

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université A. MIRA - Béjaia

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de biologie physico-chimique
Filière : Sciences biologiques
Spécialité biochimie appliqué



Réf.....

Mémoire de Fin de Cycle
En vue de l'obtention du diplôme

MASTER

Thème

*Etude de l'interaction entre les composées phénoliques
et les protéines*

Présenté par :

Brahami Imène & Benahmed Abdelhafid

Soutenu le : **25 Juin 2018**

Devant le jury composé de :

M^{me} Moulaoui.K.

MAA

Présidente

M^{me} Chaher-bazizi .N.

MCB

Encadreur

M^{me} Dahdouh-Aksas.

MAA

Examinatrice

Année universitaire : 2017/2018



Remerciement

Au terme de ce modeste travail, Nous tenons à remercier dieu pour le courage, la patience ainsi que la santé qui nous a permis d'achever ce travail.

Il est particulièrement agréable d'exprimer ici notre reconnaissance envers tous ceux qui nous ont tendu leur main.

Nous souhaitons particulièrement remercier en premier lieu notre promotrices

M^m chafer –bazizi pour l'intérêt et l'attention qu'elle a réservé à notre travail, pour ces compétences, ces remarques et critiques constructives.

Un très grand merci à M^m Mehdid .A de nous avoir consacré de son temps en nous faisant l'honneur de présider le jury et d'évaluer notre travail ;

Nous tenons à remercier aussi M^m Dahdouh-Akses de nous avoir fait l'honneur d'examiner ce travail ;

Un grand merci pour M^m Sadaoui .Kh et M^r Ouchmoukh .S

Nous remercions les membres du Laboratoire génétique et BPC1 pour leur accueil et la bonne ambiance qui a régné tout au long de la réalisation de notre travail ;

Nous remercions nos familles et nos amis qui nous ont soutenus et qui ont contribué de près, ou de loin à l'aboutissement de ce travail.

Un grand merci à tous, surtout M^{elle} Fatah D et M^{elle} Ladjouzi Y





Dédicace



Avec un cœur plein d'amour et de fierté je dédie ce modeste travail :

*A l'étoile de mon ciel qui a su mettre la lumière dans mon univers, qui m'a toujours entourée d'amour, pour me soutenir et m'encourager durant toute ma vie et donner l'espoir de poursuivre ce chemin jusqu'au bout «**Ma mère chérie**» Que dieu la protège.*

*A l'homme le plus généreux du monde, à celui qui a été toujours présent, qui m'a appris les valeurs de la vie, qui m'a soutenu en toutes circonstances et à celui qui m'a tout donné sans cesse, «**Mon père** » que j'aime, pour qui l'honneur d'être sa fille me suffit.*

*A celui qui a illuminé ma vie Hessouna «**Ma moitié** » qui m'a soutenu durant cette période.*

A mes très chères sœurs chichus et Kenza ; et son fiancé.

A mes amis choumissa, dalia , Yamina , soumaya, zineb, naquim, maya, souhila , zina, chanez,

Ledjwaz, Farah,

*A mes deux meilleures amis Nassima «**Ma poupée**» et Islem que j'aime tellement et qui ont été toujours à mes côtés*

A toutes les personnes qui ont été présentes pour moi et m'ont soutenu durant mon parcours

A mon binôme hafid ainsi à toutes sa familles



Imène





Dédicace



Avec un cœur plein d'amour et de joie je dédie ce modeste travail :

À la plus belle créature que Dieu a créée sur terre, À cette source d'amour, de tendresse, de patience et de générosité,, À ma mère !

À mon père qui m'a toujours encouragé tout au long de mes études, que dieu le protège

À mes très chères sœurs Mira, Hinda, Zoulikha et Biba, et à mes beaux frères Zahir, Ikhllef et omar

À mes chères frères Mlek, Zahir, Hadi, Hamou, Moqrane et mes belles sœurs zahra et maya

À mes amis Zahir, Lydia, Islem, Ryma, Warda, sissa, katia, Jigou, Salim, Hanene, Wawa, Mourade, Kiki et Chafou*

À mes meilleurs amis Dalia, Yamina, Hassouna, Aris que j'aime tellement

À mes collègues de travail Imane, Sihem, Saouba, kenza et thiziri

À ma binôme Imène et à toutes sa familles



Abdelhafid



Liste des tableaux**Liste des figures****Liste des abréviations**

Introduction	01
--------------------	----

Chapitre I : synthèse bibliographique

I-1.Généralités sur les composés phénoliques	02
--	----

I-1.1. Classification des composés phénoliques.....	02
---	----

I-1.1.1.Les acides phénoliques	02
--------------------------------------	----

I-1.1.2.Les flavonoïdes.....	02
------------------------------	----

I-1.1.3.Les tannins.....	04
--------------------------	----

I-1.2. Propriétés biologiques des polyphénols	05
---	----

I-2. Généralité sur les protéines.....	06
--	----

I-2.1. Structure des protéines.....	06
-------------------------------------	----

I-2.1.1.Structure primaire	06
----------------------------------	----

I-2.1.2.Structure secondaire	07
------------------------------------	----

I.2.1.3.Structure tertiaire.....	07
----------------------------------	----

I.2.1.4.Structure quaternaire	08
-------------------------------------	----

I-2.2. Protéines intervenant dans l'interaction avec les polyphénols	08
--	----

I-2.2.1.Caséines	08
------------------------	----

I-2.2.2. Pepsine.....	08
-----------------------	----

I-2.2.3. Albumine de sérum bovin (BSA)	09
--	----

I-3. Interaction polyphénols-protéines	10
--	----

I-3.1.Principe de la complexations polyphénols-protéines	10
--	----

I-3.2.Les différents types interactions	11
---	----

I.3.3.Les paramètres contrôlant le complexe protéines-polyphénols	11
---	----

Chapitre II : matériels et méthodes

II-1. Matériels	13
II-2. Méthodes	14
II-2-1. Préparation des solutions	14
II-2-2. Etude de l'interaction protéines-polyphénols	14
II.2.2.1. Effet de la concentration des protéines	15
II.2.2.2 Effet de la force ionique	16
II.2.2.2 Effet du pH	17

Chapitre III : résultats et discussion

III-Etude de l'interaction polyphénols-protéine (spectrophotométrie UV – visible et fluorométrie).....	18
III-1. Effet de la concentration des protéines	18
III-2. Effet de la force ionique.....	23
III-3. Effet du pH.....	27
Conclusion et perspectives	31
Référence bibliographique.....	32

Annexes

Liste des tableaux

Tableau 1 : Constitution du milieu réactionnel pour l'étude de l'effet de la concentration Des protéines sur les composées phénoliques.....	15
Tableau 2 : Constitution du milieu réactionnel pour l'étude de l'effet de la force ionique Sur complexe composées phénoliques –protéines.....	16
Tableau 3 : Solubilisation du composée phénolique et la protéine dans le tampon phosphate 0,1M à différentes pH.....	17

Liste des figures

Figure 1 : Exemples de quelques acides phénols de série benzoïque.....	02
Figure 2 : Exemple de quelques acides phénols de la série cinnamique.....	03
Figure 3 : structure de base d'un flavonoïde.....	04
Figure 4 : Exemples de structures chimiques des flavonoïdes.....	04
Figure 5 : Exemples de structures chimiques d'un tanin hydrolysable et d'un tanin Condensé.....	05
Figure 6 : Structure générale d'un acide amine.....	06
Figure 7 : Formule développée d'une protéine de n acides aminés.....	07
Figure 8 : Structure secondaire d'une protéine.....	07
Figure 9 : Structure tertiaire d'une protéine.....	07
Figure 10 : Structure quaternaire d'une protéine.....	08
Figure 11 : Principe de complexations entre les polyphénols et protéines.....	10
Figure 12 : Les différentes interactions polyphénols/protéines.....	11
Figure 13 : Variation de la densité optique en fonction de la concentration de la BSA. (A) Spectrophotométrie UV-visible, (B) Fluorométrie. C : catéchine, T : Tannin, G : gallique, Q : quercétine, R : rutine.....	18
Figure 14 : Variation de la densité optique en fonction de la concentration de la Caséine de lait de vache. (A) Spectrophotométrie, (B) Fluorométrie. C : catéchine, T : Tannin, G : gallique, Q : quercétine, R : rutine.....	19
Figure 15 : Variation de la densité optique en fonction de la concentration de la pepsine. (A) Spectrophotométrie, (B) Fluorométrie. C : catéchine, T : Tannin, G : gallique, Q : quercétine, R : rutine.....	21
Figure 16 : Structure chimique des principaux acides phénoliques.....	22
Figure 17 : Variation de la densité optique du complexe BSA-polyphénols en fonction de la concentration du tampon phosphate de sodium à pH 7. (A) Spectrophotométrie, (B) Fluorométrie .C : catéchine, T : Tannin, G : gallique, Q : quercétine, R : rutine.....	23
Figure 18 : Variation de la densité optique du complexe caséine du lait de vache-polyphénols en fonction de la concentration du tampon phosphate de sodium à pH 7. (A) Spectrophotométrie, (B) Fluorométrie .C : catéchine, T : Tannin, G : gallique, Q : quercétine, R : rutine.....	24

Figure 19 : Variation de la densité optique du complexe pepsine-polyphénols en fonction de la concentration du tampon phosphate de sodium à pH 7. (A) Spectrophotométrie, (B) Fluorométrie .C : catéchine, T : Tannin, G : gallique, Q : quercétine, R : rutine.....	25
Figure 20 : Variation de l'absorbance du complexe BSA-polyphénols dans un tampon phosphate de sodium 0,1M en fonction de pH en présence de BSA 1 mg/ml. (A) Spectrophotométrie, (B) Fluorométrie. C : catéchine, T : Tannin, G : gallique, Q : quercétine,R :rutine.....	27
Figure 21 : Variation de l'absorbance du complexe caséine du lait de vache-polyphénols dans un tampon phosphate de sodium 0,1 M en fonction de pH en présence de caséine du lait de vache 1 mg/ml. (A) Spectrophotométrie, (B) Fluorométrie. C : catéchine, T : Tannin, G : gallique,Q :quercétine,R :rutine.....	28
Figure 22 : Variation de l'absorbance du complexe pepsine-polyphénols dans un tampon phosphate de sodium 0,1 M en fonction de pH en présence de la pepsine 1 mg/ml. (A) Spectrophotométrie, (B) Fluorométrie. C : catéchine, T : Tannin, G : gallique, Q : quercétine, R :rutine.....	29

Liste des abréviations

BSA : Sérum Albumine Bovine.

CLV : Caséine du Lait de Vache.

HSA : Sérum Albumine humain.

KDA : L'unité de masse atomique (kilo dalton).

PEP : Pepsine.

pH : Le potentiel hydrogène ; Unité de mesure d'acidité, sur une échelle allant de 1 à 14.

Phi : potentiel hydrogène isoélectrique ou le point isoélectrique.

La recherche sur les substances naturelles est un thème porteur depuis quelques années. Les laboratoires pharmaceutiques sont toujours à la recherche de nouveaux composés actifs, ce qui les a menés de plus en plus vers l'identification et la caractérisation de molécules issues de matrice naturelle, et s'inspirent de leur structure moléculaire pour imaginer de nouveaux médicaments.

Parmi ces substances naturelles on trouve les composés phénoliques, des métabolites secondaires des plantes, qui constituent un groupe d'une extrême diversité, plus de 5000 molécules polyphénoliques(acide phénol, tannins, flavonoïdes), dont 2000 flavonoïdes ont été identifiés jusqu'à ce jour et leur nombre est toujours en augmentation (**Tsao et Yang, 2003**).

Les polyphénols, sont doués de multiples vertus thérapeutiques. Ils jouent un rôle très important, principalement dans la lutte contre les cancers, les maladies cardiovasculaires et la peroxydation lipidique, expliquant ainsi leur grande utilisation dans la fabrication des médicaments (**Bruneton, 2009**).

L'une des propriétés majeures des composés phénoliques est leur capacité à lier et précipiter les protéines en formant des complexes, ou un grand nombre de recherches est consacré à l'étude des propriétés biologiques interactionnelles de ces composés (**Verge et al., 2002**). La question qui s'imposent donc, quels sont les facteurs importants dans l'interaction polyphénols / protéines ? Et quels sont les mécanismes de l'interaction ?

Notre objectif a été d'étudier le mode d'interaction entre certaines protéines et les composés phénoliques ainsi de déterminer la nature des interactions entre ces protéines et les phénols biologiquement actifs afin d'estimer leur rôles exacts dans ces relations.

Le travail réalisé est réparti en deux grandes parties :

- ✓ La première partie est consacrée à une synthèse bibliographique comportant trois alinéas : le premier comprenant une définition et une classification des composées phénoliques et leurs propriétés biologiques, le deuxième sur les généralités des protéines, et le troisième sur l'étude d'interaction protéine- polyphénols.
- ✓ La deuxième partie est consacrée à l'étude expérimentale, sur l'effet de quelques paramètres (concentration des protéines, les force ionique, pH) sur l'interaction des protéines (Sérum Albumine Bovine(BSA), la Caséine du lait de vache, et la Pepsine) avec les composées phénoliques (la quercétine, la rutine, la catéchine, l'acide tannique et l'acide gallique).

I.1. Généralités sur les composés phénoliques

Les composés phénoliques sont des métabolites secondaires retrouvés dans la plupart des espèces végétales. L'expression de composé phénolique est utilisée pour toute substance chimique qui renferme dans sa structure un noyau aromatique, portant un ou plusieurs groupements hydroxyles (**Bruneton, 2009**).

Ils jouent un rôle contre les microbes pathogènes et les prédateurs des plantes, mais leur intérêt essentiel est l'effet protecteur contre les maladies telles que les maladies cardiovasculaires et les cancers causés par les espèces réactives de l'oxygène et d'autres radicaux libres (**Morton, 2000**).

La structure des composés phénoliques naturels est très variable comportant plus de 5000 structures phénoliques. Ils se trouvent sous forme de molécules simples (acides phénoliques), et d'autres plus hautement polymérisées (tannins condensés) (**Tsao et Yang, 2003**).

I.1.1. Classification des composés phénoliques

La classification des composés phénoliques est très complexe. Les polyphénols peuvent être classés dans plusieurs groupes selon leur squelette structural, allant de simple phénol aux composés très polymérisés.

I.1.1.1 Les acides phénoliques

Les acides phénoliques ont une fonction acide (COOH) et plusieurs fonctions hydroxyle (**figure 1**). Les dérivés de l'acide benzoïque sont très communs, aussi bien sous forme libre que combinée à l'état d'esters ou d'hétérosides.

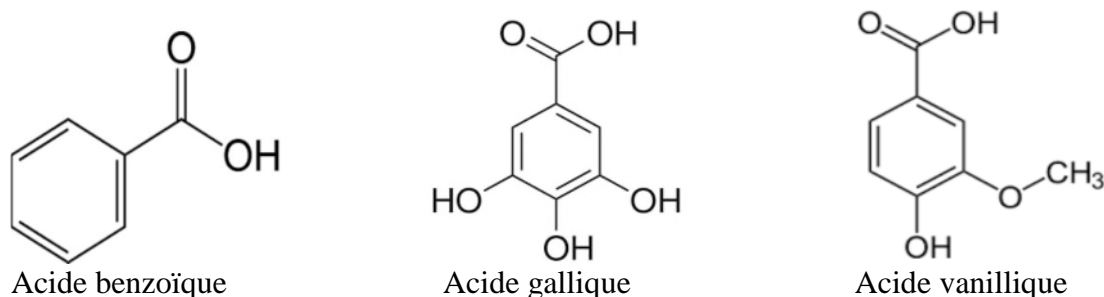


Figure 1 : Exemples de quelques acides phénols de série benzoïque (**Bruneton, 2009**).

I.1.1.2 Les flavonoïdes

Les flavonoïdes constituent un groupe de plus de 2000 composés naturels qui sont quasiment universels chez les plantes vasculaires. Ils constituent des pigments responsables des colorations jaune, orange, et rouge de différents organes végétaux.

Tous les flavonoïdes possèdent la même structure de base ($C_6-C_3-C_6$), deux cycles aromatiques A et B (**figure 2**), liés avec une unité de trois atomes de carbone qui peut ou non être une partie d'un troisième cycle C (**Daojin, Li et al., 2007**).

Ces composés existent sous forme libre dite aglycone ou sous forme d'hétérosides, c'est-à-dire liée à des oses et autres substances (**Sari-Manchado et Cheynier, 2006**).

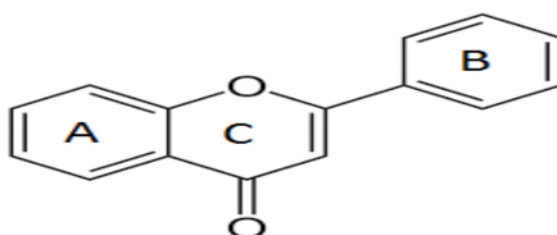


Figure 2 : structure de base d'un flavonoïde (**Sarni-Manchado et Cheynier, 2006**).

La structure de l'hétérocycle central et son degré d'oxydation permettent de distinguer les différentes classes des flavonoïdes (les flavones, les anthocyanes, les flavonols, les flavanones, les isoflavones, et les flavanols).

Les plus importantes sont comme suit :

- **Les Flavones :**

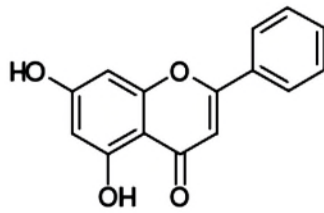
Les flavones sont des composés phénoliques (**Figure 3, a**) dont la structure contient un groupe carboxyle.

- **Les anthocyanines :**

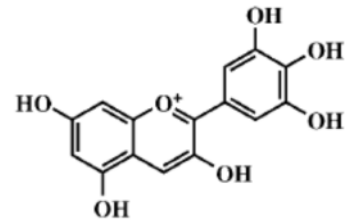
Selon **Mazza et Miniati (1993)**, les anthocyanines (anthos : fleur ; kyanos : bleu) (**Figure 3, b**), sont un groupe de colorants des plantes largement distribués dans la nature. Ils confèrent aux fleurs et aux fruits les couleurs : bleu, violette, rouge et jaune.

- **Les Flavonols :**

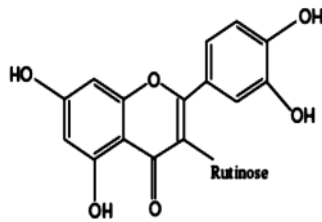
D'après **Kandaswami et Middleton (1996)**, ce sont les flavonoïdes les plus répandus dans le règne végétale (**Figure 3, c, d**). Ils diffèrent des flavones par l'existence d'un OH en position 3 (hydroxyl -3-flavones).



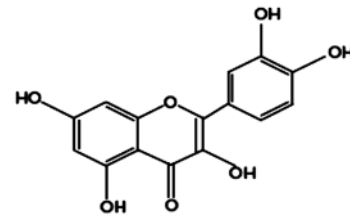
Crysine (a)



Delphinidine (b)



Rutine (c)



Quercétine (d)

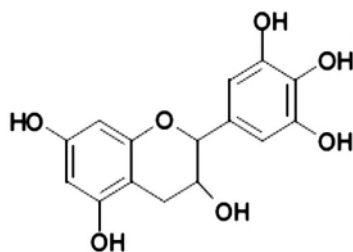
Figure 3 : Exemples de structures chimiques des flavonoïdes (Arapitsas *et al.*, 2008), (a) : Crysine , (b) : Delphinidine, (c) : Rutine, (d) : Quercétine .

- **Les flavanols :**

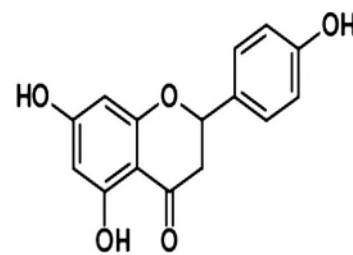
Selon Manach *et al.* (2004), ils désignent des composés (Figure 4, a) ayant une structure flavan-3-ol et possédant un radical OH sur leur noyau latéral.

- **Les flavanones :**

Les flavanones (Figure 4, b) dérivent par disparition de la double liaison de l'hétérocycle central des flavones.



Catéchine (a)



Naringénine (b)

Figure 4 : Exemples de structures chimiques des flavonoïdes (Rodríguez Vaquero *et al.*, 2007), (a) : Catéchine, (b) : Naringénine.

I.1.1.3. Les tannins

Les tanins sont très abondants dans la nature. Leur poids moléculaire varie entre 500 à 3000 kDA. Ils sont caractérisés par leur propriétés de donner des complexes insolubles avec les protéines, les ions métalliques et d'autres polymères tels que les polysaccharides (Nacz et al., 1994).

On distingue : les tanins hydrolysables et les tanins condensés.

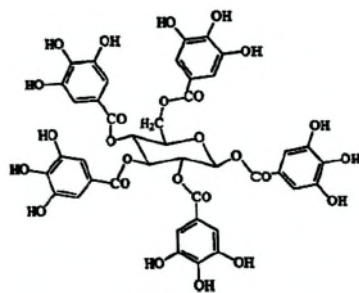
- **Les tanins hydrolysables :**

Les tanins hydrolysables sont des oligo ou polyester d'un sucre et d'un nombre variable d'acide phénol (**figure 5 .a**).

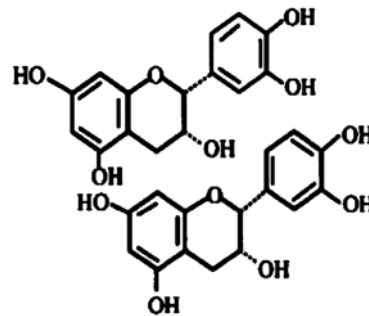
Ils sont divisés en éllagitannins et gallotannins, Les gallotannins libèrent par hydrolyse acide, et hydrolyse basique à l'eau chaude ou par action enzymatique de l'acide gallique (Bruneton, 2009).

- **Les tanins condensés :**

Les tanins condensés se diffèrent des tanins hydrolysables car ils ne possèdent pas de sucre dans leur molécule se trouvent sous forme de polymères (de flavanes). Les polymères donnent une structure hérissée d'OH phénoliques capable de former des liaisons stables avec les protéines (**Figure 5.b**) (Sarni-Manchado et Cheynier, 2006).



Tanins hydrolysables (a)



Tanins condensés (b)

Figure 5 : Exemples de structures chimiques d'un tannin hydrolysable et d'un tannin condensé (Bruneton, 2009), (a) : Tanins hydrolysables, (b) : Tanins condensés.

I .1.2. Propriétés biologiques des polyphénols

Les polyphénols sont considérés comme des agents thérapeutiques pour une large variété de maladies y compris, les maladies inflammatoires, les maladies neurodégénératives, les maladies cardiovasculaires et certains types de cancers (**Ribereau-Gayon ,1968**).

L'effet bénéfique des composés phénoliques est attribué à leurs activités antioxydant et à d'autres propriétés physiologiques telle que : anti-tumoraux ; anti-inflammatoire ; vasodilatateur ; détoxifiant...ex (**Martin et Andriantsitohaina, 2002**).

Les polyphénols sont caractérisés par leur affinité pour les protéines, ce qui leurs permet de former des complexes protéines-polyphénols solubles ou insolubles, réversible ou irréversible (**Papadopoulou et Frasier, 2004**).

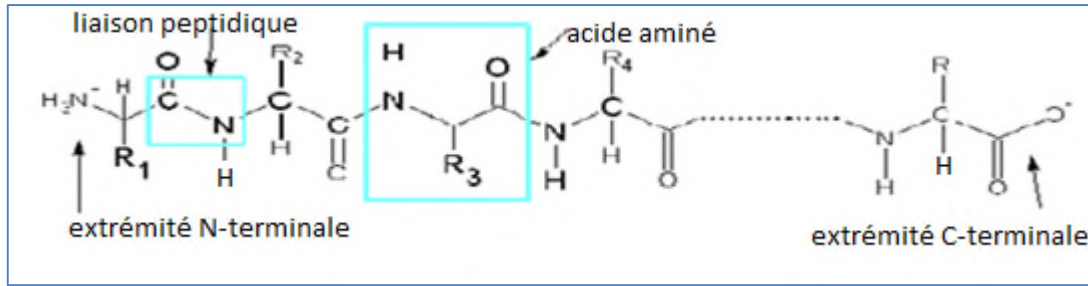
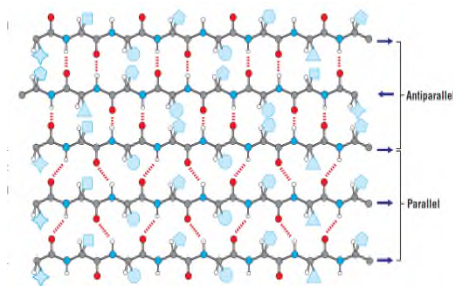


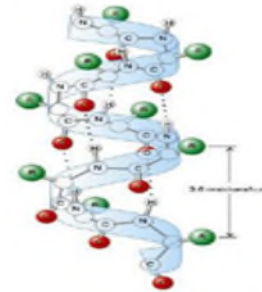
Figure 7 : Formule développée d'une protéine de n acides aminés (Boumaza, 2015).

I .2.1.2. Structure secondaire

Elle correspond à des repliements locaux au sein des protéines dus à la formation de liaisons hydrogène entre des résidus proches dans la séquence. Il existe deux types de structures secondaires régulières : les hélices α et les brins β (Boumaza, 2015) (Figure 8).



Feuillets β



hélice α

Figure 8 : Structure secondaire d'une protéine (Boumaza, 2015).

I .2.1.3. Structure tertiaire

La structure tertiaire se définit comme étant la structure tridimensionnelle d'une protéine. Elle décrit l'interaction spatiale des structures secondaires entre elles. Un certain nombre d'interactions stabilisent les structures tertiaires : les liaisons disulfures, les liaisons hydrogènes, les ponts salins se forment entre deux acides aminés ionisés, les interactions hydrophobes sont formées entre groupements non polaires (Figure 9) (Boumaza, 2015).

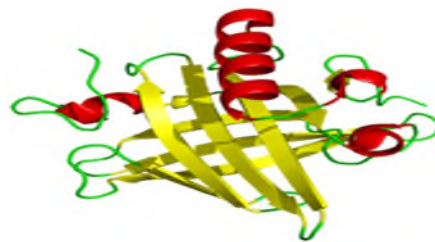


Figure 9 : Structure tertiaire d'une protéine (Boumaza, 2015).

I .2.1.4. Structure quaternaire

Cette structure est le niveau le plus élevé d'organisation des protéines. Elle concerne les protéines constituées de plusieurs chaînes polypeptidiques. L'assemblage de ces sous-unités entre elles par des liaisons faibles constitue la structure quaternaire de la protéine (Ansari et Helms, 2005) (Figure 10).



Figure 10 : Structure quaternaire d'une protéine (Ansari et Helms, 2005).

I .2.2. Protéines intervenant dans l'interaction avec les polyphénols

I .2.2.1. La Caséine

La caséine entière représente 80% des protéines du lait de vache. Elle a un rôle nutritif en apportant de l'azote et d'acides aminés indispensables. Elle est constituée de 4 caséines α_1 , α_2 , β , et K ou kappa qui sont synthétisées dans la glande mammaire à partir de 4 gènes de structure différents situés sur le même chromosome (Guillou et al., 1986).

Les caséines α_1 , α_2 et β sont des phosphoprotéines, la caséine K est une phosphoglycoprotéine. Ces protéines sont hétérogènes, Cette hétérogénéité est due à des teneurs différentes en phosphore pour les caséines α_1 et α_2 ou en sucre pour la caséine K.

Un groupe de caséines mineures a été mis en évidence dans le lait de vache caséine γ . Les 3 caséines de ce groupe (γ_1 , γ_2 , γ_3) proviennent de la protéolyse limitée de la caséine β par la plasmine, enzyme provenant du sang et naturellement présente dans le lait. La caséine α_1 aussi hydrolysée par la plasmine en caséine λ (Guillou et al., 1986).

I .2.2.2. La pepsine

La pepsine est sécrétée par la muqueuse gastrique sous forme de pepsinogène inactif, Le quel est transformé en enzyme active par enlèvement d'un certain nombre de petits peptides dont le pH optimum est très bas (aux environs de 2).

La pepsine hydrolyse préférentiellement la liaison peptidique où est engagé le groupement aminé d'un acide aminé aromatique phénylalanine, tyrosine (Nalinanon et al., 2010).

La pepsine se caractérise par une teneur élevée en acides aminés acides, β -hydroxylé et par la présence d'un petit nombre de résidus basiques. Elle a une forme bilobée avec un domaine N-terminal et un domaine C-terminal séparé par une fente perpendiculaire au plus grand diamètre. Cette fente contient les 2 résidus aspartyles impliqués dans le mécanisme catalytique et constitue un site de liaison du substrat de grande taille, capable de recevoir environ 6 résidus.

I .2.2.3. Albumine de sérum bovin (BSA)

L'albumine est une protéine globulaire hydrosoluble fabriquée par le foie. Est la protéine du plasma la plus abondante chez l'Homme (HSA) et certain mammifères (BSA). Elle est essentielle pour distribution appropriée des fluides corporels entre les compartiments intravasculaires et les tissus (Isaza et al., 2012).

La BSA est une protéine globulaire avec un poids moléculaire de 66,43 KDa. Elle présente une structure primaire en forme de cœur, sa structure secondaire contient entre 50 et 68% d'hélices α et entre 16 et 18% de feuillet β (Bos et al., 1989).

La structure tertiaire de la BSA n'est toujours pas connue, et en raison de sa similitude avec L'albumine sérum humain (HSA), dont le pourcentage d'homologie de séquences entre BSA et la HSA est de 76%, un acide aminé hydrophobe étant remplacé par un autre acide aminé hydrophobe, un acide aminé hydrophile étant remplacé par un autre acide aminé hydrophile de même charge. Les chercheurs supposent que les deux protéines possèdent une structure tridimensionnelle très proche. A ce sujet, des études récentes indiquent qu'il y a des différences parmi certains résidus lysine dans la structure tertiaire de la BSA et de la HSA (Isaza et al., 2012).

La BSA est généralement employée comme une protéine modèle dans plusieurs domaines de recherche comme la biologie moléculaire et la médecine.

I .3. Interaction polyphénols-protéines

Les polyphénols sont doués de multiples effets biochimiques et pharmacologiques, et parmi ces effets figure une propriété importante, qui a fait l'objet de plusieurs études ; interaction des polyphénols avec les protéines. Les polyphénols ont une affinité significative pour les protéines et pour les peptides, cependant la plupart de ces recherches sont basées sur l'étude des interactions entre les tannins et les protéines (**Richard et al., 2006**).

I .3.1. Principe de la complexation polyphénols-protéines

Jobstl et al., (2004) ont proposés un modèle moléculaire en trois étapes pour la complexations entre protéines salivaires riches en proline et l'epigallocatechine–gallate, modèle qui pourrait expliquer les interactions polyphénols-protéines (**Figure 11**).

Dans une première étape, le polyphénol s'associe à la surface de la molécule protéique, et généralement plusieurs molécules de polyphénols qui se lient simultanément à une même molécule protéique. La molécule protéique change alors de la conformation relâchée à une structure plus compacte. Dans une deuxième étape, les polyphénols se lient à plusieurs molécules protéiques rendant ainsi le complexe insoluble et formant une solution colloïdale. Dans une troisième étape, une augmentation du nombre d'interactions cause l'accroissement de la taille des agrégats, ce qui provoque leur précipitation. Ce phénomène se traduit par une diminution du volume hydrodynamique de la molécule protéique durant la première minute qui suit le mélange entre les deux molécules suivi par une augmentation des tailles des particules due à l'agrégation (**Jobstl et al., 2004**).

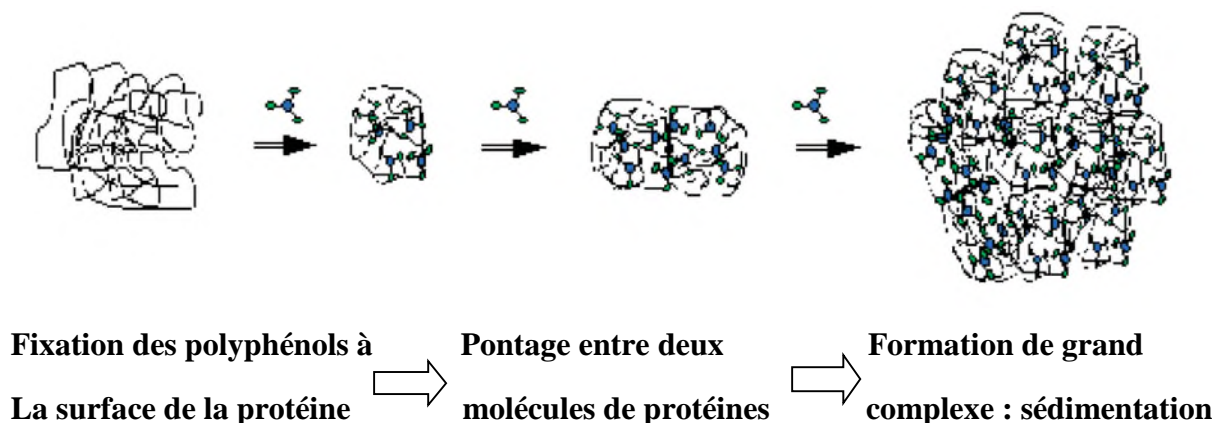


Figure 11 : Principe de complexations entre les polyphénols et protéines (**Jobstl et al., 2004**).

I.3.2. Les différents types interactions

Les principaux mécanismes d'interaction entre les polyphénols et les protéines sont au nombre de trois, représentés sur **la figure 12**.

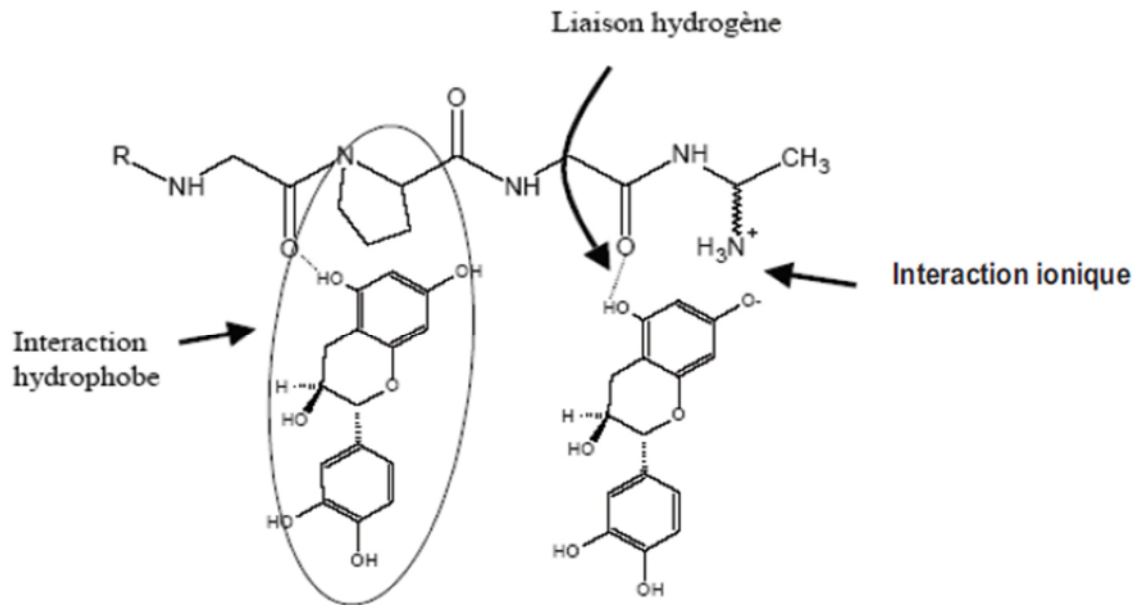


Figure 12 : Les différentes interactions polyphénols/protéines (Croft *et al.*, 2008).

En premier lieu, les interactions hydrophobe entre les groupements latéral de la proline et les multiples sites aromatiques des polyphénols, dans ce cas les liaisons hydrogène apparaissant comme secondaire (Charlton *et al.*, 1996).

Pour Hagerman et Butler, 1981 les liaisons hydrogènes sont la force majeure de stabilisation du complexe polyphénols/protéines. Ces liaisons se créent entre les fonctions hydroxyles des polyphénols et les carbonyles de la protéine et enfin les interactions de type ionique (Croft *et al.*, 2008).

I.3.3. Les paramètres contrôlant le complexe protéines-polyphénols

Les critères définissant l'affinité ou la taille du complexe protéine-polyphénol peuvent être regroupés en deux classes ; les paramètres intrinsèques liés à la nature de la protéine et du polyphénol et les paramètres extrinsèque liés aux conditions dans lesquelles s'effectuent les complexations.

I.3.3.1. Les paramètres intrinsèques

Plusieurs paramètres internes aux protéines et aux polyphénols agissent sur l'interaction des polyphénols avec les protéines sont :

- **La taille de la protéine :** la structure des protéines joue un grand rôle dans l'interaction. Une taille moléculaire plus importante permet à la protéine de s'enrouler autour du tannin augmentant ainsi les possibilités d'interaction (**Adrian et al., 1996**).
- **La taille du polyphénol :** l'augmentation du poids moléculaire du polyphénol favorise la complexation avec les protéines. Les polyphénols sont capables d'établir des liaisons multidentates avec les protéines et l'augmentation de leur masse permettrait d'accentuer ce phénomène. (**Okuda et al., 2006**).
- **Le nombre de groupements hydroxyle :** Le nombre de groupement hydroxyles ainsi leur substitution sont importants dans l'interaction protéines-polyphénols, l'affinité augmente avec l'augmentation du groupement OH libre sur le noyau (**Zhao et Ren, 2009**).

I.3.3.2. Les paramètres liés aux conditions de complexation

Ces paramètres concernent les conditions de solubilisation du complexe, telle que :

- **La Température :** c'est un paramètre qui peut influencer l'affinité de l'interaction, dans certains cas la constante d'affinité de la réaction augmente avec la température (interactions hydrophobes), et dans d'autres cas la constante d'affinité peut également diminuer avec la température (liaisons hydrogènes) (**Rawel et al., 2005**).
- **La force ionique :** Ce paramètre joue un rôle important dans l'interaction protéines-polyphénols. Toute molécule immergée en milieu aqueux est entourée d'une double couche ionique, son épaisseur dépend de la force ionique de la solution, ce qui empêchera la formation de liaisons hydrogène (**Rawel et al., 2005**).
- **La valeur du pH :** l'effet du pH sur les interactions polyphénols/ protéines est extrêmement dépendant des polyphénols et des protéines utilisés (concentration, charge des protéines, groupements hydroxyles des polyphénols). Pour un couple tannin / protéine donné, l'influence du pH n'est pas linéaire et il existe souvent un pH optimum (**Prigent et al., 2003**).
- **L'effet des polysaccharides :** La présence dans la solution de certains polysaccharides comme la pectine et le glucose diminue la formation d'agrégats protéines-polyphénols (**Carvalho et al., 2006**).

II .Matériels et Méthodes

II .1.Matériels

✚ Appareillage utilisés

- Plaque magnétique agitatrice
- Balance analytique de précision
- pH mètre
- Réfrigérateur 4°C
- Fluoromètre synergy/HTX
- Spectrophotomètre analytikjena specord 50

Dans ce travail, les composées phénoliques synthétiques utilisées sont :

- Quercétine (quercetin hydrate, 95%)
- Acide gallique (gallic acid monohydrate Analytical reagent)
- Acide tannique (tannic acid Analytical reagent)
- Catéchine (catechin hydrate, 98%)
- Rutine (rutin Analytical reagent)

Et les protéines utilisées sont :

- Caséine du lait de vache (fabriquée par SIGMA life science)
- BSA (fabriquée par Biochem chemopharma)
- Pepsine (fabriquée par Biochem chemopharma)

II .2. Méthodes

II .2.1. Préparation des solutions

A)- La solution protéique

✚ Les solutions protéiques (sérum albumine bovine(BSA), pepsine, caséine du lait de vache) ont été préparées par solubilisation de 600mg de chaque protéine dans 200ml de tampon phosphate de sodium à 0,1M, pH 7.

Les solutions protéines ensuite conservée à 4° C jusqu'à leur utilisation.

B)- La solution des composées phénoliques

✚ Les solutions des composées phénoliques (acide gallique, tannique, la quercétine, la rutine, la catéchine) ont été préparée par la solubilisation de 20mg de chaque composées phénoliques dans 200ml de l'éthanol 99% à une concentration de 0,1mg/ml.

Les solutions préparées ont été conservées dans des récipients hermétiques à température 4° C.

II .2.2. Etude de l'interaction protéine-polyphénol

Les polyphénols sont connus pour leurs caractéristiques interactionnelles avec les protéines. Les interactions polyphénols-protéines sont visualisables par l'aspect turbide de la solution. L'analyse de la turbidité a été réalisé par :

- 1- La méthode spectrophotométrie :** C'est une méthode qui a pour but de mesurer des absorbances des molécules d'une solution selon les longueurs d'onde des groupements chromophores de ces molécules. On parle alors de spectrophotométrie moléculaire dans l'UV ou bien le visible (**Winiarski et al., 1995**).
- 2- La méthode fluorométrie :** Est basée sur la capacité « d'extinction » de la fluorescence du chromophore d'une molécule par une autre. Elle permet de détecter les composées à des concentrations très faibles. Comme le spectre d'absorption. (**Galez, 2011**).

II .2.2.1. Effet de la concentration des protéines

➤ Mise en évidence de l'interaction polyphénols-protéines

La mise en contact de la solution protéique (3mg/ml) avec la solution de composée phénolique (0,1mg/ml) à température ambiante ou la concentration du polyphénol reste constante et ont fait varier la concentration de la protéine entre 0,5 et 2 mg/ml (**tableau 1**). Le milieu réactionnel contient aussi le tampon phosphate de sodium 0,1M, pH=7. On le laisse incuber le mélange pendant 40 minutes à l'obscurité, ensuite on mesure les spectres d'absorbance entre 250 et 600 nm par les deux méthodes spectrales, pour déterminer les longueurs d'onde maximale de chaque composé phénolique.

Tableau 1 : Constitution du milieu réactionnel pour l'étude de l'effet de la concentration Des protéines sur les composées phénoliques.

Tube	1	2	3	4	5
Tampon phosphate de sodium (0.1M.pH7) (en ml)	2,7	2,2	1,7	1,2	0,7
protéines (3mg/ml) (en ml) : -CLV - BSA - PEP	0	0,5	1	1,5	2
Polyphénols (0.1mg/ml) (ml) : -Quercétine -Acide tannique -Rutine -Catéchine -Acide gallique	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3

II .2.2.2. Effet de la force ionique

Dans le but d'étudier l'effet de la force ionique, on a préparé des solutions de tampon phosphate de sodium à pH=7 et à différentes molarités (0,05 ; 0,1 ; 0,5 ; 1M). Par suite nous avons mélangé les différentes solutions : le tampon phosphate de sodium, la protéine et le composé phénolique solubilisé dans l'éthanol (**tableau2**). Après 40 minutes d'incubation les densités optiques ont été mesurées.

Tableau 2 : Constitution du milieu réactionnel pour l'étude de l'effet de la force ionique Sur complexe composées phénoliques -protéines.

Molarités	0,05M	0,1M	0,5M	1M
Tampon phosphate de sodium (0.1M.pH7) (en ml)	1,7	1,7	1,7	1,7
protéines (3mg/ml) en (ml) : -CLV - BSA - PEP	1	1	1	1
polyphénols (0.1mg/ml) (ml) : -Quercétine -Acide tannique -Rutine -Catéchine -Acide gallique	0,3	0,3	0,3	0,3

II .2.2.3. Effet du pH

Dans le test d'évaluation de l'effet du pH, nous avons mélangés le composé phénolique avec la protéine dans un tampon phosphate de sodium à différentes pH comme le décrit le **tableau 3**. Après 40 minutes d'incubation les densités optiques ont été mesurées.

Tableau 3 : Solubilisation du composé phénolique et la protéine dans le tampon phosphate 0,1M à différentes PH.

	pH=4	pH=4,5	pH=5	pH=5,5	pH=6	pH=6,5	pH=7
Tampon phosphate de sodium (0,1M à différentes pH) (ml)	1,7	1,7	1,7	1,7	1,7	1,7	1,7
Protéines (3mg/ml) (ml) : -CLV -BSA -PEP	1	1	1	1	1	1	1
polyphénols (0,1mg/ml) (ml) -Quercétine -Acide tannique -Rutine -Catéchine -Acide gallique	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3

III . Etudes de l'interaction protéines-polyphénols

III .1. Effet de la concentration des protéines

L'études de l'interaction protéines-polyphénols permet de suivre l'évolution des complexes polyphénols-protéines par spectrophotométrie et fluorométrie à des longueurs d'ondes différentes caractériser de chaque composés phénoliques (280 nm pour les flavonoïdes ,290 nm pour les tannins et 270 nm pour l'acide gallique) , en considérant qu'à ces longueurs d'ondes, l'intensité de l'absorption de la lumière est proportionnelle à la concentration des complexes formés.

La détermination de la longueur d'onde maximale a été réalisée on traçant le spectre de densité optique en fonction de la longueur d'onde dans la gamme allant de 250 à 600 nm (Annexe 1-9).

Pour évaluer l'effet de la concentration des protéines sur l'évolution de spectre d'absorbance nous avons mesuré la densité optique (DO) des complexes à différentes concentrations de protéine, et les résultats sont montrés sur les figures (13 ; 14 ; 15).

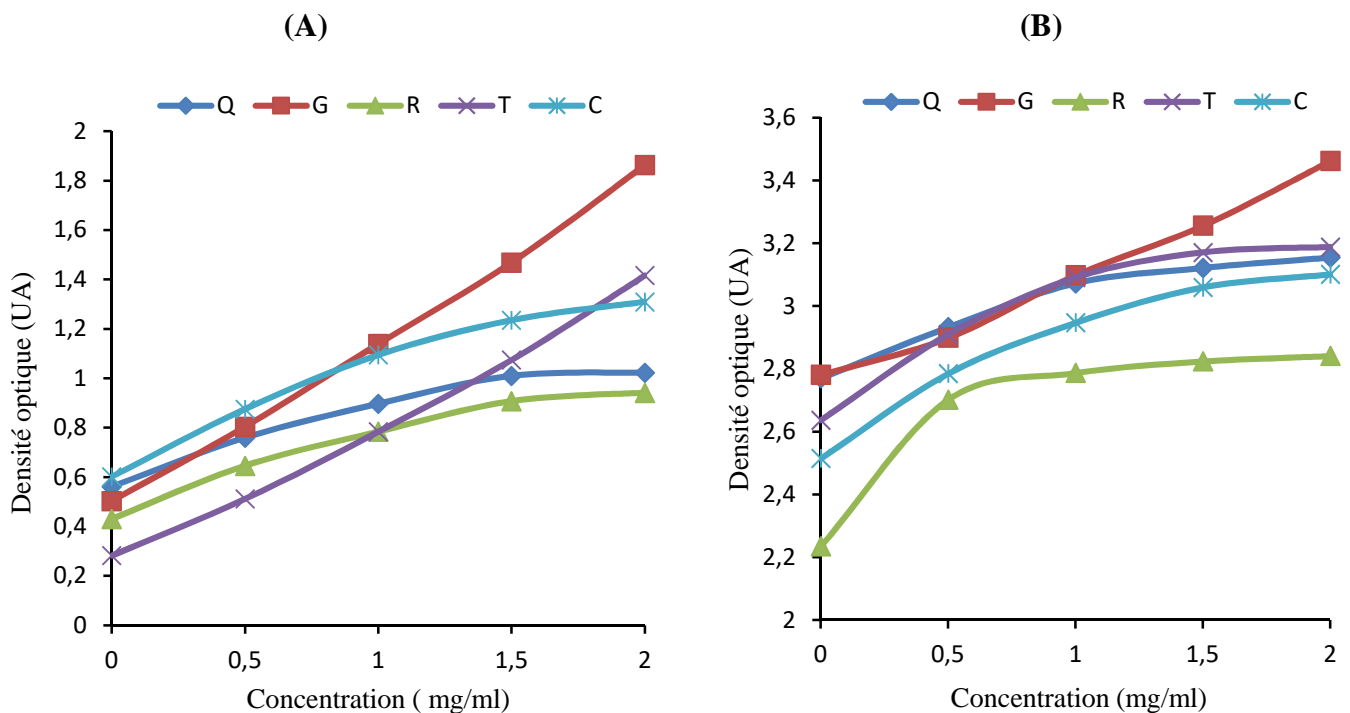


Figure 13 : Variation de la densité optique en fonction de la concentration du sérum albumine bovine. (A) Spectrophotométrie, (B) Fluorométrie. C : catéchine, T : A.Tannique, G : A. gallique, Q : quercétine, R : rutine.

Les résultats montrés par la méthode fluorométrique (**Figure 13 .B**), indique que les complexes quercétine, rutine, acide tannique et catéchine avec la BSA forment une courbe hyperbolique, avec une augmentation de la DO pour les premières concentrations (0,5 et 1mg/ml), puis la courbe se stabilise à une DO maximal (3,1mg/ml). Cette stabilisation peut être expliquée par le fait que tous les composés phénoliques sont sous forme complexés avec la BSA, donc même si on augmente la concentration de la protéine, la DO reste constant. Par contre le complexe formé par l'acide gallique-BSA évolue d'une manière croissante linéaire avec la concentration du sérum albumine bovine.

Concernant la méthode spectrophotométrie (A), les résultats obtenus sont presque similaires à ceux trouvés par la méthode fluorométrique (B). La légère différence se constitue au niveau de la courbe enregistrée pour le complexe acide tannique-BSA.

La différence des résultats enregistrés entre le complexe acide gallique-BSA et le reste des complexes, peut être due à la différence structurale de l'acide gallique qui possède moins de groupements OH par rapport aux autres composés phénoliques, ce qui lui empêche de former assez de pont croisé avec le site actif de la BSA.

Pour l'étude de l'effet de la concentration de la caséine du lait de vache (CLV), les résultats sont montrés sur **la figure 14**, on constate alors facilement que la DO des différents complexes formés évolue avec l'évolution de la concentration de la caséine.

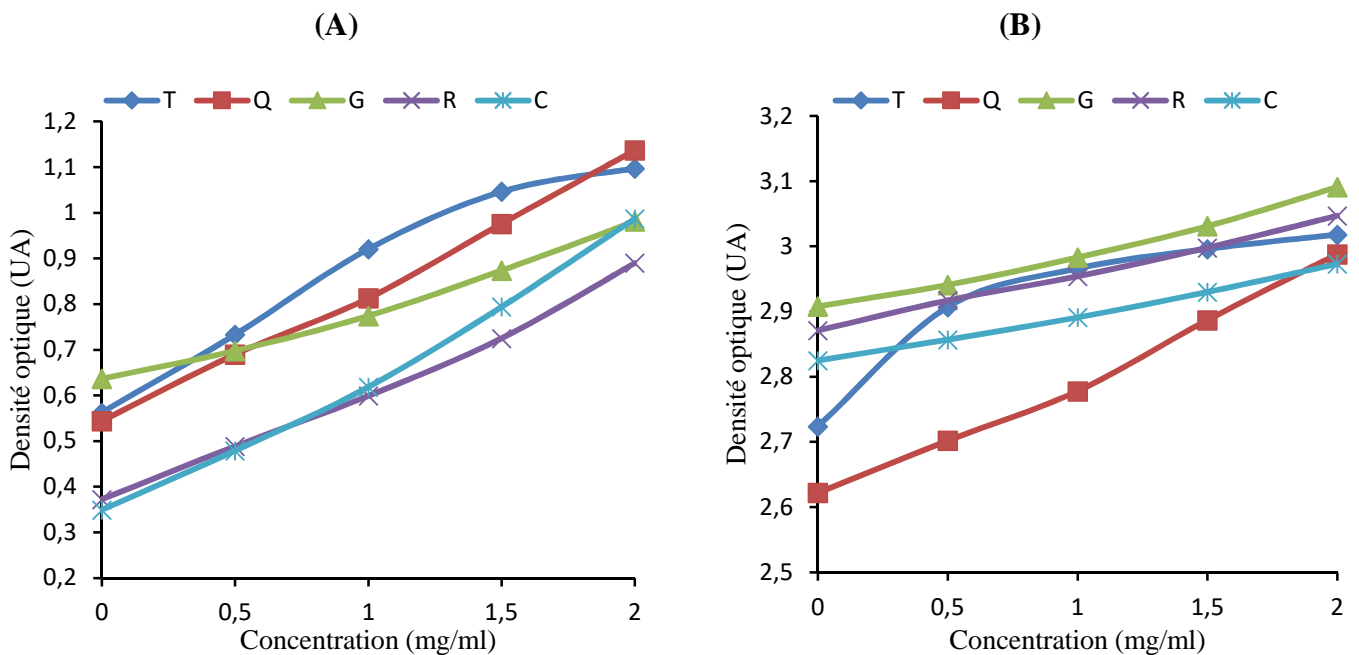


Figure 14 : Variation de la densité optique en fonction de la concentration de la caséine du lait de vache. (A) Spectrophotométrie UV-visible, (B) Fluorométrie. C : catéchine, T : A.Tannique, G : A.gallique, Q : quercétine, R : rutine.

D'après les résultats montrés sur **la figure 14**, on constate que la DO des différents complexes formés évolue d'une manière proportionnelle avec la concentration de la caséine du lait de vache (CLV), pour les deux spectres (A) et (B).

Concernant le spectre obtenu en A, on remarque que la DO du complexe CLV-acide tannique augmente en fonction de la concentration de la caséine du lait de vache, pour les trois premières concentrations testées (0,5 ; 1 ; 1,5mg/ml). Après sa l'allure elle se stabilise a une DO maximal de 1,5mg/ml, ce qui peut être due à un phénomène de saturation. Quant au spectre obtenu en B, la même allure que celle de A.

Tant dit que les complexes formés entre le reste des composés phénoliques (quercétine, acide gallique, rutine et catéchine) avec la caséine du lait de vache, montre une courbe différente dans les deux méthodes (A et B).

La différence enregistrés dans les résultats pour le complexes CLV-acide tannique et le reste des complexes formés peut s'expliquer par le fait, que l'acide tannique possède une structure différente des autres composés phénoliques ou il possède plus de groupements OH libre, ce qui lui permet de former assez de liaison avec le site actif de la caséine du lait de vache et donc il atteint rapidement sa saturation. De plus, l'acide tannique présente une forte affinité pour les protéines riche en proline et glycine précisément la caséine (**Zimmer et Cordess, 1996**).

Les résultats enregistrés pour les complexes acide gallique-caséine du lait de vache et catéchine-caséine du lait de vache ne sont pas compatible avec ceux de **Abi AZAR, 2007**, ou la formation des complexes est suivie à 600 nm. Ce qui peut être due à la différence structurelle entre la caséine et la caséine du lait de vache.

La figure 15 représente les résultats enregistrés par les deux méthodes spectrophotométrie (A) et fluorométrie (B) pour les complexes pepsine-polyphénols, ou on constate que la DO des différents complexes formé évolue d'une manière proportionnelle avec l'évolution de la concentration de la pepsine (PEP).

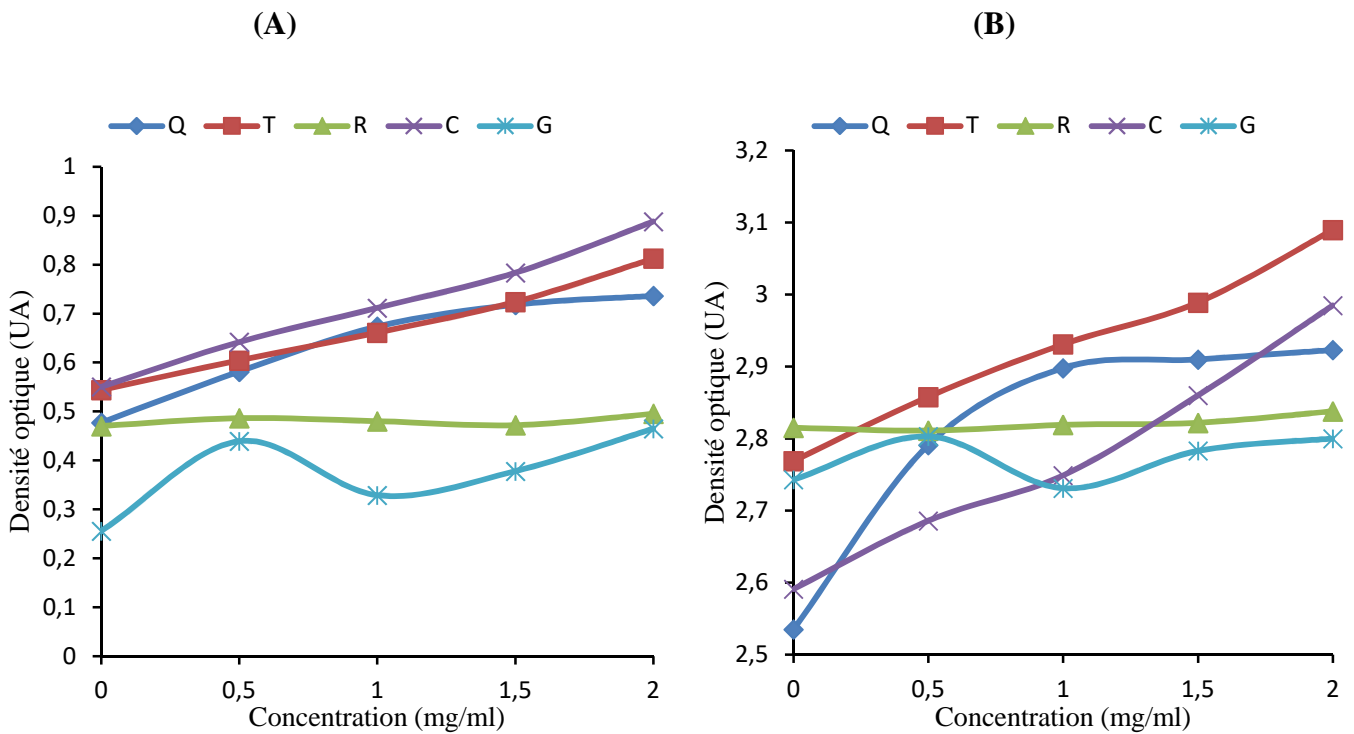


Figure 15 : Variation de la densité optique en fonction de la concentration de la pepsine. (A) Spectrophotométrie, (B) Fluorométrie. C : catéchine, T : A.Tannique, G : A.gallique, Q : quercétine, R : rutine.

La courbe enregistrée pour le complexe PEP-Quercétine elle a une tendance hyperbolique, ou la DO augmente avec l'augmentation de la concentration de la PEP et ceci pour les deux premières concentrations (0,5 et 1mg/ml), puis la courbe elle se stabilise à une DO maximal enregistré pour les deux dernières concentrations (1,5 et 2mg/ml).Ce qui est peut être expliqué par le phénomène de saturation.

Par contre dans la courbe enregistrée pour les deux composés phénoliques acide gallique et rutine elle n'a pas donné de résultats significatifs, ce qui est peut être dû à l'environnement non favorable à la pepsine pour rentrer en interaction, vu que la pepsine est une protéine gastrique.

Pour les complexes (catéchine-PEP, tannin-PEP) la DO augmente avec l'augmentation de la concentration de la pepsine d'une façon croissante ; sans cesse, ce qui explique que ces complexes n'ont pas atteint leur saturation au niveau des sites de liaisons.

Les résultats enregistrés pour le complexe catéchine-PEP en (B) sont similaires avec ceux obtenue par **Chan Liu et al., (2016)** ou il a validé la présence de forte affinité de liaison entre la catéchine et cette protéine gastrique.

Cette différence des résultats entre les complexes former peut être due à la structure qui caractérise chaque composé phénolique (**figure 16**).

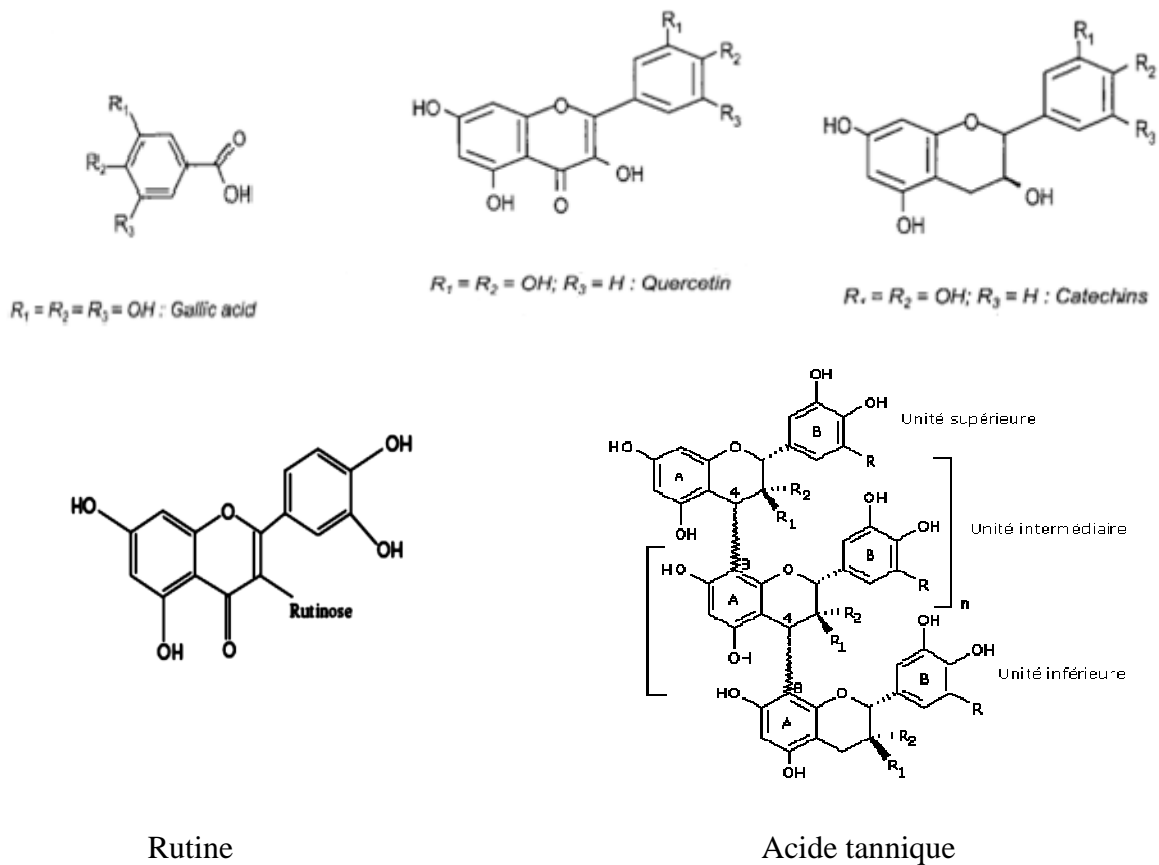


Figure 16 : Structure chimique des principaux acides phénoliques (Manach *et al.*, 2004).

L'affinité entre les protéines et les polyphénols change en fonction de leur nature et de leur structure. Ce qui peut expliquer la différence des résultats obtenue pour les trois protéines BSA, pepsine, et caséine du lait de vache. Le sérum albumine bovine (BSA) a une structure ouverte et flexible, or que la pepsine est une enzyme qui possède une structure globulaire compacte, par contre les caséines ont une structure de micelle (Ribadeau-Dumas, 1991).

III .2. Effet de la force ionique

Les figures 17 ; 18 et 19 représentent la variation de l'absorbance des complexes BSA-polyphénols, caséine du lait de vache-polyphénols, Pepsine-polyphénols en fonction de la concentration du tampon phosphate de sodium à pH=7.

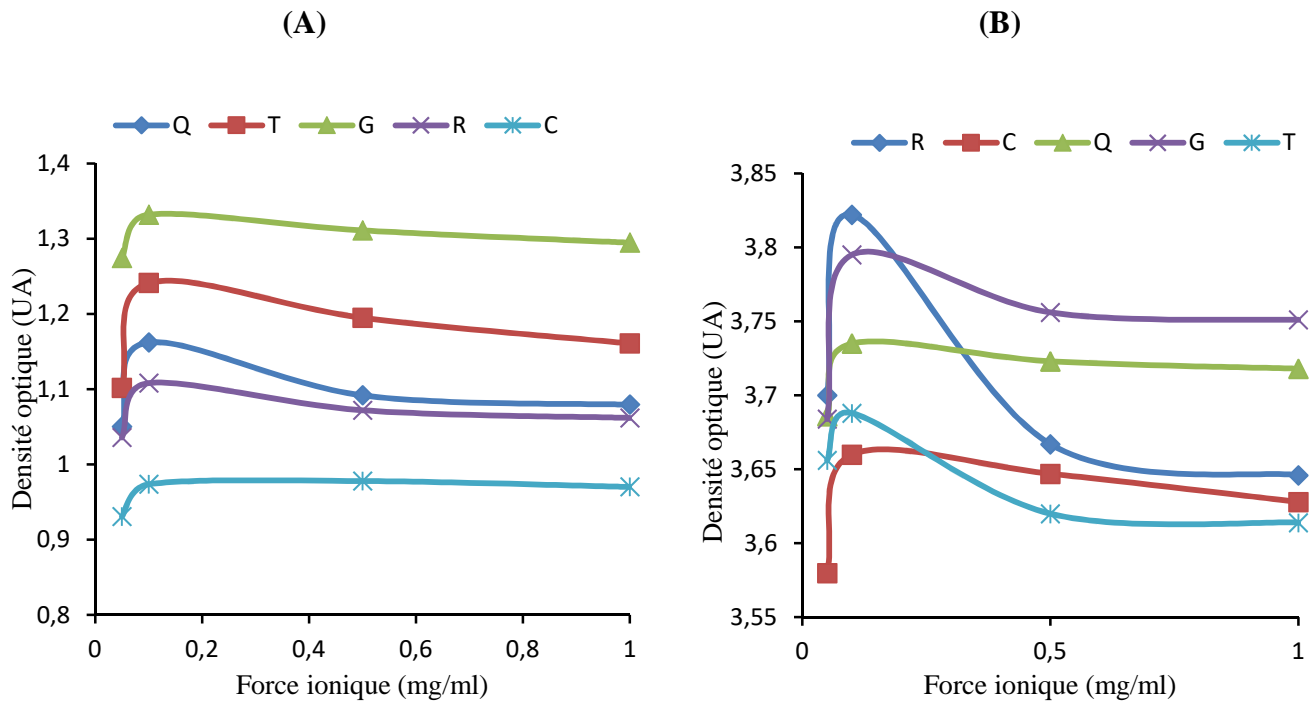


Figure17 : Variation de la densité optique du complexe BSA-polyphénols en fonction de la concentration du tampon phosphate de sodium à pH 7. (A) Spectrophotométrie, (B) Fluorométrie. . C : catéchine, T : A. Tannique, G : A.gallique, Q : quercétine, R : rutine.

Les résultats trouvés par la méthode spectrophotométrie (A) et la méthode fluorométrique (B) (**figure 17**), montre une augmentation de la densité optique des complexes BSA-acide tannique, rutine, catéchine, quercétine, acide gallique avec la variation de la concentration du tampon phosphate allant de 0,05 à 0,1 mg/ml et une diminution pour les concentrations supérieures à 0,1mg/ml. Cette diminution dans la densité optique des complexes est peut être due à la faible interaction entre les différents composés phénoliques avec le sérum albumine bovine. Ce qui indique que l'interaction d'association de la BSA avec ces composés phénoliques sont de type électrostatiques rompt facilement par l'augmentation de la concentration du tampon phosphate, ce qui provoque la dissociation des complexes, aussi l'augmentation des forces ioniques dans le milieu réactionnelle empêche la formation de nouvelles liaisons (**Edelmann et al., 2003**).

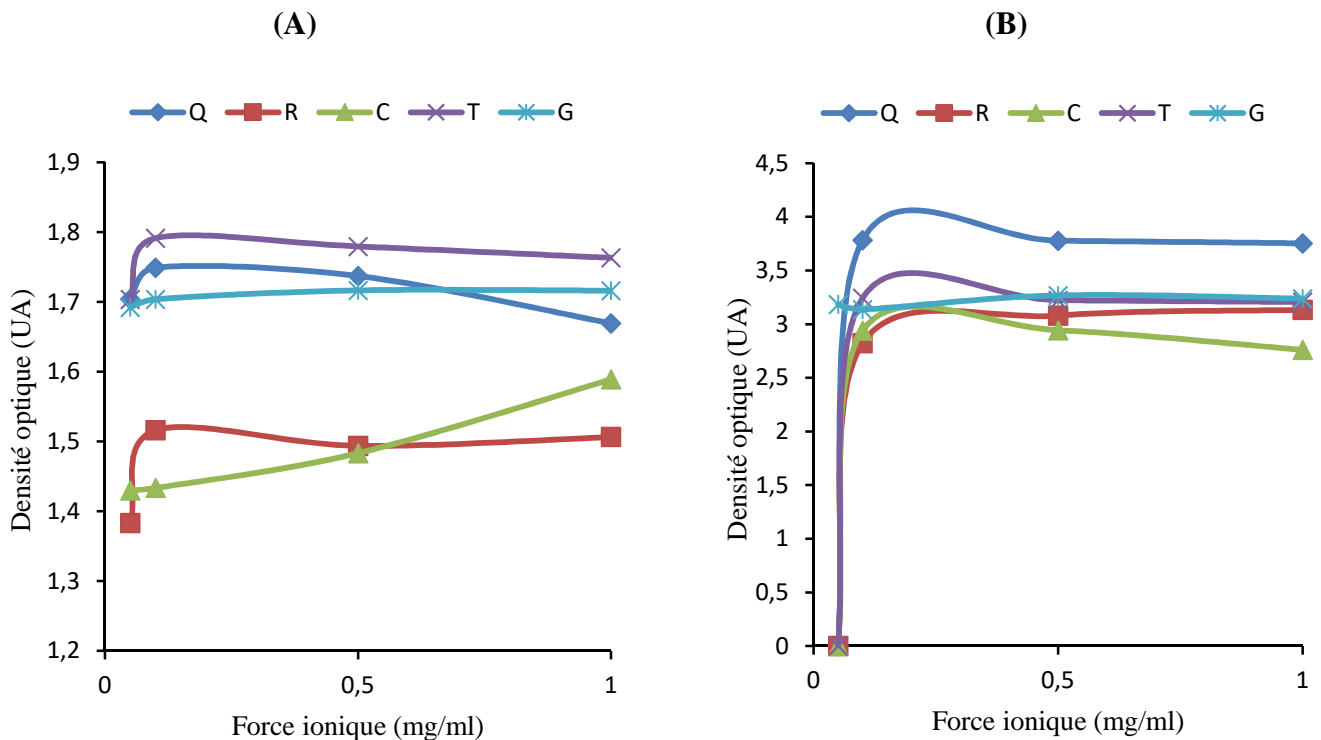


Figure 18 : Variation de la densité optique du complexe caséine du lait de vache-polyphénols en fonction de la concentration du tampon phosphate de sodium à pH 7. (A) Spectrophotométrie, (B) Fluorométrie. . C : catéchine, T : A.Tannique, G : A.gallique, Q : quercétine, R : rutine.

La Figure 18, montre les résultats obtenue avec la caséine du lait de vache (CLV), la DO des complexes quercétine-CLV, tannin-CLV, rutine-CLV augmente avec l'augmentation de la concentration du tampon phosphate allant de 0,05 à 0,1mg/ml, puis on remarque une diminution de la valeur de la DO pour les concentrations supérieures à 0,1mg/ml. Cette diminution est peut être due à la faible interaction entre la caséine et les différents composés phénoliques causé par l'augmentation de la présence des forces ioniques dans le milieu, ce qui empêche la formation des liaisons entre ces composés et la protéine, donc pas de formation de complexe CLV-polyphénols.

Concernant le complexe CLV-catéchine les résultats trouvés par la méthode spectrophotométrie ne sont pas compatible avec les résultats obtenue par la méthode fluorométrique, cette dernière nous a donné la même courbe des complexes précédents (quercétine-CLV, tannin-CLV, rutine-CLV), par contre les résultats obtenue par la méthode spectrophotométrie montrent une courbe droite croissante qui évolue avec la variation de la concentration du tampon phosphate.

Le complexe acide gallique- CLV n'a pas donné de résultats significatifs pour les deux méthodes (A et B) ou la courbe reste constante toute ou long des différents concentrations du tampon phosphate de sodium, ce qui est peut être expliqué par le fait que la force ionique n'a aucune influence sur le complexe.

La figure 19 représentent la variation de l'absorbance des complexes Pepsine-polyphénols en fonction de la concentration du tampon phosphate de sodium a pH=7.

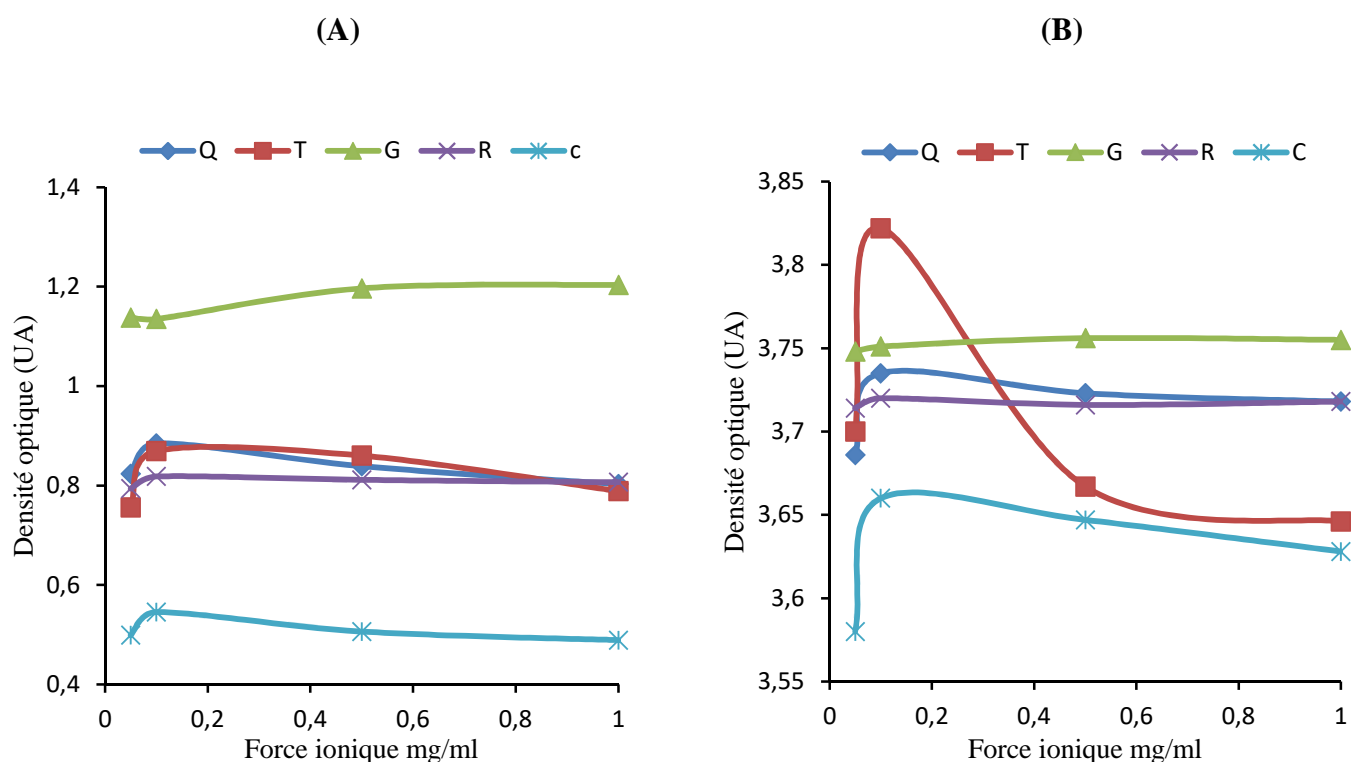


Figure 19 : Variation de la densité optique du complexe pepsine-polyphénols en fonction de la concentration du tampon phosphate de sodium à pH 7. (A) Spectrophotométrie, (B) Fluorométrie. C : catéchine, T : A.Tannique, G : A.gallique, Q : quercétine, R : rutine.

D'après le spectre obtenue en A et B on constate que la DO des complexes acide tannique-PEP, Quercétine-PEP et Catéchine-PEP évolue en fonction de la concentration du tampon phosphate de 0,05 à 0,1mg/ml, ensuite y aura une diminution progressive de la DO avec l'augmentation de la concentration du tampon au-delà de 0,1mg/ml. Ce qui peut être expliqué par la faible interaction entre la pepsine et ces composés phénoliques causé par l'augmentation des forces ioniques dans le milieu.

Par contre les résultats obtenue pour les deux composés phénoliques acide gallique et rutine ne sont pas similaire avec les résultats trouver pour les autres complexes, le spectre A et B montre une courbe linéaire constante tout au long de l'évolution de la concentration du tampon phosphate pour les deux composés , ce qui signifie que la force ionique n'a aucune influence.

Cette différence de résultats est peut être due à la différence au niveau des structures qui caractérise chaque composé phénolique, et elle confirme aussi l'absence de formation des complexes entre PEP-rutine et PEP-acide gallique.

Pour **Hagerman et al., (1981)** ont estimer que Plus la force ionique augmente, plus l'interaction entre des tannins hydrolysables et des protéines augmentent, par contre **Rawel et al., (2005)** ont validé le fait que plus la force ionique augmente, plus l'interaction entre la BSA et la quercétine est faible. Ce qui est en accord avec nos résultats.il reste difficile de savoir si l'effet de la force ionique est lié à des modifications de conformation des protéines ou des polyphénols, voire à une modification des propriétés du solvant ; tous ces mécanismes ont été mis en cause.

III .3. Effet du pH

Les variations d'absorption du complexe protéine-polyphénol en fonction de pH sont représentées dans **les figures (20, 21, et 22)**.

Le pH influence la liaison entre les polyphénols et les protéines. L'affinité et la précipitation des protéines diminuent à pH faible et fort (inférieur à 4 et supérieur à 7), mais sont optimales lorsque le pH est proche du point isoélectrique de la protéine, c'est-à-dire quand les forces de répulsions entre les protéines sont minimales (**Hagerman et Butler, 1981**).

La courbe de variation de l'absorbance du complexe polyphénols-BSA en fonction du pH, pour les deux méthodes spectrophotométrie (A) et fluorométrie (B) présente une allure en cloche avec un maximum à pH=5,5 (**figure 20**).

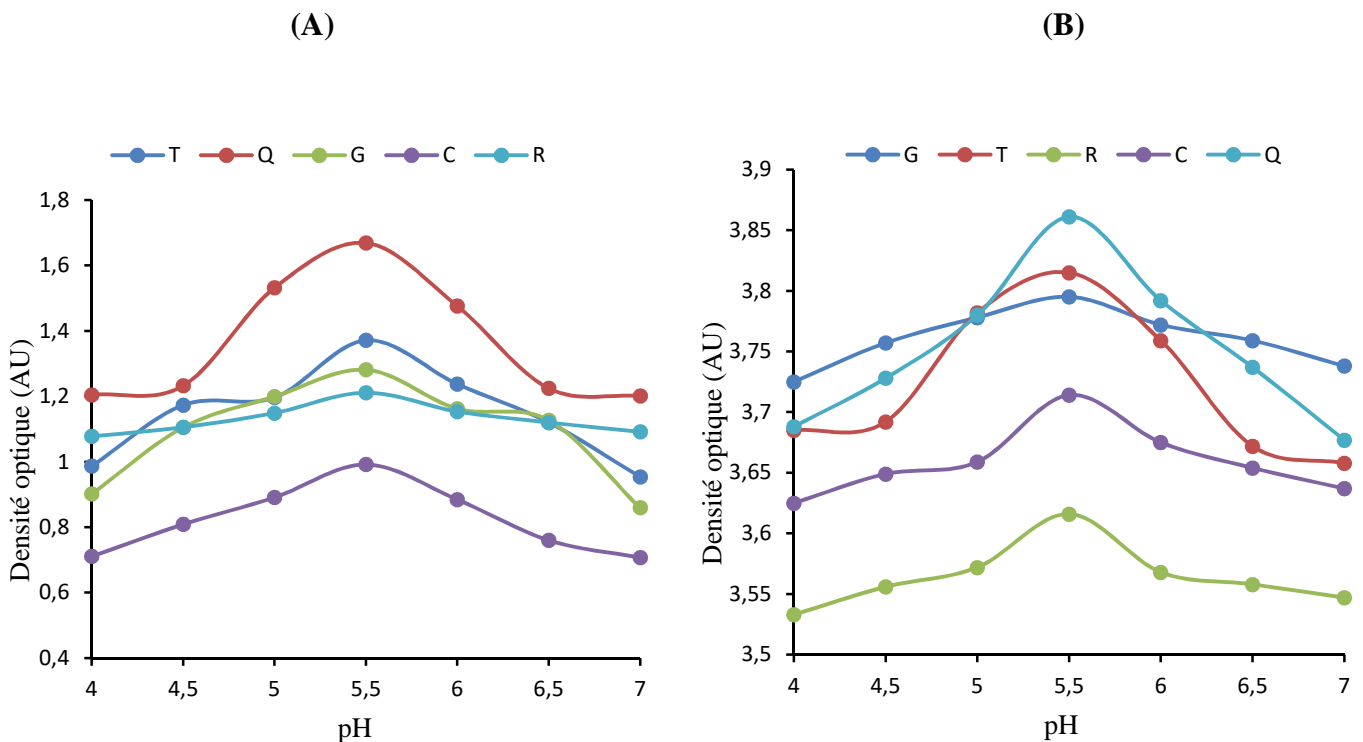


Figure 20 : Variation de l'absorbance du complexe BSA-polyphénols dans un tampon phosphate de sodium 0,1 M en fonction de pH. (A) spectrophotométrie, (B) Fluorométrie. C : catéchine, T : A.Tannique, G : A.gallique, Q : quercétine, R : rutine.

Les résultats des deux méthodes (A, B) montre que les interactions entre la quercétine et la BSA ainsi pour les interactions catéchine-BSA, Acide tannique-BSA, dépend des pH. Les interactions de complexation sont donc des interactions polaires, de type électrostatique ou hydrogène.

Dans les cas où les liaisons sont de type électrostatique, la quercétine doit être sous forme anionique O^- donc les résidus des sites protéiques interagissant sous forme cationique (chargés positivement) comme le groupement NH^+ des acides aminés basiques (histidine, lysine, arginine) (wroblewski *et al.*, 2001).

Dans les cas où les liaisons sont de type hydrogène, les groupements hydroxyle de la quercétine jouent le rôle de donneurs, les groupements accepteurs au niveau de site de liaison peuvent être l'azote ou l'oxygène (le groupement $C=O$) des résidus histidine, asparagine et glutamine (Prigent, 2005).

Concernant la méthode fluorométrique (B), les résultats obtenus sont presque similaires à ceux trouvés par la méthode spectrophotométrique (A), avec une légère différence au niveau de la courbe enregistrée pour le complexe acide gallique-BSA qui n'a pas donné un pic remarquable.

Le **figure 21** représente la variation de l'absorbance du complexe polyphénol-caséine du lait de vache en fonction du pH (de 4 à 7).

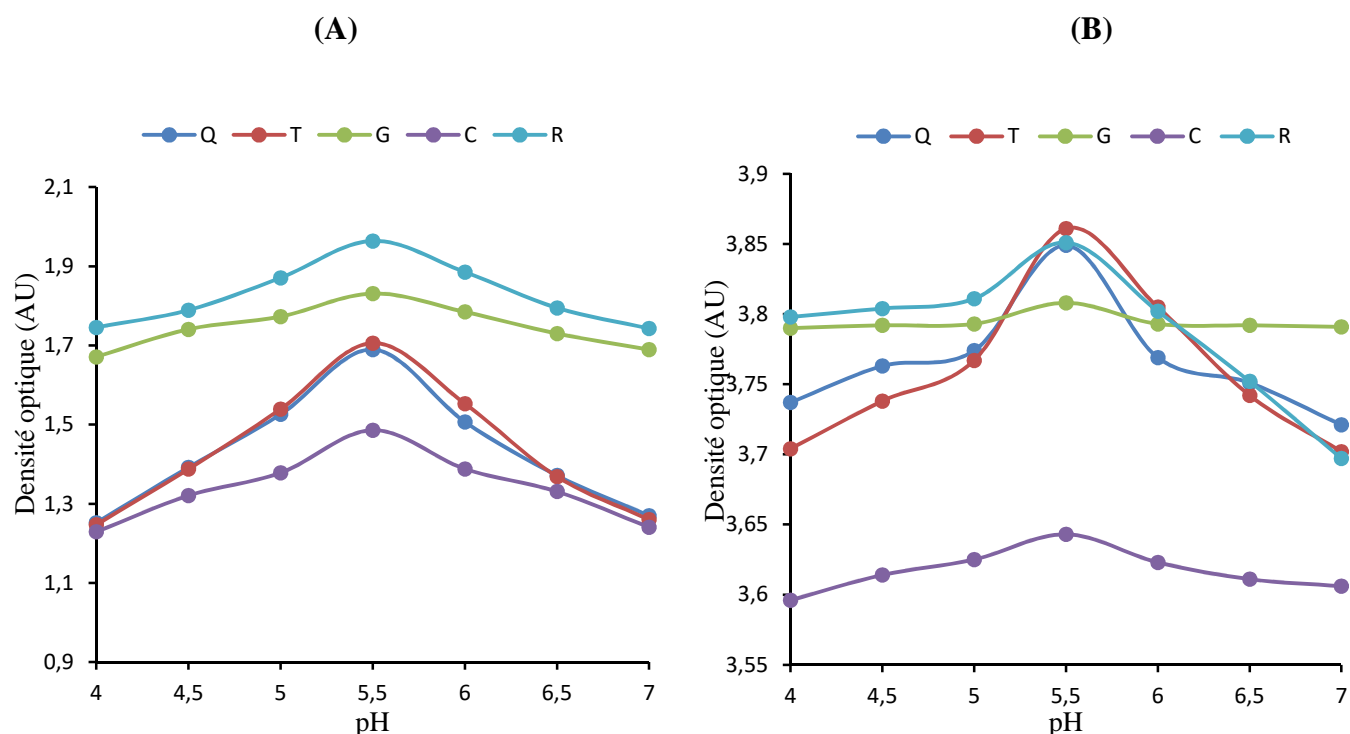


Figure 21 : Variation de l'absorbance du complexe caséine du lait de vache-polyphénols dans un tampon phosphate de sodium 0,1 M en fonction de pH. (A) spectrophotométrie, (B) Fluorométrie. C : catéchine, T : A.Tannique, G : A.gallique, Q : quercétine, R : rutine.

Le spectre obtenu pour les deux méthodes (A et B), montre une courbe avec un pic à pH=5,5, dont on remarque une augmentation de la DO pour les complexes (quercétine-CLV ; catéchine-CLV ; rutine-CLV ; acide tannique-CLV) avec l'augmentation du pH (de pH= 4 à pH= 5,5), puis une diminution progressive de la densité optique.

Ces résultats peuvent être expliqués par le fait qu'à des pH acides la modification de la charge de la caséine doit induire d'importantes modifications dans sa structure et la polarité de ces acides aminés ce qui provoque la diminution du pourcentage de la protéine précipité avec les polyphénols (Sausse, 2003). Or on sait qu'au voisinage de son $pI=4,7$, la caséine présente de force de répulsion minimale. De même pour les pH supérieurs à 5,5, la caséine perd sa conformation ce qui explique la faible interaction entre la caséine et les polyphénols.

Le spectre du complexe acide gallique-caséine du lait de vache n'a pas donné la même courbe en cloche, mais on remarque qu'il existe une légère augmentation de la DO avec l'augmentation du pH jusqu'au 5,5, puis une diminution progressive de la DO en fonction du pH. Ce qui peut être expliqué par le fait que l'acide gallique est un composé simple et ne contient pas dans sa structure assez de groupement OH pour ce lié à la caséine.

La figure 22 représente la variation de l'absorbance du complexe pepsine-polyphénols en fonction du pH (de 4 à 7).

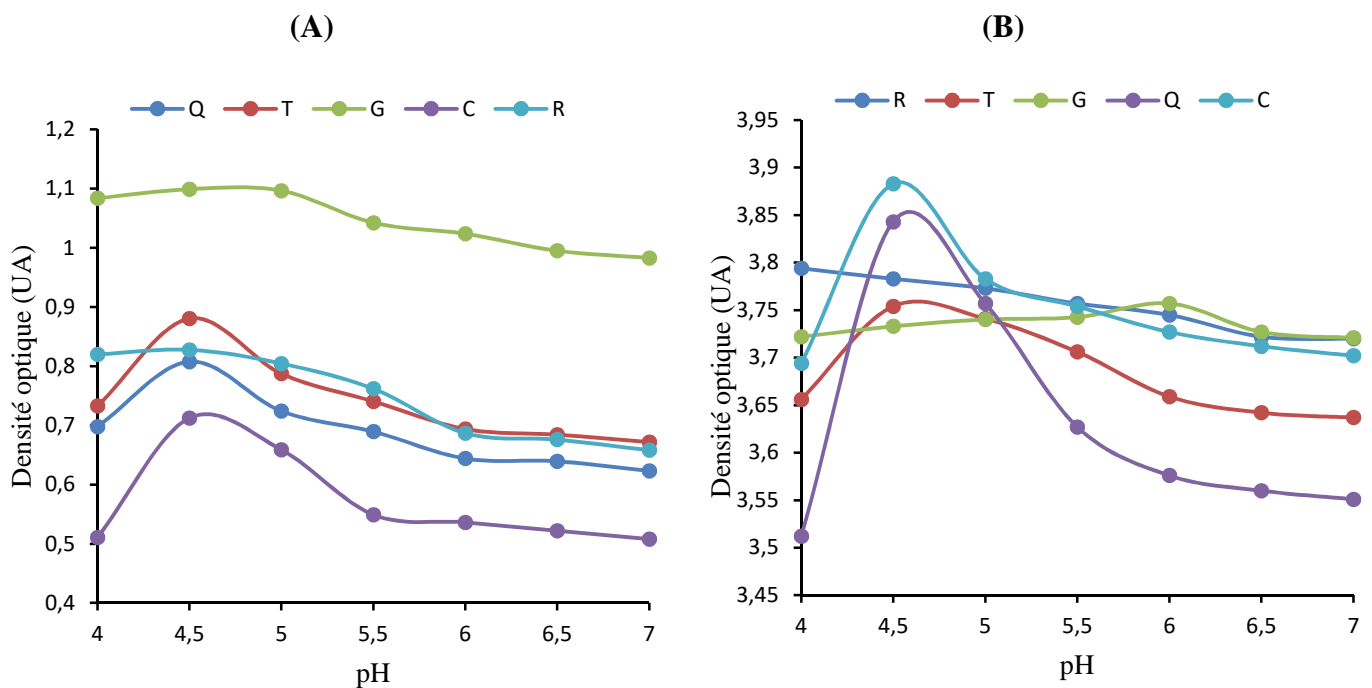


Figure 22 : Variation de l'absorbance du complexe pepsine-polyphénols dans un tampon phosphate de sodium 0,1 M en fonction de pH. (A) spectrophotométrie, (B) Fluorométrie. C : catéchine, T : A.Tannique, G : A.gallique, Q : quercétine, R : rutine.

La courbe de variation de l'absorbance du complexe polyphénols-pepsine (PEP) en fonction du pH, pour les deux méthodes spectrophotométrique (A) et fluorométrique (B) présente une allure en cloche avec un maximum à pH=4,5, dont on remarque une augmentation de la DO pour les complexes (quercétine-PEP ; catéchine-PEP ; acide tannique-PEP,) jusqu'au pH=4,5, puis une diminution progressive de la densité optique suivie d'une stabilisation de la courbe. Ce qui peut être expliqué par le fait que la protéine se lie aux polyphénols avec une forte affinité lorsque le pH du milieu est proche du point isoélectrique de la protéine (pI de la pepsine = 1,9).

Les résultats obtenus en B concernant le complexe catéchine -PEP est en accord avec ceux trouvés par (**Chan Liu et al., 2016**) où il a confirmé que l'activité de la pepsine est maximale à des pH acide.

Concernant les deux composés phénoliques rutine, et acide gallique le spectre obtenu en A et B n'a pas donné une courbe significative ce qui confirme l'absence d'interaction.

La valeur du pH est très importante pour l'interaction, de ce fait les interactions protéines-composés phénoliques sont maximales à des pH proches du pI (**peterson et al., 2003**). Ce qui explique la différence des résultats obtenus pour les trois protéines qui se caractérisent par des pI différents (pI BSA=4,9 ; pI caséine du lait de vache=4,8 et pI pepsine=1,9).

Les composées phénoliques sont des molécules très répandues dans le règne végétal pouvant se lier très facilement à des nombreuses molécules, en particulier les protéines. Pour mettre en évidence l'interaction entre le sérum albumine bovine -polyphénols, caséine du lait de vache-polyphénols, et pepsine-polyphénols, on a utilisé comme technique d'analyse la spectrophotométrie UV-Visible et la fluorométrie.

A l'issue de notre travail on conclut que :

- Il y a établissement des interactions entre les protéines (sérum albumine bovine, caséine du lait de vache, et la pepsine) et les composées phénoliques (quercétine, rutine, acide gallique, acide tannique, et catéchine). Ces interactions sont influencées par : la concentration en protéines, le pH du milieu (pH maximal : BSA et CLV = 5,5, Pepsine = 4,5) et la force ionique (0,1 M).
- Il existe une certaine différence de l'intensité d'interaction entre les différentes protéines et les polyphénols, où la BSA donne une intensité d'interaction meilleure que les deux autres protéines (méthode spectrophotométrie : DO_{BSA} [0,8-1,9] UA ; méthode fluorométrique : DO_{BSA} [2,8-3,5] UA) ; ainsi que la différence structurale des composées phénoliques influe sur l'intensité de l'interaction (nombre de groupement OH).
- Les interactions de stabilisation des complexes (BSA-polyphénols ; CLV-polyphénols ; PEP-polyphénols) sont majoritairement de type polaire qui s'établit par l'intervention probablement des liaisons électrostatiques et/ou hydrogènes ;

Il serait intéressant de poursuivre ce travail en l'orientant sur l'étude de détermination des sites des liaisons protéines-composés phénoliques, pour mieux comprendre le mécanisme de fixation de ces composés aux protéines étudiées, on utilisant d'autres méthodes telles que : la technique de fluorescence de tryptophane, la spectroscopie infrarouge.

Références bibliographiques

A

Abi Azar R. (2007). *Complexation des protéines lactières par les extraits de gousses vertes de caroubier propriétés technologiques des coagulums obtenus.* Thèse doctorat, présentée pour l'obtention du titre de docteur d'AgroParisTech, AgroParisTech, 151p.

Adrian J.C., Baxter N. J., Lilley T. H., Haslam E., McDonald C. J., Williamson M.P. (1996). Tannin interactions with a full-length human salivary proline-rich protein display a stronger affinity than with single proline-rich repeats. *FEBS Letters*, 382 (3): 289-292.

Ansari S. et Helms V., (2005). Statistical analysis of predominantly transient protein-protein interfaces. *Proteins*, 61(2): 344 - 355.

Arapitsas P., Sjöbergper J.R. et Turner Ch. (2008). Characterisation of anthocyanins in red cabbage using high-resolution liquid chromatography coupled with photodiode array detection and electrospray ionization linear ion trap mass spectrometry. *Food Chemistry*, 109 (8): 219-226.

B

Bos O.J., Labro J.F., Ficher M.J., Wilting J., Jansen L.H. (1989). The Molecular Mechanism of the Neutral-to-Base Transition of Humain Serum Albumin. Acide/Base Titrtation and Proton Nuclear Manetic Resonance Studies on a large peptic and a Large Tryptic Fragment of Albumin. *Journal of Biological Chemistry*, 264(2) : 953-959.

Boumaza S. (2015). *Evaluation rapide des protéines par turbidimétrie : Application à quelques effluents agro-alimentaires avant et après un traitement de clarification.* Thèse de Doctorat 3ème cycle, Biochimie Appliquée, Université Badji Mokhtar – ANNABA, P 15.

Bruneton J. (1993). *Pharmacognosie, photochimie et plantes médicinales.* Paris : Lavoisier. 980 p.

Bruneton J. (2009). *Autres stéroïdes, autres triterpènes.* *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales.* Paris: Lavoisier. 950 p.

C

Carvalho E., Póvoas M. J., Mateus N., De Freitas V. (2006). Application of flow nephelometry to the analysis of the influence of carbohydrates on protein-tannin interactions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86 (6):891-896.

Chan liu., Wenjia He., Saisai Chen., Jei Chen., MaomaoZeng., Fang Qin., Zhiyong he.(2016).interaction of digestive enzymes and milk protein with tea catechins at gastric and intestinal ph. *International journal of food science technology*, 127 (5): 390-398.

Charlton A.J., Baxter N.J., Lilley T.H., Haslam E., McDonal C.J. et Williamson M.P. (1996). Tannin interactions with a full-length human salivary proline-rich protein display a stronger affinity than with single proline-rich repeats. *Fedaration of euopean Biochemical societieties letters*, 382 (4): 289-292.

Croft A.K. et Foley M.K. (2008). Proline-rich proteins deriving a basis for residue-based selectivity in polyphenolic binding. *Organic and Biomolecular Chemistry*, 6 (9): 1594-1600.

D

Daojin Li., Jingfeng Zhu., Jing Jin., Xiaojun Yao. (2007). Studies on the binding of nevadensin to human serum albumin by molecular spectroscopy and modeling. *Journal of Molecular Structure*, 846 (6): 34–41.

E

Edelmann C., Poncet-Legrand., Sarni-ManchadonB., Lend A., VerhnetA.et Cheynier V. (2003). Polyphenol/protein ratio and ionic strength. In: *Dynamiclight scattering study of the complexation between proline riche protein and falvan-ols: influence of molecular structure*. Vienna: Institue of technology and Analytics. 1060 p.

G

Galez P. (2011).Techniques spectroscopiques d'analyse/Fluorimétrie.*Annecy*.12p.

Guillou H., Pelissier J.P., Grappin R. (1986). Méthodes de dosage des protéines du lait de vache. *Dairy Science & Technology*, 66 (2): 143-175.

H

Hagerman A.E. (1981).chemistry of tannin-protein complexation. In: *chemistry and significance of condensed tannins plemumpress*. New York: Branham edt. 956 p.

Hagerman A.E., Butler L.G. (1981). Specificity of proanthocyanidin-protein interactions. *Journal of Biological chemistry*, 256 (5):494-497.

I

Isaza C., Seigneux S., Martin P.Y. (2012). Protéinurie : rappel physiologique et application pratique. *Revue médical suisse*, 8 (7) : 466-472.

J

Jobstl E., O'Connell J., Fairclough J.P.A., Williamson M.P. (2004). Astringency-A molecular model for polyphenol / protein binding. *Fibre Diffraction Review*, 12 (4) : 66-69.

K

Kamoun P., Lavoigne A., De Verneuil H., Darmon H., Demotes-Mainland. J. (2003). *Biochimie et biologie moléculaire*. Paris : Ed. Flammarion. 473p.

Kandaswami C. et Middleton E.J. (1996). *Natural antioxidant Chemistry, Health effects and applications*. Champaign: The American oil chemistry Society Press. 414 p.

L

Linderstrom-Lang K.U. and Shellman J.A. (1959). Protein structure and enzyme activity. In: *The Enzymes*. Paris: Academic Press. 973 p.

Lodish H., Berk, A., Matsudaira P., Kaiser C., Krieger A. M., Scott M. P., Zipursky S. L., Darnell J. (2005). *Biologie moléculaire de la cellule*. Francfort : De Boeck. 1204 p.

M

Mannach C., Scalbert A., Morand C., Remesy C. et Jimenez L. (2004). Polyphenols : food sources and bioavailability. *American journal Clinical Nutrition*, 79 (21) :727-747.

Martin S. et Andriantsitohaina R. (2002). Mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium. *Annale de cardiologie et d'angiologie*, 51 (6) : 303-315.

Mazza G. et Miniati E. (1993). *Anthocyanins in fruits vegetables and grains*. Boca Raton, Ann Arbor, Londres, Tokyo: CRC Press. 310p.

Morton L.W., Caccetta R. A., Puddey I. B. et Croft K. D. (2000). Chemistry and biological effects of dietary phenolic compounds: relevance to cardiovascular disease. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 27 (3), 152-159.

N

Naczki M. et Shahidi F. (2006). Phenolic in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* .41(5): 1523-1677.

Nalinanon et al., (2010). Biochemical properties of pepsinogen and pepsin from the stomach of albacore tuna (*Thunnus alalunga*). *Food chemistry*, 121(1): 49-55.

O

Okuda T., Fukui M., Takayanagi T., Yokotsuka K. (2006). Characterization of major stable proteins in chardonnay wine. *Food Science and Technology Research*, 12 (2): 131-136.

P

Papadopoulou A. et Frazier R.A. (2004). Characterization of protein-polyphenol interactions. *Trends in Food Science and Technology*, 15 (5):186 – 190.

Peterson S.M. et al., (2003). Filtration and use of silica hydrogel and polyvinyl pyrrolidone for removal of haze-active proteins and polyphenols in beer. *Food and nutritional Sciences*, 27 (5): 23-38.

Prigent S. V. E., Gruppen H., Visser A. J. W. G., Van Koningsveld G. A., De Jong G. A. H., Voragen A. G. J. (2003). Effects of non-covalent interactions with 5-Ocaffeoylquinic acid (chlorogenic acid) on the heat denaturation and solubility of globular proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51 (17): 5088-5095.

Prigent S. (2005). Interaction of phenolic compounds with globular proteins and their effects on food-related functional properties .In: *Chemistry of food components*. Wageningen: ISB. : 132p.

R

Rawel H. M., Meidtnr K., Kroll J. (2005). Binding of selected phenolic compounds to proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (10) : 4228-4235.

Ribadeau-Dumas B. (1991). *Physicochimie et biochimie des protéines du lait. Données récentes*. Paris : INRA Edition. 859p.

Ribereau-Gayon P. (1968). *Les composés phénolique des végétaux*. Paris : Edition DUNOD, 8 : 173-201.

Richard T., Lefeuvre D., Descendit A., Quideau S .et Monti J.P. (2006). Recognition characters in peptide-phenol complex formation. *Biochimical and Biophysical Acta*, 1760 (8): 951-958.

Rodríguez Vaquero M.J., Alberto M.R. et Manca de Nadra M.C. (2007). Antibacterial effect of phenolic compounds from different wines. *Food Control*, 18 (8): 93–101.

S

Sarni-Manchado P. et Cheynier J.J. (2006). *Les polyphénols en agroalimentaire*. Paris : Lavoisier. 398 p.

Sausse P. (2003). *Effets de composés polyphénoliques sur la structure et les propriétés de couches d'adsorption de caséine β en milieu hydro alcoolique.* Thèse de doctorat en Physique des Liquides, biochimie, Université Pierre et Marie Curie, Paris VI, p 127.

T

Tsao R. et Yang R. (2003). Optimization of a new mobile phase to know the complex and real polyphenolic composition: towards a total phenolic index using high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1018 (12): 29-40.

V

Vergé S., Richard T., Moreau S., Richelme-David S., Vercauteren J., Promé J.C., Monti J.P. (2002). First observation of non-covalent complexes for a tannin-protein interaction model investigated by electrospray ionisation mass spectroscopy. *Tetrahedron Lett*, 43 (4): 2363-2366.

W

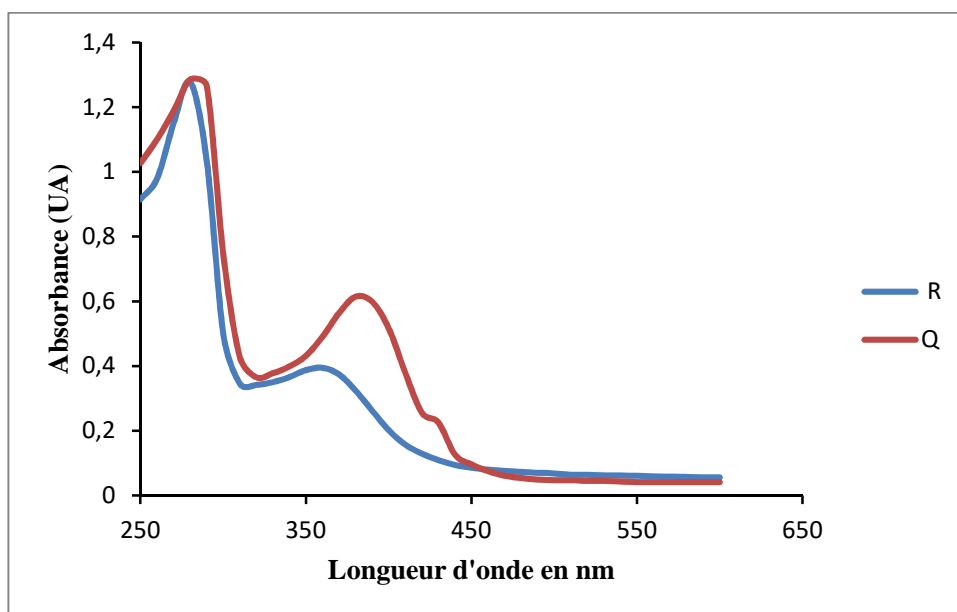
Winiarski T., Thomas O., Charrier C. (1995). Analysis of the spatial and temporal variations in the water quality of a karstic aquifer using UV spectrophotometry. *Journal of Contaminant Hydrology*, 19 (12): 307-320.

Wroblewski karol., Muhandiram Ranjith., Chakrabartty Avi et Bennick Anders .(2001).The molecular interaction of human salivary histatines with polyphenolic compounds''. *European journal biochemistry*, 268 (10) : 4384-4397.

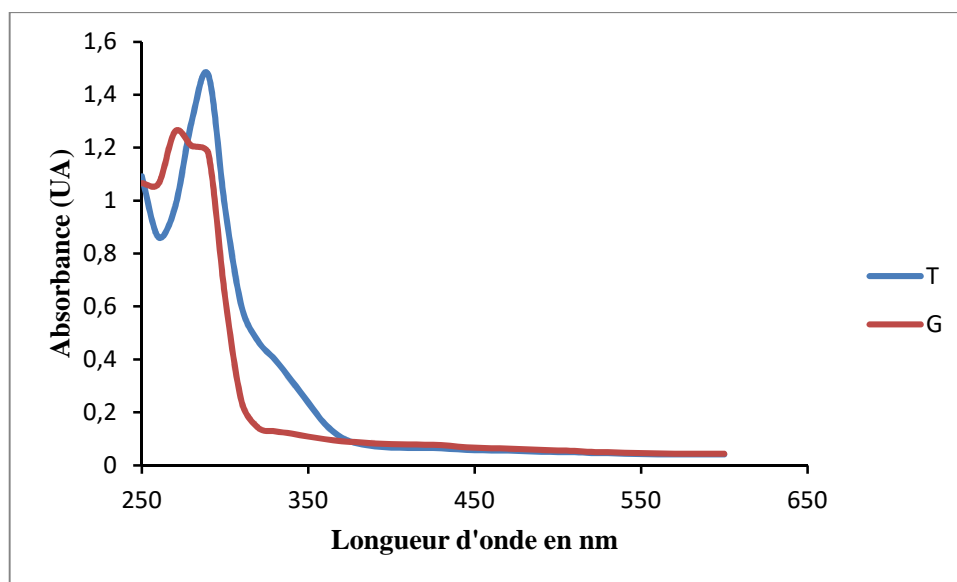
Z

Zhao J., Ren F. (2009). Influence of hydroxylation and glycosylation in ring A of soybean isoflavones on interaction with BSA. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 72 (3) : 682-685.

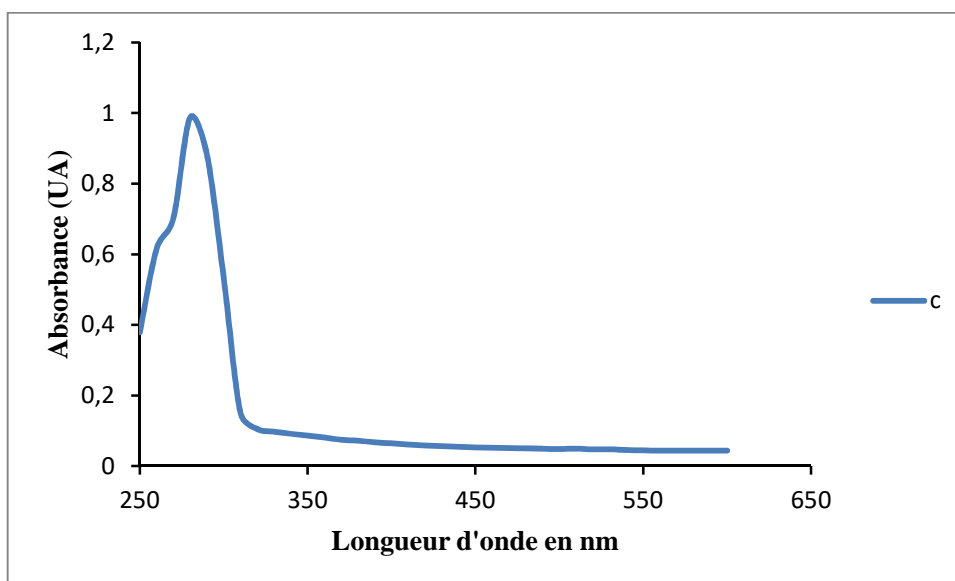
Zimmer N.et Cordess R. (1996).influence des tanins sur la valeur nutritive des aliments des ruminants. Montpellier : *INRA production Animal* . 9 (3) :167-179.



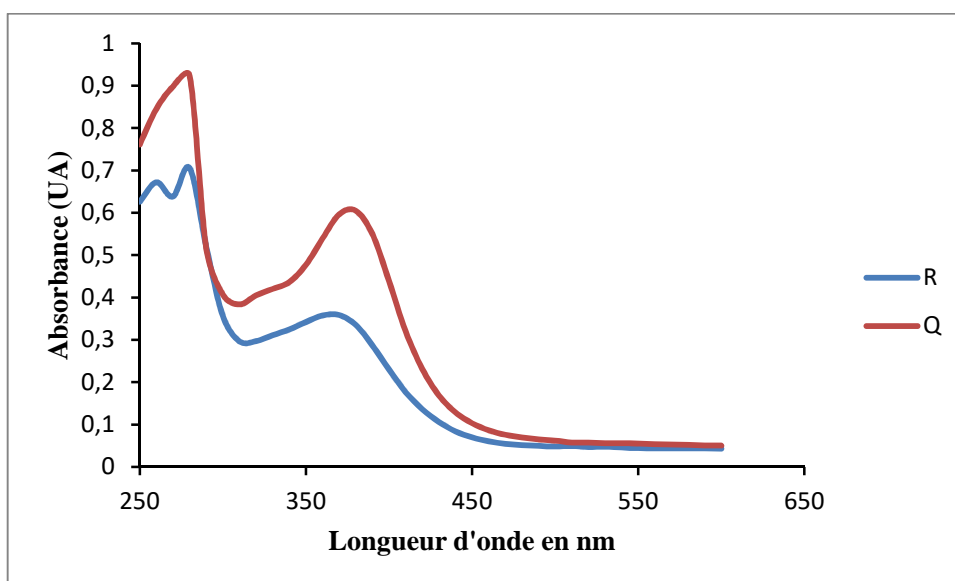
Annexe 1 : Spectre de balayage de la solution BSA avec quercétine (Q) et rutine (R) (250-600 nm).



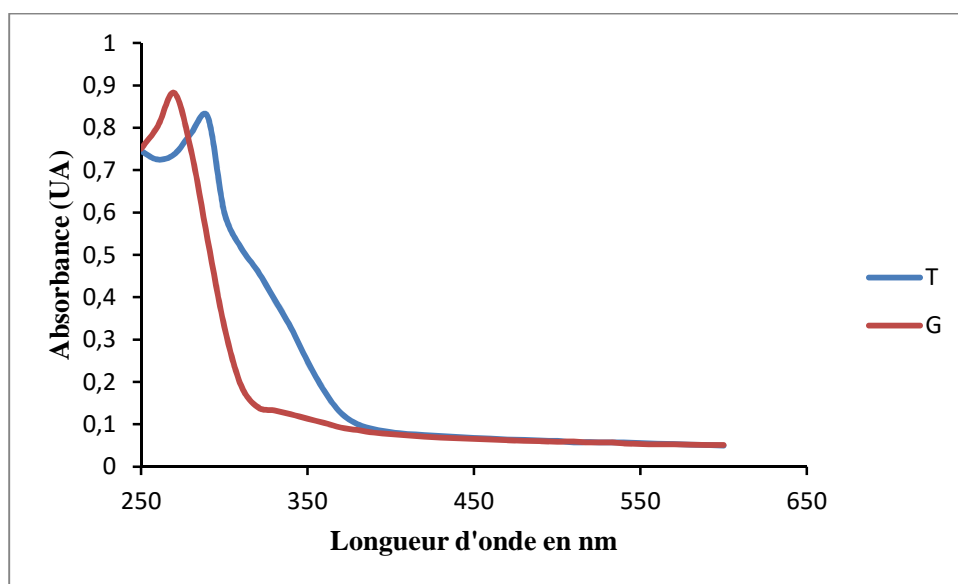
Annexe 2 : Spectre de balayage de la solution BSA avec l'acide tannique (T) et l'acide gallique (G) (250-600 nm).



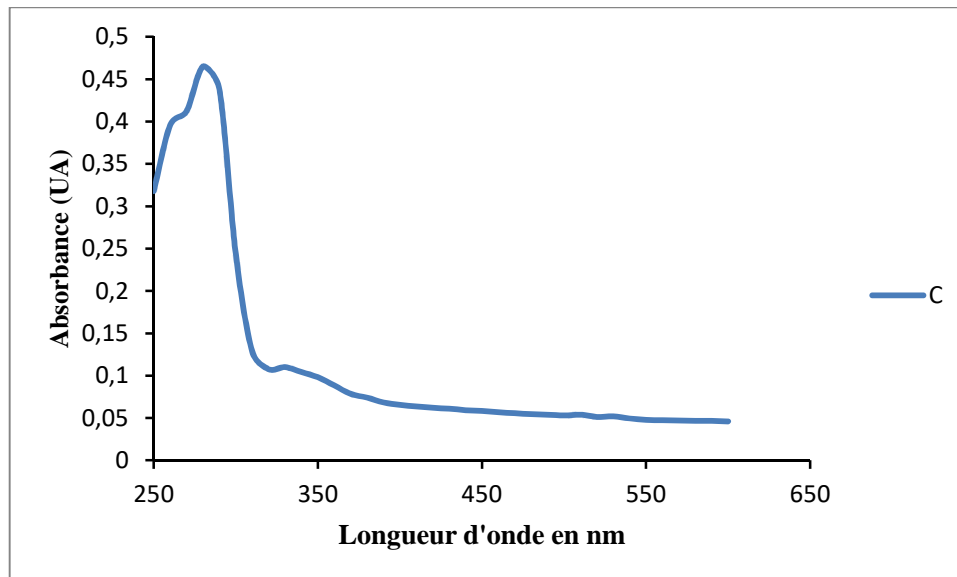
Annexe 3 : Spectre de balayage de la solution BSA et la catéchine (C) (250-600 nm).



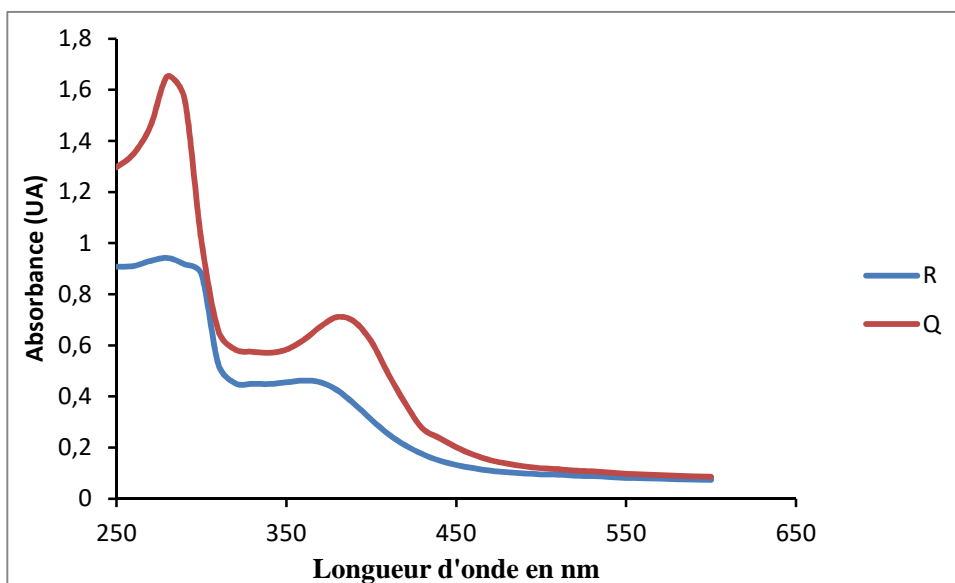
Annexe 4 : Spectre de balayage de la solution pepsine avec quercétine (Q) et rutine (R) (250-600 nm).



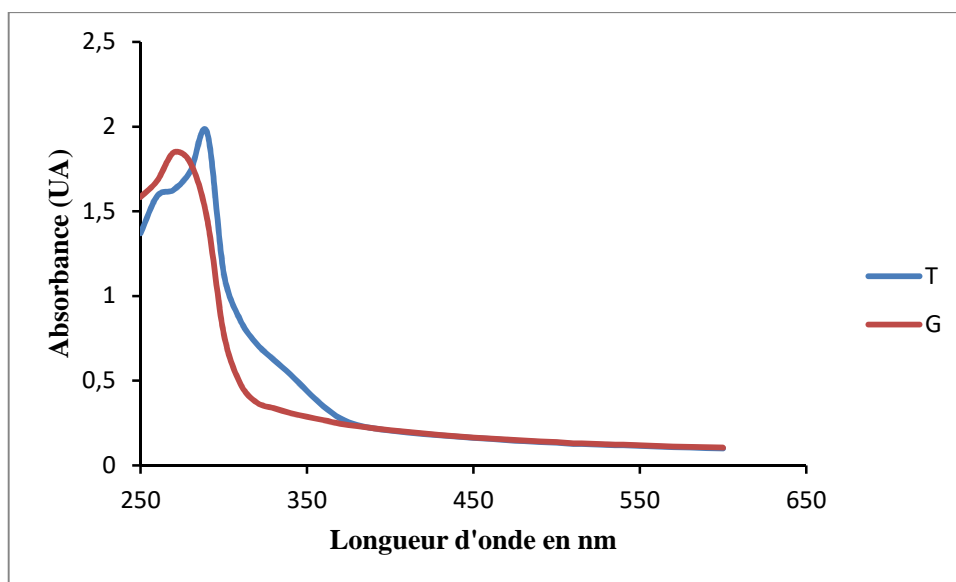
Annexe 5 : Spectre de balayage de la solution pepsine avec l'acide tannique (T) et l'acide gallique (G) (250-600 nm).



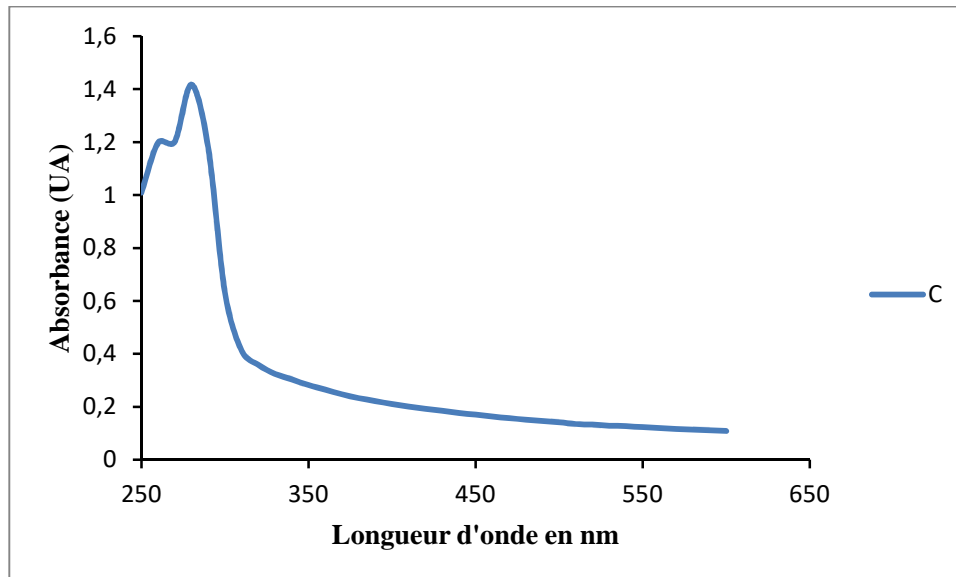
Annexe 6 : Spectre de balayage de la solution pepsine et la catéchine (C) (250-600 nm).



Annexe 7 : Spectre de balayage de la solution caséine du lait de vache avec quercétine (Q) et rutine (R) (250-600 nm).



Annexe 8 : Spectre de balayage de la solution caséine du lait de vache avec l'acide tannique (T) et l'acide gallique (G) (250-600 nm).



Annexe 9 : Spectre de balayage de la solution caséine du lait de vache et la catéchine (C) (250-600 nm).

Résumer

Les composés phénoliques sont des substances naturelles, du métabolisme secondaire des plantes, ils sont largement rencontrés dans le règne végétal notamment dans les fruits et les légumes. Plusieurs études dans le domaine pharmacologique et pharmacocinétique ont prouvé plusieurs effets thérapeutiques de ces molécules. Le but de ce travail est de mettre en évidence l'interaction entre certains composés phénoliques (acide tannique, acide gallique, rutine, catéchine et quercétine) et trois protéines (sérum albumine bovine, caséine du lait de vache et la pepsine). L'analyse est faite par spectrophotométrie UV-Visible et fluorométrie, les résultats obtenue montre que les interactions sont majoritairement polaires (méthode spectrophotométrie : DO_{BSA} [0,8-1,9] UA, DO_{CLV} [0,8-1,1] UA, DO_{PEP} [0,7-0,9] UA ; méthode fluorométrique : DO_{BSA} [2,8-3,5] UA, DO_{CLV} [2,9-3,1] UA, DO_{PEP} [2,9-3,05] UA). Ces interactions s'établissent par des liaisons électrostatique et/ou hydrogènes. Le mode d'interaction protéines-polyphénols est gouverné par le pH et la force ionique.

Mots clés : Composés phénoliques, protéines, spectrophotomètre, fluoromètre, interactions.

Abstract

Phenolic compounds are natural substances, secondary metabolism of plants, they are widely found in the vegetable kingdom especially in fruits and vegetables. Several studies in the pharmacological and pharmacokinetic field have proved several therapeutic effects of these molecules. The aim of this work is to highlight the interaction between certain phenolic compounds (tannic acid, gallic acid, rutin, catechin and quercetin) and three proteins (bovine serum albumin, casein from cow's milk and pepsin). The analysis is made by UV-Visible spectrophotometry and fluorometry, the results obtained show that the interactions are predominantly polar (spectrophotometry method: DO_{BSA} [0.8-1.9] AU, DO_{CLV} [0.8-1.1] AU, DO_{PEP} [0.7-0.9] AU, fluorometric method: DO_{BSA} [2.8-3.5] AU, DO_{CLV} [2.9-3.1] AU, DO_{PEP} [2.9-3.05] UA). These interactions are established by electrostatic and / or hydrogen bonds. The mode of protein-polyphenol interaction is governed by pH and ionic strength.

Keys words: Phenolic compounds, protein, spectrophotometry, fluorometry, interactions.

ملخص

المركبات الفينولية هي المواد الطبيعية الأيض الثانوية من النباتات، واجهت على نطاق واسع في المملكة النباتية في الفواكه والخضروات. وقد أثبتت العديد من الدراسات في مجال علم العقاقير الدوائية العديد من الآثار العلاجية لهذه الجزيئات. وكان الغرض من هذه الدراسة إلى تسليط الضوء على التفاعل بين بعض المركبات الفينولية (حمض التانيك، حمض الغال، روتين، كاتشين وكيرسيتين) وثلاثة بروتينات (ألبومين المصل البقري، كازين الحليب البقري والبيبيسين). يتم إجراء التحليل بواسطة القياس الطيفي المرئي للأشعة فوق البنفسجية والقياس الفلوري، وتظهر النتائج التي تم الحصول عليها أن التفاعلات هي في الغالب قطبية (طريقة القياس الطيفي: DO_{BSA} [0.8-1.9] AU، DO_{CLV} [0.8-1.1] AU، DO_{PEP} [0.7-0.9] AU، وطريقة القياس الفلوري: DO_{BSA} [2.8-3.5] AU، DO_{CLV} [2.9-3.1] AU، DO_{PEP} [2.9-3.05] UA). يتم إنشاء هذه التفاعلات بواسطة روابط كهروستاتيكية و / أو هيدروجينية. يتم التحكم في طريقة تفاعل البوليفينول-البروتين بواسطة الرقم الهيدروجيني والقوة الأيونية.

الكلمات المفتاحية: المركبات الفينولية، بروتينات، القياس الطيفي المرئي، القياس الفلوري، التفاعلات.