leur sensation en bouche [6]. Cependant, la seule caractérisation rhéologique ne suffit pas à prédire toutes les modalités complexes liées à la perception. Pour un produit astringent, la caractérisation rhéologique ne permet pas toujours de comprendre pleinement son niveau d'astringence. Cela est dû à la complexité des attributs sensoriels et à la variabilité individuelle de la perception sensorielle.

En 1977, Kokini et al. [259] ont introduit le concept de tribologie orale, qui établit des corrélations entre la perception sensorielle et des paramètres tribologiques tels que le coefficient de frottement. Aujourd'hui, de nombreuses études exploitent la tribologie pour prédire la perception sensorielle des aliments [6, 41, 182, 195]. La sensation d'astringence, par exemple, est une perception particulièrement intéressante à étudier avec la tribologie en raison de son lien avec la lubrification (voir section II.3 du chapitre 1). Des corrélations positives existent entre la perception de l'astringence et des paramètres tribologiques tels que le coefficient de frottement [167, 348]. La tribologie se révèle être un outil prometteur pour l'étude et la prédiction de sensations, notamment l'astringence.

L'astringence est une perception sensorielle définie comme une sécheresse et une rugosité des tissus oraux survenant après la consommation d'aliments riches en tanins [40]. Les tanins, polyphénols responsables de cette sensation, sont connus pour former des agrégats avec les protéines salivaires et transmembranaires, perturbant ainsi la lubrification de la muqueuse buccale [7], (voir section II.3 du chapitre 1).

Malgré cette explication moléculaire, la perception de l'astringence demeure subjective et varie selon les individus. Nous nous demandons s'ils existent des liens entre la perception d'astringence et des paramètres physiques ou biologiques comme le coefficient de frottement ou la composition salivaire. Notre ambition est d'utiliser la tribologie pour identifier des individus plus ou moins sensibles à l'astringence sans passer par l'analyse sensorielle. Nous visons à les classer selon leur sensibilité respective via des essais de frottement.

I.2 Stratégie de recherche

L'objectif de l'étude présentée dans ce chapitre est d'identifier à l'aveugle différents groupes de sujets présentant une sensibilité variable à l'astringence via l'étude de paramètres physiques. Nous collaborons avec le Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation (CSGA) de l'INRAE à Dijon, en particulier avec Alix Rollinat, doctorante au sein du laboratoire. Pour mener à bien cette étude, Alix nous a fourni des échantillons de salive classés selon la sensibilité des donneurs à l'acide tannique qui est un composé astringent, permettant ainsi de former six groupes distincts de 3 individus (le protocole de classification sera présenté dans la suite de cette section). La classification des groupes de sensibilité ne nous a été révélée qu'après l'analyse des résultats de frottement afin d'éviter tout biais d'analyse.

Afin de distinguer ces groupes en fonction des propriétés de lubrification des salives, des essais de frottement *in vitro* sont mis en place en utilisant la méthodologie décrite dans les chapitres 3 et 4. Nous réalisons des tests de frottement sur nos modèles de muqueuses orales MUC1/VNTR à l'aide du dispositif mécanique spécialement développé pour cette travaux. Deux conditions expérimentales sont testées : avec PM et avec PM additionnée d'acide tannique.

La pellicule mucosale a été reconstituée à partir des échantillons de salive fournis par le CSGA. Cela nous permet de suivre les propriétés de lubrification des salives provenant des individus des 6 groupes formés. Le protocole de reconstruction de la PM est identique à celui proposé dans les chapitres précédents. Les paramètres mécaniques utilisés pour suivre l'état de lubrification, tels que le coefficient de frottement et l'énergie dissipée par frottement, restent également les mêmes.

Par conséquent, l'objectif de ce travail est d'évaluer le comportement tribologique de chaque groupe de sensibilité à l'aide de tests de frottement dans les deux conditions expérimentales. Les résultats de ces essais de frottement nous permettent de classer à l'aveugle les six groupes de sensibilité, afin d'observer s'il existe une cohérence entre

les propriétés lubrifiantes des salives, les paramètres biologiques (sensibilité) et les paramètres physiques.

II Protocoles expérimentaux

II.1 Construction des groupes de sensibilité

L'intégralité de la procédure de collecte des échantillons de salive et de constitution des groupes de sensibilité a été réalisée par Alix Rollinat, doctorante au laboratoire CSGA à Dijon. Elle a eu l'amabilité de nous fournir les échantillons de salive nécessaires à la mise en place des tests de frottement sur nos modèles de muqueuse orale, dans le but de corrélérer les paramètres physiques avec les différents groupes de sensibilités.

II.1.1 Choix des participants

Un total de 193 participants (âge moyen 31 ans, mini = 18 ans et max = 40 ans), recrutés à Dijon via la base de données de leur laboratoire, ont contribué au premier test de sensibilité à l'acide tannique. Les volontaires, sans expérience préalable dans l'évaluation sensorielle, ont été sélectionnés selon plusieurs critères stricts :

- Âgés de 18 à 40 ans
- Absence d'allergie alimentaire connue
- Absence de pathologie chronique
- Aucun trouble de la perception olfactive et/ou gustative
- Non enceintes ni allaitantes
- Non-fumeurs

II.1.2 Solution d'acide tannique pour les tests sensoriels

Les solutions d'acide tannique sont préparées en utilisant de l'eau d'Évian comme solvant et différentes concentrations d'acide tannique (CAS : 1401-55-4, Sigma-Aldrich, Allemagne). Ce choix s'est porté sur ce tanin en raison de son amertume moindre par rapport à d'autres composés astringents.

Les solutions sont formulées 1 à 2 minutes avant l'utilisation par les volontaires, afin de prévenir tout contact de l'acide tannique avec l'oxygène et ainsi limiter les risques d'oxydation. En effet, l'oxydation pourrait sous-estimer la quantité de composés astringents présents dans la solution, et par conséquent surestimer le seuil de perception chez les participants. Étant un antioxydant, l'acide tannique s'oxyde rapidement, ce qui pourrait altérer la sensation d'astringence.

Pour la procédure de rinçage buccal, des solutions aqueuses de pectine (E440i, Meilleur du Chef, France) ainsi qu'une solution de bicarbonate de sodium (La Patelière, France) sont utilisées. L'eau d'Évian a servi de solvant pour la préparation de ces solutions de rinçage.

II.1.3 Protocole de détermination des seuils de perception

Le protocole pour déterminer le seuil de perception de l'acide tannique, proposé par Alix Rollinat, suit les standards de détection des seuils sensoriels tels que définis pour les arômes et les goûts. Il repose sur une méthode à choix forcé avec une série de concentrations croissantes d'acide tannique, conforme à la norme ASTM E 679-04. La mesure du seuil de perception de l'acide tannique est effectuée dans une salle d'analyse sensorielle, à température ambiante sous lumière rouge (pour ne pas influencer le visuel car la solution contenant l'acide tannique était légèrement jaune pouvant entraîner un biais cognitif). Les séances durent 1 heure.

Dès le départ, une solution de référence astringente contenant 1 g/L d'acide tannique est présentée à chaque volontaire pour évaluer leur capacité à détecter cette sensation. Pour le test principal, huit concentrations croissantes d'acide tannique, allant de 0,015 à 1,001 g/L avec un pas géométrique de 1,821, a été proposée aux participants, voir tableau 5.1. Chaque série comprend trois verres contenant 10 mL de solution : deux verres sans acide tannique et un verre contenant de l'acide tannique. L'ordre de présentation et de dégustation des trois solutions dans chaque série est aléatoire. Les participants sont invités à prendre en bouche chaque solution pendant 5 secondes avant de la recracher. Il a été demandé à chaque volontaire d'attendre 20 à 30 secondes entre deux échantillons afin de laisser le temps à la sensation d'astringence de se développer en bouche, car celle-ci met entre 5 et 25 secondes pour atteindre son intensité maximale [349].

TABLEAU 5.1 – Gamme de concentration utilisée pour la détermination des seuils de perception

Concentration	C1	C2	C3	C4	C5	C6
Acide tannique (g/L)	0,015	0,027	0,050	0,091	0,166	0,302

Après chaque série, une phase de 3 minutes comprenant un rinçage avec la solution de pectine à 0,1% suivie de bicarbonate de sodium à 1% et d'eau d'Évian est mise en place pour limiter l'effet d'accumulation de la rémanence de l'astringence.

II.1.4 Classification des individus

L'objectif de ces sessions est de former des catégories extrêmes de sujets présentant des perceptions différentes de l'acide tannique. Ainsi, ces séances d'analyse sensorielle visent à déterminer le seuil de perception individuel de chaque participant afin de les classer et de constituer les ensembles.

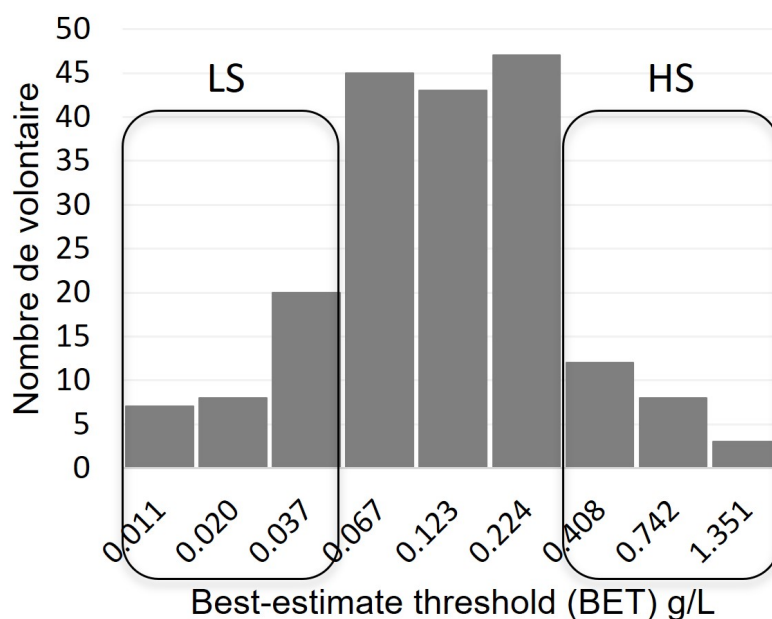


FIGURE 5.1 – Répartition des volontaires par seuil de meilleure estimation - Les catégories LS correspondent aux volontaires avec une faible sensibilité et HS ceux avec une grande sensibilité - Figure issue des travaux de thèse d'Alix Rollinat

Le seuil de perception individuel est calculé selon la méthode du Best Estimate Threshold (BET), en prenant la moyenne géométrique entre la concentration correspondant au dernier échec (où le volontaire n'a pas sélectionné le bon échantillon) et la concentration immédiatement supérieure (où le volontaire a correctement identifié l'astringence procurée par l'acide tannique). Ces sessions permettent de former une première catégorie de 40 personnes considérées comme sensibles à l'astringence procurée par l'acide tannique **HS** (âge moyen de 32 ans, composé de 25 femmes et 15 hommes) et une seconde de 38 personnes peu sensibles **LS** (âge moyen de 33 ans, composé de 24 femmes et 14 hommes). Ces 78 volontaires sont ensuite soumis à une deuxième session pour valider cette classification. La figure 5.1 montre la répartition des volontaires par seuil de sensibilité à l'acide tannique, et la position des deux catégories par rapport à cette répartition.

Chaque catégorie est ensuite subdivisée en trois groupes, à savoir HS+++, HS++, et HS+ pour la catégorie HS, et LS+++, LS++, et LS+ pour la catégorie LS. Le préfixe HS ou LS indique la catégorie à laquelle le groupe appartient, tandis que les suffixes +++, ++, ou + spécifient son degré de sensibilité par rapport à l'échelle définie par la distribution gaussienne (voir figure 5.1). Par exemple, le groupe HS+++ est le plus extrême parmi ceux de la catégorie HS, indiquant la plus haute sensibilité à l'astringence de l'acide tannique. Le groupe LS+++ est le plus extrême parmi ceux de la catégorie LS, représentant le degré de sensibilité le plus bas à l'acide tannique. Chaque groupe est constitué de trois individus regroupés dans un échantillon de salive unique, minimisant ainsi les variations interindividuelles.

En résumé, chaque catégorie (HS et LS) comprend trois groupes, chacun formé de trois individus. La figure 5.2 récapitule l'organisation des groupes de sensibilité.

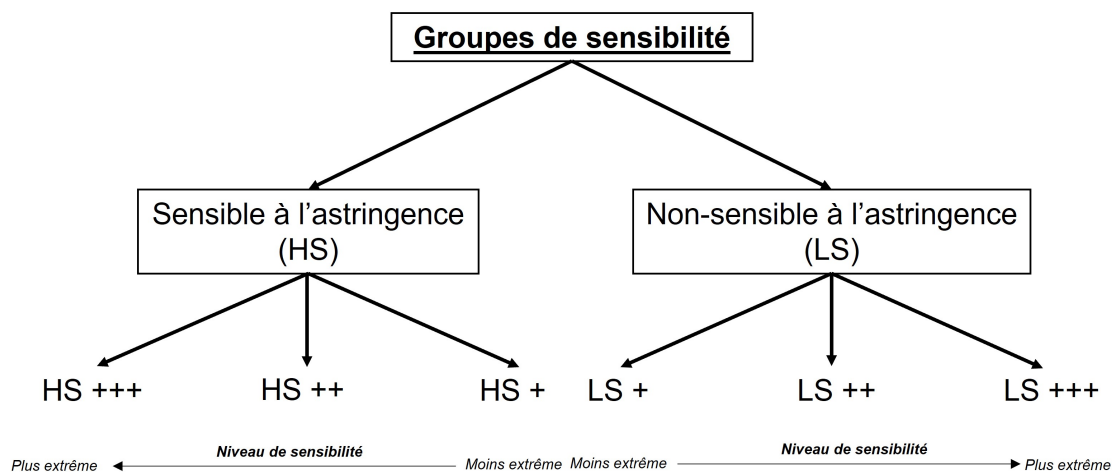


FIGURE 5.2 – Organisation des groupes de sensibilité à l'astringence de l'acide tannique

II.1.5 Collection de la salive

Chaque individu fournit un échantillon de salive qui a été combiné avec ceux des autres membres de son groupe. Nous utilisons ces pools de salive pour reconstruire la PM sur les modèles d'épithélium.

La procédure de collecte de la salive est alignée sur les protocoles détaillés dans les chapitres précédents (3 et 4). Elle est réalisée en stricte conformité avec les principes énoncés dans la Déclaration d'Helsinki, la loi Jardé et avec le consentement éclairé des participants. Les échantillons de salive recueillis correspondent à des salives non-stimulées. Les salives ont reçu l'approbation du Comité d'éthique pour la recherche (CPP Ile de France I 23.01785.000230 – 2023-A00291-44).

II.2 Protocole de préparation des échantillons

II.2.1 Préparation des modèles d'épithélium

Les mesures tribologiques sont conduites sur nos modèles d'épithélium *in vitro*. Les modèles cellulaires sont composés d'une monocouche de cellules épithéliales exprimant MUC1, déposée sur une lame de verre. La lignée utilisée est MUC1/VNTR, choisie pour sa proximité avec la forme *in vivo*, comprenant les domaines VNTR et SEA clivable. Une description détaillée de cette isoforme est présentée dans le Chapitre 2, section I.1.1. La structure de MUC1/VNTR est illustrée dans la figure 2.1 et décrite dans le Tableau 2.1.

Ces modèles sont cultivés selon le protocole décrit dans la section I.1.2 du Chapitre 2. Une fois les cellules parvenues à confluence, elles sontensemencées sur leurs substrats en verre. Les substrats utilisés dans cette étude sont préalablement revêtues de Poly-D-lysine. Chaque étape du processus de préparation des échantillons est expliquée en détail dans la partie I.1 du Chapitre 2.

II.2.2 Reconstruction de la pellicule mucosale

Les échantillons de salive de chaque sujet sont préservés individuellement dans de l'azote liquide en vue de leur utilisation ultérieure. Au moment des analyses, les échantillons salivaires de chaque individu sont décongelés dans des bains de glace pour un dégel progressif. Une fois décongelée, la salive est homogénéisée.

Ensuite, un pool est constitué en combinant 1 mL de salive provenant des trois individus d'un même groupe dilué dans 1 mL de PBS afin de créer une solution homogène, limitant ainsi les variations interindividuelles. Ce pool est par la suite dilué dans un milieu de culture (rapport 1 :1) pour obtenir la solution de travail. Cette procédure est répétée pour les six groupes de sensibilité.

La pellicule mucosale est reconstituée à la surface des modèles cellulaires à l'aide de la solution de travail. Cette dernière est déposée sur l'épithélium et incubée pendant 2 heures (37 °C, 7.5% CO₂ et 100% d'humidité). À l'issue de cette période, les modèles sont rincés deux fois avec du PBS afin d'éliminer toute salive non fixée à l'épithélium, ne laissant ainsi que la PM.

II.2.3 Solution d'acide tannique pour les essais de frottement

Comme pour les mesures de seuil de perception une solution aqueuse d'acide tannique à une concentration de 1 g/L est utilisée comme milieu astringent. Après la reconstruction de la PM, la solution d'acide tannique est ajoutée au modèle cellulaire pendant 10 minutes dans l'incubateur (37 °C, 7.5% CO₂ et 100% d'humidité). Après ce laps de temps, la solution de tanins est retirée et les tests de friction sont réalisés.

Ce protocole de préparation de la PM et de la solution d'acide tannique est résumé schématiquement sur la figure 5.3.

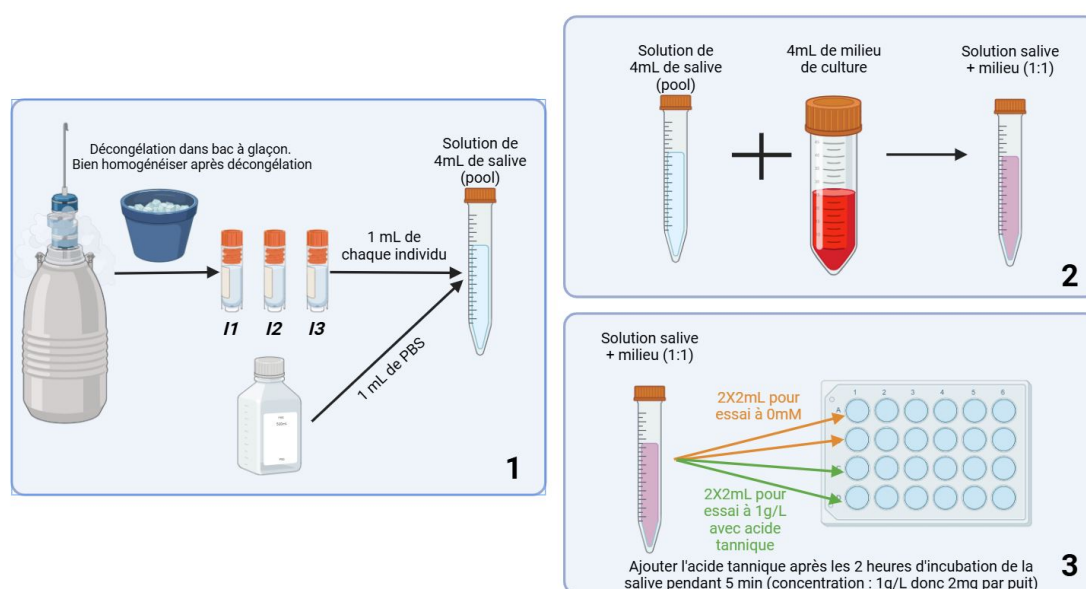


FIGURE 5.3 – Description des 3 étapes du protocole de reconstruction de la pellicule mucosale dans cette étude

II.3 Protocoles expérimentaux

II.3.1 Essais tribologiques

L'examen de la lubrification des divers groupes de sensibilité est réalisé comme pour les chapitres précédents (3 et 4) via des tests tribologiques. Chaque groupe est soumis à deux conditions distinctes : (I) PM reconstruite seule et (II) PM reconstruite avec acide tannique. Les essais tribologiques sont exécutés à l'aide du bio-tribomètre conçu sur mesure. Le protocole expérimental de ces essais de frottement est présenté en détail dans les chapitres précédents et notamment dans la section II.3.1 du chapitre 3 et dans le travail suivant [309].

Chaque groupe et chaque condition sont soumis à quatre répétitions, totalisant ainsi 8 essais par groupe. Les grandeurs mécaniques μ et Ed ont servi d'indicateurs de l'état de lubrification du modèle épithélial.

II.3.2 Analyse de l'endommagement

L'endommagement des surfaces *post mortem* est utilisé dans ce chapitre comme indicateur supplémentaire de l'état de lubrification des modèles d'épithélium. Toute la procédure est présentée dans la section III.1 du Chapitre 2.

II.4 Analyses statistiques

L'analyse statistique menée dans ce chapitre suit la même méthodologie que celle décrite au Chapitre 3 et détaillée dans la section II.4 du chapitre 2. Les niveaux de signification sont définis comme suit : $p = 0 < *** < 0,001 < ** < 0,01 < * < 0,05 < \circ < 0,1 < . < 1$. Ces analyses sont réalisées à l'aide de XLSTAT (version 2019.4.2, Addinsoft, France), une extension du logiciel Excel, et MatlabTM (R2021b, Licence École Centrale de Lyon).

III Études expérimentales

L'objectif de ce chapitre de thèse est d'identifier les groupes de sensibilité à l'astringence procurée par l'acide tannique parmi plusieurs individus via des essais de frottement sur nos modèles cellulaires lubrifiés avec les salives des participants. L'analyse des résultats s'effectue à plusieurs niveaux. Le premier niveau de raisonnement porte sur le mélange de tous les groupes, sensibles ou non, afin d'observer l'effet global de l'acide tannique sur les propriétés lubrifiantes des salives. L'objectif est de confirmer les effets néfastes mis en évidence dans le chapitre 4. Ensuite, nous effectuons une analyse comparative des effets de l'acide tannique sur la lubrification entre les deux catégories de sensibilité (LS et HS). Enfin, le dernier niveau consiste à classer dans le même ordre que l'analyse sensorielle, les six groupes de sensibilité (HS+++ , HS++ , HS+ et LS+++ , LS++ , LS+) via l'analyse des paramètres mécaniques issus des essais de frottement. La figure 5.4 présente schématiquement les trois niveaux d'analyse étudiés dans ce chapitre.

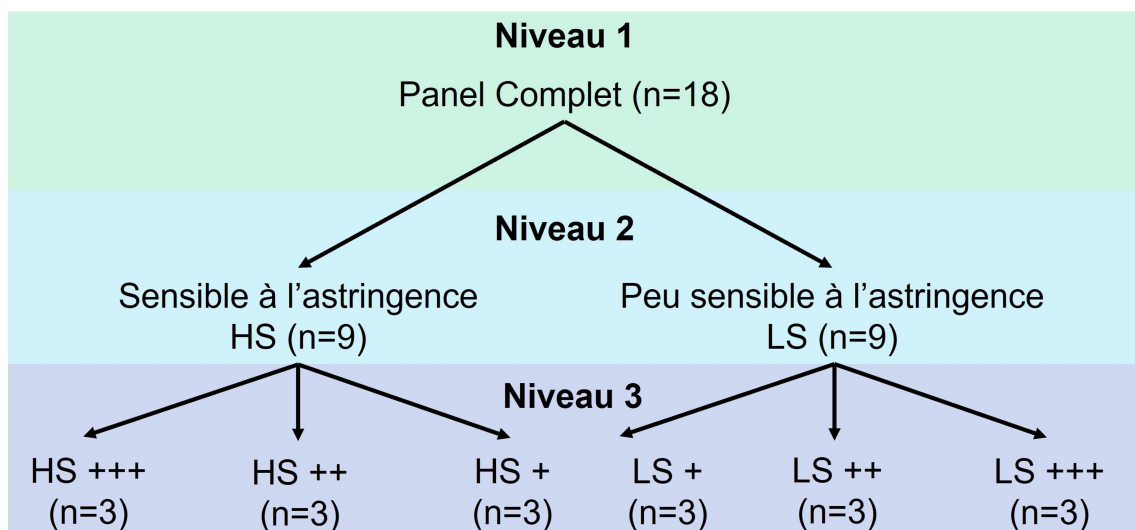


FIGURE 5.4 – Représentation des 3 niveaux d'analyse proposés dans le chapitre 5, du plus grossier jusqu'à l'identification des 6 groupes de sensibilité

III.1 Niveau 1 : Étude globale incluant le panel complet

III.1.1 Problématique

Dans cette section, l'effet des tanins sur les propriétés lubrifiantes de la PM est évalué en utilisant les salives du panel complet. L'objectif est de vérifier l'impact négatif des tanins sur un ensemble de 18 échantillons de salive, afin de confirmer les résultats obtenus dans le Chapitre 4. Comme dans les chapitres précédents, nous utilisons nos paramètres mécaniques habituels comme indicateurs de l'état de lubrification : le coefficient de frottement, l'énergie dissipée et la surface endommagée.

III.1.2 Analyses et discussions des résultats

La figure 5.5 illustre l'évolution des trois paramètres calculés pour les deux conditions expérimentales, permettant d'évaluer l'influence de l'acide tannique sur les propriétés lubrifiantes de la PM. Les résultats révèlent une augmentation des trois indicateurs après l'exposition à l'acide tannique. Par exemple, le coefficient de frottement s'accroît significativement ($p < 0.001$) de 0.03 ± 0.01 à 0.05 ± 0.01 . De même, une augmentation notable ($p < 0.05$) de la surface endommagée après frottement est observée, passant de $(1.63 \pm 0.48) \cdot 10^5 \mu m^2$ à $(3.25 \pm 1.08) \cdot 10^5 \mu m^2$. L'énergie dissipée augmente également mais pas de manière significative, bien qu'elle soit marquée.

Ainsi, les résultats exposés dans cette section corroborent les conclusions établies dans le chapitre 4 de ce manuscrit, mais sur des échantillons de salive provenant de 18 individus. Encore une fois, l'augmentation des paramètres physiques après l'ajout de tanins traduit une diminution de la lubrification des modèles cellulaires. La réduction des capacités lubrifiantes de la PM est attribuée à l'agrégation des tanins à la surface des épithéliums. Ces phénomènes conduisent à une augmentation des forces de friction et à des dommages en surface [3], comme observé dans le Chapitre 4.

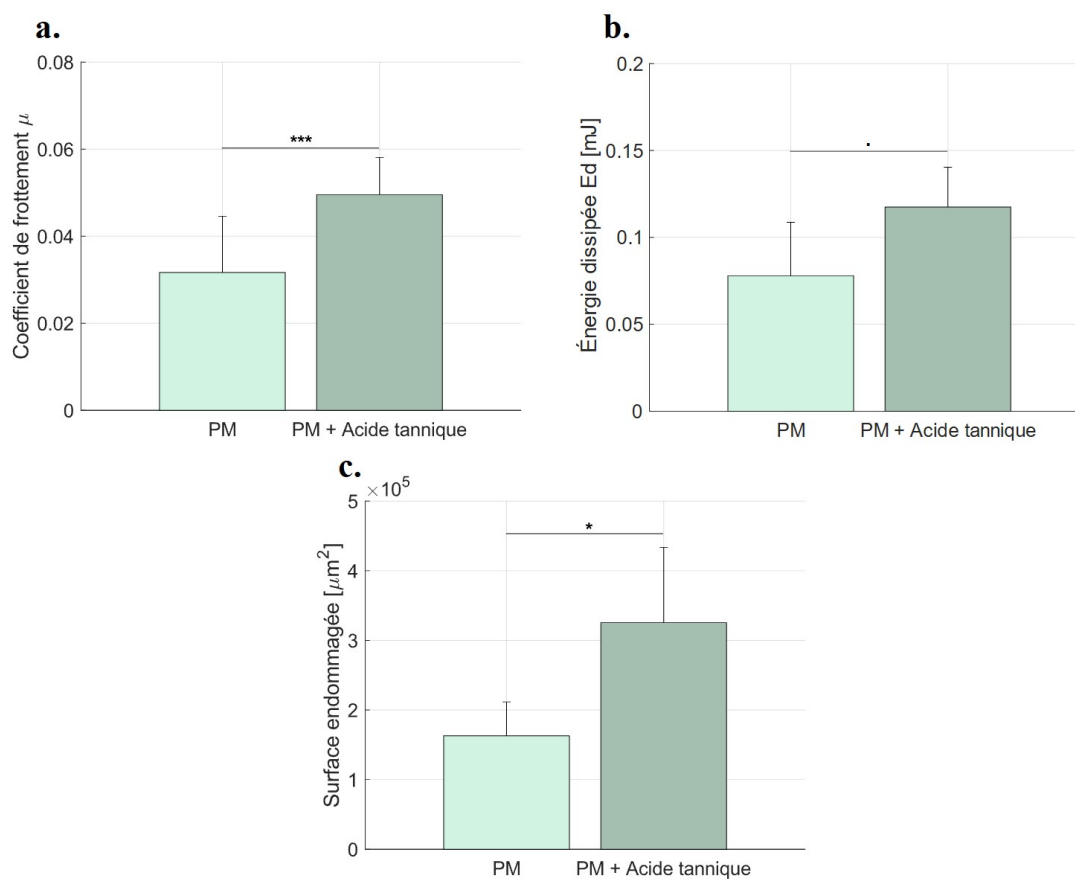


FIGURE 5.5 – (a) Coefficient de frottement, (b) Énergie dissipée et (c) Surface endommagée entre les deux conditions expérimentales : PM seule et PM avec Acide tannique sur les 18 individus

III.1.3 Conclusions intermédiaires

L'analyse du premier niveau vise essentiellement à corroborer les conclusions de nos études antérieures (chapitre 4). Nous constatons de nouveau une diminution de la lubrification attribuée à la présence de tanins lors des essais de frottement, confirmant ainsi une fois de plus l'effet délétère de ce composé phénolique sur un pool de salive provenant de 18 individus. Ces résultats sont particulièrement intéressants car ils valident, avec notre méthodologie, les phénomènes moléculaires sous-jacents aux mécanismes de l'astringence.

III.2 Niveau 2 : Différentiation des deux catégories de sensibilité

III.2.1 Problématique

Le niveau 2 d'analyse vise à distinguer les deux catégories extrêmes de sensibilité à l'acide tannique, comme illustré sur la figure 5.4. À cette fin, nous réalisons une analyse comparative des essais de frottement entre les salives provenant des groupes LS et HS. La question qui émerge est la suivante : la salive ainsi que l'évolution de ses propriétés lubrifiantes en présence de tanins joue-t-elle un rôle dans la différence de perception de l'astringence des individus ?

III.2.2 Résultats et discussions

La figure 5.6 met en lumière l'effet des tanins sur la lubrification des modèles d'épithélium pour chaque catégorie de sensibilité. Les essais révèlent une augmentation des forces de frottement, caractéristique de l'effet des tanins [170, 262, 314] comme observé dans le Chapitre 4. En effet, pour la catégorie HS, le coefficient de frottement μ augmente de 0.019 ± 0.003 à 0.050 ± 0.011 ($p < 0.05$) entre l'état sans tanin (PM) et l'état avec tanins (PM + acide tannique), tandis que pour la catégorie LS, il passe seulement de 0.042 ± 0.006 à 0.048 ± 0.005 ($p > 0.05$). Des différences similaires sont observées concernant l'énergie dissipée par le frottement.

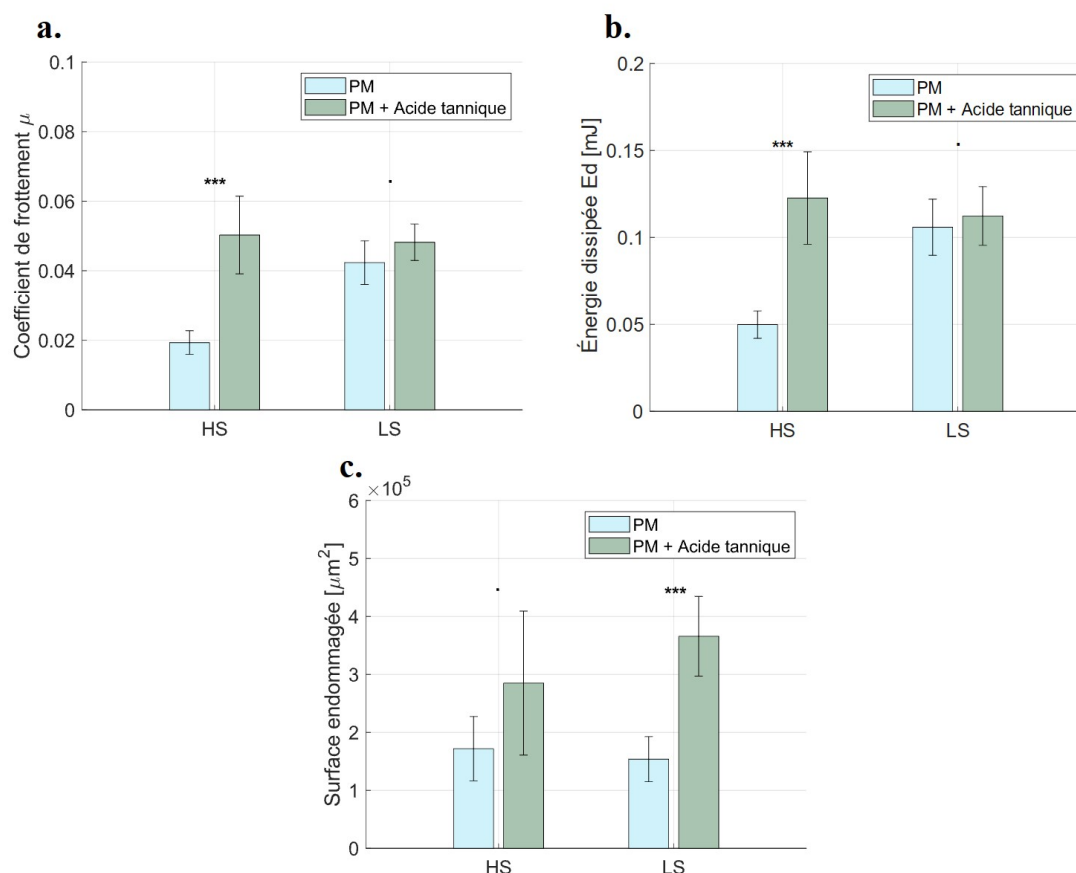


FIGURE 5.6 – (a) Coefficient de frottement (b) Énergie dissipée et (c) Surface endommagée entre les deux conditions expérimentales : PM seule et PM avec Acide tannique pour les deux catégories de sensibilité

Cette augmentation est causée par une perte de lubrification due à l'agrégation des tanins sur la surface épithéliale, et plus spécifiquement par l'interaction des tanins avec la protéine MUC1. Cela conduit à la dissociation de la PM et à la réduction de ses propriétés lubrifiantes [34].

Toutefois, cette augmentation n'est pas homogène entre les deux groupes de sensibilité et n'est significative que pour la catégorie HS, voir figure 5.6. L'augmentation est plus forte pour les groupes HS. Cela suggère une différence d'effet en fonction de la catégorie analysée. La différence entre les deux catégories est très marquée à l'état initial (PM

seule). Le groupe LS présente une moins bonne lubrification à l'état avec la PM seule (0.042 ± 0.006), ainsi la différence entre les deux conditions expérimentales pour LS est faible et non significative. Cette observation pourrait justifier leur perception moins marquée de l'astringence de l'acide tannique. Alors que le groupe HS présente une meilleure lubrification à l'état initial 0.019 ± 0.003 , entraînant une augmentation forte et significative après l'ajout de tanins ($p < 0.05$), cela pourrait par ailleurs justifier leur perception accrue de l'astringence.

En examinant les valeurs brutes de μ et Ed en présence de tanins sans calculer les variations, nous observons qu'elles sont légèrement plus élevées pour la catégorie HS que pour LS. Cela peut expliquer également la différence de perception. Cependant, ces différences ne sont pas significatives ($p > 0.05$) et bien trop faibles. Mais cela peut s'expliquer par la différence des scores attribués par les groupes pour noter l'astringence de l'acide tannique lors des essais sensoriels qui n'était pas significative non plus : 9.2 pour le groupe HS et 8.1 pour le groupe LS.

En ce qui concerne l'analyse de la surface endommagée, les résultats ne sont pas cohérents avec ceux du coefficient de frottement et de l'énergie dissipée. La surface endommagée augmente après l'ajout de tanins, confirmant leur effet délétère sur la lubrification. Cependant, la variation des dommages est plus marquée pour le groupe peu sensible. Cela pourrait être dû à des phénomènes supplémentaires durant les tests qui influenceraient la surface endommagée. Ainsi, pour l'analyse du niveau 3, nous abandonnons l'étude de ce paramètre.

III.2.3 Conclusions intermédiaires

L'analyse de niveau 2 permet de distinguer les deux groupes de sensibilité à partir de l'étude des variations du coefficient de frottement et de l'énergie dissipée. La variation de ces deux paramètres est plus marquée pour le groupe très sensible (150% pour μ et 145% pour Ed) que pour le groupe peu sensible (13% pour μ et 6% pour Ed). Notre hypothèse est que la différence de perception de l'astringence procuré par l'acide tannique pourrait être attribuée à une augmentation des forces de friction distinctes entre les groupes. En effet, il semblerait que les essais de frottement sur les salives des personnes très sensibles, entraînent des forces de friction qui augmentent plus fortement que les personnes peu sensibles. Ces divergences proviendraient d'une différence de lubrification de la salive dès l'état initial (sans tanin). La salive des individus des groupes HS étant naturellement plus lubrifiante. Il est important de noter que ce n'est probablement pas le seul phénomène à l'origine de ces disparités. En effet, plusieurs autres critères doivent sûrement rentrer en ligne de compte. Toutefois, cette méthodologie permet d'identifier les deux groupes de sensibilité, avec des variations des paramètres physiques plus prononcées chez les individus très sensibles à l'acide tannique, ce qui est assez intuitif de prime abord.

III.3 Niveau 3 : Identification des sous-groupes

III.3.1 Problématique

Comme cela a été détaillé précédemment, chaque catégorie HS et LS est subdivisée en trois sous-ensembles en fonction de la sensibilité à l'acide tannique. Par exemple, la sous-catégorie HS+++ représente la sensibilité la plus élevée, tandis que la sous-catégorie LS+++ correspond à la sensibilité la plus faible.

Dans cette étude, nous nous concentrons sur le niveau d'analyse finale. Nous cherchons à classer chaque groupe dans leur catégorie en fonction de leur sensibilité à l'astringence. Cette classification repose sur les paramètres tribologiques standards (μ et Ed), l'objectif étant de découvrir un lien entre les paramètres physiques et sensoriels. L'analyse de niveau 2, présentée dans la section précédente, a démontré que le calcul de la variation des paramètres physiques entre les deux conditions permettait de distinguer efficacement les catégories LS et HS. Nous adopterons donc cette méthodologie pour cette partie de l'étude également.

III.3.2 Résultats et discussions

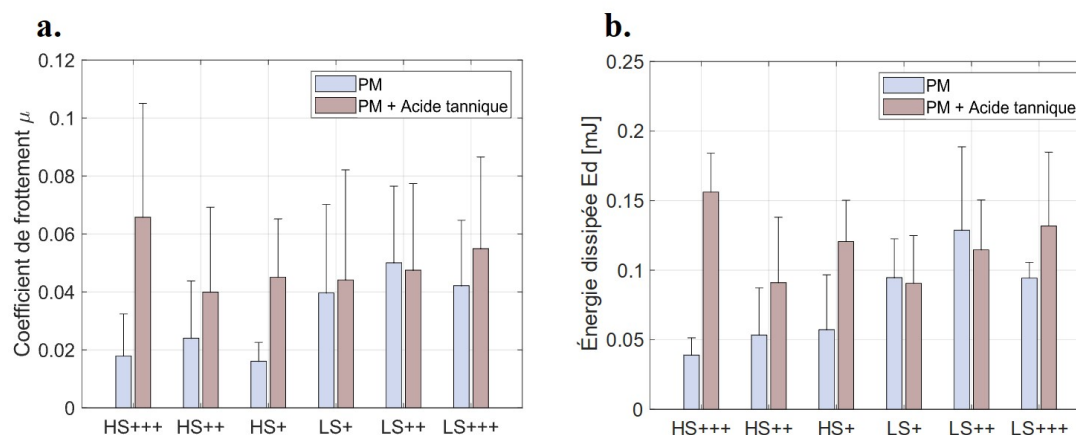


FIGURE 5.7 – (a) Coefficient de frottement et (b) Énergie dissipée entre les deux conditions expérimentales : PM seule et PM avec Acide tannique pour les 6 groupes de sensibilité

La figure 5.7 illustre les résultats obtenus dans les deux conditions expérimentales usuelles : PM et PM + acide tannique. L'analyse des résultats révèle dans un premier temps que l'effet des tanins demeure observable indépendamment des échantillons étudiés. En résumé, comme mentionné depuis le début de ce manuscrit, les tanins exercent un effet néfaste sur la lubrification de nos modèles d'épithélium. Les résultats obtenus ici ne font pas exception sauf pour deux groupes. En effet, le suivi des paramètres tribologiques indique une augmentation après l'ajout de tanins, traduisant une diminution de la lubrification imputable à l'effet de l'acide tannique. Par exemple, le coefficient de frottement passe de 0.018 ± 0.014 à 0.066 ± 0.039 pour le groupe HS+++ et de 0.042 ± 0.022 à 0.055 ± 0.031 pour LS+++ . La tendance est identique pour l'énergie

dissipée par frottement.

Cependant, un examen plus approfondi de la figure 5.7 révèle que les augmentations après l'ajout de tanins sont hétérogènes. Elles sont bien plus marquées pour les échantillons de la catégorie HS comparativement à ceux de la catégorie LS. Si nous calculons les variations du coefficient de frottement et de l'énergie dissipée pour chaque groupe, et que nous les traçons, il apparaît clairement que les variations les plus significatives sont observées dans les échantillons HS, comme illustré à la figure 5.8. Par exemple, μ augmente de 267% et Ed de 300% pour HS+++ , tandis qu'ils augmentent respectivement de seulement 30% et 39% pour LS+++ . Pour certains échantillons LS, nous n'observons pratiquement aucune augmentation, voire une diminution. De plus, ces augmentations sont statistiquement significatives uniquement pour les échantillons HS, contrairement aux LS, comme le montre le tableau 5.2, soulignant ainsi cette différence notable dans l'évolution de la lubrification entre les différents groupes.

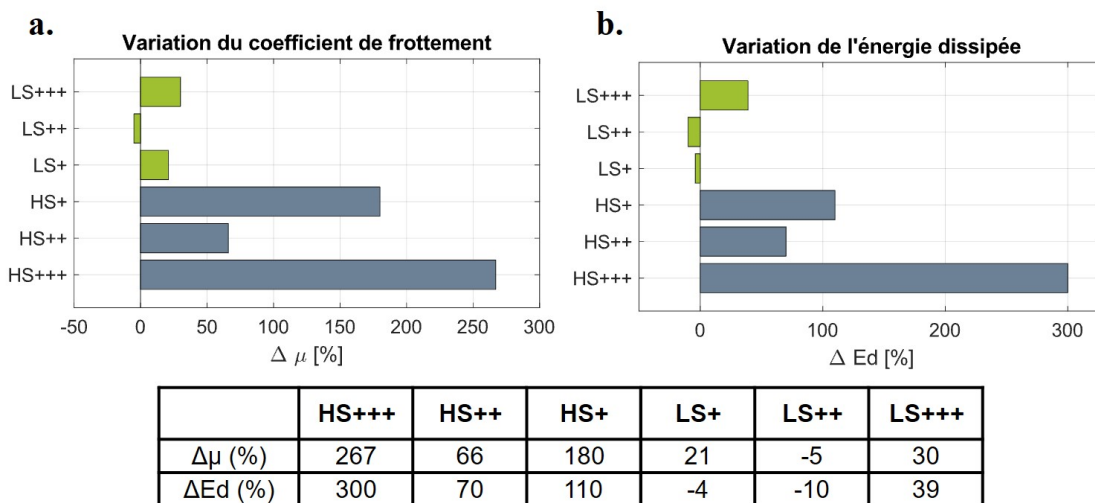


FIGURE 5.8 – Variation du (a) coefficient de frottement et de (b) l'énergie dissipée entre les deux conditions expérimentales : PM seule et PM avec Acide tannique pour les 6 groupes de sensibilité et le tableau indiquant les valeurs de variation

Ainsi, à l'instar de l'analyse des catégories étendues, il apparaît que la disparité entre les sensibilités réside dans une augmentation plus prononcée des forces de friction chez les individus plus sensibles à l'acide tannique, comme illustré par la figure 5.8 et le tableau 5.2. Cette variation des forces pourrait être à l'origine des différences perçues par les individus. En examinant les valeurs des paramètres à l'état initial, c'est-à-dire avec une PM reconstruite, celles-ci sont systématiquement plus faibles pour les trois sensibilités HS comparées à celles de la famille LS, similaire à l'analyse du niveau 2 (voir section III.2). Cette observation pourrait expliquer les distinctions. En effet, si les salives des sensibilités LS lubrifient déjà moins efficacement, la différence entre les deux états est moins perceptible. En revanche, les salives des individus appartenant aux groupes sensible semblent offrir une meilleure lubrification, rendant l'augmentation des forces de friction plus notable. Selon nous, cela pourrait expliquer leur perception plus forte. Évidemment, ce phénomène n'est pas le seul à engendrer cette différence, d'autres

mécanismes doivent certainement intervenir.

TABEAU 5.2 – Test de Mann-Whitney sur les indicateurs mécaniques pour les 6 groupes afin de comparer l'effet de l'acide tannique en fonction de la sensibilité à l'astringence procuré par l'acide tannique - Codes de signification : $0 \leq *** \leq 0.001 \leq ** \leq 0.01 \leq * \leq 0.05 \leq . \leq 0.1 \leq \leq 1$

	Coefficient de frottement	Énergie Dissipée
HS+++	***	*
HS++	**	.
HS+	***	.
LS+	.	.
LS++	.	.
LS+++	.	.

Ainsi, les groupes de sensibilités sont replacées convenablement dans leurs catégories respectives en fonction du calcul de variation des paramètres. Cependant, au sein d'une même catégorie, il y a une hiérarchie. Pour rappel, HS+++ correspond à la sensibilité la plus élevée et HS+ à la moins élevée de la catégorie HS, comme indiqué à la figure 5.2, de même pour LS. En revanche, nous n'avons trouvé aucune cohérence pour ordonner correctement les sensibilités au sein de chaque catégorie, que ce soit pour LS ou HS. Sur la figure 5.8, il apparaît que le $\Delta\mu$ et le ΔEd de HS+ sont supérieurs à ceux de HS++, ce qui n'est pas logique. Il en va de même pour les sensibilités LS, entre LS++ et LS+. Nous supposons que les mécanismes et les différences internes aux catégories opèrent à des échelles trop réduites par rapport à l'échelle macroscopique des essais tribologiques que nous utilisons.

III.3.3 Conclusions intermédiaires

Cette analyse de troisième niveau nous permet de classer les sensibilités en fonction de leur catégorie. Cette classification s'avère correcte, puisque chaque échantillon HS a pu être positionné dans la catégorie HS et de même pour les échantillons LS. Ainsi, cette méthodologie nous fournit les outils nécessaires pour caractériser les sensibilités à l'acide tannique. De la même manière que dans la section III.2 de ce chapitre 5, le calcul de la variation des paramètres physiques nous permet de classifier ces sensibilités. En effet, selon notre interprétation la différence de perception réside dans une divergence dans l'augmentation des paramètres perçus par les individus, en particulier en raison d'une lubrification différente à l'état initial. L'augmentation plus marquée des forces de friction pour les personnes très sensibles en présence de tanins entraînerait donc un ressenti plus prononcé. Cependant, la hiérarchie des sensibilités au sein de chaque catégorie n'a pas pu être recréée, probablement en raison d'une problématique d'échelle : ces différences se manifestent à l'échelle moléculaire.

Malgré cela, cette étude représente une avancée intéressante, car elle démontre que ce protocole expérimental est capable d'identifier de manière objective et quantitative la catégorie de sensibilité à l'acide tannique à laquelle appartient un échantillon de salive. Cela ouvre de nombreuses perspectives dans l'analyse de l'astringence.

IV Conclusion du chapitre

Ce chapitre propose une méthodologie innovante visant à classifier différents niveaux de sensibilité à l'astringence procuré par l'acide tannique à partir de données issues de tests sensoriels. Nous avons réalisé des essais de frottement sur nos modèles de muqueuse, lubrifiés avec des salives provenant de participants de sensibilités variées à ce tanin. Ensuite, nous avons tenté de retrouver à l'aveugle les groupes identifiés par l'analyse sensorielle. L'objectif de cette étude est de proposer une nouvelle approche de la tribologie orale et d'ouvrir des perspectives sur la corrélation entre propriétés sensorielles et paramètres physiques.

L'une des innovations de ce travail réside dans la stratégie de préparation des échantillons avant les essais. En effet, avant de réaliser les tests, un protocole rigoureux de sélection des individus est mené par Alix Rollinat, doctorante au CSGA. En amont, Alix répartit les participants en fonction de leur sensibilité à l'acide tannique à l'aide de la méthode BET, formant ainsi deux grandes catégories : très sensible (HS) et peu sensible (LS). Chaque catégorie est ensuite subdivisée en trois niveaux hiérarchisés en fonction du seuil de l'astringence de l'acide tannique (voir figure 5.2). Chaque individu fournit un échantillon de salive, combiné avec ceux des autres membres de son groupe. Ces pools de salive sont ensuite utilisés pour reconstituer la PM sur les modèles d'épithélium. Les essais de frottement réalisés sur ces modèles, avec la PM reconstituée et de l'acide tannique, fournissent des indicateurs mécaniques tels que le coefficient de frottement, l'énergie dissipée et la surface endommagée, permettant d'évaluer l'état de lubrification des modèles. L'objectif est d'évaluer la position de chaque groupe par rapport à leur sensibilité via ces paramètres physiques.

L'analyse des résultats se divise en trois niveaux. Le premier se concentre sur l'impact de l'acide tannique sur les propriétés de lubrification de la PM (issu des 18 individus), indépendamment de leur niveau de sensibilité. L'objectif est de corroborer les conclusions de nos études antérieures sur un plus grand échantillon. Les résultats confirment une fois de plus l'effet délétère des composés phénoliques sur un pool de salive.

Le second niveau d'analyse vise à distinguer les deux grandes catégories de sensibilité (HS et LS) via les essais de frottement. Les résultats montrent que la variation des paramètres mécaniques entre les deux conditions expérimentales permet de repositionner les catégories de manière similaire à l'analyse sensorielle. La variation de ces paramètres est plus prononcée pour la famille à forte sensibilité que pour la plus faible, permettant ainsi de distinguer les deux catégories.

Enfin, le dernier niveau d'analyse a pour objectif de repositionner les six groupes de sensibilité à l'acide tannique (LS+++ , LS++ , LS+ , HS+++ , HS++ et HS+) élaborés par l'analyse sensorielle en utilisant la variation des paramètres mécaniques. Nos résultats permettent de classer chaque groupe dans sa catégorie appropriée : les échantillons HS ont été correctement positionnés dans la catégorie HS, et de même pour les échantillons LS. Cependant, nos tests ne permettent pas de retrouver la hiérarchie interne au sein des catégories HS ou LS.

Nos travaux semblent indiquer que la différence de perception de l'astringence procuré par l'acide tannique peut résider dans une divergence de l'augmentation des paramètres physiques perçus par les individus, particulièrement en raison d'une lubrification différente à l'état initial. Le ressenti plus fort serait donc causé par une augmentation plus prononcée. Évidemment ce n'est que notre interprétation et ce n'est pas le seul mécanisme qui induit ces décalages. L'utilisation de cette méthodologie est particulièrement intéressante puisqu'elle offre la possibilité de déterminer le niveau d'une perception sensorielle par l'analyse de paramètres physiques. Comme nous l'avons observé, nos résultats sont très encourageants mais l'analyse est complexe, reposant sur des calculs de variations très dépendants de l'état initial. L'objectif futur serait d'identifier des différences tangibles en termes de paramètres physiques bruts (comme le coefficient de frottement μ , tel que discuté dans les chapitres précédents 3 et 4). Par ailleurs, cette étude analyse les différences de lubrification de la salive de personnes ayant une sensibilité différente à un stimulus, une tâche complexe en raison des nombreux biais entre individus et paramètres physiques. La différence de perception pourrait provenir d'autres facteurs totalement indépendants des propriétés lubrifiantes de leur salive. Cependant, notre méthodologie permet de classer les groupes dans le même ordre que l'analyse sensorielle, ce qui est très prometteur pour la suite.

En conclusion, ces travaux ouvrent des perspectives intéressantes pour la caractérisation sensorielle de nombreux produits alimentaires ou pharmaceutiques. L'idée est de quantifier et d'objectiver les propriétés sensorielles d'un produit alimentaire, ou de qualifier la performance de certains produits pharmaceutiques tels que les substituts salivaires. Enfin, au vu des résultats très intéressants obtenus dans ce travail, nous pourrions envisager de comparer les propriétés de lubrification de la salive saine et pathologique provenant de maladies affectant la lubrification orale des patients, telles que la xérostomie, par exemple.

Chapitre 6

Nouvelle approche de la simulation de la tribologie orale *in vivo*

SOMMAIRE

I	INTRODUCTION	189
I.1	Problématique	189
I.2	Stratégie de recherche	189
II	PROTOCOLES	190
II.1	Collection de la salive	190
II.2	Construction d'un nouveau modèle de muqueuse orale	191
II.3	Protocoles de mesure mécanique	192
II.4	Analyse de l'endommagement	194
II.5	Étude de la mouillabilité	195
II.6	Analyses statistiques	195
III	ÉTUDES EXPÉRIMENTALES	195
III.1	Caractérisations des hydrogels	195
III.2	Étude de la lubrification sur les hydrogels seuls	199
III.3	Le rôle de la protéine MUC1 dans les propriétés lubrifiantes de la pellicule mucosale	201
III.4	L'effet de l'EgCG sur la lubrification des modèles d'épithélium	203
III.5	Mécanismes moléculaires de l'astringence intégrant la mucine MUC1	206
IV	CONCLUSION DU CHAPITRE	207

I Introduction

I.1 Problématique

L'analyse des processus oraux est largement étudiée dans la littérature dans de nombreux domaines comme l'agroalimentaire [314], le pharmaceutique [350], le médical, etc. Le but est de corrélérer la perception sensorielle en bouche avec des paramètres issus de la tribologie *in vitro*. Plusieurs travaux montrent des corrélations pertinentes avec des sensations telles que l'astringence [254, 287], le gras [196], l'onctuosité [196], ou encore les sensations "pâteuses" [197]. Ainsi, la tribologie orale *in vitro* ouvre de nouvelles perspectives d'analyse de la perception sensorielle orale, complétant ainsi l'analyse sensorielle classique qui nécessite des panels entraînés.

Les paramètres tribologiques sont des paramètres systémiques, et la validité des résultats obtenus n'existe que dans les limites des conditions expérimentales définies pour l'essai. Il est donc nécessaire de trouver des paramètres expérimentaux se rapprochant des paramètres physiologiques, comme la pression de contact entre les surfaces, la vitesse, le mouvement, etc [209]. Le choix des matériaux est également crucial. L'utilisation de matériaux très rigides à l'instar de l'acier ou du verre ne simule en rien les paramètres mécaniques de la muqueuse. Actuellement, la plupart des recherches sur ce sujet [4, 170, 262] utilisent des matériaux synthétiques offrant de nombreux avantages comme la modulation des propriétés mécaniques et physico-chimiques de surface. Cependant, ces matériaux restent encore éloignés de la muqueuse *in vivo*. Ils ont besoin de traitements supplémentaires pour se rapprocher des paramètres de topographie et de mouillabilité des tissus buccaux. De plus, les propriétés mécaniques ne sont pas encore comparables (*MPa* vs. *kPa*). De surcroît, en surface ils ne simulent pas les échanges avec l'environnement oral, comme les interactions protéiques, abordé en détail dans le chapitre 1 section III.3. Ainsi, l'utilisation de la tribologie *in vitro* dans ce contexte est complexe, en raison de la difficulté à reproduire les conditions *in vivo*.

L'objectif futur de l'étude de la tribologie orale *in vitro* est de construire un modèle de muqueuse capable de se rapprocher de la muqueuse *in vivo* selon des critères mécaniques et physico-chimiques. Plus les matériaux utilisés seront capables de simuler le comportement des tissus buccaux, plus les relations entre la tribologie et les perceptions sensorielles seront pertinentes.

I.2 Stratégie de recherche

L'intégration des modèles d'épithélium oral dans les chapitres 3, 4 et 5 de ce manuscrit de thèse, composés d'une mono-couche cellulaire et d'un substrat en verre, est innovante. Elle permet de recréer les interactions moléculaires en surface qui régissent en partie la lubrification de la muqueuse. Ces travaux aboutissent à des conclusions novatrices sur le rôle de MUC1 dans la lubrification orale. De plus, ils permettent de discriminer des groupes de sensibilité à l'astringence, confirmant ainsi la relation entre tribologie et perception sensorielle.

Cependant, nos modèles d'épithélium restent encore trop éloignés du comportement de la muqueuse orale *in vivo*, notamment en raison de l'utilisation de lame de verre comme substrat cellulaire. Pour répondre à cette problématique, nous devons trouver

des matériaux capables de mimer la muqueuse buccale *in vivo*. Ainsi, nous modifions le substrat sur lequel les cellules épithéliales sontensemencées, car la lame de verre est bien trop rigide et ne reproduit en aucun cas les mêmes paramètres mécaniques que les tissus oraux.

Les objectifs de ce chapitre sont donc les suivants :

1. **Développer un nouveau modèle de muqueuse orale** : l'objectif est d'utiliser un nouveau matériau capable de simuler le comportement de la muqueuse orale, tout en permettant le développement des cellules épithéliales afin d'obtenir une monocouche cellulaire sur laquelle les essais tribologiques seront réalisés.
2. **Valider les résultats** : pour valider ce nouveau modèle, nous devons confirmer les principaux résultats obtenus, tels que le rôle de MUC1 dans la lubrification et l'effet des composés astringents sur celle-ci.

Cette nouvelle approche du modèle de muqueuse orale offre des perspectives très intéressantes. Elle vise à atténuer les lacunes des modèles antérieurs tout en fournissant des paramètres mécaniques similaires à ceux de la muqueuse orale *in vivo*. Un tel modèle représente pour nous l'opportunité de confirmer nos résultats dans des conditions de plus en plus proches de l'environnement physiologique. L'objectif de ce chapitre est de présenter la nouvelle approche du modèle de muqueuse orale et d'ouvrir de nouvelles perspectives dans l'étude de la tribologie orale. Pour ce faire, nous menons des essais tribologiques avec notre dispositif mécanique précédemment décrit (chapitre 2 partie II.1). Comme dans les études précédentes, l'analyse des paramètres mécaniques (μ , Ed et le niveau d'endommagement) sur ces nouveaux modèles nous permet d'évaluer leur état de lubrification dans diverses conditions expérimentales. L'objectif est de valider les conclusions résultantes des essais des chapitres n°3-4-5 concernant :

- le rôle de la protéine MUC1 dans les propriétés de lubrification de la pellicule mucoale
- l'effet de l'EgCG sur la lubrification des modèles d'épithélium
- l'influence de la protéine MUC1 dans les mécanismes de perte de lubrification

II Protocoles

II.1 Collection de la salive

La collecte de la salive suit le même protocole que les études des chapitres précédents 3, 4 et 5, menée en conformité avec les directives de la Déclaration d'Helsinki et avec le consentement des sujets participants. Les salives ont reçu l'approbation du Comité d'éthique pour la recherche (CPP Est I. Dijon, #14.06.03, ANSM #2014-A00071-46). Les échantillons de salive non stimulée sont recueillis dans des tubes, utilisés immédiatement. Les volontaires ont observé une période d'abstention de boisson, de nourriture et de tabac avant la collecte.

II.2 Construction d'un nouveau modèle de muqueuse orale

II.2.1 Les isoformes de MUC1

Seules les isoformes Non-MUC1 et MUC1/VNTR sont étudiées dans cette partie, étant les isoformes les plus divergents structurellement. La figure 2.1 et le tableau 2.1 décrivent les structures des deux isoformes. Un récapitulatif des deux lignées cellulaire est présenté ci-dessous et sur la figure 6.1.

- **Non-MUC1** : la forme native de la lignée TR146, qui n'exprime pas la mucine MUC1
- **MUC1/VNTR** : cellules TR146 transfectées qui expriment une forme de MUC1 proche de la structure physiologique avec des domaines biologiques d'intérêt tels que le domaine VNTR et le domaine SEA clivable

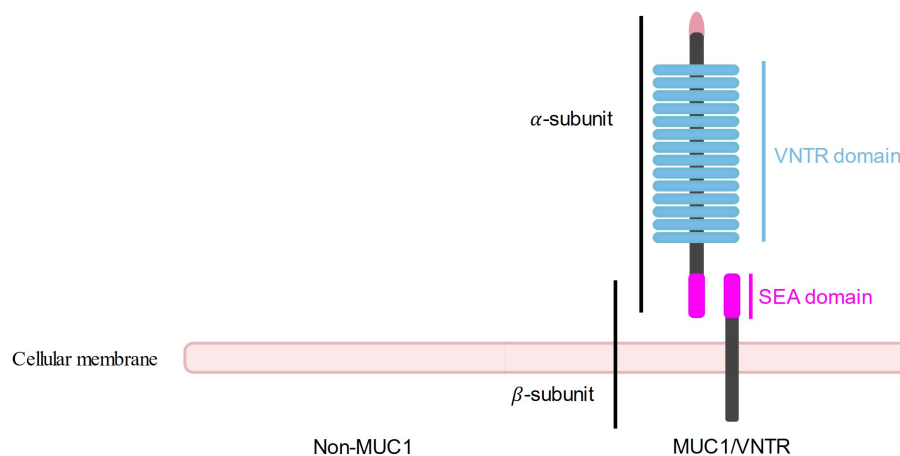


FIGURE 6.1 – Représentations schématiques des deux isoformes de MUC1 utilisés pour les nouveaux modèles de muqueuse - Non-MUC1 n'exprime pas la protéine MUC1 - MUC1/VNTR exprime une forme de MUC1 avec le domaine VNTR et le domaine SEA clivable

II.2.2 Nouveau substrat : l'hydrogel

Le nouveau substrat est un hydrogel en polyacrylamide (PetriSoft 30 mm, Cell Guidance System, UK), offrant l'avantage d'une très faible rigidité (8 kPa données du fabricant), se rapprochant ainsi de celle de la muqueuse orale (environ 2 à 12 kPa au repos [207, 212, 221, 280]). Les hydrogels sont revêtus de collagène de type I de queue de rat et sont immédiatement prêts à être utilisés pour la culture cellulaire. Ce revêtement favorise l'ancrage des cellules à la surface du substrat, jouant un rôle similaire à celui de la poly-D-lysine utilisée sur les lames de verre.

De la même manière que pour les substrats en verre, les modèles sont cultivés en routine, comme décrit précédemment dans la section I.1 du Chapitre 2. Les cellules sontensemencées sur les hydrogels formant ainsi un nouveau modèle bi-couche de muqueuse orale, voir figure 6.2. Les hydrogels sont fournis directement dans des boîtes de Petri de 30 mm, prêts à l'emploi, ce qui facilite le protocole de préparation des échantillons.

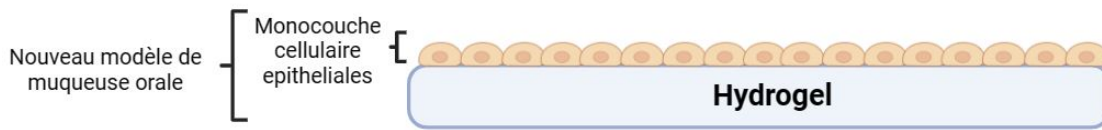


FIGURE 6.2 – Représentation schématique du nouveau modèle de muqueuse orale composé : d'une mono-couche cellulaire épithéliales (Non-MUC1 ou MUC1/VNTR) et d'un substrat en hydrogel mou

Pour une meilleure clarté dans ce chapitre, nous renommerons les deux modèles de muqueuse. Les modèles utilisés dans les études des chapitres 3, 4 et 5, composés d'un substrat en lame de verre, seront désignés comme *modèles hardes* en raison de la dureté des substrats. Ceux développés récemment avec un substrat en hydrogel et testés dans ce chapitre 6 seront appelés *modèles softs* en raison de l'élasticité du substrat.

II.2.3 Reconstruction de la pellicule mucosale

Dans le cadre de ces essais, nous reconstituons la pellicule mucosale en suivant le même protocole que les études précédentes (voir partie II.2.1 du chapitre 3). Les modèles de muqueuse orale sont incubés à 37°C et 7.5% de CO₂ durant 2h avec de la salive. Après les 2 heures, les modèles sont rincés 2 fois avec du PBS pour ne conserver que la pellicule mucosale et rincer la salive non ancrée.

II.2.4 Solution d'EgCG et exposition au modèle d'épithélium

Le protocole d'exposition ainsi que la référence de l'EgCG sont identiques à ceux du Chapitre 4 section II.2.2. La concentration d'EgCG utilisée pour les tests de friction est de 1 mM, diluée dans 2 mL de PBS. Cette concentration est choisie pour être supérieure aux seuils de détection sensorielle de l'EgCG, mesurés à 0,54 mM [333]. Après le protocole de formation de la PM et avant les tests de friction, la solution de tanins est ajoutée au modèle cellulaire. Le modèle avec les tanins est incubé à 37 °C et 7.5% de CO₂ pendant 10 minutes. Après 10 minutes, la solution est retirée et les tests de friction sont réalisés immédiatement.

II.3 Protocoles de mesure mécanique

II.3.1 Tests de friction

Pour cette étude, nous employons le biotribomètre développé dans le cadre de ce travail, similairement à son utilisation dans les essais des Chapitres 3-4-5. Ce dispositif, illustré sur la figure 2.6 permet de simuler le contact oral physiologique palais dur/muqueuse orale. Dans l'étude présentée dans ce chapitre 6, la bille utilisée a un rayon de courbure de 0,4 mm, une rugosité Ra de 70 nm et une rigidité en GPa. Les paramètres mesurés (coefficient de frottement et énergie dissipée) sont des indicateurs mécaniques de l'état de lubrification des modèles d'épithélium, permettant ainsi la comparaison de la lubrification dans différentes conditions expérimentales. La méthode de calcul de ces paramètres est décrite dans la section II.3 du Chapitre 2. Les paramètres

PID sont ajustés, par rapport aux essais des chapitres précédents (3-4-5), afin de compenser les effets visqueux des hydrogels. Les essais sont réalisés dans des conditions de température et d'hygrométrie contrôlées (22-24 °C et 30-40%) et répétés 6 fois.

Deux protocoles expérimentaux sont employés dans ce travail : le premier consiste en l'étude des hydrogels seuls sans mono-couche de cellules épithéliales. Le deuxième consiste en l'étude du *modèle soft*, incluant l'hydrogel et la mono-couche cellulaire (voir figure 6.2). Ces protocoles se ressemblent, seuls les paramètres expérimentaux diffèrent.

II.3.1.1 Protocole sur les hydrogels seuls

Les essais sont menés exclusivement sur les hydrogels sans reproduction de l'épithélium oral. Une charge normale de 2 mN est appliquée par la bille en acier sur l'hydrogel et maintenue constante par le régulateur PID. Une fois la consigne atteinte, l'essai de friction démarre à une vitesse de 1000 $\mu\text{m/s}$ sur une course de 500 μm . L'absence de couche cellulaire permet d'augmenter significativement le nombre de cycles à 1000 pour ces essais, sans nécessité de limiter ce nombre afin d'éviter l'endommagement du tapis cellulaire. Les paramètres sont récapitulés dans le tableau 6.1.

II.3.1.2 Protocole sur les nouveaux modèles *softs*

Les essais de ce protocole sont effectués sur les *modèles softs* de muqueuse orale (voir figure 6.2). Une charge normale de 2 mN est appliquée par la bille sur le modèle cellulaire à une vitesse de 5 $\mu\text{m/s}$. Cette consigne de charge est maintenue constante pendant l'essai de friction par le régulateur PID. La friction est effectuée à une vitesse de 300 $\mu\text{m/s}$ sur une distance de 500 μm . Le nombre de cycles des tests est de 50. Nous réduisons les paramètres par rapport au protocole précédent pour limiter les dommages sur les cellules. Ces paramètres sont résumés dans le tableau 6.1.

TABLEAU 6.1 – Paramètres expérimentaux des tests tribologiques sur des hydrogels sans ou avec reconstruction de l'épithélium oral *in vitro*

Paramètres	Hydrogels sans cellule	Hydrogel avec cellule
Rayon de courbure de la bille	0,4 mm	0.4 mm
Rugosité Ra de la bille	70 nm	70 nm
Surfaces	Hydrogel / Bille en acier	Modèle de muqueuse orale / Bille en acier
Vitesse de la charge normale	50 $\mu\text{m/s}$	5 $\mu\text{m/s}$
Charge normale imposée	2 mN	2 mN
Course de frottement	500 μm	500 μm
Vitesse de frottement	1000 $\mu\text{m/s}$	300 $\mu\text{m/s}$
Nombre de cycles	1000	50
Seuil de contact	0,05 mN	0.05 mN

II.3.2 Caractérisation par indentation

La caractérisation des propriétés mécaniques de l'hydrogel utilisé dans cette étude est réalisée par indentation, fournissant notamment le module de Young réduit E^* . La méthode de calcul est décrite dans la section II.2 du Chapitre 2. Ce paramètre nous permet de comparer le comportement mécanique de l'hydrogel avec celui d'un matériau de référence : la langue de porc *ex vivo*. Le but est de valider notre choix d'hydrogel et sa rigidité. La sélection de la langue de porc comme matériau de référence dans cette étude s'explique par sa similarité avec la langue humaine et la muqueuse orale [49].

Les essais d'indentation sont effectués et répétés 5 fois sur 5 zones distinctes de l'échantillon et de la langue de porc. Pour éliminer l'adhésion et conserver une théorie de Hertz purement élastique, les tests sont menés avec des échantillons immergés dans du sérum physiologique. Cette immersion évite également la déshydratation des échantillons pendant les mesures, pouvant grandement altérer les résultats. Les essais utilisent le même type de bille que les essais de friction, une bille en acier avec un rayon de courbure de 0,4 mm. Les paramètres détaillés des essais sont présentés dans le tableau 6.2.

TABLEAU 6.2 – Paramètres expérimentaux des tests d'indentation

Paramètres expérimentaux	Hydrogel	Langue de porc <i>ex vivo</i>
Bille	Acier / R = 0,4 mm	Acier / R = 0,4 mm
Vitesse normale	5 $\mu\text{m/s}$	5 $\mu\text{m/s}$
Consigne	Déplacement imposé : 50 μm	Effort imposé : 5 mN
Modèle	Hertz	Hertz

II.3.2.1 Préparation des échantillons pour l'indentation

Les trois langues de porc ont été achetées dans le commerce, puis préalablement sélectionnées pour ne conserver que les parties en bon état, qui ne comportaient pas de zone dégradée. Les échantillons sont stockés dans de l'azote liquide. Avant la caractérisation, les langues sont décongelées lentement (environ 1 heure) dans des bacs de glace. Les essais sont réalisés sur des échantillons complètement décongelés, à la même température que les essais précédents (21-23°C et 30-40%).

II.4 Analyse de l'endommagement

L'analyse de l'endommagement permet d'étudier la surface dégradée par le frottement ce qui caractérise l'état de lubrification des modèles de muqueuse orale. Le protocole employé pour cette analyse est le même que pour les chapitres précédents (chapitres 3-4-5). Les modèles sont fixés avec de la PFA diluée à 4% puis déshydratés dans des bains d'éthanol successifs après les essais de friction. Les images des traces obtenues par interférométrie sont traitées pour réduire les effets du bruit et de la forme. Puis

la surface de dégâts est calculée selon le protocole présenté dans le Chapitre 2. Toute la procédure est détaillée dans la section III.1 du Chapitre 2.

II.5 Étude de la mouillabilité

Afin de comparer les caractéristiques chimiques de surface entre les hydrogels utilisés dans cette étude et les tissus oraux réels, nous évaluons leur mouillabilité. Pour ce faire, nous utilisons l'angle de contact comme mesure de la mouillabilité de chaque matériau. Les données relatives aux tissus oraux sont extraites de la littérature [49, 57]. Quant à nos hydrogels, les angles de contact sont mesurés à leur surface.

Nous employons un dispositif de mouillage mobile, le MSA One-Click SFE (Krüss, Allemagne). Ce dispositif dépose une goutte d'eau sur la surface de l'hydrogel, puis mesure l'angle de contact entre la goutte et la surface. Cette mesure caractérise la capacité d'un liquide (ici, l'eau) à mouiller la surface de l'hydrogel. L'angle de contact est défini comme l'angle formé par la tangente à la surface de la goutte au point de phase triple avec la surface du corps solide [351], comme illustré dans la figure 6.3. Une plus faible valeur d'angle indique une plus grande hydrophilie de la surface, tandis qu'une valeur plus élevée reflète une plus grande hydrophobie.

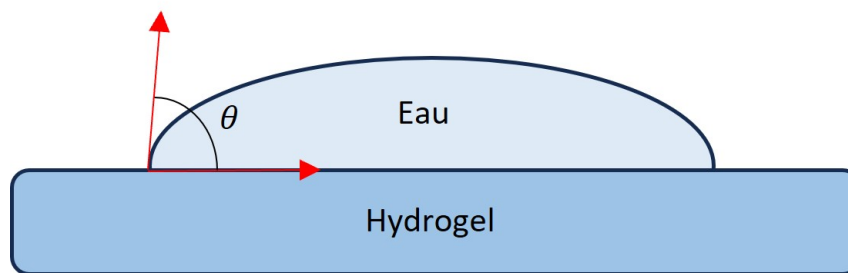


FIGURE 6.3 – Schéma de la mesure de l'angle de contact θ entre une goutte d'eau et notre hydrogel, utilisant la méthode de la tangente au point triple

II.6 Analyses statistiques

L'analyse statistique présentée ici adopte la même méthodologie que celle décrite au Chapitre 3 et détaillée dans la section II.4 du Chapitre 2. Les niveaux de signification sont définis comme suit : $p = 0 < *** < 0,001 < ** < 0,01 < * < 0,05 < \circ < 0,1 < . < 1$. Ces analyses sont effectuées en utilisant le logiciel XLSTAT (version 2019.4.2, Addinsoft, France), une extension d'Excel, ainsi que MatlabTM (R2021b, Licence École Centrale de Lyon).

III Études expérimentales

III.1 Caractérisations des hydrogels

III.1.1 Problématique

Les matériaux utilisés pour simuler les tissus oraux dans les études de tribologie orale *in vitro* sont principalement des polymères silicones. Cependant, leur similarité

avec les tissus oraux réels est souvent limitée en raison de la complexité de ces derniers [212]. Une compréhension approfondie de la physique et de la chimie des surfaces buccales humaines est nécessaire pour évaluer la pertinence des surfaces synthétiques utilisées dans ces expériences. Cette connaissance permet d'améliorer la proximité des nouveaux matériaux employés avec le comportement des tissus oraux *in vivo*.

Pour rappel le *modèle soft* repose sur l'utilisation d'un hydrogel souple. Dans cette étude, nous comparons la rigidité, la rugosité et la mouillabilité de cet hydrogel avec celles des surfaces buccales humaines réelles. L'objectif est de confirmer l'emploi de ce nouvel hydrogel pour la construction du *modèle soft* de muqueuse orale (voir figure 6.2).

III.1.2 Observations et Analyses des résultats

III.1.2.1 Rigidité de surface

Avant d'entamer les essais tribologiques et l'étude de la lubrification, nous souhaitons comparer les propriétés mécaniques de nos hydrogels à celles d'un matériau de référence, considéré comme similaire à la muqueuse orale : la langue de porc *ex vivo*.

La figure 6.4 présente le module d'élasticité réduit E^* mesuré sur les langues de porc, qui s'élève à $7,6 \pm 1,3$ kPa. Cette valeur est en accord avec les études de la littérature qui caractérisent les tissus de la muqueuse orale avec un module d'élasticité compris entre 2 et 10 kPa [201, 283, 352]. La langue de porc se révèle donc très pertinente pour simuler les tissus oraux et devient ainsi une référence précieuse pour les comparaisons avec les propriétés de nos hydrogels.

Quant au module d'Young réduit des hydrogels, il est présenté sur la figure 6.4 et affiche une valeur de $8,9 \pm 0,7$ kPa. L'analyse de la rigidité des hydrogels indique qu'ils se rapprochent étroitement du comportement des langues de porc *ex vivo*, et par conséquent, des tissus oraux *in vivo*. Ces résultats valident donc le choix des hydrogels et de la rigidité retenue.

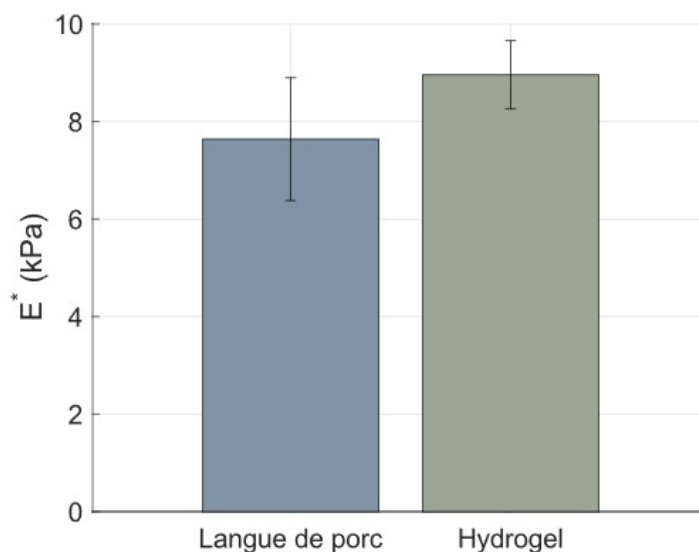


FIGURE 6.4 – Modules élastiques réduits mesurés sur les langues de porc et sur les hydrogels

III.1.2.2 Étude de la mouillabilité des surfaces

La mouillabilité des surfaces de la cavité buccale humaine est essentielle pour de nombreux processus biologiques [57]. Cette caractéristique intrinsèque rend généralement les tissus oraux hydrophobes. Toutefois, les tissus ayant des fonctions d'adsorption, d'échange ou de lubrification tendent à être plus hydrophiles, tandis que ceux nécessitant une protection contre les agents externes sont plutôt hydrophobes. Les recherches de van der Mei et al. [57] ont révélé que les surfaces buccales sont hydrophobes, avec un angle de contact d'environ 70° , démontrant ainsi leur rôle protecteur contre les infections. De plus, la pellicule mucosale adhère mieux aux surfaces hydrophobes [212]. Cependant, en présence de la pellicule mucosale, la surface des tissus oraux devient hydrophile avec un angle de contact de 51° , modifiant ainsi sa propriété hydrophobe [212].

Les surfaces de la cavité buccale favorisent donc l'ancrage cellulaire et protéique grâce à leur hydrophobicité intrinsèque [58]. Cependant, elles deviennent hydrophiles sous l'influence de la salive ou de la pellicule mucosale. En résumé, la salive est déterminante dans la mouillabilité des surfaces orales [212]. Les matériaux synthétiques imitant les tissus oraux sont initialement hydrophobes, nécessitant souvent un traitement au plasma coûteux et instable pour devenir hydrophiles [203]. Ainsi, la mouillabilité de ces matériaux n'est pas influencée par la présence du film salivaire.

Les propriétés de mouillabilité de nos hydrogels sont évaluées dans deux conditions expérimentales : sans revêtement et avec un revêtement salivaire. Chimiquement, nos hydrogels se comportent de manière similaire aux surfaces des tissus buccaux. Initialement ils sont hydrophobes ($67 \pm 3^\circ$) et deviennent hydrophiles une fois recouverts de la pellicule salivaire ($25 \pm 2^\circ$), voir figure 6.5. Ce comportement est confirmé par les résultats comparatifs avec les angles de contact mesurés sur des muqueuses orales humaines (voir tableau 6.3). Ils soulignent ainsi la similarité des propriétés physico-chimiques de nos hydrogels avec celles des tissus oraux.

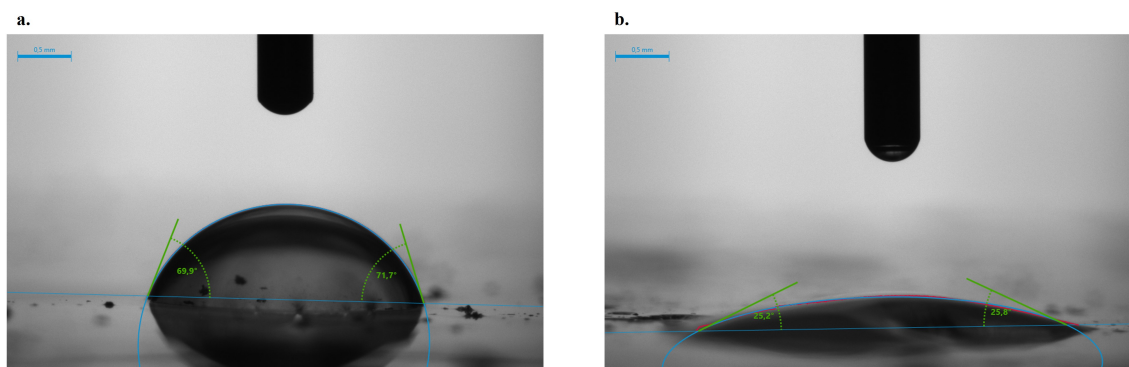


FIGURE 6.5 – Angles de contact mesurés dans deux conditions expérimentales : (a) sans revêtement (à sec) et (b) avec un film salivaire appliqué sur les hydrogels

TABLEAU 6.3 – Comparaison des angles de contact entre les hydrogels et des muqueuses buccales humaines, en considérant deux conditions : sans revêtement et avec revêtement.

Matériaux	Surface sèche	Surface revêtue d'un film salivaire
Muqueuse orale	$72 \pm 10^\circ$ [57]	$50 \pm 2^\circ$ [49]
Hydrogel	$67 \pm 3^\circ$	$25 \pm 2^\circ$

III.1.2.3 Étude de la topographie

Les cellules constituant la couche superficielle des épithéliums buccaux présentent des replis membranaires appelés micropliquae [83], comme illustré sur la figure 1.4.a. Leur hauteur est comprise entre 200 et 800 *nm* et la largeur entre 100 et 200 *nm*, elles varient peu selon les différentes régions de la cavité buccale [7, 15]. Ces micropliquae expriment à leur extrémité la mucine transmembranaire MUC1. Ces replis membranaires permettent d'augmenter la surface d'échange membranaire, favorisant ainsi les échanges avec l'environnement oral. Ces micropliquae participent à la formation de la pellicule mucosale [7] via la présence de MUC1. Elles fournissent une base pour les fonctions protectrices des mucines.

La présence de ces micropliquae à la surface des modèles cellulaires que nous utilisons dans cette étude a été observée par Nivet et al. et Ployon et al [7, 8]. La figure 6.6, réalisée par Nivet et al. [7] valide la présence de micropliquae en surface des isoformes Non-MUC1 et MUC1/VNTR. Sirviö et al. [353] ont également observé ces replis membranaires sur des tissus *ex vivo* de personnes saines. Nos modèles de muqueuse orale expriment donc des micropliquae naturellement, reproduisant fidèlement la surface de la muqueuse buccale.

Ces résultats démontrent que nos modèles de muqueuse sont novateurs, ils expriment une topographie très proche de celle observée *in vivo* contrairement aux matériaux synthétiques classiques comme le PDMS. En effet, obtenir une topographie de surface aussi complexe sur des matériaux synthétiques est extrêmement difficile, demandant des étapes supplémentaires fastidieuses pour tenter d'obtenir une rugosité plus ou moins similaire à celle des tissus *in vivo*.

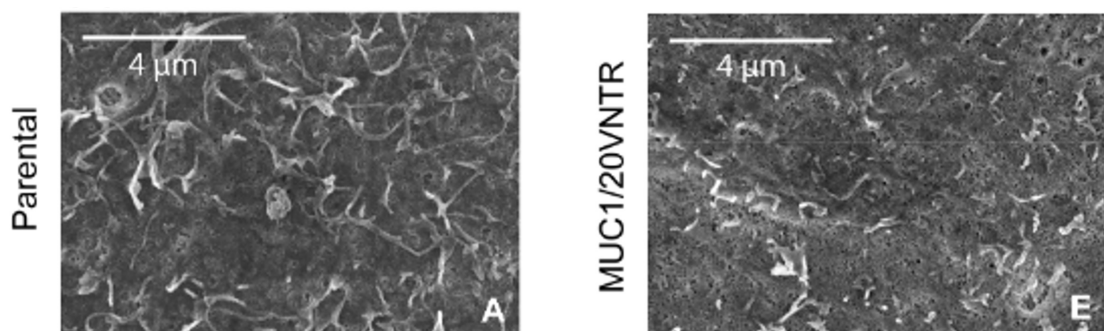


FIGURE 6.6 – Observation au microscope électronique à balayage sur les isoformes Non-MUC1 (parentale) et MUC1/VNTR montrant les micropliquae en surface des isoformes - Images issues des travaux de Nivet et al. [282]

III.1.3 Conclusions intermédiaires

Les propriétés de la langue de porc *ex vivo* sont étroitement similaires à celles des tissus oraux *in vivo*, ce qui en fait un matériau de substitution très intéressant pour l'étude des processus oraux par tribologie *in vitro*. Cependant, sa disponibilité limitée et sa tendance à se dégrader rapidement sont des inconvénients majeurs. De plus, les différences individuelles entre les langues de porc nécessitent l'utilisation de nombreuses langues pour obtenir des résultats reproductibles. Malgré ces limitations, la langue de porc reste un excellent matériau de référence pour valider l'utilisation de nouveaux matériaux imitant les tissus oraux. Dans cette partie, nos hydrogels sont comparés avec des langues de porc, où nous constatons une similitude des modules d'élasticité. Ces résultats valident donc l'utilisation de nos hydrogels dans les *modèles softs*, d'un point de vue mécanique.

Ces hydrogels sont également conçus pour permettre l'ensemencement de cellules, nous permettant ainsi de construire les *modèles softs* bi-couche : un hydrogel mou et un épithélium oral *in vitro* reconstitué, figure 6.2. Cette approche nous permet de reproduire les échanges entre l'épithélium et l'environnement oral, en exprimant les protéines transmembranaires MUC1. De plus, les épithéliums reproduisent une rugosité physiologique en formant des microplacae présentes en surface des tissus oraux *in vivo*. Ces microplacae fournissent ainsi une extension de la surface d'échange avec l'extérieur, favorisant la formation de la pellicule mucosale.

D'un point de vue chimie de surface, l'hydrogel présente une similitude remarquable avec les tissus buccaux réels. Initialement hydrophobe, sa surface devient hydrophile lorsqu'elle est revêtue d'un film salivaire. Ces caractéristiques sont pertinentes pour la simulation des surfaces buccales, favorisant à la fois l'adhérence cellulaire et la formation d'un film salivaire protecteur.

Ainsi, notre *modèle soft* reproduit fidèlement la muqueuse orale *in vivo* en termes de rigidité, de mouillabilité et de topographie.

III.2 Étude de la lubrification sur les hydrogels seuls

III.2.1 Problématique

Dans la section précédente, nous démontrons que l'hydrogel utilisé dans cette étude est un matériau de substitution qui reproduit fidèlement les propriétés mécaniques et surfacique de la muqueuse orale *in vivo*. Avant d'entreprendre des essais tribologiques sur ce *modèle soft*, nous cherchons à valider certaines hypothèses et conclusions sur l'hydrogel seul, étant donné qu'il représente déjà de manière assez précise le comportement des tissus oraux. Ainsi, cette section du Chapitre 6 vise à examiner deux points : le pouvoir lubrifiant de la pellicule mucosale et l'effet des tanins (l'EgCG) sur la lubrification des surfaces.

III.2.2 Analyse et interprétation des résultats

La figure 6.7 présente les résultats des essais tribologiques sur les hydrogels bruts, sans mono-couche cellulaire ajoutée. Premièrement, nous notons que la présence d'une

pellicule mucosale améliore la lubrification à la surface des hydrogels. En effet, le coefficient de frottement moyen diminue passant de $0,473 \pm 0,028$ à sec sans PM à $0,017 \pm 0,006$ avec une pellicule mucosale ($p < 0,05$), comme illustré dans la figure 6.7.b. La figure 6.7.a démontre très clairement que μ est bien plus faible en présence du film salivaire. Ces résultats mettent en évidence l'efficacité de la pellicule mucosale dans la lubrification des surfaces [64, 65], même en l'absence de protéines transmembranaires en surface. Ces conclusions sont en accord avec les résultats obtenus dans le chapitre 3 sur nos *modèles hard*. Nous montrons que la présence d'une pellicule mucosale entraîne une diminution des forces de friction pour chaque lignées cellulaire. Ils sont également en accord avec d'autres travaux de la littérature [49, 50], qui ont montré le pouvoir lubrifiant de la pellicule mucosale sur des surfaces synthétiques et *ex vivo*.

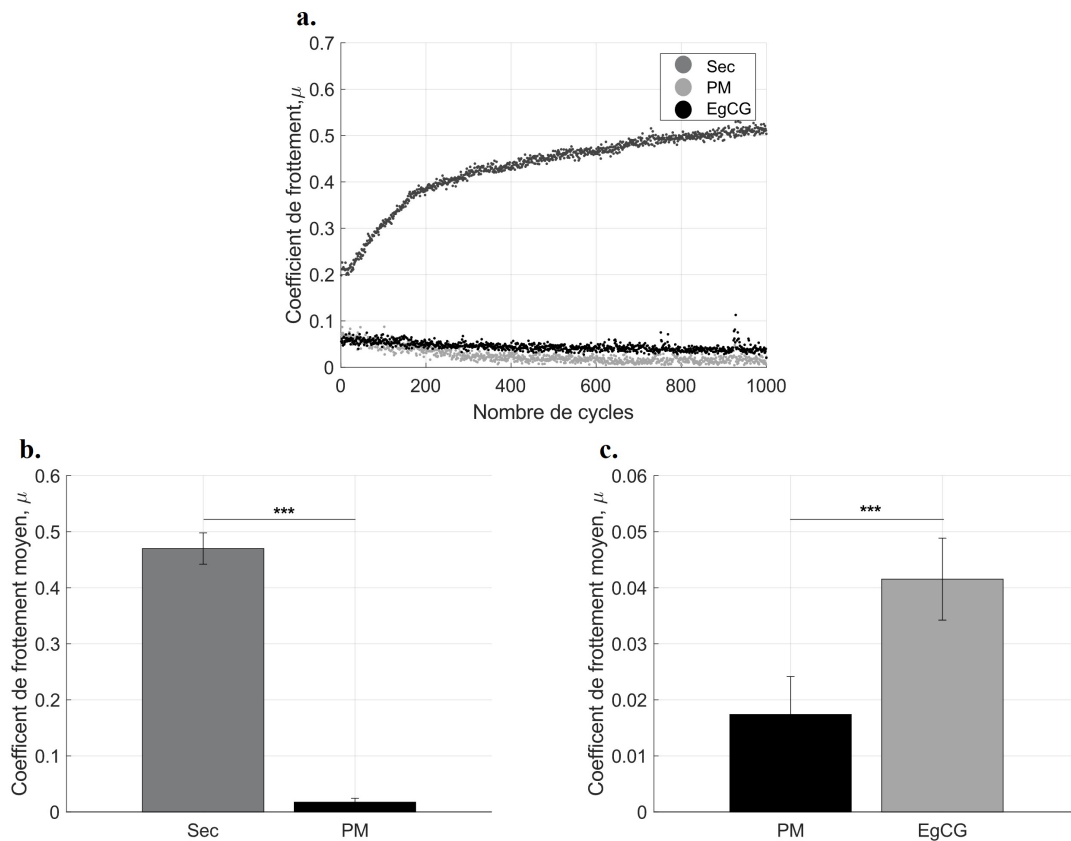


FIGURE 6.7 – (a) Évolution du coefficient de frottement en fonction du nombre de cycles pour les trois conditions expérimentales testées sur les hydrogels bruts - Comparaison des coefficients de frottement moyens entre (b) les conditions seche et avec PM (c) les conditions avec PM et avec PM + EgCG

La deuxième hypothèse que nous étudions est l'impact des tanins sur les propriétés lubrifiantes de la pellicule mucosale. La figure 6.7 illustre l'effet de l'EgCG sur cette lubrification. Nous constatons que la présence d'EgCG entraîne une augmentation des forces de friction, indiquant une perte de lubrification en surface des hydrogels. Le coefficient de frottement augmente, passant de $0,017 \pm 0,006$ sans tanin à $0,041 \pm 0,007$ après l'ajout de l'EgCG ($p < 0,05$), comme représenté dans les figures 6.7.a et 6.7.c. Nous remarquons sur la figure 6.7.a que μ est plus faible en présence du film salivaire sans l'ajout

de tanins. Comme expliqué précédemment dans ce manuscrit, cette perturbation de la lubrification est causée par l'agrégation des tanins avec les protéines salivaires venant perturber le pouvoir lubrifiant de la pellicule [43, 50, 76, 95]. Ces résultats, observés sur des hydrogels mous, sont également obtenus sur nos *modèles hard* de muqueuse orale dans le chapitre 4, où nous avons montré que l'ajout de tanins entraîne une perte de lubrification à la surface des modèles d'épithélium oral.

III.2.3 Conclusions intermédiaires

Pour explorer les mécanismes de lubrification orale, de nombreux travaux *in vitro* utilisent des matériaux synthétiques tels que le PDMS [167, 203]. Par exemple, Rossetti et al. [167] ont examiné l'impact des composés astringents sur le coefficient de friction et la lubrification des surfaces de PDMS. Nos recherches, présentées dans cette section, confirment ces résultats en utilisant des hydrogels en polyacrylamide souple. Nous confirmons à la fois l'efficacité lubrifiante de la pellicule mucosale et l'influence des tanins sur la lubrification des surfaces. Ces hydrogels offrent une alternative aux matériaux conventionnels utilisés dans la tribologie orale *in vitro*, voir tableau 1.3. Leur principal avantage, par rapport aux matériaux existants, est leur faible rigidité et leur mouillabilité, similaire à celle de la muqueuse orale *in vitro*. Cependant, ils ne permettent pas d'analyser les mécanismes moléculaires des interactions protéines/protéines responsables de la lubrification orale.

III.3 Le rôle de la protéine MUC1 dans les propriétés lubrifiantes de la pellicule mucosale

III.3.1 Problématique

L'utilisation de matériaux totalement inertes néglige les interactions entre les protéines présentes sur la muqueuse orale et l'environnement extérieur. Ces interactions sont essentielles dans les processus de lubrification. Afin de prendre en compte ces mécanismes et de perfectionner nos modèles de tribologie orale *in vitro*, nous avons développé le *modèle soft*, comme illustré à la figure 6.2.

L'objectif de cette section est de valider le rôle crucial de la protéine MUC1 dans la formation de la pellicule mucosale. Nous cherchons à démontrer l'efficacité du *modèle soft* pour l'étude des processus oraux. Pour confirmer ces résultats nous utilisons les mêmes indicateurs mécaniques que dans le Chapitre 3 : le coefficient de frottement, l'énergie dissipée par frottement et la surface d'endommagement.

III.3.2 Discussion des observations

La figure 6.8 et le tableau 6.4 présentent le coefficient de frottement, l'énergie dissipée et la surface endommagée par frottement, tandis que la figure 6.9 illustre les surfaces *post mortem* pour chaque isoforme. Ces essais sont réalisés sur les isoformes Non-MUC1 et MUC1/VNTR avec une PM reconstruite.

TABLEAU 6.4 – Coefficient de frottement, Énergie dissipée et Surface endommagée moyens mesurés avec reconstruction de la PM sur les isoformes Non-MUC1 et MUC1/VNTR sur le modèle soft (moyenne ± écart-type) et p_{value}

	Non-MUC1	MUC1/VNTR	p
Coefficient de frottement	$0,013 \pm 0,002$	$0,010 \pm 0,002$	***
Énergie Dissipée [mJ]	$0,75 \pm 0,17$	$0,66 \pm 0,11$.
Surface endommagée ($\cdot 10^5$) [μm^2]	$4,4 \pm 1,6$	$1,6 \pm 0,5$	*

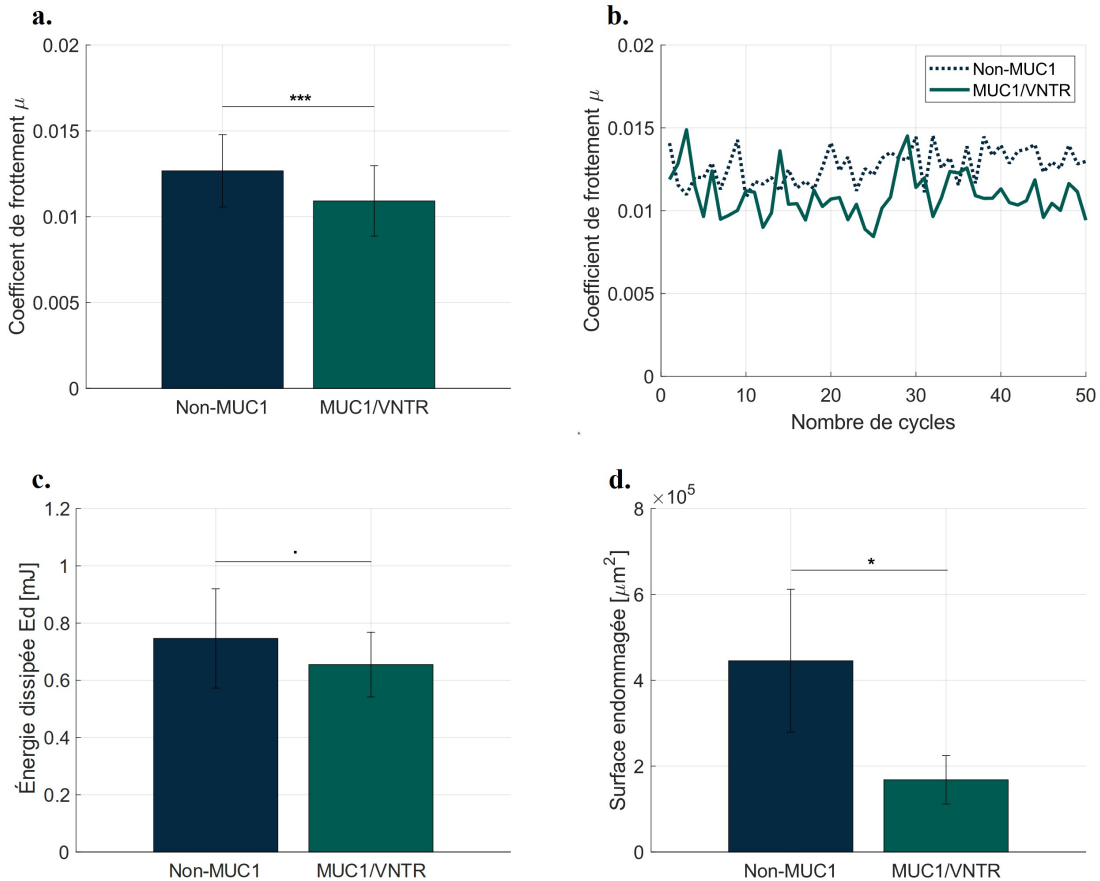


FIGURE 6.8 – Comparaison des performances de frottement entre les isoformes de MUC1 (Non-MUC1 et MUC1/VNTR) avec une PM reconstruite : (a) Coefficient moyen de frottement, (b) Variation du coefficient de frottement en fonction du nombre de cycles, (c) Énergie dissipée par frottement, et (d) Surface endommagée par frottement

En présence de MUC1, une diminution du coefficient de frottement est observée ($p < 0,05$, tableau 6.4), passant de $0,013 \pm 0,002$ pour les Non-MUC1 à $0,010 \pm 0,002$ pour l'isoforme MUC1/VNTR exprimant MUC1. Bien que l'énergie dissipée diminue également, cette diminution n'atteint pas de signification statistique (voir tableau 6.4).

La figure 6.9 illustre qualitativement une différence importante dans la surface d'endommagement entre les isoformes. Les dommages semblent plus prononcés pour l'isoforme Non-MUC1, indiquant une réduction des dommages en présence de MUC1. Une analyse d'image quantitative révèle une surface endommagée de $(4,4 \pm 1,6) \cdot 10^5 \mu m^2$ pour l'isoforme Non-MUC1 et de $(1,6 \pm 0,5) \cdot 10^5 \mu m^2$ pour l'isoforme MUC1/VNTR, mon-

trant ainsi une différence significative dans les dommages causés par le frottement selon l'isoforme étudiée ($p < 0,05$, tableau 6.4).

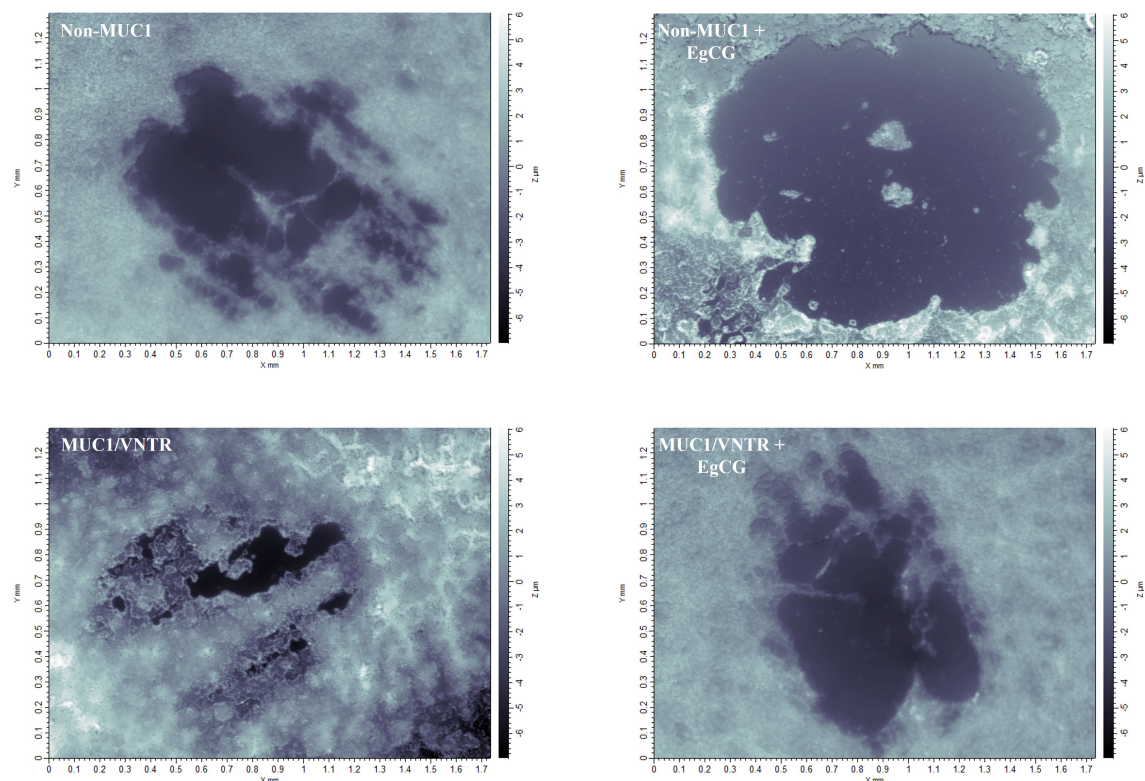


FIGURE 6.9 – Images des surfaces épithéliales après frottement pour les deux isoformes étudiées dans les deux conditions expérimentales PM reconstruite et PM reconstruite + EgCG sur les modèles softs de muqueuse orale

Cette analyse des indicateurs explore l'impact de la présence de la protéine MUC1 dans la lubrification des *modèles softs*. L'expression de MUC1 favorise les interactions entre les protéines salivaires et l'épithélium oral, améliorant ainsi la lubrification macroscopique des modèles d'épithélium [25, 68, 282, 309]. Ces résultats confirment les résultats du Chapitre 3 section III.2, sur nos *modèles hard* de muqueuse orale et valident la pertinence du *modèle soft* dans l'étude de la tribologie orale.

III.4 L'effet de l'EgCG sur la lubrification des modèles d'épithélium

III.4.1 Problématique

Afin de poursuivre la validation de ces *modèles softs*, nous visons à étudier l'influence des tanins, en particulier de l'EgCG, sur la lubrification des épithéliums. Cette recherche s'appuie sur la littérature [34, 128, 167] ainsi que sur notre étude présentée dans le chapitre 4 sur les *modèles hard*. Cette section a pour objectif de confirmer les études précédentes sur nos *modèles softs*, validant ainsi son potentiel pour les futures recherches en tribologie orale.

III.4.2 Analyse des données et réflexions

Les résultats de cette section portent sur les deux mêmes isoformes que l'étude précédente, Non-MUC1 et MUC1/VNTR. Deux conditions expérimentales sont testées : avec PM et avec PM + EgCG.

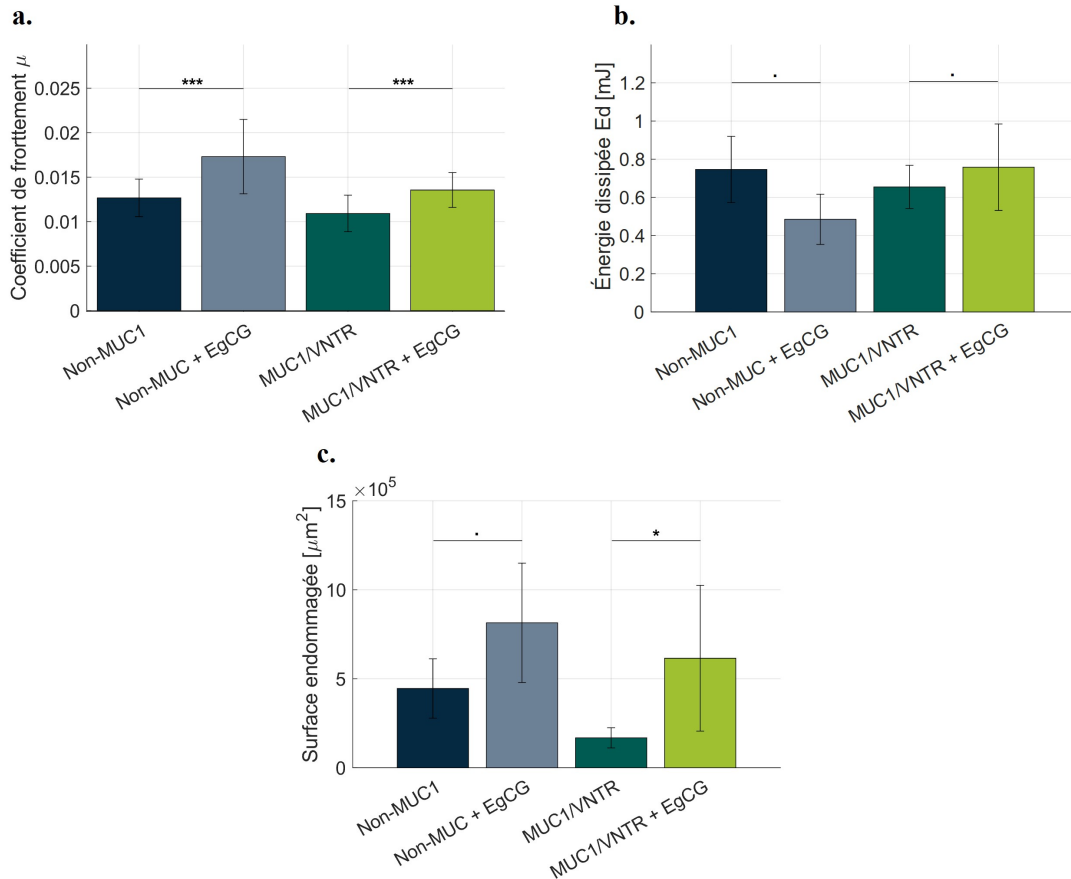


FIGURE 6.10 – Comparaison de l'effet de l'EgCG sur la lubrification des isoformes de MUC1 (Non-MUC1 et MUC1/VNTR) : (a) Coefficient moyen de frottement, (b) Énergie dissipée par frottement, et (c) Surface endommagée par frottement pour les deux conditions expérimentales : PM reconstruite et PM reconstruite + EgCG

La figure 6.10 et le tableau 6.5 montrent l'évolution des trois indicateurs mécaniques après l'ajout d'EgCG sur les deux isoformes. Nous observons une augmentation significative du coefficient de frottement moyen ($p < 0.05$, tableau 6.5) pour les deux isoformes, passant de $0,013 \pm 0,002$ à $0,017 \pm 0,002$ pour Non-MUC1 et de $0,010 \pm 0,002$ à $0,014 \pm 0,002$ pour MUC1/VNTR. L'augmentation de l'énergie dissipée n'est observable que pour l'isoforme MUC1/VNTR. Ces augmentations traduisent une lubrification plus faible à la surface des épithéliums due à l'agrégation d'EgCG, entraînant une rupture de la PM et de ses pouvoirs lubrifiants.

Cette perte de lubrification se reflète également dans les dommages subis par les surfaces des modèles épithéliaux après frottement. En effet, une diminution de la lubrification entraîne une augmentation des forces de friction, provoquant ainsi des dommages plus importants à la surface, comme illustré qualitativement sur les images des épithéliums *post mortem* (voir figure 6.9). La rupture de la PM diminue sa capacité

de protection des épithéliums. La quantification de ces dégâts par analyse d'image confirme ces résultats, figure 6.10. L'endommagement augmente de $(4,4 \pm 1,6) \cdot 10^5 \mu\text{m}^2$ à $(8,1 \pm 3,4) \cdot 10^5 \mu\text{m}^2$ pour l'isoforme Non-MUC1 et augmente de $(1,6 \pm 0,5) \cdot 10^5 \mu\text{m}^2$ à $(6,2 \pm 4,1) \cdot 10^5 \mu\text{m}^2$ pour MUC1/VNTR. Cette augmentation est significative que pour MUC1/VNTR, ($p < 0.05$, tableau 6.5).

TABLEAU 6.5 – Coefficient de frottement, Énergie dissipée et Surface endommagée mesurés sur les isoformes Non-MUC1 et MUC1/VNTR dans les deux conditions expérimentales PM reconstruite et PM reconstruite + EgCG (moyenne \pm écart-type) et p value

Non-MUC1			
	PM	PM+EgCG	p
Coefficient de frottement	$0,013 \pm 0,002$	$0,017 \pm 0,004$	* * *
Énergie dissipée [mJ]	$0,75 \pm 0,17$	$0,48 \pm 0,13$.
Surface endommagée ($\cdot 10^5$) [μm^2]	$4,4 \pm 1,6$	$8,1 \pm 3,4$.
MUC1/VNTR			
	PM	PM+EgCG	p
Coefficient de frottement	$0,010 \pm 0,002$	$0,014 \pm 0,002$	* * *
Énergie dissipée [mJ]	0.65 ± 0.11	0.76 ± 0.23	.
Surface endommagée ($\cdot 10^5$) [μm^2]	$1,6 \pm 0,5$	$6,2 \pm 4,1$	*

Ces travaux sur les *modèles softs* confirment à nouveau l'impact néfaste des tanins sur la lubrification. En effet, ces travaux démontrent à plusieurs reprises, tant sur des *modèles hard*s (voir Chapitre 4) que sur des matériaux synthétiques en hydrogel (voir Chapitre 6, section III.2), que l'EgCG entraîne une perte de lubrification due à une rupture de la PM. Ces conclusions sont également corroborées par la littérature [167, 170, 171, 262]. En employant ce type de *modèle soft*, nous parvenons à des conclusions similaires : les forces de friction et les dommages augmentent après l'ajout de tanins, traduisant une perte de lubrification due à l'agrégation de l'EgCG à la surface de l'épithélium. Seule l'énergie dissipée pour les cellules natives donne un résultat incohérent. De nouveau, nous validons la pertinence de l'utilisation de nos *modèles softs* dans l'étude de l'impact des composés astringents sur la lubrification des épithéliums. Nous exploitons les avantages des essais sur des matériaux multimodaux présentant des propriétés physico-chimiques proches de celles de la muqueuse orale et reproduisant les interactions protéiques.

III.5 Mécanismes moléculaires de l'astringence intégrant la mucine MUC1

III.5.1 Problématique

Pour conclure la validation de ce *modèle soft*, nous cherchons à examiner l'impact de MUC1 sur les mécanismes de perte de lubrification causés par les tanins. Cette hypothèse est explorée dans le Chapitre 4 section III.1.2.1 sur les *modèles hard*s.

III.5.2 Interprétation des Résultats et Discussions

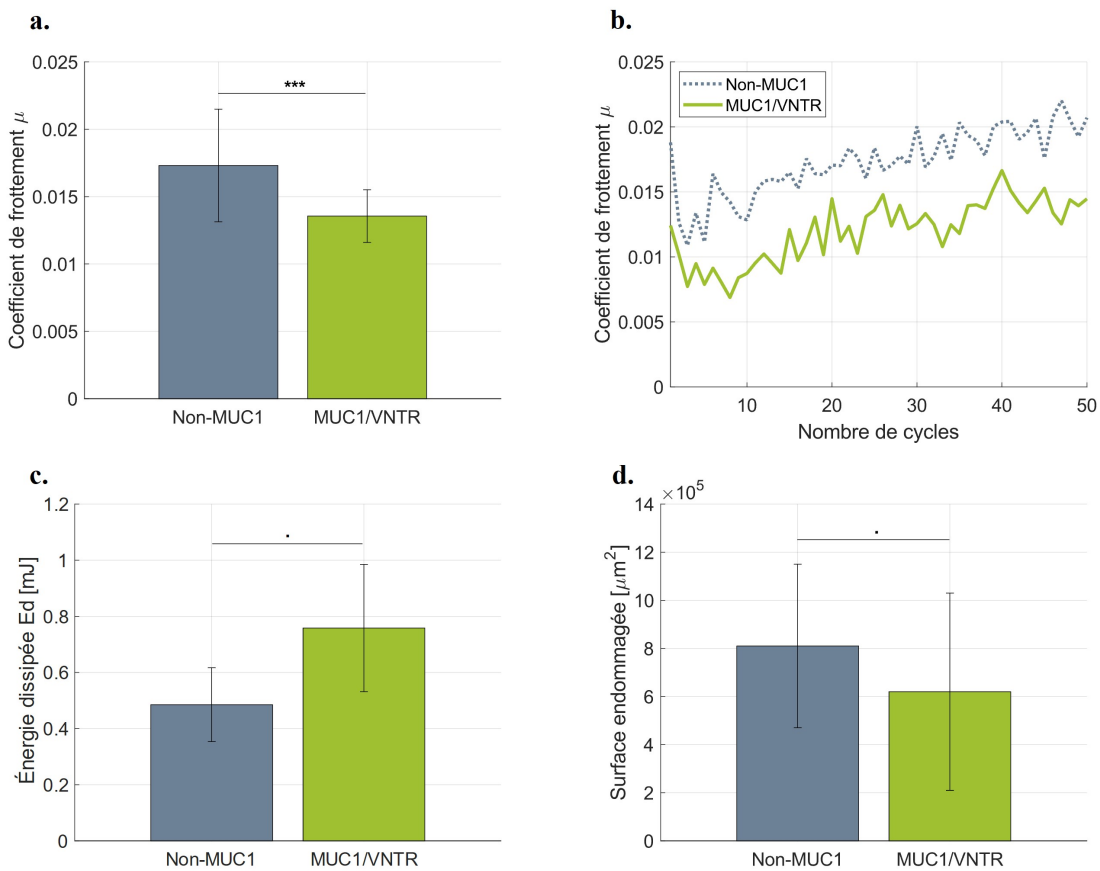


FIGURE 6.11 – Comparaison des résultats tribologiques entre les isoformes de MUC1 (Non-MUC1 et MUC1/VNTR) en présence d'EgCG : (a) Coefficient moyen de frottement, (b) Variation du coefficient de frottement en fonction du temps, (c) Énergie dissipée par frottement, et (d) Surface endommagée par frottement

La figure 6.11 ainsi que le tableau 6.6 comparent les valeurs de coefficient de frottement, l'énergie dissipée et la surface d'endommagement entre les isoformes Non-MUC1 et MUC1/VNTR en présence de tanins. En présence de MUC1, une diminution du coefficient de frottement est constatée ($p < 0.05$, tableau 6.6), passant de $0,017 \pm 0,004$ pour Non-MUC1 à $0,014 \pm 0,002$ pour MUC1/VNTR. Ces résultats confirment les conclusions établies dans le Chapitre 4, indiquant que la présence de MUC1 atténue l'effet des tanins (ici l'EgCG) sur la lubrification. L'étude de la surface d'usure dépeint également les mécanismes d'atténuation de l'effet de l'EgCG. Les images Non-MUC1 + EgCG et MUC1/VNTR + EgCG de la figure 6.9 montrent que les dégâts causés par le frottement

en présence de tanins sont nettement moins importants avec l'expression de MUC1. En quantifiant ces dégâts, nous constatons que la surface d'endommagement diminue avec la mucine, passant de $(8,1 \pm 3,4) \cdot 10^5 \mu m^2$ pour Non-MUC1 à $(6,2 \pm 4,1) \cdot 10^5 \mu m^2$ pour MUC1/VNTR, voir figure 6.11 et tableau 6.6. En revanche, l'analyse de l'énergie dissipée donne des résultats incohérents car elle ne suit pas la même tendance que les autres paramètres.

TABLEAU 6.6 – Coefficient de frottement, Énergie dissipée et Surface endommagée moyens mesurés en présence de l'EgCG sur les isoformes Non-MUC1 et MUC1/VNTR (moyenne \pm écart-type) et p_{value}

	Non-MUC1 + EgCG	MUC1/VNTR + EgCG	p
Coefficient de frottement	$0,017 \pm 0,004$	$0,014 \pm 0,002$	***
Énergie Dissipée [mJ]	$0,48 \pm 0,13$	$0,76 \pm 0,23$.
Surface endommagée ($\cdot 10^5$) [μm^2]	$8,1 \pm 3,4$	$6,2 \pm 4,1$.

Cette étude sur nos *modèles softs* met en évidence l'influence de la présence de MUC1 sur l'effet de l'EgCG sur la lubrification des épithéliums buccaux. Cette atténuation est due à la structure particulière des mucines transmembranaires MUC1. Le processus de rupture du domaine SEA clivable agit comme une mesure de protection contre la rupture cellulaire lors des phénomènes d'agrégation [87]. De plus, la présence d'un domaine VNTR richement glycosylé crée une barrière physique difficilement franchissable pour les composés extérieurs, grâce à un fort encombrement stérique [7, 81]. Ces fonctions de MUC1 sont étudiées et démontrées dans le Chapitre 4 de ce manuscrit sur nos *modèles hard*. Nous les validons à nouveau sur les *modèles softs*, encore plus proches de la muqueuse orale *in vivo*, ce qui renforce leur validité et les propose pour de futures études de la tribologie orale.

IV Conclusion du chapitre

Le premier objectif de ce chapitre est de revoir l'approche de simulation de la muqueuse orale afin d'améliorer le protocole et la méthodologie développés au cours de ces travaux de doctorat. Jusqu'à présent, les matériaux utilisés imitaient partiellement le comportement mécanique de la muqueuse orale. Ainsi nous avons élaboré un *modèle soft* (voir figure 6.2). Il combine un substrat en hydrogel avec un épithélium reconstruit *in vitro* à partir de la lignée cellulaire TR146, transfectée avec différentes isoformes de MUC1 (voir figure 6.1). Cette approche permet une simulation plus fidèle des tissus oraux. L'optimisation de la physico-chimie de surface et de la rigidité permet d'obtenir des paramètres de rugosité, de mouillabilité et de module d'élasticité similaires à ceux de la muqueuse orale *in vivo*. L'objectif est de surmonter les limites des matériaux précédemment utilisés dans la littérature [170, 262]. Nos hydrogels présentent une rigidité très faible, proche de celle des tissus buccaux. Nos mono-couches cellulaires reproduisent les microplacae présents sur la muqueuse buccale, créant une topographie similaire à celle des tissus physiologiques. Enfin, la mouillabilité de surface de nos modèles reflète

le comportement observé sur les tissus oraux.

Le deuxième objectif de cette recherche consiste à répliquer les résultats obtenus dans nos études antérieures menées sur un *modèle hard* moins représentatif de la muqueuse orale *in vivo*. Nos essais tribologiques sur le *modèle soft* confirment de nouveau le rôle crucial de MUC1 dans la lubrification. L'expression de MUC1 favorise les interactions entre les protéines salivaires et l'épithélium oral, améliorant ainsi la lubrification macroscopique des modèles d'épithélium. De plus, cette étude confirme les effets néfastes des tanins sur la lubrification. L'agrégation des tanins à la surface des épithéliums entraîne une rupture de la PM. Ce phénomène réduit les performances d'hydratation et de lubrification. Enfin, nos résultats corroborent ceux obtenus dans le Chapitre 4, indiquant que la présence de MUC1 atténue l'effet des tanins (ici l'EgCG) sur la lubrification. Le mécanisme de clivage du domaine SEA ainsi que l'environnement protecteur créé par les domaines VNTR hautement glycosylés, limitent l'agrégation des tanins à la surface des épithéliums. Il est à noter que nous obtenons des résultats similaires à ceux des essais précédents, ce qui confirme à la fois les résultats des chapitres précédents (3, 4 et 5) et la viabilité de notre *modèle soft*.

La confirmation et la cohérence de nos résultats avec la littérature et nos études précédentes (chapitre 3, 4 et 5) sur ces *modèles softs* permettent de confirmer qu'ils sont efficaces pour l'étude de la tribologie orale *in vitro*. Dans ce chapitre, nous validons le *modèle soft* afin de le positionner comme une véritable nouvelle alternative pour l'étude des processus oraux. De nouveaux horizons novateurs peuvent être envisagés dans de nombreux domaines scientifiques. La corrélation entre la perception sensorielle (comme l'astringence ou la douceur) et le coefficient de frottement devient de plus en plus crédible. La recherche en agroalimentaire regorge de défis et de possibilités avec ce *modèle soft*. De même, l'étude de pathologies touchant la lubrification comme la xérostomie, reste un sujet très préoccupant dans la littérature scientifique [354] et peut être exploré avec cette nouvelle méthode. Ce chapitre ouvre ainsi de nouveaux angles intéressants et présente un protocole novateur pour l'étude de la lubrification orale. À partir de notre protocole et des matériaux utilisés, nous sommes en mesure d'aborder de manière innovante de nouvelles problématiques, se rapprochant davantage du comportement *in vivo* de la muqueuse orale.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES ET PERSPECTIVES

La cavité buccale est recouverte par la pellicule mucoale (PM), ancrée à la surface de la muqueuse orale, qui assure la lubrification des tissus. Les travaux de recherche sur ce film lubrifiant se sont multipliés ces dernières années [25, 46, 48, 52, 59, 60, 282, 309]. L'intérêt croissant pour cette structure réside dans ses fonctions biologiques spécifiques de lubrification et d'hydratation des épithéliums oraux. En effet, la PM joue un rôle crucial dans la protection des tissus oraux contre les contraintes mécaniques et les agressions extérieures, ainsi que dans le processus de prise alimentaire. Ses propriétés viscoélastiques lui confèrent un rôle particulier dans la lubrification des surfaces orales. Une perturbation de ce film salivaire entraîne une diminution de son pouvoir lubrifiant, pouvant être associée à une sensation de sécheresse buccale. Cette sécheresse peut réduire l'appétit et entraîner des conséquences telles que la perte de poids, l'exclusion sociale, voire la dépression [355]. Les altérations des propriétés lubrifiantes de la PM peuvent être pathologiques [260]. Elles peuvent aussi être liées à des perceptions sensorielles comme l'astringence.

L'astringence est une perception sensorielle encore mal comprise aujourd'hui. Les aliments riches en tanins sont à l'origine de cette sensation désagréable de sécheresse buccale, pouvant réduire la prise alimentaire. L'étude de cette sensation revêt un intérêt social, économique et écologique significatif. En effet, le XXI^e siècle connaît et connaîtra une explosion démographique qui modifiera les modes de consommation. D'un point de vue social, il est impératif d'augmenter l'accès à une alimentation équilibrée pour toute la population. Or, l'alimentation actuelle, riche en protéines animales issues d'élevages intensifs, pose de réels problèmes écologiques et de santé publique. Nous observons aujourd'hui une augmentation des pathologies telles que le diabète, les cancers et les maladies cardiovasculaires, conséquences de nos régimes alimentaires actuels. Il est donc nécessaire de trouver des sources alternatives de protéines, en diversifiant leurs sources. Les protéines végétales représentent de bonnes options de substitution, mais ces produits sont souvent associés à la sensation d'astringence due à leur teneur élevée en tanins. Cette sensation freine considérablement l'acceptabilité et la consommation de ces produits par les consommateurs. Pourtant les tanins, appartenant à la famille des polyphénols, possèdent des vertus bénéfiques pour la santé, comme des effets antioxydants. Toutefois, en raison de leurs effets astringents, les consommateurs rejettent ce type de produits. Il est donc crucial de comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans la sensation d'astringence. L'idée est d'apporter des connaissances fondamentales pour le développement de nouveaux produits alimentaires ou pharmaceutiques alliant les bénéfices des tanins et la réduction de leurs inconvénients. Ces objectifs répondent aux enjeux majeurs de l'alimentation du XXI^e siècle.

Un des éléments clés de la lubrification des tissus oraux est la protéine transmem-

branaire MUC1 [34]. Des découvertes récentes suggèrent que MUC1 interagit avec les mucines salivaires telles que MUC5B pour former la PM [63]. MUC1 fournit des points d'ancrage pour les protéines salivaires, permettant ainsi la formation de la PM à la surface de la muqueuse orale [25, 68, 282, 309]. Cependant, la consommation d'aliments d'origine végétale, riches en tanins, diminue le pouvoir lubrifiant de la PM en raison de la présence de ces composés astringents [70]. L'agrégation des composants astringents avec les mucines salivaires et transmembranaires provoque la dissociation des mucines MUC1. Ces dissociations entraînent la perte de l'ancrage et la rupture de la PM à la surface de la cavité buccale, ce qui réduit la lubrification [34, 52]. Cette perte de lubrification engendre la sensation d'astringence, pouvant se manifester par une augmentation des forces de friction perçues par les mécanorécepteurs oraux. Ainsi nous pouvons attribuer à la PM à la fois le rôle de lubrification de tissus oraux, ainsi que la participation active dans la perception sensorielle.

L'objectif de cette thèse est de développer une méthodologie capable de caractériser les mécanismes moléculaires de la lubrification orale selon deux axes : la formation de la PM et les mécanismes physiques à l'origine de la perception de l'astringence. Pour répondre à ces problématiques, nous avons développé des modèles de muqueuse orale *in vitro*. Ces modèles sont constitués de deux couches : une monocouche cellulaire de cellules épithéliales orales TR146 exprimant quatre isoformes de MUC1, et un substrat (lame de verre ou hydrogel) sur lequel ces cellules sontensemencées. Ces nouveaux modèles se distinguent par leur similitude avec l'épithélium oral *in vivo*. Contrairement aux matériaux synthétiques et inertes qui sont couramment utilisés [162, 170, 201, 217], et qui ne représentent pas fidèlement la muqueuse orale. En effet, les matériaux traditionnels sont dépourvus des protéines transmembranaires essentielles à la formation de la PM et à ses propriétés biologiques.

Nos modèles ont été recouverts de salive pour reconstruire la PM par ancrage spontané des protéines salivaires sur l'épithélium oral *in vitro*, en interaction avec les protéines MUC1. De plus, l'exposition à diverses molécules, modifiant la lubrification, telles que les tanins ou les protéines végétales nous a permis d'étudier de nombreux mécanismes moléculaires en fonction de l'isoforme de MUC1. Ces protocoles nous ont permis d'étudier les mécanismes impliqués dans la formation de la PM et de mieux comprendre l'impact des tanins sur la muqueuse orale et la perception de l'astringence. Pour analyser ces mécanismes moléculaires induisant des perceptions macroscopiques. Nous avons développé un bio-tribomètre (voir chapitre 2 section II.1) capable de réaliser des essais de frottement et d'indentation à une échelle micrométrique. Ces essais fournissent des indicateurs mécaniques de l'état de lubrification des modèles de muqueuse orale dans diverses conditions. Cela nous permet d'analyser le rôle de MUC1 ou d'étudier l'effet néfaste des composés astringents sur la lubrification (voir Chapitre 2). La caractérisation mécanique de ces essais, couplée à la caractérisation des dégâts et de la topographie de surface des échantillons *pre* et *post mortem*, confirme les divers mécanismes et les hypothèses moléculaires proposés dans la littérature en utilisant des paramètres physiques macroscopiques.

Notre première étude (Chapitre 3) a porté sur le rôle essentiel de la protéine MUC1 et

de ses structures spécifiques (domaine VNTR et domaine SEA) dans les propriétés de lubrification de l'épithélium intrinsèque et de la PM. Nous avons reconstruit une PM sur les quatre lignées cellulaires. Chaque lignée exprime une isoforme différente de MUC1. Sur ces modèles nous avons réalisé des essais de frottement pour suivre l'évolution de la lubrification selon les isoformes. Les résultats, présentés dans le Chapitre 3, montrent que MUC1 joue un rôle crucial dans la formation de la PM, améliorant la lubrification grâce à une meilleure rétention des protéines salivaires à la surface cellulaire [25, 282, 309]. Le domaine VNTR de MUC1 améliore également ses propriétés lubrifiantes et agit en synergie avec les protéines salivaires. Tandis que le mécanisme d'auto-clivage du domaine SEA semble dissiper efficacement l'énergie résultant du stress mécanique, augmentant ainsi l'efficacité globale de la lubrification [87]. Enfin, la lubrification intrinsèque des épithéliums semble également être influencée et en partie dirigée par la protéine MUC1.

La seconde étude, portée par le chapitre 4, a exploré les mécanismes moléculaires de l'astringence et ses effets sur la lubrification. Nous avons exposé nos quatre modèles cellulaires à des composés astringents pour étudier leur impact sur la lubrification. L'expression de MUC1 a permis d'analyser son rôle dans les mécanismes physiques liés à l'astringence. Les résultats confirment que les tanins diminuent le pouvoir lubrifiant de la PM causé par leurs agrégations en surface cellulaire et le détachement de la PM des épithéliums. Cependant, MUC1, notamment par le clivage du domaine SEA et la libération du domaine VNTR, semble protéger partiellement la lubrification épithéliale après exposition aux tanins [3, 87]. Le domaine VNTR contribue également à cette protection en empêchant les tanins d'atteindre la surface épithéliale, en créant une barrière physique avec un fort encombrement.

Le rôle actif des PRP (protéines riches en proline) dans la création d'un autre mécanisme de protection a été analysé dans cette étude. Les résultats montrent que la présence de ces protéines avant l'exposition aux tanins limite leurs effets néfastes, améliorant la lubrification et réduisant la formation d'agrégats. Ces résultats mettent en évidence le pouvoir protecteur des PRP et ouvrent des perspectives pour l'étude d'autres protéines impliquées dans la lubrification des épithéliums. Enfin, nous avons mené une analyse comparative sur une seule isoforme (MUC1/VNTR) pour étudier l'effet de deux protéines végétales et d'une protéine animale sur la lubrification des surfaces cellulaires. Les résultats montrent que les protéines animales ont un impact moindre sur la lubrification que les protéines végétales, ce qui est cohérent avec leur non-astringence. La cohérence entre nos paramètres physiques et des caractéristiques sensorielles connues ouvrent des perspectives intéressantes pour le développement d'aliments réduisant l'astringence. Cela inclut également l'étude d'autres sensations en bouche, telles que la sensation de gras.

L'intérêt principal de l'utilisation de la tribologie dans l'analyse des produits alimentaires réside dans la recherche de corrélations entre des paramètres physiques et des paramètres sensoriels. Ces corrélations constituent précisément l'objectif de notre troisième étude (présentée dans le chapitre 5). Nous avons réalisé des mesures tribologiques sur l'une des isoformes de MUC1 (MUC1/VNTR, qui se rapproche le plus de

la forme physiologique de MUC1), avec une PM reconstruite à partir de six groupes de salives différents. Ces groupes sont classés en fonction de leur sensibilité à l'astringence procurée par l'acide tannique. Le comportement tribologique de chaque groupe de sensibilité est évalué à l'aide de tests tribologiques dans deux conditions : avec reconstruction de la PM seule et avec reconstruction de la PM associée à des tanins. Nos résultats ont permis de valider et de classer les groupes dans les catégories initialement proposées en fonction de leur sensibilité à l'acide tannique. Cette classification s'est basée sur les variations du coefficient de frottement et de l'énergie dissipée. Les changements les plus marqués entre les deux conditions sont observés chez les groupes présentant une sensibilité élevée. Ces résultats suggèrent que la perception de l'acide tannique chez les personnes très sensibles est liée à une augmentation plus importante des forces de friction par rapport aux personnes moins sensibles. Cette corrélation propose des perspectives pour l'industrie agroalimentaire et pharmaceutique, en offrant une alternative quantitative aux tests sensoriels coûteux et chronophages. Elle fournit aux industriels et aux chercheurs des paramètres quantitatifs pour évaluer initialement la perception des produits alimentaires ou pharmaceutiques.

Tous ces travaux ont été menés sur un modèle de muqueuse orale composé d'une monocouche cellulaire et d'un substrat en lame de verre (*modèle hard*), partiellement similaire au comportement mécanique de la muqueuse orale. Pour cette raison, notre dernière étude, exposée dans le chapitre 6, vise à améliorer ce modèle en combinant les monocouches cellulaires avec un hydrogel mou. L'objectif de cette étude est de simuler plus fidèlement les tissus oraux en optimisant la physico-chimie de surface et la rigidité. Ces *modèles soft* ont validé les principaux résultats des études précédentes, notamment le rôle de MUC1 dans la lubrification et l'effet des composés astringents sur celle-ci. Ils ont également souligné l'effet protecteur de MUC1 contre les tanins (en particulier l'EgCG) sur la lubrification. Ainsi, ces résultats certifient la viabilité de ces *modèles softs*. Cette étude vise à les promouvoir comme une alternative précieuse pour l'étude des processus oraux. Cela ouvre ainsi une nouvelle vision pour la tribologie orale en utilisant un nouveau matériau très similaire à la muqueuse orale *in vivo*. De nouvelles perspectives stimulantes émergent dans plusieurs domaines scientifiques. La corrélation entre la perception sensorielle, comme l'astringence ou la douceur, et le coefficient de frottement se renforce de manière significative. Ainsi, la recherche en agroalimentaire est pleine de défis et d'opportunités grâce à ce *modèle soft* de muqueuse orale. Par ailleurs, l'étude des pathologies affectant la lubrification, telles que la xérostomie, reste un sujet de grande préoccupation dans la littérature scientifique [354] et pourrait être approfondie à l'aide de cette nouvelle méthode. Ces travaux de thèse ouvrent de nouveaux horizons et proposent un protocole novateur pour l'étude de la lubrification orale. Notre protocole ainsi que les matériaux utilisés, permettent d'aborder de manière innovante des problématiques pluridisciplinaires, en se rapprochant davantage du comportement *in vivo* de la muqueuse orale.

Questionnements et Perspectives

Malgré la pertinence des résultats de nos travaux, ils présentent des limites offrant des pistes pour des recherches futures. Tout d'abord, nos modèles cellulaires utilisent la lignée cellulaire TR146, issue de cellules cancéreuses humaines présentant un phénotype différent des cellules épithéliales orales *in vivo*. De plus, la culture de ces cellules ne permet d'obtenir qu'une fine couche de faible épaisseur, loin des multicouches observées *in vivo* chez l'homme [356]. Sur le plan technique, tous nos essais ont été menés dans des conditions de température (21-23°C) et d'hygrométrie (30-40%) contrôlées dans une salle dédiée. Il serait nécessaire de réaliser ces travaux à des paramètres environnementaux proches des conditions *in vivo* dans la cavité buccale (33.2–38.2 °C et < 75%) [357, 358] pour obtenir des résultats encore plus proches du comportement *in vivo*. Ainsi, il convient de modifier le dispositif pour intégrer des modules capables de gérer la température et l'hygrométrie.

En ce qui concerne les protocoles expérimentaux, tous les tanins testés sont des tanins "purs", dont la molécule a été isolée. Bien que nos résultats aient validé leurs effets néfastes, il serait intéressant de travailler avec de vrais aliments complets considérés comme astringents. Par exemple, des études ont testé l'effet du vin lors de tests tribologiques [264]. Notre méthodologie apporterait une analyse des interactions entre des aliments complets avec une distribution et une structure spatiale des protéines salivaires et transmembranaires proche de la réalité.

Les isoformes de MUC1 utilisées dans ces travaux présentent des structures distinctes. Deux d'entre elles possèdent un domaine VNTR comprenant 20 répétitions. Au sein de la population européenne, il existe une grande variabilité interindividuelle quant au nombre de ces répétitions. En effet, 20 correspond à une valeur basse observée en Europe du Nord. Il serait donc particulièrement pertinent de réaliser nos essais sur des isoformes possédant un nombre de répétitions supérieur afin d'évaluer son impact sur les propriétés de lubrification et d'hydratation. De telles mesures permettraient de valider l'importance de ce domaine VNTR et de ses paramètres dans des propriétés physiologiques notables.

Comme mentionné dans la conclusion du chapitre 4, la gélatine utilisée dans cette étude n'a pas été soumise à la chaleur et les essais ont été réalisés à température ambiante. Ainsi, il serait judicieux, à l'avenir, de chauffer la gélatine préalablement aux essais ou de les effectuer à température buccale afin de reproduire la rhéologie réelle de la gélatine telle qu'elle est consommée. Cela nous permettrait d'obtenir sa forme gélifiée et de mieux nous approcher des conditions réelles pour comparer les résultats avec des aliments considérés comme astringents.

Il serait pertinent de poursuivre les analyses par spectroscopie Raman sur nos modèles dans des conditions expérimentales variées. À ce jour, seules les signatures moléculaires des isoformes Non-MUC1 et MUC1/VNTR ont été étudiées. Il serait donc intéressant d'étudier les spectres Raman des autres isoformes afin d'examiner l'impact de la structure de MUC1 sur les signatures chimiques des modèles d'épithélium. Ces ana-

lyses pourraient comparer les profils moléculaires des surfaces, en présence de la PM reconstruite, ainsi qu'en présence de tanins.

De plus, nous n'avons pas pu explorer l'effet des PRP sur les profils chimiques par spectroscopie Raman. Nous pensons que les spectres Raman seraient également modifiés en raison de la présence de ces protéines. L'objectif serait donc de renforcer l'analyse couplée entre les essais tribologiques et les analyses chimiques pour tenter de trouver de nouvelles corrélations entre l'évolution des paramètres physiques et moléculaires. Ces corrélations fourniraient des explications supplémentaires sur l'évolution du comportement mécanique, comme nous l'avons réalisé pour certaines conditions (voir Chapitre 3-4).

Pour terminer et pour aller plus loin, les expérimentations sur nos modèles de muqueuse orale soulèvent plusieurs problématiques. D'un point de vue technique, la mise en place d'un protocole de culture cellulaire de routine engendre de nombreuses contraintes, notamment la nécessité de disposer d'une pièce stérile. Ces exigences de stérilité posent des risques de contamination, pouvant entraîner des retards ou des résultats inattendus. De plus, il est indispensable de disposer d'un personnel formé, capable de cultiver les cellules. Malgré ces défis, nos modèles permettent de simuler de manière optimale la lubrification orale, avec la présence de protéines transmembranaires et des paramètres physico-chimiques proches de ceux de la muqueuse orale *in vivo*. L'emploi de ce type de modèle représente dès lors une option particulièrement attrayante pour les industriels confrontés à ce genre de problématique. Par conséquent, les services de Recherche et Développement devront allouer les ressources nécessaires à l'instauration de routines permettant l'utilisation quotidienne de nos modèles afin de simuler au mieux les mécanismes complexes de la lubrification orale. Une étude approfondie, analysant les avantages et les inconvénients permettrait aux industriels d'adapter leur choix de modèles selon leur besoin.

Pour aller plus loin...

Durant cette thèse, notre dispositif a été employé pour plusieurs études transversales visant à caractériser d'autres tissus biologiques, notamment des peaux reconstruites. J'ai eu la chance et l'opportunité de réaliser les mesures et d'analyser les résultats dans deux études complémentaires utilisant l'indentation avec notre dispositif mécanique.

Les peaux reconstruites

La première étude entre dans le cadre des travaux de thèse de QIAO Na [359], au cours de laquelle le dispositif a été utilisé pour analyser les propriétés mécaniques de peaux reconstruites provenant d'Episkin (*T-SkinTM / Reconstructed Human Full Thickness Skin Model, France*). L'utilisation du biotribomètre a permis de distinguer deux peaux avec des maturations différentes (une peau qualifiée de jeune et une autre d'âgée). En effet, une peau plus jeune se caractérise par une rigidité de contact plus importante [360].

Conditions des tests

Les essais ont été réalisés dans une pièce maintenue à une température et une humidité contrôlées (22-24 °C et 30-40 %). Chaque test a été répété quatre fois pour chacun des deux échantillons. En ce qui concerne les paramètres des essais, un enfoncement normal de 100 μm a été appliqué à une vitesse de 5 $\mu\text{m/s}$. Ces paramètres ont été choisis afin de limiter l'enfoncement à moins de 10% de l'épaisseur de l'échantillon de peau, afin de minimiser les effets du substrat.

Résultats et analyses

Les résultats présentés dans la figure 6.12 et le tableau 6.7 démontrent que nous avons été capables de discriminer deux types de peaux artificielles : une jeune et une âgée, connues pour leur comportement mécanique différent, la peau âgée étant moins rigide que la peau jeune [360]. Cette différence observée est statistiquement significative ($p < 0.05$). La contribution à cette étude met en évidence la possibilité d'étudier des matériaux biologiques différents en utilisant notre dispositif.

TABLEAU 6.7 – Modules élastiques réduits E^* pour les deux types de peau testés [359]

Échantillons	Modules élastiques réduits E^* [kPa]
Peau Jeune	84,2 \pm 2,9
Peau Agée	56,6 \pm 7,7

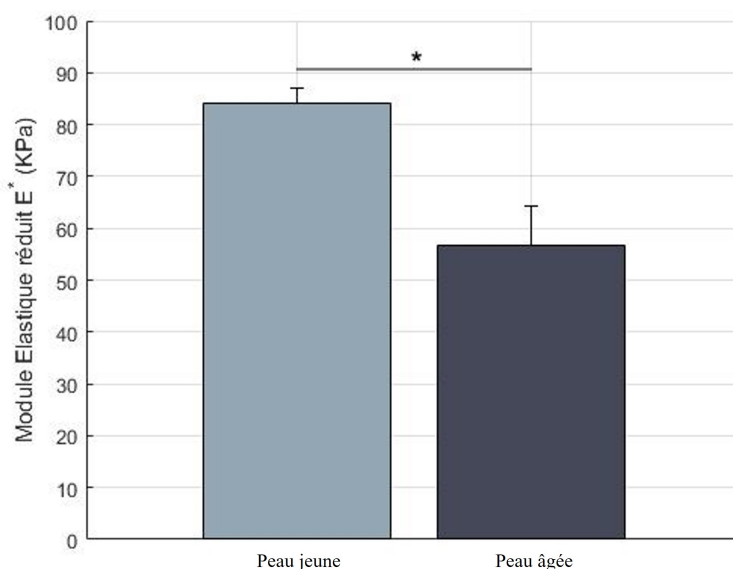


FIGURE 6.12 – Modules élastiques réduits pour les deux types de peau testés

Des cristallins *ex vivo*

Cette seconde étude s'est concentrée sur l'analyse des propriétés mécaniques du cristallin de porc *ex vivo*, réalisée en collaboration avec le laboratoire Biologie, Ingénierie et Imagerie pour l'Ophtalmologie (BiiO) de l'Université Jean Monnet de Saint-Étienne. Notre dispositif nous a permis de conduire des essais d'indentation et de relaxation sur les cristallins, afin de caractériser leurs paramètres viscoélastiques. Les objectifs visaient à quantifier l'effet de la conservation des cristallins, en évaluant l'influence de différents milieux de conservation, notamment le PBS et le PFA, sur leurs propriétés mécaniques par rapport à un cristallin frais et un cristallin déshydraté. L'objectif final étant de tester les modifications mécaniques du cristallin causées par des traitements anti presbytie (assouplissant le cristallin).

Conditions des tests

Les essais ont été réalisés dans une pièce maintenue à une température contrôlée de 22-24 °C et une humidité relative de 30-40%. Les cristallins de porc jeune ont été testés sous quatre conditions expérimentales : des cristallins frais, des cristallins conservés dans du PFA pendant 20 heures à 4°C, des cristallins conservés dans du PBS pendant 20 heures à 4°C et des cristallins déshydratés. Concernant les paramètres d'indentation, une force normale de 3 *mN* a été appliquée sur les cristallins dans chaque condition à l'aide d'une bille en acier de 0,5 *mm* de rayon, à une vitesse de 5 $\mu\text{m/s}$. Nous calculons le module élastique réduit E^* pour caractériser l'élasticité du cristallin dans les quatre conditions expérimentales

Résultats et analyses

TABLEAU 6.8 – Modules élastiques réduits E^* sur des cristallins de porc *ex vivo* pour 3 conditions de conservation

Conditions de conservation	Modules élastiques réduits E^* [<i>kPa</i>]
Frais	14,7 ± 0,4
Déshydratés	36,4 ± 4,2
PBS	35,5 ± 0,4
PFA 0,8%	417

Le tableau 6.8 illustre clairement l'impact des conditions de conservation sur les propriétés mécaniques du cristallin. Un cristallin frais se révèle nettement plus souple qu'un échantillon conservé dans du PBS ou du PFA. Le PBS et le PFA pénètrent dans le cristallin, le remplissant de liquide, ce qui empêche les fibres de se déformer et d'exercer leur rôle élastique. De plus, la rigidité extrême observée dans le cristallin traité au PFA (417 *kPa*) est due à la fixation des protéines entre elles, modifiant leur conformation et limitant leurs déplacements. Enfin, le module des cristallins déshydratés est nettement supérieur au frais, ce qui confirme la nécessité de le conserver dans un milieu adéquat. Ces résultats soulignent l'importance cruciale du choix des conditions de conservation

pour une étude visant à caractériser les paramètres du comportement des cristallins. Nos essais, réalisés avec le dispositif, ont produit des résultats très répétables, ouvrant ainsi des perspectives intéressantes pour l'analyse de traitement du cristallin notamment le traitement anti presbytie.

Liste des figures

1	Organigramme du manuscrit	3
1.1	Représentation de la cavité orale, vue antérieure d'après l'ouvrage de G.J Tortora et B.Derrickson [11]	7
1.2	Schéma de coupes histologiques des muqueuses orales - (Droite) : Muqueuse masticatoire (Gauche) : Muqueuse de recouvrement. [16]	9
1.3	Description histologique de l'épithélium oral.(a) Kératinisé (b) Non kératinisé - Mise en évidence des différences structurales entre les épithéliums - Issue de [13]	10
1.4	Images des microplacae et de MUC1 à la surface des cellules épithéliales de la muqueuse orale	11
1.5	Constituants de la salive [32]	14
1.6	Schéma représentant la structure de la pellicule mucosale ancrée à la surface de la muqueuse orale [7]	15
1.7	Représentation schématique de la structure et de la composition de la pellicule mucosale [8]	16
1.8	Représentation des mécanismes de formation de la pellicule mucosale, impliquant les composants principaux : MUC1, MUC5B, IgA et MUC7. Schéma adapté de [63]	17
1.9	Courbe de Stribeck présentant les 3 régimes tribologiques : d'interface, mixte et hydrodynamique [71]	18
1.10	Représentation de la localisation de l'expression des mucines sécrétées et transmembranaires chez l'humain adulte - Adapté et inspiré de [7, 74]	19
1.11	Représentation des structures protéiques des différentes mucines transmembranaires : MUC1, MUC3, MUC4, MUC12, MUC13, MUC16, MUC17 - D'après [79] et inspiré de [7].	20
1.12	Schéma représentant la structure de la protéine MUC1 - D'après [73]	21
1.13	Représentation de la structure protéique de MUC5B - Les 3 régions sont représentées : N et C-terminale et la région centrale - La région centrale présente plusieurs domaines VNTR (région S/T/P) richement glycosylés - Schéma adapté de Demouveau et al. [92]	22

1.14 Exemple d'essai tribologique sur des solutions de mucines MUC5B intactes et modifiées (modifications dans leur schéma de glycosylation) montrant l'impact favorable de MUC5B et de sa structure non modifiée dans la lubrification - D'après [76]	23
1.15 Représentation de la structure protéique de MUC7 - Les 4 régions sont représentées - Schéma adapté de Rose et Voynow [103]	24
1.16 Classification des différentes familles structurales des tanins - Inspiré de Nivet et al. et Ployon et al. [7, 8]	25
1.17 Sources courantes de protéines d'origine végétale - D'après [149]	27
1.18 Représentation schématique des interactions entre tanins et protéines salivaires à l'origine des mécanismes moléculaires d'astringence Hypothèse 1 : (1) Formation des complexes PRP/Tanins. (2) Agrégation des complexes. (3) Précipitation des complexes à la surface de l'épithélium oral. Hypothèse 2 : (4) Formation d'agrégation directe entre les tanins et les protéines salivaires secrétées. Adapté de Nivet et al. [7]	30
1.19 Représentation schématique des mécanismes moléculaires de l'astringence, mettant en jeu MUC1 - Ce schéma représente l'hypothèse alternative qui est vérifiée dans ce travail de thèse	32
1.20 Représentation de deux conformations de PRP - Adapté de [186]	32
1.21 Schéma représentant le mouvement oral simplifié entre la langue et le palais, avec les forces de friction, la force normale et la vitesse du mouvement - Reproduit et basé sur un travail de Laguna et al [168]	35
1.22 Illustration schématique des caractéristiques physico-chimiques de la langue, mettant en avant divers aspects tels que sa rugosité élevée, ses propriétés de mouillabilité, et la présence de la pellicule mucoale composée de mucines [212].	36
1.23 Effet de la charge normale sur le coefficient de frottement	38
1.24 Exemple de tribomètre utilisé dans la littérature pour étudier la tribologie orale <i>in vitro</i> - (a) Tribomètre basé sur un rhéomètre de Heyer et al. [275] - (b) Tribomètre optique couplant tribomètre et un dispositif d'imagerie dispositif de Dresselhuis et al. [202] - (c) "Friction analyzer" de Prinz et de Wijk [271] - (d) Dispositif MTM (PCS Instrument,UK) le schéma ici est de Bongaert et al., [203]	42
2.1 Représentations schématiques des 4 isoformes de MUC1 étudiées dans ce travail - Non-MUC1 n'exprime pas la protéine MUC1 - MUC1/Y-LSP exprime une forme tronquée de MUC1 plus courte - MUC1/VNTR exprime une forme de MUC1 avec le domaine VNTR et le domaine SEA clivable - MUC1/VNTR-NC exprime MUC1 avec le domaine VNTR sans le domaine SEA	50

2.2	Co-immunomarquage de la membrane cellulaire (en rouge) et de MUC1 (en bleu) observé par microscopie confocale sur les quatre lignées cellulaires - Les régions de colocalisation apparaissent en magenta, indiquant la présence de MUC1 sur la membrane cellulaire, comme souligné par les flèches blanches - Figures et résultats adaptés des travaux de Nivet et al. [282]	52
2.3	Milieus de culture utilisés pour cultiver les quatre isoformes de MUC1 - Illustration réalisée avec BioRender	54
2.4	Représentation schématique du protocole de routine de culture cellulaire	55
2.5	Illustrations topographiques des cellules Non-MUC1 après friction sur des lames de verre : à gauche sans Poly-D-Lysine, à droite avec Poly-D-Lysine - Images acquises par interférométrie à lumière blanche	56
2.6	Vue latérale du dispositif développé et utilisé dans ces travaux de thèse, montrant tous les composants détaillés du tribomètre	59
2.7	Représentation schématique du déroulement d'un test d'indentation	60
2.8	Représentation schématique du déroulement d'un test de frottement	61
2.9	Schéma illustrant la chaîne d'acquisition et de pilotage du système de mesure - L'astérisque apposé sur les blocs "Contrôleur piézo E-501 PI *" indique qu'il s'agit des mêmes composants, dupliqués dans le schéma pour des raisons de clarté	62
2.10	Courbe d'indentation caractéristique d'un matériau visco-élastique	63
2.11	Paramètres géométriques d'un essai d'indentation avec un indenteur sphérique - $F_N [N]$ est l'effort normal engendré par l'enfoncement de l'indenteur sur l'échantillon - $R [m]$ est le rayon de la bille - $a [m]$ est le rayon de contact de l'indenteur sur l'échantillon engendré par l'enfoncement - $\delta [m]$ est l'enfoncement de l'indenteur dans l'échantillon	65
2.12	Courbe d'indentation caractéristique d'un matériau visco-élastique avec adhésion	66
2.13	Courbes d'indentation caractéristiques d'un matériau visco-élastique immergé ou dans l'air quand l'adhésion est liée à de la capillarité - D'après Khon et Ebenstein [300]	66
2.14	Distribution de la pression de contact en fonction du modèle utilisé : JKR ou Hertz - D'après [302]	68
2.15	Exemple des courbes expérimentales mesurées et utilisées dans l'analyse des essais tribologiques - a. Effort normal b. Effort tangentiel c. Déplacement normal d. Déplacement tangentiel	71
2.16	Représentation schématique (a) d'un essai tribologique (b) des forces de frottement mesurées avec le tribomètre pendant l'essai - Les zones de glissement, représentées par les régions grises et rouge, sont utilisées pour calculer le coefficient de frottement	72
2.17	Cycle de fretting en glissement totale avec l'énergie dissipée par frottement E_d	73
2.18	Modules élastiques réduits pour les 5 silicones testés	75
2.19	Évolution du coefficient de frottement en fonction du temps pour les deux conditions de lubrification - Sec sans lubrifiant et avec une salive artificielle	76

2.20 Évolutions de la consigne F_N durant les essais tribologiques pour les 3 conditions tests	77
2.21 Principe de fonctionnement de l'interférométrie - Illustration adapté de [308]	79
2.22 (a) Image brute représentant une trace de friction obtenue sur un modèle d'épithélium oral (isoforme MUC1/Y-LSP) à l'aide de l'interférométrie optique - (b) Cette même image, une fois filtrée et soumise à un seuillage - (c) Image de la trace de friction après avoir été convertie en une image binaire noir et blanc avec un processus de binarisation et de seuillage - (d) Calcul de la superficie des pixels noirs sur cette image, qui correspondent aux zones dégradées - Issu de notre travail publié [309]	80
2.23 Formation d'une famille d'ondelettes à partir de l'ondelette mère - Illustration tirée de [311]	82
2.24 Représentation de l'ondelette chapeau mexicain en 3D, utilisée dans le cadre de notre travail pour caractériser la topographie de surface des épithéliums [313]	83
2.25 Les trois étapes de la décomposition en ondelettes d'un modèle d'épithélium oral : de la surface initiale jusqu'au cube de reconstruction	84
2.26 Décomposition en ondelettes d'une surface pour une analyse multi-échelles [311]	85
2.27 Les différentes étapes de pré-traitement d'un spectre Raman sur MUC1/VNTR - Spectre brut, (1) Élimination des rayons cosmiques, (2) Correction de la ligne de base, (3) Lissage et (4) Normalisation	89
2.28 Exemple de procédure ACP suivie de ACP-LDA dans le cadre d'une étude visant à différencier des cellules saines et infectées - (a) présente les résultats d'une ACP avec la représentation graphique des spectres dans la base des composantes principales - (b) montre les résultats de la procédure LDA sur les résultats de l'ACP dans la base des vecteurs propres de la LDA et (c) présente les spectres moyens pour les trois échantillons - Étude de Kongklad et al [323]	91
3.1 Schéma du plan d'expérience de cette étude - Isoformes testées et conditions expérimentales - "Brute" correspond à un état sans ajout de PM, et "PM" correspond à un essai avec une pellicule mucosale reconstruite	96
3.2 Schéma du contact pendant le test tribologique entre la bille et un modèle d'épithélium - Avec F_n la force normale et F_t la force tangentielle	98
3.3 (a) Coefficient de friction et (b) Énergie dissipée sur les quatre isoformes de MUC1 sans reconstruction de la PM	101
3.4 ACP sur les spectres Raman des deux isoformes Non-MUC1 et MUC1/VNTR sans PM	103
3.5 (a) Coefficient de frottement, (b) Énergie dissipée et (c) Surface endommagée par frottement obtenus après la formation de la PM sur les modèles d'épithélium oral pour chaque isoforme de MUC1	105
3.6 Images des surfaces épithéliales après frottement pour chaque isoforme de MUC1 - Les images ont une dimension de $1 \times 1 \text{ mm}^2$	106

3.7	(a) Immunomarquage de MUC5B sur les surfaces des cellules TR146 et TR146-MUC1 (b) Semi-quantification de l'immunomarquage via une analyse d'image - Les barres d'échelle représentent 100 μm - Figure issue des travaux de Nivet et al. [282]	107
3.8	Résultat de l'ACP des spectres des deux isoformes : Non-MUC1 et MUC1/VNTR dans le cas de la PM reconstruite	108
3.9	Coefficient de frottement (a), Énergie dissipée par frottement (b) et Surface endommagée (c) entre les isoformes n'exprimant pas de domaine VNTR (MUC1/Y-LSP) et les isoformes exprimant ce domaine biologique (MUC1/VNTR et MUC1/VNTR-NC)	109
3.10	Analyse comparative du coefficient de frottement (a), de l'énergie dissipée par frottement (b) et de la surface endommagée (c) entre les isoformes avec un domaine SEA clivable (MUC1/VNTR) et les isoformes avec un domaine SEA non-clivable (MUC1/VNTR-NC)	112
3.11	Variation du (a) coefficient de frottement et de (b) l'énergie dissipée par frottement avec et sans reconstruction de la PM	115
3.12	ACP sur les spectres Raman des deux isoformes (a) Non-MUC1 et (b) MUC1/VNTR entre les conditions expérimentales : Brute (sans reconstruction de la PM) et PM (avec reconstruction de la PM)	117
3.13	Schéma de synthèse des conclusions obtenues dans le chapitre 3 du manuscrit	119
4.1	Schéma du plan d'expérience du chapitre 4, illustrant les éléments étudiés et caractérisés - L'effet des tanins et des protéines d'origine végétale ainsi que l'impact des PRP sur la lubrification des épithéliums	124
4.2	Formules chimiques de (a) l'EgCG et de (b) l'acide tannique	126
4.3	Schéma représentant les étapes avant le calcul de l'indice de tension IC - Chaque IC _x est calculé à partir de la décomposition par ondelettes continues afin d'étudier la tension mécanique de l'épithélium oral <i>in vitro</i> à des échelles fines	132
4.4	(a) Coefficient de frottement (b) Énergie dissipée et (c) Surface endommagée <i>post mortem</i> sans et avec exposition à une solution d'EgCG pour les quatre isoformes de MUC1	133
4.5	Images des surfaces épithéliales <i>post mortem</i> pour chaque isoforme de MUC1 : Non-MUC1, MUC1/Y-LSP, MUC1/VNTR et MUC1/VNTR-NC	135
4.6	Images des surfaces épithéliales de la lignée MUC1/VNTR avant frottement avec et sans EgCG	136
4.7	(a) Spectres SMA moyens (b) Moyenne du SMA (c) Spectres NAD moyens et (d) Moyenne du NAD pour les deux conditions expérimentales étudiées : avec et sans exposition à l'EgCG sur l'isoforme MUC1/VNTR - Les courbes des figures a et c ont une échelle semi-logarithmique en x - Les moyennes sont calculées sur les petites longueurs d'onde (entre 10 ⁻³ et 10 ⁻²) - Le code de significativité sur les figures (b) et (d) correspondent aux différences avec la condition PM seule	137

4.8	Microscopie électronique à balayage de la PM et de son mélange avec l'EgCG - Issue de [128]	137
4.9	Résultat de l'ACP-LDA des spectres Raman des deux isoformes : Non-MUC1 et MUC1/VNTR dans les trois conditions expérimentales : Brute, PM et PM + EgCG	138
4.10	Indices de tension IC pour les deux conditions expérimentales avec et sans tanins	139
4.11	Immunomarquage des MUC5B après exposition du modèle cellulaire à de l'EgCG - Tapissage de la surface par MUC5B et taille moyenne des dépôts de MUC5B pour les trois conditions - Issu des travaux de thèse de Ployon [8]	139
4.12	Corrélation entre la concentration en EgCG et (a) le coefficient de frottement et (b) la surface endommagée post frottement	142
4.13	(a) Coefficient de frottement, (b) Énergie dissipée et (c) Surface endommagée <i>post mortem</i> après exposition à une solution d'EgCG pour les quatre isoformes de MUC1	143
4.14	Comparaison de l'effet de l'acide tannique sur la lubrification de l'isoforme MUC1/VNTR par rapport à l'EgCG sur les trois indicateurs mécaniques (a) Coefficient de frottement (b) Énergie dissipée et (c) Surface endommagée - Le code de signification statistique montre la comparaison par rapport à la condition "PM"	146
4.15	(a) Spectres SMA moyens (b) Moyenne du SMA (c) Spectres NAD moyens et (d) Moyenne du NAD pour les conditions PM (sans tanin) et après exposition aux deux tanins étudiés : EgCG et Acide tannique - Les courbes des figures a et c ont une échelle semi-logarithmique en x - Les moyennes sont calculées sur les petites longueurs d'onde (entre 10^{-3} et 10^{-2}) - Le code de significativité sur les figures (b) et (d) correspondent aux différences avec la condition PM seule	147
4.16	Courbes concentration en catechine en fonction de l'intensité d'astringence perçue - Graphique issu des travaux de Xu et al [338]	149
4.17	Étude de l'effet des protéines végétales sur le comportement tribologique de l'isoforme MUC1/VNTR et comparaison avec une protéine d'origine animale la gélatine porcine sur les trois indicateurs mécaniques : (a) Coefficient de frottement (b) Énergie dissipée et (c) Surface endommagée - Les codes de significative au-dessus des bar plot compare avec l'état initial (PM)	152
4.18	Images des épithéliums <i>post mortem</i> après l'exposition à des protéines végétales et une protéine animale comparées à la condition initiale	153
4.19	(a) Spectres SMA moyens (b) Moyenne du SMA (c) Spectres NAD moyens et (d) Moyenne du NAD pour les conditions PM seule et après exposition à des protéines végétale : FBPP et PP et le gélatine porcine - Les courbes des figures a et c ont une échelle semi-logarithmique en x - Les moyennes sont calculées sur les petites longueurs d'onde (entre 10^{-3} et 10^{-2}) - Le code de significativité sur les figures (b) et (d) correspondent aux différences avec la condition PM seule	154

4.20	Impact des PRP sur nos modèles cellulaires - (a) Coefficient de friction (b) Énergie dissipée et (c) Surface endommagée après exposition du modèle cellulaire à l'EgCG (0,5 mM et 1 mM), avec ou sans PRP (0,66 mM) - Le code de significativité au dessus des barres d'erreur explique la différence avec le test control - Le test control correspond à une condition : PM + PRP sans EgCG	159
4.21	Spectres SMA et NAD moyens pour les deux concentrations en EgCG étudiées dans les trois conditions expérimentales : Control (PM + PRP), PM + EgCG et PM + EgCG + PRP - Les figures (c) et (f) présentent les paramètres moyens sur les longueurs d'onde "moyenne" entre 10^{-3} et 10^{-2} μm - Le code de significativité sur les figures (c) et (f) au dessus des bars plot correspondent aux différences avec la condition Control (PM + PRP) . . .	160
4.22	Indices de tension pour les trois conditions expérimentales : sans EgCG, avec EgCG et EgCG + PRP	161
4.23	Effet des PRP sur (a) le tapissage de la surface cellulaire par MUC5B et (b) la taille moyenne des dépôts - Images issues des travaux de Ployon et al [8]	162
4.24	Schéma récapitulatif des résultats et conclusions obtenues dans le cadre de ces travaux de thèse sur : (i) l'effet des tanins sur la lubrification des modèles d'épithélium (ii) le rôle de MUC1 et de sa structure	165
4.25	Schéma récapitulatif des résultats et conclusions obtenues dans le cadre de ces travaux de thèse sur l'effet protecteur des PRP sur la lubrification des modèles d'épithélium en présence de tanins	166
5.1	Répartition des volontaires par seuil de meilleure estimation - Les catégories LS correspondent aux volontaires avec une faible sensibilité et HS ceux avec une grande sensibilité - Figure issue des travaux de thèse d'Alix Rollinat	173
5.2	Organisation des groupes de sensibilité à l'astringence de l'acide tannique	174
5.3	Description des 3 étapes du protocole de reconstruction de la pellicule mucoale dans cette étude	175
5.4	Représentation des 3 niveaux d'analyse proposés dans le chapitre 5, du plus grossier jusqu'à l'identification des 6 groupes de sensibilité	177
5.5	(a) Coefficient de frottement, (b) Énergie dissipée et (c) Surface endommagée entre les deux conditions expérimentales : PM seule et PM avec Acide tannique sur les 18 individus	178
5.6	(a) Coefficient de frottement (b) Énergie dissipée et (c) Surface endommagée entre les deux conditions expérimentales : PM seule et PM avec Acide tannique pour les deux catégories de sensibilité	179
5.7	(a) Coefficient de frottement et (b) Énergie dissipée entre les deux conditions expérimentales : PM seule et PM avec Acide tannique pour les 6 groupes de sensibilité	181

5.8	Variation du (a) coefficient de frottement et de (b) l'énergie dissipée entre les deux conditions expérimentales : PM seule et PM avec Acide tannique pour les 6 groupes de sensibilité et le tableau indiquant les valeurs de variation	182
6.1	Représentations schématiques des deux isoformes de MUC1 utilisés pour les nouveaux modèles de muqueuse - Non-MUC1 n'exprime pas la protéine MUC1 - MUC1/VNTR exprime une forme de MUC1 avec le domaine VNTR et le domaine SEA clivable	191
6.2	Représentation schématique du nouveau modèle de muqueuse orale composé : d'une mono-couche cellulaire épithéliales (Non-MUC1 ou MUC1/VNTR) et d'un substrat en hydrogel mou	192
6.3	Schéma de la mesure de l'angle de contact θ entre une goutte d'eau et notre hydrogel, utilisant la méthode de la tangente au point triple	195
6.4	Modules élastiques réduits mesurés sur les langues de porc et sur les hydrogels	196
6.5	Angles de contact mesurés dans deux conditions expérimentales : (a) sans revêtement (à sec) et (b) avec un film salivaire appliqué sur les hydrogels	197
6.6	Observation au microscope électronique à balayage sur les isoformes Non-MUC1 (parentale) et MUC1/VNTR montrant les microplicae en surface des isoformes - Images issues des travaux de Nivet et al. [282]	198
6.7	(a) Évolution du coefficient de frottement en fonction du nombre de cycles pour les trois conditions expérimentales testées sur les hydrogels bruts - Comparaison des coefficients de frottement moyens entre (b) les conditions sèche et avec PM (c) les conditions avec PM et avec PM + EgCG	200
6.8	Comparaison des performances de frottement entre les isoformes de MUC1 (Non-MUC1 et MUC1/VNTR) avec une PM reconstruite : (a) Coefficient moyen de frottement, (b) Variation du coefficient de frottement en fonction du nombre de cycles, (c) Énergie dissipée par frottement, et (d) Surface endommagée par frottement	202
6.9	Images des surfaces épithéliales après frottement pour les deux isoformes étudiées dans les deux conditions expérimentales PM reconstruite et PM reconstruite + EgCG sur les <i>modèles softs</i> de muqueuse orale	203
6.10	Comparaison de l'effet de l'EgCG sur la lubrification des isoformes de MUC1 (Non-MUC1 et MUC1/VNTR) : (a) Coefficient moyen de frottement, (b) Énergie dissipée par frottement, et (d) Surface endommagée par frottement pour les deux conditions expérimentales : PM reconstruite et PM reconstruite + EgCG	204
6.11	Comparaison des résultats tribologiques entre les isoformes de MUC1 (Non-MUC1 et MUC1/VNTR) en présence d'EgCG : (a) Coefficient moyen de frottement, (b) Variation du coefficient de frottement en fonction du temps, (c) Énergie dissipée par frottement, et (d) Surface endommagée par frottement	206
6.12	Modules élastiques réduits pour les deux types de peau testés	215
A.1	Protocole de comptage des cellules avec une cellule de Malassez	272

A.2 Spectres Raman moyens entre les conditions avec et sans PM sur les isoformes Non-MUC1	274
A.3 Spectres Raman moyens entre les conditions avec et sans PM sur les isoformes MUC1/VNTR	274
A.4 Comparaison spectres Raman entre les isoformes Non-MUC1 et MUC1/VNTR pour la condition sans PM	275
A.5 Comparaison spectres Raman entre les isoformes Non-MUC1 et MUC1/VNTR pour la condition avec PM	275
A.6 Images des épithéliums post mortem dans trois conditions expérimentales : avec PM seule, avec PM + EgCG et avec PM + PRP + EgCG	276

Liste des tableaux

1.1 Exemple d'effets de tanins sur l'organisme humain	26
1.2 Résumé de tous les dispositifs utilisés pour étudier la tribologie orale	39
1.3 Matériaux utilisés dans la littérature pour étudier la tribologie orale - Les "-" correspondent à des grandeurs mécaniques qui ne sont pas précisées dans la littérature	45
2.1 Présentation des quatre lignées cellulaires utilisées pour développer le modèle d'épithélium oral	51
2.2 Module élastique réduit E^* pour les deux types de peau testés	75
3.1 Paramètres expérimentaux des tests tribologiques	99
3.2 Paramètres expérimentaux des tests d'indentation	99
3.3 Paramètres utilisés pour la spectroscopie Raman sur les modèles d'épithélium	100
3.4 Coefficient de frottement et Énergie dissipée moyens mesurés sans reconstruction de la PM pour chaque isoforme (moyenne \pm écart-type)	102
3.5 Test de Mann-Whitney sur les indicateurs mécaniques pour les 4 isoformes afin de comparer l'effet de la présence de MUC1 sur la lubrification sans reconstruction de la PM. Codes de signification : $0 \leq *** \leq 0.001 \leq ** \leq 0.01 \leq * \leq 0.05 \leq . \leq 0.1 \leq \leq 1$	102
3.6 Coefficient de frottement, Énergie dissipée et Surface endommagée moyens mesurés avec reconstruction de la PM pour chaque isoforme (moyenne \pm écart-type)	104
3.7 Test de Mann-Whitney sur les indicateurs mécaniques pour les 4 isoformes afin de comparer l'effet de la présence de MUC1 sur les propriétés lubrifiantes de la PM - Codes de signification : $0 \leq *** \leq 0.001 \leq ** \leq 0.01 \leq * \leq 0.05 \leq . \leq 0.1 \leq \leq 1$	105

3.8	Coefficient de frottement, Énergie dissipée et Surface endommagée moyens mesurés avec reconstruction de la PM pour les isoformes exprimant MUC1 (moyenne \pm écart-type)	110
3.9	Test de Mann-Whitney sur les indicateurs mécaniques pour les trois isoformes exprimant MUC1 afin de comparer l'effet de la présence du domaine VNTR sur les propriétés lubrifiantes de la PM. Codes de signification : $0 \leq *** \leq 0.001 \leq ** \leq 0.01 \leq * \leq 0.05 \leq . \leq 0.1 \leq \leq 1$	110
3.10	Coefficient de frottement, Énergie dissipée et Surface endommagée moyens mesurés avec reconstruction de la PM pour les isoformes exprimant un domaine VNTR (MUC1/VNTR et MUC1/VNTR-NC) (moyenne \pm écart-type)	112
3.11	Test de Mann-Whitney sur les indicateurs mécaniques pour les deux isoformes exprimant MUC1 avec un domaine VNTR afin de comparer l'effet d'un domaine SEA clivable sur les propriétés lubrifiantes de la PM. Codes de signification : $0 \leq *** \leq 0.001 \leq ** \leq 0.01 \leq * \leq 0.05 \leq . \leq 0.1 \leq \leq 1$	113
3.12	Taux de variation du coefficient de friction ($\Delta\mu$) et de l'énergie dissipée (ΔEd) pour chaque lignée cellulaire entre les deux conditions : sans et avec la reconstruction de la PM	115
3.13	Force d'adhésion calculée après essais d'indentation sur l'isoforme MUC1/VNTR dans deux conditions : avec et sans reconstruction de la PM	116
4.1	Coefficient de frottement (μ), Énergie dissipée (Ed) et Surface endommagée mesurés sur les quatre isoformes dans les deux conditions expérimentales PM reconstruite et PM reconstruite + EgCG (moyenne \pm écart-type)	134
4.2	Coefficient de corrélation de Pearson entre la concentration en EgCG et : le coefficient de frottement ou la surface endommagée - ^a la corrélation est statistiquement significative	141
4.3	Test de Mann-Whitney sur les indicateurs mécaniques pour les quatre isoformes de MUC1 comparant l'effet de MUC1 et de sa structure sur la perte de lubrification causé par l'EgCG - Code de signification : $0 \leq *** \leq 0.001 \leq ** \leq 0.01 \leq * \leq 0.05 \leq . \leq 0.1 \leq \leq 1$	144
4.4	Valeurs de l'intensité d'astringence calculées à partir du modèle prédictif proposé par Xu et al. [338]	150
4.5	Coefficient de corrélation de Pearson entre les paramètres physiques et l'intensité d'astringence prédite - ^a la corrélation est statistiquement significative	151
4.6	Coefficient de corrélation de Pearson entre les paramètres tribologiques et topographiques avec et sans ajout de PRP avant les tanins - ^a la corrélation est statistiquement significative	158
5.1	Gamme de concentration utilisée pour la détermination des seuils de perception	172

5.2	Test de Mann-Whitney sur les indicateurs mécaniques pour les 6 groupes afin de comparer l'effet de l'acide tannique en fonction de la sensibilité à l'astringence procuré par l'acide tannique - Codes de signification : $0 \leq *** \leq 0.001 \leq ** \leq 0.01 \leq * \leq 0.05 \leq . \leq 0.1 \leq \leq 1$	183
6.1	Paramètres expérimentaux des tests tribologiques sur des hydrogels sans ou avec reconstruction de l'épithélium oral <i>in vitro</i>	193
6.2	Paramètres expérimentaux des tests d'indentation	194
6.3	Comparaison des angles de contact entre les hydrogels et des muqueuses buccales humaines, en considérant deux conditions : sans revêtement et avec revêtement.	198
6.4	Coefficient de frottement, Énergie dissipée et Surface endommagée moyens mesurés avec reconstruction de la PM sur les isoformes Non-MUC1 et MUC1/VNTR sur le <i>modèle soft</i> (moyenne \pm écart-type) et <i>p_{value}</i> .	202
6.5	Coefficient de frottement, Énergie dissipée et Surface endommagée mesurés sur les isoformes Non-MUC1 et MUC1/VNTR dans les deux conditions expérimentales PM reconstruite et PM reconstruite + EgCG (moyenne \pm écart-type) et <i>p_{value}</i>	205
6.6	Coefficient de frottement, Énergie dissipée et Surface endommagée moyens mesurés en présence de l'EgCG sur les isoformes Non-MUC1 et MUC1/VNTR (moyenne \pm écart-type) et <i>p_{value}</i>	207
6.7	Modules élastiques réduits E^* pour les deux types de peau testés [359] .	215
6.8	Modules élastiques réduits E^* sur des cristallins de porc <i>ex vivo</i> pour 3 conditions de conservation	216
A.1	Paramètres expérimentaux des tests tribologiques	273

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] Ronald LEE. « The Outlook for Population Growth ». In : *Science* 333.6042 (29 juill. 2011). Publisher : American Association for the Advancement of Science, p. 569-573. DOI : [10.1126/science.1208859](https://doi.org/10.1126/science.1208859). URL : <https://www.science.org/doi/abs/10.1126/science.1208859> (visité le 13/05/2024).
- [2] P.J GERBER et al. « Tackling climate change through livestock – A global assessment of emissions and mitigation opportunities ». In : *Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO)* (2013).
- [3] Francis CANON et al. « Aggregation of the salivary proline-rich protein IB5 in the presence of the tannin EgCG ». In : *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* 29.6 (12 fév. 2013), p. 1926-1937. ISSN : 1520-5827. DOI : [10.1021/la3041715](https://doi.org/10.1021/la3041715).
- [4] Ben KEW et al. « Transforming sustainable plant proteins into high performance lubricating microgels ». In : *Nature Communications* 14.1 (7 août 2023). Number : 1 Publisher : Nature Publishing Group, p. 4743. ISSN : 2041-1723. DOI : [10.1038/s41467-023-40414-7](https://doi.org/10.1038/s41467-023-40414-7). URL : <https://www.nature.com/articles/s41467-023-40414-7> (visité le 13/09/2023).
- [5] Anwasha SARKAR et Emma M KROP. « Marrying oral tribology to sensory perception : a systematic review ». In : *Current Opinion in Food Science. Sensory Science and Consumer Perception • Food Physics & materials Science* 27 (1^{er} juin 2019), p. 64-73. ISSN : 2214-7993. DOI : [10.1016/j.cofs.2019.05.007](https://doi.org/10.1016/j.cofs.2019.05.007). URL : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2214799318300845> (visité le 12/07/2022).
- [6] Laura LAGUNA et al. « Relating rheology and tribology of commercial dairy colloids to sensory perception ». In : *Food & Function* 8.2 (23 fév. 2017). Publisher : The Royal Society of Chemistry, p. 563-573. ISSN : 2042-650X. DOI : [10.1039/C6FO01010E](https://doi.org/10.1039/C6FO01010E). URL : <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2017/fo/c6fo01010e> (visité le 23/05/2024).
- [7] Clément NIVET. « Rôle de la mucine transmembranaire MUC1 dans la formation de la pellicule muqueuse et la sensation d'astringence ». Thèse de doct. Université Bourgogne Franche Comté, 2023. URL : <https://theses.fr/2023UBFCK033>.
- [8] Sarah PLOYON. « Interactions entre muqueuse orale, salive et molécules de la saveur ». Thèse de doctorat. Dijon, 5 déc. 2016. URL : <https://www.theses.fr/2016DIJOS037> (visité le 17/03/2022).
- [9] Jean-Baptiste THOMAZO. « Perception de la texture en bouche : une approche biomimétique ». Thèse de doctorat. Sorbonne université, 8 oct. 2019. URL : <https://www.theses.fr/2019SORUS388> (visité le 01/03/2024).

- [10] Lina ENGELEN et Andries VAN DER BILT. « Oral Physiology and Texture Perception of Semisolids ». In : *Journal of Texture Studies* 39.1 (2008). _eprint : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/j.1745-4603.2007.00132.x>, p. 83-113. ISSN : 1745-4603. DOI : [10.1111/j.1745-4603.2007.00132.x](https://doi.org/10.1111/j.1745-4603.2007.00132.x). URL : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1745-4603.2007.00132.x> (visité le 01/03/2024).
- [11] Gerard J. TORTORA et Bryan DERRICKSON. *Anatomie et physiologie*. Trad. par Elizabeth VITTE, Renan BAIN et Frederic PARIAUD. 5e édition. OCLC : 1293868931. Louvain-la-Neuve : De Boeck Superieur : De Boeck Supérieur, 2018. ISBN : 978-2-8073-0805-3.
- [12] Alan CRUCHLEY et Lesley BERGMEIER. « Structure and Functions of the Oral Mucosa ». In : *Oral Mucosa in Health and Disease : A Concise Handbook*. Journal Abbreviation : Oral Mucosa in Health and Disease : A Concise Handbook. 2 mars 2018, p. 1-18. ISBN : 978-3-319-56064-9. DOI : [10.1007/978-3-319-56065-6_1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-56065-6_1).
- [13] Camille OBER. « Caractérisation de tissus épithélio-conjonctifs : analyse des marqueurs moléculaires et organisationnels en conditions physiopathologiques ». These de doctorat. Toulouse 3, 12 mai 2022. URL : <http://www.theses.fr/2022TOU30056> (visité le 25/08/2022).
- [14] B. ROED-PETERSEN et G. RENSTRUP. « A topographical classification of the oral mucosa suitable for electronic data processing. Its application to 560 leukoplasias ». In : *Acta Odontologica Scandinavica* 27.6 (déc. 1969), p. 681-695. ISSN : 0001-6357. DOI : [10.3109/00016356909026317](https://doi.org/10.3109/00016356909026317).
- [15] Pekka ASIKAINEN et al. « Microstructure of the Superficial Epithelial Cells of the Human Oral Mucosa ». In : *Ultrastructural Pathology* 38.1 (1^{er} fév. 2014). Publisher : Taylor & Francis _eprint : <https://doi.org/10.3109/01913123.2013.816401>, p. 6-12. ISSN : 0191-3123. DOI : [10.3109/01913123.2013.816401](https://doi.org/10.3109/01913123.2013.816401). URL : <https://doi.org/10.3109/01913123.2013.816401> (visité le 29/08/2022).
- [16] Lesley Ann BERGMEIER, éd. *Oral Mucosa in Health and Disease*. Cham : Springer International Publishing, 2018. ISBN : 978-3-319-56064-9. DOI : [10.1007/978-3-319-56065-6](https://doi.org/10.1007/978-3-319-56065-6). URL : <http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-56065-6> (visité le 24/08/2022).
- [17] Christopher A. SQUIER, éd. *Human oral mucosa : development, structure, and function*. Oxford : Wiley-Blackwell, 2011. 168 p. ISBN : 978-0-470-95973-2.
- [18] Mehdi HADDAG. « Influence du comportement biomécanique et de l'état physiopathologique de la muqueuse orale dans le choix du matériau et de la technique d'empreinte en prothèse amovible ». In : (5 juill. 2021), p. 76. URL : <https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03837342> (visité le 06/03/2024).
- [19] C. A. SQUIER. « The permeability of oral mucosa ». In : *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine : An Official Publication of the American Association of Oral Biologists* 2.1 (1991), p. 13-32. ISSN : 1045-4411. DOI : [10.1177/10454411910020010301](https://doi.org/10.1177/10454411910020010301).

- [20] K MOHARAMZADEH et al. « Tissue-engineered Oral Mucosa : a Review of the Scientific Literature ». In : *J Dent Res* (2007), p. 10. DOI : [10 . 1177 / 154405910708600203](https://doi.org/10.1177/154405910708600203). URL : <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17251509/>.
- [21] D. V. DAWSON et al. « Organization, barrier function and antimicrobial lipids of the oral mucosa ». In : *International Journal of Cosmetic Science* 35.3 (2013). _eprint : [https ://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/ics.12038](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/ics.12038), p. 220-223. ISSN : 1468-2494. DOI : [10 . 1111 / ics . 12038](https://doi.org/10.1111/ics.12038). URL : [https ://onlinelibrary . wiley . com / doi / abs / 10 . 1111 / ics . 12038](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/ics.12038) (visité le 25/08/2022).
- [22] Sabine GROEGER et Joerg MEYLE. « Oral Mucosal Epithelial Cells ». In : *Frontiers in Immunology* 10 (2019). ISSN : 1664-3224. URL : [https ://www . frontiersin . org / articles / 10 . 3389 / fimmu . 2019 . 00208](https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2019.00208) (visité le 25/08/2022).
- [23] P. ASIKAINEN et al. « Microplicae—Specialized Surface Structure of Epithelial Cells of Wet-Surfaced Oral Mucosa ». In : *Ultrastructural Pathology* 39.5 (2015), p. 299-305. ISSN : 1521-0758. DOI : [10 . 3109 / 01913123 . 2015 . 1054015](https://doi.org/10.3109/01913123.2015.1054015).
- [24] Arja M. KULLAA et al. « Microstructure of oral epithelial cells as an underlying basis for salivary mucosal pellicle ». In : *Ultrastructural Pathology* 38.6 (déc. 2014), p. 382-386. ISSN : 1521-0758. DOI : [10 . 3109 / 01913123 . 2014 . 944732](https://doi.org/10.3109/01913123.2014.944732).
- [25] Sarah PLOYON et al. « The membrane-associated MUC1 improves adhesion of salivary MUC5B on buccal cells. Application to development of an in vitro cellular model of oral epithelium ». In : *Archives of Oral Biology* 61 (jan. 2016), p. 149-155. ISSN : 00039969. DOI : [10 . 1016 / j . archoralbio . 2015 . 11 . 002](https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2015.11.002). URL : [https ://linkinghub . elsevier . com / retrieve / pii / S0003996915300741](https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003996915300741) (visité le 17/03/2022).
- [26] Hubert E. SCHROEDER et Max A. LISTGARTEN. « The gingival tissues : the architecture of periodontal protection ». In : *Periodontology 2000* 13.1 (fév. 1997), p. 91-120. ISSN : 0906-6713, 1600-0757. DOI : [10 . 1111 / j . 1600 - 0757 . 1997 . tb00097 . x](https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.1997.tb00097.x). URL : [https ://onlinelibrary . wiley . com / doi / 10 . 1111 / j . 1600 - 0757 . 1997 . tb00097 . x](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1600-0757.1997.tb00097.x) (visité le 25/08/2022).
- [27] I. D. MANDEL. « The Functions of Saliva ». In : *Journal of Dental Research* 66.1 (1^{er} fév. 1987). Publisher : SAGE Publications Inc, p. 623-627. ISSN : 0022-0345. DOI : [10 . 1177 / 00220345870660S103](https://doi.org/10.1177/00220345870660S103). URL : [https : / / doi . org / 10 . 1177 / 00220345870660S103](https://doi.org/10.1177/00220345870660S103) (visité le 28/03/2022).
- [28] Haseeb AHSAN. « Biomolecules and biomarkers in oral cavity : bioassays and immunopathology ». In : *Journal of Immunoassay and Immunochimistry* 40.1 (2 jan. 2019). Publisher : Taylor & Francis _eprint : [https ://doi.org/10.1080/15321819.2018.1550423](https://doi.org/10.1080/15321819.2018.1550423), p. 52-69. ISSN : 1532-1819. DOI : [10 . 1080 / 15321819 . 2018 . 1550423](https://doi.org/10.1080/15321819.2018.1550423). URL : [https : / / doi . org / 10 . 1080 / 15321819 . 2018 . 1550423](https://doi.org/10.1080/15321819.2018.1550423) (visité le 25/08/2022).
- [29] Adrien SCHOM. « La salive en médecine légale : revue de la littérature ». In : (15 mai 2019), p. 59. URL : [https : / / dumas . ccsd . cnrs . fr / dumas - 02169953](https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-02169953) (visité le 29/03/2022).

- [30] Lina ENGELEN et al. « The relation between saliva flow after different stimulations and the perception of flavor and texture attributes in custard desserts ». In : *Physiology & Behavior* 78.1 (jan. 2003), p. 165-169. ISSN : 0031-9384. DOI : [10.1016/s0031-9384\(02\)00957-5](https://doi.org/10.1016/s0031-9384(02)00957-5).
- [31] S. P. HUMPHREY et R. T. WILLIAMSON. « A review of saliva : normal composition, flow, and function ». In : *The Journal of Prosthetic Dentistry* 85.2 (fév. 2001), p. 162-169. ISSN : 0022-3913. DOI : [10.1067/mpr.2001.113778](https://doi.org/10.1067/mpr.2001.113778).
- [32] Yahya TRIGUI. « Biomarqueurs de la salive et santé générale ». Pages : Non renseigné. other. Université de Lorraine, 2018. URL : <https://hal.univ-lorraine.fr/hal-01932178> (visité le 29/03/2022).
- [33] John W. ROWE et Robert L. KAHN. « Successful Aging1 ». In : *The Gerontologist* 37.4 (1^{er} août 1997), p. 433-440. ISSN : 0016-9013. DOI : [10.1093/geront/37.4.433](https://doi.org/10.1093/geront/37.4.433). URL : <https://doi.org/10.1093/geront/37.4.433> (visité le 25/08/2022).
- [34] Francis CANON et al. « Perspectives on Astringency Sensation : An Alternative Hypothesis on the Molecular Origin of Astringency ». In : *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 69.13 (7 avr. 2021), p. 3822-3826. ISSN : 0021-8561, 1520-5118. DOI : [10.1021/acs.jafc.0c07474](https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c07474). URL : <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jafc.0c07474> (visité le 11/05/2022).
- [35] Raymond G. SCHIPPER, Erika SILLETTI et Monique H. VINGERHOEDS. « Saliva as research material : biochemical, physicochemical and practical aspects ». In : *Archives of Oral Biology* 52.12 (déc. 2007), p. 1114-1135. ISSN : 0003-9969. DOI : [10.1016/j.archoralbio.2007.06.009](https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2007.06.009).
- [36] Laurent DEVOIZE et Dallem R. « Salivation ». In : *EMC - Médecine Buccale* (1^{er} jan. 2010).
- [37] Jos A. BOSCH. « The Use of Saliva Markers in Psychobiology : Mechanisms and Methods ». In : *Saliva : Secretion and Functions* 24 (2014). Publisher : Karger Publishers, p. 99-108. DOI : [10.1159/000358864](https://doi.org/10.1159/000358864). URL : <https://www.karger.com/Article/FullText/358864> (visité le 25/08/2022).
- [38] Mathieu SCHWARTZ et al. « Role of human salivary enzymes in bitter taste perception ». In : *Food Chemistry* 386 (30 août 2022), p. 132798. ISSN : 0308-8146. DOI : [10.1016/j.foodchem.2022.132798](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132798). URL : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814622007609> (visité le 08/07/2024).
- [39] AV Nieuw AMERONGEN et Eci VEERMAN. « Saliva the defender of the oral cavity ». In : *Oral Diseases* 8.1 (jan. 2002), p. 12-22. ISSN : 1354523X, 16010825. DOI : [10.1034/j.1601-0825.2002.1o816.x](https://doi.org/10.1034/j.1601-0825.2002.1o816.x). URL : <http://doi.wiley.com/10.1034/j.1601-0825.2002.1o816.x> (visité le 28/10/2021).
- [40] Andreas ROSENKRANZ et al. « Correlating wine astringency with physical measures – Current knowledge and future directions ». In : *Advances in Colloid and Interface Science* 296 (oct. 2021), p. 102520. ISSN : 00018686. DOI : [10.1016/j.cis.2021.102520](https://doi.org/10.1016/j.cis.2021.102520). URL : <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0001868621001615> (visité le 04/07/2022).

- [41] Anwasha SARKAR, Feng XU et Seunghwan LEE. « Human saliva and model saliva at bulk to adsorbed phases – similarities and differences ». In : *Advances in Colloid and Interface Science* 273 (1^{er} nov. 2019), p. 102034. ISSN : 0001-8686. DOI : [10.1016/j.cis.2019.102034](https://doi.org/10.1016/j.cis.2019.102034). URL : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0001868619301241> (visité le 02/02/2023).
- [42] Liselott LINDH et al. « Salivary Pellicles ». In : *Saliva : Secretion and Functions* 24 (2014). Publisher : Karger Publishers, p. 30-39. DOI : [10.1159/000358782](https://doi.org/10.1159/000358782). URL : <https://www.karger.com/Article/FullText/358782> (visité le 02/02/2023).
- [43] Christian HANNIG et al. « The mucosal pellicle – An underestimated factor in oral physiology ». In : *Archives of Oral Biology* 80 (1^{er} août 2017), p. 144-152. ISSN : 0003-9969. DOI : [10.1016/j.archoralbio.2017.04.001](https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2017.04.001). URL : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003996917301036> (visité le 23/06/2022).
- [44] S D BRADWAY et al. « Oral mucosal pellicle. Adsorption and transpeptidation of salivary components to buccal epithelial cells. » In : *Biochemical Journal* 261.3 (1^{er} août 1989), p. 887-896. ISSN : 0264-6021. URL : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1138913/> (visité le 26/08/2022).
- [45] S D BRADWAY et al. « Formation of salivary-mucosal pellicle : the role of transglutaminase ». In : *Biochemical Journal* 284.2 (1^{er} juin 1992), p. 557-564. ISSN : 0264-6021, 1470-8728. DOI : [10.1042/bj2840557](https://doi.org/10.1042/bj2840557). URL : <https://portlandpress.com/biochemj/article/284/2/557/28120/Formation-of-salivarymucosal-pellicle-the-role-of> (visité le 28/10/2021).
- [46] HI GIBBINS et al. « Concentration of salivary protective proteins within the bound oral mucosal pellicle ». In : *Oral Diseases* 20.7 (oct. 2014), p. 707-713. ISSN : 1354-523X, 1601-0825. DOI : [10.1111/odi.12194](https://doi.org/10.1111/odi.12194). URL : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/odi.12194> (visité le 28/10/2021).
- [47] Marité CÁRDENAS, Ulla ELOFSSON et Liselott LINDH. « Salivary Mucin MUC5B Could Be an Important Component of in Vitro Pellicles of Human Saliva : An in Situ Ellipsometry and Atomic Force Microscopy Study ». In : *Biomacromolecules* 8.4 (1^{er} avr. 2007). Publisher : American Chemical Society, p. 1149-1156. ISSN : 1525-7797. DOI : [10.1021/bm061055h](https://doi.org/10.1021/bm061055h). URL : <https://doi.org/10.1021/bm061055h> (visité le 29/08/2022).
- [48] Hannah L GIBBINS et al. « What interactions drive the salivary mucosal pellicle formation ». In : *Colloids and surfaces B, Biointerfaces* 120 (1^{er} août 2014), p. 184-192. ISSN : 1873-4367. DOI : [10.1016/j.colsurfb.2014.05.020](https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.05.020). URL : <https://europepmc.org/articles/PMC4097378> (visité le 26/08/2022).
- [49] H. RANC et al. « Friction coefficient and wettability of oral mucosal tissue : Changes induced by a salivary layer ». In : *Colloids and Surfaces A : Physicochemical and Engineering Aspects* 276.1 (mars 2006), p. 155-161. ISSN : 09277757. DOI : [10.1016/j.colsurfa.2005.10.033](https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2005.10.033). URL : <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927775705007594> (visité le 28/10/2021).

- [50] Lubica MACAKOVA et al. « Influence of ionic strength changes on the structure of pre-adsorbed salivary films. A response of a natural multi-component layer ». In : *Colloids and Surfaces B : Biointerfaces* 77.1 (1^{er} mai 2010), p. 31-39. ISSN : 0927-7765. DOI : [10.1016/j.colsurfb.2009.12.022](https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2009.12.022). URL : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0927776510000251> (visité le 22/07/2022).
- [51] Marité CÁRDENAS et al. « Human Saliva Forms a Complex Film Structure on Alumina Surfaces ». In : *Biomacromolecules* 8.1 (1^{er} jan. 2007). Publisher : American Chemical Society, p. 65-69. ISSN : 1525-7797. DOI : [10.1021/bm060492t](https://doi.org/10.1021/bm060492t). URL : <https://doi.org/10.1021/bm060492t> (visité le 05/04/2022).
- [52] Martine MORZEL et al. « Immunocytological detection of salivary mucins (MUC5B) on the mucosal pellicle lining human epithelial buccal cells ». In : *Microscopy Research and Technique* 77.6 (2014). _eprint : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/jemt.22366>, p. 453-457. ISSN : 1097-0029. DOI : [10.1002/jemt.22366](https://doi.org/10.1002/jemt.22366). URL : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jemt.22366> (visité le 26/08/2022).
- [53] Olga SANTOS et al. « Adsorption from saliva to silica and hydroxyapatite surfaces and elution of salivary films by SDS and delmopinol ». In : *Biofouling* 26.6 (août 2010), p. 697-710. ISSN : 1029-2454. DOI : [10.1080/08927014.2010.506609](https://doi.org/10.1080/08927014.2010.506609).
- [54] U. LENDENMANN, J. GROGAN et F. G. OPPENHEIM. « Saliva and dental pellicle—a review ». In : *Advances in Dental Research* 14 (déc. 2000), p. 22-28. ISSN : 0895-9374. DOI : [10.1177/08959374000140010301](https://doi.org/10.1177/08959374000140010301).
- [55] M. HANNIG et al. « Transmission electron microscopy comparison of methods for collecting in situ formed enamel pellicle ». In : *Clinical Oral Investigations* 9.1 (mars 2005), p. 30-37. ISSN : 1432-6981. DOI : [10.1007/s00784-004-0284-1](https://doi.org/10.1007/s00784-004-0284-1).
- [56] Helena UKKONEN et al. « Oral mucosal epithelial cells express the membrane anchored mucin MUC1 ». In : *Archives of Oral Biology* 73 (jan. 2017), p. 269-273. ISSN : 00039969. DOI : [10.1016/j.archoralbio.2016.10.019](https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2016.10.019). URL : <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003996916302989> (visité le 28/10/2021).
- [57] Henny C van der MEI, Don J WHITE et Henk J BUSSCHER. « On the wettability of soft tissues in the human oral cavity ». In : *Archives of Oral Biology* 49.8 (1^{er} août 2004), p. 671-673. ISSN : 0003-9969. DOI : [10.1016/j.archoralbio.2004.03.002](https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2004.03.002). URL : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003996904000627> (visité le 24/03/2022).
- [58] N. VASSILAKOS, T. ARNEBRANT et P. O. GLANTZ. « An in vitro study of salivary film formation at solid/liquid interfaces ». In : *Scandinavian Journal of Dental Research* 101.3 (juin 1993), p. 133-137. ISSN : 0029-845X. DOI : [10.1111/j.1600-0722.1993.tb01652.x](https://doi.org/10.1111/j.1600-0722.1993.tb01652.x).
- [59] Watcharapong AROONSANG et al. « Influence of substratum hydrophobicity on salivary pellicles : organization or composition ? » In : *Biofouling* 30.9 (oct. 2014), p. 1123-1132. ISSN : 1029-2454. DOI : [10.1080/08927014.2014.974155](https://doi.org/10.1080/08927014.2014.974155).

- [60] H.L. GIBBINS et G.H. CARPENTER. « Alternative Mechanisms of Astringency – What is the Role of Saliva? » In : *Journal of Texture Studies* 44.5 (oct. 2013), p. 364-375. ISSN : 0022-4901, 1745-4603. DOI : [10.1111/jtxs.12022](https://doi.org/10.1111/jtxs.12022). URL : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jtxs.12022> (visité le 28/10/2021).
- [61] G. D. OFFNER et R. F. TROXLER. « Heterogeneity of high-molecular-weight human salivary mucins ». In : *Advances in Dental Research* 14 (déc. 2000), p. 69-75. ISSN : 0895-9374. DOI : [10.1177/08959374000140011101](https://doi.org/10.1177/08959374000140011101).
- [62] A R BIESBROCK, M S REDDY et M J LEVINE. « Interaction of a salivary mucin-secretory immunoglobulin A complex with mucosal pathogens. » In : *Infection and Immunity* 59.10 (oct. 1991), p. 3492-3497. ISSN : 0019-9567. URL : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC258911/> (visité le 11/07/2023).
- [63] M. PÄRSSINEN et al. « Oral mucosal pellicle as an immune protection against micro-organisms in patients with recurrent aphthous stomatitis : A hypothesis ». In : *Medical Hypotheses* 146 (1^{er} jan. 2021), p. 110449. ISSN : 0306-9877. DOI : [10.1016/j.mehy.2020.110449](https://doi.org/10.1016/j.mehy.2020.110449). URL : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0306987720333405> (visité le 26/08/2022).
- [64] L. A. TABAK. « In defense of the oral cavity : structure, biosynthesis, and function of salivary mucins ». In : *Annual Review of Physiology* 57 (1995), p. 547-564. ISSN : 0066-4278. DOI : [10.1146/annurev.ph.57.030195.002555](https://doi.org/10.1146/annurev.ph.57.030195.002555).
- [65] I Cecilia HAHN BERG, Liselott LINDH et Thomas ARNEBRANT. « Intraoral Lubrication of PRP-1, Statherin and Mucin as Studied by AFM ». In : *Biofouling* 20.1 (1^{er} fév. 2004). Publisher : Taylor & Francis _eprint : <https://doi.org/10.1080/08927010310001639082>, p. 65-70. ISSN : 0892-7014. DOI : [10.1080/08927010310001639082](https://doi.org/10.1080/08927010310001639082). URL : <https://doi.org/10.1080/08927010310001639082> (visité le 24/01/2024).
- [66] Gleb E. YAKUBOV et al. « Viscous boundary lubrication of hydrophobic surfaces by mucin ». In : *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* 25.4 (17 fév. 2009), p. 2313-2321. ISSN : 0743-7463. DOI : [10.1021/la8018666](https://doi.org/10.1021/la8018666).
- [67] Birgit J. TEUBL et al. « The oral cavity as a biological barrier system : Design of an advanced buccal in vitro permeability model ». In : *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. Biological Barriers* 84.2 (1^{er} juin 2013), p. 386-393. ISSN : 0939-6411. DOI : [10.1016/j.ejpb.2012.10.021](https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2012.10.021). URL : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0939641112003931> (visité le 01/03/2024).
- [68] Ece Neslihan AYBEKE et al. « Nanoscale Mapping of the Physical Surface Properties of Human Buccal Cells and Changes Induced by Saliva ». In : *Langmuir* 35.39 (1^{er} oct. 2019), p. 12647-12655. ISSN : 0743-7463, 1520-5827. DOI : [10.1021/acs.langmuir.9b01979](https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.9b01979). URL : <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.langmuir.9b01979> (visité le 17/03/2022).

- [69] Adelaida ESTEBAN-FERNÁNDEZ et al. « Intra-oral adsorption and release of aroma compounds following in-mouth wine exposure ». In : *Food Chemistry* 205 (15 août 2016), p. 280-288. ISSN : 0308-8146. DOI : [10.1016/j.foodchem.2016.03.030](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.03.030). URL : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814616303818> (visité le 01/03/2024).
- [70] A. NAYAK et G. H. CARPENTER. « A physiological model of tea-induced astringency ». In : *Physiology & Behavior* 95.3 (20 oct. 2008), p. 290-294. ISSN : 0031-9384. DOI : [10.1016/j.physbeh.2008.05.023](https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2008.05.023). URL : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0031938408001868> (visité le 26/08/2022).
- [71] Jianshe CHEN et Jason R. STOKES. « Rheology and tribology : Two distinctive regimes of food texture sensation ». In : *Trends in Food Science & Technology* 25.1 (mai 2012), p. 4-12. ISSN : 09242244. DOI : [10.1016/j.tifs.2011.11.006](https://doi.org/10.1016/j.tifs.2011.11.006). URL : <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S092422441100272X> (visité le 28/10/2021).
- [72] Jan DEKKER et al. « The MUC family : an obituary ». In : *Trends in Biochemical Sciences* 27.3 (mars 2002), p. 126-131. ISSN : 0968-0004. DOI : [10.1016/s0968-0004\(01\)02052-7](https://doi.org/10.1016/s0968-0004(01)02052-7).
- [73] Christine L. HATTRUP et Sandra J. GENDLER. « Structure and Function of the Cell Surface (Tethered) Mucins ». In : *Annual Review of Physiology* 70.1 (2008). _eprint : <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.70.113006.100659>, p. 431-457. DOI : [10.1146/annurev.physiol.70.113006.100659](https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.70.113006.100659). URL : <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.70.113006.100659> (visité le 25/01/2024).
- [74] Bastien DEMOUVEAUX et al. « Gel-forming mucin interactome drives mucus viscoelasticity ». In : *Advances in Colloid and Interface Science* 252 (1^{er} fév. 2018), p. 69-82. ISSN : 0001-8686. DOI : [10.1016/j.cis.2017.12.005](https://doi.org/10.1016/j.cis.2017.12.005). URL : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0001868617304797> (visité le 31/01/2024).
- [75] Bharathi GOVINDARAJAN et Ilene K. GIPSON. « Membrane-tethered mucins have multiple functions on the ocular surface ». In : *Experimental Eye Research* 90.6 (juin 2010), p. 655-663. ISSN : 1096-0007. DOI : [10.1016/j.exer.2010.02.014](https://doi.org/10.1016/j.exer.2010.02.014).
- [76] Matthias MARCZYNSKI et al. « Charged glycan residues critically contribute to the adsorption and lubricity of mucins ». In : *Colloids and Surfaces B : Biointerfaces* 187 (1^{er} mars 2020), p. 110614. ISSN : 0927-7765. DOI : [10.1016/j.colsurfb.2019.110614](https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.110614). URL : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0927776519307581> (visité le 29/02/2024).
- [77] Fiana LEVITIN et al. « The MUC1 SEA Module Is a Self-cleaving Domain ». In : *Journal of Biological Chemistry* 280.39 (sept. 2005), p. 33374-33386. ISSN : 00219258. DOI : [10.1074/jbc.M506047200](https://doi.org/10.1074/jbc.M506047200). URL : <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021925820790666> (visité le 12/05/2022).

- [78] Yoannis IMBERT et al. « MUC1 splice variants in human ocular surface tissues : Possible differences between dry eye patients and normal controls ». In : *Experimental Eye Research* 83.3 (1^{er} sept. 2006), p. 493-501. ISSN : 0014-4835. DOI : [10.1016/j.exer.2006.01.031](https://doi.org/10.1016/j.exer.2006.01.031). URL : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014483506001667> (visité le 22/07/2023).
- [79] Jos P. M. van PUTTEN et Karin STRIJBIS. « Transmembrane Mucins : Signaling Receptors at the Intersection of Inflammation and Cancer ». In : *Journal of Innate Immunity* 9.3 (2017), p. 281-299. ISSN : 1662-8128. DOI : [10.1159/000453594](https://doi.org/10.1159/000453594).
- [80] F.-G. HANISCH et S. MULLER. « MUC1 : the polymorphic appearance of a human mucin ». In : *Glycobiology* 10.5 (1^{er} mai 2000), p. 439-449. ISSN : 0959-6658, 1460-2423. DOI : [10.1093/glycob/10.5.439](https://doi.org/10.1093/glycob/10.5.439). URL : <https://academic.oup.com/glycob/article-lookup/doi/10.1093/glycob/10.5.439> (visité le 28/10/2021).
- [81] Wenqing CHEN et al. « MUC1 : Structure, Function, and Clinic Application in Epithelial Cancers ». In : *International Journal of Molecular Sciences* 22.12 (jan. 2021). Number : 12 Publisher : Multidisciplinary Digital Publishing Institute, p. 6567. ISSN : 1422-0067. DOI : [10.3390/ijms22126567](https://doi.org/10.3390/ijms22126567). URL : <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/12/6567> (visité le 25/01/2024).
- [82] Julia R. DAVIES, Claes WICKSTRÖM et David J. THORNTON. « Gel-Forming and Cell-Associated Mucins : Preparation for Structural and Functional Studies ». In : *Mucins : Methods and Protocols*. Sous la dir. de Michael A. MCGUCKIN et David J. THORNTON. Methods in Molecular Biology. Totowa, NJ : Humana Press, 2012, p. 27-47. ISBN : 978-1-61779-513-8. DOI : [10.1007/978-1-61779-513-8_2](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-513-8_2). URL : https://doi.org/10.1007/978-1-61779-513-8_2 (visité le 25/01/2024).
- [83] A. KULLAA-MIKKONEN et T. E. SORVARI. « A Scanning Electron Microscopic Study of the Dorsal Surface of the Human Tongue ». In : *Cells Tissues Organs* 123.2 (1985). Publisher : Karger Publishers, p. 114-120. ISSN : 1422-6405, 1422-6421. DOI : [10.1159/000146050](https://doi.org/10.1159/000146050). URL : <https://www.karger.com/Article/FullText/146050> (visité le 24/03/2022).
- [84] Sara K. LINDÉN et al. « MUC1 limits Helicobacter pylori infection both by steric hindrance and by acting as a releasable decoy ». In : *PLoS pathogens* 5.10 (oct. 2009), e1000617. ISSN : 1553-7374. DOI : [10.1371/journal.ppat.1000617](https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000617).
- [85] Jeong-Hyun KANG et al. « Relationships between oral MUC1 expression and salivary hormones in burning mouth syndrome ». In : *Archives of Oral Biology* 78 (juin 2017), p. 58-64. ISSN : 00039969. DOI : [10.1016/j.archoralbio.2017.01.022](https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2017.01.022). URL : <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003996917300304> (visité le 28/10/2021).
- [86] Mika SUMIYOSHI et al. « Antiadhesive Character of Mucin O-glycans at the Apical Surface of Corneal Epithelial Cells ». In : *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 49.1 (1^{er} jan. 2008), p. 197-203. ISSN : 1552-5783. DOI : [10.1167/iovs.07-1038](https://doi.org/10.1167/iovs.07-1038). URL : <https://doi.org/10.1167/iovs.07-1038> (visité le 21/08/2023).
- [87] Bertil MACAO et al. « Autoproteolysis coupled to protein folding in the SEA domain of the membrane-bound MUC1 mucin ». In : *Nature Structural & Molecular Biology* 13.1 (jan. 2006), p. 71-76. ISSN : 1545-9993. DOI : [10.1038/nsmb1035](https://doi.org/10.1038/nsmb1035).

- [88] David J. THORNTON, Karine ROUSSEAU et Michael A. MCGUCKIN. « Structure and Function of the Polymeric Mucins in Airways Mucus ». In : *Annual Review of Physiology* 70.1 (2008). _eprint : <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.70.113006.100702>, p. 459-486. DOI : [10.1146/annurev.physiol.70.113006.100702](https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.70.113006.100702). URL : <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.70.113006.100702> (visité le 23/01/2024).
- [89] Mouri FARUQUE et al. « A review on the role of salivary MUC5B in oral health ». In : *Journal of Oral Biosciences* 64.4 (déc. 2022), p. 392-399. ISSN : 1880-3865. DOI : [10.1016/j.job.2022.09.005](https://doi.org/10.1016/j.job.2022.09.005).
- [90] Caroline RIDLEY et al. « Biosynthesis of the polymeric gel-forming mucin MUC5B ». In : *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology* 310.10 (15 mai 2016), p. L993-L1002. ISSN : 1040-0605. DOI : [10.1152/ajplung.00046.2016](https://doi.org/10.1152/ajplung.00046.2016). URL : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4896102/> (visité le 05/02/2024).
- [91] Jean-Luc DESSEYN, Daniel TETAERT et Valérie GOUYER. « Architecture of the large membrane-bound mucins ». In : *Gene* 410.2 (15 mars 2008), p. 215-222. ISSN : 0378-1119. DOI : [10.1016/j.gene.2007.12.014](https://doi.org/10.1016/j.gene.2007.12.014). URL : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378111907006270> (visité le 05/02/2024).
- [92] Bastien DEMOUVEAUX et al. « La structure des mucines conditionne les propriétés viscoélastiques des gels de mucus ». In : *médecine/sciences* 34.10 (1^{er} oct. 2018). Number : 10 Publisher : EDP Sciences, p. 806-812. ISSN : 0767-0974, 1958-5381. DOI : [10.1051/medsci/2018206](https://doi.org/10.1051/medsci/2018206). URL : <https://www.medecinesciences.org/articles/medsci/abs/2018/10/msc170059/msc170059.html> (visité le 05/02/2024).
- [93] Courtney M FERNANDEZ-PETTY et al. « A glycopolymer improves vascoelasticity and mucociliary transport of abnormal cystic fibrosis mucus ». In : *JCI insight* 4.8 (1^{er} avr. 2019), p. 125954. ISSN : 2379-3708. DOI : [10.1172/jci.insight.125954](https://doi.org/10.1172/jci.insight.125954). URL : <https://europepmc.org/articles/PMC6538343> (visité le 05/02/2024).
- [94] Liselott LINDH et al. « Adsorption of MUC5B and the role of mucins in early salivary film formation ». In : *Colloids and Surfaces B : Biointerfaces* 25.2 (1^{er} juin 2002), p. 139-146. ISSN : 0927-7765. DOI : [10.1016/S0927-7765\(01\)00300-9](https://doi.org/10.1016/S0927-7765(01)00300-9). URL : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0927776501003009> (visité le 05/02/2024).
- [95] L. A. TABAK et al. « Role of salivary mucins in the protection of the oral cavity ». In : *Journal of Oral Pathology* 11.1 (fév. 1982), p. 1-17. ISSN : 0300-9777. DOI : [10.1111/j.1600-0714.1982.tb00138.x](https://doi.org/10.1111/j.1600-0714.1982.tb00138.x).
- [96] Rashida PRAMANIK et al. « Protein and mucin retention on oral mucosal surfaces in dry mouth patients ». In : *European Journal of Oral Sciences* 118.3 (2010). _eprint : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/j.1600-0722.2010.00728.x>, p. 245-253. ISSN : 1600-0722. DOI : [10.1111/j.1600-0722.2010.00728.x](https://doi.org/10.1111/j.1600-0722.2010.00728.x). URL : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1600-0722.2010.00728.x> (visité le 30/08/2022).

- [97] S. GIROD et al. « Role of the physiochemical properties of mucus in the protection of the respiratory epithelium ». In : *The European Respiratory Journal* 5.4 (avr. 1992), p. 477-487. ISSN : 0903-1936. URL : <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1563506/>.
- [98] Masatomo KAWAKUBO et al. « Natural antibiotic function of a human gastric mucin against *Helicobacter pylori* infection ». In : *Science (New York, N.Y.)* 305.5686 (13 août 2004), p. 1003-1006. ISSN : 1095-9203. DOI : [10.1126/science.1099250](https://doi.org/10.1126/science.1099250).
- [99] T. L. GURURAJA et al. « Structural features of the human salivary mucin, MUC7 ». In : *Glycoconjugate Journal* 15.5 (mai 1998), p. 457-467. ISSN : 0282-0080. DOI : [10.1023/a:1006978818555](https://doi.org/10.1023/a:1006978818555).
- [100] Tom ALBER. « Structure of the leucine zipper ». In : *Current Opinion in Genetics & Development* 2.2 (1^{er} jan. 1992), p. 205-210. ISSN : 0959-437X. DOI : [10.1016/S0959-437X\(05\)80275-8](https://doi.org/10.1016/S0959-437X(05)80275-8). URL : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0959437X05802758> (visité le 06/02/2024).
- [101] E. K. O'SHEA et al. « Preferential heterodimer formation by isolated leucine zip-pers from fos and jun ». In : *Science (New York, N.Y.)* 245.4918 (11 août 1989), p. 646-648. ISSN : 0036-8075. DOI : [10.1126/science.2503872](https://doi.org/10.1126/science.2503872).
- [102] L. A. BOBEK et al. « Structure and chromosomal localization of the human salivary mucin gene, MUC7 ». In : *Genomics* 31.3 (1^{er} fév. 1996), p. 277-282. ISSN : 0888-7543. DOI : [10.1006/geno.1996.0049](https://doi.org/10.1006/geno.1996.0049).
- [103] Mary Callaghan ROSE et Judith A. VOYNOW. « Respiratory Tract Mucin Genes and Mucin Glycoproteins in Health and Disease ». In : *Physiological Reviews* 86.1 (jan. 2006). Publisher : American Physiological Society, p. 245-278. ISSN : 0031-9333. DOI : [10.1152/physrev.00010.2005](https://doi.org/10.1152/physrev.00010.2005). URL : <https://journals.physiology.org/doi/full/10.1152/physrev.00010.2005> (visité le 07/02/2024).
- [104] Libuse A. BOBEK et Hongsa SITU. « MUC7 20-Mer : Investigation of Antimicrobial Activity, Secondary Structure, and Possible Mechanism of Antifungal Action ». In : *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 47.2 (fév. 2003), p. 643-652. ISSN : 0066-4804. DOI : [10.1128/AAC.47.2.643-652.2003](https://doi.org/10.1128/AAC.47.2.643-652.2003). URL : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC151741/> (visité le 06/02/2024).
- [105] J. SATYANARAYANA et al. « Divergent solid-phase synthesis and candidacidal ac-tivity of MUC7 D1, a 51-residue histidine-rich N-terminal domain of human sali-vary mucin MUC7 ». In : *The Journal of Peptide Research* 56.5 (2000). _eprint : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1034/j.1399-3011.2000.00765.x>, p. 275-282. ISSN : 1399-3011. DOI : [10.1034/j.1399-3011.2000.00765.x](https://doi.org/10.1034/j.1399-3011.2000.00765.x). URL : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1034/j.1399-3011.2000.00765.x> (visité le 06/02/2024).
- [106] Simon MOLE. « The systematic distribution of tannins in the leaves of angio-sperms : A tool for ecological studies ». In : *Biochemical Systematics and Eco-logy* 21.8 (1^{er} déc. 1993), p. 833-846. ISSN : 0305-1978. DOI : [10.1016/0305-1978\(93\)90096-A](https://doi.org/10.1016/0305-1978(93)90096-A). URL : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/030519789390096A> (visité le 11/07/2023).

- [107] Karamali KHANBABAEE et Teunis van REE. « Tannins : Classification and Definition ». In : *Natural Product Reports* 18.6 (11 déc. 2001). Publisher : The Royal Society of Chemistry, p. 641-649. ISSN : 1460-4752. DOI : [10.1039/B101061L](https://doi.org/10.1039/B101061L). URL : <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2001/np/b1010611> (visité le 08/02/2024).
- [108] Raymond V. BARBEHENN et C. PETER CONSTABEL. « Tannins in plant–herbivore interactions ». In : *Phytochemistry. Plant-Insect Interactions* 72.13 (1^{er} sept. 2011), p. 1551-1565. ISSN : 0031-9422. DOI : [10.1016/j.phytochem.2011.01.040](https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2011.01.040). URL : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0031942211000690> (visité le 08/02/2024).
- [109] Antonella SMERIGLIO et al. « Proanthocyanidins and hydrolysable tannins : occurrence, dietary intake and pharmacological effects ». In : *British Journal of Pharmacology* 174.11 (juin 2017), p. 1244-1262. ISSN : 0007-1188. DOI : [10.1111/bph.13630](https://doi.org/10.1111/bph.13630). URL : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5429339/> (visité le 08/02/2024).
- [110] Mafalda Santos SILVA et al. « Molecular Interaction Between Salivary Proteins and Food Tannins ». In : *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 65.31 (9 août 2017). Publisher : American Chemical Society, p. 6415-6424. ISSN : 0021-8561. DOI : [10.1021/acs.jafc.7b01722](https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b01722). URL : <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b01722> (visité le 08/02/2024).
- [111] Raymond V. BARBEHENN et al. « Tree Resistance to *Lymantria dispar* Caterpillars : Importance and Limitations of Foliar Tannin Composition ». In : *Oecologia* 159.4 (2009). Publisher : [Springer, International Association for Ecology], p. 777-788. ISSN : 0029-8549. URL : <https://www.jstor.org/stable/40309945> (visité le 11/07/2023).
- [112] David F. RHOADES et Rex G. CATES. « Toward a General Theory of Plant Antiherbivore Chemistry ». In : *Biochemical Interaction Between Plants and Insects*. Sous la dir. de James W. WALLACE et Richard L. MANSELL. Recent Advances in Phytochemistry. Boston, MA : Springer US, 1976, p. 168-213. ISBN : 978-1-4684-2646-5. DOI : [10.1007/978-1-4684-2646-5_4](https://doi.org/10.1007/978-1-4684-2646-5_4). URL : https://doi.org/10.1007/978-1-4684-2646-5_4 (visité le 11/07/2023).
- [113] H. J. BLYTT, T. K. GUSCAR et L. G. BUTLER. « Antinutritional effects and ecological significance of dietary condensed tannins may not be due to binding and inhibiting digestive enzymes ». In : *Journal of Chemical Ecology* 14.6 (juin 1988), p. 1455-1465. ISSN : 0098-0331. DOI : [10.1007/BF01012417](https://doi.org/10.1007/BF01012417).
- [114] C. T. ROBBINS et al. « Role of Tannins in Defending Plants Against Ruminants : Reduction in Protein Availability ». In : *Ecology* 68.1 (1987). Publisher : Wiley, p. 98-107. ISSN : 0012-9658. DOI : [10.2307/1938809](https://doi.org/10.2307/1938809). URL : <https://www.jstor.org/stable/1938809> (visité le 08/02/2024).
- [115] A. L. CHUNG-MACCOUBREY, A. E. HAGERMAN et R. L. KIRKPATRICK. « Effects of tannins on digestion and detoxification activity in gray squirrels (*Sciurus carolinensis*) ». In : *Physiological Zoology* 70.3 (1997), p. 270-277. ISSN : 0031-935X. DOI : [10.1086/639595](https://doi.org/10.1086/639595).

- [116] Irene MUELLER-HARVEY. « Unravelling the conundrum of tannins in animal nutrition and health ». In : *Journal of the Science of Food and Agriculture* 86.13 (2006). _eprint : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/jsfa.2577>, p. 2010-2037. ISSN : 1097-0010. DOI : [10.1002/jsfa.2577](https://doi.org/10.1002/jsfa.2577). URL : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jsfa.2577> (visité le 08/02/2024).
- [117] N. NIHO et al. « Subchronic toxicity study of gallic acid by oral administration in F344 rats ». In : *Food and Chemical Toxicology : An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association* 39.11 (nov. 2001), p. 1063-1070. ISSN : 0278-6915. DOI : [10.1016/s0278-6915\(01\)00054-0](https://doi.org/10.1016/s0278-6915(01)00054-0).
- [118] S. M. COOPER et N. OWEN-SMITH. « Condensed tannins deter feeding by browsing ruminants in a South African savanna ». In : *Oecologia* 67.1 (août 1985), p. 142-146. ISSN : 1432-1939. DOI : [10.1007/BF00378466](https://doi.org/10.1007/BF00378466).
- [119] H MEHANSHO et al. « Modulation of proline-rich protein biosynthesis in rat parotid glands by sorghums with high tannin levels. » In : *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 80.13 (juill. 1983), p. 3948-3952. ISSN : 0027-8424. URL : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC394176/> (visité le 08/02/2024).
- [120] Lingyu YANG et al. « Proanthocyanidins against Oxidative Stress : From Molecular Mechanisms to Clinical Applications ». In : *BioMed Research International* 2018 (2018), p. 8584136. ISSN : 2314-6141. DOI : [10.1155/2018/8584136](https://doi.org/10.1155/2018/8584136).
- [121] Abdur RAUF et al. « Proanthocyanidins : A comprehensive review ». In : *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie* 116 (août 2019), p. 108999. ISSN : 1950-6007. DOI : [10.1016/j.biopha.2019.108999](https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.108999).
- [122] Bruno Oliveira de VERAS, Márcia Vanusa da SILVA et Penha Patricia CABRAL RIBEIRO. « Tannic acid is a gastroprotective that regulates inflammation and oxidative stress ». In : *Food and Chemical Toxicology : An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association* 156 (oct. 2021), p. 112482. ISSN : 1873-6351. DOI : [10.1016/j.fct.2021.112482](https://doi.org/10.1016/j.fct.2021.112482).
- [123] Mario CARUANA, Ruben CAUCHI et Neville VASSALLO. « Putative Role of Red Wine Polyphenols against Brain Pathology in Alzheimer's and Parkinson's Disease ». In : *Frontiers in Nutrition* 3 (2016), p. 31. ISSN : 2296-861X. DOI : [10.3389/fnut.2016.00031](https://doi.org/10.3389/fnut.2016.00031).
- [124] Ghulam HUSSAIN et al. « Putative Roles of Plant-Derived Tannins in Neurodegenerative and Neuropsychiatry Disorders : An Updated Review ». In : *Molecules (Basel, Switzerland)* 24.12 (13 juin 2019), p. 2213. ISSN : 1420-3049. DOI : [10.3390/molecules24122213](https://doi.org/10.3390/molecules24122213).
- [125] King-Thom CHUNG et al. « Tannins and Human Health : A Review ». In : *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 38.6 (août 1998), p. 421-464. ISSN : 1040-8398, 1549-7852. DOI : [10.1080/10408699891274273](https://doi.org/10.1080/10408699891274273). URL : <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10408699891274273> (visité le 28/10/2021).

- [126] Kartik SHARMA et al. « Health effects, sources, utilization and safety of tannins : a critical review ». In : *Toxin Reviews* 40.4 (2 oct. 2021). Publisher : Taylor & Francis _eprint : <https://doi.org/10.1080/15569543.2019.1662813>, p. 432-444. ISSN : 1556-9543. DOI : [10.1080/15569543.2019.1662813](https://doi.org/10.1080/15569543.2019.1662813). URL : <https://doi.org/10.1080/15569543.2019.1662813> (visité le 09/02/2024).
- [127] Martha R. BAJEC et Gary J. PICKERING. « Astringency : Mechanisms and Perception ». In : *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 48.9 (10 sept. 2008), p. 858-875. ISSN : 1040-8398, 1549-7852. DOI : [10.1080/10408390701724223](https://doi.org/10.1080/10408390701724223). URL : <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10408390701724223> (visité le 28/10/2021).
- [128] Sarah PLOYON et al. « Mechanisms of astringency : Structural alteration of the oral mucosal pellicle by dietary tannins and protective effect of bPRPs ». In : *Food Chemistry* 253 (juill. 2018), p. 79-87. ISSN : 03088146. DOI : [10.1016/j.foodchem.2018.01.141](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.01.141). URL : <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814618301560> (visité le 28/10/2021).
- [129] Dr. Mamta KUMARI et Shashi JAIN. « Tannin : An Antinutrient with Positive Effect to Manage Diabetes ». In : *Research Journal of Recent Sciences Vol I* (8 déc. 2012). ISSN : 2277-2502.
- [130] Ann E. HAGERMAN et al. « High Molecular Weight Plant Polyphenolics (Tannins) as Biological Antioxidants ». In : *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46.5 (mai 1998), p. 1887-1892. ISSN : 1520-5118. DOI : [10.1021/jf970975b](https://doi.org/10.1021/jf970975b).
- [131] G. C. WAGHORN et al. « Effects of condensed tannins in Lotus pedunculatus on its nutritive value for sheep. 2. Nitrogenous aspects ». In : *The Journal of Agricultural Science* 123.1 (août 1994). Publisher : Cambridge University Press, p. 109-119. ISSN : 1469-5146, 0021-8596. DOI : [10.1017/S0021859600067836](https://doi.org/10.1017/S0021859600067836). URL : <https://www.cambridge.org/core/journals/journal-of-agricultural-science/article/effects-of-condensed-tannins-in-lotus-pedunculatus-on-its-nutritive-value-for-sheep-2-nitrogenous-aspects/B5A35157A9EC63B68F04633EC974CA70> (visité le 09/02/2024).
- [132] K. RAMAKRISHNAN et M. R.V. KRISHNAN. « TANNIN – CLASSIFICATION, ANALYSIS AND APPLICATIONS ». In : *Ancient Science of Life* 13.3 (1994), p. 232-238. ISSN : 0257-7941. URL : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3336524/> (visité le 09/02/2024).
- [133] J. D. REED. « Nutritional toxicology of tannins and related polyphenols in forage legumes ». In : *Journal of Animal Science* 73.5 (mai 1995), p. 1516-1528. ISSN : 0021-8812. DOI : [10.2527/1995.7351516x](https://doi.org/10.2527/1995.7351516x).
- [134] Janet M DAWSON et al. « Effects of dietary quebracho tannin on nutrient utilisation and tissue metabolism in sheep and rats ». In : *Journal of the Science of Food and Agriculture* 79.11 (août 1999), p. 1423-1430. ISSN : 0022-5142, 1097-0010. DOI : [10.1002/\(SICI\)1097-0010\(199908\)79:11<1423::AID-JSFA383>3.0.CO;2-8](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(199908)79:11<1423::AID-JSFA383>3.0.CO;2-8). URL : [https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(199908\)79:11%3C1423::AID-JSFA383%3E3.0.CO;2-8](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/(SICI)1097-0010(199908)79:11%3C1423::AID-JSFA383%3E3.0.CO;2-8) (visité le 09/02/2024).

- [135] T. ACAMOVIC et J. D. BROOKER. « Biochemistry of plant secondary metabolites and their effects in animals ». In : *The Proceedings of the Nutrition Society* 64.3 (août 2005), p. 403-412. ISSN : 0029-6651. DOI : [10.1079/pns2005449](https://doi.org/10.1079/pns2005449).
- [136] Jennifer K. KETZIS et al. « Evaluation of efficacy expectations for novel and non-chemical helminth control strategies in ruminants ». In : *Veterinary Parasitology* 139.4 (31 juill. 2006), p. 321-335. ISSN : 0304-4017. DOI : [10.1016/j.vetpar.2006.04.022](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.04.022).
- [137] Cyril AUGER et al. « Red Wine Phenolic Compounds Reduce Plasma Lipids and Apolipoprotein B and Prevent Early Aortic Atherosclerosis in Hypercholesterolemic Golden Syrian Hamsters (*Mesocricetus auratus*) ». In : *The Journal of Nutrition* 132.6 (1^{er} juin 2002), p. 1207-1213. ISSN : 0022-3166. DOI : [10.1093/jn/132.6.1207](https://doi.org/10.1093/jn/132.6.1207). URL : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022316622151291> (visité le 09/02/2024).
- [138] M. MATHER. « Migraines and tannins—any relationship? » In : *Headache* 37.8 (sept. 1997), p. 529. ISSN : 0017-8748. DOI : [10.1046/j.1526-4610.1997.3708529.x](https://doi.org/10.1046/j.1526-4610.1997.3708529.x).
- [139] Hirota FUJIKI et al. « Green tea : cancer preventive beverage and/or drug ». In : *Cancer Letters* 188.1 (15 déc. 2002), p. 9-13. ISSN : 0304-3835. DOI : [10.1016/S0304-3835\(02\)00379-8](https://doi.org/10.1016/S0304-3835(02)00379-8).
- [140] Pietro BUZZINI et al. « Antimicrobial and antiviral activity of hydrolysable tannins ». In : *Mini Reviews in Medicinal Chemistry* 8.12 (oct. 2008), p. 1179-1187. ISSN : 1389-5575. DOI : [10.2174/138955708786140990](https://doi.org/10.2174/138955708786140990).
- [141] Yusuf YILMAZ et Romeo T. TOLEDO. « Major flavonoids in grape seeds and skins : antioxidant capacity of catechin, epicatechin, and gallic acid ». In : *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52.2 (28 jan. 2004), p. 255-260. ISSN : 0021-8561. DOI : [10.1021/jf030117h](https://doi.org/10.1021/jf030117h).
- [142] Debosree GHOSH. « Tannins from Foods to Combat Diseases ». In : *International Journal of Pharma Research & Review* (17 avr. 2015).
- [143] G. MUTHUKUMAR et al. « Effect of tannins on soil respiration and glucose oxidation by microorganisms ». In : *Indian Journal of Experimental Biology* 19.11 (1^{er} jan. 1981). Number : 11, p. 1083-1085. ISSN : 0019-5189. URL : <https://eurekamag.com/research/005/274/005274471.php> (visité le 09/02/2024).
- [144] Praveen KUMAR ASHOK et Kumud UPADHYAYA. « Tannins are Astringent ». In : *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 1 (1^{er} sept. 2012), p. 45-50. ISSN : 2278-4136.
- [145] Francis CANON et al. « Photodissociation and Dissociative Photoionization Mass Spectrometry of Proteins and Noncovalent Protein-Ligand Complexes ». In : *Angewandte Chemie International Edition* 52.32 (5 août 2013), p. 8377-8381. ISSN : 14337851. DOI : [10.1002/anie.201304046](https://doi.org/10.1002/anie.201304046). URL : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/anie.201304046> (visité le 28/10/2021).

- [146] Susana SOARES et al. « Contribution of Human Oral Cells to Astringency by Binding Salivary Protein/Tannin Complexes ». In : *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 64.41 (19 oct. 2016), p. 7823-7828. ISSN : 1520-5118. DOI : [10.1021/acs.jafc.6b02659](https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b02659).
- [147] Hana MOUMEN. *UNICEF-WHO-The World Bank : Joint Child Malnutrition Estimates (JME) — Levels and Trends – 2023 edition*. UNICEF DATA. 18 mai 2023. URL : <https://data.unicef.org/resources/jme-report-2023/> (visité le 28/02/2024).
- [148] William R. AIMUTIS. « Plant-Based Proteins : The Good, Bad, and Ugly ». In : *Annual Review of Food Science and Technology* 13.1 (2022). _eprint : <https://doi.org/10.1146/annurev-food-092221-041723>, p. 1-17. DOI : [10.1146/annurev-food-092221-041723](https://doi.org/10.1146/annurev-food-092221-041723). URL : <https://doi.org/10.1146/annurev-food-092221-041723> (visité le 27/02/2024).
- [149] Gulsah KARABULUT, Gulden GOKSEN et Amin MOUSAVI KHANEGHAH. « Plant-based protein modification strategies towards challenges ». In : *Journal of Agriculture and Food Research* 15 (1^{er} mars 2024), p. 101017. ISSN : 2666-1543. DOI : [10.1016/j.jafr.2024.101017](https://doi.org/10.1016/j.jafr.2024.101017). URL : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2666154324000541> (visité le 01/03/2024).
- [150] William R. AIMUTIS. « Bioactive properties of milk proteins with particular focus on anticariogenesis ». In : *The Journal of Nutrition* 134.4 (avr. 2004), 989S-95S. ISSN : 0022-3166. DOI : [10.1093/jn/134.4.989S](https://doi.org/10.1093/jn/134.4.989S).
- [151] Ana R. MADUREIRA et al. « Bovine whey proteins – Overview on their main biological properties ». In : *Food Research International (Ottawa, Ont.)* 40.10 (déc. 2007), p. 1197-1211. ISSN : 0963-9969. DOI : [10.1016/j.foodres.2007.07.005](https://doi.org/10.1016/j.foodres.2007.07.005). URL : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7126817/> (visité le 27/02/2024).
- [152] Maeve HENCHION et al. « Future Protein Supply and Demand : Strategies and Factors Influencing a Sustainable Equilibrium ». In : *Foods* 6.7 (juill. 2017). Number : 7 Publisher : Multidisciplinary Digital Publishing Institute, p. 53. ISSN : 2304-8158. DOI : [10.3390/foods6070053](https://doi.org/10.3390/foods6070053). URL : <https://www.mdpi.com/2304-8158/6/7/53> (visité le 27/02/2024).
- [153] Marta LONNIE et al. « Exploring Health-Promoting Attributes of Plant Proteins as a Functional Ingredient for the Food Sector : A Systematic Review of Human Interventional Studies ». In : *Nutrients* 12.8 (30 juill. 2020), p. 2291. ISSN : 2072-6643. DOI : [10.3390/nu12082291](https://doi.org/10.3390/nu12082291).
- [154] J. W. ANDERSON, B. M. JOHNSTONE et M. E. COOK-NEWELL. « Meta-analysis of the effects of soy protein intake on serum lipids ». In : *The New England Journal of Medicine* 333.5 (3 août 1995), p. 276-282. ISSN : 0028-4793. DOI : [10.1056/NEJM199508033330502](https://doi.org/10.1056/NEJM199508033330502).

- [155] Luca AMAGLIANI et al. « The composition, extraction, functionality and applications of rice proteins : A review ». In : *Trends in Food Science & Technology* 64 (1^{er} juin 2017), p. 1-12. ISSN : 0924-2244. DOI : [10.1016/j.tifs.2017.01.008](https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.01.008). URL : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S092422441630070X> (visité le 27/02/2024).
- [156] Mike J. BOLAND et al. « The future supply of animal-derived protein for human consumption ». In : *Trends in Food Science & Technology* 29.1 (1^{er} jan. 2013), p. 62-73. ISSN : 0924-2244. DOI : [10.1016/j.tifs.2012.07.002](https://doi.org/10.1016/j.tifs.2012.07.002). URL : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924224412001458> (visité le 27/02/2024).
- [157] Li DAY. « Proteins from land plants – Potential resources for human nutrition and food security ». In : *Trends in Food Science & Technology* 32.1 (1^{er} juill. 2013), p. 25-42. ISSN : 0924-2244. DOI : [10.1016/j.tifs.2013.05.005](https://doi.org/10.1016/j.tifs.2013.05.005). URL : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S092422441300109X> (visité le 27/02/2024).
- [158] Khetan SHEVKANI et al. « Structural and functional characterization of kidney bean and field pea protein isolates : A comparative study ». In : *Food Hydrocolloids* 43 (1^{er} jan. 2015), p. 679-689. ISSN : 0268-005X. DOI : [10.1016/j.foodhyd.2014.07.024](https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.07.024). URL : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0268005X14002677> (visité le 27/02/2024).
- [159] Stefan H. M. GORISSEN et al. « Protein content and amino acid composition of commercially available plant-based protein isolates ». In : *Amino Acids* 50.12 (déc. 2018), p. 1685-1695. ISSN : 1438-2199. DOI : [10.1007/s00726-018-2640-5](https://doi.org/10.1007/s00726-018-2640-5).
- [160] Krishan KUMAR et al. « Genetically modified crops : current status and future prospects ». In : *Planta* 251.4 (31 mars 2020), p. 91. ISSN : 1432-2048. DOI : [10.1007/s00425-020-03372-8](https://doi.org/10.1007/s00425-020-03372-8).
- [161] Morfo ZEMBYLA et al. « Surface adsorption and lubrication properties of plant and dairy proteins : A comparative study ». In : *Food Hydrocolloids* 111 (fév. 2021), p. 106364. ISSN : 0268-005X. DOI : [10.1016/j.foodhyd.2020.106364](https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106364).
- [162] Sorin-Cristian VLĂDESCU et al. « Protein-induced delubrication : How plant-based and dairy proteins affect mouthfeel ». In : *Food Hydrocolloids* 134 (1^{er} jan. 2023), p. 107975. ISSN : 0268-005X. DOI : [10.1016/j.foodhyd.2022.107975](https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2022.107975). URL : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0268005X22004957> (visité le 23/08/2022).
- [163] Newsha OMRANI KHIABANIAN et al. « Chemical, textural, rheological, and sensorial properties of wheyless feta cheese as influenced by replacement of milk protein concentrate with pea protein isolate ». In : *Journal of Texture Studies* 51.3 (juin 2020), p. 488-500. ISSN : 1745-4603. DOI : [10.1111/jtxs.12508](https://doi.org/10.1111/jtxs.12508).
- [164] Anwasha SARKAR et Harjinder SINGH. « Emulsions and Foams Stabilised by Milk Proteins ». In : *Advanced Dairy Chemistry : Volume 1B : Proteins : Applied Aspects*. Sous la dir. de Paul L. H. MCSWEENEY et James A. O'MAHONY. New York, NY : Springer, 2016, p. 133-153. ISBN : 978-1-4939-2800-2. DOI : [10.1007/978-](https://doi.org/10.1007/978-)

- 1-4939-2800-2_5. URL : https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2800-2_5 (visité le 28/02/2024).
- [165] Benjamin ZEEB et al. « Modulation of the bitterness of pea and potato proteins by a complex coacervation method ». In : *Food & Function* 9.4 (25 avr. 2018). Publisher : The Royal Society of Chemistry, p. 2261-2269. ISSN : 2042-650X. DOI : [10.1039/C7F001849E](https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2018/fo/c7fo01849e). URL : <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2018/fo/c7fo01849e> (visité le 28/02/2024).
- [166] A. TROSZYŃSKA et al. « Investigation of astringency of extracts obtained from selected tannins-rich legume seeds ». In : *Food Quality and Preference*. The First European Conference on Sensory Science of Food and Beverages : "A Sense of Identity" 17.1 (1^{er} jan. 2006), p. 31-35. ISSN : 0950-3293. DOI : [10.1016/j.foodqual.2005.04.006](https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0950329305000686). URL : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0950329305000686> (visité le 28/02/2024).
- [167] D. ROSSETTI et al. « Astringency of tea catechins : More than an oral lubrication tactile percept ». In : *Food Hydrocolloids* 23.7 (oct. 2009), p. 1984-1992. ISSN : 0268005X. DOI : [10.1016/j.foodhyd.2009.03.001](https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0268005X09000538). URL : <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0268005X09000538> (visité le 28/10/2021).
- [168] Laura LAGUNA et Anwasha SARKAR. « Oral tribology : update on the relevance to study astringency in wines ». In : *Tribology - Materials, Surfaces & Interfaces* 11.2 (3 avr. 2017), p. 116-123. ISSN : 1751-5831, 1751-584X. DOI : [10.1080/17515831.2017.1347736](https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/17515831.2017.1347736). URL : <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/17515831.2017.1347736> (visité le 28/10/2021).
- [169] Shuanhong MA et al. « Astringent Mouthfeel as a Consequence of Lubrication Failure ». In : *Angewandte Chemie International Edition* 55.19 (4 mai 2016), p. 5793-5797. ISSN : 14337851. DOI : [10.1002/anie.201601667](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/anie.201601667). URL : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/anie.201601667> (visité le 17/03/2022).
- [170] R.E.D. RUDGE et al. « A tribological approach to astringency perception and astringency prevention ». In : *Food Hydrocolloids* 121 (déc. 2021), p. 106951. ISSN : 0268005X. DOI : [10.1016/j.foodhyd.2021.106951](https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0268005X21003672). URL : <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0268005X21003672> (visité le 17/03/2022).
- [171] Georgios AGORASTOS et al. « Lubrication behavior of ex-vivo salivary pellicle influenced by tannins, gallic acid and mannoproteins ». In : *Heliyon* 8.12 (1^{er} déc. 2022), e12347. ISSN : 2405-8440. DOI : [10.1016/j.heliyon.2022.e12347](https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2405844022036350). URL : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2405844022036350> (visité le 18/04/2023).
- [172] Y. KAWAMURA et al. « A neurophysiological study on astringent taste ». In : *The Japanese Journal of Physiology* 19.6 (déc. 1969), p. 851-865. ISSN : 0021-521X. DOI : [10.2170/jjphysiol.19.851](https://doi.org/10.2170/jjphysiol.19.851).
- [173] Susana SOARES et al. « Different phenolic compounds activate distinct human bitter taste receptors ». In : *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61.7 (20 fév. 2013), p. 1525-1533. ISSN : 1520-5118. DOI : [10.1021/jf304198k](https://doi.org/10.1021/jf304198k).

- [174] S. A. SIMON, W. L. HALL et S. S. SCHIFFMAN. « Astringent-tasting compounds alter ion transport across isolated canine lingual epithelia ». In : *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 43.1 (1^{er} sept. 1992), p. 271-283. ISSN : 0091-3057. DOI : [10.1016/0091-3057\(92\)90668-6](https://doi.org/10.1016/0091-3057(92)90668-6). URL : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0091305792906686> (visité le 14/06/2023).
- [175] Barry G. GREEN. « Oral astringency : A tactile component of flavor ». In : *Acta Psychologica* 84.1 (oct. 1993), p. 119-125. ISSN : 00016918. DOI : [10.1016/0001-6918\(93\)90078-6](https://doi.org/10.1016/0001-6918(93)90078-6). URL : <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0001691893900786> (visité le 28/10/2021).
- [176] N. SCHOBEL et al. « Astringency Is a Trigeminal Sensation That Involves the Activation of G Protein-Coupled Signaling by Phenolic Compounds ». In : *Chemical Senses* 39.6 (1^{er} juill. 2014), p. 471-487. ISSN : 0379-864X, 1464-3553. DOI : [10.1093/chemse/bju014](https://doi.org/10.1093/chemse/bju014). URL : <https://academic.oup.com/chemse/article-lookup/doi/10.1093/chemse/bju014> (visité le 28/10/2021).
- [177] Catherine A. LEE, Baraem ISMAIL et Zata M. VICKERS. « The role of salivary proteins in the mechanism of astringency ». In : *Journal of Food Science* 77.4 (avr. 2012), p. C381-387. ISSN : 1750-3841. DOI : [10.1111/j.1750-3841.2012.02644.x](https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2012.02644.x).
- [178] Catherine A. LEE et Zata M. VICKERS. « Astringency of foods may not be directly related to salivary lubricity ». In : *Journal of Food Science* 77.9 (sept. 2012), S302-306. ISSN : 1750-3841. DOI : [10.1111/j.1750-3841.2012.02860.x](https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2012.02860.x).
- [179] A HAGERMAN et C. T. ROBBINS. « Specificity of tannin-binding salivary proteins relative to diet selection by mammals ». In : *Specificity of tannin-binding salivary proteins relative to diet selection by mammals* 71.3 (1993). Place : Ottawa, ON Publisher : National Research Council of Canada, p. 628-633. ISSN : 0008-4301. DOI : [10.1139/z93-085](https://doi.org/10.1139/z93-085). URL : <https://cdnsciencepub.com/doi/abs/10.1139/z93-085>.
- [180] John HORNE, John HAYES et Harry T. LAWLESS. « Turbidity as a Measure of Salivary Protein Reactions with Astringent Substances ». In : *Chemical Senses* 27.7 (1^{er} sept. 2002), p. 653-659. ISSN : 0379-864X. DOI : [10.1093/chemse/27.7.653](https://doi.org/10.1093/chemse/27.7.653). URL : <https://doi.org/10.1093/chemse/27.7.653> (visité le 25/08/2023).
- [181] Pascale SARNI-MANCHADO et al. « Influence of the glycosylation of human salivary proline-rich proteins on their interactions with condensed tannins ». In : *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56.20 (22 oct. 2008), p. 9563-9569. ISSN : 1520-5118. DOI : [10.1021/jf801249e](https://doi.org/10.1021/jf801249e).
- [182] Natalia BROSSARD et al. « "Oral" Tribological Study on the Astringency Sensation of Red Wines ». In : *Journal of Texture Studies* 47.5 (2016). _eprint : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/jtxs.12184>, p. 392-402. ISSN : 1745-4603. DOI : [10.1111/jtxs.12184](https://doi.org/10.1111/jtxs.12184). URL : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/jtxs.12184> (visité le 13/03/2023).

- [183] D. ROSSETTI et al. « Interaction of human whole saliva and astringent dietary compounds investigated by interfacial shear rheology ». In : *Food Hydrocolloids* 22.6 (1^{er} août 2008), p. 1068-1078. ISSN : 0268-005X. DOI : [10.1016/j.foodhyd.2007.05.014](https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2007.05.014). URL : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0268005X07001476> (visité le 14/06/2023).
- [184] Massimo FUSCONI et al. « Qualitative mucin disorders in patients with primary Sjögren's syndrome : a literature review ». In : *Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal* 26.1 (jan. 2021), e71-e77. ISSN : 1698-4447. DOI : [10.4317/medoral.23996](https://doi.org/10.4317/medoral.23996). URL : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7806352/> (visité le 04/09/2023).
- [185] George HAJISHENGALLIS et Michael W. RUSSELL. « Chapter 15 - Innate Humoral Defense Factors ». In : *Mucosal Immunology (Fourth Edition)*. Sous la dir. de Jiri MESTECKY et al. Boston : Academic Press, 1^{er} jan. 2015, p. 251-270. ISBN : 978-0-12-415847-4. DOI : [10.1016/B978-0-12-415847-4.00015-X](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415847-4.00015-X). URL : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978012415847400015X> (visité le 28/08/2023).
- [186] Hélène BOZE et al. « Proline-Rich Salivary Proteins Have Extended Conformations ». In : *Biophysical Journal* 99.2 (21 juill. 2010), p. 656-665. ISSN : 0006-3495. DOI : [10.1016/j.bpj.2010.04.050](https://doi.org/10.1016/j.bpj.2010.04.050). URL : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2905104/> (visité le 29/02/2024).
- [187] Christine PASCAL et al. « Aggregation of a proline-rich protein induced by epigallocatechin gallate and condensed tannins : effect of protein glycosylation ». In : *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56.15 (13 août 2008), p. 6724-6732. ISSN : 1520-5118. DOI : [10.1021/jf800790d](https://doi.org/10.1021/jf800790d).
- [188] Francis CANON. « Contribution de la spectrométrie de masse à l'étude des interactions entre les protéines salivaires riche en proline et les tanins. » These de doctorat. Montpellier, SupAgro, 30 sept. 2010. URL : <https://www.theses.fr/2010NSAM0015> (visité le 06/10/2022).
- [189] A. BENNICK et al. « The location and nature of calcium-binding sites in salivary acidic proline-rich phosphoproteins ». In : *The Journal of Biological Chemistry* 256.10 (25 mai 1981), p. 4741-4746. ISSN : 0021-9258. DOI : [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)69314-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)69314-2).
- [190] Q YAN et A BENNICK. « Identification of histatins as tannin-binding proteins in human saliva ». In : *Biochemical Journal* 311.1 (1^{er} oct. 1995), p. 341-347. ISSN : 0264-6021. DOI : [10.1042/bj3110341](https://doi.org/10.1042/bj3110341). URL : <https://doi.org/10.1042/bj3110341> (visité le 28/08/2023).
- [191] K. SUGIYAMA et K. OGATA. « High-performance liquid chromatographic determination of histatins in human saliva ». In : *Journal of Chromatography B : Biomedical Sciences and Applications* 619.2 (22 sept. 1993), p. 306-309. ISSN : 0378-4347. DOI : [10.1016/0378-4347\(93\)80121-J](https://doi.org/10.1016/0378-4347(93)80121-J). URL : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/037843479380121J> (visité le 29/02/2024).

- [192] Susana SOARES et al. « Reactivity of Human Salivary Proteins Families Toward Food Polyphenols ». In : *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59.10 (25 mai 2011), p. 5535-5547. ISSN : 0021-8561, 1520-5118. DOI : [10.1021/jf104975d](https://doi.org/10.1021/jf104975d). URL : <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf104975d> (visité le 14/06/2023).
- [193] Takuya SHIMADA. « Salivary Proteins as a Defense Against Dietary Tannins ». In : *Journal of Chemical Ecology* 32.6 (1^{er} juin 2006), p. 1149-1163. ISSN : 1573-1561. DOI : [10.1007/s10886-006-9077-0](https://doi.org/10.1007/s10886-006-9077-0). URL : <https://doi.org/10.1007/s10886-006-9077-0> (visité le 11/10/2023).
- [194] Heather M. SHEWAN, Clementine PRADAL et Jason R. STOKES. « Tribology and its growing use toward the study of food oral processing and sensory perception ». In : *Journal of Texture Studies* (19 juin 2019), jtxs.12452. ISSN : 0022-4901, 1745-4603. DOI : [10.1111/jtxs.12452](https://doi.org/10.1111/jtxs.12452). URL : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jtxs.12452> (visité le 17/03/2022).
- [195] Maria Alessandra PAISSONI et al. « Mouthfeel subqualities in wines : A current insight on sensory descriptors and physical–chemical markers ». In : *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 22.4 (juill. 2023), p. 3328-3365. ISSN : 1541-4337, 1541-4337. DOI : [10.1111/1541-4337.13184](https://doi.org/10.1111/1541-4337.13184). URL : <https://ift.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/1541-4337.13184> (visité le 30/10/2023).
- [196] A. CHOJNICKA-PASZUN, H. H. J. de JONGH et C. G. de KRUIF. « Sensory perception and lubrication properties of milk : Influence of fat content ». In : *International Dairy Journal*. 7th NIZO Dairy Conference 26.1 (1^{er} sept. 2012), p. 15-22. ISSN : 0958-6946. DOI : [10.1016/j.idairyj.2012.04.003](https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2012.04.003). URL : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0958694612000969> (visité le 22/07/2022).
- [197] Emma M. KROP et al. « On relating rheology and oral tribology to sensory properties in hydrogels ». In : *Food Hydrocolloids* 88 (1^{er} mars 2019), p. 101-113. ISSN : 0268-005X. DOI : [10.1016/j.foodhyd.2018.09.040](https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.09.040). URL : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0268005X18307021> (visité le 22/07/2022).
- [198] Marc MASEN et Philippa CANN. « Tribology test design for friction measurements with application to oral medicines ». In : *Biotribology* 35-36 (1^{er} déc. 2023), p. 100260. ISSN : 2352-5738. DOI : [10.1016/j.biotri.2023.100260](https://doi.org/10.1016/j.biotri.2023.100260). URL : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2352573823000276> (visité le 30/10/2023).
- [199] S. LEE et al. « Chocolate at a Sliding Interface ». In : *Journal of Food Science* 67.7 (sept. 2002), p. 2712-2717. ISSN : 0022-1147, 1750-3841. DOI : [10.1111/j.1365-2621.2002.tb08803.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2002.tb08803.x). URL : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2621.2002.tb08803.x> (visité le 19/05/2022).
- [200] Pere MORELL, Jianshe CHEN et Susana FISZMAN. « The role of starch and saliva in tribology studies and the sensory perception of protein-added yogurts ». In : *Food & Function* 8.2 (23 fév. 2017). Publisher : The Royal Society of Chemistry, p. 545-553. ISSN : 2042-650X. DOI : [10.1039/C6F000259E](https://doi.org/10.1039/C6F000259E). URL : <https://doi.org/10.1039/C6F000259E>

- [//pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2017/fo/c6fo00259e](https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2017/fo/c6fo00259e) (visité le 21/07/2022).
- [201] G. CARPENTER et al. « A study of saliva lubrication using a compliant oral mimic ». In : *Food Hydrocolloids* 92 (juill. 2019), p. 10-18. ISSN : 0268005X. DOI : [10.1016/j.foodhyd.2019.01.049](https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.01.049). URL : <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0268005X1831885X> (visité le 17/03/2022).
- [202] D DRESSELHUIS et al. « Application of oral tissue in tribological measurements in an emulsion perception context ». In : *Food Hydrocolloids* 22.2 (mars 2008), p. 323-335. ISSN : 0268005X. DOI : [10.1016/j.foodhyd.2006.12.008](https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2006.12.008). URL : <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0268005X06003006> (visité le 28/10/2021).
- [203] J.H.H. BONGAERTS, K. FOURTOUNI et J.R. STOKES. « Soft-tribology : Lubrication in a compliant PDMS–PDMS contact ». In : *Tribology International* 40.10 (oct. 2007), p. 1531-1542. ISSN : 0301679X. DOI : [10.1016/j.triboint.2007.01.007](https://doi.org/10.1016/j.triboint.2007.01.007). URL : <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0301679X07000126> (visité le 28/10/2021).
- [204] Rutuja UPADHYAY, Natalia BROSSARD et Jianshe CHEN. « Mechanisms underlying astringency : introduction to an oral tribology approach ». In : *Journal of Physics D : Applied Physics* 49.10 (9 mars 2016), p. 104003. ISSN : 0022-3727, 1361-6463. DOI : [10.1088/0022-3727/49/10/104003](https://doi.org/10.1088/0022-3727/49/10/104003). URL : <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/0022-3727/49/10/104003> (visité le 17/03/2022).
- [205] Helen S. JOYNER (MELITO), Chris W. PERNELL et Christopher R. DAUBERT. « Beyond surface selection : The impact of different methodologies on tribological measurements ». In : *Journal of Food Engineering* 134 (août 2014), p. 45-58. ISSN : 02608774. DOI : [10.1016/j.jfoodeng.2014.03.003](https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2014.03.003). URL : <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0260877414001009> (visité le 19/05/2022).
- [206] Laura LAGUNA et al. « New Approach to Food Difficulty Perception : Food Structure, Food Oral Processing and Individual's Physical Strength ». In : *Journal of Texture Studies* 47.5 (2016). _eprint : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/jtxs.12190>, p. 413-422. ISSN : 1745-4603. DOI : [10.1111/jtxs.12190](https://doi.org/10.1111/jtxs.12190). URL : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/jtxs.12190> (visité le 24/03/2022).
- [207] Rohit SRIVASTAVA et al. « A new biomimetic set-up to understand the role of the kinematic, mechanical, and surface characteristics of the tongue in food oral tribological studies ». In : *Food Hydrocolloids* 115 (1^{er} juin 2021), p. 106602. ISSN : 0268-005X. DOI : [10.1016/j.foodhyd.2021.106602](https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.106602). URL : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0268005X21000187> (visité le 06/07/2022).
- [208] Lamis ALI. « Assessing Impact of Food Structure on Oral Tribology and In-Vitro Digestion of Dairy Products ». In : *All Graduate Theses and Dissertations, Fall 2023 to Present* (1^{er} mai 2024). DOI : <https://doi.org/10.26076/faa9-fff7>. URL : <https://digitalcommons.usu.edu/etd2023/108>.

- [209] Marie-Anne van STEE, Els de HOOG et Fred van de VELDE. « Oral Parameters Affecting Ex-vivo Tribology ». In : *Biotribology* 11 (sept. 2017), p. 84-91. ISSN : 23525738. DOI : [10.1016/j.biotri.2017.05.001](https://doi.org/10.1016/j.biotri.2017.05.001). URL : <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2352573816301032> (visité le 17/03/2022).
- [210] René A. de WIJK, Florian WULFERT et Jon F. PRINZ. « Oral processing assessed by M-mode ultrasound imaging varies with food attribute ». In : *Physiology & Behavior. Making Sense of Food* 89.1 (30 août 2006), p. 15-21. ISSN : 0031-9384. DOI : [10.1016/j.physbeh.2006.05.021](https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2006.05.021). URL : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0031938406002290> (visité le 12/07/2022).
- [211] René A de WIJK, Lina ENGELEN et Jon F PRINZ. « The role of intra-oral manipulation in the perception of sensory attributes ». In : *Appetite* 40.1 (1^{er} fév. 2003), p. 1-7. ISSN : 0195-6663. DOI : [10.1016/S0195-6663\(02\)00172-1](https://doi.org/10.1016/S0195-6663(02)00172-1). URL : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0195666302001721> (visité le 12/07/2022).
- [212] Anwesha SARKAR et al. « Lubrication of soft oral surfaces ». In : *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 39 (fév. 2019), p. 61-75. ISSN : 13590294. DOI : [10.1016/j.cocis.2019.01.008](https://doi.org/10.1016/j.cocis.2019.01.008). URL : <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359029418301006> (visité le 28/10/2021).
- [213] A KULLAA-MIKKONEN, M HYNYNEN et P HYVONEN. « Filiform Papillae of Human, Rat and Swine Tongue ». In : (), p. 5. DOI : [10.1159/000146457](https://doi.org/10.1159/000146457). URL : <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2449029/>.
- [214] Malal KANE et Benyebka BOU-SAID. « A Study of Roughness and Non-Newtonian Effects in Lubricated Contacts ». In : *Journal of Tribology* 127.3 (13 juin 2005), p. 575-581. ISSN : 0742-4787. DOI : [10.1115/1.1866169](https://doi.org/10.1115/1.1866169). URL : <https://doi.org/10.1115/1.1866169> (visité le 18/07/2022).
- [215] Alina KRZEMINSKI et al. « Measurement of lubricating properties in a tribosystem with different surface roughness ». In : *International Dairy Journal. 7th NIZO Dairy Conference* 26.1 (1^{er} sept. 2012), p. 23-30. ISSN : 0958-6946. DOI : [10.1016/j.idairyj.2012.02.005](https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2012.02.005). URL : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0958694612000489> (visité le 18/07/2022).
- [216] Brogan L. TAYLOR et Tom B. MILLS. « Surface texture modifications for oral processing applications ». In : *Biotribology* 23 (sept. 2020), p. 100132. ISSN : 23525738. DOI : [10.1016/j.biotri.2020.100132](https://doi.org/10.1016/j.biotri.2020.100132). URL : <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2352573820300184> (visité le 18/05/2022).
- [217] H. RANC et al. « Effect of surface structure on frictional behaviour of a tongue/palate tribological system ». In : *Tribology International* 39.12 (déc. 2006), p. 1518-1526. ISSN : 0301679X. DOI : [10.1016/j.triboint.2006.01.017](https://doi.org/10.1016/j.triboint.2006.01.017). URL : <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0301679X06000272> (visité le 19/05/2022).

- [218] Els H. A. de HOOG et al. « Lubrication of Oral Surfaces by Food Emulsions : the Importance of Surface Characteristics ». In : *Journal of Food Science* 71.7 (sept. 2006), E337-E341. ISSN : 0022-1147, 1750-3841. DOI : [10.1111/j.1750-3841.2006.00140.x](https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2006.00140.x). URL : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1750-3841.2006.00140.x> (visité le 13/06/2022).
- [219] Woroud Abdulrahman ALSANEI et Jianshe CHEN. « Studies of the Oral Capabilities in Relation to Bolus Manipulations and the Ease of Initiating Bolus Flow ». In : *Journal of Texture Studies* 45.1 (2014). _eprint : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/jtxs.12041>, p. 1-12. ISSN : 1745-4603. DOI : [10.1111/jtxs.12041](https://doi.org/10.1111/jtxs.12041). URL : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/jtxs.12041> (visité le 24/03/2022).
- [220] S. CHENG et al. « Viscoelastic properties of the tongue and soft palate using MR elastography ». In : *Journal of Biomechanics* 44.3 (3 fév. 2011), p. 450-454. ISSN : 0021-9290. DOI : [10.1016/j.jbiomech.2010.09.027](https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2010.09.027). URL : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021929010005427> (visité le 24/03/2022).
- [221] Sayaka ISHIHARA et al. « Compression Test of Food Gels on Artificial Tongue and Its Comparison with Human Test ». In : *Journal of Texture Studies* 44.2 (2013). _eprint : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/jtxs.12002>, p. 104-114. ISSN : 1745-4603. DOI : [10.1111/jtxs.12002](https://doi.org/10.1111/jtxs.12002). URL : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/jtxs.12002> (visité le 26/10/2023).
- [222] Seunghwan LEE et Nicholas D. SPENCER. « Aqueous lubrication of polymers : Influence of surface modification ». In : *Tribology International* 38.11 (nov. 2005), p. 922-930. ISSN : 0301679X. DOI : [10.1016/j.triboint.2005.07.017](https://doi.org/10.1016/j.triboint.2005.07.017). URL : <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0301679X05001908> (visité le 31/05/2022).
- [223] Nikolaos NIKOGEORGOS, Jan Busk MADSEN et Seunghwan LEE. « Influence of impurities and contact scale on the lubricating properties of bovine submaxillary mucin (BSM) films on a hydrophobic surface ». In : *Colloids and Surfaces B : Biointerfaces* 122 (oct. 2014), p. 760-766. ISSN : 09277765. DOI : [10.1016/j.colsurfb.2014.08.017](https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.08.017). URL : <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927776514004391> (visité le 31/05/2022).
- [224] J. H. H. BONGAERTS, D. ROSSETTI et J. R. STOKES. « The Lubricating Properties of Human Whole Saliva ». In : *Tribology Letters* 27.3 (24 juill. 2007), p. 277-287. ISSN : 1023-8883, 1573-2711. DOI : [10.1007/s11249-007-9232-y](https://doi.org/10.1007/s11249-007-9232-y). URL : <http://link.springer.com/10.1007/s11249-007-9232-y> (visité le 19/05/2022).
- [225] Hilal Y. ÇELEBIOĞLU et al. « Investigation of the interaction between mucins and -lactoglobulin under tribological stress ». In : *Food Hydrocolloids* 54 (mars 2016), p. 57-65. ISSN : 0268005X. DOI : [10.1016/j.foodhyd.2015.09.013](https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.09.013). URL : <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0268005X15300886> (visité le 31/05/2022).

- [226] Nengneng FAN et al. « Dynamic Tribology Protocol (DTP) : Response of salivary pellicle to dairy protein interactions validated against sensory perception ». In : *Food Hydrocolloids* 113 (avr. 2021), p. 106478. ISSN : 0268005X. DOI : [10.1016/j.foodhyd.2020.106478](https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106478). URL : <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0268005X20328526> (visité le 19/05/2022).
- [227] Jung Min KIM, Frederik WOLF et Stefan K. BAIER. « Effect of varying mixing ratio of PDMS on the consistency of the soft-contact Stribeck curve for glycerol solutions ». In : *Tribology International*. The International Conference on BioTribology 2014 89 (1^{er} sept. 2015), p. 46-53. ISSN : 0301-679X. DOI : [10.1016/j.triboint.2014.12.010](https://doi.org/10.1016/j.triboint.2014.12.010). URL : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0301679X14004393> (visité le 21/07/2022).
- [228] J. de VICENTE, J.R. STOKES et H.A. SPIKES. « The Frictional Properties of Newtonian Fluids in Rolling–Sliding soft-EHL Contact ». In : *Tribology Letters* 20.3 (1^{er} déc. 2005), p. 273-286. ISSN : 1573-2711. DOI : [10.1007/s11249-005-9067-3](https://doi.org/10.1007/s11249-005-9067-3). URL : <https://doi.org/10.1007/s11249-005-9067-3> (visité le 22/07/2022).
- [229] J. de VICENTE, J. R. STOKES et H. A. SPIKES. « Lubrication properties of non-adsorbing polymer solutions in soft elastohydrodynamic (EHD) contacts ». In : *Tribology International* 38.5 (1^{er} mai 2005), p. 515-526. ISSN : 0301-679X. DOI : [10.1016/j.triboint.2004.11.001](https://doi.org/10.1016/j.triboint.2004.11.001). URL : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0301679X04002348> (visité le 22/07/2022).
- [230] J. de VICENTE, J. R. STOKES et H. A. SPIKES. « Soft lubrication of model hydrocolloids ». In : *Food Hydrocolloids*. Part Special issue : WCFS Food Summit 20.4 (1^{er} juin 2006), p. 483-491. ISSN : 0268-005X. DOI : [10.1016/j.foodhyd.2005.04.005](https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2005.04.005). URL : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0268005X05000706> (visité le 22/07/2022).
- [231] J. de VICENTE, H. A. SPIKES et J. R. STOKES. « Viscosity Ratio Effect in the Emulsion Lubrication of Soft EHL Contact ». In : *Journal of Tribology* 128.4 (1^{er} oct. 2006), p. 795-800. ISSN : 0742-4787, 1528-8897. DOI : [10.1115/1.2345400](https://doi.org/10.1115/1.2345400). URL : <https://asmedigitalcollection.asme.org/tribology/article/128/4/795/471311/Viscosity-Ratio-Effect-in-the-Emulsion-Lubrication> (visité le 18/05/2022).
- [232] S. A. RODRIGUES et al. « Lubrication of chocolate during oral processing ». In : *Food & Function* 8.2 (23 fév. 2017). Publisher : The Royal Society of Chemistry, p. 533-544. ISSN : 2042-650X. DOI : [10.1039/C6F000950F](https://doi.org/10.1039/C6F000950F). URL : <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2017/fo/c6fo00950f> (visité le 22/07/2022).
- [233] Nichola SELWAY, Vincent CHAN et Jason R. STOKES. « Influence of fluid viscosity and wetting on multiscale viscoelastic lubrication in soft tribological contacts ». In : *Soft Matter* 13.8 (22 fév. 2017). Publisher : The Royal Society of Chemistry, p. 1702-1715. ISSN : 1744-6848. DOI : [10.1039/C6SM02417C](https://doi.org/10.1039/C6SM02417C). URL : <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2017/sm/c6sm02417c> (visité le 22/07/2022).

- [234] Bin ZHANG et al. « Tribology of swollen starch granule suspensions from maize and potato ». In : *Carbohydrate Polymers* 155 (2 jan. 2017), p. 128-135. ISSN : 0144-8617. DOI : [10.1016/j.carbpol.2016.08.064](https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.08.064). URL : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144861716310086> (visité le 22/07/2022).
- [235] Laura LAGUNA et al. « Exploring mouthfeel in model wines : Sensory-to-instrumental approaches ». In : *Food Research International* 102 (1^{er} déc. 2017), p. 478-486. ISSN : 0963-9969. DOI : [10.1016/j.foodres.2017.09.009](https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.09.009). URL : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996917305665> (visité le 13/03/2023).
- [236] M. E MALONE, I. A. M APPELQVIST et I. T NORTON. « Oral behaviour of food hydrocolloids and emulsions. Part 1. Lubrication and deposition considerations ». In : *Food Hydrocolloids*. 6th International Hydrocolloids Conference - Part 2 17.6 (1^{er} nov. 2003), p. 763-773. ISSN : 0268-005X. DOI : [10.1016/S0268-005X\(03\)00097-3](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(03)00097-3). URL : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0268005X03000973> (visité le 06/07/2022).
- [237] C. MYANT, H. A. SPIKES et J. R. STOKES. « Influence of load and elastic properties on the rolling and sliding friction of lubricated compliant contacts ». In : *Tribology International* 43.1 (1^{er} jan. 2010), p. 55-63. ISSN : 0301-679X. DOI : [10.1016/j.triboint.2009.04.034](https://doi.org/10.1016/j.triboint.2009.04.034). URL : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0301679X09001145> (visité le 06/07/2022).
- [238] Nichola SELWAY et Jason R. STOKES. « Insights into the dynamics of oral lubrication and mouthfeel using soft tribology : Differentiating semi-fluid foods with similar rheology ». In : *Food Research International* 54.1 (1^{er} nov. 2013), p. 423-431. ISSN : 0963-9969. DOI : [10.1016/j.foodres.2013.07.044](https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.07.044). URL : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996913004109> (visité le 22/07/2022).
- [239] Adam STEINBACH et al. « Normal force-controlled tribological measurement of soft drinks and lubrication additives ». In : *Journal of Food Measurement and Characterization* 8.2 (1^{er} juin 2014), p. 142-148. ISSN : 2193-4134. DOI : [10.1007/s11694-014-9174-7](https://doi.org/10.1007/s11694-014-9174-7). URL : <https://doi.org/10.1007/s11694-014-9174-7> (visité le 06/07/2022).
- [240] B. VARDHANABHUTI et al. « Lubricating properties of human whole saliva as affected by -lactoglobulin ». In : *Food Hydrocolloids* 25.6 (1^{er} août 2011), p. 1499-1506. ISSN : 0268-005X. DOI : [10.1016/j.foodhyd.2011.02.021](https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.02.021). URL : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0268005X11000646> (visité le 05/09/2023).
- [241] Shaoyang WANG et al. « Astringency sub-qualities drying and pucker are driven by tannin and pH – Insights from sensory and tribology of a model wine system ». In : *Food Hydrocolloids* 109 (déc. 2020), p. 106109. ISSN : 0268005X. DOI : [10.1016/j.foodhyd.2020.106109](https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106109). URL : <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0268005X20311395> (visité le 17/03/2022).

- [242] Qi WANG, Yang ZHU et Jianshe CHEN. « Development of a simulated tongue substrate for in vitro soft “oral” tribology study ». In : *Food Hydrocolloids* 120 (nov. 2021), p. 106991. ISSN : 0268005X. DOI : [10.1016/j.foodhyd.2021.106991](https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.106991). URL : <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0268005X21004070> (visité le 28/10/2021).
- [243] Agnieszka CHOJNICKA et al. « Lubrication Properties of Protein Aggregate Dispersions in a Soft Contact ». In : *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56.4 (1^{er} fév. 2008), p. 1274-1282. ISSN : 0021-8561, 1520-5118. DOI : [10.1021/jf0720988](https://doi.org/10.1021/jf0720988). URL : <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf0720988> (visité le 17/03/2022).
- [244] Agnieszka CHOJNICKA-PASZUN et Harmen.H.J. de JONGH. « Friction properties of oral surface analogs and their interaction with polysaccharide/MCC particle dispersions ». In : *Food Research International* 62 (août 2014), p. 1020-1028. ISSN : 09639969. DOI : [10.1016/j.foodres.2014.05.028](https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.05.028). URL : <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996914003330> (visité le 17/03/2022).
- [245] Phuong T.M. NGUYEN, Bhesh BHANDARI et Sangeeta PRAKASH. « Tribological method to measure lubricating properties of dairy products ». In : *Journal of Food Engineering* 168 (jan. 2016), p. 27-34. ISSN : 02608774. DOI : [10.1016/j.jfoodeng.2015.07.011](https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2015.07.011). URL : <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0260877415003106> (visité le 13/06/2022).
- [246] Alina SONNE et al. « Improved mapping of in-mouth creaminess of semi-solid dairy products by combining rheology, particle size, and tribology data ». In : *LWT - Food Science and Technology* 59.1 (1^{er} nov. 2014), p. 342-347. ISSN : 0023-6438. DOI : [10.1016/j.lwt.2014.05.047](https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.05.047). URL : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643814003363> (visité le 21/07/2022).
- [247] B. LE CALVÉ et al. « Fat Perception : How Sensitive are We? » In : *Journal of Texture Studies* 46.3 (2015). _eprint : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/jtxs.12120>, p. 200-211. ISSN : 1745-4603. DOI : [10.1111/jtxs.12120](https://doi.org/10.1111/jtxs.12120). URL : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/jtxs.12120> (visité le 21/09/2023).
- [248] Daniel FOX et al. « Mouthfeel of Beer : Development of Tribology Method and Correlation with Sensory Data from an Online Database ». In : *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 80.2 (3 avr. 2022). Publisher : Taylor & Francis _eprint : <https://doi.org/10.1080/03610470.2021.1938430>, p. 112-127. ISSN : 0361-0470. DOI : [10.1080/03610470.2021.1938430](https://doi.org/10.1080/03610470.2021.1938430). URL : <https://doi.org/10.1080/03610470.2021.1938430> (visité le 26/09/2022).
- [249] Kartik S. PONDICHERY, Florian RUMMEL et Joerg LAEUGER. « Extended stribeck curves for food samples ». In : *Biosurface and Biotribology* 4.1 (2018). _eprint : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1049/bsbt.2018.0003>, p. 34-37. ISSN : 2405-4518. DOI : [10.1049/bsbt.2018.0003](https://doi.org/10.1049/bsbt.2018.0003). URL : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1049/bsbt.2018.0003> (visité le 21/07/2022).

- [250] Ana Margarida CARVALHO-DA-SILVA et al. « Oral processing of two milk chocolate samples ». In : *Food & Function* 4.3 (26 fév. 2013). Publisher : The Royal Society of Chemistry, p. 461-469. ISSN : 2042-650X. DOI : [10.1039/C2FO30173C](https://doi.org/10.1039/C2FO30173C). URL : <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2013/fo/c2fo30173c> (visité le 21/07/2022).
- [251] S. M. GOH et al. « Tribological measurements of foods using a rheometer ». In : *Food Research International* 43.1 (1^{er} jan. 2010), p. 183-186. ISSN : 0963-9969. DOI : [10.1016/j.foodres.2009.09.024](https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.09.024). URL : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996909002890> (visité le 06/07/2022).
- [252] F. C. GODOI, B. R. BHANDARI et Sangeeta PRAKASH. « Tribo-rheology and sensory analysis of a dairy semi-solid. ». In : *Food Hydrocolloids* 70 (2017). Publisher : Elsevier Ltd, p. 240-250. ISSN : 0268-005X. URL : <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20173219371> (visité le 06/07/2022).
- [253] Kenneth KIESERLING, Sebastian SCHALOW et Stephan DRUSCH. « Method Development and Validation of Tribological Measurements for Differentiation of Food in a Rheometer ». In : *Biotribology* 16 (1^{er} déc. 2018), p. 25-34. ISSN : 2352-5738. DOI : [10.1016/j.biotri.2018.09.002](https://doi.org/10.1016/j.biotri.2018.09.002). URL : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2352573818300039> (visité le 21/07/2022).
- [254] Natalia BROSSARD et al. « Astringency sub-qualities of red wines and the influence of wine–saliva aggregates ». In : *International Journal of Food Science & Technology* 56.10 (2021). _eprint : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/ijfs.15065>, p. 5382-5394. ISSN : 1365-2621. DOI : [10.1111/ijfs.15065](https://doi.org/10.1111/ijfs.15065). URL : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/ijfs.15065> (visité le 26/04/2023).
- [255] Jianshe CHEN, Zhenyu LIU et Sangeeta PRAKASH. « Lubrication studies of fluid food using a simple experimental set up ». In : *Food Hydrocolloids* 42 (déc. 2014), p. 100-105. ISSN : 0268005X. DOI : [10.1016/j.foodhyd.2014.01.003](https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.01.003). URL : <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0268005X14000071> (visité le 17/03/2022).
- [256] Solange SANAHUJA et al. « Spectral analysis of the stick-slip phenomenon in “oral” tribological texture evaluation ». In : *Journal of Texture Studies* 48.4 (2017). _eprint : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/jtxs.12266>, p. 318-334. ISSN : 1745-4603. DOI : [10.1111/jtxs.12266](https://doi.org/10.1111/jtxs.12266). URL : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/jtxs.12266> (visité le 21/07/2022).
- [257] Qi WANG, Xinmiao WANG et Jianshe CHEN. « A new design of soft texture analyzer tribometer (STAT) for in vitro oral lubrication study ». In : *Food Hydrocolloids* 110 (1^{er} jan. 2021), p. 106146. ISSN : 0268-005X. DOI : [10.1016/j.foodhyd.2020.106146](https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106146). URL : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0268005X20309425> (visité le 06/07/2022).
- [258] René A. de WIJK et Jon F. PRINZ. « The role of friction in perceived oral texture ». In : *Food Quality and Preference* 16.2 (mars 2005), p. 121-129. ISSN : 09503293. DOI : [10.1016/j.foodqual.2004.03.002](https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2004.03.002). URL : <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0950329304000321> (visité le 06/07/2022).

- [259] J. L. KOKINI, J. B. KADANE et E. L. CUSSLER. « Liquid Texture Perceived in the Mouth¹ ». In : *Journal of Texture Studies* 8.2 (1977). _eprint : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/j.1745-4603.1977.tb01175.x>, p. 195-218. ISSN : 1745-4603. DOI : [10.1111/j.1745-4603.1977.tb01175.x](https://doi.org/10.1111/j.1745-4603.1977.tb01175.x). URL : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1745-4603.1977.tb01175.x> (visité le 29/08/2023).
- [260] Francesca BODEGA et al. « Role of MUC1 in lubrication of pleural mesothelial cells cultured on fibrine gel ». In : *Tissue and Cell* 70 (1^{er} juin 2021), p. 101503. ISSN : 0040-8166. DOI : [10.1016/j.tice.2021.101503](https://doi.org/10.1016/j.tice.2021.101503). URL : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0040816621000197> (visité le 21/08/2023).
- [261] Håkan OLSSON, Vincent HENRICSSON et Tony AXÉLL. « A new device for measuring oral mucosal surface friction - reference values ». In : *European Journal of Oral Sciences* 99.4 (août 1991), p. 329-332. ISSN : 0909-8836, 1600-0722. DOI : [10.1111/j.1600-0722.1991.tb01036.x](https://doi.org/10.1111/j.1600-0722.1991.tb01036.x). URL : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1600-0722.1991.tb01036.x> (visité le 15/06/2022).
- [262] Ryan S. EDMONDS et al. « Friction measurements of model saliva-wine solutions between polydimethylsiloxane surfaces ». In : *Food Hydrocolloids* 113 (avr. 2021), p. 106522. ISSN : 0268005X. DOI : [10.1016/j.foodhyd.2020.106522](https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106522). URL : <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0268005X20328964> (visité le 17/03/2022).
- [263] Gustavo LUENGO et al. « Thin Film Rheology and Tribology of Chocolate ». In : *Journal of Food Science* 62.4 (1997). _eprint : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/j.1365-2621.1997.tb15453.x>, p. 767-812. ISSN : 1750-3841. DOI : [10.1111/j.1365-2621.1997.tb15453.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1997.tb15453.x). URL : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1365-2621.1997.tb15453.x> (visité le 06/07/2022).
- [264] Aude A. WATRELOT, Tonya L. KUHLE et Andrew L. WATERHOUSE. « Friction forces of saliva and red wine on hydrophobic and hydrophilic surfaces ». In : *Food Research International* 116 (fév. 2019), p. 1041-1046. ISSN : 09639969. DOI : [10.1016/j.foodres.2018.09.043](https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.09.043). URL : <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996918307646> (visité le 13/06/2022).
- [265] Diane M. DRESSELHUIS et al. « Tribology of o/w Emulsions Under Mouth-like Conditions : Determinants of Friction ». In : *Food Biophysics* 2.4 (1^{er} déc. 2007), p. 158-171. ISSN : 1557-1866. DOI : [10.1007/s11483-007-9040-9](https://doi.org/10.1007/s11483-007-9040-9). URL : <https://doi.org/10.1007/s11483-007-9040-9> (visité le 21/07/2022).
- [266] D.M. DRESSELHUIS et al. « The occurrence of in-mouth coalescence of emulsion droplets in relation to perception of fat ». In : *Food Hydrocolloids* 22.6 (août 2008), p. 1170-1183. ISSN : 0268005X. DOI : [10.1016/j.foodhyd.2007.06.013](https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2007.06.013). URL : <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0268005X07001774> (visité le 17/03/2022).

- [267] Kun LIU et al. « Tribological properties of rice starch in liquid and semi-solid food model systems ». In : *Food Hydrocolloids* 58 (1^{er} juill. 2016), p. 184-193. ISSN : 0268-005X. DOI : [10.1016/j.foodhyd.2016.02.026](https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.02.026). URL : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0268005X16300662> (visité le 21/07/2022).
- [268] Tijs A.M. ROVERS et al. « Potential of Microbubbles as Fat Replacer : Effect on Rheological, Tribological and Sensorial Properties of Model Food Systems ». In : *Journal of Texture Studies* 47.3 (2016). _eprint : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/jtxs.12175>, p. 220-230. ISSN : 1745-4603. DOI : [10.1111/jtxs.12175](https://doi.org/10.1111/jtxs.12175). URL : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/jtxs.12175> (visité le 21/09/2023).
- [269] S. TSUI et al. « Friction measurements with yoghurt in a simulated tongue-palate contact ». In : *Biotribology* 8 (1^{er} déc. 2016), p. 1-11. ISSN : 2352-5738. DOI : [10.1016/j.biotri.2016.02.001](https://doi.org/10.1016/j.biotri.2016.02.001). URL : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2352573816300026> (visité le 06/07/2022).
- [270] Georgios SAMARAS et al. « Measurement of molten chocolate friction under simulated tongue-palate kinematics : Effect of cocoa solids content and aeration ». In : *Current Research in Food Science* 3 (1^{er} nov. 2020), p. 304-313. ISSN : 2665-9271. DOI : [10.1016/j.crfs.2020.10.002](https://doi.org/10.1016/j.crfs.2020.10.002). URL : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2665927120300368> (visité le 06/07/2022).
- [271] J.F. PRINZ, R.A. de WIJK et L. HUNTJENS. « Load dependency of the coefficient of friction of oral mucosa ». In : *Food Hydrocolloids* 21.3 (mai 2007), p. 402-408. ISSN : 0268005X. DOI : [10.1016/j.foodhyd.2006.05.005](https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2006.05.005). URL : <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0268005X06001020> (visité le 17/03/2022).
- [272] Evangelos LIAMAS, Simon D. CONNELL et Anwasha SARKAR. « Frictional behaviour of plant proteins in soft contacts : unveiling nanoscale mechanisms ». In : *Nanoscale Advances* 5.4 (2023). Publisher : Royal Society of Chemistry, p. 1102-1114. DOI : [10.1039/D2NA00696K](https://doi.org/10.1039/D2NA00696K). URL : <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2023/na/d2na00696k> (visité le 24/08/2023).
- [273] J Enrique COMETTO-MUÑIZ et al. « Interactions between CO₂ Oral Pungency and Taste ». In : *Perception* 16.5 (oct. 1987), p. 629-640. ISSN : 0301-0066, 1468-4233. DOI : [10.1068/p160629](https://doi.org/10.1068/p160629). URL : <http://journals.sagepub.com/doi/10.1068/p160629> (visité le 13/06/2022).
- [274] Przemysław SADOWSKI et Stanisław STUPKIEWICZ. « Friction in lubricated soft-on-hard, hard-on-soft and soft-on-soft sliding contacts ». In : *Tribology International* 129 (jan. 2019), p. 246-256. ISSN : 0301679X. DOI : [10.1016/j.triboint.2018.08.025](https://doi.org/10.1016/j.triboint.2018.08.025). URL : <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0301679X18304213> (visité le 19/05/2022).
- [275] Patrick HEYER et Jörg LÄUGER. « Correlation between friction and flow of lubricating greases in a new tribometer device ». In : *Lubrication Science* 21.7 (2009). _eprint : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/lc.88>, p. 253-268. ISSN :

- 1557-6833. DOI : [10.1002/ls.88](https://doi.org/10.1002/ls.88). URL : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/ls.88> (visité le 06/07/2022).
- [276] Kazuhiro HORI et al. « Newly developed sensor sheet for measuring tongue pressure during swallowing ». In : *Journal of Prosthodontic Research* 53.1 (jan. 2009), p. 28-32. ISSN : 2212-4632. DOI : [10.1016/j.jpor.2008.08.008](https://doi.org/10.1016/j.jpor.2008.08.008).
- [277] Andrew REDFEARN et Ben HANSON. « A Mechanical Simulator of Tongue–Palate Compression to Investigate the Oral Flow of Non-Newtonian Fluids ». In : *IEEE/ASME Transactions on Mechatronics* 23.2 (avr. 2018). Conference Name : IEEE/ASME Transactions on Mechatronics, p. 958-965. ISSN : 1941-014X. DOI : [10.1109/TMECH.2018.2808704](https://doi.org/10.1109/TMECH.2018.2808704). URL : <https://ieeexplore.ieee.org/document/8301544> (visité le 18/03/2024).
- [278] Samuel S. GAMANIEL et al. « A tribo-chemical view on astringency of plant-based food substances ». In : *Friction* (13 mars 2024). ISSN : 2223-7704. DOI : [10.1007/s40544-023-0812-0](https://doi.org/10.1007/s40544-023-0812-0). URL : <https://doi.org/10.1007/s40544-023-0812-0> (visité le 18/03/2024).
- [279] Luyao TANG et al. « Sugar or milk : Tribological study on the sensation of coffee beverages ». In : *Journal of Food Engineering* 367 (1^{er} avr. 2024), p. 111876. ISSN : 0260-8774. DOI : [10.1016/j.jfoodeng.2023.111876](https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2023.111876). URL : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0260877423004740> (visité le 09/01/2024).
- [280] Junning CHEN et al. « Biomechanics of oral mucosa ». In : *Journal of The Royal Society Interface* 12.109 (août 2015), p. 20150325. ISSN : 1742-5689, 1742-5662. DOI : [10.1098/rsif.2015.0325](https://doi.org/10.1098/rsif.2015.0325). URL : <https://royalsocietypublishing.org/doi/10.1098/rsif.2015.0325> (visité le 28/10/2021).
- [281] Agnieszka CHOJNICKA et al. « The interactions between oil droplets and gel matrix affect the lubrication properties of sheared emulsion-filled gels ». In : *Food Hydrocolloids* 23.3 (1^{er} mai 2009), p. 1038-1046. ISSN : 0268-005X. DOI : [10.1016/j.foodhyd.2008.08.008](https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2008.08.008). URL : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0268005X08001938> (visité le 22/07/2022).
- [282] Clément NIVET et al. « Development of New Models of Oral Mucosa to Investigate the Impact of the Structure of Transmembrane Mucin-1 on the Mucosal Pellicle Formation and Its Physicochemical Properties ». In : *Biomedicines* 12.1 (jan. 2024). Number : 1 Publisher : Multidisciplinary Digital Publishing Institute, p. 139. ISSN : 2227-9059. DOI : [10.3390/biomedicines12010139](https://doi.org/10.3390/biomedicines12010139). URL : <https://www.mdpi.com/2227-9059/12/1/139> (visité le 31/01/2024).
- [283] C. PAILLER-MATTEI et al. « Ex vivo approach to studying bio-adhesive and tribological properties of artificial salivas for oral dryness (xerostomia) ». In : *Wear* 332-333 (mai 2015), p. 710-714. ISSN : 00431648. DOI : [10.1016/j.wear.2015.02.020](https://doi.org/10.1016/j.wear.2015.02.020). URL : <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0043164815001295> (visité le 17/03/2022).

- [284] Max BIEGLER et al. « Cationic astringents alter the tribological and rheological properties of human saliva and salivary mucin solutions ». In : *Biotribology* 6 (1^{er} juin 2016), p. 12-20. ISSN : 2352-5738. DOI : [10.1016/j.biotri.2016.03.002](https://doi.org/10.1016/j.biotri.2016.03.002). URL : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2352573816300130> (visité le 21/07/2022).
- [285] Ophelie TORRES et al. « Emulsion Microgel Particles as High-Performance Bio-Lubricants ». In : *ACS Applied Materials & Interfaces* 10.32 (15 août 2018). Publisher : American Chemical Society, p. 26893-26905. ISSN : 1944-8244. DOI : [10.1021/acsami.8b07883](https://doi.org/10.1021/acsami.8b07883). URL : <https://doi.org/10.1021/acsami.8b07883> (visité le 22/07/2022).
- [286] Gleb E. YAKUBOV et al. « Aqueous lubrication by fractionated salivary proteins : Synergistic interaction of mucin polymer brush with low molecular weight macromolecules ». In : *Tribology International*. The International Conference on BioTribology 2014 89 (1^{er} sept. 2015), p. 34-45. ISSN : 0301-679X. DOI : [10.1016/j.triboint.2014.12.025](https://doi.org/10.1016/j.triboint.2014.12.025). URL : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0301679X14004666> (visité le 22/07/2022).
- [287] Shaoyang WANG et al. « Relationship between salivary lubrication and temporal sensory profiles of wine mouthfeel and astringency sub-qualities ». In : *Food Hydrocolloids* (15 sept. 2022), p. 108106. ISSN : 0268-005X. DOI : [10.1016/j.foodhyd.2022.108106](https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2022.108106). URL : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0268005X22006269> (visité le 19/09/2022).
- [288] M. DOUAIRE, T. STEPHENSON et I. T. NORTON. « Soft tribology of oil-continuous emulsions ». In : *Journal of Food Engineering* 139 (1^{er} oct. 2014), p. 24-30. ISSN : 0260-8774. DOI : [10.1016/j.jfoodeng.2014.04.007](https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2014.04.007). URL : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0260877414001678> (visité le 22/07/2022).
- [289] I. FERNÁNDEZ FARRÉS, M. DOUAIRE et I. T. NORTON. « Rheology and tribological properties of Ca-alginate fluid gels produced by diffusion-controlled method ». In : *Food Hydrocolloids* 32.1 (1^{er} juill. 2013), p. 115-122. ISSN : 0268-005X. DOI : [10.1016/j.foodhyd.2012.12.009](https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.12.009). URL : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0268005X12003116> (visité le 22/07/2022).
- [290] G. CASSIN, E. HEINRICH et H.A. SPIKES. « The Influence of Surface Roughness on the Lubrication Properties of Adsorbing and Non-Adsorbing Biopolymers ». In : *Tribology Letters* 11.2 (1^{er} août 2001), p. 95-102. ISSN : 1573-2711. DOI : [10.1023/A:1016702906095](https://doi.org/10.1023/A:1016702906095). URL : <https://doi.org/10.1023/A:1016702906095> (visité le 06/07/2022).
- [291] H. T. RUPNIAK et al. « Characteristics of four new human cell lines derived from squamous cell carcinomas of the head and neck ». In : *Journal of the National Cancer Institute* 75.4 (oct. 1985), p. 621-635. ISSN : 0027-8874.
- [292] Jette JACOBSEN et al. « TR146 cells grown on filters as a model for human buccal epithelium : I. Morphology, growth, barrier properties, and permeability ». In : *International Journal of Pharmaceutics* 125.2 (31 oct. 1995), p. 165-184. ISSN : 0378-5173. DOI : [10.1016/0378-5173\(95\)00109-V](https://doi.org/10.1016/0378-5173(95)00109-V). URL : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S037851739500109V>

- www.sciencedirect.com/science/article/pii/S037851739500109V (visité le 16/11/2023).
- [293] Naohiro SOGA. « Elastic moduli and fracture toughness of glass ». In : *Journal of Non-Crystalline Solids*. Glass Science and Technology Problems and Prospects for 2004 73.1 (1^{er} août 1985), p. 305-313. ISSN : 0022-3093. DOI : [10.1016/0022-3093\(85\)90356-4](https://doi.org/10.1016/0022-3093(85)90356-4). URL : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022309385903564> (visité le 24/06/2024).
- [294] Jean-Luc LOUBET. « Etude des courbes d'indentation - cas du poinçon cône et de la pyramide Vickers ». Thèse de doct. Université Claude Bernard et Ecole Centrale de Lyon, 1983. (Visité le 02/11/2023).
- [295] Ian N. SNEDDON. « The Stress on the boundary of an elastic half-plane in which body forces are acting ». In : *Glasgow Mathematical Journal* 7.1 (jan. 1965). Publisher : Cambridge University Press, p. 48-54. ISSN : 2051-2104, 2040-6185. DOI : [10.1017/S2040618500035188](https://doi.org/10.1017/S2040618500035188). URL : <https://www.cambridge.org/core/journals/glasgow-mathematical-journal/article/stress-on-the-boundary-of-an-elastic-halfplane-in-which-body-forces-are-acting/D0BD9D0BF86E2287327E6FDE511A8E68#> (visité le 22/11/2022).
- [296] Simon TUPIN. « Caractérisation de l'effet de la microstructure collagénique sur le comportement mécanique global des peaux reconstruites ». Thèse de doct. L'École Centrale de Lyon et l'École Nationale d'ingénieurs de Saint-Etienne, 2015.
- [297] Heinrich HERTZ. « Ueber die Berührung fester elastischer Körper. » In : *crll* 1882.92 (1882), p. 156-171. ISSN : 0075-4102, 1435-5345. DOI : [10.1515/crll.1882.92.156](https://doi.org/10.1515/crll.1882.92.156). URL : <https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/crll.1882.92.156/html> (visité le 11/01/2023).
- [298] Kenneth Langstreth JOHNSON. *Contact mechanics*. Cambridge : Cambridge university press, 1992. ISBN : 978-0-521-34796-9.
- [299] C. PAILLER-MATTEI, S. BEC et H. ZAHOUANI. « In vivo measurements of the elastic mechanical properties of human skin by indentation tests ». In : *Medical Engineering & Physics* 30.5 (juin 2008), p. 599-606. ISSN : 13504533. DOI : [10.1016/j.medengphy.2007.06.011](https://doi.org/10.1016/j.medengphy.2007.06.011). URL : <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S135045330700135X> (visité le 17/03/2022).
- [300] Julie C. KOHN et Donna M. EBENSTEIN. « Eliminating adhesion errors in nanoindentation of compliant polymers and hydrogels ». In : *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* 20 (1^{er} avr. 2013), p. 316-326. ISSN : 1751-6161. DOI : [10.1016/j.jmbbm.2013.02.002](https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2013.02.002). URL : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S175161611300057X> (visité le 06/01/2023).
- [301] Kenneth Langstreth JOHNSON. « Surface energy and the contact of elastic solids ». In : *Proceedings of the Royal Society of London. A. Mathematical and Physical Sciences* 324.1558 (8 sept. 1971), p. 301-313. ISSN : 0080-4630. DOI : [10.1098/rspa.1971.0141](https://doi.org/10.1098/rspa.1971.0141). URL : <https://royalsocietypublishing.org/doi/10.1098/rspa.1971.0141> (visité le 06/01/2023).

- [302] Q. Jane WANG et Yip-Wah CHUNG, éd. *Encyclopedia of Tribology*. Boston, MA : Springer US, 2013. ISBN : 978-0-387-92896-8 978-0-387-92897-5. DOI : [10.1007/978-0-387-92897-5](https://doi.org/10.1007/978-0-387-92897-5). URL : <http://link.springer.com/10.1007/978-0-387-92897-5> (visité le 17/03/2022).
- [303] Charles Augustin (1736-1806) Auteur du texte COULOMB. *Théorie des machines simples (Nouv. éd.) / , en ayant égard au frottement de leurs parties et à la roideur des cordages, par C.-A. Coulomb,... Nouvelle édition...* 1821. URL : <https://gallica.bnf.fr/ark:/12148/bpt6k1095299> (visité le 03/11/2023).
- [304] F. P. BOWDEN et al. *The Friction and Lubrication of Solids*. Oxford Classic Texts in the Physical Sciences. Oxford, New York : Oxford University Press, 8 fév. 2001. 424 p. ISBN : 978-0-19-850777-2.
- [305] Coralie THIEULIN. « Caractérisation des mécanismes d'endommagement du stratum corneum induit par le frottement répété de papier cellulose ». Thèse de doct. L'École Centrale de Lyon et l'École Nationale d'ingénieurs de Saint-Etienne, 2017.
- [306] J.A. GREENWOOD et D. TABOR. « The friction of hard sliders on lubricated rubber : The importance of deformation losses ». In : *Proceedings of the Physical Society* 71.6 (1958), p. 989-1001. ISSN : 0370-1328. DOI : [10.1088/0370-1328/71/6/312](https://doi.org/10.1088/0370-1328/71/6/312).
- [307] Denis MAZUYER. « La force de frottement limite ». These de doctorat. Ecully, Ecole centrale de Lyon, 1^{er} jan. 1989. URL : <https://www.theses.fr/1989ECDL0004> (visité le 03/11/2023).
- [308] *Interférométrie*. In : *Wikipédia*. Page Version ID : 213262919. 11 mars 2024. URL : <https://fr.wikipedia.org/w/index.php?title=Interf%C3%A9rom%C3%A9trie&oldid=213262919> (visité le 20/03/2024).
- [309] Ianis AMMAM et al. *Exploring the role of the MUC1 mucin in human oral lubrication by tribological in vitro studies*. ISSN : 2693-5015. 5 juin 2024. DOI : [10.21203/rs.3.rs-4455367/v1](https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-4455367/v1). URL : <https://www.researchsquare.com/article/rs-4455367/v1> (visité le 06/06/2024).
- [310] S. G. MALLAT. *A wavelet tour of signal processing*. 2nd ed. San Diego : Academic Press, 1999. 637 p. ISBN : 978-0-12-466606-1.
- [311] Sabeur MEZGHANI. « Approches multi-échelles de caractérisation tridimensionnelle des surfaces : Applications aux procédés d'usinage ». These de doctorat. Ecully, Ecole centrale de Lyon, 1^{er} jan. 2005. URL : <https://theses.fr/2005ECDL0011> (visité le 20/03/2024).
- [312] Juliette JAMART. « Caractérisation multi-échelle du comportement morphomécanique de la fibre capillaire suite à une sollicitation thermomécanique ». These de doctorat. Ecully, Ecole centrale de Lyon, 1^{er} jan. 2015. URL : <https://theses.fr/2015ENISE033> (visité le 20/03/2024).
- [313] David MORENO-HERNANDEZ et al. « Three-dimensional particle position using continuous wavelet and circle Hough transforms ». In : *Optical Engineering* 50.5 (mai 2011). Publisher : SPIE, p. 053604. ISSN : 0091-3286, 1560-2303. DOI : [10.1117/1.3575650](https://doi.org/10.1117/1.3575650). URL : <https://www.spiedigitallibrary.org/journals/optical-engineering/volume-50/issue-5/053604/Three-dimensional->

- [particle-position-using-continuous-wavelet-and-circle-Hough/10.1117/1.3575650.full](#) (visité le 20/03/2024).
- [314] Lei LEI et al. « Influence of two polyphenols on the structure and lubrication of salivary pellicle : An in vitro study on astringency mechanism ». In : *Friction* 10.1 (1^{er} jan. 2022), p. 167-178. ISSN : 2223-7704. DOI : [10.1007/s40544-021-0494-4](#). URL : <https://doi.org/10.1007/s40544-021-0494-4> (visité le 20/11/2023).
- [315] C. V. RAMAN et K. S. KRISHNAN. « A New Type of Secondary Radiation ». In : *Nature* 121.3048 (mars 1928). Publisher : Nature Publishing Group, p. 501-502. ISSN : 1476-4687. DOI : [10.1038/121501c0](#). URL : <https://www.nature.com/articles/121501c0> (visité le 27/03/2024).
- [316] Nordin FELIDJ. « Introduction à... La spectroscopie Raman et la diffusion exaltée de surface ». In : *Photoniques* 81 (avr. 2016), p. 46-49. ISSN : 1629-4475, 2269-8418. DOI : [10.1051/photon/20168146](#). URL : <http://www.photoniques.com/10.1051/photon/20168146> (visité le 27/03/2024).
- [317] Philippe COLOMBAN. « Imagerie Raman de matériaux et dispositifs nano/microhétérogènes ». In : 1^{er} jan. 2013. URL : https://www.researchgate.net/publication/260184980_Imagerie_Raman_de_materiaux_et_dispositifs_nanomicroheterogenes.
- [318] Jean N'DRE. « Etude structurelle en Microscopie Confocale Raman du cartilage produit par ingénierie tissulaire ». Thèse de doct. Université Montpellier ; Université Félix Houphouët-Boigny (Abidjan, Côte d'Ivoire), 26 mars 2021. URL : <https://theses.hal.science/tel-03342131> (visité le 27/03/2024).
- [319] A. FALAMAS et al. « Raman Spectroscopic Characterization of Saliva for the Discrimination of Oral Squamous Cell Carcinoma ». In : *Analytical Letters* 54.1 (22 jan. 2021), p. 57-69. ISSN : 0003-2719, 1532-236X. DOI : [10.1080/00032719.2020.1719129](#). URL : <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/00032719.2020.1719129> (visité le 17/03/2022).
- [320] Jeonghee YEOM et al. « Soft and ion-conducting hydrogel artificial tongue for astringency perception ». In : *Science Advances* 6.23 (5 juin 2020). Publisher : American Association for the Advancement of Science, eaba5785. DOI : [10.1126/sciadv.aba5785](#). URL : <https://www.science.org/doi/full/10.1126/sciadv.aba5785> (visité le 27/07/2022).
- [321] Mahmoud GARGOTTI et al. « Raman spectroscopy detects biochemical changes due to different cell culture environments in live cells in vitro ». In : *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 410.28 (1^{er} nov. 2018), p. 7537-7550. ISSN : 1618-2650. DOI : [10.1007/s00216-018-1371-5](#). URL : <https://doi.org/10.1007/s00216-018-1371-5> (visité le 05/12/2022).
- [322] Olga A. MASLOVA. « Spectroscopie et imagerie Raman de matériaux inhomogènes ». These de doctorat. Orléans, 20 oct. 2014. URL : <https://theses.fr/2014ORLE2036> (visité le 27/03/2024).

- [323] Gunganist KONGKLAD et al. « Discriminant Analysis PCA-LDA Assisted Surface-Enhanced Raman Spectroscopy for Direct Identification of Malaria-Infected Red Blood Cells ». In : *Methods and Protocols* 5.3 (juin 2022). Number : 3 Publisher : Multidisciplinary Digital Publishing Institute, p. 49. ISSN : 2409-9279. DOI : [10.3390/mps5030049](https://doi.org/10.3390/mps5030049). URL : <https://www.mdpi.com/2409-9279/5/3/49> (visité le 27/03/2024).
- [324] Gianluigi CABIDDU et al. « Proteomic characterization of the mucosal pellicle formed in vitro on a cellular model of oral epithelium ». In : *Journal of proteomics* 222 (30 juin 2020). Publisher : J Proteomics. ISSN : 1876-7737. DOI : [10.1016/j.jprot.2020.103797](https://doi.org/10.1016/j.jprot.2020.103797). URL : <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32360370/> (visité le 24/11/2023).
- [325] Susana SOARES et al. « Oral interactions between a green tea flavanol extract and red wine anthocyanin extract using a new cell-based model : insights on the effect of different oral epithelia ». In : *Scientific Reports* 10 (28 juill. 2020), p. 12638. ISSN : 2045-2322. DOI : [10.1038/s41598-020-69531-9](https://doi.org/10.1038/s41598-020-69531-9). URL : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7387539/> (visité le 31/01/2024).
- [326] G. E. YAKUBOV et al. « Tribology of particle suspensions in rolling-sliding soft contacts ». In : *Biotribology* 3 (1^{er} sept. 2015), p. 1-10. ISSN : 2352-5738. DOI : [10.1016/j.biotri.2015.09.003](https://doi.org/10.1016/j.biotri.2015.09.003). URL : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2352573815300056> (visité le 22/07/2022).
- [327] Jeffrey M. COLES, Debby P. CHANG et Stefan ZAUSCHER. « Molecular mechanisms of aqueous boundary lubrication by mucinous glycoproteins ». In : *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 15.6 (1^{er} déc. 2010), p. 406-416. ISSN : 1359-0294. DOI : [10.1016/j.cocis.2010.07.002](https://doi.org/10.1016/j.cocis.2010.07.002). URL : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359029410000786> (visité le 24/01/2024).
- [328] S. K. LINDEN et al. « Mucins in the mucosal barrier to infection ». In : *Mucosal Immunology* 1.3 (mai 2008), p. 183-197. ISSN : 1935-3456. DOI : [10.1038/mi.2008.5](https://doi.org/10.1038/mi.2008.5).
- [329] Z. ASSY et al. « Salivary film thickness and MUC5B levels at various intra-oral surfaces ». In : *Clinical Oral Investigations* 27.2 (fév. 2023), p. 859-869. ISSN : 1436-3771. DOI : [10.1007/s00784-022-04626-3](https://doi.org/10.1007/s00784-022-04626-3).
- [330] Bertrand D. E. RAYNAL et al. « Calcium-dependent protein interactions in MUC5B provide reversible cross-links in salivary mucus ». In : *The Journal of Biological Chemistry* 278.31 (1^{er} août 2003), p. 28703-28710. ISSN : 0021-9258. DOI : [10.1074/jbc.M304632200](https://doi.org/10.1074/jbc.M304632200).
- [331] C WICKSTRÖM et al. « MUC5B is a major gel-forming, oligomeric mucin from human salivary gland, respiratory tract and endocervix : identification of glycoforms and C-terminal cleavage. » In : *Biochemical Journal* 334 (Pt 3 15 sept. 1998), p. 685-693. ISSN : 0264-6021. URL : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1219739/> (visité le 25/01/2024).

- [332] Woon-Ic CHANG et al. « MUC1 expression in the oral mucosal epithelial cells of the elderly ». In : *Archives of Oral Biology* 56.9 (1^{er} sept. 2011), p. 885-890. ISSN : 0003-9969. DOI : [10.1016/j.archoralbio.2011.02.007](https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2011.02.007). URL : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003996911000537> (visité le 30/08/2022).
- [333] Susanne SCHARBERT, Nadine HOLZMANN et Thomas HOFMANN. « Identification of the astringent taste compounds in black tea infusions by combining instrumental analysis and human bioresponse ». In : *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52.11 (2 juin 2004), p. 3498-3508. ISSN : 0021-8561. DOI : [10.1021/jf049802u](https://doi.org/10.1021/jf049802u).
- [334] Sylvie PERONNY. « La perception gustative et la consommation des tannins chez le maki (*Lemur catta*) ». Thèse de doct. Museum national d'histoire naturelle - MNHN PARIS, 1^{er} déc. 2005. URL : <https://theses.hal.science/tel-00125461> (visité le 22/04/2024).
- [335] Gaetan AÜLLO-RASSER et al. « Early-stage knee OA induced by MIA and MMT compared in the murine model via histological and topographical approaches ». In : *Scientific Reports* 10.1 (déc. 2020), p. 15430. ISSN : 2045-2322. DOI : [10.1038/s41598-020-72350-7](https://doi.org/10.1038/s41598-020-72350-7). URL : <https://www.nature.com/articles/s41598-020-72350-7> (visité le 13/05/2022).
- [336] Bruno BORDONI et al. « Biotensegrity or Fascintegrité ? » In : *Cureus* 11.6 (3 juin 2019), e4819. ISSN : 2168-8184. DOI : [10.7759/cureus.4819](https://doi.org/10.7759/cureus.4819).
- [337] V. KAHAN et al. « Stress, immunity and skin collagen integrity : evidence from animal models and clinical conditions ». In : *Brain, Behavior, and Immunity* 23.8 (nov. 2009), p. 1089-1095. ISSN : 1090-2139. DOI : [10.1016/j.bbi.2009.06.002](https://doi.org/10.1016/j.bbi.2009.06.002).
- [338] Yong-Quan XU et al. « Quantitative analyses of the bitterness and astringency of catechins from green tea ». In : *Food Chemistry* 258 (30 août 2018), p. 16-24. ISSN : 0308-8146. DOI : [10.1016/j.foodchem.2018.03.042](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.03.042). URL : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814618304746> (visité le 20/11/2023).
- [339] Linyi MO, Jianshe CHEN et Xinmiao WANG. « A novel experimental set up for *in situ* oral lubrication measurements ». In : *Food Hydrocolloids* 95 (1^{er} oct. 2019), p. 396-405. ISSN : 0268-005X. DOI : [10.1016/j.foodhyd.2019.04.055](https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.04.055). URL : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0268005X19301316> (visité le 29/04/2024).
- [340] H. LESME et al. « Difference in astringency of the main pea protein fractions ». In : *Food Hydrocolloids* 149 (1^{er} avr. 2024), p. 109489. ISSN : 0268-005X. DOI : [10.1016/j.foodhyd.2023.109489](https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2023.109489). URL : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0268005X23010354> (visité le 02/02/2024).
- [341] Wendy J. DAHL, Lauren M. FOSTER et Robert T. TYLER. « Review of the health benefits of peas (*Pisum sativum* L.) » In : *The British Journal of Nutrition* 108 Suppl 1 (août 2012), S3-10. ISSN : 1475-2662. DOI : [10.1017/S0007114512000852](https://doi.org/10.1017/S0007114512000852).

- [342] M. ASSAD-BUSTILLOS et al. « Assessment of the interactions between pea and salivary proteins in aqueous dispersions ». In : *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 84 (1^{er} mars 2023), p. 103290. ISSN : 1466-8564. DOI : [10.1016/j.ifset.2023.103290](https://doi.org/10.1016/j.ifset.2023.103290). URL : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1466856423000243> (visité le 02/02/2024).
- [343] M.c. GOLDNER et M.c. ZAMORA. « Effect of Polyphenol Concentrations on Astringency Perception and Its Correlation with Gelatin Index of Red Wine ». In : *Journal of Sensory Studies* 25.5 (2010). _eprint : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/j.1745-459X.2010.00304.x>, p. 761-777. ISSN : 1745-459X. DOI : [10.1111/j.1745-459X.2010.00304.x](https://doi.org/10.1111/j.1745-459X.2010.00304.x). URL : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1745-459X.2010.00304.x> (visité le 15/01/2024).
- [344] Anders BENNICK. « Interaction of plant polyphenols with salivary proteins ». In : *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine : An Official Publication of the American Association of Oral Biologists* 13.2 (2002), p. 184-196. ISSN : 1045-4411. DOI : [10.1177/154411130201300208](https://doi.org/10.1177/154411130201300208).
- [345] Y. LU et A. BENNICK. « Interaction of tannin with human salivary proline-rich proteins ». In : *Archives of Oral Biology* 43.9 (sept. 1998), p. 717-728. ISSN : 0003-9969. DOI : [10.1016/s0003-9969\(98\)00040-5](https://doi.org/10.1016/s0003-9969(98)00040-5).
- [346] WHO. *Obesity and overweight*. fact sheet no 311. 2015. URL : <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight> (visité le 13/06/2024).
- [347] Judith L. BUTTRISS. « Food reformulation : the challenges to the food industry ». In : *Proceedings of the Nutrition Society* 72.1 (fév. 2013), p. 61-69. ISSN : 0029-6651, 1475-2719. DOI : [10.1017/S0029665112002868](https://doi.org/10.1017/S0029665112002868). URL : <https://www.cambridge.org/core/journals/proceedings-of-the-nutrition-society/article/food-reformulation-the-challenges-to-the-food-industry/65312FF335A28B3F6050037251F0F61B> (visité le 13/06/2024).
- [348] Y. LI et al. « Impact of pasteurization method and fat on milk : Relationships among rheological, tribological, and astringency behaviors ». In : *International Dairy Journal* 78 (1^{er} mars 2018), p. 28-35. ISSN : 0958-6946. DOI : [10.1016/j.idairyj.2017.10.006](https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2017.10.006). URL : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0958694617302200> (visité le 13/06/2024).
- [349] H. VALENTOVÁ et al. « Determination of astringent taste in model solutions and in beverages ». In : *Czech Journal of Food Sciences* 19.5 (31 oct. 2001). Publisher : Czech Journal of Food Sciences, p. 196-200. ISSN : 12121800, 18059317. DOI : [10.17221/6607-CJFS](https://doi.org/10.17221/6607-CJFS). URL : <https://doi.org/10.17221/6607-CJFS> (visité le 17/06/2024).
- [350] J. K. HOFMANOVÁ, J. MASON et H. K. BATCHELOR. « Tribology provides an *in vitro* tool that correlated to *in vivo* sensory data on the mouthfeel of coated tablets ». In : *International Journal of Pharmaceutics* 597 (15 mars 2021), p. 120323. ISSN : 0378-5173. DOI : [10.1016/j.ijpharm.2021.120323](https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.120323). URL : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517321003233>

- www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517321001277 (visité le 11/04/2024).
- [351] David QUÉRÉ. « Lois du mouillage et de l'imprégnation ». In : *Techniques de l'ingénieur* (2023), p. 15. URL : <https://www.techniques-ingenieur.fr/base-documentaire/procedes-chimie-bio-agro-th2/formulation-concepts-et-outils-methodologiques-42489210/lois-du-mouillage-et-de-l-impregnation-j2140/fondements-de-la-capillarite-j2140niv10001.html> (visité le 18/04/2024).
- [352] Selda GOKTAS, John J. DMYTRYK et Peter S. MCFETRIDGE. « Biomechanical Behavior of Oral Soft Tissues ». In : *Journal of Periodontology* 82.8 (2011). _eprint : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1902/jop.2011.100573>, p. 1178-1186. ISSN : 1943-3670. DOI : [10.1902/jop.2011.100573](https://doi.org/10.1902/jop.2011.100573). URL : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1902/jop.2011.100573> (visité le 12/04/2024).
- [353] Ellinoora SIRVIÖ et al. « Localization of transmembrane mucin MUC1 on the apical surface of oral mucosal cells ». In : *Ultrastructural Pathology* 43.4 (3 sept. 2019). Publisher : Taylor & Francis _eprint : <https://doi.org/10.1080/01913123.2019.1687630>, p. 184-189. ISSN : 0191-3123. DOI : [10.1080/01913123.2019.1687630](https://doi.org/10.1080/01913123.2019.1687630). URL : <https://doi.org/10.1080/01913123.2019.1687630> (visité le 16/04/2024).
- [354] William AUSTIN et al. « Oral Lubrication, Xerostomia, and Advanced Macromolecular Lubricants for Treatment of Dry Mouth ». In : *Lubricants* 12.4 (avr. 2024). Number : 4 Publisher : Multidisciplinary Digital Publishing Institute, p. 126. ISSN : 2075-4442. DOI : [10.3390/lubricants12040126](https://doi.org/10.3390/lubricants12040126). URL : <https://www.mdpi.com/2075-4442/12/4/126> (visité le 17/04/2024).
- [355] S. S. SCHIFFMAN et B. G. GRAHAM. « Taste and smell perception affect appetite and immunity in the elderly ». In : *European Journal of Clinical Nutrition* 54 Suppl 3 (juin 2000), S54-63. ISSN : 0954-3007. DOI : [10.1038/sj.ejcn.1601026](https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1601026).
- [356] Sven PRESTIN et al. « Measurement of epithelial thickness within the oral cavity using optical coherence tomography ». In : *Head & Neck* 34.12 (déc. 2012), p. 1777-1781. ISSN : 1097-0347. DOI : [10.1002/hed.22007](https://doi.org/10.1002/hed.22007).
- [357] Märtha SUND-LEVANDER, Christina FORSBERG et Lis Karin WAHREN. « Normal oral, rectal, tympanic and axillary body temperature in adult men and women : a systematic literature review ». In : *Scandinavian Journal of Caring Sciences* 16.2 (2002). _eprint : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1046/j.1471-6712.2002.00069.x>, p. 122-128. ISSN : 1471-6712. DOI : [10.1046/j.1471-6712.2002.00069.x](https://doi.org/10.1046/j.1471-6712.2002.00069.x). URL : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1046/j.1471-6712.2002.00069.x> (visité le 07/06/2024).
- [358] Mizuki SAKAMOTO et al. « The utility of oral moisture measurement for the diagnosis of Sjögren's syndrome : Its potential application as a diagnostic criterion ». In : *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology* (29 fév. 2024). ISSN : 2212-5558. DOI : [10.1016/j.ajoms.2024.02.007](https://doi.org/10.1016/j.ajoms.2024.02.007). URL : <https://doi.org/10.1016/j.ajoms.2024.02.007>

[//www.sciencedirect.com/science/article/pii/S221255582400019X](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S221255582400019X) (visité le 14/06/2024).

- [359] Na QIAO. « Effect of mechanostimulation by shear waves on skin and fascia : Study on reconstructed skin and in vivo ». Thèse de doct. Ecole Centrale de Lyon, 2023.
- [360] Pierre AGACHE, COLLECTIF et Howard MAIBACH. *Physiologie de la peau et explorations fonctionnelles cutanées*. Tec & Doc Lavoisier, 1^{er} juill. 2000. 706 p. ISBN : 978-2-7430-0360-9.

Annexes **A**

Annexes

I Annexe A : Protocole de comptage des cellules avec cellule de Malassez

L'utilisation du bleu de trypan et d'une cellule de Malassez permet de quantifier les cellules viables et de contrôler la concentration des cellulesensemencées sur leur substrat. Le bleu de trypan est un colorant capable de pénétrer dans les cellules. En un laps de temps court, il permet de différencier les cellules vivantes des cellules mortes, les premières apparaissant blanches tandis que les secondes sont colorées en bleu. Le protocole pour le décompte des cellules avant leur ensemencement est fourni par le CSGA et se présente comme suit :

1. Préparer la cellule de Malassez en fixant la lamelle dessus à l'aide d'éthanol.
2. Après le repiquage, prélever 450 μl de la suspension de cellules individualisées et ajouter 50 μl de solution de bleu de trypan (0.4%) (15250-061, Gibco, TermoFischer, Allemagne).
3. Homogénéiser la solution, puis prélever une petite quantité du mélange pour remplir la cellule de Malassez par capillarité.
4. Laisser reposer la préparation pendant quelques secondes.
5. Placer la cellule sous un microscope et repérer les quadrillages avec l'objectif x10. Compter les cellules vivantes observées.

Les cellules sont comptées sur une dizaine de rectangles, sachant qu'un rectangle correspond à 20 petits carreaux (voir figure A.1. Pour déterminer le nombre de cellules dans un carreau, il faut compter celles à l'intérieur du rectangle ainsi que celles situées uniquement sur deux des côtés du carreau. Les cellules présentes sur les deux autres côtés (indiqués en rouge) seront prises en compte dans les carreaux adjacents. Les cellules colorées en bleu par le trypan ne sont pas incluses dans le décompte (ce sont des cellules mortes).

Pour calculer la concentration cellulaire de la solution prélevée, nous utilisons la formule :

$$\left(\frac{N}{M} \times V \times 100\right) \times \frac{1}{9} \times 1000 = \gamma \times 10^6 \text{ Cellules/mL} \quad (\text{A.1})$$

Avec N le nombre de cellules, M nombre de carreau, V volume de milieu prélevé

Ainsi le volume de solution à déposer sur le substrat est donnée par la définition A.2 :

$$V_{\text{solution}} = \frac{\text{Concentration}_{\text{voulue}} \times \text{Volume}_{\text{final}}}{\text{Concentration}_{\text{mesure}}} \quad (\text{A.2})$$

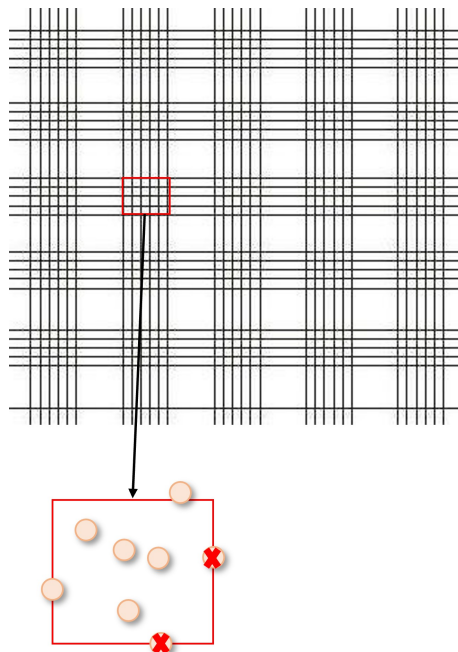


FIGURE A.1 – *Protocole de comptage des cellules avec une cellule de Malassez*

II Annexe B : Calcul de la pression de contact entre la bille en silicone et les modèles cellulaires sur *les modèles hard*

La pression de contact entre les deux surfaces impliquées dans les protocoles des essais tribologiques des chapitres 3, 4, 5 et 6 est calculée. L'objectif est de s'assurer que la pression est proche de la pression *in vivo* et d'éviter l'endommagement du tapis cellulaire par la pression de contact. Afin d'évaluer l'endommagement causé par les effets de frottement et de lubrification, nous avons calculé la pression de contact par indentation dans les mêmes conditions de tests que celles des essais tribologiques (chapitres 3, 4, 5 et 6). Le tableau A.1 ci-dessous résume les paramètres expérimentaux.

TABLEAU A.1 – Paramètres expérimentaux des tests tribologiques

Rayon de courbure de la bille	1.5 mm
Substrat	Lame de verre
Vitesse de la charge normale	1 $\mu\text{m/s}$
Charge normale imposée	0.5 mN
Course de frottement	500 μm
Vitesse de frottement	300 $\mu\text{m/s}$
Nombre de cycle	10
Seuil de contact	0.1 mN

La pression de contact maximale dans le contact est calculée d'après l'équation A.3 :

$$p_{max} = \frac{3F_N}{2\pi a_{JKR}^2} + \frac{F_{ad}}{2\pi a_{JKR}^2} \quad (\text{A.3})$$

Cette relation est issue de l'hypothèse de JKR car nous sommes en présence d'adhésion. Pour rappel le module d'élasticité réduit de la bille en silicone est de 250kPa et celui des modèles d'épithélium de l'ordre du GPa.

Nous obtenons donc une pression de contact maximale durant les essais tribologiques de $p_{max} = 8,2 \pm 0,6 \text{ kPa}$. Cette valeur respecte largement l'ordre de grandeur de la pression *in vivo*, et permet d'éviter l'endommagement de l'épithélium..

III Annexe C : Spectres Raman utilisés pour les ACP

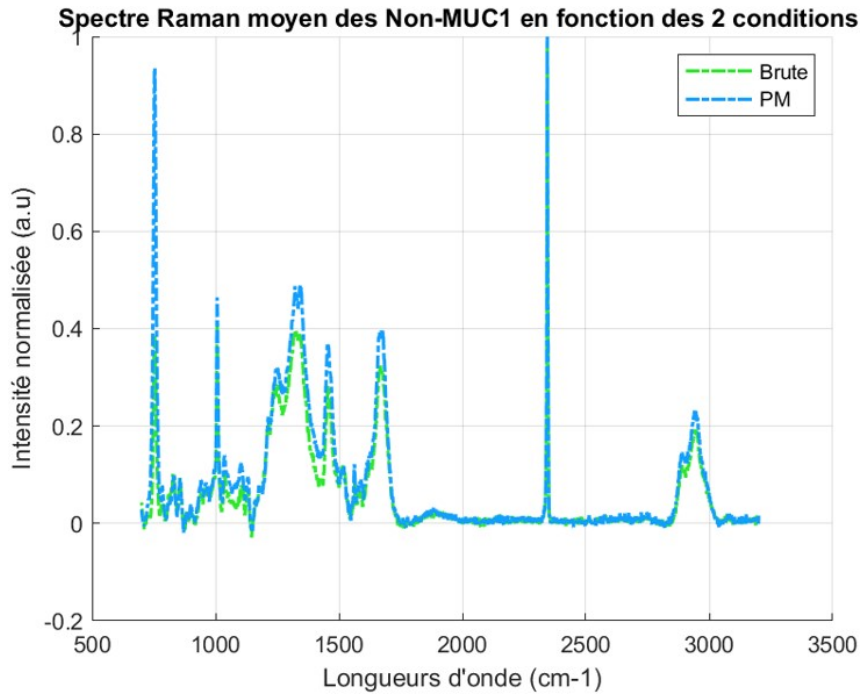


FIGURE A.2 – Spectres Raman moyens entre les conditions avec et sans PM sur les isoformes Non-MUC1

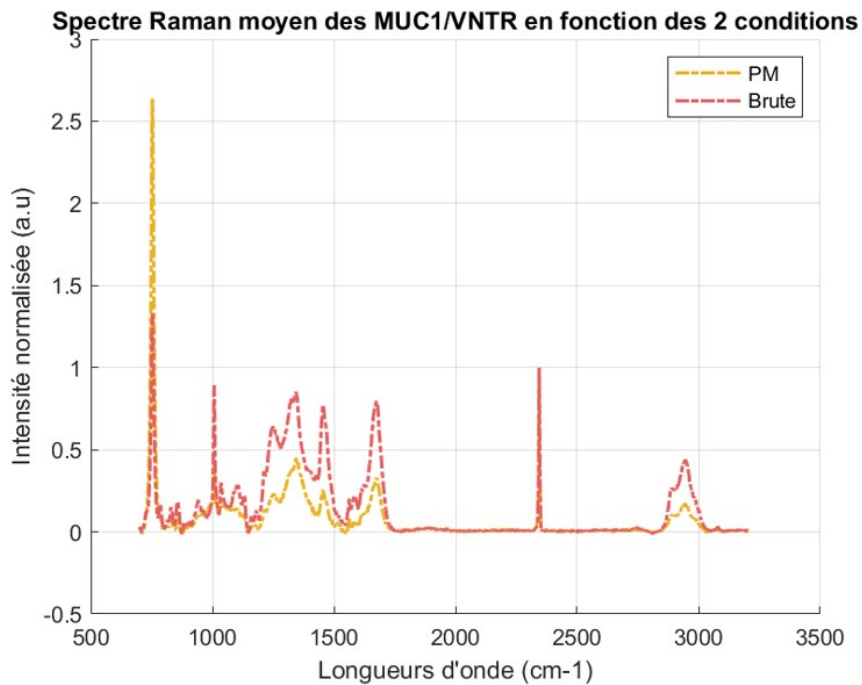


FIGURE A.3 – Spectres Raman moyens entre les conditions avec et sans PM sur les isoformes MUC1/VNTR

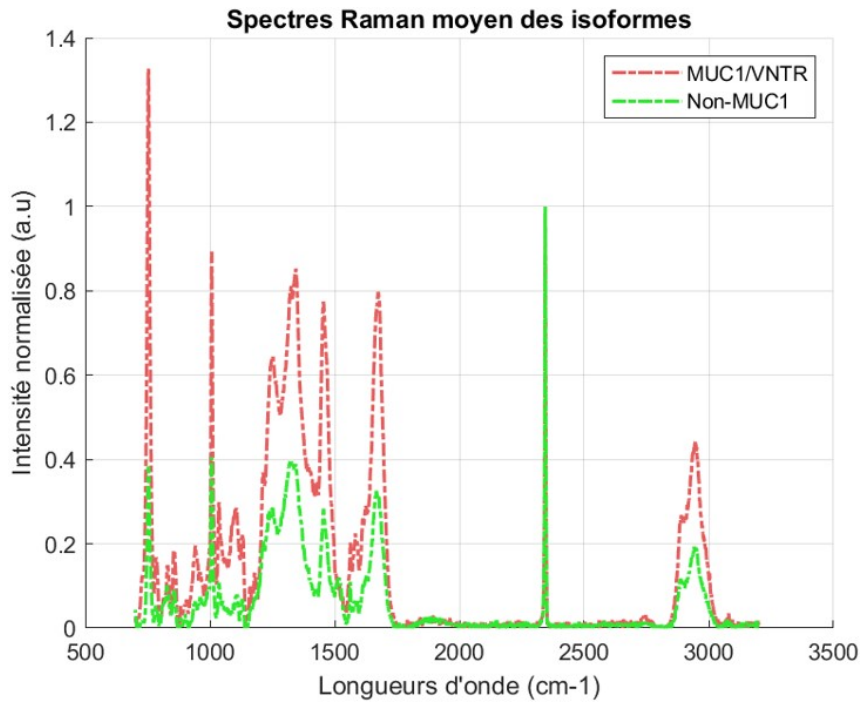


FIGURE A.4 – Comparaison spectres Raman entre les isoformes Non-MUC1 et MUC1/VNTR pour la condition sans PM

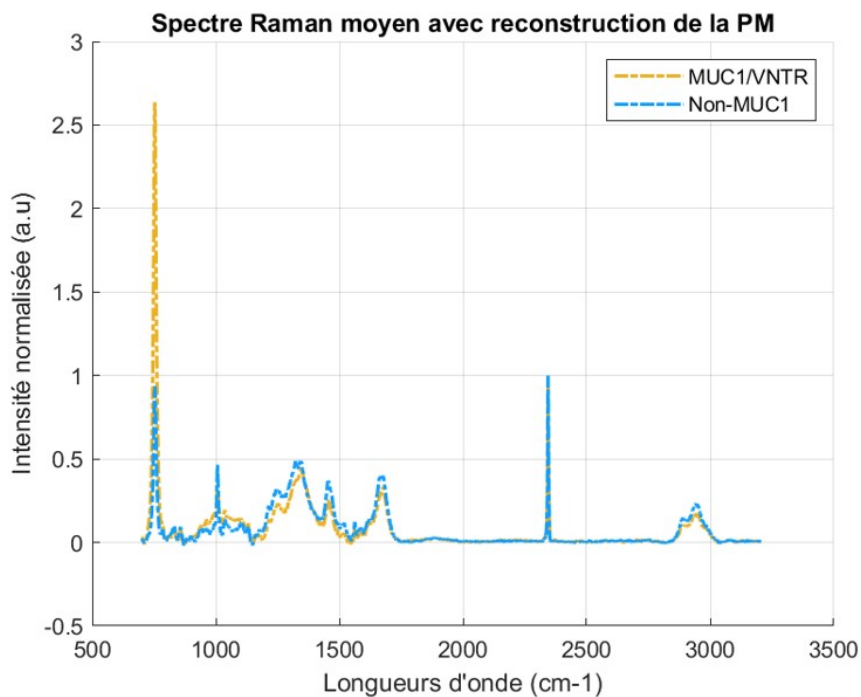


FIGURE A.5 – Comparaison spectres Raman entre les isoformes Non-MUC1 et MUC1/VNTR pour la condition avec PM

IV Annexe D : Images *post mortem* des épithéliums en présence des PRP

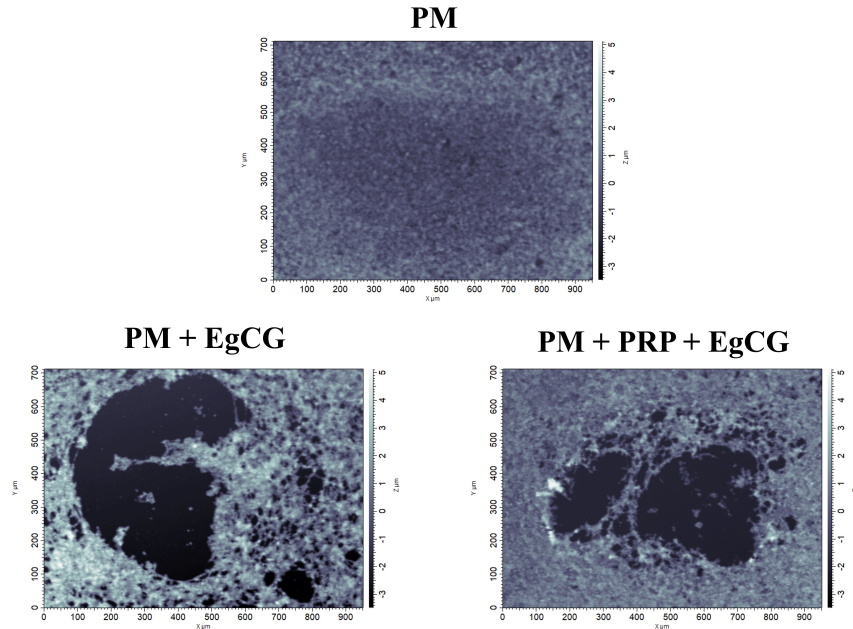


FIGURE A.6 – Images des épithéliums *post mortem* dans trois conditions expérimentales : avec PM seule, avec PM + EgCG et avec PM + PRP + EgCG

Résumé : L'étude de la lubrification orale devient une problématique actuelle pour l'industrie agroalimentaire. Les analyses quantitatives permettent de comprendre et d'anticiper des mécanismes physiologiques, tels que la prédiction des phénomènes d'astringence des produits alimentaires. L'astringence se manifeste par une diminution de la lubrification de la muqueuse orale après la consommation de produits d'origine végétale. Cependant, les recherches actuelles sur la lubrification orale s'appuient sur des matériaux synthétiques qui représentent mal les tissus buccaux. Elles négligent les interactions entre les protéines salivaires sécrétées et les protéines transmembranaires, limitant ainsi la compréhension des mécanismes de lubrification. Cette thèse s'inscrit dans le projet MACARON qui vise à étudier le rôle de la muqueuse orale dans la perception sensorielle. Des modèles *in vitro* de muqueuse orale qui expriment la protéine transmembranaire MUC1 ont été développés pour simuler les interactions fondamentales entre MUC1 et les protéines salivaires. Ces interactions sont responsables de la lubrification et de l'hydratation des tissus. Par ailleurs, un tribomètre a été conçu pour effectuer des tests tribologiques *in vitro* sur ces modèles d'épithélium afin de suivre leur état de lubrification. Cette thèse se concentre ainsi sur l'étude des mécanismes moléculaires de la lubrification orale à travers une approche tribologique *in vitro*, en utilisant des paramètres physiques macro et micrométriques. Ce manuscrit propose en premier lieu une étude sur le rôle crucial de la mucine MUC1 et de sa structure dans la lubrification orale.

La présence de MUC1 améliore la lubrification grâce à une meilleure rétention des protéines salivaires à la surface cellulaire. Ensuite, le manuscrit présente une exploration des mécanismes moléculaires de l'astringence. Les essais tribologiques *in vitro* en présence de composés astringents montrent que ces substances forment des agrégations à la surface épithéliale qui diminuent la lubrification orale. Parallèlement, nos travaux montrent que des mécanismes de protection, notamment la dissociation de MUC1 et l'interaction des protéines riches en proline avec les tanins, atténuent ces effets néfastes sur la lubrification. À travers une étude complémentaire, des corrélations entre la perception sensorielle et nos propriétés physiques mesurées sont établies, démontrant la capacité de notre méthodologie à classer des individus selon leur sensibilité à l'astringence. Enfin, la dernière étude présente le développement d'un nouveau modèle de muqueuse orale visant à reproduire les propriétés mécaniques et physico-chimiques de la muqueuse *in vivo*. Cette thèse propose une méthodologie innovante pour l'étude de la lubrification orale. En particulier en s'intéressant à des mécanismes responsables de la sensation d'astringence grâce à l'utilisation de modèles de muqueuse toujours plus proches des tissus oraux physiologiques.

Mots clés : Lubrification orale, Tribologie orale *in vitro*, épithélium oral, mucines transmembranaires, MUC1, Protéines Salivaires, Astringence, Caractérisation de surface

Abstract : The study of oral lubrication has become a current concern for the food industry. Quantitative analyses allow for understanding and anticipating physiological mechanisms, such as predicting astringency phenomena in food products. Astringency is characterized by a decrease in oral mucosa lubrication following the consumption of plant-based products. However, current research on oral lubrication relies on synthetic materials that poorly represent oral tissues, neglecting interactions between secreted salivary proteins and transmembrane proteins, thus limiting the understanding of lubrication mechanisms. This thesis is part of the MACARON project, which aims to investigate the role of oral mucosa in sensory perception. *In vitro* models of oral mucosa expressing the transmembrane protein MUC1 have been developed to simulate fundamental interactions between MUC1 and salivary proteins responsible for tissue lubrication and hydration. Additionally, a tribometer has been designed to perform *in vitro* tribological tests on these epithelial models to monitor their lubrication state. Thus, this thesis focuses on studying the molecular mechanisms of oral lubrication through an *in vitro* tribological approach, using macro- and micrometric physical parameters. Firstly, this manuscript provides a study on the crucial role of MUC1 mucin and its structure in oral lubrication. The presence of MUC1 enhances lubrication

by improving the retention of salivary proteins on the cell surface. Secondly, the manuscript explores molecular mechanisms of astringency. *In vitro* tribological tests in the presence of astringent compounds show that these substances form aggregations on the epithelial surface, reducing oral lubrication. Concurrently, our work demonstrates protective mechanisms, including the dissociation of MUC1 and the interaction of proline-rich proteins with tannins, mitigating these adverse effects on lubrication. Through additional study, correlations between sensory perception and our measured physical properties are established, demonstrating the ability of our methodology to classify individuals based on their sensitivity to astringency. Finally, the last study presents the development of a new oral mucosa model aiming to reproduce mechanical and physico-chemical properties of *in vivo* mucosa. This thesis proposes an innovative methodology for studying oral lubrication, particularly focusing on mechanisms responsible for astringency sensation through the use of mucosa models increasingly closer to physiological oral tissues.

Keywords : Oral lubrication, *in vitro* oral tribology, Oral epithelium, Transmembrane mucins, MUC1, Salivary Proteins, Astringency, Surface characterization

