Protéome salivaire et sensibilité à l'amertume chez l'homme

Micheline Dsamou

▶ **To cite this version:**

Micheline Dsamou. Protéome salivaire et sensibilité à l'amertume chez l'homme. Alimentation et Nutrition. Université de Bourgogne, 2012. Français. NNT : . tel-02811276

HAL Id: tel-02811276
https://hal.inrae.fr/tel-02811276

Submitted on 6 Jun 2020

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

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

UNIVERSITE DE BOURGOGNE

UMR Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation (CSGA)

THESE

pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université de Bourgogne

Discipline : Sciences de l'alimentation

par :

Micheline DSAMOU

Protéome salivaire et sensibilité à l'amertume chez l'Homme

Directrice de thèse : Prof. Marie-Christine **CHAGNON**
Co-directrice de thèse : Dr Martine **MORZEL**

Soutenue le 18 Décembre 2012 devant le jury composé de :

Prof. Dominique PARENT-MASSIN	Rapporteur
Dr Christophe HIRTZ	Rapporteur
Dr Christian SALLES	Membre du Jury
Dr Camille SCHWARTZ	Membre du Jury
Dr Martine MORZEL	Co-directrice de thèse
Prof. Marie-Christine CHAGNON	Directrice de thèse

Dédicace

A qui dédicacer ce manuscrit ?

A mes parents pour tout ce qu'ils m'ont apporté, et ce depuis le premier jour ?

A ma fratrie pour avoir toujours répondu présent?

A mon conjoint pour avoir brillamment passé le test « Etre avec une thésarde » ?

A mes directrice et co-directrice de thèse pour avoir, pendant trois ans durant, encadré cette thèse ?

A tous ceux qui ont participé à ces travaux ?

Comme disait Tim Allen : « Les hommes se plaisent à penser qu'ils peuvent se débrouiller seuls, mais l'homme, le vrai, sait que rien ne vaut le soutien et les encouragements d'une bonne équipe »

REMERCIEMENTS

Comme le titre l'indique, cette partie est réservée aux «remerciements». Ne soyez donc pas surpris de lire autant de «Merci» en quelques lignes.

Tout d'abord merci à Elisabeth Guichard et Christian Salles de m'avoir accueillie au sein de leur équipe (équipe 1 du CSGA). Nul ne va sans dire que sans une équipe d'accueil, la thèse aurait été bien plus difficile.
Merci également à Marie-Christine Chagnon et Philippe Besnard de m'avoir accueillie au sein du laboratoire de toxicologie, aujourd'hui NUTox.

Merci au jury de l'école doctorale pour m'avoir choisie pour cette thèse.

Ce travail a été rendu possible grâce au soutien financier du Conseil Régional de Bourgogne et je tiens à les remercier.

Bien évidemment, MERCI à mes directrices et co-directrices de thèse respectivement Marie-Christine Chagnon et Martine Morzel pour avoir monté ce projet et encadré cette thèse.
Je ne suis pas particulièrement féministe, mais je trouve qu'avoir deux femmes comme directrice et co-directrice de thèse, excusez-moi l'expression, « ça claque » !
Marie-Christine: Merci. Les choses que je retiens de toi sont l'aptitude à faire plusieurs tâches sur une même période, l'anticipation et la valorisation de son travail. Merci également d'avoir été favorable à mon inscription au MAE. Je ne regrette absolument pas de l'avoir fait.
Martine: Qui va encore corriger ces petits détails dans mes Powerpoint qui font toute la différence? Qui vais-je encore entendre dire «ça marche du feu de Dieu!»? Les choses que je retiens de toi sont la rigueur scientifique, l'exactitude des références et la capacité à raconter l'histoire. Merci !

Merci à toutes les personnes qui ont, d'une manière ou d'une autre, participé à mes travaux de thèse. Merci à **Chantal Septier**, **Isabelle Séverin**, **Ludovic Le Corre**, **Laurence Dahbi**, **Emilien Di Sotto**.

En statistique**, Claire Chabanet**,
En protéomique, **Géraldine Lucchi** et **Patrick Ducoroy**
En cytométrie, **Arlette Hamman**
Cette liste ne serait pas complète si je ne citais pas également feu **Olivier Palicki** que je n'ai connu que 8 mois, mais qui à mon sens est parti très tôt. Merci pour toute ton aide au début de ma thèse.

Merci à tous ceux qui ont facilité mes commandes de produits, d'articles, et les tâches administratives : **Catherine Bergès**, **Sabine Julien**, **Josette Thery**, **Corinne Aquilina**, et **le secrétariat**.

Merci aux membres du comité de thèse, **Marie-Agnès Peyron** et **Philippe Besnard**, pour d'une part avoir accepté d'en faire partie et d'autre part pour leurs remarques et mots d'encouragements.

Merci à mes deux rapporteurs, **Dominique Parent-Massin** et **Christophe Hirtz** pour avoir accepté de prendre de leur temps pour lire ce manuscrit ainsi qu'aux autres membres du Jury de thèse, **Christian Salles** et **Camille Schwartz** pour avoir accepté d'assumer cette tâche.

Merci à tous les thésards, permanents, et stagiaires que j'ai croisés ou côtoyés à l'INRA, à Agrosup, ou au CESG et qui par leurs contributions, leurs échanges, ou leurs sourires ont su être un rayon de soleil au moment opportun. Je n'en citerai que quelques-uns.
Maiken: Je me souviens encore de mon tout premier repas à la cantine de l'INRA. Ahhh! Who would have known? Merci tout simplement.
Marion: Juste énorme. Rares sont les conversations avec toi où je n'ai pas eu un sourire ou deux. Merci.
Lydie: Tu es arrivée au moment parfait en ce qui me concerne. Certains disent qu'il n'y a pas de hasard. On se comprendra sur ce point. Merci.
Hélène B.: J'ai énormément apprécié partager le bureau avec toi. Merci pour tout.
Coralie D.: Merci entre autre pour les transports chez moi et pour «Crassula», ma plante. Elle a bien grandi depuis, processus normal de la thèse.
Chau: Ma première et unique stagiaire de thèse. Merci pour ta participation.

Syrina: J'ai apprécié les rares mais mémorables échanges que nous avons eus. Bonne soutenance.
Bon courage à tous les thésards de l'équipe 1 du CSGA et de NUTox. Surtout, gardez les yeux fixés sur le but !

Aux responsables du MAE et à Mme China, merci pour le suivi. Merci aussi à tous ceux avec qui j'ai travaillé, Coralie B., Emilie, Mia.

Aux sportifs et aux sportives: Merci à l'Adas pour les adayades 2010… inoubliables ! Découverte et apprentissage du Tir à l'arc à la clé. Encore beaucoup d'entraînements nécessaires, mais après cette expérience, je crois bien que je suis une archère dans l'âme. Merci aux organisateurs des fameux tournois de badminton. C'est tout simplement un sport magnifique ! Merci à tous ceux du ping pong, Marine et tous les autres.

Merci **à tous mes proches et amis**.

A ma fratrie : Simply the best ! Merci pour tout et depuis toutes ces années. Vous êtes ma famille en or.

A Fred : Mon Homme, le seul, le vrai ! Merci pour ton soutien.

Last but not least, **à mes parents** : Merci pour votre amour, votre éducation et tant d'autres choses encore que j'ai déjà eu et/ou aurai l'occasion de vous dire. Vous êtes deux êtres exceptionnels. Si vous n'existiez pas, il aurait fallu vous inventer.

LISTE DES COMMUNICATIONS ET PUBLICATIONS

COMMUNICATIONS SOUS FORME D'AFFICHES

Dsamou M, Palicki O, Septier C, Séverin I, Chagnon M-C. & Morzel M. 2010. Salivary proteome and sensitivity to bitter taste. 5e Congrès Vitagora Goût – Nutrition – Santé, 23-24 Mars 2010, Dijon, France.

Dsamou M, Palicki O, Septier C, Séverin I, Chagnon M-C. & Morzel M. 2010. Protéome salivaire et sensibilité à l'amertume. XVI Forum des Jeunes Chercheurs, 7-8 Juin 2010, Besançon, France.

Dsamou M, Palicki O, Septier C, Chabanet C, Lucchi G, Ducoroy P, Chagnon M-C & Morzel M. 2011. Sensitivity to Bitterness: May In-mouth Proteolysis Be Involved? 9th Pangborn Sensory Science Symposium, 4-8 Septembre 2011, Toronto, Canada.

Dsamou M, Morzel M & Chagnon M-C. 2012. The Human Submandibular Gland (HSG) cell line: a tool to study regulation of salivary markers of bitterness perception. 2nd International Conference on Food Oral Processing (FOP), 1-5 Juillet 2012, Beaune, France.

COMMUNICATION ORALE

Dsamou M, Morzel M & Chagnon M-C. 2012. The Human Submandibular Gland (HSG) cell line: a tool to study regulation of salivary markers of bitterness perception. 2nd International Conference on Food Oral Processing (FOP), 1-5 Juillet 2012, Beaune, France.

ARTICLES

Dsamou M, Palicki O, Septier C, Chabanet C, Lucchi G, Ducoroy P, Chagnon M-C & Morzel M. 2012. Salivary protein profiles and sensitivity to the bitter taste of caffeine. *Chemical Senses*, 37: 87-95.

Dsamou M, Morzel M, Le Corre L, Séverin I & Chagnon M-C. 2012. Caffeine increases the expression of a salivary marker of sensitivity to bitterness (cystatin SN) in human submandibular acinar cells. Soumis à *Chemical Senses*.

TABLE DES MATIÈRES

Remerciements....1
Liste des communications et publications....4
Liste des figures....7
Liste des tableaux....9
INTRODUCTION GENERALE....10
CHAPITRE I : ETAT DE L'ART....13
I.1 La perception gustative....14
I.1.1 Anatomie du système gustatif....14
I.1.2 Mécanisme général de la perception gustative....15
I.1.3 Mesure de la perception gustative....16
I.1.3.1 Définitions....16
I.1.3.2 Mesure du seuil de détection ou seuil de perception....16
I.2 L'Amertume....17
I.2.1 Les molécules amères....17
I.2.1.1 La caféine....18
I.2.1.2 La quinine....20
I.2.1.3 L'urée....22
I.2.2 Les récepteurs du goût amer....22
I.2.3 Origine de la variabilité interindividuelle de perception de l'amertume....24
I.2.3.1 Variations génétiques....24
I.2.3.2 Variations environnementales....25
I.3 La salive....27
I.3.1 Définition et formation de la salive....27
I.3.2 Régulation de la sécrétion salivaire....28
I.3.2.1 Réflexes et système nerveux autonome....28
I.3.2.2 Voies de signalisation et transports ioniques....29
I.3.2.3 Régulation endocrinienne....31
I.3.3 Composition de la salive....32
I.3.3.1 Composés inorganiques....32
I.3.3.2 Composés organiques....32
I.3.3.3 Facteurs modulant la composition salivaire....33
I.3.4 Rôle de la salive....34
I.3.4.1 Lubrification, protection des muqueuses et activité antimicrobienne....35
I.3.4.2 Maintien de l'intégrité dentaire et régulation du pH....36
I.3.4.3 Digestion....36
I.3.4.4 Perception gustative....37
I.4 Les glandes salivaires....39
I.4.1 Anatomie générale des glandes salivaires....39
I.4.1.1 Unités sécrétrices....39
I.4.1.2 Canaux des glandes salivaires....40
I.4.2 Développement des glandes salivaires....41
I.4.3 Glandes salivaires majeures et mineures....42
I.4.3.1 La glande parotide....42
I.4.3.2 La glande sous maxillaire....43
I.4.3.3 La glande sublinguale....43
I.4.3.4 Les glandes mineures....43
I.4.4 Pathologies des glandes salivaires....44

I.4.4.1 Burning mouth syndrome....44
I.4.4.2 Syndrome de Sjögren....44
I.5 Etudes *in vitro* des glandes salivaires....45
I.5.1 Intérêt des approches in *vitro*....45
I.5.2 Culture *in vitro* des glandes salivaires....45
I.5.2.1 La culture primaire....45
I.5.2.2 Les lignées cellulaires....45
I.5.3 La lignée cellulaire HSG....48
I.5.3.1 Présentation de la lignée....48
I.5.3.2 La différenciation en acini....48
I.5.3.3 Les études menées sur la lignée HSG....52
CHAPITRE II: LIENS ENTRE COMPOSITION SALIVAIRE ET SENSIBILITE A L'AMERTUME DE LA CAFEINE - ETUDE *in vivo*....55
Introduction....56
II.1 Travaux non présentés sous forme d'article....57
II.1.1 Matériels & Méthodes....57
II.1.1.1 Consommation de boissons contenant de la caféine....57
II.1.1.2 Analyse monodimensionnelle et identification des bandes protéiques....57
II.1.1.3 Statistiques....58
II.1.2 Résultats....58
II.1.2.1 Consommation de boissons contenant de la caféine....58
II.1.2.2 Profils salivaires obtenus par électrophorèse mono-dimensionnelle....60
II.2 Article 1 - Principaux Résultats....64
ARTICLE 1....65
Discussion....75
CHAPITRE III: EFFET DES MOLECULES AMERES SUR LES PROTEINES DE LA SALIVE - ETUDE *in vitro*....78
Introduction....79
III.1 Travaux non présentés sous forme d'article....80
III.1.1 Matériel & Méthodes....80
III.1.1.1 Optimisation des conditions de culture pour induire la différenciation....80
III.1.1.2 Vérification de la différenciation des cellules HSG d'un point de vue fonctionnel....81
III.1.1.3 Effet des molécules amères sur la lignée HSG....85
III.1.2 Résultats....87
III.1.2.1 Optimisation des conditions de différenciation de la lignée HSG....87
III.1.2.2 Différenciation et fonctionnalité de la lignée HSG....89
III.1.2.3 Cytotoxicité....95
III.1.2.4 Détection de la cystatine SN dans les cellules HSG exposée à la caféine, à la quinine, et à l'urée....97
III.2 Article 2 - Principaux Résultats....101
ARTICLE 2....102
Discussion....120
DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES....125
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES....130

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Localisation des papilles gustatives sur la langue (D'après Smith et Margolskee, 2006).....15
Figure 2 : Anatomie du système gustatif. A) les papilles gustatives et B) les bourgeons gustatifs (D'après Smith et Margolskee, 2006) 15
Figure 3 : Structures chimiques des molécules amères. Vingt-cinq des 93 structures principales sont représentées. (D'après Rodgers et al., 2005).....18
Figure 4 : Structure moléculaire de la caféine 19
Figure 5 : Teneur en caféine (mg/L) dans diverses boissons.....19
Figure 6 : Structure moléculaire de la quinine.....21
Figure 7 : Structure moléculaire de l'urée 22
Figure 8 : Structure des récepteurs. A) Structure générale des récepteurs couplés à la protéine G. B) Structure générale des TAS2Rs (D'après Gilbertson et al., 2000). 23
Figure 9 : Dendrogramme des relations entre les séquences de TAS2Rs. Les lignes continues indiquent les gènes localisés sur le chromosome 12, les tirets correspondent aux gènes localisés sur le chromosome 7, et les pointillés correspondent aux gènes localisés sur le chromosome 5 (D'après Bufe et al., 2002). 24
Figure 10 : Etapes de la sécrétion salivaire (D'après Catalan et al., 2009). 27
Figure 11 : Centres du cerveau impliqués dans la régulation des glandes salivaires (D'après Pedersen et al., 2002). 29
Figure 12 : Mécanisme principal de la sécrétion salivaire basée sur un transport actif transépithélial de Cl^- et le gradient osmotique NaCl et H_2O. Quatre transporteurs d'ions sont impliqués dans ce mécanisme (encadrés), le Na^+/K^+ adenosine triphosphate (ATPase), le cotransporteur Na^+ - K^+ - $2Cl^-$, et un canal K^+ activé situés sur la membrane basale, et un canal Cl^- activé par Ca^{2+} situé sur la membrane apicale (D'après Catalan et al., 2009).....30
Figure 13 : Synthèse et sécrétion des protéines salivaires par la voie sympathique (D'après Peter Smith, University of Liverpool, 1998. www.petesmif.org.uk).....31
Figure 14 : Rôles de la salive (D'après Amerongen et Veerman, 2002).....35
Figure 15 : Glandes salivaires **:** Les unités sécrétrices et canaux (D'après Serge Nataf, matériel d'enseignement à l'Université de Lyon/Hospices Civils de Lyon).....40
Figure 16 : Les différents canaux des glandes salivaires (D'après Franck Pellestor, matériel d'enseignement à l'Université de Montpellier/Faculté de Medecine).....41
Figure 17 : Localisation anatomique des glandes salivaires majeures (parotides, sublinguales, sous-maxillaires) et mineures (D'après Amerongen et Veerman, 2002) ..42
Figure 18 : Cellules HSG non différenciées, 24h après ensemencement **:** formation d'une monocouche de cellules épithéliales et adhérentes (Maria et al., 2011).....48
Figure 19 : Cellules HSG différenciées sur Matrigel, 24h après ensemencement. Structures acinotubulaires (A). Réseau réticulaire (B). Réseau réticulaire et amas cellulaires (C). Structures acinaires (D). (D'après Vag et al., 2007) 51
Figure 20 : Cellules HSG différenciées sur Matrigel 2 jours (A) et 4 jours (B) après ensemencement (D'après Szlávik et al., 2008). 52
Figure 21 : Profil électrophorétique de salive, indiquant la position des 27 bandes détectées et retenues dans l'analyse. Trois bandes (1, 7, et 23) inversement corrélées aux seuils de détection de la caféine, sont indiquées par des flèches. 61
Figure 22 : Conditions de culture en vue de l'optimisation de la différenciation des cellules HSG en acini 80

Figure 23 : Observations morphologiques des cellules HSG non différenciées (A) et différenciées sur GFR Matrigel dilué à 5,4 mg/ml (B), 2D (10% SVF, C), et 3D (5% Matrigel et 5% de SVF, D). 88
Figure 24 : Profil électrophorétique des ARN totaux extraits 1, 1.5, 2 et 4 jours après ensemencement dans les cellules non différenciées (ND) et 1 et 2 jours après ensemencement dans les cellules différenciées (3D). 89
Figure 25 : Expression du gène AMY1A dans les cellules HSG non différenciées et différenciées. 90
Figure 26 : Expression de la cystatine SN dans les cellules HSG non différenciées (à gauche de l'échelle) et différenciées (à droite de l'échelle) évaluée par Western Blot. S= salive. PM **:** marqueur de poids moléculaire (Precision Plus Protein Unstained Standards, Bio-Rad). 90
Figure 27 : Cycle cellulaire des cellules HSG non différenciées et différenciées par Double marquage BrdU/IP. Les valeurs sont la moyenne ± SEM (3 essais indépendants). 92
Figure 28 : Cycle cellulaire des cellules HSG non différenciées et différenciées par la méthode Vindelov. 94
Figure 29 : Cytotoxicité de la caféine (A), de la quinine (B) et de l'urée (C) dans les cellules HSG non différenciées (à gauche) et différenciées (à droite). Les valeurs sont la moyenne ± SEM (2 essais indépendants). 96
Figure 30 : Effet de l'urée 5000 µM (A), de la quinine 2µM (B) et de la caféine 50µM (C) sur les cellules HSG différenciées par Western blot. La tubuline (50 kDa) a été utilisée comme protéine de référence. 98
Figure 31 : Semi-quantification et quantification de la cystatine SN respectivement par Western blot (A) et ELISA (B) dans les cellules HSG différenciées exposées à la quinine (2 µM). Valeurs moyennes (2 essais indépendants). 99
Figure 32 : Effet de la caféine sur la quantité de cystatine mesurée dans le milieu de culture des cellules HSG non différenciées et différenciées par ELISA. Moyennes ± SEM exprimées en ng/ml (3 essais indépendants). 101
Figure 33 : Voies de signalisation des récepteurs α1- et β2- adrénergiques, potentiellement impliquées dans l'augmentation de la synthèse et de la sécrétion de la cystatine SN par la caféine (D'après la Base de données des récepteurs adrénergiques, http**:**//ardb.bjmu.edu.cn/). 128

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Liste non exhaustive des protéines salivaires dans la salive entière et leur concentrations dans les glandes salivaires majeures (parotide, sous-maxillaire-sublinguale ou SMSL) (D'après Huq et al., 2007).....33
Tableau 2 : Les différentes lignées cellulaires de glandes salivaires (D'après le Salivary Gland Development Database). 47
Tableau 3 : Liste non exhaustive des protéines étudiées spécifiquement dans les cellules HSG 53
Tableau 4 : Consommation de boissons contenant de la caféine chez les 6 sujets hypersensibles (S+) et 6 sujets hyposensibles (S-). Les consommations journalières de café extraites du relevé de consommation alimentaire hebdomadaire sont indiquées entre parenthèses. NC **:** non-communiquée.....59
Tableau 5 : Identification des protéines contenues dans les bandes d'électrophorèse par spectrométrie de masse. Les protéines portées au tableau sont soit significativement identifiées en mode MS soit identifiées de façon non-significative en mode MS mais confirmées de façon significative en mode MS/MS. 63
Tableau 6 : Effet de la quinine et de la caféine sur les cellules HSG différenciées : ratio de la concentration en cystatine SN (mesurée par ELISA) sur la concentration totale en protéines. Les valeurs sont la moyenne de 3 essais indépendants 99

INTRODUCTION GENERALE

Parmi les saveurs élémentaires reconnues, l'amertume est l'une des moins appréciées, entrainant bien souvent le rejet de certains aliments. Elle est généralement considérée comme jouant un rôle protecteur contre l'ingestion de divers poisons ou autres substances nocives. Cependant la perception de l'amertume ne se limite pas à ces substances. En effet, elle fait partie intégrante de notre alimentation. L'amertume est par exemple une qualité gustative de diverses boissons (café, thé, bière…) mais aussi de certains fruits (ex : agrumes) ou légumes (ex : crucifères, épinards, asperges…) Certains de ces aliments sont considérés comme bénéfiques pour la santé et leur rejet peut être une limite à certaines sources de nutriments, notamment chez les enfants.

Dans ce contexte, de bonnes connaissances physiologiques et mécanistiques de la perception des molécules amères apparaissent nécessaires. Les individus perçoivent le goût amer différemment, y sont plus ou moins sensibles. Cette variabilité interindividuelle a longtemps été attribuée aux divergences dans les gènes codants pour les récepteurs du goût amer. Bien que cette variation génétique explique la majorité des variations interindividuelles dans la perception de certaines molécules amères telles que le PROP, elle n'explique que dans une moindre mesure les variabilités sensorielles dans le cas d'autres molécules telles que la quinine ou la caféine. D'autres facteurs, notamment les facteurs environnementaux (l'âge, les pathologies, ou encore la prise de médicaments) peuvent également affecter la perception de l'amertume. Toutefois pour des sujets sains, un facteur de variations interindividuelles particulièrement intéressant est la composition salivaire. En effet, la salive joue un rôle important dans la perception gustative en général, et dans celle de l'amertume en particulier, par exemple en assurant la dilution et le transport des molécules sapides vers leurs récepteurs. Une variation dans la composition de la salive, notamment en facteurs trophiques des bourgeons du goût telle que l'anhydrase carbonique 6, peut également entrainer une augmentation ou diminution de la perception de la saveur. Ces observations soulèvent la question des liens entre molécules amères, perception du goût amer, et composition salivaire, en particulier la composition protéique de la salive. Deux questions ont été abordées, premièrement existe-t-il un lien statistique entre composition protéique salivaire chez l'Homme et sensibilité à l'amertume, deuxièmement l'exposition à des molécules amères peut-elle moduler la composition salivaire ?

Ainsi, les travaux de cette thèse sont présentés en 3 parties. Une première partie expose les connaissances actuelles concernant la salive et son lien avec la perception gustative mais

aussi les outils *in vitro* permettant d'étudier les effets dans un milieu contrôlé des molécules amères et les mécanismes de régulation de la sécrétion salivaire. Une deuxième partie présente une étude expérimentale décrivant les liens entre protéines salivaires et perception du goût amer chez l'Homme. La troisième partie est une étude expérimentale menée *in vitro* sur une lignée cellulaire de glande sous-maxillaire humaine, visant à comprendre l'effet des molécules amères sur l'expression d'un marqueur protéique de sensibilité précédemment identifié.

CHAPITRE I :

ETAT DE L'ART

I.1 LA PERCEPTION GUSTATIVE

Le goût d'un aliment au sens commun du terme comprend la saveur captée par la langue, l'arôme libéré par la mastication et les sensations trigéminales en bouche. Au sens strict du terme toutefois, le goût est une sensation provenant de cellules gustatives spécialisées, situées dans la cavité orale (Smith et Margolskee, 2006). Le goût est généralement décrit en termes de 5 qualités basiques que sont le sucré, le salé, l'acide, l'amer et l'umami (Smith et Margolskee, 2006; Toko, 2000). Récemment, des études se sont intéressées à la possibilité d'une sixième qualité basique du goût, le gras. Par exemple, même sans la contribution des composantes olfactives et texturales, le gras peut être détecté au niveau de la langue (Stewart et al., 2010; Pepino et al., 2012) La perception gustative requiert un système spécialisé capable de détecter l'information provenant des aliments, de l'intégrer, et de la transmettre.

I.1.1 Anatomie du système gustatif

Le système gustatif est composé de 4 types de papilles gustatives, qui sont des fines projections situées essentiellement sur la langue et le palais (Fig. 1) (Smith et Margolskee 2006). Les papilles fongiformes, situées sur le devant de la langue apparaissent comme de petits points roses et sont innervées par le nerf facial. Les papilles caliciformes, situées à l'arrière de la langue, forment un V inversé et sont innervées par le nerf glossopharyngeal. Devant les papilles caliciformes et sur les côtés de la langue, se trouvent les papilles foliées, innervées à la fois par le nerf glossopharyngeal et par le nerf facial (Drewnowski et Gomez-Carneros, 2002). Les 3 premiers types de papilles, fongiformes, caliciformes, et foliées, contiennent des structures spécialisées, les bourgeons gustatifs (Fig. 2). A l'intérieur de ces bourgeons gustatifs se trouvent environ 50 à 100 cellules gustatives dont les microvilli protubèrent à travers des pores situés sur la membrane apicale des bourgeons. Ces cellules gustatives contiennent les récepteurs du goût et les canaux ioniques avec lesquels interagissent diverses molécules alimentaires. Les papilles filiformes, impliquées dans la sensation tactile des aliments, ne contiennent pas de bourgeons gustatifs (Smith et Margolskee, 2006).

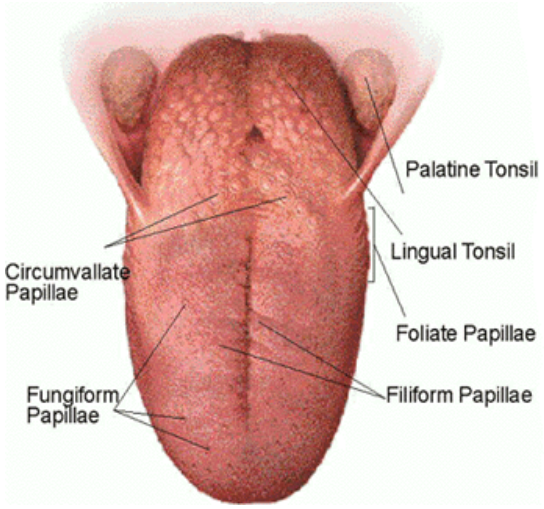


Figure 1 : Localisation des papilles gustatives sur la langue (D'après Smith et Margolskee, 2006)

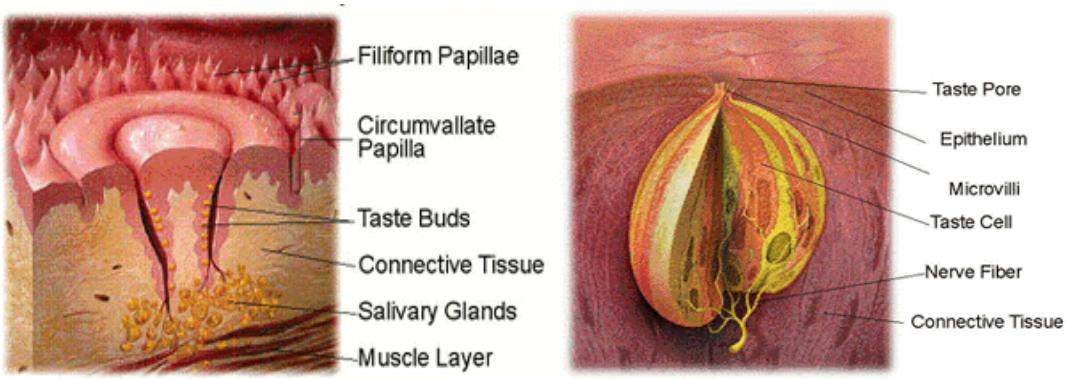


Figure 2 : Anatomie du système gustatif. A) les papilles gustatives et B) les bourgeons gustatifs (D'après Smith et Margolskee, 2006)

I.1.2 Mécanisme général de la perception gustative

Après la mise en bouche, les molécules alimentaires sont dissoutes dans la salive et rentrent en contact avec les cellules gustatives par les pores gustatifs (Toko, 2000; Smith et Margolskee, 2006). Elles vont soit se lier aux récepteurs du goût, c'est le cas par exemple des molécules amères ou sucrées, soit traverser directement les canaux ioniques, c'est le cas des ions Na^+ et H^+ des molécules salées ou acides. Cette interaction entraine la dépolarisation des cellules gustatives et déclenche la libération de neurotransmetteurs par les cellules. Ce signal chimique est changé en signal électrique et transmis au cerveau via les fibres nerveuses. Le cerveau décode ce signal et perçoit un goût.

I.1.3 Mesure de la perception gustative

I.1.3.1 Définitions

La mesure de la perception gustative se fait par le biais de l'analyse sensorielle. L'analyse sensorielle consiste à analyser les propriétés organoleptiques d'un produit par les organes des sens que sont la vue, l'ouïe, l'odorat, le goût et le toucher (Norme ISO 5492). Elle permet par exemple de mesurer divers seuils comme le seuil de détection ou le seuil de reconnaissance. La Norme ISO 5492 définit le seuil de détection, aussi appelé seuil de perception ou seuil d'apparition, comme la valeur minimale d'un stimulus sensoriel nécessaire à l'éveil d'une sensation. Cette sensation peut ne pas être identifiée. Le seuil de reconnaissance, ou seuil d'identification, quant à lui, est la valeur minimale du stimulus sensoriel permettant d'identifier la sensation perçue. L'instrument de mesure de cette méthode est l'individu et ses capacités à percevoir les caractéristiques d'un produit.

I.1.3.2 Mesure du seuil de détection ou seuil de perception

Il existe plusieurs méthodes de mesure du seuil de détection parmi lesquelles, la méthode d'appariement, la méthode triangulaire à choix forcé de 1 parmi 3 (3-AFC) (NF ISO 13301; NF ISO 4120) et la méthode A-non A (NF ISO 8588).

La méthode triangulaire 3-AFC, permet de déterminer la détection de différences ou de similitudes entre deux produits (A et B). Plusieurs séries de 3 échantillons, dont 1 contenant le stimulus et 2 autres contenant la référence, sont présentés aux sujets. Six combinaisons pour la présentation des échantillons sont possibles, AAB, ABA, BAA, BAB, BBA, ABB. Les séries sont présentées en ordre croissant de concentration de stimulus. Les sujets doivent alors déterminer lequel des 3 échantillons est non répété.

I.2 L'AMERTUME

Le rejet du goût amer est parfois considéré comme inné (Desor et al., 1975) . La perception peut causer le rejet de certains aliments et a donc souvent été considérée comme un mécanisme de défense contre l'ingestion de substances toxiques (Drewnowski et Gomez-Carneros, 2000). Des goûts basiques, l'amer est considéré comme le plus complexe du fait notamment de la multiplicité des récepteurs et molécules impliqués dans cette perception (Behrens et al., 2004).

I.2.1 Les molécules amères

Il existe de nombreuses molécules amères. Celles-ci sont très variées et incluent par exemple des peptides, des sels, et des ions organiques. Certaines structures chimiques semblent associées à la perception de l'amertume, comme démontré par Rodgers et al. (2005). Ainsi, une classification par structure a été effectuée sur un ensemble de 758 molécules amères et de 22421 molécules supplémentaires choisies aléatoirement, Seules les structures contenant une quantité significative de molécules amères (> 20%) et possédant un nombre minimum de 8 molécules au total ont été retenues. Au final, cela a permis d'identifier 93 structures associées à la perception de l'amertume (Fig. 3).

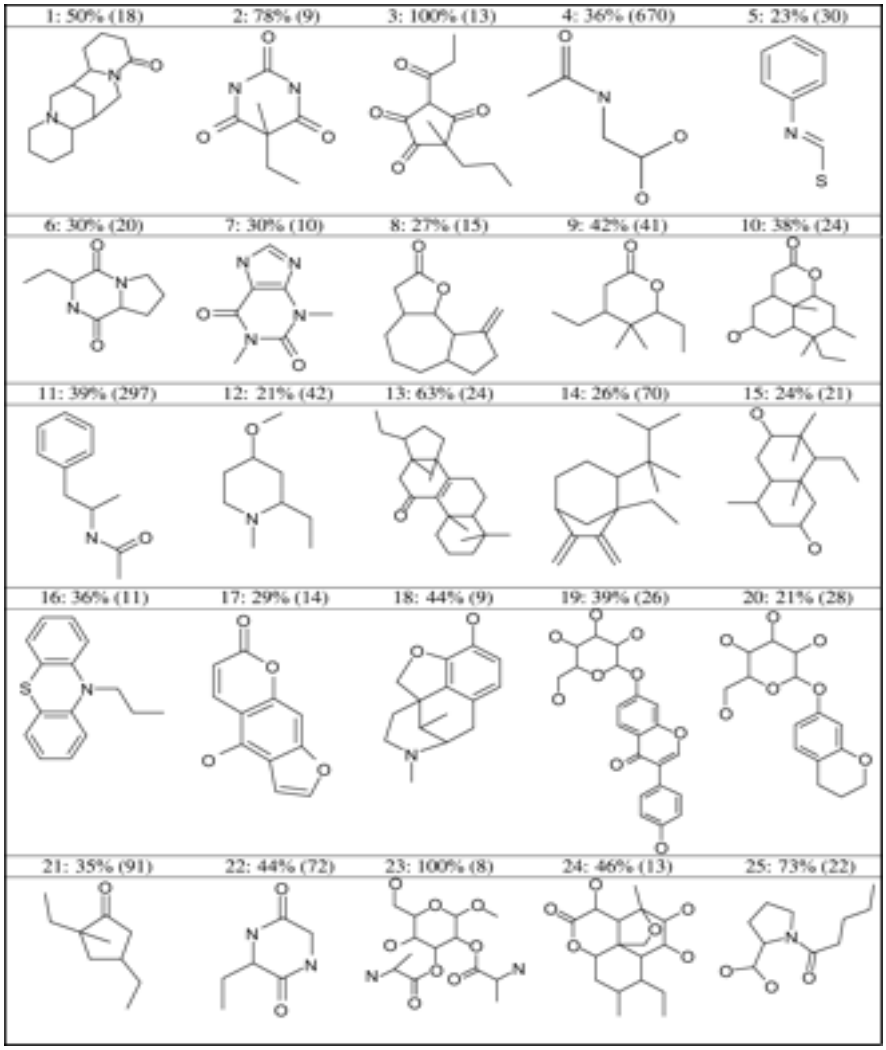


Figure 3 : Structures chimiques des molécules amères. Vingt-cinq des 93 structures principales sont représentées. (D'après Rodgers et al., 2005)

I.2.1.1 La caféine

La caféine ($C_8H_{10}N_4O_2$) est l'une des molécules amères naturelles les plus consommées mondialement. C'est un alcaloïde de la famille des méthylxanthines, plus précisément, 1, 3, 7-trimethylxanthine (Fig. 4) (Chapman et Miller, 1974). Elle a été isolée à l'état relativement pur pour la première fois en 1819 par Ferdinand Runge (Ribeiro et Sebastiao, 2010). La caféine est non seulement retrouvée dans différentes espèces végétales provenant d'Amérique latine, d'Asie et d'Afrique, mais aussi dans différent aliments (Daly et Fredholm, 1998) à des teneurs variables (Fig. 5)

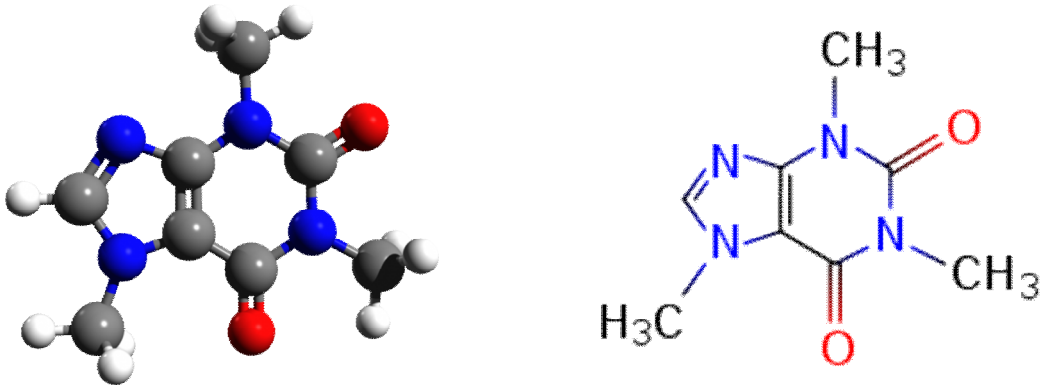


Figure 4 : Structure moléculaire de la caféine

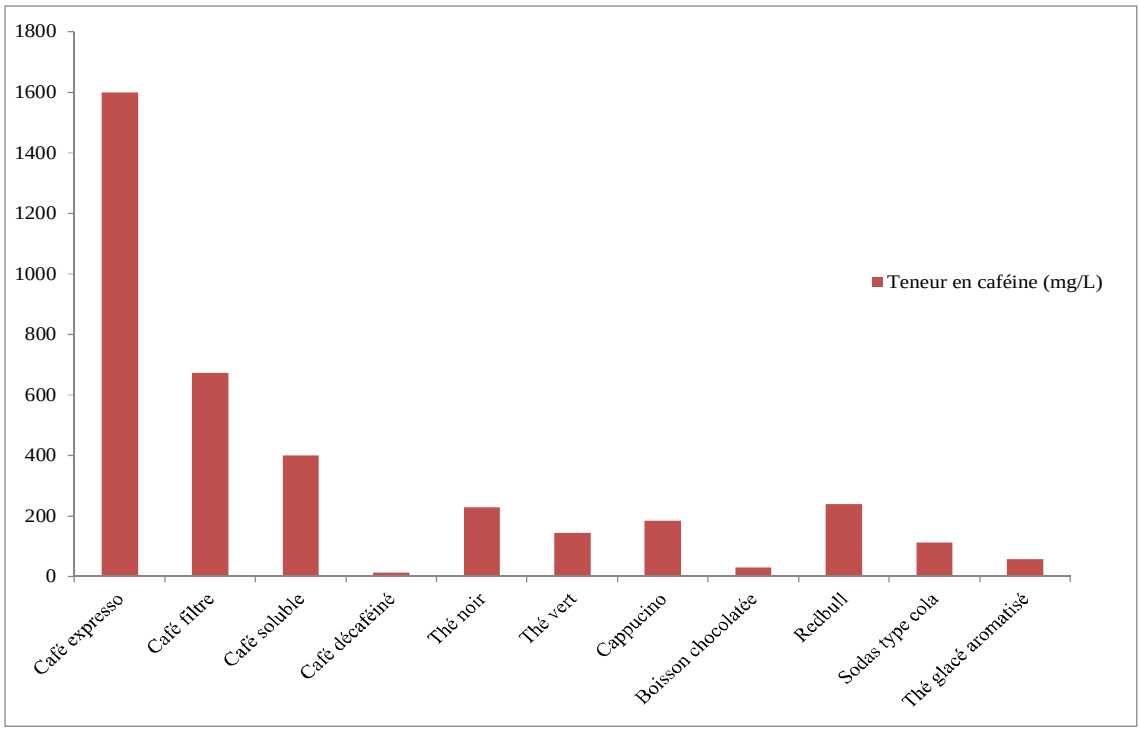


Figure 5 : Teneur en caféine (mg/L) dans diverses boissons

La consommation mondiale moyenne de caféine est de 80 à 400 mg/ jour/ personne et les concentrations plasmatiques observées varient de 5 à 20 µM (Daly et Fredholm, 1998). La caféine est rapidement absorbée par le tube digestif et très rapidement distribuée aux différents organes (Chou et Benowitz, 1994; Nurminen et al., 1999). Elle est métabolisée dans le foie en 3 métabolites primaires, la paraxanthine, la théobromine, et la théophylline par N-déméthylation oxydative et en acide 1, 3, 7-trimethyl urique par un cycle d'oxydation directe (Tang-Liu et al., 1983). Les effets de la caféine sont variés et découlent principalement de son action en tant qu'inhibiteur compétitif de l'adénosine (Ribeiro et Sebastiao, 2010). En effet,

l'interaction de la caféine avec les récepteurs A1 de l'adénosine présente plusieurs bénéfices tels que la stimulation du système nerveux central, avec une augmentation de la vigilance (Warbuton, 1995) et de la mémoire verbale (Jarvis 1993), la bronchodilatation, et la stimulation respiratoire (Ahn et al., 1988). La caféine permet également de réduire l'état de fatigue (Johnson et al., 1990) et elle a été associée à une diminution du risque de divers types de cancer (Butt et Sultan, 2011). Cependant, une consommation élevée de caféine peut entrainer des effets néfastes pour la santé tels que l'arythmie cardiaque (Katan et Schouten, 2005), l'augmentation de la pression artérielle (Nurminen et al., 1999), l'augmentation de l'anxiété (Ahn et al., 1988; Sawyer et al., 1982), les changements hormonaux (Spindel et al., 1984) ou encore des troubles digestifs (Nawrot et al., 2003). La caféine augmente aussi le calcium intracellulaire (Shimamura et al., 1991) ainsi que l'activité plasmatique de la rénine (Robertson et al., 1981), modifie la libération des catécholamines (Lane et al., 1990) et est également un inhibiteur des phosphodiesterases (Wells et Kramer, 1981).

De nombreuses études ont décrit la perception sensorielle de la caféine. Une étude, visant à valider une méthode de mesure des seuils de détection de l'amertume sur un groupe de 32 sujets, rapporte un seuil moyen de détection à la caféine d'environ 1 mM, avec des seuils allant de 0.08 mM à 4.94 mM (Robinson et al., 2005). L'étude de Keast et Roper (2007) sur un groupe de 33 sujets a relevé un seuil moyen de détection de caféine de 1.2 ± 0.12 mM. Cette même étude a aussi montré qu'il y avait une grande différence de perception entre les individus. Cependant, en dessous d'une concentration de caféine de 6 mM, une corrélation entre l'intensité d'amertume perçue et la concentration en caféine a pu être observée chez les sujets, et identiquement pour les concentrations au-dessus de 6 mM. Aucune corrélation n'a été observée entre ces deux groupes de concentrations, suggérant différents mécanismes pour la perception de caféine à faibles et à fortes concentrations.

I.2.1.2 La quinine

La quinine ($C_{20}H_{24}O_2N_2$) est un alcaloïde naturel à la structure complexe (Fig. 6) (Silva et al., 1996). Elle provient de l'écorce de l'arbre Cinchona du Pérou dont les principes actifs ont été extraits en 1820 par la méthode Pelletier-Caventou (Meshnick et Dobson, 2001) et commercialisés dès 1823.

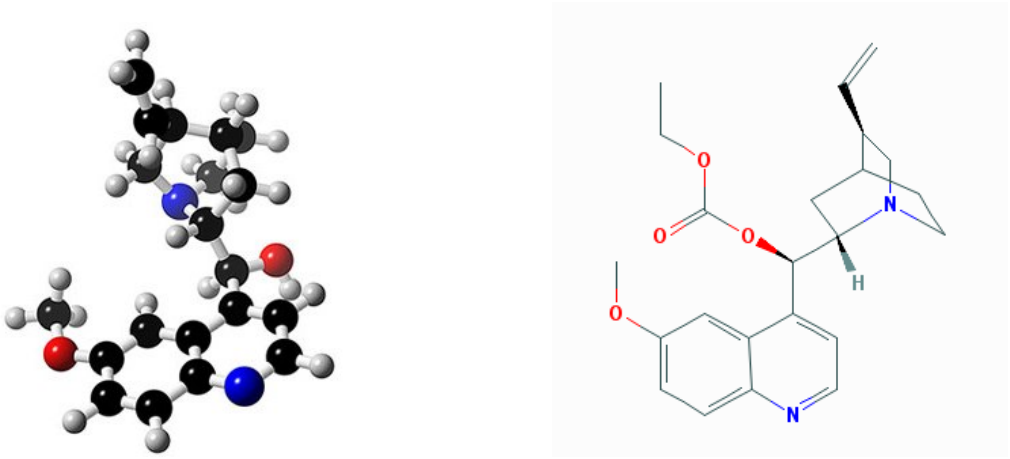


Figure 6 : Structure moléculaire de la quinine

La quinine est utilisée dans le traitement des crampes musculaires et dans celui de la malaria pour son action contre les parasites intra-érythrocytaires (Woodfield et al., 2005; Achan et al., 2011). Cependant, elle est aussi utilisée dans le domaine alimentaire et en particulier celui des boissons Tonic (type Schweppes®) auxquelles elle confère un goût amer. La quantité de quinine présente dans les boissons est régulée par le comité scientifique mixte FAO/OMS sur les normes alimentaires (1993) et fixée à un maximum de 100 mg/L. Pour une consommation d'1 litre et un sujet de 60 kg, ceci représente un taux circulant d'environ 2 µM en moyenne.

La durée de vie plasmatique de la quinine est courte (4 à 6h) et les concentrations dans le plasma sont négligeables 24h après ingestion (Reijenga et al., 1985). La quinine est principalement métabolisée dans le foie par oxydation en (3S)-3-hydroxyquinidine, carbostyril 2'-quinidinone, et en O-desmethylquinidine (Reijenga et al., 1985; Achan et al., 2011). Cependant 5 à 20% de quinine sont directement excrétés dans l'urine (Achan et al., 2011). Ses effets secondaires indésirables sont principalement le cinchonisme qui se caractérise par des maux de têtes, des troubles visuels, des bourdonnements d'oreilles et, dans certains cas, par un choc anaphylactique (Goldenberg et Wexler, 1988).

D'un point de vue sensoriel, une variation interindividuelle a été observée en ce qui concerne la perception de la quinine. Le seuil moyen de détection de la quinine est de 0.0083 ± 0.001 mM (Keast et Roper, 2007).

I.2.1.3 L'urée

L'urée ($CO(NH_2)_2$) est aussi appelée carbamide (Fig. 7). Elle a été découverte en 1773, mais ce n'est qu'en 1828 que Friedrich Wöhler la synthétise à partir de composés inorganiques, l'ammoniaque et l'acide cyanique, ouvrant ainsi la voie à la chimie organique (Dunitz et al., 1998).

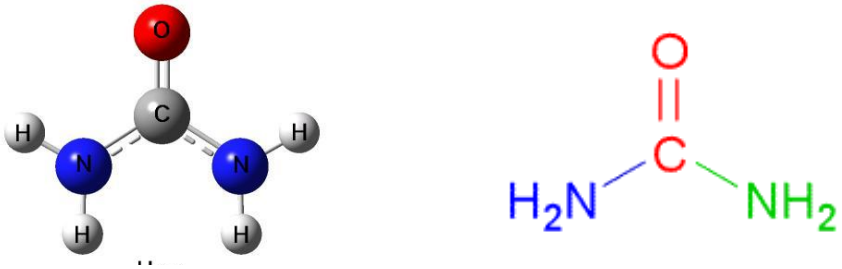


Figure 7 : Structure moléculaire de l'urée

L'urée est naturellement sécrétée par les glandes salivaires et la concentration d'urée dans la salive varie de 3 à 10 mM (Nascimento, 2009). Le taux normal d'urée dans le sang est d'environ 1 à 3 mM. En ce qui concerne l'alimentation humaine, l'urée est présente dans les vins et boissons alcoolisées (Zotta et al., 2007). Elle joue également un rôle dans le traitement des farines, notamment en empêchant leur recristallisation, et est incorporée dans certains chewing-gums sans sucre afin d'améliorer la neutralisation des acides de la plaque dentaire (Ma et al., 2004; Imfeld, 1999). Toutefois, la principale source d'urée circulante provient du métabolisme des protéines. L'urée est éliminée du sang par les reins et excrétée dans l'urine. Aucune dose journalière admissible (DJA) ni aucun effet toxique ne sont actuellement spécifiés.

I.2.2 Les récepteurs du goût amer

Les bourgeons gustatifs peuvent exprimer plusieurs récepteurs. Les récepteurs du goût amer, TAS2Rs aussi appelés T2Rs, ont été identifiés par Adler et al. (2000) Ils contiennent 7 segments transmembranaires et un court domaine N-terminal extracellulaire (Fig. 8). Ils

possèdent une identité d'acides aminés de 30 à 70 % et partagent une séquence très conservée dans les 3 premiers et le dernier segment transmembranaire, ainsi que dans la deuxième boucle cytoplasmique (Adler et al., 2000). Ils sont couplés à la sous-unité α de la protéine G, Gustducine.

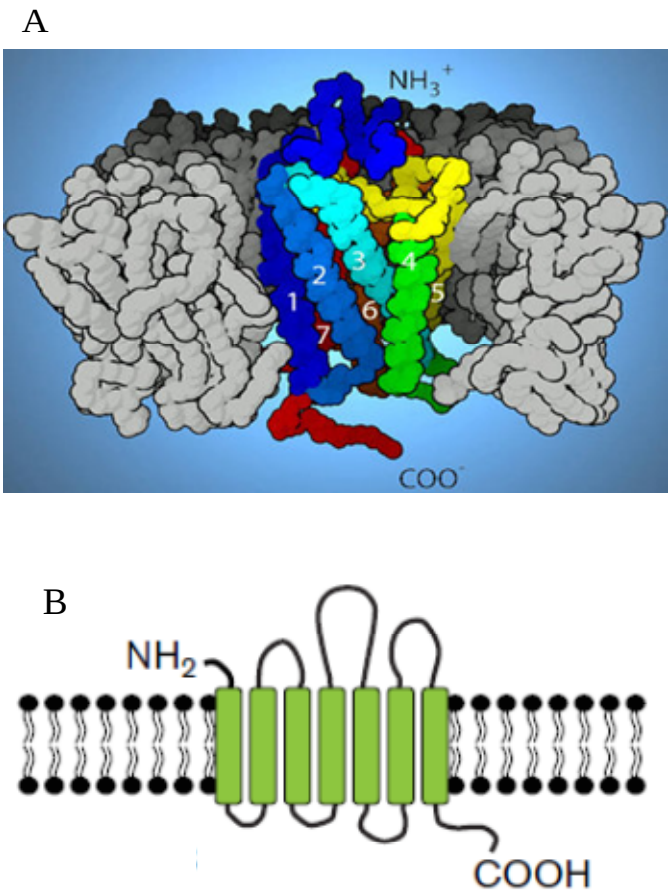


Figure 8 : Structure des récepteurs. A) Structure générale des récepteurs couplés à la protéine G. B) Structure générale des TAS2Rs (D'après Gilbertson et al., 2000).

En 2002, 24 gènes humains codant pour des récepteurs du goût amer étaient identifiés sur les chromosomes 5, 7 et 12 (Bufe et al., 2002, Fig. 9). En 2007, la banque de données du génome humain, The Human Genomic database (GDB), recensait 43 TAS2Rs chez l'Homme (Bachmanov et Beauchamp, 2007). Ce nombre limité de récepteurs du goût amer est capable de reconnaître une grande variété de molécules amères et, réciproquement, différentes molécules amères peuvent activer diverses sous-populations de cellules contenant ces récepteurs (Caicedo et Roper, 2001, Meyerhof, 2005).

Figure 9 : Dendrogramme des relations entre les séquences de TAS2Rs. Les lignes continues indiquent les gènes localisés sur le chromosome 12, les tirets correspondent aux gènes localisés sur le chromosome 7, et les pointillés correspondent aux gènes localisés sur le chromosome 5 (D'après Bufe et al., 2002).

I.2.3 Origine de la variabilité interindividuelle de perception de l'amertume

I.2.3.1 Variations génétiques

Depuis les années 1930, plusieurs études se sont focalisées sur le rôle que pouvait jouer les variations génétiques sur la perception du goût amer. Les premières recherches ont montré que certaines personnes (« non tasters ») ne percevaient pas le goût du phenylthiocarbamide (PTC), alors que d'autres le percevaient comme amer (Fox, 1932). Ces observations ont également été rapportées pour le 6-n-Propylthiouracyl (PROP), une molécule amère structurellement proche du PTC (Guo et Reed, 2001). Parmi ceux qui en perçoivent le goût, une autre subdivision a pu être observée entre les personnes qui percevaient moyennement le goût amer du PROP (« medium tasters ») et ceux qui le percevaient comme très intense (« supertasters »). Ces derniers percevaient également de manière intense d'autres molécules amères et sucrées (Bartoshuk et al., 1994). Par la suite, cette différence de perception entre les individus a majoritairement été attribuée à une variation au niveau des gènes. Une autre étude

sur l'intensité d'amertume perçue par un groupe de frères et sœurs (jumeaux homozygotes, hétérozygotes, et non jumeaux) pour 4 différentes solutions amères (PROP, sucrose octa-acétate, quinine, caféine) a montré que trois ensembles de gènes distincts gouvernent, respectivement, la sensibilité au PROP, à la quinine et aux trois molécules quinine-caféine-SOA. Ils ont également montré que la sensibilité au PROP était largement expliquée (à 72%) par les variations génétiques alors que les sensibilités aux autres composés en dépendaient moins (22 à 28%) (Hansen et al., 2006). La sensibilité à l'amertume du PROP est expliquée en grande partie par un polymorphisme affectant le récepteur TAS2R38 (Kim et al., 2003). Toutefois, une étude plus récente a également mis en évidence l'implication du gène CA6 codant pour la protéine salivaire carbonique anhydrase VI. En particulier, un polymorphisme rs2274333 (A/G) résulte en un changement de conformation de la zone permettant la fixation du zinc, affectant ainsi la fonctionnalité de la protéine (Padiglia et al., 2010). Non fonctionnelle, la protéine ne peut plus assurer son rôle dans la croissance des bourgeons du goût (Henkin et al., 1999) et leur protection contre l'apoptose (Leinonen et al., 2001). Une autre étude centrée sur l'identification de gènes liés à la sensibilité à plusieurs composés amers a pointé pour la quinine une région du chromosome 12 contenant des gènes codant pour des récepteurs du goût amer mais aussi les gènes PRR4 et PRH1 codant pour des protéines salivaires, les Protéines riches Prolines en ou PRPS (Reed et al., 2010). Cette même étude n'a pas démontré d'association significative entre perception de la caféine et variabilité génétique.

Il apparait déjà qu'une partie de la variation génétique expliquant les différences de perception du goût amer touche des gènes codant pour des protéines salivaires (CA6, PRR4, PRH1). Le rôle de la composition salivaire sera détaillé plus avant au paragraphe **I.3.4**.

I.2.3.2 Variations environnementales

Les facteurs environnementaux, tels que l'âge, les pathologies, ou encore les médicaments, agissent aussi indirectement ou directement sur la perception de l'amertume. Pour ce qui est de l'âge, les enfants hétérozygotes pour le gène TAS2R38 (AVI/PAV), par exemple, sont plus sensibles à l'amertume du PROP que les adolescents AVI/PAV, qui eux-mêmes sont plus sensibles que les adultes AVI/PAV (Mennella et al., 2010) mais le mécanisme à l'origine de cette constatation n'est pas connu. De façon générale, la sensibilité à l'amertume semble diminuer avec l'âge. En effet, les mesures du seuil de détection et la

perception supra-liminaire de plusieurs molécules amères ont montré que les personnes âgées détectaient les molécules amères à des concentrations plus élevées et étaient moins sensibles aux concentrations supra-liminaires comparé aux jeunes adultes (Schiffman et al., 1994). Cependant, ces différences de sensibilité entre jeunes et personnes âgées n'ont pas été observées dans le cas de l'urée (Cowart et al., 1994), et seule une tendance de l'effet âge a été observée par Mojet et al. (2001) pour la caféine, suggérant l'existence de différents mécanismes de transduction du goût amer. Pour ce qui est des pathologies, on peut citer le «burning mouth syndrome» et la xérostomie qui réduisent l'acuité gustative en général mais de façon plus significative la perception de l'amertume (et de l'acide) que celle du sucré ou du salé (Hershkovich et Nagler, 2004). Enfin, plus de 250 médicaments sont connus pour modifier le goût et l'odorat. Le cas d'une patiente ayant une perception d'amertume en bouche due à l'utilisation du Cosopt dans le traitement d'un glaucome a été rapporté (Douglass et Heckman, 2010). Au contraire, l'utilisation thérapeutique d'inhibiteurs de protéases dans le traitement de l'infection au VIH peut réduire la perception de l'amertume, comme celle de la quinine par exemple (Schiffman et al., 1999).

I.3 LA SALIVE

I.3.1 Définition et formation de la salive

La salive est un liquide présent dans la cavité orale et sécrété principalement par trois glandes majeures que sont la glande parotide, la glande sous-maxillaire, et la glande sublinguale, mais aussi par plusieurs glandes mineures (Mese et Matsuo, 2007). Ce qui est appelé plus généralement salive « totale » est le fluide constitué des salives issues des glandes auxquelles viennent s'ajouter le fluide créviculaire (un exsudat du plasma provenant du plexus gingival des vaisseaux sanguins) et des constituants issus de la desquamation de l'épithélium (Pisano et al., 2005) et de la flore orale. Dans les glandes, la formation de la salive nécessite deux étapes (Fig. 10). La salive primaire isotonique, constituée essentiellement d'eau, d'électrolytes et de protéines, est en premier lieu sécrétée par les cellules acinaires des glandes salivaires. Ensuite, elle est modifiée par réabsorption intratubulaire des ions sodium (Na^+) et chlorure (Cl^-) et sécrétion des ions potassium (K^+) et bicarbonate ($HCO3^-$). Cette modification donne lieu à une salive finale hypotonique.

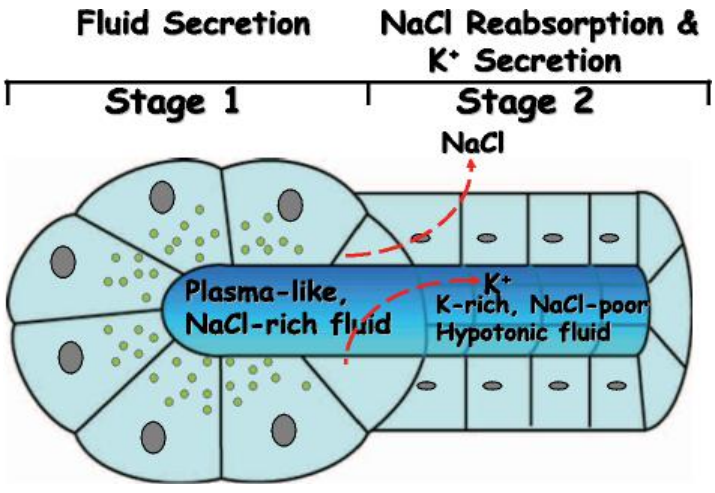


Figure 10 : Etapes de la sécrétion salivaire (D'après Catalan et al., 2009).

Chez un sujet sain, la production journalière de salive est de 0,5 à 1 L (Pedersen, 2007). On distingue deux états de la salive totale: la salive au repos qui représente une quantité basale de

salive recouvrant constamment la surface des cavités orale et pharyngéale, et la salive stimulée dont la formation est initiée par la présence d'un stimulus, tel qu'une molécule sapide, la mastication ou la prise alimentaire (Mese et Matsuo 2007). Le flux salivaire varie généralement entre 0,3 et 0,5 ml/min pour la salive au repos et entre 1 et 1,5 ml/min pour la salive stimulée (Pedersen, 2007).

I.3.2 Régulation de la sécrétion salivaire

I.3.2.1 Réflexes et système nerveux autonome

La formation de la salive est basée sur des réflexes conditionnés et inconditionnés comprenant une partie sensorielle afférente et une partie sécrétrice efférente (Pedersen, 2007). En ce qui concerne le reflexe inconditionné, la stimulation des chémorécepteurs des bourgeons gustatifs et des mécanorécepteurs du ligament parodontal active la partie sensorielle. Un signal sensoriel est alors envoyé aux noyaux salivaires du centre salivaire dans la médulle oblongata du cerveau (Fig. 11). Le signal est intégré dans le centre salivaire puis redirigé vers la partie réflexe liée à la sécrétion (Pedersen, 2007). Les réflexes conditionnés, quant à eux, sont programmés dans des centres plus élevés du cerveau et peuvent être activés par la pensée, la vue, l'odeur de la nourriture ou encore par des bruits de cuisine (Pedersen et al., 2002 ; Pedersen, 2007). L'information est ensuite relayée au centre salivaire et redirigée vers la partie sécrétrice. Des études réalisées sur des rats et des lapins ont montré que la sécrétion salivaire est contrôlée par le système nerveux autonome sympathique et parasympathique, responsable respectivement de la sécrétion des protéines et du transport d'eau et d'électrolytes. (Garrett et al., 1991, Turner et Sugiya, 2002).

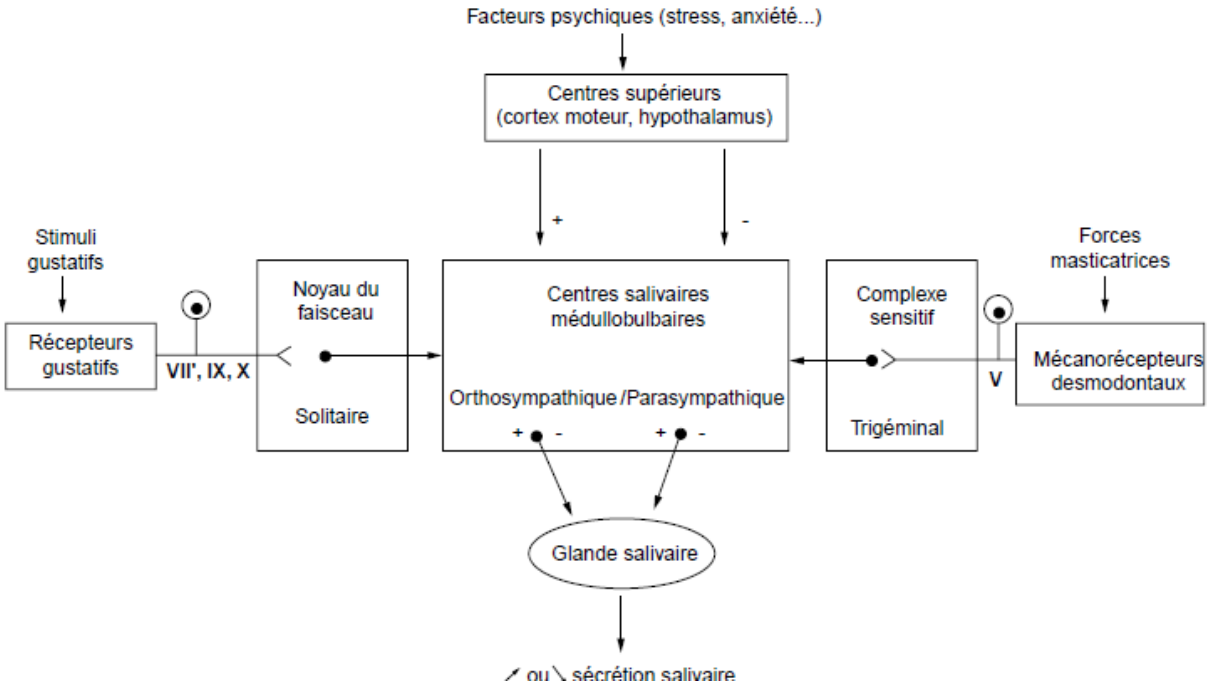


Figure 11 : Centres du cerveau impliqués dans la régulation des glandes salivaires (D'après Pedersen et al., 2002).

I.3.2.2 Voies de signalisation et transports ioniques

La stimulation du nerf parasympathique entraine la libération d'acétylcholine par les terminaisons nerveuses postganglioniques, ce qui va entrainer l'activation d'une cascade de signalisation après liaison de l'ACTH aux récepteurs muscariniques (Pedersen, 2007). Un mécanisme a été décrit (Turner et Sugiya, 2002) (illustré Fig. 12). La cellule acinaire possède 4 transporteurs d'ions, le Na^+/K^+ adenosine triphosphate (ATPase), le cotransporteur Na^+ - K^+ - $2Cl^-$, et un canal K^+ activé par Ca^{2+} tous situés sur la membrane basale ainsi qu'un canal Cl^- activé par Ca^{2+} situé sur la membrane apicale. La stimulation du nerf parasympathique déclenche la libération du Ca^{2+} intracellulaire. L'augmentation de Ca^{2+} dans la cellule entraine l'ouverture des canaux K^+ et Cl^-. Les ions Cl^- vont alors être sécrétés dans le lumen et créer un courant électronégatif. Afin de préserver une électroneutralité, les ions Na^+ vont diffuser vers le lumen à travers les jonctions serrées entre les cellules acinaires. Un gradient osmotique dû à la formation de NaCl est créé à travers la cellule, ce qui va entrainer le transport de molécules d'eau par le canal Aquaporin 5 (AQP5) de l'interstice vers le lumen et

par conséquent la formation de la salive primaire (Mese et Matsuo, 2007 ; Turner et Sugiya, 2002 ; Catalan et al., 2009).

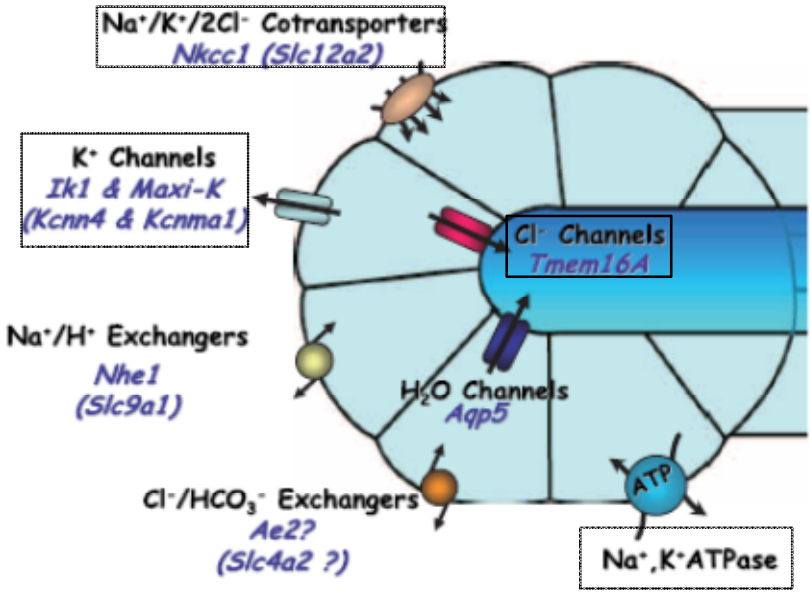


Figure 12 : Mécanisme principal de la sécrétion salivaire basée sur un transport actif transépithélial de Cl^- et le gradient osmotique NaCl et H_2O. Quatre transporteurs d'ions sont impliqués dans ce mécanisme (encadrés), le Na^+/K^+ adenosine triphosphate (ATPase), le cotransporteur Na^+ - K^+ - $2Cl^-$, et un canal K^+ activé situés sur la membrane basale, et un canal Cl^- activé par Ca^{2+} situé sur la membrane apicale (D'après Catalan et al., 2009).

D'autre part, la stimulation des récepteurs β-adrénergiques du nerf sympathique déclenche l'activation des voies de signalisation de l'adénosine 3', 5'-monophosphate cyclique (cAMP), avec une activation de la Protéine Kinase A (PKA) (Mese et Matsuo 2007) (Fig. 13). Cette activation entraine d'une part, le transport des protéines salivaires à l'intérieur des granules de stockage vers la membrane cellulaire (Proctor, 1998) et leur sécrétion par exocytose dans le lumen (Turner et Sugiya, 2002). D'autre part, elle est responsable de la synthèse des protéines par la cellule en vue du réapprovisionnement des réserves dans les granules (Proctor, 1998). L'inhibition de la Protéine Kinase C (PKC)-δ, protéine en aval des voies liées aux récepteurs α1-adrenergiques, est également capable d'entrainer la synthèse de protéines salivaires, comme cela a été décrit pour l'amylase (Jung et al., 2000).

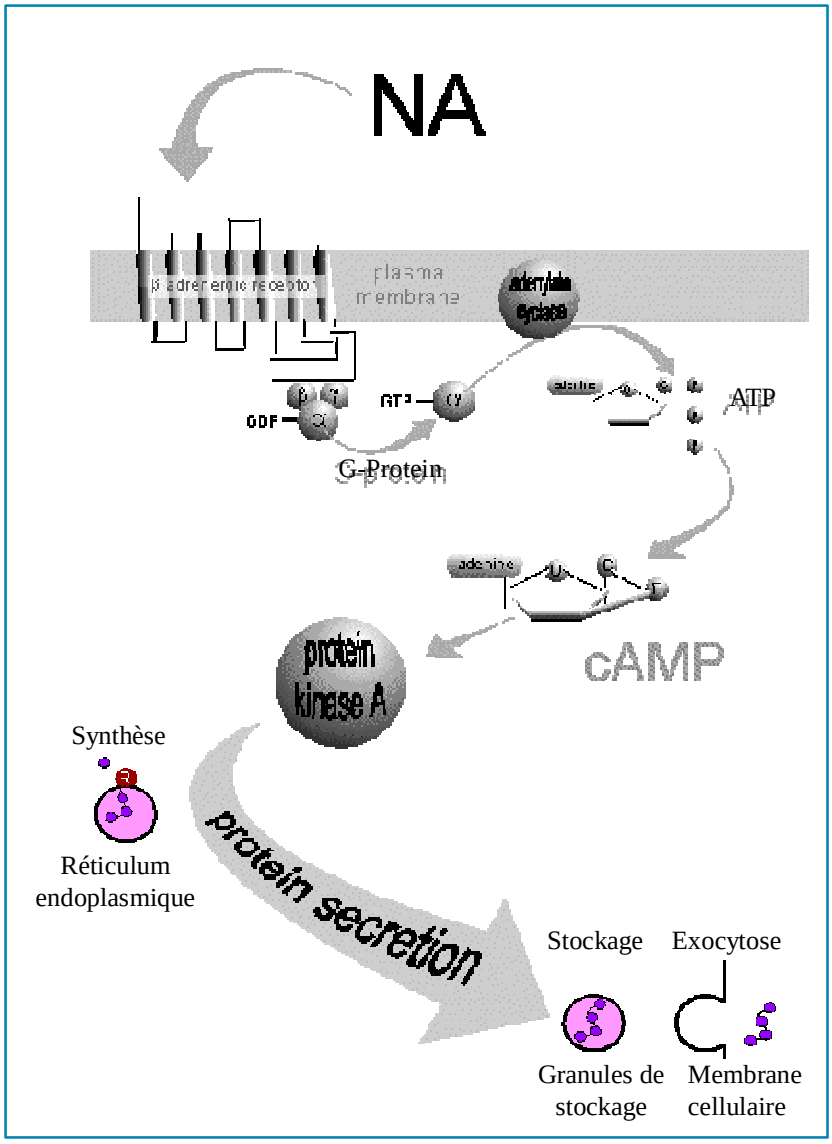


Figure 13 : Synthèse et sécrétion des protéines salivaires par la voie sympathique (D'après Peter Smith, University of Liverpool, 1998. www.petesmif.org.uk).

I.3.2.3 Régulation endocrinienne

Bien que la sécrétion de la salive soit en majorité sous la dépendance du système nerveux autonome, diverses études ont mis en évidence une influence hormonale faisant intervenir les androgènes, les œstrogènes, les hormones thyroïdiennes et les corticoïdes. Par exemple, les hormones thyroïdiennes peuvent réguler les activités protéolytiques de la rénine et la kallicréine, et l'insuline joue un rôle sur l'activité de synthèse et de libération des

protéines glandulaires. L'expression de certaines protéines salivaires (ex : CAVI) est également sous le contrôle des hormones stéroïdiennes sexuelles (Kivela et al., 2003).

I.3.3 Composition de la salive

La salive totale est composée d'environ 99% d'eau et contient des composés inorganiques et organiques.

I.3.3.1 Composés inorganiques

Les principaux composés inorganiques sont d'une part le sodium, les bicarbonates et le calcium dont les concentrations sont basses au repos et augmentent progressivement après stimulation, et d'autre part, le potassium, le magnésium et le phosphate dont les concentrations sont élevées au repos et diminuent progressivement après stimulation (Young et Schneyer 1981). A l'exception des bicarbonates, ils proviennent directement du sang. De façon générale, leur concentration salivaire est inférieure à la concentration plasmatique, à l'exception du phosphate qui a une concentration 2 à 3 fois plus élevée dans la salive (Young et Schneyer 1981). L'osmolarité de la salive dépend principalement de son contenu en composés inorganiques.

I.3.3.2 Composés organiques

Parmi les composés organiques, on compte essentiellement les protéines. Le « Consortium du Protéome Salivaire Humain » a rapporté 1166 protéines identifiées dans la salive (Denny et al., 2008). Les protéines salivaires peuvent être divisées en plusieurs catégories : les protéines sécrétées par les glandes salivaires, les protéines sériques, et celles provenant de la flore buccale. Les protéines sécrétés par les glandes salivaires (Tableau 1) incluent entre autres des glycoprotéines, telles que les mucines ou les Immunoglobulines A (IgA), des enzymes, telles que l'amylase ou l'anhydrase carbonique VI, les kallicréines, les cystatines, les histatines, les PRPs, et des facteurs de croissances principalement le nerve growth factor (NGF) et l'epithelial growth factor (EGF) (Schenkels et al., 1995 ; Young et Schneyer, 1981).

Tableau 1 : Liste non exhaustive des protéines salivaires dans la salive entière et leur concentrations dans les glandes salivaires majeures (parotide, sous-maxillaire-sublinguale ou SMSL) (D'après Huq et al., 2007)

Component	Range of concentrations in saliva (µg/ml)			References
	Whole saliva	Parotid	SMSL	
Albumin	29–238	–	–	(Mandel 1980; Henskens et al. 1996)
Amylase	380–500	650–2,600		(Aguirre et al. 1987; Oppenheim et al. 2007)
Cystatin	240–280	1.6–4	92–280	(Aguirre et al. 1992; Oppenheim et al. 2007)
Fibronectin	0.2–2	2–6	0.3–2.0	(Babu and Dabbous 1986; Tynelius-Bratthall 1988; Tynelius-Bratthall et al. 1986)
Histatins	2–30	30–55	13–70	(MacKay et al. 1984)
IgG	0.4–14.4	–	–	(Cole et al. 1978; Mandel 1980; Brandtzaeg 2007)
Lactoferrin	194	12	13	(Mandel 1980; Rudney et al. 1991)
Lysozyme		7	21	(Mandel 1980; Rudney et al. 1991)
MG1	80–500	–	80–560	(Oppenheim et al. 2007)
MG2	10–200	–	5–243	(Aguirre et al. 1993)
β-2-Microglobulin		0.2–0.9	0.3–0.4	(Ericson et al. 1982)
Parotid agglutinin		10		(Ericson and Rundegren 1983)
Proline-rich proteins	90–180	230–1,251	270–1,335	(Hay and Moreno 1989; Kousvelari et al. 1980; Aguirre et al. 1993)
sIgA	19–439	20–230	41–56	(Aguirre et al. 1987; Cole et al. 1978; Rudney et al. 1991; Stuchell and Mandel 1978; Henskens et al. 1996)
Statherin	2–12	16–147	20–150	(Hay et al. 1984; Oppenheim et al. 2007)

Les protéines sériques comprennent l'albumine sérique, la transferrine et certaines immunoglobulines (Ig), telles que les IgG et IgM (Young et Schneyer, 1981). La cavité orale est colonisée par un grand nombre de microorganismes tels que les Streptococci (Amerongen et Veerman, 2002). Ces microorganismes relarguent des protéines ou des peptides, tels que les adhésines (Scannapieco, 1994) et les lantibiotiques (Amerongen et Veerman, 2002) dans la salive.

I.3.3.3 Facteurs modulant la composition salivaire

La composition salivaire présente une grande variation interindividuelle (Quintana et al., 2009a). Plusieurs facteurs tels que l'âge, les pathologies, les variations des gènes codant pour les protéines salivaires, ou encore les stimulations sensorielles sont susceptibles de modifier la composition protéique de la salive. Une étude a montré que la composition en PRPs varie avec l'âge post-conceptionnel chez les nouveaux nés (Inzitari et al., 2007). Des variations substantielles dans les profils protéiques (Morzel et al., 2011) et peptidiques (Morzel et al., 2012) sont également observés chez des nourrissons entre 3 et 6 mois, puis

entre des groupes d'âges différents, des nourrissons aux adultes (Cabras et al., 2009). Pour ce qui est des pathologies, la salive est modifiée en premier lieu par les pathologies orales comme la parodontite (Henskens et al., 1993 ; Wu et al., 2009 ; Gonçalves et al., 2010) ou les cancers de la sphère orale (Hu et al., 2008). Toutefois, la salive peut également être utilisée comme source de biomarqueurs du cancer du sein (Streckfus et al., 2008) ou du diabète de type 1 (Hirtz et al., 2006) ou type 2 (Rao et al., 2009).

D'autre part, les variations génétiques entre les individus modifient l'expression de certaines protéines salivaires, c'est le cas par exemple des gènes codant pour les PRPs (Oppenheim et al., 2007).

La composition protéique salivaire peut être modifiée par des stimulations sensorielles, notamment gustatives. En particulier, l'étude des profils protéiques après stimulation par goût a révélé que les goûts acide et amer perturbaient plus le protéome salivaire que l'umami ou le goût sucré (Neyraud et al., 2006). La modification d'abondance de protéines salivaires impliquées dans la protection de la cavité orale et dans les voies inflammatoires a également été observée après ingestion de molécules sapides, précisément la quinine et l'urée (Quintana et al., 2009b). Plus récemment, une étude a montré la modification de profils obtenus par SELDI-ToF après une stimulation sucrée (Siletti et al., 2012).

I.3.4 Rôle de la salive

La salive, de par sa composition, assume plusieurs rôles au sein de la cavité orale (Fig. 14). Elle lubrifie et protège les muqueuses orales, pharyngéale et œsophagienne. La salive est également responsable de la protection de l'émail dentaire et de la régulation du pH. Elle exerce une activité antimicrobienne et intervient dans les premières phases de la digestion. Enfin, la salive joue un rôle dans la perception gustative, en intervenant, entre autres, dans la maturation des bourgeons gustatifs ou le transport de molécules sapides.

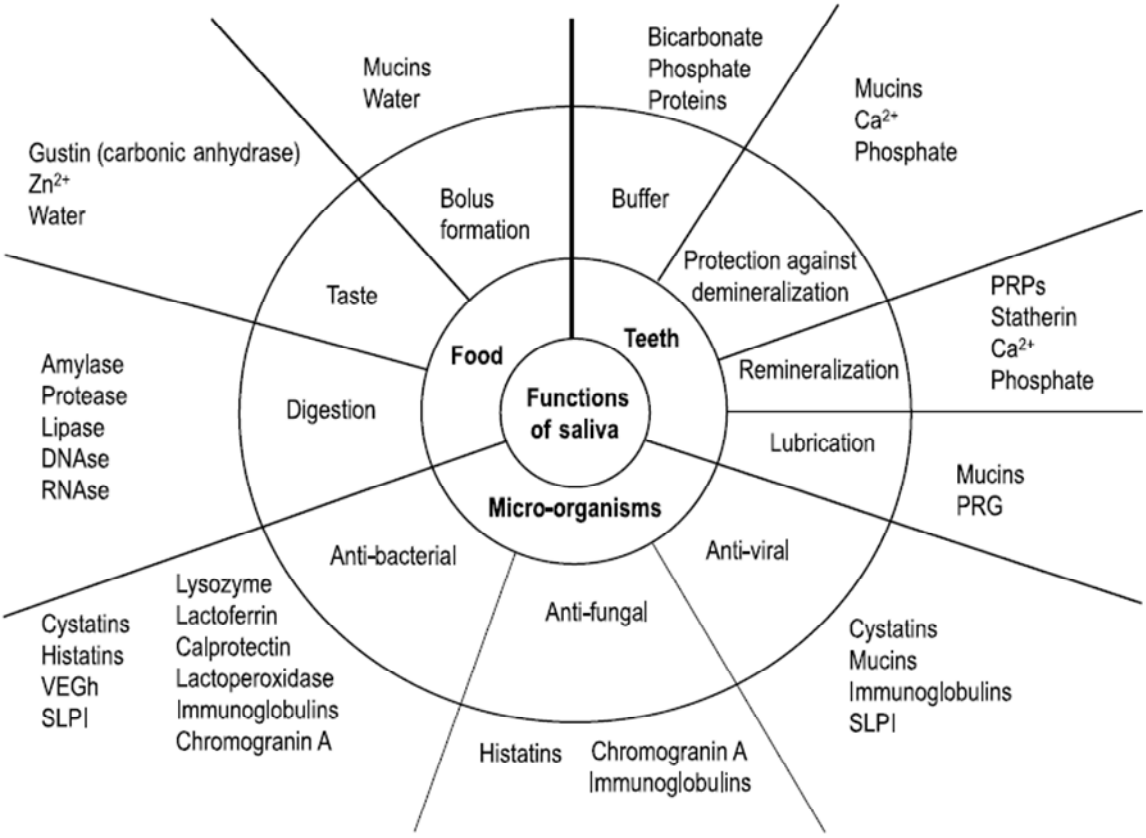


Figure 14 : Rôles de la salive (D'après Amerongen et Veerman, 2002)

I.3.4.1 Lubrification, protection des muqueuses et activité antimicrobienne

La lubrification des muqueuses orale, pharyngéale, et œsophagienne se fait en grande partie par des glycoprotéines de haut poids moléculaire telles que les mucines, sécrétées par les glandes salivaires. Leur nature hydrophile permet la rétention de molécules d'eau et évite la déshydratation des muqueuses (Pedersen et al., 2002; Tabak, 1995). Les protéines salivaires sont aussi impliquées dans la protection des muqueuses via l'inhibition de l'adhésion bactérienne (Pedersen et al., 2002). Plusieurs études ont mis en évidence l'existence d'une interaction entre les protéines salivaires, notamment les mucines, les sIgA, les lysozymes, ou encore la β2-microglobuline, et les microorganismes (Golub et al., 1984 ; Scannapieco, 1994), ce qui permet leur élimination par le système digestif. Les cystatines, qui sont des inhibiteurs de protéase, possèdent aussi une activité antimicrobienne. Par exemple, une étude a montré qu'un peptide synthétique, basé sur la structure de la cystatine C était capable d'inhiber de manière sélective la croissance de streptococci du groupe A (Bjorck et al., 1989).

I.3.4.2 Maintien de l'intégrité dentaire et régulation du pH

La cavité orale, y compris les muqueuses et l'émail dentaire, est entièrement recouverte d'un film fin et continu, appelé pellicule ou film salivaire, formé par l'adsorption sélective de de protéines salivaires (Bradway et al., 1989), tels que les mucines ou l'α-amylase (Scannapieco, 1994). Les composés de ce film salivaire sont sujets à la protéolyse en bouche (Bradway et al., 1992). La capacité de certaines bactéries à adhérer au film salivaire et aux surfaces orales constitue un des principaux moyens de colonisation bactérienne et de formation de la plaque dentaire (Scannapieco, 1994). La présence de plaque dentaire entraine la production d'acides qui favorisent la déminéralisation des dents (Loesche, 1986). Afin de maintenir l'intégrité dentaire, la salive neutralise les acides et élimine les bactéries. La neutralisation des acides est assurée par 3 constituants salivaires, le bicarbonate, le phosphate, et les protéines (Pedersen et al., 2002 ; Bardow et al., 2000). Leur action tamponnante est dépendante notamment du flux salivaire. A faible flux salivaire et à pH<5, la neutralisation des acides est principalement assurée par les protéines (Pedersen et al., 2002). Dans la salive au repos, cette action est assurée en grande partie par le bicarbonate (pK 6.1 - 6.3) et le phosphate,(pK = 6.8 - 7.0) (Lenander-Lumikari et Loimaranta, 2000). Dans la salive stimulée, 90% de l'action tamponnante est assurée par le bicarbonate. La salive étant saturée en calcium et phosphate, certaines protéines salivaires telles que les statherines, les PRPs, les cystatines, ou encore les histatines, protègent l'émail dentaire de la déminéralisation en inhibant la précipitation du calcium phosphate (Pedersen et al., 2002). La protéine anhydrase carbonique VI joue également un rôle dans la protection des dents contre les carries de par son action enzymatique tamponnante. Une corrélation négative entre la concentration salivaire en CAVI et la présence de carries a été démontrée (Kivela et al., 1999).

I.3.4.3 Digestion

En plus d'agir au niveau de la protection de la cavité orale, la salive joue également un rôle modéré dans la première étape de la digestion. Deux principales enzymes salivaires sont impliquées, l'α-amylase et la lipase (Pedersen, 2007). L'α-amylase salivaire lyse les liaisons α(1-4)glycosidiques de l'amidon en molécules de maltose, maltotriose et dextrine. Ce processus constitue la première phase de la digestion de l'amidon (Pedersen et al., 2002). La lipase ou du moins l'activité lipasique en bouche, quant à elle, lyse une partie des

triglycérides provenant des aliments en bouche (Hamosh et Burns, 1977 ; Neyraud et al., 2012) particulièrement chez le nourrisson. Elle est stimulée par une alimentation riche en lipides et par l'allaitement (Pedersen et al., 2002, Harries, 1982).

I.3.4.4 Perception gustative

La salive intervient aussi dans la perception du goût en agissant soit directement sur les molécules sapides, soit au niveau des récepteurs du goût (Mese et Matsuo, 2007). Pour ce qui est de son interaction avec les molécules sapides, la salive assure la dilution et le transport de ces molécules vers leurs récepteurs (Spielman, 1990). La dilution des molécules sapides dépend des propriétés physiques des aliments dans lesquels elles sont présentes. La dilution par la salive d'une molécule sapide, par exemple, sera plus rapide si elle est dans un liquide que dans un solide (Matsuo, 2000). De plus, comme mentionné précédemment, le bicarbonate dans la salive est capable d'interagir avec et neutraliser les molécules acides avant même qu'elles atteignent les récepteurs (Christensen et al., 1987). Les molécules acides entrainent une forte sécrétion de salive riche en bicarbonate. L'action tamponnante du bicarbonate influence la disponibilité des ions H^+ associés aux molécules acides et, par conséquent, la perception au goût acide (Spielman, 1990). Aussi, l'interaction de l' α-amylase avec les aliments pourrait être impliquée dans la perception gustative. Par exemple, une corrélation négative a été observée entre activité amylasique dans la salive et perception du salé dans des matrices amylacées (Ferry et al., 2006).

Pour ce qui de son action au niveau des récepteurs, des composés de la salive peuvent stimuler continuellement les récepteurs du goût et ainsi changer la sensibilité aux molécules sapides. C'est par exemple du NaCl ou du glutamate, pour lesquels le seuil de détection dépend des concentrations basales dans la salive (Mese et Matsuo, 2007). La salive assure aussi la protection et la maturation des bourgeons gustatifs. La suppression des glandes salivaires chez le rat entraine la diminution ou la perte des bourgeons gustatifs (Morris-Wiman et al., 2000). De plus, la protéine CAVI a été impliquée dans la croissance et la maturation des bourgeons. La présence de vacuolisation et la dégénérescence cellulaire ont été observées chez des patients souffrant de problèmes gustatifs et olfactifs liée à une sous-expression de la CAVI (Henkin et al., 1999). La protéine joue également un rôle protection contre l'apoptose (Leinonen et al., 2001). Ceci explique en partie que la déficience en CAVI ait été associée à une diminution générale de la perception gustative (Shatzman et Henkin, 1981).

Cas particulier de l'amertume

Pour ce qui est de l'amertume, une étude réalisée sur un groupe de patients se présentant comme ayant des pertes de goût et d'odorat, et ayant des concentrations salivaires réduites en CAVI, a montré que le seuil de détection du goût amer de l'urée était plus fréquemment anormal par rapport aux seuils de détection aux goûts salé, sucré et acide (Henkin et al., 1999). Le niveau d'autres protéines salivaires est corrélé à la perception de l'amertume. Par exemple, deux protéines de la famille des PRPs basiques (II-2 et Ps-1) sont surexprimées dans la salive de supertasters au PROP et la stimulation par le PROP entraîne une augmentation rapide de leur niveau seulement chez ces sujets (Cabras et al., 2012). Les auteurs n'ont pas formulé d'hypothèse mécanistique pour expliquer ces résultats. Enfin, la sensibilité à la quinine est liée au niveau d'histatine 5 (Wada et al., 2010), ce qui s'explique probablement par la capacité de cette protéine à se lier à la quinine, empêchant ainsi son interaction avec les récepteurs du goût. Ces résultats associés à l'importante variation de la composition salivaire entre les individus (Quintana et al., 2009a) laissent envisager un lien entre la composition protéique de la salive et les différences de perception au goût amer entre les individus.

I.4 LES GLANDES SALIVAIRES

Les glandes salivaires sont structurellement diverses et exercent de nombreuses fonctions biologiques. Elles sont capables de produire des molécules, d'interagir avec et d'influencer l'environnement oral et gastrique. Les glandes salivaires sont classifiées comme majeures ou mineures essentiellement en fonction de leur taille. Il existe 3 paires de glandes salivaires majeures, la glande parotide, la glande sous maxillaire, et la glande sublinguale, et plusieurs glandes mineures recouvrant toutes les muqueuses à l'exception des gencives (Tandler et Phillips, 1998). Ces glandes sont composées d'unités sécrétrices et de canaux qui excrètent la salive dans la cavité orale.

I.4.1 Anatomie générale des glandes salivaires

I.4.1.1 Unités sécrétrices

En fonction de la glande et de la nature de la sécrétion, les unités sécrétrices peuvent avoir plusieurs formes. Elles peuvent être acinaires, tubulaires, ou un mélange des deux formes (Fig. 15) (Tandler et Phillips, 1998). Les cellules des acini sont appelées cellules séreuses car elles sécrètent les protéines. Elles sont basophiles, contiennent un réticulum endoplasmique rugueux extensif et régulier ainsi que plusieurs granules sécrétrices. Les cellules des unités sécrétrices tubulaires sont appelées cellules muqueuses et produisent le mucus, un liquide visqueux riche en glycoconjugués. Ces cellules contiennent des granules regroupés en une seule masse (Tandler et Phillips, 1998). Les cellules des unités sécrétrices à la fois acinaires et tubulaires, quant à elles, sont appelées séromuqueuses et possèdent les caractéristiques des deux précédents types de cellules. D'autres cellules encore, les cellules myoépithéliales, recouvrent les unités sécrétrices. Elles jouent un rôle dans l'aspect mécanique de la sécrétion salivaire (Tandler et Phillips, 1998).

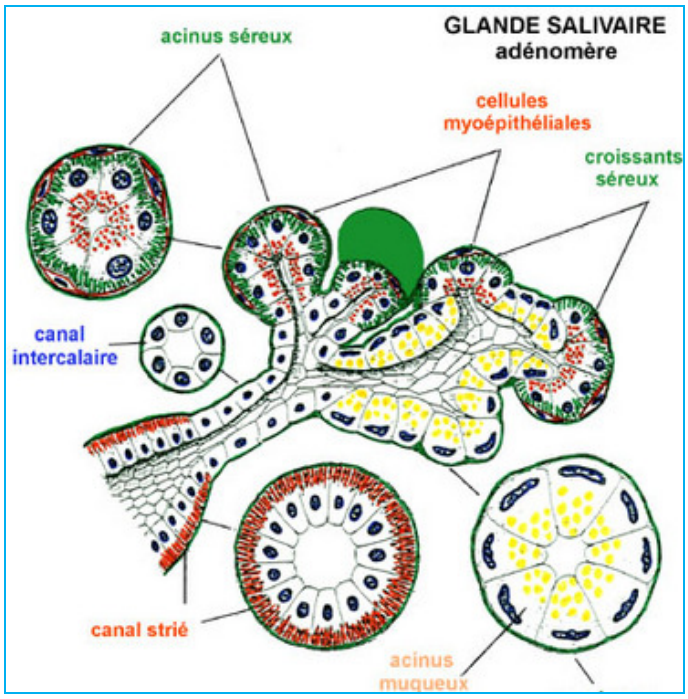


Figure 15 : Glandes salivaires : Les unités sécrétrices et canaux (D'après Serge Nataf, matériel d'enseignement à l'Université de Lyon/Hospices Civils de Lyon)

I.4.1.2 Canaux des glandes salivaires

Avant d'être sécrétée dans la cavité orale, la salive passe par une série de 4 canaux (Fig. 16). Le premier est le canal intercalaire, qui contient des cellules non différenciées de type épithélial cubique simple. Il connecte les unités sécrétrices au canal strié. La modification de la salive primaire par échange d'ions a essentiellement lieu dans ce deuxième canal (Tandler et Phillips, 1998). Les cellules du canal strié sont de type épithélial cylindrique stratifié et contiennent de nombreuses mitochondries, qui produisent l'énergie nécessaire au transport ionique (Tandler, 1993 ; Riva et al., 1993). Une fois modifiée, la salive passe par le canal interlobulaire (Tandler and Phillips, 1998). Enfin, les canaux interlobulaires convergent pour former le canal collecteur, lequel va excréter la salive dans la cavité orale.

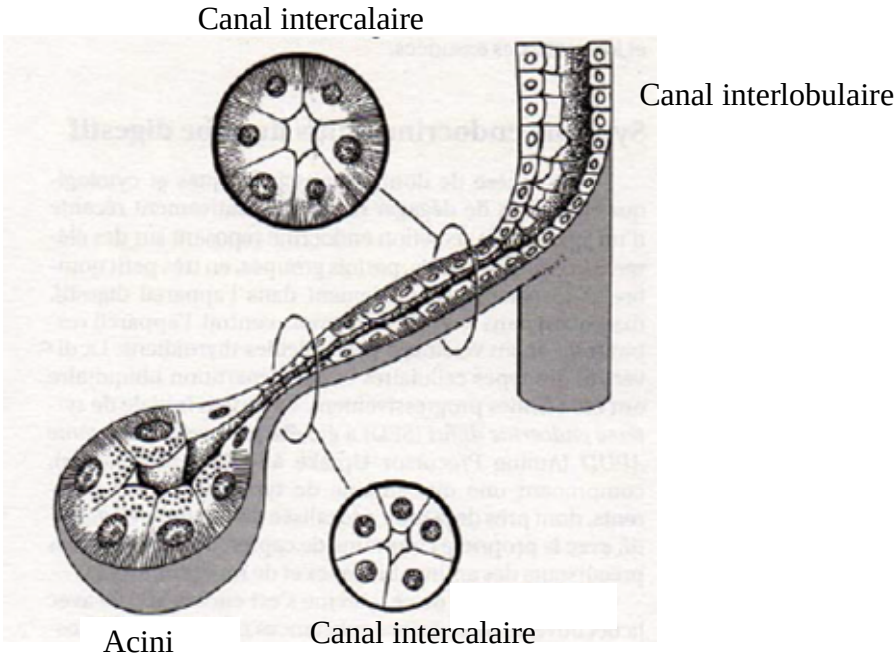


Figure 16 : Les différents canaux des glandes salivaires (D'après Franck Pellestor, matériel d'enseignement à l'Université de Montpellier/Faculté de Medecine).

I.4.2 Développement des glandes salivaires

Le développement des glandes salivaires commence entre la sixième et la huitième semaine embryonnaire et consiste en 3 phases principales (Holsinger et Bui, 2007). Durant la première phase, les structures primitives se mettent en place avec la formation d'un réseau de bourgeons ductaux. Les cellules épithéliales entourent le lumen tandis que les cellules myoépitheliales recouvrent les surfaces externes. Lors de la deuxième phase, les canaux ductaux et lobulaires commencent à se former. Les acini primitifs et les régions ductales distales se forment durant la septième semaine embryonnaire. La troisième phase est marquée par la maturation des acini et des canaux intercalés et par la diminution du tissu conjonctif interstitiel. La première glande à se former est la parotide primitive autour de la sixième semaine embryonnaire (Holsinger et Bui, 2007). Elle est suivie par la glande sous-maxillaire, puis par la glande sublinguale la neuvième semaine embryonnaire. L'ectoderme respiratoire supérieur donne lieu à des unités acinotubulaires qui, durant la douzième semaine, se développent en glandes salivaires mineures.

I.4.3 Glandes salivaires majeures et mineures

I.4.3.1 La glande parotide

Parmi les 3 glandes majeures, la glande parotide est la plus volumineuse. Elle est située en dessous et en avant du pavillon de l'oreille (Fig. 17) (Stevens et Lowe, 1997). La glande parotide est composée uniquement de cellules acinaires séreuses groupées en lobules. Elle contient également un nombre important de canaux intercalaires et une quantité moins importante de canaux striés. Ses canaux interlobulaires convergent pour former le canal de Stenon, par lequel une salive fluide riche en protéines est secrétée dans la bouche (Pedersen, 2007). La glande parotide contribue à 26% de la salive totale au repos (Young et Schneyer, 1981). Les données de la littérature sur la contribution de la glande parotide après stimulation diffèrent entre elles. Une contribution de 34% de la salive totale a été rapportée par Young et Schneyer (1981) alors qu'Aps et Martens (2005) mentionnent une contribution de 58% de la salive totale.

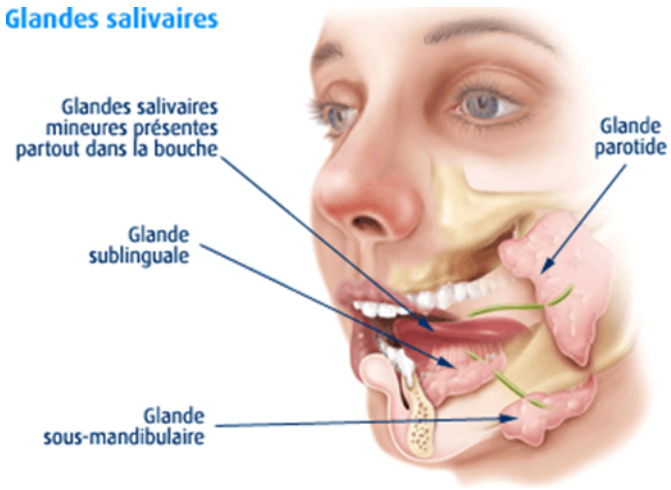


Figure 17 : Localisation anatomique des glandes salivaires majeures (parotides, sublinguales, sous-maxillaires) et mineures (D'après Amerongen et Veerman, 2002)

I.4.3.2 La glande sous maxillaire

Comme son nom l'indique, elle est située sous la mandibule (Fig. 17) (Stevens et Lowe, 1997). Elle est considérée comme une glande mixte, contenant majoritairement des cellules acinaires séreuses mais aussi des cellules muqueuses (Stevens et Lowe, 1997). Elle possède des canaux intercalaires et un nombre plus important de canaux striés, qui ultimement vont déboucher dans le canal de Wharton. La glande sous maxillaire secrète une salive riche en protéine et en mucine (Stevens et Lowe, 1997). Au repos, elle contribue à 69% de la salive totale produite par les glandes majeures. Après stimulation, Young et Schneyer (1981) ont rapporté une contribution de 63% de la salive totale par alors qu'Aps et Martens (2005) mentionnent une contribution de 33% de la salive totale.

I.4.3.3 La glande sublinguale

La glande sublinguale est, quant à elle, située sur le plancher buccal, de part et d'autre du frein de la langue (Fig. 17) (Stevens et Lowe, 1997). Elle contient essentiellement des cellules acinaires muqueuses mais également des cellules seromuqueuses (Denny et al., 2008). Elle ne possède pas de canaux intercalaires mais contient des canaux striés débouchant ultimement sur les canaux de Rivinus ou de Walther . La glande sublinguale contribue à 5% de la salive au repos et à environ 2% de la salive stimulée (Young et Schneyer, 1981; Aps et Martens, 2005).

I.4.3.4 Les glandes mineures

Les glandes mineures, estimées à entre 600 et 1000, sont situées dans les régions buccale, labiale, palatale et linguale de la cavité orale (Eliasson et Carlen, 2010). Leur type cellulaire varie selon la glande. Les glandes labiales, par exemple, sont des glandes mixtes à prédominance muqueuse alors que les glandes linguales contiennent des cellules séreuses et des cellules muqueuses. Elles possèdent des canaux striés débouchant sur des petits canaux, mais certaines glandes, telles que les glandes labiales et linguales, ne possèdent pas de canaux

intercalaires. Leur sécrétion représente environ 8% de la salive totale et repos et après stimulation (Eliasson et Carlen, 2010).

I.4.4 Pathologies des glandes salivaires

Les glandes salivaires sont sujettes à diverses pathologies parmi lesquelles le « burning mouth syndrome » et le syndrome de Sjögren, susceptibles de donner lieu à des symptômes tels que la xérostomie. La xérostomie est une sensation de sécheresse buccale. Elle est généralement associée à une diminution de la production de la salive ou à un changement dans sa composition chimique. Elle peut être causée par des dysfonctionnements des glandes salivaires, mais aussi par la prise de médicaments ou par des fortes doses de radiothérapie (Cassolato et Turnbull, 2003).

I.4.4.1 Burning mouth syndrome

Le «burning mouth syndrome» est une maladie causant des douleurs intraorales, généralement associées à des lésions des muqueuses ou à d'autres symptômes tels que la xérostomie ou encore des problèmes de perception gustative (Grushka et Epstein, 1997). La plupart du temps, il se manifeste de manière spontanée et affecte différentes parties de la cavité buccale, incluant le plus souvent les 2/3 de la partie antérieure de la langue, la partie antérieure du palais, et les muqueuses de la lèvre inférieure (Grushka et Epstein, 1997).

I.4.4.2 Syndrome de Sjögren

Le syndrome de Sjögren est une maladie auto-immune systémique qui affecte les glandes exocrines, y compris les glandes salivaires. Il se caractérise par une infiltration lymphocytique des glandes, une perte et une atrophie des cellules acinaires et une hyperplasie des cellules ductales (Poduval et al., 2009) entrainant des dysfonctionnements sévères tels que la xérostomie et la xérophtalmie, sécheresse des yeux (Li et al., 2004). Le syndrome de Sjögren peut se manifester seul -syndrome de Sjögren primaire- ou associé à d'autres maladies touchant les tissues conjonctifs -syndrome de Sjögren secondaire (Tobon et al., 2010).

I.5 ETUDES *IN VITRO* DES GLANDES SALIVAIRES

I.5.1 Intérêt des approches in *vitro*

Le terme *in vitro* englobe l'utilisation d'organes, de coupes d'organes, de cultures de cellules, de cellules isolées et d'organites cellulaires (Adolphe, 1995). L'emploi de méthodes *in vitro* dites alternatives permet notamment de limiter le recours à l'expérimentation animale, ce qui présente un intérêt éthique.

La culture cellulaire quant à elle est définie comme le maintien en dehors de l'organisme de cellules capables de se diviser et d'exprimer *in vitro* métabolismes et fonctions spécifiques (Schaeffer, 1979). Elle permet le maintien *in vitro* de cellules possédant tout ou partie des caractéristiques qu'elles manifestent *in vivo* et peuvent aboutir à une véritable organisation tissulaire (Adolphe, 1995).

I.5.2 Culture *in vitro* des glandes salivaires

I.5.2.1 La culture primaire

La culture primaire de glandes salivaires humaines nécessite l'isolement de cellules à partir d'un tissu de glandes salivaires extrait chez un patient (Chan et al., 2011). Une fois isolées, les cellules sont mises en culture dans un milieu sans sérum contenant des facteurs de croissance, ainsi que de l'insuline ou de l'extrait pituitaire bovin (Hiraki et al., 2002, Chan et al., 2011).

Les cellules primaires présentent l'avantage de dériver directement de l'organisme. Elles n'ont donc pas subi de modifications génétiques et sont morphologiquement et fonctionnellement très proches des cellules *in vivo* (Guillouzo, 1998). Cependant, la difficulté des prélèvements tissulaires, le maintien d'un environnement proche de la situation *in vivo*, ou encore leur courte durée de vie présentent un réel challenge pour des études sur le long terme.

I.5.2.2 Les lignées cellulaires

Les lignées cellulaires de glandes salivaires humaines sont des populations homogènes de cellules stables et immortalisées. Ce sont généralement soit des cellules cancéreuses prélevées chez un patient, soit des cellules rendues immortelles par une transfection avec l'antigène T du virus simien 40 (SV40) (Azuma et al., 1993). Du fait de leur modification génétique, elles ne sont pas fonctionnellement identiques aux cellules *in vivo* saines. Cependant, la conservation de plusieurs caractéristiques, la possibilité de travailler en milieu contrôlé, et leur durée de vie illimitée permet la réalisation d'un certain nombre d'études qui ne serait pas possible *in vivo* ou sur cellules primaires. Il existe plusieurs lignées cellulaires de glandes salivaires humaines (Tableau 2). Elles peuvent différer par leur glande d'origine, c'est le cas des lignées HMS-1, et HSG, provenant, respectivement des glandes parotides et sous-maxillaires. Elles peuvent aussi différer par leur phénotype, c'est le cas des lignées HSG avec un phénotype de cellules ductales et HSG traitées au sodium butyrate avec un phénotype de cellules myoépithéliales. La composition du milieu de culture va être différente selon la lignée cellulaire utilisée. Par exemple, la lignée humaine de glandes sous-maxillaires (HSG) est généralement cultivée dans un milieu essentiel minimum (MEM ou DMEM) contenant 10 % de sérum de veau fétal (SVF) alors que la lignée humaine myoépithéliale 1 (HMS-1) est cultivée dans un milieu pour kératinocytes sans sérum contenant des facteurs de croissance et de l'extrait pituitaire bovin (Shao et al., 1998, Hattori et al., 2007).

Tableau 2 : Les différentes lignées cellulaires de glandes salivaires (D'après le Salivary Gland Development Database).

Lignée cellulaire	Source	Description	Propriétaire de la lignée
A253	Adénocarcinome de l'épiderme de la glande sous-maxillaire humaine	Lignée cellulaire néoplasique de glande salivaire	Giard, DJ. 1973 ATCC
HMS-1	Adénocarcinome des cellules basales de la glande parotide humaine	Lignée cellulaire myoépithéliale	Sternlicht, MD. 1996 Université de Californie, LA, USA
HPAM 1 HPAF 1	Glande parotide normale	Lignées cellulaires de cellules épithéliales diploïdes normales et non transformées.	Chopra, DP. 1995
HSG	Glande submandibulaire humaine irradiée, histologiquement normale.	Cellules ductales intercalées (néoplasique)	Shirasuna, K. 1981 Université de Tokushima, Japon
HSG (traitées)	Lignée cellulaire HSG brièvement traitée avec du sodium butyrate	Différenciation irréversible en cellules myoépithéliales	Azuma, M. 1986
HSG (traitées)	Lignée cellulaire HSG brièvement traitée avec 5-azacytidine	Différenciation irréversible en cellules acinaires et myoépithéliales	Sato, M. 1987
HSG (traitées)	Lignée cellulaire HSG cultivée en présence d'acide rétinoïque	Changement phénotypique réversible en cellules squameuses kératinisées	Azuma, M. 1988
HSG (traitées)	Cellules HSG acinaires induit cultivées en présence de dyhydroxyvitamin-D3	Changement phénotypique réversible en chondrocytes	Azuma, M. 1989
NS-SV-AC	Glande salivaire humaine normale immortalisée par SV40	Cellules acinaires	Azuma, M. 1993 Université de Tokushima, Japon
NS-SV-DC	Glande salivaire humaine normale immortalisée par SV40	Cellules ductales à forte activité protéolytique	Azuma, M. 1993 Université de Tokushima, Japon
NS-SV-MC	Glande salivaire humaine normale immortalisée par SV40	Cellules myoépithéliales	Azuma, M. 1993 Université de Tokushima, Japon
NS-SV-SC	Glande salivaire humaine normale immortalisée par SV40	Cellules squameuses	Azuma, M. 1993 Université de Tokushima, Japon
PA 16 :23	Adénome pléomorphique de la glande parotide humaine	Cellules myoépithéliales secrétant IL6	Gallo, O. 1992 Université de Florence, Italie
SGT-1	Glande submandibulaire humaine, adénome très peu différenciée	Adénocarcinome de glandes salivaires	Lee, CC, Université de Dangkok, Seoul, Corée du Sud

I.5.3 La lignée cellulaire HSG

I.5.3.1 Présentation de la lignée

Les cellules de la lignée humaine de glande sous-maxillaire (HSG) sont des cellules épithéliales extraites de la glande sous-maxillaire irradiée d'un patient japonais atteint d'un carcinome épidermoïde du plancher de la bouche (Shirasuna et al., 1981). Elles présentent une structure similaire à celles des cellules ductales des glandes salivaires et peuvent se différencier en cellules myoépithéliales ou en cellules acinaires (Sato et al., 1987). Les cellules HSG non différenciées se cultivent dans un milieu essentiel minimum d'Eagle (MEM) contenant 10% de sérum de veau fétal (SVF), 1% de L- glutamine, et 1% d'acides aminés non essentiels. Elles sont incubées à 37°C en présence de 5% de CO_2. Elles forment une monocouche de cellules polygonales et adhérentes qui prolifèrent jusqu'à confluence (Fig. 18).

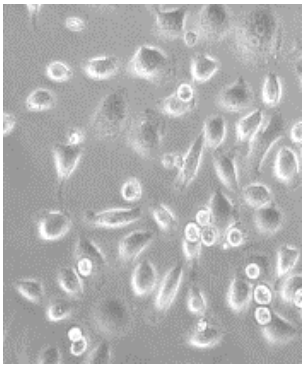


Figure 18 : Cellules HSG non différenciées, 24h après ensemencement : formation d'une monocouche de cellules épithéliales et adhérentes (Maria et al., 2011).

I.5.3.2 La différenciation en acini

Comme mentionné précédemment (**I.3.1** Définition et formation de la salive), les acini sont responsables de la sécrétion des protéines et du transport de l'eau et des électrolytes en vue de la formation de la salive. La différenciation des cellules HSG en acini suscite alors un

grand intérêt pour son éventuelle capacité à remplacer des cellules acinaires endommagées (Baum et Tran, 2006, Szlávik et al., 2008). Principalement trois marqueurs de différenciation ont été étudiés, la vimentine (Lam et al., 2005) qui est une protéine de structure, l'amylase (Zheng et al., 1998; Lam et al., 2005, Vag et al., 2007; Maria et al., 2011) qui est une enzyme impliquée dans la digestion de l'amidon, et la cystatine (Hoffman, 1996; Lam et al., 2005) qui est un inhibiteur de protéase. Etudiée d'un point de vue morphologique et fonctionnel, la différentiation des cellules HSG en acini est dépendante de divers facteurs que sont le milieu de culture, la matrice utilisée, la densité cellulaire et le temps de culture.

Le milieu de culture

L'addition de 5-azactideine au milieu de culture induit la différenciation en type cellulaire myoépithélial et acinaire (Sato et al., 1987). Les cellules HSG résultantes ont été étudiées par électrophorèse différentielle DIGE (Kasamatsu et al., 2006). Des protéines de structure (beta-actine, L-plastine, lamine A/C) étaient sous-exprimées dans les cellules différenciées comparées aux cellules non différenciées. Les cellules différenciées en phénotype myoépithélial se caractérisaient par une abondance de chaine légère 2 de myosine ou de créatine kinase alors que les cellules acinaires sur-exprimaient la protéine associée aux microtubules 6 (MAP6), régulatrice de la calmoduline, et l'Annexine 3.

La matrice de culture

Plusieurs constituants de la matrice extracellulaire (la laminine, la fibronectine, le collagène I) ou des matrices complexes (gélatine, Matrigel) ont été utilisées dans le but de différencier les cellules HSG en acini. Le Matrigel est un extrait soluble de membrane basale dérivé d'une tumeur murine du cartilage et qui forme un gel à 37°C (Kleinman et Martin, 2005).

La différenciation morphologique et fonctionnelle des cellules HSG dépend de la matrice utilisée. En effet, la formation de larges structures multicellulaires ressemblant à des structures salivaires ductales a été montrée en cultivant les cellules HSG sur Matrigel pendant 3 à 5 jours alors que des monocouches de cellules rondes et réfringentes ont été observées en cultivant les cellules HSG sur du collagène I (Lam et al., 2005). Dans cette même étude, la surexpression des gènes codant pour la vimentine, la cystatine SN et l'amylase dans les

cellules HSG différenciées sur Matrigel ou collagène I comparé aux cellules HSG différenciées sur gélatine ou fibronectine a également été observée.

Dans le cas où le Matrigel est utilisé, la différenciation des cellules HSG en acini est aussi dépendante de sa concentration protéique et de sa réduction ou non en facteurs de croissance. En effet, les observations morphologiques ont montré la formation de structures acinotubulaires tridimensionnelles complexes contenant 50 à 100 cellules en présence de GFR (Growth Factor Reduced) Matrigel à une concentration protéique de 12,8 mg/ml alors qu'à plus forte concentration protéique (17,5 mg/ml), un réseau réticulaire a été observé (Vag et al., 2007) (Fig. 19 A et B). De plus, la culture sur Matrigel non réduit en facteurs de croissance et contenant 16,4 mg/ml ou 20mg/ml de protéines a entrainé l'organisation des cellules en 2 structures distinctes, d'une part en un réseau réticulaire diffus, et d'autre part en amas cellulaires (Vag et al., 2007) (Fig. 19 C). La dilution du Matrigel réduit ou non en facteurs de croissance à 6 mg/ml a donné lieu à la formation de structures acinaires (Vag et al., 2007) (Fig. 19 D) de même que pour une concentration de GFR-Matrigel de 8,5 mg/ml (Szlávik et al., 2008).

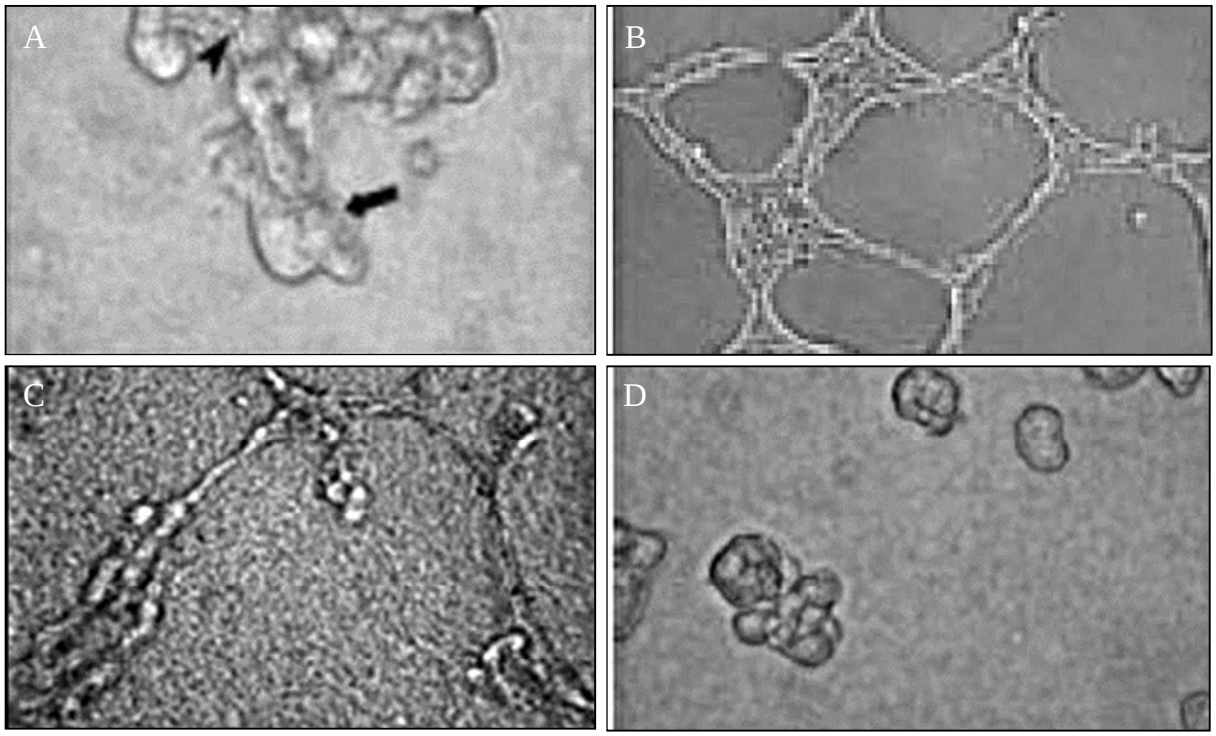


Figure 19 : Cellules HSG différenciées sur Matrigel, 24h après ensemencement. Structures acinotubulaires (A). Réseau réticulaire (B). Réseau réticulaire et amas cellulaires (C). Structures acinaires (D). (D'après Vag et al., 2007)

Du point de vue fonctionnel, à forte concentration de GFR Matrigel (17,5 mg/ml) ou de Matrigel non réduit en facteurs de croissance (16,4 mg/ml) les cellules HSG différenciées exprimaient 3 à 4 fois plus d'amylase que les cellules non différenciées (Vag et al., 2007). De plus, une sous-expression du gène codant pour l'amylase accompagnée d'une surexpression de la protéine été observée dans des cellules différenciées sur du Matrigel dilué à 2 mg/ml (Maria et al., 2011). Aucune différence significative dans l'expression de l'amylase n'a été observée entre les cellules cultivées sur Matrigel non réduit en facteurs de croissance à 20 mg/ml ou sur GFR Matrigel à 12,8 mg/ml et les cellules non différenciées (Vag et al., 2007). Enfin, cultivées sur un mélange collagène/ GFR-Matrigel, une sur-expression de ARNm d'amylase a été observée (Joraku et al., 2007).

Densité cellulaire et temps de culture

La différenciation dépend également de de la densité cellulaire à l'ensemencement. Par exemple, quand les cellules sont ensemencées respectivement à 3×10^4 cellules/cm^2 et $2,5 \times 10^4$ cellules/cm^2, (Vag et al., 2007, Szlávik et al., 2008), des structures acinaires isolées sont

observées rapidement. En revanche, Zheng et al., (1998) ont montré que des cellules HSG ensemencées à 6,2 × 10^4 cellules/cm^2 formaient d'abord un réseau réticulaire dans les premières 24h après l'ensemencement, puis s'organisaient en structures acinaires.

Enfin, le temps de culture joue aussi un rôle sur le maintien de la différenciation des cellules en acini. En effet, l'étude de Szlávik et al., (2008) a montré qu'une fois les acini formés, les cellules maintiennent cette structure (Fig. 20 A et B) jusqu'au jour 6 après quoi les acini se désintègrent et la cellule apparaît rétrécie (Szlávik et al., 2008).

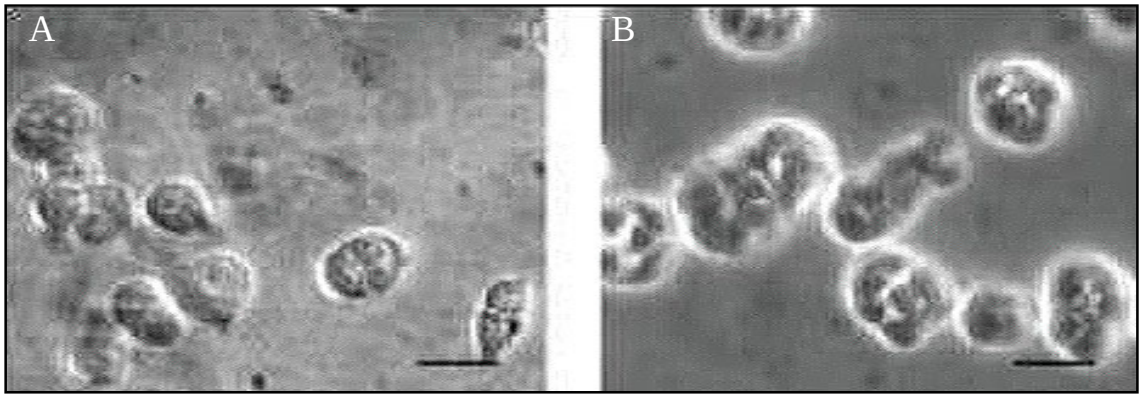


Figure 20 : Cellules HSG différenciées sur Matrigel 2 jours (A) et 4 jours (B) après ensemencement (D'après Szlávik et al., 2008).

I.5.3.3 Les études menées sur la lignée HSG

Plusieurs études visant à mieux comprendre les mécanismes physiologiques et pathologiques qui ont lieu dans les glandes salivaires ont été menées sur les cellules HSG. Les mécanismes physiologiques investigués sont par exemple l'activation des récepteurs muscariniques (Kim et al., 2009), la régulation du calcium intracellulaire $[Ca^{2+}]_i$ (Kurihara et al., 1997; Poronnik et al., 1998; Singh et al., 2000), la translocation de l'aquaporine 5 impliquée dans la sécrétion de la salive (Kim et al., 2009), le maintien du pH intracellulaire (Atsumi et al., 1996; Oehlke et al., 2011) ou encore l'identification des kinases responsables de la phosphorylation de la PRP1 (Drzymala et al., 2000). La lignée cellulaire HSG a aussi été utilisée comme modèle *in vitro* dans les études liées au dysfonctionnement des glandes salivaires, tels que le syndrome de Sjögren (Ohlsson et al., 2002; Li et al., 2004; Huang et al., 2005; Tsuboi et al., 2010) et la xérostomie liée au traitement par irradiation des cancers de la tête et du cou (Lillibridge et O'Connell., 1997; O'Connell et al., 1998).

Le tableau 3 fournit des exemples de protéines spécifiquement étudiées dans les cellules HSG ainsi que leur fonction.

Tableau 3 : Liste non exhaustive des protéines étudiées spécifiquement dans les cellules HSG

Protéines	Fonction (référence)
Ro52	Autoantigène impliqué dans le syndrôme de Sjögren (Ohlsson et al., 2002)
Protéines riches en Proline 1 (PRP1)	Protéines phosphorylées jouent un rôle dans la concentrtion du calcium dans la salive (Drzymala et al., 2000)
E2F1	Facteur de transcription impliqué dans la croissance cellulaire (O'Connell et al., 1998)
Récepteurs muscariniques (M3R)	Voies de signalisation du calcium (Kim et al., 2009)
Récepteurs histaminiques	Voies de signalisation du calcium (Kim et al., 2009)
Purinocepteurs (P_2X, P_2Y)	Voies de signalisation du calcium (Worthington et al., 1999)
Récepteur de potentiel transitoire 1 (TRP1)	Voies de signalisation du calcium (Liu et al., 2000)
Protéine G	Voies de signalisation du calcium (Poronnik et al., 1998)
V-ATPase	Maintien du pH intracellulaire (Oehlke et al., 2010)
Aquaporine 5 (AQP5)	Transport de molécules d'eau (Kim et al., 2009)
Caspases	Protéase impliquée dans l'apoptose (Kulkarni et al., 2006)

CHAPITRE II:

LIENS ENTRE COMPOSITION SALIVAIRE ET SENSIBILITE A L'AMERTUME DE LA CAFEINE - ETUDE *in vivo*

INTRODUCTION

Dans le contexte évoqué dans le chapitre I (état de l'art) où la salive joue un rôle dans la sensibilité gustative et où la fraction organique de la salive est en très grande majorité protéique, l'objectif de cette première partie de la thèse était d'étudier le lien existant entre le protéome salivaire propre à un individu et sa sensibilité à l'amertume. La première étape de ce travail a été de faire des choix pertinents de modèles (molécule, sujets). La caféine a été choisie afin de travailler avec une molécule amère très présente dans l'alimentation (Heckman et al., 2010 ; Butt et Sultan, 2011) et déjà bien étudiée d'un point de vue sensoriel (ex Hansen et al., 2006 ; Keast et Roper, 2007). Cette molécule présente également l'intérêt d'activer au moins cinq récepteurs du goût amer (Meyerhof et al., 2010). Ceci réduit le risque de sélectionner les sujets sur un critère biologique directement lié au polymorphisme d'un récepteur hTASR2, ce qui ne serait pas pertinent pour étudier le rôle d'évènements péri-récepteurs. Enfin, d'un point de vue pratique, il est possible de se procurer de la caféine de qualité alimentaire.

En ce qui concerne les sujets, nous avons choisi de nous limiter à des hommes de 25 à 45 ans, sans pathologie orale déclarée, ne prenant pas de traitement médicamenteux et non-fumeurs. L'effet perturbateur des pathologies orales et des traitements médicamenteux sur la perception de l'amertume a été évoquée dans le chapitre I. La gamme d'âge a été choisie afin de s'affranchir d'éventuelles variations dues au vieillissement. Par exemple, Hyde et Feller (1981) ont observé que les jeunes adultes détectent plus facilement des faibles concentrations de caféine comparé aux personnes âgées. Les fumeurs ont été exclus d'une part parce que la perception de l'amertume est significativement réduite chez les fumeurs comparée aux non-fumeurs (Krut et al., 1961) et d'autre part parce que le fait de fumer entraine d'importantes modifications du protéome salivaire (Jessie et al., 2010) Enfin, le choix de se limiter aux hommes permet de s'affranchir des variations hormonales menstruelles pouvant modifier la sensibilité gustative (Bartoshuk et al., 1997).

Ainsi, la démarche générale de cette étude *in vivo* a été de mesurer le seuil de détection de la caféine chez une trentaine de sujets grâce à la méthode de référence ISO 13301:2002. Trente-trois sujets ont complété l'étude mais les données sensorielles étaient incohérentes et inexploitables pour 4 sujets. Ainsi les seuils de détection ont été déterminés chez 29 sujets.

Par ailleurs, la salive au repos de ces mêmes sujets a été prélevée au début des 4 séances. Les salives ont été analysées par électrophorèse mono et bidimensionnelle. Le but était d'évaluer la corrélation entre les seuils de détection de la caféine et la composition protéique de la salive et d'identifier les protéines impliquées.

II.1 TRAVAUX NON PRÉSENTÉS SOUS FORME D'ARTICLE

II.1.1 Matériels & Méthodes

II.1.1.1 Consommation de boissons contenant de la caféine

Les sujets participant à l'étude se sont vus remettre un formulaire sur la consommation de boissons contenant de la caféine, ainsi qu'un formulaire de relevé de consommation alimentaire sur une semaine. Pour chaque boisson (café, thé, sodas au cola, chocolat), les sujets devaient indiquer s'ils en consommaient et à quelle fréquence 1 fois/jour ou plus, 1 à 6 fois/semaine, 1 à 5 fois/mois, ou plus rarement ou jamais.

Dans ce même formulaire était incluse une question sur la consommation d'une boisson amère ne contenant pas de caféine, la bière.

II.1.1.2 Analyse monodimensionnelle et identification des bandes protéiques

Les échantillons de salive prélevés chez les 29 sujets ont été soumis à une électrophorèse monodimensionnelle. Pour chaque sujet, 3 aliquots de 1 ml, collectés lors de 3 sessions différentes, ont été poolés. Afin de concentrer les protéines, la salive a été ultrafiltrée à 15000 g pendant 30 minutes à 10°C sur membrane (Vivaspin, Sartorius) avec un cutoff de 5 kDa. Un dosage protéique a été effectué par la méthode de Bradford. Les protéines ont ensuite été reprises dans du tampon de Laemmli et séparées sur gels SDS polyacrylamide à 12%, d'environ 20 cm de hauteur. La charge protéique a été ajustée à 20µg par puits. La migration des protéines a été effectuée à 40 V et 15 mA par gel pendant 30 minutes, puis 300 V pendant 8 heures à l'aide du Protean II Multicell (Bio-Rad). Les gels ont ensuite été colorés au bleu de Coomassie selon le protocole décrit par Candiano et al. (2004). L'acquisition et l'analyse

d'images ont été réalisées à l'aide du densitomètre GS-800 (Bio-Rad) et du logiciel Quantity One, respectivement. Des quantités relatives (exprimées en pourcentage de la totalité des bandes retenues) ont été calculées pour chaque bande.

Les protéines contenues dans les bandes ont été identifiées par spectrométrie de masse MALDI en modes MS et MS/MS, suivant la même méthode que celle détaillée dans l'article 1.

II.1.1.3 Statistiques

L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du logiciel Statistica. La corrélation entre les seuils de détection et les quantités relatives de bandes a été évaluée par le test de corrélation non-paramétrique de Spearman. Le niveau de significativité a été fixé à 5%.

II.1.2 Résultats

II.1.2.1 Consommation de boissons contenant de la caféine

Le tableau 4 synthétise les résultats relatifs à la consommation de boissons contenant de la caféine chez les 12 sujets (6 hypersensibles, 6 hyposensibles).

Tableau 4 : Consommation de boissons contenant de la caféine chez les 6 sujets hypersensibles (S+) et 6 sujets hyposensibles (S-). Les consommations journalières de café extraites du relevé de consommation alimentaire hebdomadaire sont indiquées entre parenthèses. NC : non-communiquée

.

N° de Sujet (classés par ordre de sensibilité)		1 fois/ jour ou +	1 à 6 fois/ semaine	Moins fréquemment ou jamais
S+	18	Thé, Chocolat	Cola	Café
	32	Thé	Cola	Café, Chocolat
	50	Café (1 tasse)		
	16	Café (NC), Thé		Cola, Chocolat
	40	Café (NC), Thé,	Cola	Chocolat
	33	Café (NC)	Thé	Cola, Chocolat
S-	21	Café (NC), Thé, Cola		Chocolat
	22	Café (1 bol)	Chocolat	Thé, Cola
	47	Café (1 bol)	Thé, Chocolat	Cola
	15	Café (NC)	Cola	Thé, Chocolat
	49	NC	NC	NC
	9	Café (1 bol + 4 à 5 tasses)	Cola	Thé, Chocolat

Ces données doivent être considérées avec précautions puisqu'elles sont incomplètes. Toutefois, elles mettent en évidence que 4 sujets hypersensibles consomment régulièrement (au moins une fois par jour) du thé contre un seul dans le groupe des hyposensibles. En revanche, tous les sujets hyposensibles pour lesquels nous disposons d'informations sont consommateurs réguliers (au moins une fois par jour) de café. Le sujet le moins sensible à l'amertume de la caféine (sujet 9) est d'ailleurs un fort consommateur. Chez les hypersensibles, 4 sont consommateurs réguliers de café mais deux sont consommateurs très occasionnels (moins d'une fois par semaine) ou non-consommateurs.

Par ailleurs, bien qu'il ne s'agisse pas d'une boisson contenant de la caféine, il faut noter que les quatre sujets les moins sensibles à l'amertume consomment au moins une fois par semaine de la bière (une boisson généralement amère) alors que tous les hypersensibles sont consommateurs occasionnels (moins d'une fois par semaine) ou non-consommateurs.

II.1.2.2 Profils salivaires obtenus par électrophorèse mono-dimensionnelle

Au total, 27 bandes avec un poids moléculaire variant entre 10 et 45,9 kDa ont été détectées et retenues pour analyse (Fig. 21). Vingt-six de ces bandes ont été identifiées avec succès par spectrométrie de masse (Tableau 5). Toutes les protéines identifiées sont des protéines précédemment identifiées dans la salive (Denny et al., 2008) ou répertoriées dans la base de données UniProt (http://www.uniprot.org) comme abondamment exprimées dans les glandes salivaires et/ou la salive. La plupart sont d'origine glandulaire mais certaines sont issues du sang (hémoglobine) et pourraient avoir rejoint la cavité orale par le fluide créviculaire ou par des saignements en bouche. Certaines protéines étaient identifiées dans des bandes à des poids moléculaires apparents différents. C'est le cas par exemple de l'alpha-amylase 1 présente dans 6 bandes allant de 29,4 à 45,7 kDa ou de l'anhydrase carbonique VI présente dans 5 bandes allant de 30.8 à 38.3 kDa.

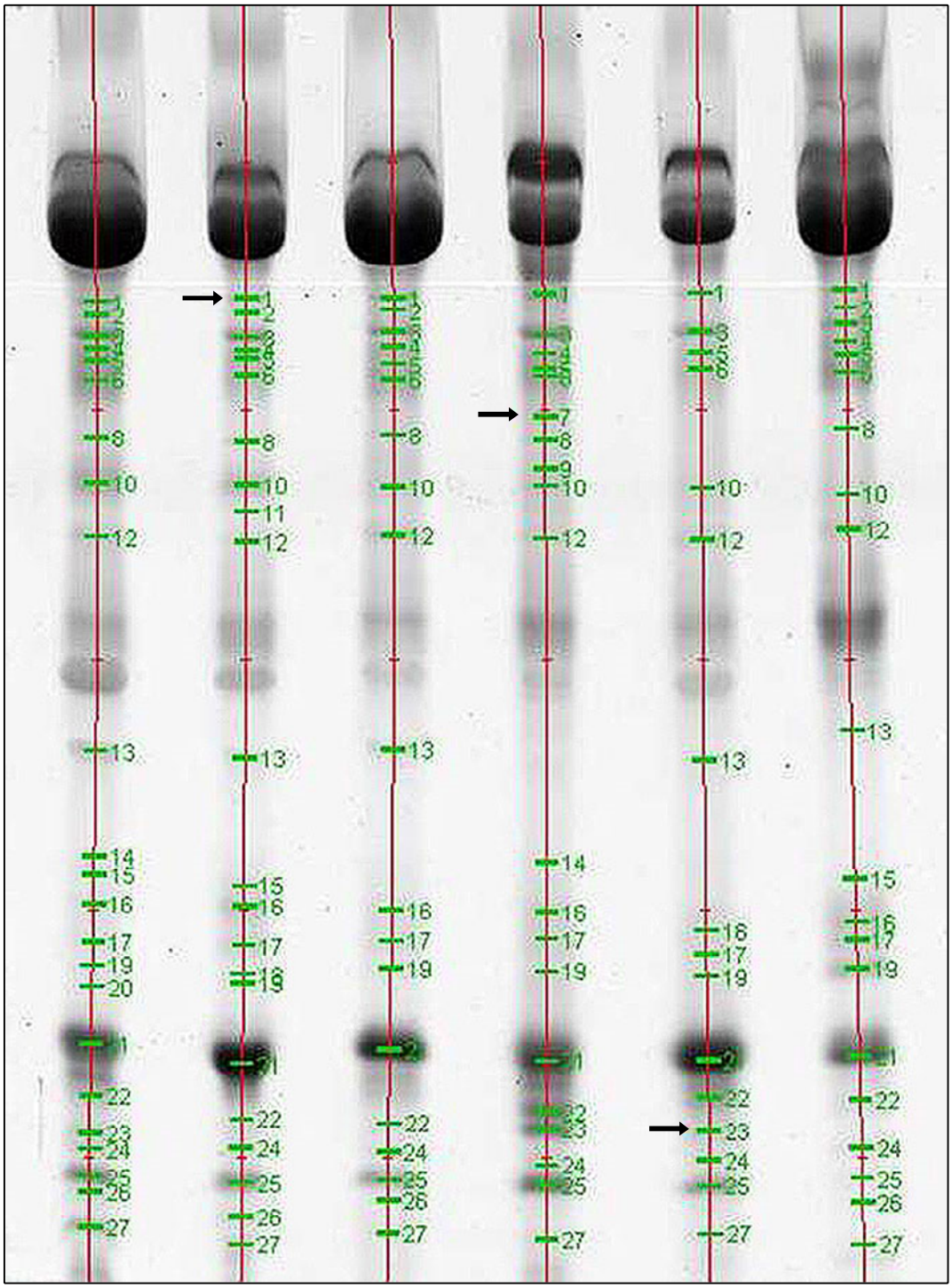


Figure 21 : Profil électrophorétique de salive, indiquant la position des 27 bandes détectées et retenues dans l'analyse. Trois bandes (1, 7, et 23) inversement corrélées aux seuils de détection de la caféine, sont indiquées par des flèches.

Trois bandes parmi ces 27 (bande 1, 7, et 23) étaient significativement ($p<0,05$) et négativement corrélées au seuil de détection, c'est-à-dire qu'elles étaient plus abondantes chez les plus sensibles à la caféine. La bande 1 (r=-0,37) contenait de l'alpha amylase et de l'alpha enolase (Tableau 5). Les protéines identifiées dans la bande 7 (r=-0.37) étaient l'anhydrase carbonique VI (CAVI), et une protéine non caractérisée UPF0762 C6orf58. La bande 23 (r=-0.40) correspondait à la sous-unité alpha de l'hémoglobine.

Tableau 5 : Identification des protéines contenues dans les bandes d'électrophorèse par spectrométrie de masse. Les protéines portées au tableau sont soit significativement identifiées en mode MS soit identifiées de façon non-significative en mode MS mais confirmées de façon significative en mode MS/MS.

Numéro de bande	PM (kDa)	Identifications			
1	**45,9**	alpha-amylase 1	alpha-enolase		
2	**44,3**	alpha –amylase 1	cystatin-SN		
3	**42,5**	cytoplasmic actin 1			
4	**40,9**	alpha-amylase 1	zinc-alpha-2 glycoprotein	UPF0762 protein C6orf58	
5	**39,5**	zinc-alpha-2 glycoprotein	alpha –amylase 1	leukocyte elastase inhibitor	
6	**38,3**	carbonic anhydrase 6	alpha -amylase 2B		
7	**35,6**	carbonic anhydrase 6	UPF0762 protein C6orf58		
8	**34,5**	alpha-amylase 1	carbonic anhydrase 6	UPF0762 protein C6orf58	
9	**33,5**	Parotid Secretory Protein			
10	**32,1**	zinc-alpha-2 glycoprotéin	carbonic anhydrase 6		
11	**30,8**	alpha -amylase 2B	carbonic anhydrase 6		
12	**29,4**	alpha-amylase 1			
13	**20,7**	zymogen granule protein 16 homolog B			
14	**18**	Neutrophil gelatinase-associated lipocalin			
15	**17,5**	prolactin-inducible protein	zymogen granule protein 16 homolog B		
16	**16,9**	prolactin-inducible protein	Cystatin-SN	zymogen granule protein 16 homolog B	lyzozyme C
17	**16,3**	prolactin-inducible protein	lipocalin-1		
18	**16**		Non identifiée		
19	**15,7**	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	prolactin-inducible protein	lipocalin-1	
20	**15,3**	Cystatin-SN	Cystatin-S		
21	**14,1**	Cystatin-SN			
22	**13**	Hemoglobin subunit beta			
23	**12,4**	Hemoglobin subunit alpha			
24	**11,8**	Protein S100-A8			
25	**11,2**	Protein S100-A8	Cystatin-S		
26	**10,5**	Hemoglobin subunit beta			
27	**10**	Ubiquitin			

II.2 ARTICLE 1 - PRINCIPAUX RÉSULTATS

Le seuil de détection de la caféine chez les 29 sujets étudiés a montré une variabilité interindividuelle. Les seuils mesurables variaient entre 0.38 et 6.04 mM. Ceci a permis de classer les sujets selon leur sensibilité et de sélectionner 6 sujets hypersensibles et 6 sujets hyposensibles. Ceci ne différaient significativement ni par leur flux salivaire au repos ni par leur corpulence (BMI).

L'analyse par électrophorèse bi-dimensionelle de la salive au repos des 6 sujets hypersensibles et 6 sujets hyposensibles à la caféine a permis la détection de 255 spots, dont 26 étaient significativement différents entre hyper- et hyposensibles. L'identification de ces 26 spots a révélé la surexpression de fragments d'alpha amylase, de fragments d'albumine sérique, et de sous-unités alpha de l'immunoglobuline A ainsi que la sous-expression de cystatine SN chez les hypersensibles, comparé aux hyposensibles.

En accord avec la sous-expression de la cystatine SN, la mesure de l'activité protéolytique a montré une tendance à avoir une activité protéolytique plus importante, bien que non significativement, chez les hypersensibles (1425 AU/µg vs 784 AU/µg).

ARTICLE 1

Chem. Senses 37: 87–95, 2012

doi:10.1093/chemse/bjr070
Advance Access publication August 25, 2011

Salivary Protein Profiles and Sensitivity to the Bitter Taste of Caffeine

Micheline Dsamou[1], Olivier Palicki[1], Chantal Septier[1], Claire Chabanet[1], Géraldine Lucchi[2], Patrick Ducoroy[2], Marie-Christine Chagnon[1] and Martine Morzel[1]

[1]Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation, UMR6265 CNRS, UMR1324 INRA, Université de Bourgogne, Agrosup Dijon, 17 rue Sully, F-21000 Dijon, France and [2]CLIPP (Clinical Innovation Proteomic Platform), IFR 100 Santé-STIC, Université de Bourgogne, CHU Dijon, F-21000 Dijon, France

Correspondence to be sent to: Martine Morzel, Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation, 17 rue Sully, F-21000 Dijon, France. e-mail: martine.morzel@dijon.inra.fr

Accepted July 12, 2011

Abstract

The interindividual variation in the sensitivity to bitterness is attributed in part to genetic polymorphism at the taste receptor level, but other factors, such as saliva composition, might be involved. In order to investigate this, 2 groups of subjects (hyposensitive, hypersensitive) were selected from 29 healthy male volunteers based on their detection thresholds for caffeine, and their salivary proteome composition was compared. Abundance of 26 of the 255 spots detected on saliva electrophoretic patterns was significantly different between hypo- and hypersensitive subjects. Saliva of hypersensitive subjects contained higher levels of amylase fragments, immunoglobulins, and serum albumin and/or serum albumin fragments. It also contained lower levels of cystatin SN, an inhibitor of protease. The results suggest that proteolysis occurring within the oral cavity is an important perireceptor factor associated to the sensitivity to the bitter taste of caffeine.

Key words: bitterness, cystatin, proteolysis, proteome, saliva, two-dimensional electrophoresis

Introduction

Since many poisons are bitter, bitterness is believed to be a negative cue preventing mammals from ingesting potentially harmful food constituents (Chandrashekar et al. 2000). Bitterness therefore influences food choices, including in humans. It is, for example, one of the major causes for the rejection of some vegetables (Drewnowski and Gomez-Carneros 2000). The perception of bitter taste varies greatly between individuals, which has raised questions on the mechanisms underlying this variability. Three main issues are addressed in the literature: specific genetic variation (typically sequence variants of taste receptors), generic genetic variation (e.g., density of taste bud), and environmental factors (diet, health, or hormonal status, etc.). The relative proportions of these factors in perceptive variation differ between bitter tastants. For example, the variation in the perceived intensity is highly heritable for 6-n-propyl thiouracyl (PROP) but more modestly heritable for other compounds including caffeine (Hansen et al. 2006). Such results are in agreement with the current knowledge on human bitter taste receptors, named hTAS2Rs. In particular, polymorphism in the gene encoding for hTAS2R38 results in 3 main variants of the receptor, strongly correlated with the individual bitter sensitivities to phenylthiocarbamide and PROP (Kim et al. 2003; Bufe et al. 2005). In contrast, in a study on the molecular receptive ranges of the 25 human TAS2R bitter taste receptors identified to date, it was demonstrated that caffeine has the ability of activating at least 5 TAS2Rs (Meyerhof et al. 2010). Polymorphism on one hTAS2R would therefore affect less caffeine perception than in the case of PROP. Together with the lower heritability of sensitivity to this molecule, this suggests that perireceptor events (e.g., salivary parameters) and environmental factors in the broad sense contribute substantially to the variability in caffeine perception.

Apart from water, proteins are the main constituents of human whole saliva. In whole saliva, proteins are secreted by major and minor salivary glands but originate also from nonglandular sources, such as the gingival crevicular fluid, mucosal secretions, etc. Salivary proteins are involved in diverse functions, including digestion and protection of the oral cavity (Humphrey and Williamson 2001). In addition, some saliva proteins play a role in food sensory perception. For instance, proline-rich proteins and histidine-rich

© The Author 2011. Published by Oxford University Press. All rights reserved.
For permissions, please e-mail: journals.permissions@oup.com

proteins are involved in the sensation of astringency through their binding to polyphenols (Bajec and Pickering 2008), and responses to astringent stimuli are dependent on one subject's saliva protein pattern stability (Dinnella et al. 2009, 2010). Another well-documented example is the central role of carbonic anhydrase VI (CAVI) in taste perception. Thus, a deficiency in CAVI is associated with an overall decreased taste perception (Shatzman and Henkin 1981). More generally, differences in saliva protein patterns have been evidenced in taste-impaired patients compared with healthy subjects (Igarashi et al. 2008). In this context and given the fact that saliva proteome is highly variable between individuals (Quintana et al. 2009), the objective of the present study is to test whether variability in saliva proteome composition is related to variability in sensitivity to the bitterness of caffeine and if so, to formulate mechanistic hypotheses on the link between saliva proteome and taste sensitivity.

Materials and methods

Subjects

Twenty-nine healthy male volunteers, aged 25–45, completed the study consisting of four 1-h sessions. They were nonsmokers and presented no overt sign of oral pathologies, such as gingivitis or dental decay. Their body mass index (BMI) ranged from 19 to 30. Subjects were asked to refrain from drinking or eating during the hour preceding the sessions. The entire procedure, including saliva sampling, was approved by the local ethical committee (Comité de Protection de Personnes Est I Bourgogne). Information about the study was communicated, and written informed consent was obtained from the participants.

Detection threshold determination for caffeine

Food-grade caffeine was purchased from Jerafrance. All solutions were prepared with Evian bottled water. The same water was used as the blank stimulus. Sensory testing took place in a specialized facility comprising of computerized individual booths equipped with the FIZZ software. Detection thresholds were determined following ISO 13301:2002 "General guidance for measuring odor, flavor, and taste detection thresholds by a 3-alternative forced-choice (3-AFC)." Briefly, the method consists in presenting to subjects series of 3 glasses, 2 glasses containing water, and 1 glass containing a solution of caffeine. Subjects have to identify which one is different from the others. At the first session, 10 caffeine concentrations were presented in ascending order, ranging from 0.05 to 8.7 mM in 0.25 log steps. Results of the first session were used to determine a subject's best estimated threshold (BET). In the following 2 sessions, caffeine concentrations were adapted individually: 5 concentrations were presented, namely the BET concentration and 2 higher/2 lower concentrations separated by 0.125 log steps. In total, subjects tested 5 concentrations 6 times. Data were statistically handled as described in ISO 13301:2002 in order to determine individual detection thresholds.

Saliva collection and processing

At rest saliva was collected at the beginning of all 4 sessions. During 5 min and at their own rhythm, subjects spat out the saliva passively accumulating in their mouth into a preweighed ice-chilled vessel. Immediately after collection, samples were weighed, centrifuged at 14 000 × *g* for 20 min at 4 °C, aliquoted, and stored at –80 °C until analysis. This saliva is referred to as "clarified saliva." Salivary flow rate, averaged over the 4 replicates, was expressed in g/min.

Saliva characterization: protein content and proteolytic activity

Protein content was measured in duplicates in clarified saliva using the Bradford method, using bovine serum albumin (BSA) as a standard. Proteolytic activity was measured in duplicates using a commercial kit (Pierce Fluorescent protease assay kit, Thermo Scientific). This kit is based on the detection of fluorescence following proteolytic digestion of fluorescein isothiocyanate–labeled casein (FTC-casein). The protocol was modified as follows: 100 µL of FTC-casein solution, prepared following the manufacturer's instructions, were incubated for 1 h with varying volumes of saliva (0–20 µL), the total volume of the assay being adjusted to 150 µL with Tris-buffered saline. Fluorescence emitted was plotted versus the volume of added saliva. The proteolytic activity was defined as the slope of the resulting linear curve. It was expressed in arbitrary unit (AU)/mL of saliva and converted in AU/mg of protein.

Two-dimensional electrophoresis analysis

Based on the sensory analysis results, 2 groups of 6 subjects (6 hyposensitive and 6 hypersensitive, noted S– and S+, respectively) were selected, and their saliva was used for 2D electrophoresis analysis. For each subject, three 1 mL aliquots sampled on 3 different days were thawed at room temperature and pooled. Clarified saliva was utralfiltered at 15 000 g for 30 min at 10 °C using filtration devices with a 5 kDa cutoff in order to concentrate the proteins. The protein content of the resulting extracts was measured using the Bradford method. The first dimension was performed on a Protean IEF cell (Bio-Rad). Protein extracts containing 500 µg of proteins were included in 400 µL of a rehydration buffer containing 7 M urea, 2 M thiourea, 2% CHAPS, 0.1% dithiothreitol (DTT), and 1% Ampholytes Bio-Lyte (4 °C). These were loaded onto 17 cm 3-10NL IPG strips (Bio-Rad). Strips were rehydrated at 0 V for 13 h and 50 V for 8 h, and isoelectric focusing was carried out at a final voltage of 8000 V up to 60 kVh. Strips were then equilibrated successively in 2 solutions containing 6 M urea, 1.5 M Tris–HCL pH 8.8, glycerol, 10% sodium dodecyl sulfate (SDS), and either 1% DTT or 2.5% iodoacetamide for 15 and 20 min, respectively. They were

finally placed onto 12% SDS polyacrylamide gels and sealed with agarose. Electrophoresis was performed at 25 mA per gel for 5 h on a Protean II Multicell (Bio-Rad). Analytical gels were stained with Flamingo fluorescent gel stain (Bio-Rad) following the manufacturer's instructions, whereas gels prepared for identification of proteins were stained using colloidal Coomassie blue following the protocol described by Candiano et al. (2004). Gel images were acquired on a Pharos FX imaging system (Bio-rad) for fluorescently stained gels or on a GS-800 densitometer (Bio-Rad) for colorimetrically stained gels. Images were analyzed using Samespots software (NonLinear Dynamics). Spot volumes were normalized within one gel by the total volume of all valid spots for that particular gel and log transformed.

One-dimensional electrophoresis and immunoblotting

Western blotting was used in order to verify one finding of special interest evidenced previously by 2D electrophoresis, namely underexpression of cystatin SN in hypersensitive subjects. SDS–polyacrylamide gel electrophoresis was performed on 14% acrylamide gels using the Mini-Protean-2 device (Bio-Rad) according to the method of Laemmli (1970). Ten micrograms of protein were loaded per lane, and electrophoresis was carried out at 15 mA per gel for 90 min. Proteins were then transferred onto 0.45 µm nitrocellulose membranes at 10 V for 20 min using a Transblot SD cell (Bio-rad). Membranes were saturated in 8% skimmed milk powder in 9‰ NaCl and incubated for 1 h with a 1:200 dilution of the primary antibody (anti-cystatin SN: sc-73885, Santa Cruz Biotechnology Inc.) in 9‰ NaCl/5% BSA. After washing in phosphate-buffered saline (PBS)-Tween 0.05%, membranes were blocked in 8% skimmed milk powder in 9‰ NaCl and incubated for 1 h with a 1:400 dilution of goat anti-mouse Horseradish peroxidase (HRP)-conjugated antibody in 9‰ NaCl/5% BSA. Membranes were finally washed in PBS-Tween and colorimetrically revealed using the HRP substrate kit (Bio-Rad). Images of blots were acquired on a GS-800 densitometer (Bio-Rad). Semiquantification of bands was performed using the software Quantity One (Bio-rad). Results were expressed in AU.

Statistics

Statistics were performed using Statistica software (StatSoft). The correlation between the subjects' detection thresholds and their BMI and salivary flow rate was evaluated using the Spearman correlation test. The choice of a nonparametric test was guided by the presence of 3 censored values for the calculated thresholds (see Results). The difference in BMI, salivary flow rate, protein content, proteolytic activity, and spot abundance between the hyposensitive and the hypersensitive subjects was tested by one-way analysis of variance. Underexpression of immunologically detected cystatin SN in hypersensitive subjects was statistically tested using a one-tailed Student test. The level of significance was set at 5%.

Protein identification by mass spectrometry

Spots of interest were manually excised from the gels and placed in a 96-well plate. They were then successively washed twice with 0.1 M NH_4HCO_3 and 100% acetonitrile (ACN) for 10 min. Gel pieces were successively incubated in 10 mM TCEP/0.1 M NH_4HCO_3 for 30 min at 37 °C, in 55 mM iodoacetamide/0.1 M NH_4HCO_3 for 20 min, in 0.1 M NH_4HCO_3 for 2 min, and in ACN for 8 min. Digestion was performed in 15 µL of a solution of 40 mM NH_4HCO_3/10% ACN containing 10 ng/µL of trypsin (V5280, Promega). Ten microliters of trypsin were removed, and 5 µL of 40 mM NH_4HCO_3/10% ACN was added before incubation at 37 °C for 2 h and 30 min. Peptides extraction was performed by successive incubation in 1 µL of 0.5% TFA and 10 µL of ACN for 8 min twice.

For the analysis in MS and MS/MS mode, 1 µL of matrix (3.5 mg/mL HCCA in a solution of ACN/0.5% TFA, ref 201344, Bruker Daltonics) per 0.5 µL of the digest was deposited on a ground steel target plate. Analysis was conducted using a MALDI-TOF/TOF UltrafleXtreme Bruker Daltonics in automatic mode. The database search was performed on SwissProt and restricted to Human entries. Two missed cleavages were allowed. Carbamidomethyl modification of cysteine was accepted as a stable modification and methionine oxidation as a variable modification. Mass deviation tolerance was set at 30 ppm in MS mode and 0.6 Da in MS/MS mode. Systematic reinterrogation on the list of unmatched peaks was performed until no new protein was identified.

Results

Detection thresholds for the bitter taste of caffeine

Detection thresholds for caffeine were calculated for 26 subjects and ranged from 0.38 to 6.04 mM. For the remaining 3 subjects, their detection thresholds were below the minimum concentration of caffeine presented to them in the second and third session (0.5, 0.20, and 0.37 mM, respectively). Detection thresholds for caffeine had a median value of 1.33 mM (n = 29) and a mean value of 1.83 mM (n = 26). No significant correlation was observed between detection thresholds and subjects' basic physiological recordings (BMI, salivary flow).

Six subjects hypersensitive to caffeine (<0.5 mM) and 6 subjects hyposensitive to caffeine (>2.8 mM) were selected (Figure 1). Again, there was no significant difference between the 2 groups in terms of BMI (means S–: 25.3; S+: 23.4) or salivary flow (means S–: 0.60; S+: 0.60 g/min).

Protein content and proteolytic activities

The mean protein contents in the S– and S+ groups were 0.90 and 0.50 mg/ml, respectively, and the difference between the 2 groups was marginally significant (P = 0.07). Proteolytic

activity was on average 784 and 1425 AU/µg of protein in the S– and S+ groups, respectively. However, due to high between-subject variability, the difference between the 2 groups was not significant.

Saliva electrophoretic patterns

Overall, 255 spots were detected, matched across gels, and retained for the analysis. These spots spanned the approximate molecular weight (MW) range 10–55 kDa. The expression levels of 26 spots were significantly different between the S– and S+ groups (Table 1), with 3 spots overexpressed in hyposensitive subjects and 23 overexpressed in hypersensitive subjects. Within-group coefficients of variation for individual spots ranged from 9% to 115%. Positions of these spots are shown in Figure 2.

Twenty-two of the 26 spots were successfully identified by mass spectrometry. Details of identification parameters are provided in Table 2. The identified spots corresponded to different forms of 4 major salivary proteins, namely salivary amylase, serum albumin, immunoglobulins, and cystatin SN.

Cystatin SN was represented mainly by a spot of great abundance (spot 17) at an apparent MW close to the theoretical one. Despite its presence also in a fainter spot (spot 54) at a lower MW, it can be confidently postulated that cystatin SN levels were reduced in hypersensitive subjects. As to amylase and quite expectedly since spots over 55 kDa were not resolved in our conditions, all the identified forms were at MW lower than that of the full-length protein. Mass spectrometry data (Figure 3) suggested that spots 2, 11, 54, 153, 14, 18, 121, and 84 were N-terminal fragments of the protein because the detected peptides were grouped in that region. Amylase peptides detected in spots 9, 57, 64, and 55 were more scattered on the protein sequence. Those spots may therefore correspond to internal fragments or variants of amylase. At the exception of spots 2 and 11, all spots containing amylase were overexpressed in hypersensitive subjects. Concerning serum albumin, examination of mass spectrometry data revealed that spot 15 may contain the full-length isoform2 of serum albumin, whereas spots 13 and 12 were most likely C-terminal fragments of the protein (data not shown). All were overexpressed in hypersensitive subjects. Finally, out of the 6 forms of Ig kappa chain C region, 5 had an apparent molecular approximately twice higher than the theoretical value, which may result from comigration or polymerization of the protein. All spots containing Ig kappa and Ig alpha were more abundant in hypersensitive subjects.

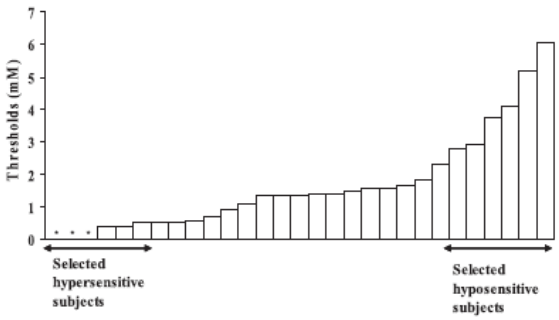


Figure 1 Individual detection thresholds for the bitter taste of caffeine (n = 29). For 3 subjects, indicated by *, thresholds were below the minimum concentration of caffeine presented to them in the second and third session (0.5, 0.20, and 0.37 mM for subjects 18, 32, and 50, respectively).

Table 1 Relative quantities (normalized volumes expressed in ppm) and coefficients of variation (CVs expressed in percent) of the 26 spots significantly different ($P < 0.05$) between the hyposensitive and the hypersensitive subjects

Spots	Hyposensitive subjects		Hypersensitive subjects		P
	Relative quantity (ppm)	CV (%)	Relative quantity (ppm)	CV (%)	
2	2877	115	912	51	0.046
17	64 896	45	34 973	45	0.043
11	3593	33	2206	28	0.024
10	567	59	947	36	0.035
92	3159	43	5475	18	0.017
54	2209	49	3790	27	0.041
9	3544	47	7085	31	0.013
13	3429	36	6460	20	0.005
12	3246	35	5846	22	0.007
153	2077	40	2960	9	0.039
14	1216	25	1790	22	0.021
88	4311	32	6532	26	0.036
61	3777	27	5649	29	0.036
19	5024	18	7072	10	0.002
118	8472	15	11 951	31	0.037
18	5886	13	7938	21	0.020
121	1755	12	2457	23	0.015
84	2047	25	3335	24	0.005
57	2049	35	3075	29	0.043
15	2697	25	4327	12	0.003
64	4236	18	6736	23	0.003
55	2354	39	4198	48	0.035
76	3119	34	5029	34	0.039
43	359	21	697	46	0.009
60	936	38	1709	35	0.014
6	435	30	903	51	0.040

The 3 first spots are underexpressed in S+ subjects.

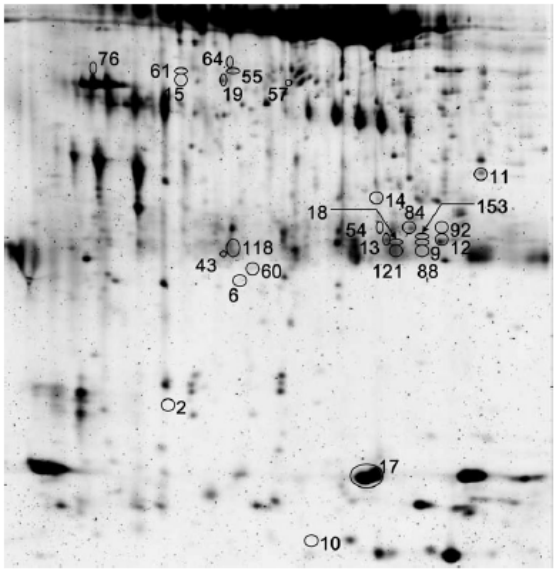


Figure 2 Two-dimensional electrophoretic protein pattern in resting whole saliva. This representative gel corresponds to a hyposensitive subject. Spots differentially expressed between subjects hyposensitive and hypersensitive to the bitter taste of caffeine are numbered.

Since Ig kappa (immunoglobulin light chain) can belong to any isotype of immunoglobulins but only Ig alpha heavy chains were identified, this most likely indicates that IgA specifically was overexpressed in hypersensitive subjects.

Abundance of cystatin SN

The primary antibody used is raised against full-length cystatin SN, and it was indeed detected as a single band of approximately 14 kDa. Semiquantification of bands confirmed that full-length cystatin SN was significantly ($P = 0.04$) overexpressed in hyposensitive subjects (15.74 AU vs. 10.79 in hypersensitive subjects). The fold-change between the 2 groups was 1.46 (Figure 4).

Discussion

The present study aimed at investigating the link between saliva proteome composition and gustatory sensitivity to bitterness, choosing caffeine as a bitter tastant and opting for a differential approach. The mean detection threshold we found for caffeine (1.83 mM averaged over 26 subjects, excluding 3 subjects with very low values) is in reasonable agreement with values previously reported, for example, 1.20 mM for young predominantly female tasters (Keast and Roper 2007) or 1.30 and 1.99 mM for young and elderly tasters, respectively (Schiffman et al. 1994). Based on these results, we selected 2 groups of subjects with clearly contrasted thresholds and found that overall saliva of hypersensitive subjects contained higher levels of amylase variants and/or fragments, immunoglobulin, and serum albumin and/or serum albumin fragments and lower levels of cystatin SN.

It is noteworthy that the proteins differentially represented between the 2 groups originate from different sources. Thus, amylase is secreted predominantly from the parotid gland, serum albumin is a plasmatic protein, immunoglobulins (in particular IgA) are secreted by major and minor glands (Marcotte and Lavoie 1998), whereas cystatin SN is predominantly produced by the submandibular and sublingual glands (Baron, DeCarlo, et al. 1999). In other words, the differences we observed were not merely the result of variability in the contribution of one source of proteins relatively to the others.

We did not observe significant reduction of CAVI proportions in hyposensitive subjects, as reported, for example, in parotid saliva of patients with hypogeusia (Shatzman and Henkin 1981). Our results are also at first sight contradictory with Igarashi et al. (2008) who reported a significant lower proportion of electrophoretically separated cystatin SN in patients suffering from taste disorders. However, no description of the taste disorders was provided, and this term can apply to many situations (hypogeusia, dysgeusia, or sensation of an unpleasant taste even in the absence of a stimulus). In contrast, some of the results described here corroborate data reported on a group of patients complaining from taste aberrations with reduced taste acuity (Hershkovich and Nagler 2004). In particular, compared with controls, such patients were characterized by a similar flow rate but significantly higher total protein content.

Taken individually, the proteins differentially expressed do not point out at a straightforward mechanism that could explain differences in sensitivity to the bitter taste of caffeine. For example, amylase overrepresented in hypersensitive subjects is one of the most abundant salivary proteins. It is represented as many isoforms in whole saliva (Hirtz et al. 2005). Its enzymatic activity consists of cleaving the glucosidic bonds of complex carbohydrates. It is suggested to initiate starch digestion in-mouth and may even retain some activity down to the small intestine (Valdez and Fox 1991). It, however, possesses many other functions. It plays, for example, an antibacterial role through binding mechanisms (Rudney et al. 1995), and it has an antiinflammatory action (Hirtz et al. 2006). Salivary amylase is upregulated by psychosocial stress (Nater et al. 2006) and in the case of several pathologies including periodontitis (Wu et al. 2009) or type I diabetes (Hirtz et al. 2006).

The second protein that was found more abundant in hypersensitive subjects is serum albumin. Serum albumin in saliva comes from plasma, and it enters the oral cavity through the gingival crevicular fluid or through epithelial permeability, the latter increasing during inflammation. Increased levels of serum albumin are therefore associated with conditions, such as gingivitis or periodontitis (Henskens

Table 2 Details of mass spectrometry results for proteins identified by MALDI-TOF or MALDI TOF-TOF

Spots	Proteins identified	Theoretical/ Estimated MW[a] (kDa)	No of unique peptides (MS mode)	Percentage of coverage	Mascot score[b] in MS mode	No of unique peptides (MS/MS mode)	Mascot score[c] in MS/MS mode	MSDB reference
2	Salivary alpha-amylase	57.7/16.4	—	—	—	2	142.89	AMYS_HUMAN
17	Cystatin SN	16.3/13.2	8	53.9	78.9	2	209.27	CYTN_ HUMAN
11	Salivary alpha-amylase	57.7/32.4	18	39.53	145	—	—	AMYS_HUMAN
10	Ig kappa chain C region	11.6/11.0	—	—	—	2	122.31	KAC_ HUMAN
92	Not identified							
54	Cystatin-SN	16.3/27.7	—	—	—	2	116.29	CYTN_ HUMAN
	Ig alpha-1 chain C region	37.6/27.7	—	—	—	2	115.89	IGHA1_ HUMAN
	Salivary alpha-amylase	57.7/27.7	—	—	—	2	174.66	AMYS_HUMAN
9	Salivary alpha-amylase	57.7/26.5	—	—	—	3	132.86	AMYC_HUMAN
13	Serum albumin[d]	69.3—47.4/26.7	—	—	—	3	139.39	ALBU_ HUMAN
12	Serum albumin[d]	69.3—47.4/26.6	—	—	—	2	145.71	ALBU_ HUMAN
153	Salivary alpha-amylase	57.7/27.0	12	29.35	65.4	—	—	AMYS_HUMAN
14	Salivary alpha-amylase	57.7/30.3	11	27.59	96.4	—	—	AMYS_HUMAN
88	Ig kappa chain C region	11.6/25.8	—	—	—	2	80.43	KAC_ HUMAN
61	Ig alpha-1 chain C region	37.6/44.1	9	35.41	77	2	218.59	IGHA1_ HUMAN
	Ig alpha-2 chain C region	36.5/44.1	8	30	64.3	—	—	IGHA2_ HUMAN
19	Ig alpha-2 chain C region	36.5/44.1	7	30	76.1	—	—	IGHA2_ HUMAN
118	Ig kappa chain C region	11.6/26.0	5	82.08	62.7	2	253.98	KAC_ HUMAN
18	Ig kappa chain C region	11.6/26.5	6	86.79	65	2	136.65	KAC_ HUMAN
	Salivary alpha-amylase	57.7/26.5	—	—	—	2	120.09	AMYS_HUMAN
121	Ig kappa chain C region	11.6/25.8	—	—	—	2	176.06	KAC_ HUMAN
	Salivary alpha-amylase	57.7/25.8	16	34.64	94.3	—	—	AMYS_HUMAN
84	Salivary alpha-amylase	57.7/27.7	16	34.05	113	—	—	AMYS_HUMAN
57	Salivary alpha-amylase	57.7/42.6	5	14.29	60.1	2	76.52	AMYS_HUMAN
15	Serum albumin[d]	69.3—47.4/42.8	15	26.6	64.5	2	103.7	ALBU_ HUMAN
64	Ig alpha-1 chain C region	37.6/44.7	—	—	—	2	159.03	IGHA1_HUMAN
	Salivary alpha-amylase	57.7/44.7	—	—	—	2	96.01	AMYS_HUMAN
55	Salivary alpha-amylase	57.7/44.1	22	42.47	143	—	—	AMYS_HUMAN
76	Not identified							
43	Ig kappa chain C region	11.6/25.8	—	—	—	2	179.49	KAC_ HUMAN
60	Not identified							
6	Not identified							

[a]The reported theoretical MW is that of the entire chain (including signal peptides).
[b]In MS mode, the identification is significant if Mascot score > 60.
[c]In MS/MS mode, the identification is significant if Mascot score > 20.
[d]Serum albumin is expressed as either isoform 1 (69.3 kDa) or isoform 2 (47.4 kDa).

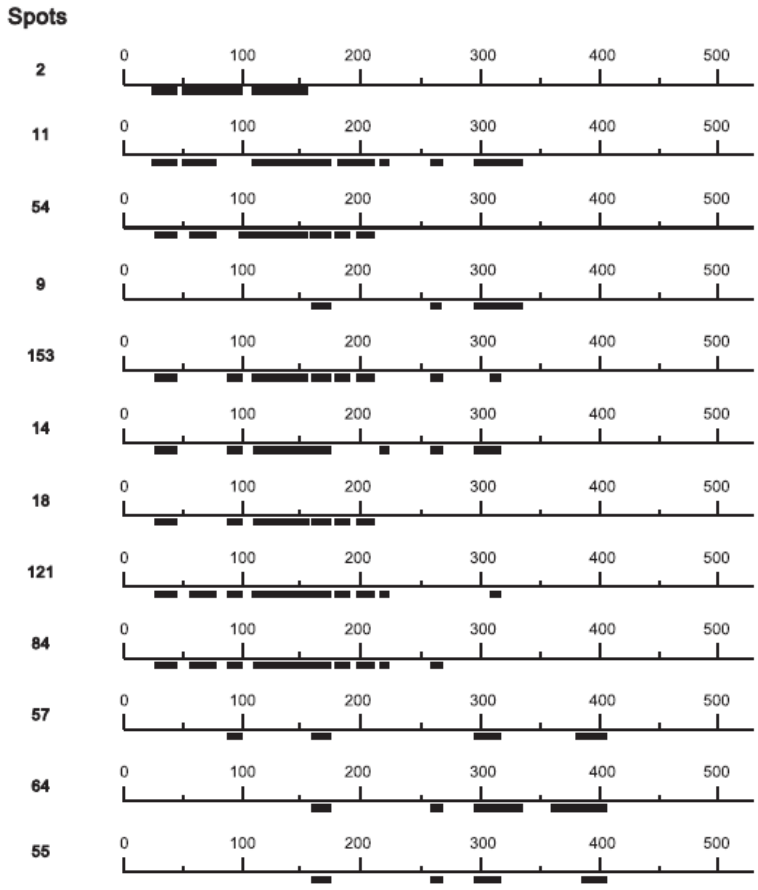


Figure 3 Coverage of α-amylase sequence (511 amino acids) by the peptides identified by MALDI-TOF MS (indicated by black bars) in spots containing amylase. The entire α-amylase sequence includes a signal peptide (amino acids in position 1–15).

et al. 1993; Gonçalves et al. 2010). Also overrepresented in hypersensitive subjects are IgA, which are the most abundant immunoglobulins in whole saliva (Teeuw et al. 2004). A main function of IgA is to limit microbial adhesion as well as antigen penetration in the mucosa (Marcotte and Lavoie 1998). In adults, levels of IgA are transiently raised by an acute stress challenge but downregulated by prolonged stress (Hucklebridge et al. 1998). Levels of IgA can be modified by oral diseases. For example, IgA1 and IgA2 are increased in oral lichen planus, and IgA2 is increased in acute recurrent aphtous ulceration (Sistig et al. 2002) or in generalized aggressive periodontitis (Wu et al. 2009).

At this point, it is interesting to note that all the 3 proteins more abundant in hypersensitive subjects have been described to be jointly overexpressed in patients with periodontitis, and in fact, profiles of such patients are also characterized by a lesser abundance of cystatin SN (Wu et al. 2009; Gonçalves et al. 2010). A targeted study of cystatins had also reported the depletion of cystatin SN in periodontally diseased patients (Baron, Gansky, et al. 1999). In our study and although subjects declared that they were free of oral pathologies, differences of profiles between hyposensitive and hypersensitive subjects may therefore indicate discreet differences in inflammatory statuses. Inflammation often results in taste dysfunction, through interferon-induced taste bud apoptosis and altered gene expression (Wang et al. 2007), but these conclusions apply mainly to acute viral and bacterial infections. For the subjects included in the present study, the inflammation levels would be only modestly different between the 2 groups.

In our view, one of the most striking results was the underrepresentation of full-length (therefore most probably functional) cystatin SN in hypersensitive subjects. One reason which drew our attention to this finding is that it is consistent with another study (Morzel M, Palicki O, Chabanet C, Schwartz C, Nicklaus S, unpublished data), where we found

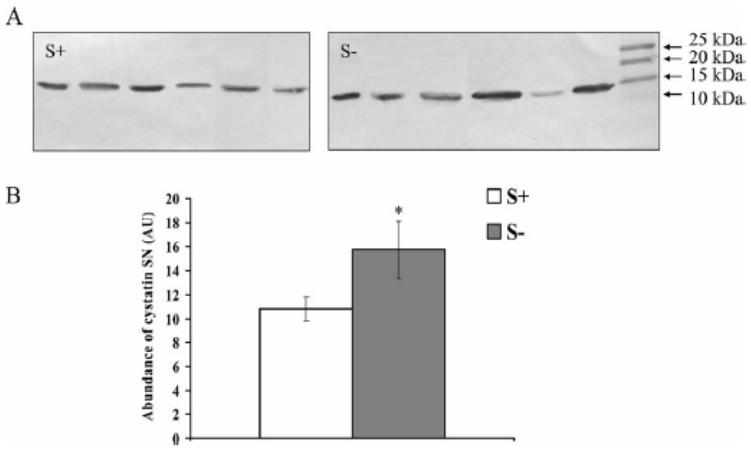


Figure 4 Abundance of cystatin SN in hypersensitive (S+) and hyposensitive (S−) subjects. **(A)** Western blotting patterns of 6 hypersensitive subjects and 6 hyposensitive subjects. **(B)** Semiquantification of immunoreactive bands (mean ± standard error of the mean) in hypersensitive and hyposensitive subjects. *indicates a significant difference ($P < 0.05$).

that salivary cystatins were overexpressed in saliva of infants who readily accepted a bitter solution thereby possibly presenting a reduced sensitivity to bitterness. Cystatin SN is specific to saliva, where its main function is the inhibition of cysteine proteases, for example, the lysozomal cathepsins B, L, and H (Baron, DeCarlo, et al. 1999). Cystatin SN thus plays an important role in the control of in vivo proteolytic events (Dickinson 2002). Here, overrepresentation of amylase fragments in hypersensitive subjects was associated to lower cystatin SN abundance, in accordance with Gonçalves et al. (2010) who attributed enhanced amylase proteolysis in periodontitis patients to cysteine protease activity. Furthermore, although the difference between the 2 groups was not statistically significant, hypersensitive subjects showed higher proteolytic activity values. We therefore propose that proteolytic events probably constitute an important perireceptor factor contributing to the differences of sensory sensitivity. Interestingly, it was previously reported that therapeutics protease inhibitors used, for example, for the treatment of HIV infection modify taste perception and in particular block or blunt the perception of quinine bitterness (Schiffman et al. 1999). The mechanism remained, however, unclear. Here, the proportion of the particular protease inhibitor cystatin SN was also increased in hyposensitive subjects but within physiological values. Again, there is no obvious explanation for this observation, but one can note that amylase, cystatins, and serum albumin are constituents of the oral salivary pellicles (Bradway et al. 1992; Siqueira et al. 2007). Mucosal pellicles are formed by absorption of salivary components onto epithelial cells. They cover all oral surfaces and have various functional properties including control of bacterial colonization, moisture retention, lubrication, and barrier protection (Bradway et al. 1989). Although never formally investigated, one can hypothesize that this barrier function may have an impact on the accessibility of tastants to receptors. A thinner or looser pellicle would then be associated with a facilitated tastant/taste receptor interaction, thereby increased sensitivity. In our case, reduced cystatin abundance and the subsequent enhanced proteolysis of amylase and serum albumin may impair mucosal pellicle formation or stability. Proteolysis of pellicle proteins would in turn favor bacterial colonization and growth (Wickström et al. 2009), which is consistent with the resemblance in salivary profiles between hypersensitive subjects and periodontitis patients.

To summarize, salivary profiles differed between subjects hyposensitive and hypersensitive to the bitterness of caffeine and suggested that enhanced in-mouth proteolysis is a key perireceptor factor associated to a higher gustatory sensitivity to this compound. The perspective of this work is to test this hypothesis on a new larger set of subjects.

Funding

This study was partly funded by the Burgundy Regional Council.

Acknowledgements

The authors wish to thank Emilien Di Sotto for technical assistance in biochemical analyses and western blotting.

References

Bajec MR, Pickering GJ. 2008. Astringency: mechanisms and perception. Crit Rev Food Sci Nutr. 48:858–875.

Baron AC, DeCarlo AA, Featherstone JDB. 1999. Functional aspects of the human salivary cystatins in the oral environment. Oral Dis. 5:234–240.

Baron AC, Gansky SA, Ryder MI, Featherstone JDB. 1999. Cysteine protease inhibitory activity and levels of salivary cystatins in whole saliva of periodontally diseased patients. J Periodontal Res. 34:437–444.

Bradway SD, Bergey EJ, Jones PC, Levine MJ. 1989. Oral mucosal pellicle—adsorption and transpeptidation of salivary components to buccal epithelial cells. Biochem J. 261:887–896.

Bradway SD, Bergey EJ, Scannapieco FA, Ramasubbu N, Zawacki S, Levine MJ. 1992. Formation of salivary mucosal pellicle—the role of transglutaminase. Biochem J. 284:557–564.

Bufe B, Breslin PA, Kuhn C, Reed DR, Tharp CD, Slack JP, Kim UK, Drayna D, Meyerhof W. 2005. The molecular basis of individual differences in phenylthiocarbamide and propylthiouracil bitterness perception. Curr Biol. 15:322–327.

Candiano G, Bruschi M, Musante L, Santucci L, Ghiggeri GM, Carnemolla B, Orecchia P, Zardi L, Righetti PG. 2004. Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. Electrophoresis. 25:1327–1333.

Chandrashekar J, Mueller KL, Hoon MA, Adler E, Feng LX, Guo W, Zuker CS, Ryba NJP. 2000. T2Rs function as bitter taste receptors. Cell. 100:703–711.

Dickinson DP. 2002. Salivary (SD-type) cystatins: over one billion years in the making—but to what purpose? Crit Rev Oral Biol Med. 13:485–508.

Dinnella C, Recchia A, Fia G, Bertuccioli M, Monteleone E. 2009. Saliva characteristics and individual sensitivity to phenolic astringent stimuli. Chem Senses. 34:295–304.

Dinnella C, Recchia A, Vincenzi S, Tuorila H, Monteleone E. 2010. Temporary modification of salivary protein profile and individual responses to repeated phenolic astringent stimuli. Chem Senses. 35:75–85.

Drewnowski A, Gomez-Carneros C. 2000. Bitter taste, phytonutrients, and the consumer: a review. Am J Clin Nutr. 72:1424–1435.

Gonçalves LD, Soares MR, Nogueira FCS, Garcia C, Camisasca DR, Domont G, Feitosa ACR, Pereira DD, Zingali RB, Alves G. 2010. Comparative proteomic analysis of whole saliva from chronic periodontitis patients. J Proteomics. 73:1334–1341.

Hansen JL, Reed DR, Wright MJ, Martin NG, Breslin PAS. 2006. Heritability and genetic covariation of sensitivity to PROP, SOA, quinine HCl, and caffeine. Chem Senses. 31:403–413.

Henskens YMC, Vandervelden U, Veerman ECI, Amerongen AVN. 1993. Protein, albumin and cystatin concentrations in saliva of healthy subjects and of patients with gingivitis or periodontitis. J Periodontal Res. 28:43–48.

Hershkovich O, Nagler RM. 2004. Biochemical analysis of saliva and taste acuity evaluation in patients with burning mouth syndrome, xerostomia and/or gustatory disturbances. Arch Oral Biol. 49:515–522.

Hirtz C, Chevalier F, Centeno D, Rofidal V, Egea JC, Rossignol M, Sommerer N, Deville de Perière D. 2005. MS characterization of multiple forms of alpha-amylase in human saliva. Proteomics. 5:4597–4607.

Hirtz C, Chevalier F, Sommerer N, Raingeard I, Bringer J, Rossignol M, Deville de Perière D. 2006. Salivary protein profiling in type I diabetes using two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry. Clin Proteomics. 2:117–127.

Hucklebridge F, Clow A, Evans P. 1998. The relationship between salivary secretory immunoglobulin A and cortisol: neuroendocrine response to awakening and the diurnal cycle. Int J Psychophysiol. 31:69–76.

Humphrey SP, Williamson RT. 2001. A review of saliva: normal composition, flow and unction. J Prosthet Dent. 85:162–169.

Igarashi A, Ito K, Funayama S, Hitomi Y, Ikui A, Ikeda M, Nomura S. 2008. The salivary protein profiles in the patients with taste disorders: the comparison of salivary protein profiles by two-dimensional gel electrophoresis between the patients with taste disorders and healthy subjects. Clin Chim Acta. 388:204–206.

Keast RSJ, Roper J. 2007. A complex relationship among chemical concentration, detection threshold, and suprathreshold intensity of bitter compounds. Chem Senses. 32:245–253.

Kim UK, Jorgenson E, Coon H, Leppert M, Risch N, Drayna D. 2003. Positional cloning of the human quantitative trait locus underlying taste sensitivity to phenylthiocarbamide. Science. 299:1221–1225.

Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227:680–685.

Marcotte H, Lavoie MC. 1998. Oral microbial ecology and the role of salivary immunoglobulin A. Microbiol Mol Biol Rev. 62:71–109.

Meyerhof W, Batram C, Kuhn C, Brockhoff A, Chudoba E, Bufe B, Appendino G, Behrens M. 2010. The molecular receptive ranges of human TAS2R bitter taste receptors. Chem Senses. 35:157–170.

Nater UM, La Marca R, Florin L, Moses A, Langhans W, Koller MM, Ehlert U. 2006. Stress-induced changes in human salivary alpha-amylase activity—associations with adrenergic activity. Psychoneuroendocrinology. 31:49–58.

Quintana M, Palicki O, Lucchi G, Ducoroy P, Chambon C, Salles C, Morzel M. 2009. Inter-individual variability of protein patterns in saliva of healthy adults. J Proteomics. 72:822–830.

Rudney JD, Ji Z, Larson CJ, Liljemark WF, Hickey KL. 1995. Saliva protein binding to layers of oral streptococci in vitro and in vivo. J Dent Res. 74:1280–1288.

Schiffman SS, Gatlin LA, Frey AE, Heiman SA, Stagner WC, Cooper DC. 1994. Taste perception of bitter compounds in young and elderly persons—relation to lipophilicity of bitter compounds. Neurobiol Aging. 15:743–750.

Schiffman SS, Zervakis J, Heffron S, Heald AE. 1999. Effect of protease inhibitors on the sense of taste. Nutrition. 15:767–772.

Shatzman AR, Henkin RI. 1981. Gustin concentration changes relative to salivary zinc and taste in humans. Proc Natl Acad Sci U S A. 78:3867–3871.

Siqueira WL, Zhang W, Helmerhorst EJ, Gygi SP, Oppenheim FG. 2007. Identification of protein components in in vivo human acquired enamel pellicle using LC-ESI-MS/MS. J Proteome Res. 6:2152–2160.

Sistig S, Vucevic-Boras V, Lukac J, Kusic Z. 2002. Salivary IgA and IgG subclasses in oral mucosal diseases. Oral Dis. 8:282–286.

Teeuw W, Bosch JA, Veerman ECI, Amerongen AN. 2004. Neuroendocrine regulation of salivary IgA synthesis and secretion: implications for oral health. Biol Chem. 385:1137–1146.

Valdez IH, Fox PC. 1991. Interactions of the salivary and gastrointestinal systems. I. the role of saliva in digestion. Dig Dis. 9:125–132.

Wang H, Zhou ML, Brand J, Huang LQ. 2007. Inflammation activates the interferon signaling pathways in taste bud cells. J Neurosci. 27:10703–10713.

Wickström C, Herzberg MC, Beighton D, Svensater G. 2009. Proteolytic degradation of human salivary MUC5B by dental biofilms. Microbiology. 155:2866–2872.

Wu Y, Shu R, Luo LJ, Ge LH, Xie YF. 2009. Initial comparison of proteomic profiles of whole unstimulated saliva obtained from generalized aggressive periodontitis patients and healthy control subjects. J Periodontal Res. 44:636–644.

DISCUSSION

La présente étude avait pour but détudier la relation entre le protéome salivaire propre à un individu et sa perception du goût amer. Pour ce faire, le seuil de détection de sensibilité au goût amer de la caféine de 29 sujets a été mesuré, leur consommation de boissons contenant de la caféine et d'une boisson amère (bière) a été recensée, et leur profils protéiques salivaires ont été obtenus par électrophorèse mono-dimensionnelle sur le groupe entier, ou par électrophorèse bi-dimensionnelle sur les 6 sujets les plus sensibles à la caféine et 6 sujets les moins sensibles.

La mesure des seuils de détection au goût amer de la caféine a permis de mettre en évidence une grande variabilité entre les sujets. Ceci est en accord avec la littérature qui rapporte des seuils compris entre 0,08 mM et 4,94 mM (Robinson et al., 2005; Keast et Roper, 2007) pour la caféine. Cette variabilité n'est d'ailleurs pas spécifique à l'amertume puisque des seuils variant de 1 à 15 sont aussi rapportés pour le goût sucré (Moore et al., 1982).

L'analyse monodimensionnelle des salives de tous les sujets a permis de mettre en évidence une corrélation positive entre l'abondance de 3 bandes et la sensibilité à la caféine. Ces 3 bandes contenaient 5 protéines parmi lesquelles seule la CAVI a jusqu'à lors été directement liée à la perception gustative, comme cela est détaillé au chapitre I. En effet, la déficience en CAVI a été associée à une diminution de la perception gustative en général (Shatzman et Henkin, 1981).

Il faut toutefois noter que d'autres bandes contenant cette même protéine, y-compris à des poids moléculaires proches du poids moléculaire théorique de la protéine entière, n'apparaissaient pas corrélées au seuil de détection. En raison du rôle clé de l'anhydrase carbonique dans la perception gustative, toutefois, il pourrait être intéressant de quantifier cette protéine par des méthodes ciblées du type ELISA.

Plus généralement, les profils mono-dimensionnels nous ont apporté peu d'informations pertinentes. L'alpha-amylase par exemple est présente sous de nombreux isoformes dans la salive (Hirtz et al., 2005) et il est difficile de conclure sur le rôle que pourrait jouer en particulier cette forme à un PM apparent de 45,9 kDa, d'autant plus que les formes

majoritaires (à des poids moléculaires aux alentours de 55 kDa, bandes les plus abondantes visibles sur la figure 21) n'ont pas été incluses dans l'analyse. De même, la corrélation entre seuil de détection de la sous-unité alpha de l'hémoglobine n'est pas retrouvée pour les bandes contenant les sous-unités beta de l'hémoglobine, alors même que l'hémoglobine fonctionnelle chez l'Homme comprend les deux sous-unités. Concernant l'alpha-énolase, son expression décroit après stimulation par l'amertume (Neyraud et al., 2006), mais le rôle exact que cette protéine pourrait jouer dans la perception de cette modalité est peu clair. Enfin, la protéine UPF0762 codée par le gène C6orf58 a une fonction inconnue et est aussi présente dans d'autres bandes non-corrélées aux seuils de détection, ce qui rend incertaine la corrélation entre abondance globale de cette protéine et sensibilité.

Ainsi, en raison de la multiplicité des protéines identifiées dans chaque bande (dans des proportions inconnues), mais aussi du fait qu'une même protéine peut être présente dans plusieurs bandes, les profils monodimensionnels ne sont pas apparus suffisamment résolutifs. Ceci nous a conduits à mener une autre étude cette fois-ci fondée sur l'utilisation de l'électrophorèse bi-dimensionnellle.

Les résultats, discutés dans l'article 1, ont montré pour la première fois que la sensibilité gustative était liée à la composition protéique globale de la salive et que la salive entre en jeu dans les mécanismes péri-récepteurs modulant la sensibilité. Les résultats suggèrent qu'il existe un lien entre activité protéolytique en bouche et sensibilité à l'amertume de la caféine. L'hypothèse proposée avance que la sous-expression de cystatine SN chez les hypersensibles entraînerait une augmentation de l'activité protéolytique en bouche, et par conséquent de la dégradation des protéines du film salivaire, notamment l'amylase, l'albumine sérique et les IgA. Cette perte de l'intégrité du film salivaire rendrait les récepteurs du goût plus accessibles aux molécules amères, d'où une hypersensibilité chez ces sujets. Cette hypothèse se rattache à un mécanisme général qui théoriquement pourrait affecter la sensibilité à d'autres molécules, y-compris d'autres modalités gustatives. Il faut toutefois garder à l'esprit que ce film salivaire peut lui-même être modifié par la prise alimentaire, et que cette hypothèse est plus vraisemblablement applicable à des molécules qui justement en affectent peu la structure. Ce travail de thèse a permis de dégager cette question (structure / épaisseur du film salivaire) de biologie mucosale comme une nouvelle priorité dans mon équipe d'accueil. La cystatine SN,

l'élément central de l'hypothèse émise, fera aussi l'objet d'une attention particulière car elle pourrait être considérée comme un marqueur de sensibilité à l'amertume.

De manière intéressante, et même si les données sont incomplètes, l'enregistrement des consommations de certaines boissons ont révélé qu'une partie des sujets hypersensibles au goût amer de la caféine consommaient rarement ou jamais du café alors que tous les hyposensibles étaient consommateurs réguliers. Cela corrobore les résultats de Mela et al. (1992) qui ont observé que les seuils de détection au goût amer de la caféine étaient plus élevés chez les consommateurs réguliers de caféine. En élargissant à une boisson amère, les hyposensibles étaient également consommateurs plus réguliers de bière.

En perspectives de cette étude, il est intéressant de se poser la question de l'origine des phénotypes salivaires observés. De nombreux facteurs génétiques et environnementaux peuvent modifier la composition salivaire. Sur la base des résultats de consommation de boissons contenant de la caféine mais aussi de travaux antérieurs qui avaient mis en avant la modification du protéome salivaire sous l'effet de molécules amères (Neyraud et al., 2006 ; Quintana et al., 2009b), la question est de décrire l'effet que des constituants alimentaires (molécules amères) pourraient avoir sur l'expression de protéines salivaires. Cet aspect est étudié dans le prochain chapitre en utilisant une approche *in vitro* et en se concentrant sur la cystatine SN, le marqueur potentiel de sensibilité à l'amertume.

CHAPITRE III:

EFFET DES MOLECULES AMERES SUR LES PROTEINES DE LA SALIVE - ETUDE *in vitro*

INTRODUCTION

L'objectif de cette deuxième partie de la thèse était d'étudier *in vitro* l'effet des molécules amères (caféine, urée, quinine) sur les protéines de la salive, et plus particulièrement sur l'expression de la cystatine SN. Dans ce but, la lignée de glandes salivaires HSG a été utilisée comme modèle cellulaire. L'avantage d'utiliser un modèle *in vitro*, et particulièrement celui de la lignée HSG est, d'une part, de travailler en milieu contrôlé, et ce, sur un modèle de glandes salivaire ayant conservé certaines des caractéristiques de la glande salivaire *in vivo* (cf. I.5.3), d'autre part, d'étudier des paramètres qu'il ne serait pas possible d'étudier *in vivo*, tels que la durée d'exposition ou la régulation et les mécanismes biochimiques. Après une mise au point des conditions de culture et de différenciation sur Matrigel de la lignée HSG, la différenciation d'un point de vue morphologique et fonctionnelle a été contrôlée. Deux marqueurs de différenciation ont, dans un premier temps, été retenus, l'alpha-amylase et la cystatine SN, sur la base de résultats présentés respectivement par Zheng et al. (1998) et Hoffman et al. (1996). La croissance et le cycle cellulaire des cellules HSG non différenciées et différenciées ont également été étudiés. En effet, différentes études ont déjà montré une différence de croissance entre cellules HSG non différenciées et cellules HSG différenciées (Lam et al., 2005; Vag et al., 2007; Szlavik et al., 2008). Des différences au niveau du cycle cellulaire ont également été rapportées (Lam et al. 2005). Par la suite, les concentrations non cytotoxiques de caféine, quinine et urée, sur la lignée HSG, ont été déterminées. Les concentrations retenues pour cette étude reflètent aussi les taux circulants dus à une consommation alimentaire dans le cas de la quinine et de la caféine (Daly and Fredholm, 1998). L'effet de ces trois molécules sur l'expression de cystatine SN a été évalué par Western Blot et par ELISA.

III.1 TRAVAUX NON PRÉSENTÉS SOUS FORME D'ARTICLE

III.1.1 Matériel & Méthodes

III.1.1.1 Optimisation des conditions de culture pour induire la différenciation

Afin d'optimiser les conditions de culture en vue de leur différenciation en acini, les cellules HSG ont été mises en culture à une densité de 5×10^4 cellules/cm^2 sur des plaques 6 puits précoatés ou non avec soit 800 µL de GFR Matrigel à 10,8 mg/ml, soit 800 µL de GFR Matrigel dilué à 5,4 mg/ml. Pour certaines plaques où les cellules ont été ensemencées avec du GFR Matrigel à 10,8 mg/ml, le milieu de culture a été renouvelé après adhérence puis toutes les 48h avec un milieu contenant 5% de Matrigel et 5% de SVF afin de permettre aux cellules HSG de se différencier en 3D (Fig. 22). Pour les autres plaques, le milieu contenait 10 % SVF. La différenciation des cellules a été suivie par observations morphologiques (×400, microscope optique, Nikon).

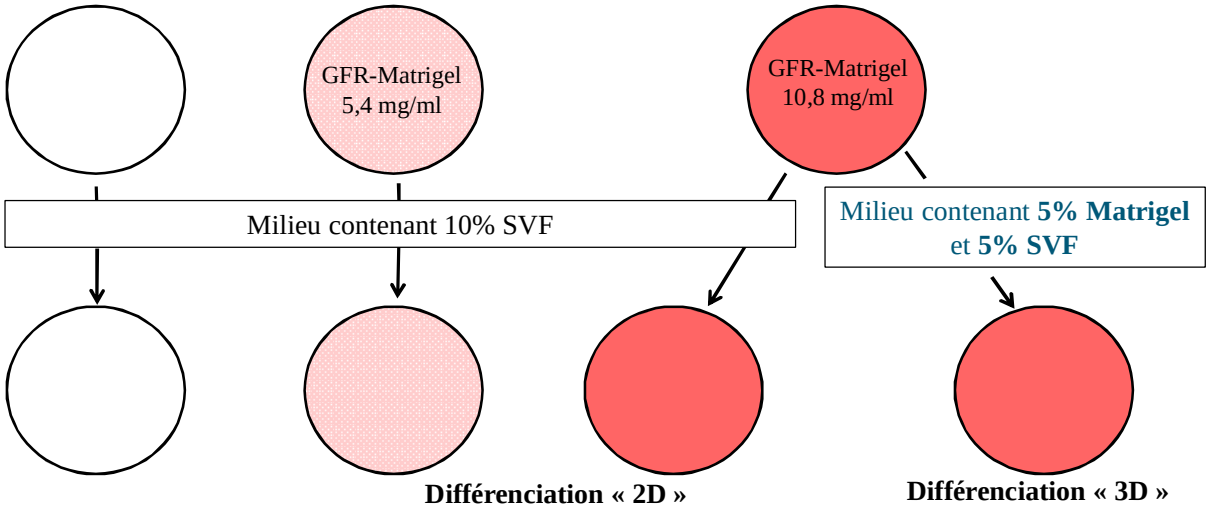


Figure 22 : Conditions de culture en vue de l'optimisation de la différenciation des cellules HSG en acini

Pour la suite des expériences, la différenciation en 3D sur du GFR Matrigel à 10,8 mg/ml a été retenue car les observations microscopiques ont montré une meilleure différenciation en acini comparé aux autres conditions de culture.

Synoptique

Dans un premier temps, la différenciation des cellules HSG a été vérifiée d'un point de vue fonctionnel. L'expression des gènes d'amylase et de cystatine SN a été analysée par RT-PCR en temps réel, le cycle cellulaire a été évalué par cytométrie de flux, et les protéines amylase et cystatine SN ont été détectées par Western blot dans les cellules HSG et le milieu extracellulaire.

Dans un deuxième temps, après avoir vérifié l'effet cytotoxique de la caféine, de la quinine et de l'urée sur les cellules HSG, l'effet des différentes molécules amères sur la lignée HSG a été étudié.

III.1.1.2 Vérification de la différenciation des cellules HSG d'un point de vue fonctionnel

Analyse de l'expression des gènes de l'amylase (AMY1A) et de la cystatine SN (CST1) par RT-PCR en temps réel

Extraction des ARN

Les cellules HSG ont été ensemencées à une densité de 5×10^4 cellules/cm^2 sur des plaques 6 puits non précoatées ou précoatées avec 800 µL de GFR Matrigel à 10,8 mg/ml pendant 4 jours. Chaque jour, les ARN totaux ont été extraits à l'aide du kit RNeasy Mini kit (Qiagen, Hilden, Allemagne), selon les instructions du fabricant.

Electrophorèse sur gel

La vérification de l'intégrité des ARN a été réalisée par électrophorèse monodimensionnelle. Après quantification des ARN totaux, 12 µL de chaque échantillon,

contenant 0,5µg d'ARN complété avec 10 µL d'eau et 2 µL de tampon de charge gel green™ Biotium (Interchim, Montluçon, France), ont été déposés dans les puits d'un gel d'agarose à 1,2%. La migration des ARN a été effectuée à 100V pendant 35 minutes, à l'aide d'un appareil à électrophorèse Run One. L'acquisition d'images a été réalisée à l'aide de l'Imager *in vivo* FPro (Carestream, Health care, New Haven, CT, USA).

Transcriptase inverse

Trois µg d'ARN total, 250 ng d'amorces aléatoires (pd(N)6) et des désoxyribonucléotides (dNTPs) à une concentration finale de 500 µM ont été mélangés et ajustés à 12 µL avec de l'eau Milli-Q. Le mélange a été dénaturé à 65°C pendant 5 minutes et placé dans de la glace. Un Mix M-MLV Reverse Transcriptase (Tampon M-MLV 5X, DTT à 0.1 M, enzyme M-MLV à 200 U/µL, Life technologies, Paisley, UK) a ensuite été rajouté afin de synthétiser l'ADNc. Le mélange a été incubé pendant 10 minutes à température ambiante puis pendant 1 heure à 37°C, et complété à 100 µL avec de l'eau Milli-Q.

PCR en temps réel

Afin d'analyser l'expression en ARNm des gènes d'amylase (AMY1A) et de cystatine SN (CST1), une PCR en temps réel a été effectuée. Pour l'amplification par PCR, 39 ng d'ADNc de chaque échantillon ont été déposés dans une plaque 96 puits et une solution contenant 5µl de Taqman® Universal PCR Master Mix 2x (AmpliTaq DNA polymerase, Tampon de l'enzyme AmpliTaq DNA polymerase, dNTPs, RoX, Life technologies), 3.5 µL d'eau et 0,2 µL de sonde a été rajoutée. Pour l'amylase et la cystatine, respectivement les sondes AMY1A (Hs00420710_g1) et CST1 (Hs00606961_m1) couplées au fluorophore 6-carboxyfluorescein (FAM™, excitation 495 nm / émission 520 nm) ont été utilisées. L'eau a été utilisée comme témoin négatif. Le gène de la protéine ribosomale RPLO couplé au fluorophore VIC®, (excitation 538 nm / émission 554nm) a été utilisé comme gène de référence. La détection des gènes amylase et cystatine SN a été effectuée à l'aide du StepOne™ plus Real-Time PCR System (Life technologies), en utilisant les paramètres suivants: 95°C pendant 10 min, 40 cycles: 95°C pendant 15 sec, et 60°C pendant 1 min.

Analyse du cycle cellulaire par cytométrie de flux

Double marquage BrdU/IP

A jour 1, 2, et 3 après ensemencement sur supports précoatés ou non avec 800 µL de GFR Matrigel à 10,8 mg/ml, du milieu frais contenant de la Bromodeoxyuridine (BrdU), un marqueur de l'ADN, à une concentration finale de 12 mM a été mis en contact avec les cellules HSG pendant 2 heures. Les cellules ont été récupérées et centrifugées à 300g pendant 5 min, puis lavées avec 10 mL de PBS, avant d'être fixées par incubation dans 0,5 mL de PBS/ 1,5 mL d'éthanol à 70%. Elles ont ensuite été reprises dans une solution de pepsine (Promega, Madison, WI, USA) diluée dans du HCl à 30 mM à raison de 0,5 mg/ml et agitées pendant 30 min à température ambiante. Après centrifugation, le culot a été repris dans du HCl à 2 mM et incubé pendant 15 min à température ambiante. Les cellules ont ensuite été incubées avec un anticorps primaire anti-BrdU (1:50) (Dako, Clostrup, Denmark) pendant 1 heure à température ambiante, puis avec un anticorps secondaire anti-souris Alexa 488 (1/1000) (Life technologies) pendant 40 minutes à l'obscurité. Les cellules ont été reprises dans 1 mL de PBS/Tween à 0,5%. Enfin, 10 µl d'iodure de propidium (IP, Life technologies), un marqueur de l'ADN, à 10 mg/ml ont été rajoutés et les cellules ont été passées au cytomètre de Flux Facscalibur (BD Biosciences) et analysées à l'aide du logiciel cellquestPro. La proportion de cellules (%) en phase de préparation à la synthèse ou à la différenciation (G0/G1), en phase de synthèse (S), et en phase de préparation à la mitose (G2/M) du cycle cellulaire a été déterminée. Trois essais indépendants ont été effectués.

Méthode Vindelov

Les cellules HSG (non synchronisées) ont été ensemencées à une densité de 5×10^4 cellules/cm² sur des plaques 6 puits précoatées ou non avec 800 µL de GFR Matrigel à 10,8 mg/ml. Chaque jour pendant 5 jours, les cellules HSG non différenciées et différenciées ont été trypsinées et lavées avec du PBS. Le surnageant a été éliminé, le culot a été repris dans 500 µL de Tampon T (0,032 mg/ml de trypsine dans du Tampon S) et incubé 15 minutes à température ambiante à l'obscurité. Quatre cents microlitres de Tampon R (100mg de Ribonucléase A à 40unités/mg à 25°C, 25mg d'inhibiteur trypsique, 50ml de Tampon S) ont ensuite été rajoutés et les cellules ont été placées 10 minutes à température ambiante à

l'obscurité. Enfin, 10 µL d'IP à 10 mg/mL ont été rajoutés. Après 5 minutes, les cellules ont été passées au cytomètre de Flux Facscalibur (BD Biosciences) et analysées à l'aide du logiciel cellquestPro. La proportion de cellules (%) en phase G0/G1, S, et G2/M du cycle cellulaire a été déterminée.

Mise en culture des cellules et extraction des protéines en vue de la détection et/ou quantification des protéines par Western Blot et ELISA

Les cellules HSG ont été ensemencées à une densité de 5×10^4 cellules/cm^2 sur des plaques 6 puits précoatées ou non avec 800 µL de GFR Matrigel à 10,8 mg/ml. Chaque jour, le milieu a été retiré et conservé à -80°C, et les cellules ont été rincées 2 fois avec du PBS. Les protéines provenant des cellules mises en culture sur support non-coaté ont été directement extraites avec du tampon de lyse RIPA (Tris-HCl à50mM, NaCl à 150 mM, NP40 à 0,1%, SDS à 0,1%, deoxycholate à 0,5%, EDTA pH8 à 1mM). Les cellules mises en culture sur des supports coatés avec du GFR Matrigel ont d'abord été dissociées du Matrigel avec une solution «Cell Recovery» (Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA) selon les instructions du fournisseur et ensuite les protéines ont été extraites avec du tampon de lyse RIPA. Un dosage protéique a été effectué par la méthode de Bradford (Bradford, 1976), en utilisant le γ-globuline comme référence.

Détection de l'amylase et de la cystatine SN dans les cellules HSG et détection de l'amylase dans les milieux de cultures par Western blot

La détection de l'amylase et de la cystatine SN dans les cellules HSG ensemencées sur supports précoatés ou non avec du GFR Matrigel pendant 6 jours et la détection de l'amylase dans le milieu de culture ont été réalisées par Western blot. Vingt microgrammes de protéines ont été déposés dans des puits de gels SDS polyacrylamide à 14 % et une électrophorèse monodimensionnelle a été effectuée d'après la méthode de Laemmli (1970) sur Mini Protean (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). La salive d'un adulte (sexe masculin) non-stimulée prélevée au moins 1heure après le dernier repas a été utilisée comme témoin positif. La migration des protéines a été effectuée à 15 mA par gel pendant 90 minutes. Les protéines ont ensuite été transférées sur une membrane de nitrocellulose de 0,45 µm à 10 V pendant 20 minutes à l'aide d'un Transblot SD cell (Bio-Rad). Les membranes ont été saturées avec 8% de poudre

de lait écrémé dans du NaCl à 9‰ et incubées pendant 1 heure avec soit un anticorps anti-amylase de souris (1:200, sc-166349 Santa Cruz Biotechnology Inc., USA) soit un anticorps anti-cystatine SN de souris (1:200, sc-73885 Santa Cruz Biotechnology Inc., USA) dans 9‰ NaCl/5% BSA. Après un lavage avec du PBS-Tween à 0,05%, les membranes ont été bloquées avec 8% de poudre de lait écrémé dans du NaCl à 9‰ et incubées pendant 2 heures dans un anticorps secondaire anti-souris de chèvre Alexa 488 (1:400) dans 9‰ NaCl/5% BSA. Les membranes ont ensuite été lavées. Le signal fluorescent a été acquis grâce au scanner Pharos (Bio-Rad). L'analyse d'image a été réalisée à l'aide du logiciel Quantity One.

III.1.1.3 Effet des molécules amères sur la lignée HSG

Test de cytotoxicité de la caféine, de la quinine et de l'urée

Cellules non différenciées

Les cellules HSG ont été ensemencées sur des plaques 96 puits non-coatées à une densité de 5×10^4 cellules/cm². Après 24 heures, le milieu a été retiré et les cellules ont été traitées avec un milieu contenant soit 2,5 µL de caféine (Sigma) diluée dans du tampon phosphate (PBS) (1, 5, 10, 30, 50, 70, 100 µM) soit 2,5 µL de quinine (Sigma) diluée dans de l'éthanol (1, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500 µM) soit 2,5 µL d'urée (Sigma) diluée dans du tampon phosphate (PBS) (1, 50, 100, 500, 3000, 7000, et 10000 µM). Le milieu contenant de la caféine, de la quinine ou de l'urée a été changé chaque jour. Les cellules traitées avec de l'éthanol ou du PBS uniquement ont été utilisées comme témoins négatifs. Un, 2 et 3 jours après traitement, le milieu a été retiré, la Résazurine (440µM) a été rajoutée dans chaque puits et incubée à 37°C pendant 3,5 heures. Pour le témoin positif, du SDS à 3% a été rajouté aux cellules. Les densités optiques ont été mesurées à l'aide du lecteur de plaques Chameleon (Hidex, Turku, Finland).

Cellules différenciées

La cytotoxicité de la caféine, de la quinine ou de l'urée sur les cellules HSG différenciées a également été déterminée. Deux jours après ensemencement, c'est-à-dire après l'apparition de structures acinaires, les cellules ont été traitées avec de la caféine (5, 50, 100 µM), de la quinine (2, 50, 150, et 300 µM), et de l'urée (500, 3000, 7000, et 10000 µM).

Détection de la cystatine SN par Western Blot

Un Western Blot a été réalisé afin de détecter la cystatine SN dans les cellules HSG non différenciées et différenciées exposées à la caféine, l'urée ou la quinine.

Vingt microgrammes de protéines ont été déposés dans des puits de gels SDS-PAGE à 14 % et une électrophorèse monodimensionnelle a été effectuée d'après la méthode de Laemmli (1970) sur Mini Protean (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). De la salive humaine, prélevée au moins 1heure après le dernier repas, a été utilisée comme témoin positif. La migration des protéines a été effectuée à 15 mA par gel pendant 90 minutes. Les protéines ont ensuite été transférées sur une membrane de nitrocellulose de 0,45 µm d'épaisseur à 10 V pendant 20 minutes à l'aide d'un Transblot SD cell (Bio-Rad). Les membranes ont été saturées avec 8% de poudre de lait écrémé dans du NaCl à 9‰ et incubées pendant 1 heure avec un anticorps anti-cystatine SN de souris (1:200, sc-73885 Santa Cruz Biotechnology Inc.) dans 9‰ NaCl/5% BSA. Après un lavage avec du PBS-Tween à 0.05%, les membranes ont été bloquées avec 8% de poudre de lait écrémé dans du NaCl à 9‰ et incubées pendant 2 heures dans un anticorps secondaire anti-souris de chèvre Alexa 488 (1:400) dans 9‰ NaCl/5% BSA. Les membranes ont ensuite été lavées. Le signal fluorescent a été acquis grâce au scanner Pharos (Bio-Rad). L'analyse d'image a été réalisée à l'aide du logiciel Quantity One.

Quantification de cystatine SN par ELISA

Afin de confirmer les résultats, la quantification de cystatine SN par ELISA a aussi été menée (cf. protocole article 2) sur les échantillons traités à la caféine été à la quinine.

La cystatine SN a également été quantifiée dans les milieux de culture (extracellulaires) d'une autre série d'échantillons de cellules exposées à la caféine.

III.1.2 Résultats

III.1.2.1 Optimisation des conditions de différenciation de la lignée HSG

Les cellules HSG mises en culture sur GFR Matrigel dilué ou non présentent une morphologie très différente des cellules mises en culture sur support non précoaté. En effet sur support non précoaté, une monocouche de cellules polygonales et adhérentes a été observée tandis que sur GFR Matrigel dilué, la formation d'un réseau acino tubulaire a été notée dès jour 1 (Fig. 23 A, B, et C). En ce qui concerne les cellules 2D et 3D, des structures acinaires isolées et la formation d'un lumen central ont été observées au cours du temps. Cependant, la membrane cellulaire et le lumen des structures acinaires sont mieux définies dans les cellules 3D (Fig. 23 D).

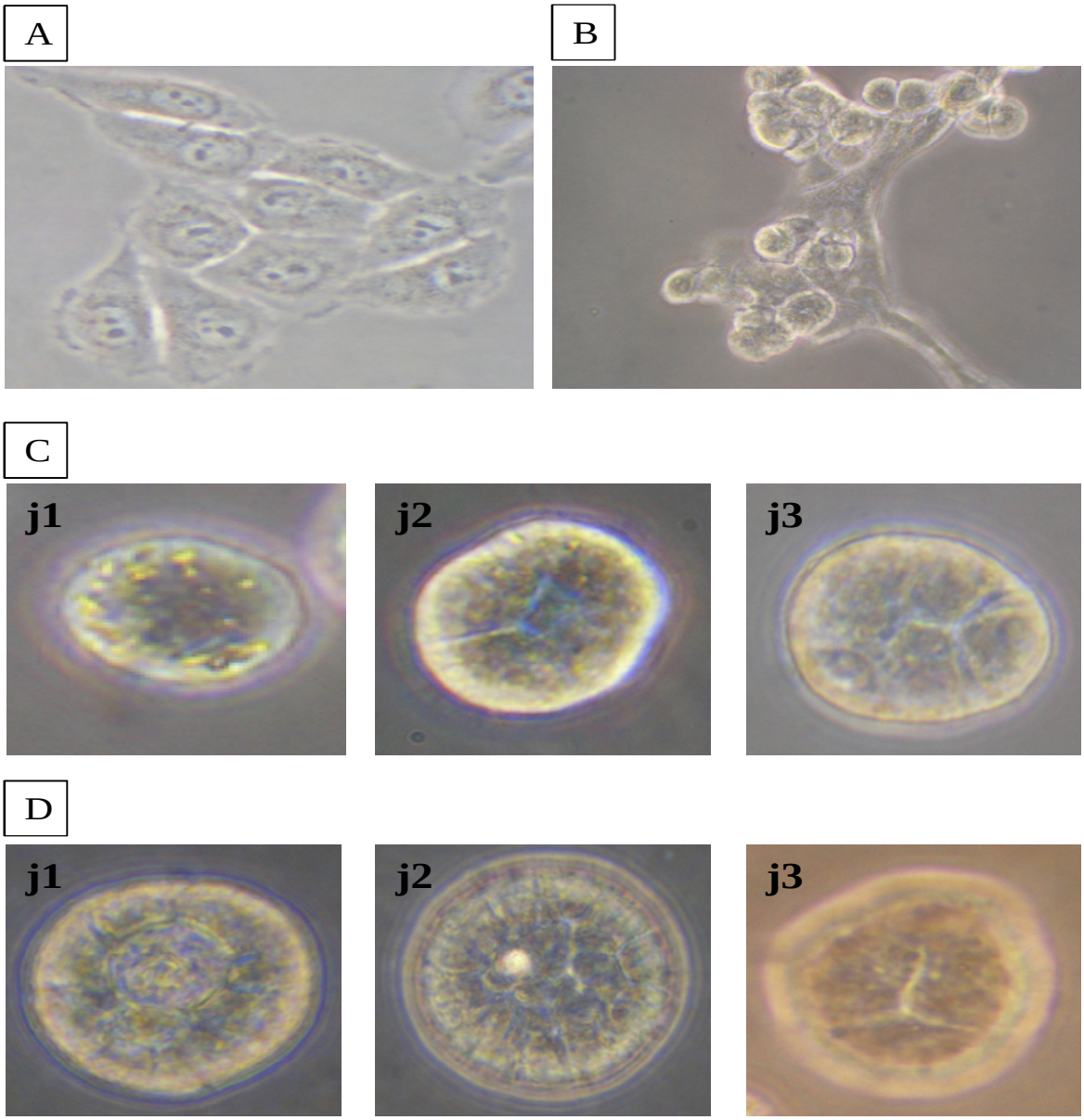


Figure 23 : Observations morphologiques des cellules HSG non différenciées (A) et différenciées sur GFR Matrigel dilué à 5,4 mg/ml (B), 2D (10% SVF, C), et 3D (5% Matrigel et 5% de SVF, D).

À la suite de ces observations microscopiques, les conditions retenues pour l'étude sont celles permettant la différenciation avec la structure tridimensionnelle. Trois essais indépendants ont été effectués.

III.1.2.2 Différenciation et fonctionnalité de la lignée HSG

Expression en ARNm de AMY1A et CST1 dans les cellules HSG

L'intégrité des ARN totaux utilisés pour la transcription inverse a été vérifiée. La figure 24 montre le profil électrophorétique des ARN totaux extraits des cellules HSG 1, 1.5, 2, et 4 jours après ensemencement pour les cellules non différenciées et 1 et 2 jours après ensemencement pour les cellules différenciées. Les ARN totaux à jour 3 dans les cellules HSG non différenciées et à jour 1.5, 3 et 4 dans les cellules différenciées présentaient un profil similaire.

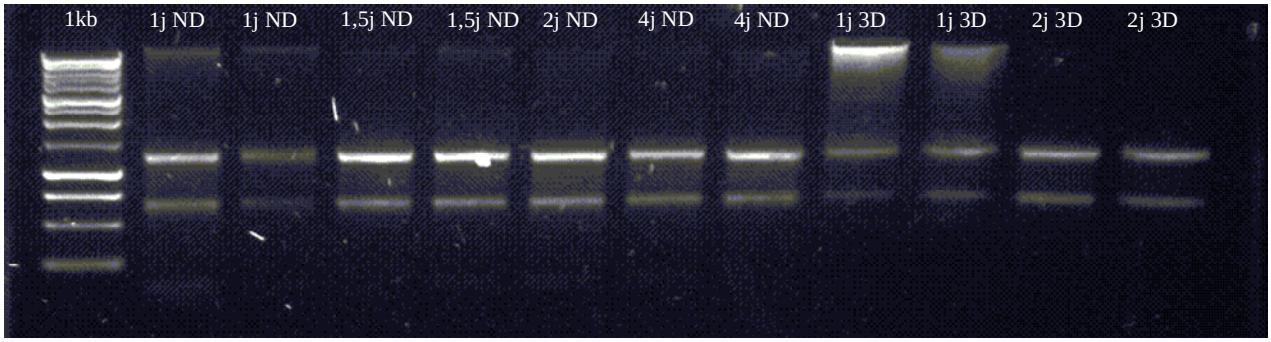


Figure 24 : Profil électrophorétique des ARN totaux extraits 1, 1.5, 2 et 4 jours après ensemencement dans les cellules non différenciées (ND) et 1 et 2 jours après ensemencement pour les cellules différenciées (3D).

Les ARN totaux extraits des cellules HSG non différenciées et différenciées sont intacts.

Les transcrits du gène AMY1A sont très faiblement exprimés dans les cellules HSG non différenciées. Les transcrits du gène AMY1A dans les cellules différenciées sont surexprimés au jour 1 ($\Delta\Delta$Ct = 74,56), jour 2 ($\Delta\Delta$Ct = 6,93), et jour 3 ($\Delta\Delta$Ct = 5,24), comparé aux cellules non différenciées. Mais cette surexpression décroit avec le temps (Fig. 25). Les transcrits du gène CST1 n'ont pas été détectés dans les cellules HSG, quels que soient les conditions ou le temps de culture.

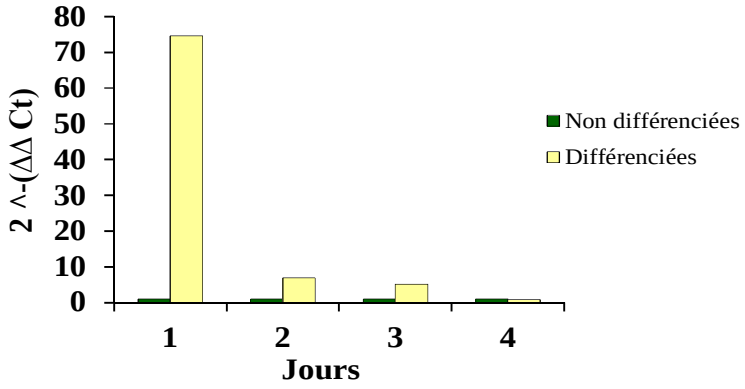


Figure 25 : Expression du gène AMY1A dans les cellules HSG non différenciées et différenciées.

Expression de l'amylase et de la cystatine SN dans les cellules HSG et expression de l'amylase dans les milieux de culture

Aucune bande correspondant à l'amylase n'a été détectée dans les cellules HSG ou dans les milieux de culture par Western Blot, et ce, quels que soient les conditions ou le temps de culture. Une bande de 15 kDa correspondant à la cystatine SN a été détectée dans les cellules HSG non différenciées et différenciées. Deux bandes supplémentaires d'environ 23 et 28 kDa ont également été détectées respectivement dans les cellules HSG différenciées jour 2 et 3 uniquement et dans les cellules HSG non différenciées et différenciées (Fig. 26). Ces bandes (23 et 28 kDa) n'ont pas été observées dans la salive humaine.

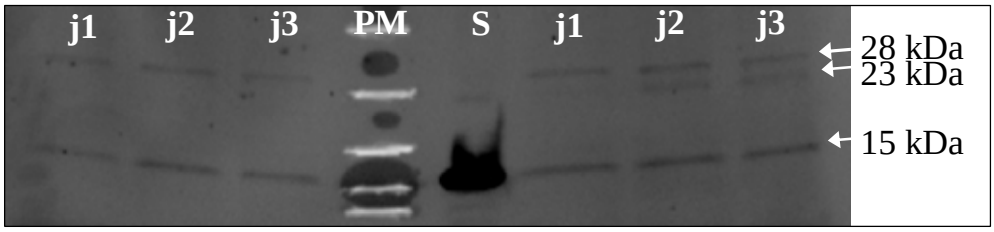
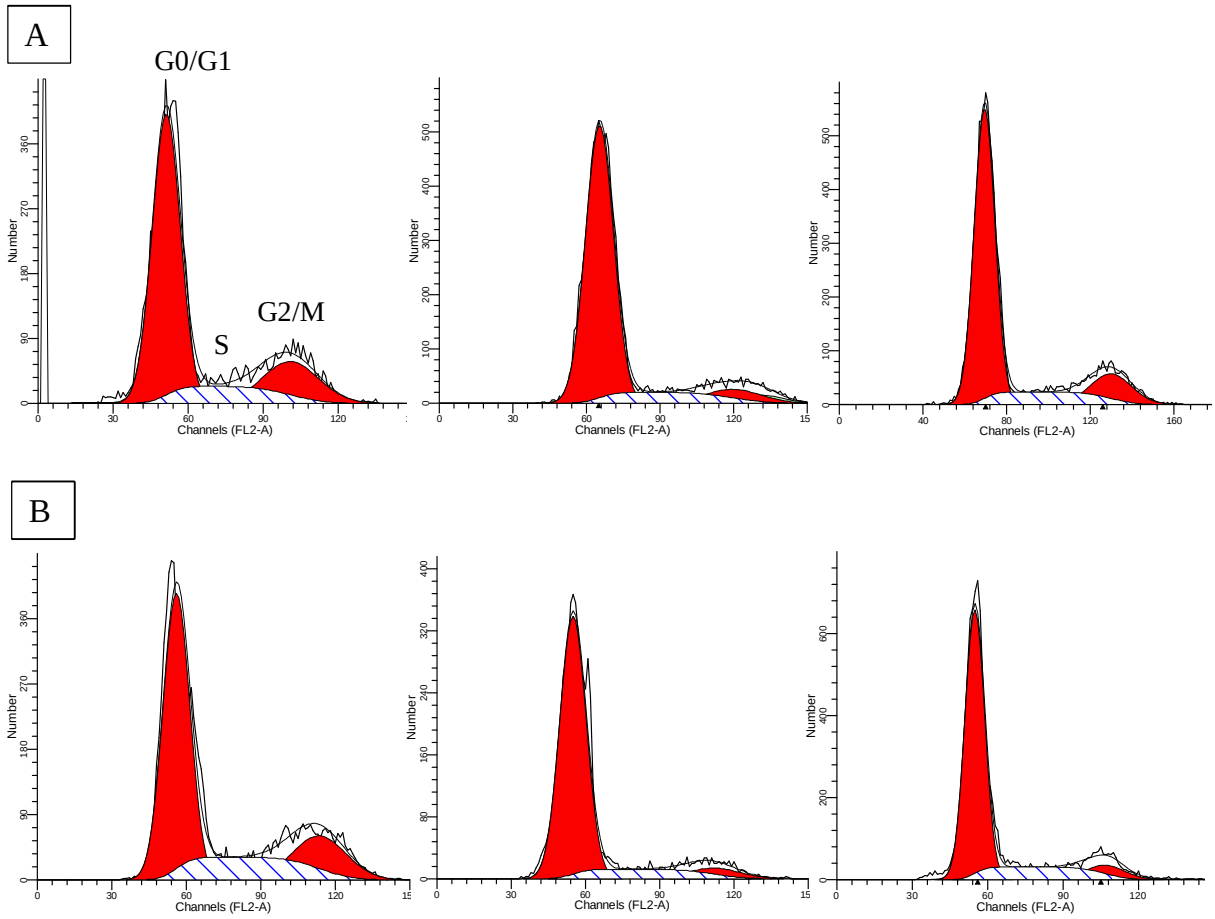


Figure 26 : Expression de la cystatine SN dans les cellules HSG non différenciées (à gauche de l'échelle) et différenciées (à droite de l'échelle) évaluée par Western Blot. S= salive. PM : marqueur de poids moléculaire (Precision Plus Protein Unstained Standards, Bio-Rad).

Cycle cellulaire

Double marquage BrdU/IP

Les cellules HSG non différenciées ou différenciées ne semblent pas avoir incorporé le BrdU. Cependant, les données d'iodure de propidium ont mis en évidence la présence d'un cycle cellulaire avec une phase S. Par cette méthode, on observe uniquement une diminution de la phase G2/M avec les cellules différenciées au jour 2 et 3 (Fig.27 A et B et Tableau).

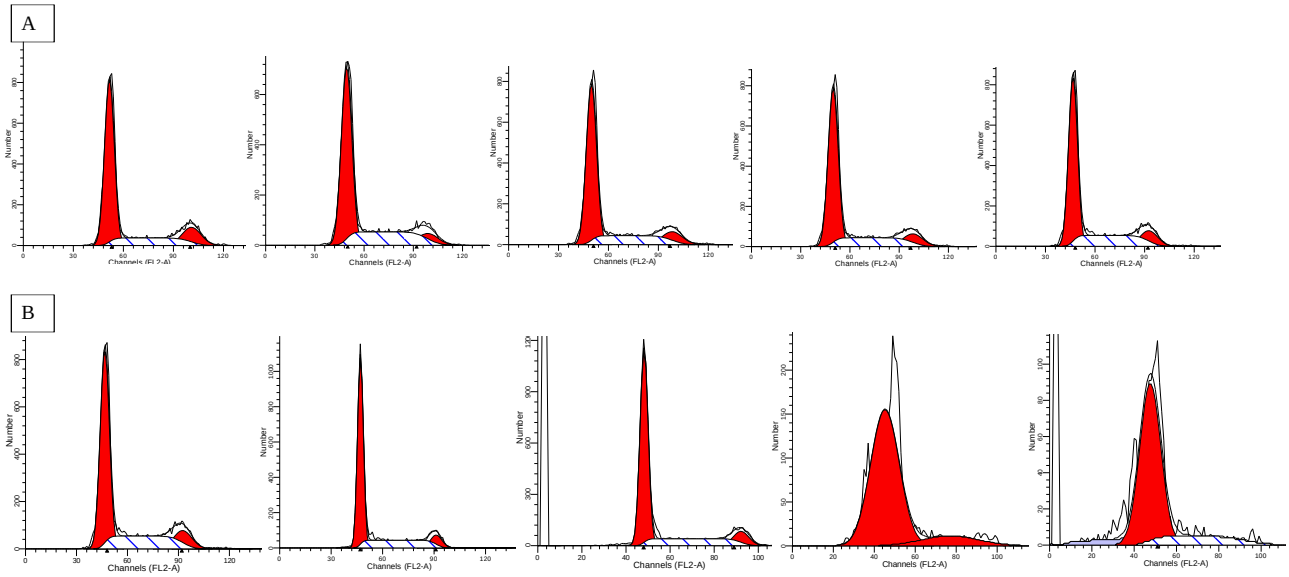


	Jours	Phases (%)		
		G0/G1	S	G2/M
Cellules HSG non différenciées	1	70,72	10,86	18,41
	2	77,25	10,79	11,96
	3	71,29	11,14	17,57
Cellules HSG différenciées	1	67,92	10,93	21,16
	2	80,62	7,06	12,34
	3	74,94	10,75	14,30

Figure 27 : Cycle cellulaire des cellules HSG non différenciées (A) et différenciées (B) par Double marquage BrdU/IP. Les jours 1, 2 et 3 sont alignés de gauche à droite. Les valeurs sont la moyenne ± SEM (3 essais indépendants).

Méthode Vindelov

La proportion de cellules HSG non différenciées arrêtées en phase G0/G1 était stable au cours du temps (Fig. 28 A). La proportion de cellules en phase S, quant à elle, semble augmenter entre jour 1 et jour 3 puis diminuer aux jours 4 et 5. Inversement, la proportion de cellules en phase G2/M a diminué entre jour 1 et jour 3 puis augmenté au jour 4. Contrairement aux cellules non différenciées, la proportion de cellules HSG différenciées arrêtées en phase G0/G1 semble augmenter au cours du temps (Fig. 28 B). La phase S des cellules HSG différenciées semble stable au cours du temps. La proportion de cellules différenciées en phase G2/M a diminué au cours du temps.



		Phases (%)		
		G0/G1	S	G2/M
Cellules HSG non différenciées	1	66,90	15,47	17,64
	2	64,33	22,03	13,64
	3	65,20	25,00	9,80
	4	67,03	17,36	15,60
	5	63,50	20,23	16,27
Cellules HSG différenciées	1	65,61	13,58	20,80
	2	68,53	17,54	13,93
	3	71,08	13,63	15,29
	4	76,78	15,25	7,97
	5	80,05	13,94	6,01

Figure 28 : Cycle cellulaire des cellules HSG non différenciées (A=) et différenciées (B) par la méthode Vindelov (1 essai). Les jours 1 à 5 sont alignés de gauche à droite.

III.1.2.3 Cytotoxicité

Effets cytotoxiques de la caféine, de la quinine et de l'urée

Le marqueur positif SDS est cytotoxique après 24 heures sur cellules différenciées ou non.

Caféine

La viabilité des cellules non différenciées ne semble pas affectée par la présence de caféine, à l'exception de la caféine à 1 µM jour 5 (54%) (Fig. 29 A). Une augmentation du pourcentage de viabilité est observée au jour 4 pour les concentrations en caféine supérieures à 5 µM. Quelle que soit la concentration de caféine testée, aucun effet cytotoxique n'a été observé sur les cellules différenciées.

Quinine

La quinine n'a pas d'effet cytotoxique à 1 µM sur les cellules HSG non différenciée sur une période de 6 jours (Fig. 29 B). A 50 µM, l'effet devient cytotoxique après 4 jours (58%). A des concentrations supérieures (de 50 à 350 µM), la viabilité des cellules est détectée à partir du quatrième jour. 400, 450, et 500 µM sont des concentrations cytotoxiques, toutes les cellules sont mortes au jour 3. Dans le cas des cellules différenciées, aucun effet cytoxique n'a été observé à 2, 50, ou 150 µM de quinine sur une période de 3 jours. L'exposition à 300 µM de quinine était, quant à elle, cytotoxique dès le deuxième jour (46%).

Urée

La viabilité des cellules non différenciées ne semble pas affectée par la présence d'urée (Fig. 29 C). Une augmentation du pourcentage de viabilité est même observée au jour 4 pour les concentrations en urée supérieures à 100 µM, mais cet effet n'a pas été retrouvé au jour 5. Quelle que soit la concentration d'urée testée, aucun effet cytotoxique n'a été observé sur les cellules différenciées.

Les concentrations retenues pour la suite des études sont 5, 50, 100 µM pour la caféine, 2, 50, ou 150 µM pour la quinine, et 500, 5000, 10000 µM pour l'urée.

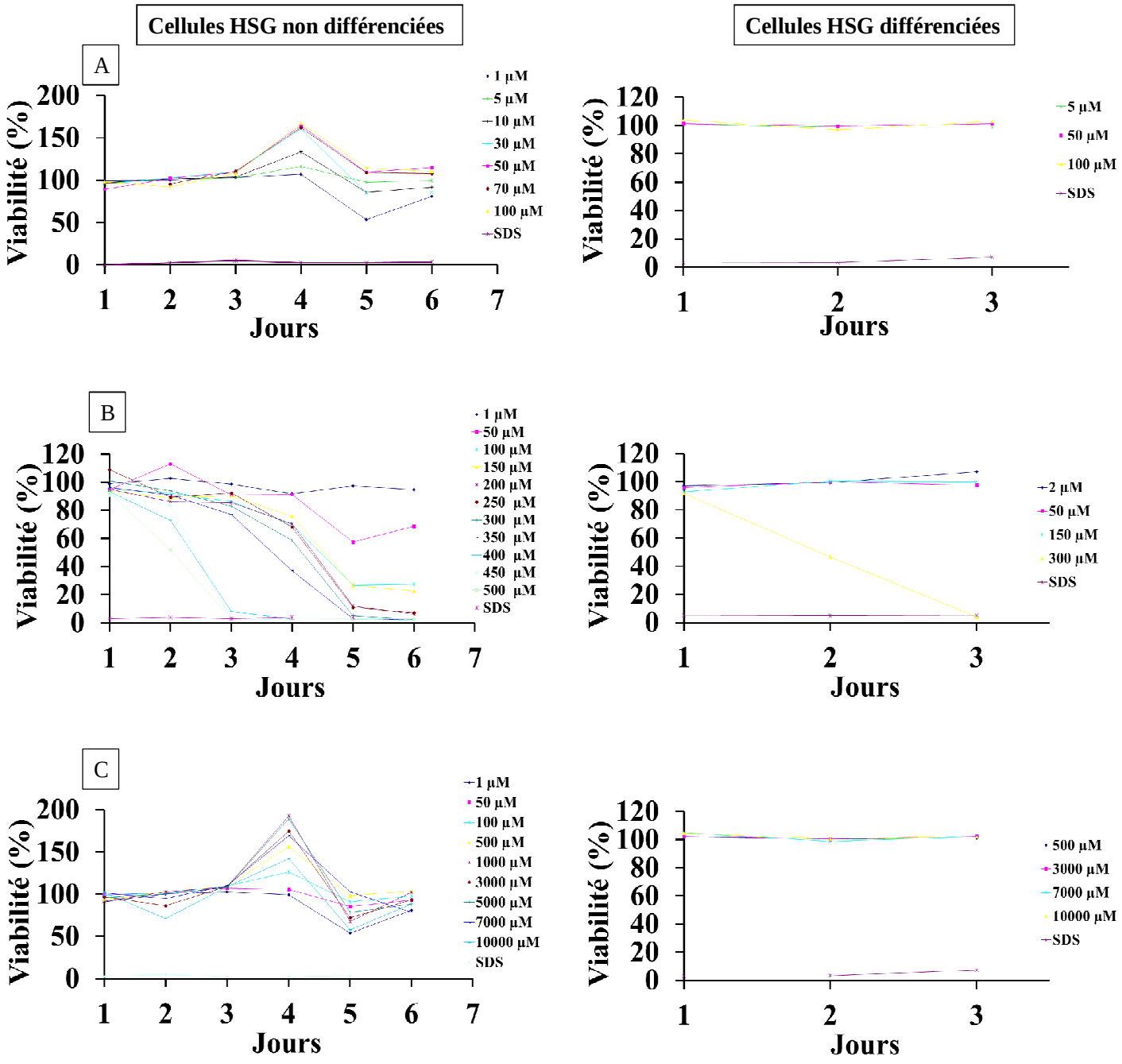


Figure 29 : Cytotoxicité de la caféine (A), de la quinine (B) et de l'urée (C) dans les cellules HSG non différenciées (à gauche) et différenciées (à droite). Les valeurs sont la moyenne ± SEM (2 essais indépendants).

III.1.2.4 Détection de la cystatine SN dans les cellules HSG exposée à la caféine, à la quinine, et à l'urée

Expression de la cystatine SN dans les cellules HSG exposées à la caféine, à la quinine ou à l'urée (Western Blot)

L'expression de cystatine SN dans les cellules HSG différenciées ou non exposées à l'urée était très faible (Fig. 30 A). La présence d'une bande de cystatine SN de 15 kDa, poids moléculaire de la protéine entière, a été détectée dans les cellules HSG différenciées ou non exposées à la caféine et à quinine, et ce quelle que soit la concentration testée ou le jour (Fig. 30 B et C). Une bande supplémentaire d'environ 28 kDa a également été détectée dans ces mêmes échantillons. La présence de cette bande (28 kDa) n'a pas été observée dans la salive. Due à une grande variabilité entre les essais, la semi-quantification des bandes n'a pas permis de conclure sur un effet de la caféine ou de la quinine sur l'expression de la cystatine SN.

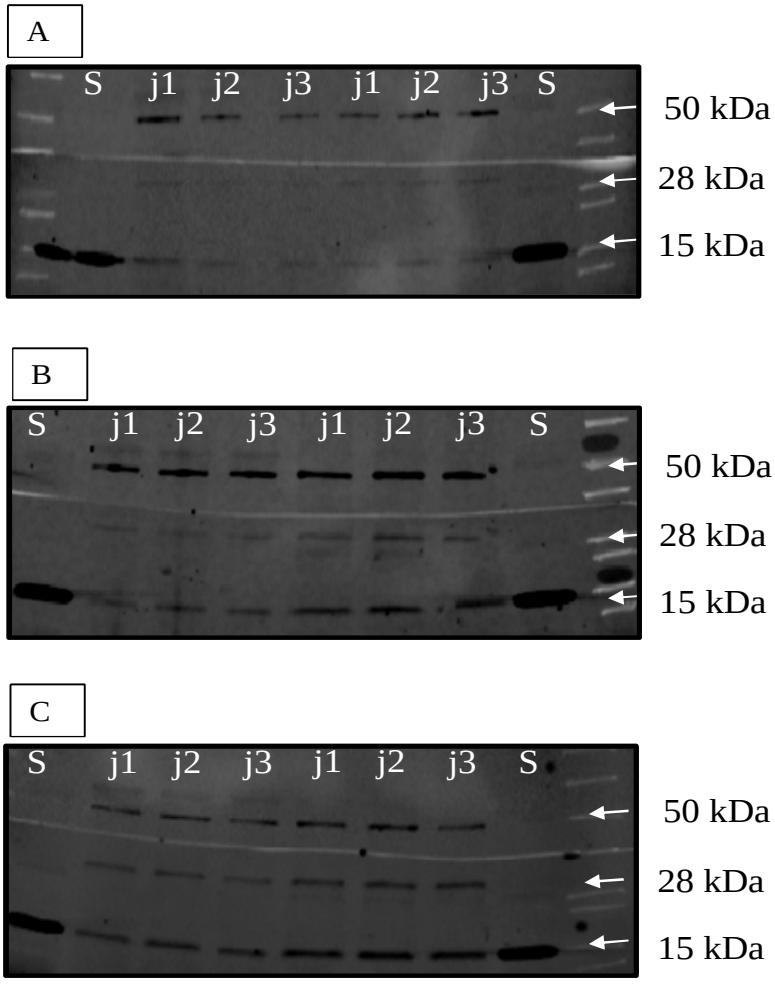


Figure 30 : Effet de l'urée 5000 µM (A), de la quinine 2µM (B) et de la caféine 50µM (C) sur les cellules HSG différenciées par Western blot. La tubuline (50 kDa) a été utilisée comme protéine de référence.

Expression de la cystatine SN dans les cellules HSG exposées à la caféine et à la quinine (méthode ELISA)

La quinine à 50 et 150 µM augmente systématiquement la concentration relative en cystatine SN dans les cellules différenciées après le jour 1 (Tableau 6) alors que la concentration demeure stable dans les cellules non différenciées. Une grande variabilité entre les essais est observée dans le cas de la caféine, ce qui ne permet pas de conclure sur l'effet de cette molécule.

Tableau 6 : Effet de la quinine et de la caféine sur les cellules HSG différenciées : ratio de la concentration en cystatine SN (mesurée par ELISA) sur la concentration totale en protéines. Les valeurs sont la moyenne de 3 essais indépendants.

		Quinine				Caféine			
	Jour	Contrôle	2	50	150	Contrôle	5	50	100
HSG non différenciées	1	10945	8846	12104	10134	10051	10724	8878	15369
	2	13957	8833	12944	11945	10873	9444	9829	15438
	3	13324	8000	12368	9721	9052	9611	10909	10435
HSG différenciées	1	15732	12934	12506	16902	11952	11479	11600	12252
	2	12520	14174	14904	18522	11103	11852	12132	8979
	3	13118	10860	15303	17874	13117	11699	13778	14385

Les résultats obtenus avec les deux méthodes, Western blot et test ELISA, ont été comparés (Fig. 31) lorsque les cellules différenciées étaient exposées à la quinine à 2 µM. On remarque la même tendance, une augmentation de l'expression de la cystatine SN au jour 2 et une diminution au jour 3. Cette convergence des résultats entre les deux méthodes a été observée avec les autres traitements.

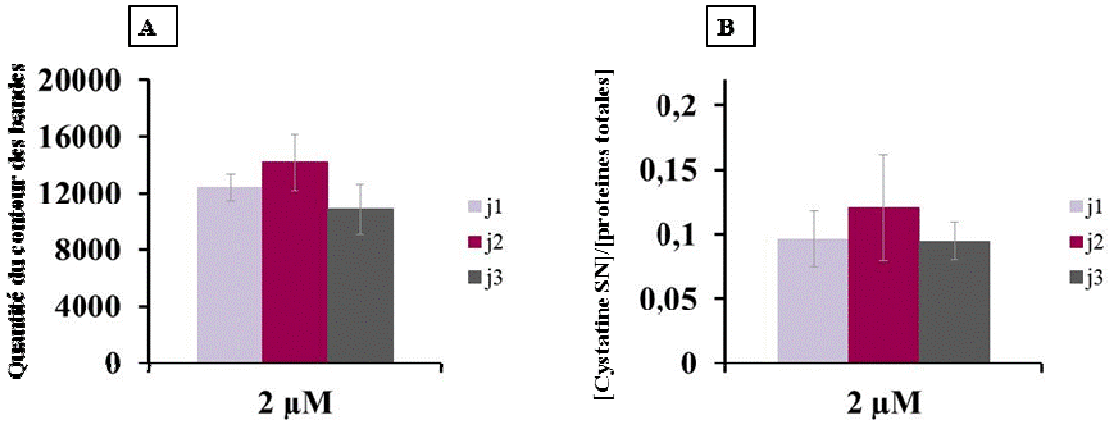


Figure 31 : Semi-quantification et quantification de la cystatine SN respectivement par Western blot (A) et ELISA (B) dans les cellules HSG différenciées exposées à la quinine (2 µM). Valeurs moyennes (2 essais indépendants).

Expression de la cystatine SN dans les milieux de culture des cellules HSG exposées à la caféine

La cystatine SN n'était pas présente dans le milieu de culture initial ou dans le tampon RIPA. Par contre, la cystatine SN a été détectée dans le milieu de culture au jour 2 dans les cellules HSG différenciées et seulement au jour 3 dans les cellules non différenciées (Fig. 32), en absence d'exposition à la caféine. Les quantités de cystatine SN sont plus importantes dans les cellules non différenciées en comparaison aux cellules différenciées au jour 3.

Quand les cellules sont exposées à la caféine, que ce soit dans les milieux provenant des cellules différenciées ou non, on n'observe pas d'effet dose puisque les quantités de cystatine sont globalement similaires quelle que soit la concentration de caféine utilisée, à l'exception du jour 2 à 50 µM dans les cellules non différenciées où on observe une quantité plus importante.

Un effet temps a aussi été observé. La concentration de cystatine SN augmente avec le temps. La cystatine SN apparait plus tôt dans les cellules différenciées, dès jour 1 quelle que soit la dose. Dans les cellules HSG non différenciées, elle apparait seulement au jour 2 pour celles traitées avec 5 et 50 µM. et jour 1 pour les cellules traitées avec 100 µM de caféine.

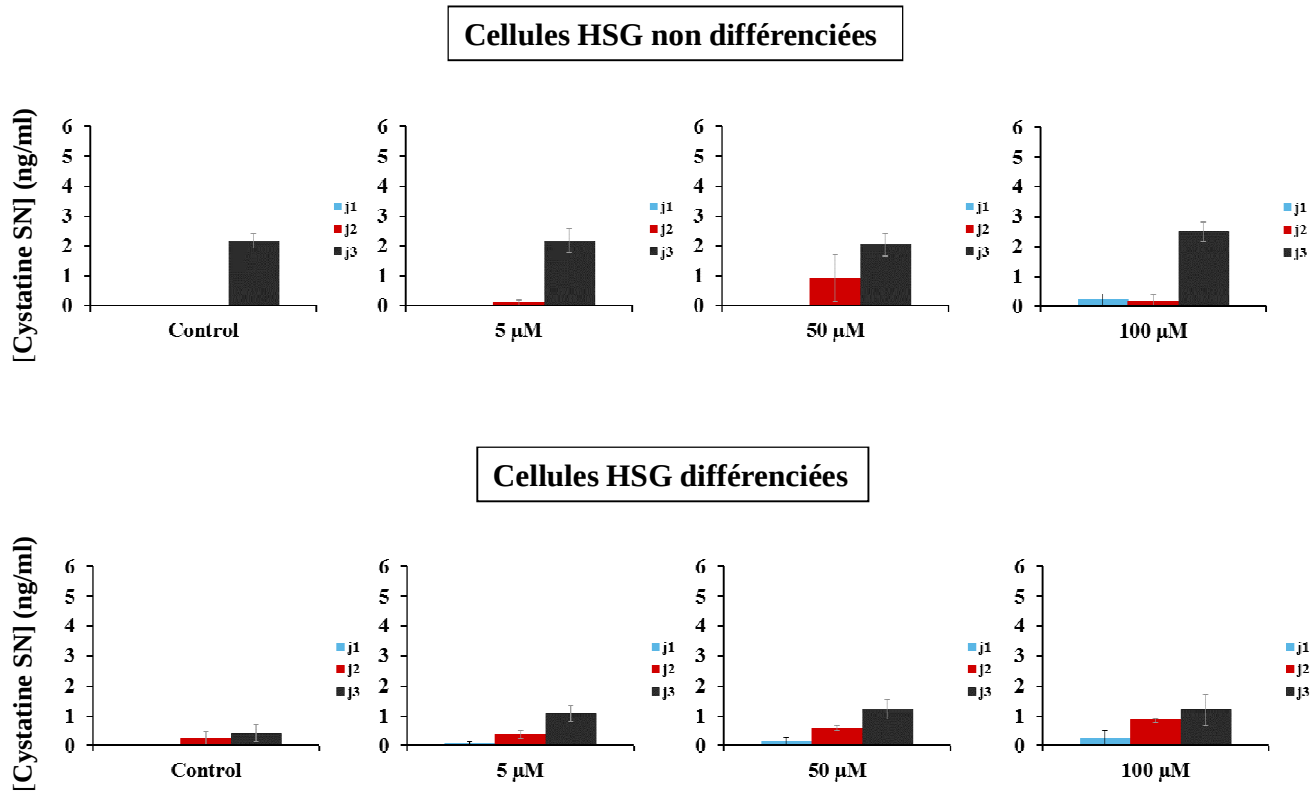


Figure 32 : Effet de la caféine sur la quantité de cystatine mesurée dans le milieu de culture des cellules HSG non différenciées et différenciées par ELISA. Moyennes ± SEM exprimées en ng/ml (3 essais indépendants).

III.2 ARTICLE 2 - PRINCIPAUX RÉSULTATS

Les observations morphologiques ont montré que les cellules HSG non différenciées avaient une forme épithéliale et aplatie tandis que les cellules HSG différenciées sur GFR Matrigel formaient des structures semblables aux acini des glandes salivaires. La croissance des cellules différenciées était ralentie par rapport à celle des cellules non-différenciées.

La cystatine SN a été mise en évidence par Western blot dans les cellules HSG non différenciées et différenciées. L'analyse par ELISA a montré que la cystatine SN dans les cellules HSG différenciées était toujours plus élevée que dans les cellules non-différenciées. Indépendamment du statut des cellules, l'expression de cystatine augmentait de façon significative au cours des 3 jours de l'étude.

Aux trois concentrations testées, la caféine augmentait significativement le taux de cystatine SN dans les cellules différenciées comparé au témoin avec un effet dose, l'effet le plus marqué étant à 50 µM.

ARTICLE 2

Caffeine increases the expression of cystatin SN in human submandibular acinar cells

Micheline Dsamou [1,2,3], Martine Morzel [1,2,3], Ludovic Le Corre [4], Isabelle Séverin [1,2,3], Marie-Christine Chagnon [1,2,3]

1 CNRS, UMR6265 Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation, F-21000 Dijon, France
2 INRA, UMR1324 Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation, F-21000 Dijon, France
3 Université de Bourgogne, UMR Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation, F-21000 Dijon, France
4 INSERM UMR866, AgroSup Dijon, Laboratoire Nutox, F-21000 Dijon, France

Keywords : bitterness, caffeine, HSG cell line, saliva, salivary gland

Correspondence to be sent to : Martine Morzel, UMR1324 Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation, 17 rue Sully, 21000 Dijon, France. e-mail : Martine.Morzel@dijon.inra.fr

Abstract

The effect of caffeine on expression of cystatin SN, a previously identified salivary marker of sensitivity to bitterness in Humans, was studied in vitro. First, differentiation of Human submandibular gland (HSG) cells was induced by culturing cells on Matrigel. Unlike undifferentiated cells, HSG cells cultured on Matrigel progressively developed acinar morphological features and exhibited slower cell growth. Caffeine cytotoxicity was then assessed over 3 days by the Resazurin test. At concentrations relevant to human adult plasma levels (5, 50 and 100 µM), caffeine did not affect cell viability whether cells were differentiated or not. The HSG cell line proved therefore to be a relevant tool to study in vitro the effect of a food constituent at concentrations consistent with dietary intake in Humans. Finally, effects of 5, 50 and 100 µM caffeine exposure on cystatin SN expression were explored over 3 days by ELISA. Cystatin SN levels were overall higher in differentiated cells and increased with time in both conditions. There was a significant ($p<0.001$) effect of caffeine on cystatin SN expression specifically in differentiated cells. The results suggest that salivary cystatin SN abundance may depend on caffeine intake, with possible consequences on taste sensitivity.

Introduction

Caffeine is one of the most common bitter molecules present in food and in particular in beverages such as coffee, tea or cola-based sodas. Depending on countries, daily caffeine intake range from 3 to 7 mg.kg-1 body weight (bw) and can reach 15 mg.kg-1 bw for high-level consumers (Nawrot et al. 2003). Excluding high-level consumers, average caffeine plasma levels range from 5 to 20 µM (Daly and Fredholm 1998) and reach approximately 55 µM after acute caffeine ingestion (Robertson et al. 1981). Caffeine has a wide range of effects on the human body, as reviewed by Butt and Sultan (2011) Heckman et al. (2010) or Nawrot et al. (2003). Benefits of moderate caffeine consumption include improved cognitive performance, decreased incidence of type II diabetes mellitus or decreased risk of Alzheimer's disease. In contrast, excessive caffeine consumption has adverse effects on mood (anxiety, irritability), cardiovascular function or female fecundability.

One of the factors dictating the consumption of caffeine-based beverages for one given subject is the acceptability of its bitter taste. Sensory sensitivity to caffeine varies greatly between individuals, with detection thresholds varying at least 15-fold (Dsamou et al. 2012; Keast and Roper 2007). In a previous study, we have shown that salivary protein composition differed between male subjects hyper- and hyposensitive to the bitter taste of caffeine (Dsamou et al. 2012). In particular, cystatin SN, a protease inhibitor, was over-expressed in hyposensitive subjects. Caffeine consumption was on average higher in this group (unpublished data), in accordance with an earlier study (Mela et al. 1992). It remains unknown, however, whether caffeine consumption is at the origin of the increased levels in cystatin SN.

In Humans, salivary composition may be regulated by tastants. For example, short-term modification of saliva proteome has been observed in response to various bitter molecules (Cabras et al. 2012; Neyraud et al. 2006; Quintana et al. 2009). In this context, further knowledge on how caffeine regulates cystatin SN expression is of interest. A model of choice for such a study is the Human submandibular gland (HSG) cell line established by Shirasuna et al. (1981). When grown on specific media such as Growth Factor Reduced (GFR) Matrigel (Vag et al. 2007), HSG cells differentiate to form acini, the cellular structures mainly responsible for saliva secretion. The present study consists of three parts. In a first series of experiments aiming at characterizing

HSG cells differentiation, HSG cells were cultured on non-coated or GFR Matrigel coated dishes and monitored in terms of morphology and growth. A second series of experiments investigated the cytoxicity of caffeine at three concentrations towards undifferentiated and differentiated HSG cells. Finally, effects of caffeine exposure on cystatin SN expression were explored in either undifferentiated or differentiated cells.

Materials & Methods

HSG cells culture and differentiation

HSG cells (HPA culture collections, London) were maintained in Minimum Essential Medium Eagle (MEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 2mM glutamine, and 1% (w/v) non-essential amino acids. Cells were plated at a density of 5 × 104 cells/ cm2 on either non-coated culture dishes or culture dishes coated with 10.8 mg/ml GFR Matrigel (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA), and kept at 37°C with 5% CO2. The medium described above was used for cells cultured on non-coated dishes. For cells cultured on GFR Matrigel, 5% FBS and 5% Matrigel was added to the medium instead of 10% FBS.

Monitoring of differentiation: morphology and cell growth

Morphological observations and cell growth monitoring were performed daily over a period of five days. Morphological observations were performed at x100 and x400 magnification using an Olympus CK40 light microscope. For cell counting, HSG cells were harvested in 1mM EDTA/0.25% (w/v) trypsin for cells cultured on non-coated dishes, while cells grown on GFR Matrigel were dissociated from Matrigel using Cell Recovery Solution (BD, Franklin Lakes, NJ, USA). Cells were washed in PBS and resuspended in fresh medium. The cell number was determined by a hemocytometer count of viable cells following trypan blue-staining.

Cell treatment with caffeine

Caffeine treatment was applied 24h after plating for cells cultured on non-coated surfaces and 48 h after plating, i.e. after appearance of acinar features, for HSG cells cultured on GFR Matrigel-coated surfaces. Caffeine treatment was applied by discarding the medium and replacing it with new medium containing 2.5 µl/ml caffeine

(Sigma, St Louis, MO, USA) diluted in PBS to reach final concentrations of 5, 50 and 100 µM. Medium containing caffeine was renewed every day. HSG cells treated with only PBS were used as negative controls.

Cytotoxic assay

Two independent trials were performed. HSG cells were plated at a density of 5 × 104 cells/cm² on non-coated 96 wells plates. One, 2 and 3 days after caffeine treatment, medium was discarded, 200µl of 440µM Resazurin (Sigma) was added to each well and incubated at 37°C in 5% CO2 air for 3.5 hours. Positive controls were obtained by adding 3% SDS to cells. Fluorescence (absorbance 540, emission 590 nm) was measured using Chameleon plate reader (Hidex, Turku, Finland). Results (% viability) were calculated as the ratio between readings of the sample versus negative control. Viability above 70% is considered as an indicator of non-cytotoxicity.

Cystatin SN protein expression by ELISA after caffeine treatment

Three independent trials were performed. HSG cells were plated at a density of 5 × 104 cells/cm²on non-coated or GFR Matrigel coated 6 wells plates (1 plate/day/condition). One, 2 and 3 days after caffeine treatment the medium was discarded from the plates and cells were washed twice with PBS. Proteins from cells grown on non-coated dishes were directly extracted using RIPA lysis buffer (50mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.1% NP40, 0.1% SDS, 0.5% deoxycholate, 1mM EDTA pH8). Cells grown on GFR Matrigel coated dishes were first dissociated from Matrigel using Cell Recovery Solution and then proteins were extracted using RIPA lysis buffer. Protein content was measured in duplicate in the cell lysates using the Bradford method, using γ-globulin as standard.

Quantification of cystatin SN in cell lysates was done using ELISA (Human Cystatin-SN (CST1) ELISA kit, CUSABIO, Wuhan, China) following the manufacturer's instructions. Optical density was measured using Victor3V microplate reader (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA). Results were expressed in ng of cystatin SN per µg of total protein.

Statistics

Statistics were performed using Statistica software (StatSoft). First, the overall effects of culture conditions (non-coated or GFR Matrigel coated supports), exposure time and caffeine concentrations and their interactions were tested by factorial ANOVA. Second, the effect of caffeine concentration on cystatin SN abundance in each condition was tested by one-way ANOVA followed by post-Hoc Fisher's LSD test.

Results

Morphological features and growth of HSG cells

HSG cells grown on non-coated dishes formed a monolayer of epithelial cells, which continuously proliferated until confluency was reached on day 5 (Fig. 1A). HSG cells cultured on GFR Matrigel coated dishes showed a morphological differentiation over time. Within a reticular network, some cells first clustered to form isolated rounded structures on day 1. These structures subsequently developed acinar-like features, with formation of a lumen from day 2 which progressively branched out and persisted until day 5 (Fig. 1B). Ultimately, acinar and acinotubular structures were observed.

HSG cells cultured on non-coated dishes grew continuously and reached 3.3 × 105 cells/mL on day 5. When cultured on GFR Matrigel coated dishes, the number of cells was significantly ($p<0.01$) lower (Fig. 2) and reached a peak on day 4 (2.2 × 105 cells/mL). Growth was also slower, with a doubling time of about 50h versus 34h for HSG cells grown on non-coated dishes.

Cytotoxic effect of caffeine

As expected, SDS was highly cytotoxic to HSG cells. In contrast, caffeine did not affect cell viability at any of the three concentrations tested (5, 50, 100 µM) over a period of 3 days, whether cells were morphologically differentiated or not (Fig. 3).

Detection of cystatin SN in HSG cells exposed to caffeine

Cystatin SN was detected in all cell lysates (Fig. 4A and 4B). Overall, the relative quantity of cystatin SN was significantly different depending on culture conditions ($p<0.001$) and on exposure time ($p<0.001$). Cystatin SN levels were overall higher in morphologically differentiated cells compared to undifferentiated cells. Levels increased with exposure time in both conditions. The caffeine concentration had a

significant ($p<0.001$) effect on cystatin SN expression, but this effect depended on culture conditions ($p<0.001$ for caffeine/ culture conditions interaction) and on exposure time ($p<0.05$ for caffeine/time interaction).

In undifferentiated HSG cells (Fig. 4A and Table 1), cystatin SN levels increased by 2.3 to 3.6-fold from day 1 to day 3. Caffeine had no significant effect on cystatin SN over-expression with time.

In morphologically differentiated cells (Fig.4B), regardless of the caffeine concentration, the levels on day 1 were already higher than initial levels in undifferentiated cells. Cystatin SN levels were always higher in cells that were exposed to caffeine compared to the controls. Indeed, caffeine had a significant effect ($p<0.001$) on cystatin SN over-expression with time, and post-hoc tests confirmed that the control differed significantly from 5 ($p<0.001$), 50 ($p<0.001$) and 100 ($p<0.01$) µM. Concentrations increased by 1.4 to 2.4-fold from day 1 to day 3 (Table 1).

Discussion

This study aimed at investigating in vitro the effect of caffeine on the expression of cystatin SN, a salivary protein previously identified as a marker of sensory sensitivity to bitterness in Humans (Dsamou et al. 2012). Prerequisites to perform this study were to verify that HSG cells could be differentiated into secretory cells (forming acini) and that caffeine exhibited no cytotoxic effect on such cells.

Relevance of differentiated HSG as a model to study food-modulated salivary secretion

Culturing HSG cells on laminin or Matrigel, a basement membrane extract, has been previously shown to induce cytodifferentiation characterized by morphological changes and over-expression of salivary markers such as α-amylase or salivary cystatins (Hoffman et al. 1996; Lam et al. 2005; Royce et al. 1993). Based on the report that the use of GFR Matrigel induced clearer acinar structures than regular Matrigel (Vag et al. 2007), we opted for this protocol. In accordance with previous studies (Szlavik et al. 2008; Vag et al. 2007), morphological features similar to salivary gland acini and acino-tubular structures were observed. The lower growth observed in differentiated cells is also in line with decreased cell proliferation rate previously reported (Maria et al. 2011;

Szlavik et al. 2008; Vag et al. 2007). Finally, the higher levels of cystatin SN observed in differentiated cells in this study corroborate findings of Lam et al. (2005) where HSG cells were cultured on regular Matrigel. Taken together, these observations indicate that HSG cells grown on GFR Matrigel are morphologically and functionally differentiated and appear as a relevant model to study secretory events occurring in the submandibular gland.

To our knowledge, caffeine cytoxicity towards HSG cells has not been investigated previously. In rat alveolar macrophages, caffeine concentration below 5 mM did not affect cell viability over 3 days (Jafari and Rabbani 2000). It was also reported that after 24 hours, caffeine at 10, 50, or 100 µM was non-cytotoxic to human mononuclear cells (Horrigan et al. 2004). Our data are in agreement with these studies, although performed with a different cell type. In Humans, caffeine plasma levels range between 5 and 20 µM, with peak values reaching 50 to 55 µM (Daly and Fredholm 1998; Robertson et al. 1981). Therefore, HSG cells can be used to perform studies on the effects of caffeine on the human submandibular gland, at concentrations relevant to normal consumption and to plasma levels. HSG cells have so far been used to investigate physiological events such as acid-base homeostasis (Oehlke et al. 2011), [Ca2+]i oscillations (Liu et al. 2001) or post-translational modifications of salivary proteins (Drzymala et al. 2000). They also served as a model to decipher mechanisms underlying the Sjögren's syndrome (Bulosan et al. 2011; Tsuboi et al. 2010) or to evaluate the effects of its therapeutic treatment (Pauley et al. 2011). In the present study, HSG cells were used to mimick in vivo conditions that would result from dietary consumption of caffeine-containing beverages. Regarding cystatin expression, the main finding of this study is that caffeine induced a significant over-expression of cystatin SN, specifically in cells differentiated in an acinar phenotype. At the level of the whole organism, this suggests that consumption of caffeine may modulate composition of submandibular saliva.

Mechanistic aspects of cystatin SN expression

The mechanism by which caffeine stimulates cystatin SN expression is not precisely known, but some data are available on the impact of caffeine on rodent submandibular gland cells. Thus, 1mM caffeine had a secretion stimulatory effect as observed through K+ and Cl- transient currents (Smith and Gallacher 1992). An increase of peroxidase secretion was also induced at 50µM caffeine and above (Turner et al. 2009). Salivary

proteins exocytosis occurs mainly through activation of sympathetic β-adrenergic receptors which triggers signaling pathways involving increase of cAMP (Mese and Matsuo 2007). The raised levels of cAMP have also been identified as a key messenger in initiation of exocytosis but also of protein resynthesis (Proctor 1998). Although obtained using lower concentrations, our findings are therefore fairly consistent with the increase of cAMP levels induced by 500µM caffeine in rat submandibular cells (Turner et al. 2009). Another way by which caffeine may exert an action on cystatin expression is its inhibitory activity towards the α1-adrenergic pathway (a pathway which activation results in activation of Protein Kinase C) observed in rat submandibular glands (Seo et al. 1999). By analogy with Jung et al. (2000) who reported that inhibition of Protein Kinase C (PKC)-δ increased amylase gene expression in HSG cells, further studies are required to verify whether caffeine exerts a similar action on the activity of the cystatin SN gene promoter.

Physiological and sensory consequences

Regardless of the mechanism involved, stimulation of cystatin SN expression has a number of physiological consequences. In saliva, Cystatin SN is produced almost exclusively by submandibular glands. For example, Dicksinson et al. (2002) reported mRNA expression in submandibular gland 154-fold higher than in parotid gland. Being a cysteine protease inhibitor, its main function is to regulate proteolytic events in the oral cavity (Baron et al. 1999). As a constitutive component of dental and mucosal pellicles (Bradway et al. 1992), it is also important for the protective lubricating and anti-bacterial effects of these films. Whether caffeine intake has consequences on oral health is largely unknown. Based on in vitro proliferation rates of rat osteaoblats, caffeine intake has been proposed as a contributor to the acceleration of periodontitis (Kamagata-Kiyoura et al. 1999) but caffeine did not affect in vivo the cariogenic potential of diet in rats (Ruenis et al. 2000). On the basis of our results, caffeine may at least modify saliva protein composition.

From a different perspective than pathologies, changes in salivary cystatin SN levels may also have some sensory consequences. Thus, in a healthy population, cystatin SN was over-represented in subjects hyposensitive to the bitter taste of caffeine (Dsamou et al. 2012). The proposed mechanistic hypothesis was that higher cystatin SN levels protect against proteolytic impairment of the salivary film integrity, thereby increasing

accessibility of bitter molecules to taste receptors. Levels of salivary cystatins were also found to be positively correlated to acceptance of a bitter urea solution in human infants (Morzel et al., submitted), which may indicate a reduced sensitivity to this taste. These observations together with findings of the present study raise the question of modulation of taste sensitivity through dietary caffeine-induced salivary modifications. This question applies to adults but also to fetuses and infants, considering that caffeine readily crosses placenta into the amniotic fluid (Grosso and Bracken 2005) and is found in breast milk (Nawrot et al. 2003).

The interplay between diet, taste sensitivity and saliva composition

It has been reported that taste detection thresholds for caffeine are higher in habitual caffeine users compared to non-users (Mela et al. 1992). Consistent with this observation, we found that on average, hyposensitive subjects to the bitter taste of caffeine were more frequent consumers of highly-caffeinated drinks (unpublished data). However, in Mela et al. (1992), acute or chronic ingestion of caffeine had no significant effect on caffeine detection threshold while the present in vitro study suggests that caffeine intake could favour expression of a salivary marker of bitterness low sensitivity / acceptance. It is therefore unclear whether sensitivity to caffeine bitterness reflects preexisting differences between caffeine users and non-users, or whether caffeine consumption can further maintain or even exacerbate taste sensitivities differences.

In addition, one should keep in mind that other diet constituents have been identified as inducing salivary cystatins. In rats for example, cystatin S-like proteins were shown to be over-expressed by diets enriched either in papain, a cysteine protease (Ninomiya et al. 1994), or capsaicin, a pungent ingredient of hot red pepper (Katsukawa and Ninomiya 1999). In human infants, diet transition from milk to a diet containing solid foods resulted in over-expression of S-type cystatins, i.e. cystatins, S, SA and SN (Morzel et al. 2011). The proposed explanation was that food diversification exposed infants to higher loads of papain-like cysteine proteases, and therefore that induction of cystatins contributed to counteract the possible negative effects of excessive in-mouth proteolysis, and the resulting nociceptive stimulation of oral mucosa as observed in rats exposed to a papain rich diet. In contrast, capsaicin (like caffeine) does not exhibit a proteolytic activity, and induction of cystatin S-like proteins was interpreted as a

measure to facilitate ingestion of diets containing irritating or toxic substances (Katsukawa and Ninomiya 1999).

To conclude, the HSG cell line proved to be a relevant tool to study in vitro the effect of a food constituent at concentrations consistent with dietary intake in Humans on the expression of a salivary protein. Given the increasingly recognized importance of saliva in sensory perception of food, this study offers perspectives in the chemosensory field. Using the HSG model, it was further showed that caffeine increased cystatin SN levels in human submandibular acinar-like cells. This suggests that salivary composition may be dependent on a subject's global diet and in turn this may modulate taste sensitivity or even intake of dietary constituents.

Figure 1

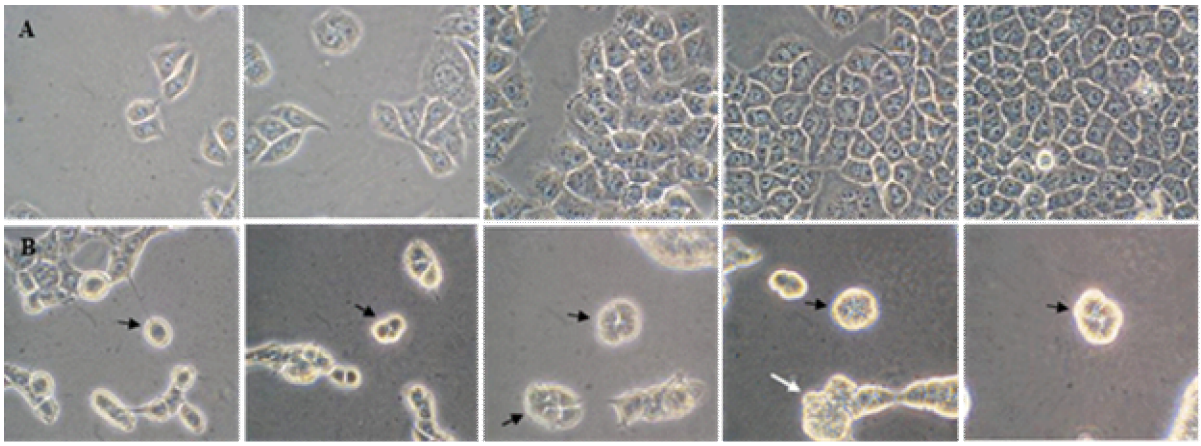


Figure 2

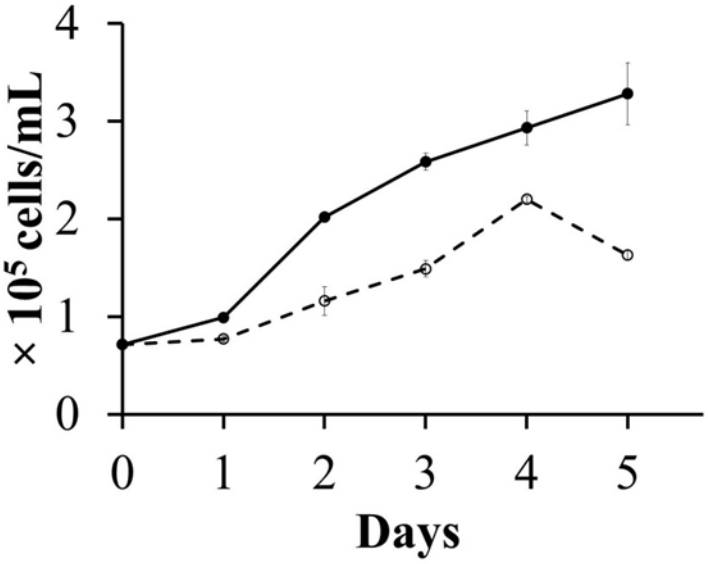


Figure 3

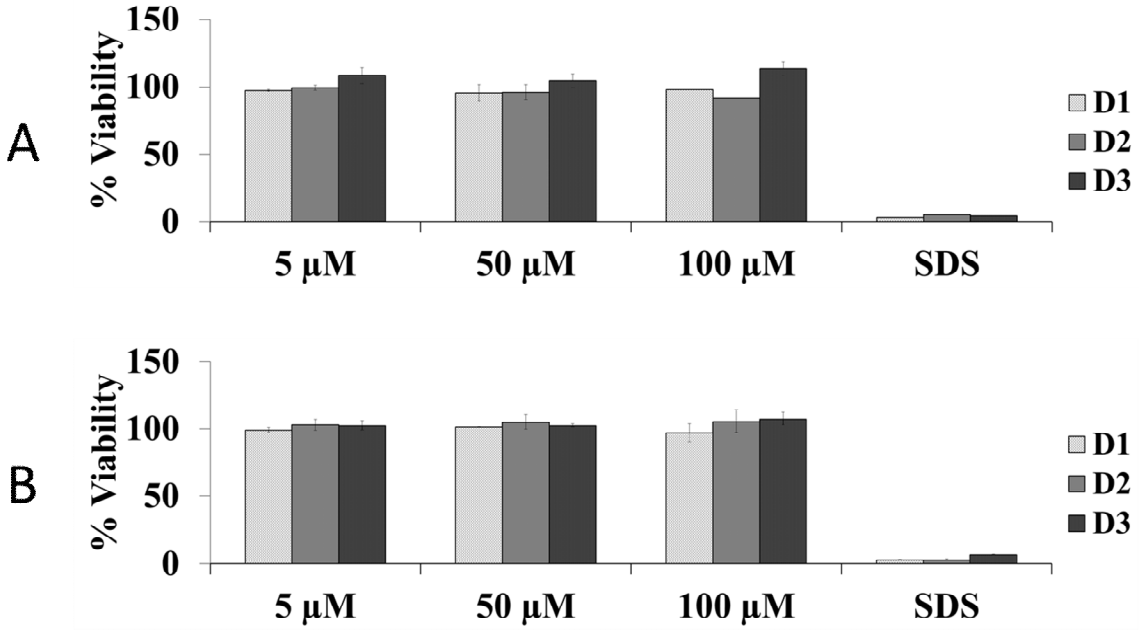


Figure 4

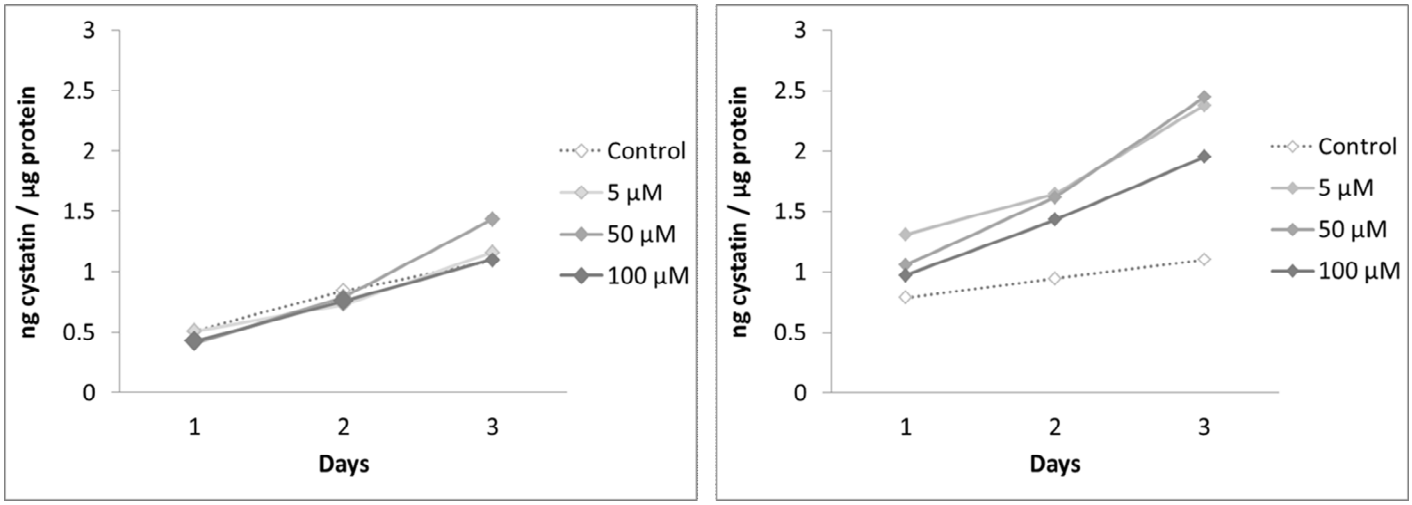


Table 1. Ratios of cystatin SN levels on day 2 and 3 compared to day 1

		Concentrations of caffeine (µM)			
		0	5	50	100
Undifferentiated cells	D2/D1	1.75	1.48	1.98	1.81
	D3/D1	2.32	2.27	3.59	2.67
Differentiated cells	D2/D1	1.32	1.29	1.57	1.49
	D3/D1	1.42	1.83	2.44	2.02

References

Baron AC, DeCarlo AA, Featherstone JDB. 1999. Functional aspects of the human salivary cystatins in the oral environment. Oral Dis. 5:234-240.
Bradway SD, Bergey EJ, Scannapieco FA, Ramasubbu N, Zawacki S, Levine MJ. 1992. Formation of salivary mucosal pellicle - the role of transglutaminase. Biochem J. 284:557-564.
Bulosan M, Pauley KM, Yo K, Chan EKL, Katz J, Peck AB, Cha S. 2009. Inflammatory caspases are critical for enhanced cell death in the target tissue of Sjogren's syndrome before disease onset. Immunol Cell Biol. 87:81-90.
Butt MS, Sultan MT. 2011. Coffee and its consumption: benefits and risks. Crit Rev Food Sci Nutr. 51:363-373.
Cabras T, Melis M, Castagnola M, Padiglia A, Tepper BJ, Messana I, Tomassini Barbarossa I. 2012. Responsiveness to 6-n-Propylthiouracil (PROP) is associated with salivary levels of two specific basic Proline-Rich Proteins in Humans. PLoS ONE. 7(2):e30962.
Daly JW, Fredholm BB. 1998. Caffeine - an atypical drug of dependence. Drug Alcohol Depend. 51:199-206.
Drzymala L, Castle A, Cheung JC, Bennick A. 2000. Cellular phosphorylation of an acidic proline-rich protein, PRP1, a secreted salivary phosphoprotein. Biochem. 39:2023-2031.
Dsamou M, Palicki O, Septier C, Chabanet C, Lucchi G, Ducoroy P, Chagnon MC, Morzel M. 2012. Salivary Protein Profiles and Sensitivity to the Bitter Taste of Caffeine. Chem Senses. 37:87-95.
Grosso LM, Bracken MB. 2005. Caffeine metabolism, genetics, and perinatal outcomes: A review of exposure assessment considerations during pregnancy. Ann Epidemiol. 15:460-466.
Heckman MA, Weil J, de Mejia EG. 2010. Caffeine (1, 3, 7-trimethylxanthine) in foods: A comprehensive review on consumption, functionality, safety, and regulatory matters. J Food Sci. 75:R77-R87.
Hoffman MP, Kibbey MC, Letterio JJ, Kleinman HK. 1996. Role of laminin-1 and TGF-beta 3 in acinar differentiation of a human submandibular gland cell line (HSG). J Cell Sci. 109:2013-2021.
Horrigan LA, Kelly JP, Connor TJ. 2004. Caffeine suppresses TNF-alpha production via activation of the cyclic AMP/protein kinase A pathway. Int Immunopharmacol 4:1409-1417.
Jafari M, Rabbani A. 2000. Dose and time dependent effects of caffeine on superoxide release, cell survival and DNA fragmentation of alveolar macrophages from rat lung. Toxicology. 149:101-108.
Jung DW, Hecht D, Ho SW, O'Connell BC, Kleinman HK, Hoffman MP. 2000. PKC and ERK1/2 regulate amylase promoter activity during differentiation of a salivary gland cell line. J Cell Physiol 185:215-225.
Kamagata-Kiyoura Y, Ohta M, Cheuk G, Yazdani M, Saltzman MJ, Nakamoto T. 1999. Combined effects of caffeine and prostaglandin E-2 on the proliferation of osteoblast-like cells (UMR106-01). J Periodontol. 70:283-288.
Katsukawa H, Ninomiya Y. 1999. Capsaicin induces cystatin S-like substances in submandibular saliva of the rat. J Dent Res 78:1609-1616.
Keast RSJ, Roper J. 2007. A complex relationship among chemical concentration, detection threshold, and suprathreshold intensity of bitter compounds. Chem Senses. 32:245-253.

Lam K, Zhang LF, Bewick M, Lafrenie RM. 2005. HSG cells differentiated by culture on extracellular matrix involves induction of S-adenosylmethione decarboxylase and ornithine decarboxylase. J Cell Physiol. 203:353-361.
Liu X, Liao D, Ambudkar IS. 2001. Distinct mechanisms of Ca2+ (i) oscillations in HSY and HSG cells: Role of Ca2+ influx and internal Ca2+ store recycling. J Membrane Biol. 181:185-193.
Maria OM, Maria O, Liu YF, Komarova SV, Tran SD. 2011. Matrigel improves functional properties of human submandibular salivary gland cell line. Int J Biochem Cell Biol. 43:622-631.
Mela DJ, Mattes RD, Tanimura S, Garciamedina MR. 1992. Relationships between ingestion and gustatory perception of caffeine. Pharmacol Biochem Behav. 43:513-521.
Mese H, Matsuo R. 2007. Salivary secretion, taste and hyposalivation. J Oral Rehab. 34:711-723.
Morzel M, Chabanet C, Schwartz C, Lucchi G, Ducoroy P, Nicklaus S. Salivary protein profiles and taste acceptance in infants: bitterness stands out. Submitted to Physiol. Behav.
Morzel M, Palicki O, Chabanet C, Lucchi G, Ducoroy P, Chambon, C, Nicklaus S. 2011. Saliva electrophoretic protein profiles in infants: Changes with age and impact of teeth eruption and diet transition. Arch Oral Biol 56:634-642.
Nawrot P, Jordan S, Eastwood J, Rotstein J, Hugenholtz A, Feeley M. 2003. Effects of caffeine on human health. Food Addit Contam. 20:1-30.
Neyraud E, Sayd T, Morzel M, Dransfield E. 2006. Proteomic analysis of human whole and parotid salivas following stimulation by different tastes. J Proteome Res. 5:2474-2480.
Ninomiya Y, Kajiura H, Naito Y, Mochizuki K, Katsukawa H, Torii K. 1994. Glossopharyngeal Denervation Alters Responses to Nutrients and Toxic-Substances. Physiol Behav. 56:1179-1184.
Oehlke O, Martin HW, Osterberg N, Roussa E. 2011. Rab11b and its effector Rip11 regulate the acidosis-induced traffic of V-ATPase in salivary ducts. J Cell Physiol. 226: 638-651.
Pauley KM, Gauna AE, Grichtchenko II, Chan EKL, Cha S. 2011. A Secretagogue-Small Interfering RNA Conjugate Confers Resistance to Cytotoxicity in a Cell Model of Sjogren's Syndrome. Arthritis Rheum. 63:3116-3125.
Proctor GB. 1998. Secretory protein synthesis and constitutive (vesicular) secretion by salivary gland. In: Garrett JR, Ekström J & Anderson LC, editors. Glandular mechanisms of salivary secretion. Basel: Karger. p73-88.
Quintana M, Palicki O, Lucchi G, Ducoroy P, Chambon C, Salles C, Morzel M. 2009. Short-term modification of human salivary proteome induced by two bitter tastants, urea and quinine. Chemosens Percept. 2:133-142.
Robertson D, Wade D, Workman R, Woosley RL, Oates JA. 1981. Tolerance to the humoral and hemodynamic effects of caffeine in man. J Clin Invest. 67:1111-1117.
Royce LS, Kibbey MC, Mertz P, Kleinman HK, Baum BJ. 1993. Human neoplastic submandibular intercalated duct cells express an acinar phenotype when cultured on a basement membrane matrix. Differentiation. 52:247-255.
Ruenis APD, Rosalen PL, Volpato MC, Groppo FC. 2000. Effects of caffeine and theophylline on the development of dental caries in rats. Biol Pharmaceut Bull. 23:339-343.
Seo JT, Sugiya H, Lee SI, Steward MC, Elliott AC. 1999. Caffeine does not inhibit substance P-evoked intracellular Ca2+ mobilization in rat salivary acinar cells. Am J Physiol-Cell Physiol. 276:C915-C922.

Shirasuna K, Sato M, Miyazaki T. 1981. A neoplastic epithelial duct cell line established from an irradiated human salivary gland. Cancer. 48:745-752.
Smith PM, Gallacher DV. 1992. Acetylcholine and caffeine evoke repetitive Ca2+ activated K+ and Cl- current in mouse submandibular cells. J Physiol. 449:109-120.
Szlavik V, Vag J, Marko K, Demeter K, Madarasz E, Olah I, Zelles T, O'Connell BC, Varga G. 2008. Matrigel-induced acinar differentiation is followed by apoptosis in HSG cells. J Cell Biochem. 103:284-295.
Tsuboi H, Matsumoto I, Wakamatsu E, Nakamura Y, Iizuka M, Hayashi T, Goto D, Ito S, Sumida T. 2010. New epitopes and function of anti-M3 muscarinic acetylcholine receptor antibodies in patients with Sjogren's syndrome. Clin Exp Immunol. 162:53-61.
Turner S, Manuele MG, Davicino R, Ferraro G, Filip R, Anesini C. 2009. Effect of caffeine on the secretion of peroxidase in rat submandibular gland: A study of its mechanism of action. Arch Oral Biol. 54:179-184.
Vag J, Byrne EM, Hughes DH, Hoffman M, Ambudkar I, Maguire P, O'Connell BC. 2007. Morphological and functional differentiation of HSG cells: Role of extracellular matrix and trpc 1. J Cell Physiol. 212:416-423.

DISCUSSION

Le but de cette étude était d'étudier *in vitro* l'effet des molécules amères sur l'expression de certaines protéines salivaires. En particulier, l'effet de trois molécules amères, la caféine, la quinine, et l'urée, sur l'expression de la cystatine SN dans les cellules HSG a été étudié. Cette étude a nécessité au préalable d'induire et de caractériser la différenciation des cellules de la lignée HSG en acini, structures majoritairement responsables dans la glande salivaire de la sécrétion des protéines.

Différenciation des cellules HSG en acini

Cette première étape a nécessité la mise en place des conditions de culture de cette lignée cellulaire (quantité de cellules ensemencées, concentration en Matrigel, contrôle de la différenciation). Dans cette étude, la différenciation morphologique des cellules HSG sur GFR Matrigel a été mise en évidence. Avec la structure 3D, la différenciation des cellules HSG est apparue comme optimale. En effet, les observations microscopiques ont révélé une morphologie radicalement différente entre cellules HSG non différenciées, de forme épithéliale et aplatie, et cellules HSG différenciées, se regroupant en structures acinaires. Ces résultats sont en accord avec plusieurs études menées sur la différenciation de la lignée HSG (Lam et al., 2005; Szlavik et al., 2008; Vag et al., 2007).

L'analyse du cycle cellulaire par le double marquage de l'ADN avec du BrdU/IP n'a pas été concluant. Les cellules n'incorporaient pas le BrdU. Par contre la méthode Vindelov, ne nécessitant pas une reconnaissance immunologique, a permis de mettre en évidence une phase G0/G1 stable et une augmentation globale de la phase S au cours du temps dans les cellules HSG non différenciées. Inversement, elle a mis en évidence l'augmentation de la phase G0/G1 et une stabilité globale de la phase S au cours du temps, dans les cellules HSG différenciées. Ces observations sont en accord avec respectivement les états de non différenciation et de différenciation. En effet, une augmentation de la G0/G1 correspond à des cellules qui soit rentrent en apoptose ou se préparent à re-rentrer dans le cycle cellulaire, soit se préparent pour la différentiation. Une augmentation de la phase S est associée à des cellules en cycle cellulaire et donc non différenciées, de façon générale.

D'un point de vue fonctionnel, les analyses génomiques n'ont pas révélé la présence du gène CST1, codant pour la cystatine SN, dans les cellules HSG différenciées ou non. Ceci n'est pas en accord avec les travaux de Lam et al. (2005) qui rapportent la présence du gène CST1 dans les cellules HSG, avec une surexpression 5 fois plus grande dans les cellules différenciées comparé aux cellules non différenciées. De plus, l'expression du gène AMY1A, codant pour l'amylase a été très faiblement révélée dans les cellules HSG non différenciées. Une surexpression de la quantité d'AMY1A a été observée dans les cellules HSG différenciées à jour 1, 2, et 3 comparé aux cellules HSG non différenciées. Cependant ces résultats restent à confirmer. Les données de la littérature sur l'expression du gène de l'amylase sont contradictoires. En effet, Maria et al. (2011) ne détectent qu'une faible quantité du gène codant pour l'amylase dans les cellules différenciées. Dans leur étude, Lam et al. (2005) observent la présence du gène AMY1A dans les cellules HSG non différenciées et différenciées, avec une expression 8 fois plus importante dans cellules différenciées. Certains facteurs, tels que la concentration du GFR Matrigel utilisé ou la quantité de facteurs de croissance du Matrigel, peuvent avoir un impact sur l'expression des gènes dans les cellules HSG. Ainsi, à forte concentration (GFR Matrigel 17,5 mg/ml et Matrigel 16,4 mg/ml) une expression du gène AMY1A 3 à 4 fois plus importante dans les cellules différenciées comparé aux cellules non différenciées a pu être détectée, alors qu'à plus faible ou très forte concentrations (GFR Matrigel 12,8 mg/ml et Matrigel 20 mg/ml) aucune différence entre les deux conditions n'a été observée (Vag et al., 2007). Cela pourrait expliquer les différences observées dans cette étude. En effet, le GFR Matrigel à 10,8 mg/ml a été utilisé, ce qui est une plus faible concentration. Il est notamment possible, dans le cas de la cystatine SN, que certaines protéines soient stockées dans des granules de stockage jusqu'à leur utilisation, et que les gènes codant pour ces protéines ne soient transcrits qu'en cas de déplétion. Cela pourrait aussi expliquer l'absence d'expression des gènes AMY1 et CST1 aux temps choisis.

Néanmoins, une faible expression du gène d'amylase, ne signifie pas l'absence de l'expression de la protéine. Ainsi, Maria et al. (2011) ont observé une surexpression de la protéine amylase dans les cellules différenciées comparé aux cellules non différenciées, et de même dans le milieu de culture de ces cellules. Dans la présente étude, cependant, aucune expression de la protéine amylase n'a été détectée dans les cellules HSG ou dans les milieux de culture. Toutefois, la cystatine SN, quant à elle, a bien été mise en évidence dans les cellules HSG non différenciées et différenciées avec une bande supplémentaire (28kDa) dans les cellules différenciées, et également dans les milieux de culture avec une teneur élevée dans

les cellules non différenciées au jour 3. Ces résultats nous ont donc emmené à se concentrer uniquement sur la protéine cystatine SN, et en particulier, sur l'effet des molécules amères sur cette protéine.

Effet de la caféine et de la quinine sur la cystatine SN

Cette étude a mis en évidence la présence de cystatine SN dans les cellules HSG non différenciées et différenciées après à la caféine ou à la quinine. Cependant, les données de semi-quantification n'étant pas reproductibles, il était difficile de conclure sur l'effet de ces molécules amères sur l'expression de la cystatine SN. Deux aspects pourraient expliquer cela, d'une part par la culture cellulaire et d'autre part la méthode du Western blot. Dans le premier cas, divers facteurs tels que l'âge des cellules au moment de l'ensemencement ou encore la quantité de cellules, peuvent avoir influencé les données obtenues. Dans le deuxième cas, le biais peut être lié à l'échelonnement de l'analyse sur plusieurs jours. En effet, par cette méthode, tous les échantillons ne peuvent pas être passés le même jour, cela augmente donc le risque de variabilité entre les essais. En utilisant les mêmes échantillons et en utilisant la méthode ELISA, méthode quantitative plus sensible et permettant de passer tous les échantillons le même jour, nous avons mis en évidence une tendance de la quinine (150 µM) à augmenter systématiquement l'expression de la cystatine SN comparé au témoin. Néanmoins, cette deuxième méthode n'a pu réduire la grande variabilité des différents essais. Cette variabilité était donc très probablement liée aux conditions de culture. En accord avec cette hypothèse, l'analyse ELISA sur 3 essais de cellules ensemencées au même moment et au même nombre de passage cellulaire, et traitées à la caféine, a permis de réduire la variabilité entre les essais.

Cette analyse a montré que, que ce soit avec les cellules non différenciées ou différenciées, et qu'elles soient traitées ou non à la caféine, la teneur en cystatine SN augmentait au cours du temps, et également avec la dose dans le cas des cellules HSG différenciées. La teneur en cystatine SN la plus importante a été observée avec 50 µM de caféine, que ce soit dans les cellules HSG différenciées ou non. De manière intéressante, cette concentration (50 µM) correspond à un de taux circulant élevé de la caféine (Lelo et al. 1986). De plus, cette étude a révélé que pour, un temps donné et quelle que soit la concentration de caféine, la concentration de cystatine SN était plus élevée dans les cellules HSG différenciées comparé aux cellules HSG non différenciées. Ce résultat sur la quantité de cystatine SN est

particulièrement intéressant car il est en accord avec les études de Lam et al. (2005) et Hoffman et al. (1996) qui ont proposé la cystatine SN comme marqueur de différenciation des cellules HSG, respectivement sur Matrigel et laminine. Cette étude a également mis en évidence, pour la première fois, la sécrétion par les cellules HSG de cystatine SN dans le milieu de culture. En effet, un effet temps a pu être observé, avec une augmentation de l'expression de la cystatine SN pour les cellules HSG exposées à la caféine comparé au témoin. Une détection de la cystatine SN plus précoce dans les cellules HSG différenciées a aussi été notée dès le premier jour, ce qui est en accord avec l'état de différenciation. Il est fort de constater la similitude avec l'*in vivo*, où les protéines salivaires sont principalement sécrétées par les acini des glandes salivaires humaines alors que les cellules ductales en secrètent moins (Tandler et Phillips, 1998). Un effet caféine sur la cystatine SN a également été démontré, et ce, uniquement dans les cellules HSG différenciés. En effet, la caféine a augmenté de manière significative la quantité de cystatine SN dans les cellules comparé au témoin. Par extrapolation, cela implique que la consommation de caféine pourrait modifier en partie la composition salivaire.

Cette surexpression de la cystatine SN dans les cellules HSG différenciées en présence de caféine associée à la tendance de ces mêmes cellules à sécréter plus de cystatine SN dans le milieu extracellulaire, met en évidence l'existence d'un lien mécanistique entre caféine et synthèse de cystatine SN et entre caféine et sécrétion de cystatine SN dans le milieu. L'hypothèse proposée et discutée dans l'article 2, et basée sur des études menées chez le rat, avance que par sa capacité, à la fois, à activer la voie de signalisation du AMP cyclique (Turner et al., 2009) et à inhiber les récepteurs α1-adrénergiques (Seo et al., 1999) des glandes salivaires, la caféine jouerait un double rôle en augmentant la synthèse et la sécrétion dans le milieu de la cystatine SN.

Il serait donc intéressant à l'avenir d'étudier les voies de signalisations susceptibles d'intervenir dans l'augmentation de la synthèse et de la sécrétion de cystatine SN par la caféine dans les cellules HSG. En particulier, il faudrait étudier les molécules activées dans les voies de l'AMP cyclique, telles que la PKA, et des récepteurs α1-adrénergiques, tels que la PKC, après exposition des cellules à la caféine et en parallèle l'effet de la caféine sur la cystatine SN. De plus, comme mentionné précédemment (cf. **I.3.3.3**), d'autres molécules amères telles que la quinine et l'urée peuvent aussi modifier la composition salivaire

(Quintana et al., 2009b). Ces molécules sont susceptibles d'agir, elles aussi, par les voies de signalisation du cAMP ou des récepteurs α1-adrénergiques. Il faudrait donc élargir la recherche à d'autres molécules amères. De façon plus générale, il peut aussi être intéressant d'observer l'effet de la consommation d'aliments amers sur la cystatine SN en particulier et sur d'autres protéines salivaires impliquées dans les variations interindividuelles dans la perception du goût amer.

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

L'objectif de ces travaux de thèse était de tenter de répondre à la question des liens existant entre molécules amères, perception du goût amer, et composition protéique de la salive. Pour ce faire, deux études ont été menées. Dans un premier temps, le lien *in vivo* entre composition protéique et sensibilité à l'amertume chez l'Homme a été étudié. Dans un deuxième temps, l'effet *in vitro* de molécules amères sur l'expression d'un marqueur protéique salivaire de sensibilité gustative (la cystatine SN) a été analysé.

Lien entre composition salivaire et sensibilité à l'amertume

Cette étude nous a tout d'abord permis de mettre en évidence l'importance des méthodes d'investigation. L'analyse par électrophorèse mono-dimensionnelle, par exemple, s'est avérée être une méthode peu informative. En effet, bien qu'elle ait permis de révéler la corrélation entre la sensibilité à la caféine et l'abondance de 3 bandes, représentant 5 protéines (CAVI, alpha amylase, alpha hémoglobine, alpha enolase, et la protéine UPF0762), elle n'a pas permis de corréler l'abondance globale des protéines détectées et sensibilité. Ceci est dû au fait que chaque bande contient plusieurs protéines dans des proportions inconnues, mais aussi qu'une même protéine peut être présente dans plusieurs bandes, L'analyse bi-dimensionnelle, en revanche, a su faire ressortir des informations intéressantes concernant le lien entre la composition salivaire et les variations interindividuelles dans la perception de l'amertume de la caféine. En effet, la surexpression des fragments de 3 protéines salivaires, l'alpha amylase, l'albumine sérique, et les IgA et la sous expression de l'inhibiteur de protéase cystatine SN ont été mis en évidence chez les sujets hypersensibles à l'amertume de la caféine. Ces observations nous ont permis de formuler l'hypothèse d'un lien entre activité protéolytique en bouche et sensibilité au goût amer de la caféine. Ainsi la sous-expression de cystatine SN chez certains sujets entrainerait une augmentation de protéolyse en bouche, qui à son tour, entrainerait une dégradation des constituants du film salivaire (ex : alpha amylase, albumine sérique, IgA). Cette dégradation du film salivaire serait alors à l'origine d'une plus grande accessibilité des récepteurs gustatifs par les molécules amères, ce qui résulterait en une hypersensibilité chez ces sujets. Le rôle central de la cystatine SN dans ce mécanisme en fait un marqueur potentiel de sensibilité à l'amertume.

Au vu de ces résultats, d'autres questions intéressantes émergent. Par exemple, quelles sont les caractéristiques physico-chimiques du film salivaire? Est-ce que la plus grande accessibilité aux récepteurs, si elle est vérifiée, s'applique aussi à d'autres molécules amères,

et de manière plus générale aux autres molécules sapides, telles que les molécules sucrées, dont la perception de la saveur passe aussi par une interaction avec des récepteurs? Afin d'y répondre, il serait fort intéressant de caractériser la structure et l'épaisseur du film salivaire, problématique actuellement étudiée au sein de mon équipe d'accueil par microscopie et immunohistochimie. Il pourrait également être intéressant de tester le lien entre les teneurs en cystatine SN et la sensibilité à d'autres molécules sapides, mais aussi plus généralement d'étudier les mécanismes de régulation de la protéolyse en bouche.

Par ailleurs, les informations sur les habitudes alimentaires des sujets hyper et hypo-sensibles au goût amer de la caféine obtenues lors de cette études ont montré que les hypersensibles consommaient rarement ou jamais du café alors que tous les hyposensibles en étaient consommateurs réguliers. Cela suggère une possible interaction entre habitudes alimentaires, composition salivaire et sensorialité, ce qui constitue également un thème de recherche émergent.

Une des premières études menées sur ce sujet est constituée par la suite des travaux de cette thèse, visant à étudier *in vitro* l'effet de molécules amères sur l'expression de protéines salivaires, en particulier du marqueur de sensibilité précédemment identifié, la cystatine SN.

Effet des molécules amères sur l'expression de protéines de la salive

Cette deuxième étude a montré, pour la première fois, la pertinence de la lignée cellulaire humaine HSG pour décrire l'effet de molécules sapides sur la composition salivaire. L'utilisation d'une lignée cellulaire présente l'avantage de limiter le recours à l'expérimentation animale et de parfaitement contrôler les conditions expérimentales. Cette étude ouvre donc la voie à l'utilisation de la lignée cellulaire HSG dans d'autres études dans les domaines de l'alimentation et de la sensorialité.

D'autre part, cette étude a montré *in vitro* que l'exposition des cellules HSG à la caféine augmentait la synthèse de cystatine SN et sa sécrétion dans le milieu de culture, suggérant par extrapolation que l'exposition de cellules de glandes salivaires *in vivo* à des molécules amères est susceptible de moduler la composition salivaire avec éventuellement des conséquences sensorielles. Cet effet était particulièrement marqué à 50µM, une concentration qui reflète les taux circulants consécutifs à une forte consommation de café.

Les données de la littérature nous ont guidés vers deux mécanismes expliquant l'action de la caféine sur la cystatine SN. IL s'agit d'une part de l'activation des récepteurs β-

adrénergiques entrainant l'augmentation d'AMP cyclique et d'autre part de l'inhibition des récepteurs α1-adrénergiques entrainant notamment l'inactivation de la protéine PKC (Fig. 33).

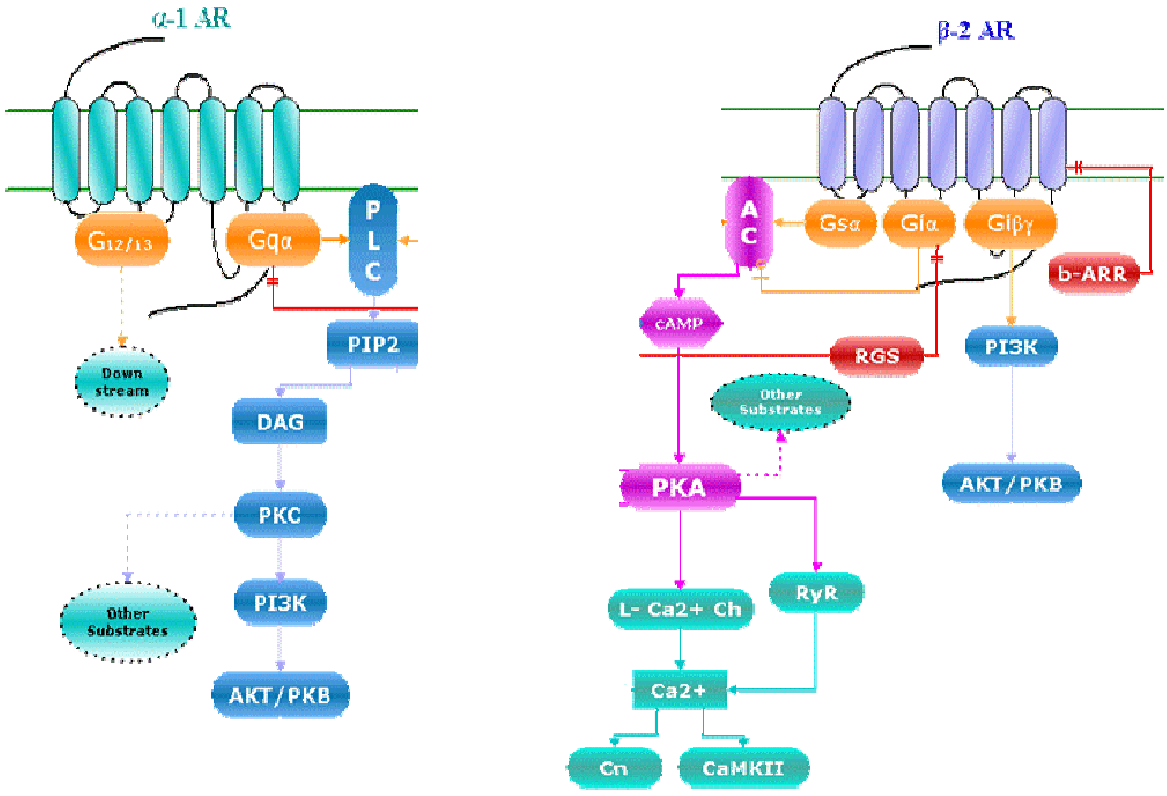


Figure 33 : Voies de signalisation des récepteurs α1- et β2- adrénergiques, potentiellement impliquées dans l'augmentation de la synthèse et de la sécrétion de la cystatine SN par la caféine (D'après la Base de données des récepteurs adrénergiques, http://ardb.bjmu.edu.cn/).

L'identification de la cascade de signalisation exacte impliquée dans l'augmentation de de la synthèse de cystatine SN par la caféine constitue une perspective de ce travail. Il s'agira par exemple de vérifier la présence des récepteurs et des acteurs des deux voies de signalisation dans la lignée HSG. Ensuite, il serait intéressant de bloquer de façon sélective une des deux voies afin d'étudier l'impact de la caféine sur l'expression de cystatine SN.

Par ailleurs, il faudrait vérifier si des résultats comparables sont obtenus avec d'autres molécules amères, et ainsi si ces molécules peuvent moduler la composition salivaire.

Ces résultats ont été observés dans la glande sous-maxillaire. Il serait intéressant d'élargir l'étude de l'impact de la caféine à d'autres glandes, notamment la parotide.

Enfin, ces résultats amènent d'autres questions à étudier *in vivo*, par exemple le lien entre consommation régulière de caféine et acceptabilité d'autres aliments amers, notamment certains légumes qui ont des bénéfices pour la santé. Ces études du type épidémiologique pourraient également être menées chez la femme enceinte afin d'envisager les conséquences que la consommation de caféine pourrait avoir sur les préférences du futur enfant, et ceci dans un contexte où les risques et bénéfices de la caféine sont actuellement débattus.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Achan, J., Talisuna, A.O., Erhart, A., Yeka, A., Tibenderana, J.K., Baliraine, F.N., Rosenthal, P.J. and D'Alessandro, U., 2011. Quinine, an old anti-malarial drug in a modern world: role in the treatment of malaria. Malaria Journal. 10, 144.

Adler, E., Hoon, M.A., Mueller, K.L., Chandrashekar, J., Ryba, N.J.P. and Zuker, C.S., 2000. A novel family of mammalian taste receptors. Cell. 100, 693-702.

Adolphe, M., 1995. Alternative methods to animal experimentation - Scientific and ethical problems. Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine. 179, 1109-1119.

Ahn, H.Y., Karaki, H. and Urakawa, N., 1988. Inhibitory effects of caffeine on contractions and calcium movement in vascular and intestinal smooth-muscle. British Journal of Pharmacology. 93, 267-274.

Amerongen, A.V.N. and Veerman, E.C.I., 2002. Saliva - the defender of the oral cavity. Oral Diseases. 8, 12-22.

Aps, J.K.M. and Martens, L.C., 2005. Review: The physiology of saliva and transfer of drugs into saliva. Forensic Science International. 150, 119-131.

Atsumi, T., Sugita, K., Kohno, M., Takahashi, T. and Ueha, T., 1996. Simultaneous measurement of Ca2+ and pH by laser cytometry using fluo-3 and SNARF-1. Cytometry. 24, 99-105.

Azuma, M., Tamatani, T., Kasai, Y. and Sato, M., 1993. Immortalization of normal human salivary gland cells with duct phenotype, myoepithelial phenotype, acinar phenotype, or squamous phenotype by transfection with SV40 ori- mutant deoxyribonucleic-acid. Laboratory Investigation. 69, 24-42.

Bachmanov, A.A. and Beauchamp, G.K., 2007. Taste receptor genes. Annual Review of Nutrition. 27, 389-414.

Bardow, A., Moe, D., Nyvad, B. and Nauntofte, B., 2000. Buffer systems and buffer capacity of whole mouth saliva. Journal of Dental Research. 79, 1296-1296.

Bartoshuk, L.M., Duffy, V.B. and Miller, I.J., 1994. PTC/PROP tasting - Anatomy, psychophysics, and sex effects. Physiology & Behavior. 56, 1165-1171.

Bartoshuk, L. M.; Duffy, V. B.; Etter, L.; Fast, K.; Garvin, V.; Lucchina, L. A.; Rodin, J.; Snyder, D. J.; Striegel-Moore, R.; Wolf, H., 1997. Appetite. 29, 388.

Baum, B.J. and Tran, S.D., 2006. Synergy between genetic and tissue engineering: creating an artificial salivary gland. Periodontology 2000. 41, 218-223.

Behrens, M., Brockhoff, A., Kuhn, C., Bufe, B., Winnig, M. and Meyerhof, W., 2004. The human taste receptor hTAS(2)R(14) responds to a variety of different bitter compounds. Biochemical and Biophysical Research Communications. 319, 479-485.

Bjorck, L., Akesson, P., Bohus, M., Trojnar, J., Abrahamson, M., Olafsson, I. and Grubb, A., 1989. Bacterial-growth blocked by a synthetic peptide based on the structure of a human proteinase-inhibitor. Nature. 337, 385-386.

Bradford, M. M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry. 72, 248-254.

Bradway, S.D., Bergey, E.J., Jones, P.C. and Levine, M.J., 1989. Oral Mucosal Pellicle - Adsorption and Transpeptidation of Salivary Components to Buccal Epithelial Cells. Biochemical Journal. 261, 887-896.

Bradway, S.D., Bergey, E.J., Scannapieco, F.A., Ramasubbu, N., Zawacki, S. and Levine, M.J., 1992. Formation of Salivary Mucosal Pellicle - the Role of Transglutaminase. Biochemical Journal. 284, 557-564.

Bufe, B., Hofmann, T., Krautwurst, D., Raguse, J.D. and Meyerhof, W., 2002. The human TAS2R16 receptor mediates bitter taste in response to beta-glucopyranosides. Nature Genetics. 32, 397-401.

Bulosan, M., Pauley, K.M., Yo, K., Chan, E.K.L., Katz, J., Peck, A.B. and Cha, S., 2009. Inflammatory caspases are critical for enhanced cell death in the target tissue of Sjogren's syndrome before disease onset. Immunology and Cell Biology. 87, 81-90.

Butt, M.S. and Sultan, M.T., 2011. Coffee and its Consumption: Benefits and Risks. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 51, 363-373.

Cabras, T., Melis, M., Castagnola, M., Padiglia, A., Tepper, B.J., Messana, I. and Tomassini Barbarossa, I., 2012. Responsiveness to 6-n-Propylthiouracil (PROP) Is Associated with Salivary Levels of Two Specific Basic Proline-Rich Proteins in Humans. PLoS ONE. 7, e30962.

Cabras, T., Pisano, E., Boi, R., Olianas, A., Manconi, B., Inzitari, R., Fanali, C., Giardina, B., Castagnola, M. and Messana, I., 2009. Age-Dependent Modifications of the Human Salivary Secretory Protein Complex. Journal of Proteome Research. 8, 4126-4134.

Caicedo, A. and Roper, S.D., 2001. Taste Receptor Cells That Discriminate Between Bitter Stimuli. Science. 291, 1557-1560.

Candiano, G., Bruschi, M., Musante, L., Santucci, L., Ghiggeri, G.M., Carnemolla, B., Orecchia, P., Zardi, L. and Righetti, P.G., 2004. Blue silver: A very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. Electrophoresis. 25, 1327-1333.

Cassolato, S.F. and Turnbull, R.S., 2003. Xerostomia: clinical aspects and treatment. Gerodontology. 20, 64-77.

Catalan, M.A., Nakamoto, T. and Melvin, J.E., 2009. The salivary gland fluid secretion mechanism. The journal of Medical Investigation. 56, 192-196.

Chan, Y.-H., Huang, T.-W., Young, T.-H. and Lou, P.-J., 2011. Selective culture of different types of human parotid gland cells. Head and Neck-Journal for the Sciences and Specialties of the Head and Neck. 33, 407-414.

Chandrashekar, J., Mueller, K.L., Hoon, M.A., Adler, E., Feng, L.X., Guo, W., Zuker, C.S. and Ryba, N.J.P., 2000. T2Rs function as bitter taste receptors. Cell. 100, 703-711.

Chapman, R.A. and Miller, D.J., 1974. Structure-activity relations for caffeine: a comparative study of the inotropic effects of the methylxanthines, imidazoles and related compounds on the frog's heart. The Journal of Physiology. 242, 615-634.

Chou, T.M. and Benowitz, N.L., 1994. Caffeine and Coffee - Effects on Health and Cardiovascular-Disease. Comparative Biochemistry and Physiology C-Pharmacology Toxicology & Endocrinology. 109, 173-189.

Christensen, C.M., Brand, J.G. and Malamud, D., 1987. Salivary changes in solution pH - A source of individual differences in sour taste peception. Physiology & Behavior. 40, 221-227.

Cowart, B.J., Yokomukai, Y. and Beauchamp, G.K., 1994. Bitter taste in aging: Compound-specific decline in sensitivity. Physiology & Behavior. 56, 1237-1241.

Daly, J.W. and Fredholm, B.B., 1998. Caffeine - an atypical drug of dependence. Drug and Alcohol Dependence. 51, 199-206.

Denny, P., Hagen, F.K., Hardt, M., Liao, L.J., Yan, W.H., Arellanno, M., Bassilian, S., Bedi, G.S., Boontheung, P., Cociorva, D., Delahunty, C.M., Denny, T., Dunsmore, J., Faull, K.F., Gilligan, J., Gonzalez-Begne, M., Halgand, F., Hall, S.C., Han, X.M., Henson, B., Hewel, J., Hu, S., Jeffrey, S., Jiang, J., Loo, J.A., Loo, R.R.O., Malamud, D., Melvin, J.E., Miroshnychenko, O., Navazesh, M., Niles, R., Park, S.K., Prakobphol, A., Ramachandran, P., Richert, M., Robinson, S., Sondej, M., Souda, P., Sullivan, M.A., Takashima, J., Than, S., Wang, J.H., Whitelegge, J.P., Witkowska, H.E., Wolinsky, L., Xie, Y.M., Xu, T., Yu, W.X., Ytterberg, J., Wong, D.T., Yates, J.R. and Fisher, S.J., 2008. The proteomes of human parotid and submandibular/sublingual gland salivas collected as the ductal secretions. Journal of Proteome Research. 7, 1994-2006.

Desor, J.A., Maller, O. and Andrews, K., 1975. Ingestive Responses of Human Newborns to Salty, Sour, and Bitter Stimuli. Journal of Comparative and Physiological Psychology. 89, 966-970.

Dickinson, D.P., 2002. Salivary (SD-type) cystatins: Over one billion years in the making-but to what purpose? Critical Reviews in Oral Biology & Medicine. 13, 485-508.

Dickinson, D.P., Thiesse, M. and Hicks, M.J., 2002. Expression of type 2 cystatin genes CST1-CST5 in adult human tissues and the developing submandibular gland. DNA and Cell Biology. 21, 47-65.

Douglass, R. and Heckman, G., Drug-related taste disturbance A contributing factor in geriatric syndromes. Canadian Family Physician. 56, 1142-1147.

Drewnowski, A. and Gomez-Carneros, C., 2000. Bitter taste, phytonutrients, and the consumer: a review. American Journal of Clinical Nutrition. 72, 1424-1435.

Drzymala, L., Castle, A., Cheung, J.C. and Bennick, A., 2000. Cellular phosphorylation of an acidic proline-rich protein, PRP1, a secreted salivary phosphoprotein. Biochemistry. 39, 2023-2031.

Dsamou, M., Palicki, O., Septier, C., Chabanet, C., Lucchi, G., Ducoroy, P., Chagnon, M.-C. and Morzel, M., Salivary Protein Profiles and Sensitivity to the Bitter Taste of Caffeine. Chemical Senses. 37, 87-95.

Dunitz, J.D., Harris, K.D.M., Johnston, R.L., Kariuki, B.M., MacLean, E.J., Psallidas, K., Schweizer, W.B. and Tykwinski, R.R., 1998. New light on an old story: The solid-state transformation of ammonium cyanate into urea. Journal of the American Chemical Society. 120, 13274-13275.

Eliasson, L. and Carlen, A., 2010. An update on minor salivary gland secretions. European Journal of Oral Sciences. 118, 435-442.

Ferry, A.L.S., Mitchell, J.R., Hort, J., Hill, S.E., Taylor, A.J., Lagarrigue, S. and Valles-Pamies, B., 2006. In-mouth amylase activity can reduce perception of saltiness in starch-thickened foods. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 54, 8869-8873.

Fox, A.L., 1932. The Relationship between Chemical Constitution and Taste. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 18, 115-120.

Garrett, J.R., Suleiman, A.M., Anderson, L.C. and Proctor, G.B., 1991. secretory responses in antigranulocytes ducts and acini of submandibular glands *in vitro* to parasympathetic or sympathetic nerve stimulation in rats. Cell and Tissue Research. 264, 117-126.

Gilbertson, T.A., Damak, S. and Margolskee, R.F., 2000. The molecular physiology of taste transduction. Current Opinion in Neurobiology. 4, 519-527.

Goldenberg, A.M. and Wexler, L.F., 1988. Quinine overdose - Review of toxicity and treatment. Clinical Cardiology. 11, 716-718.

Golub, E.E., Cheruka, J., Boosz, B., Davis, C. and Malamud, D., 1985. A comparison of bacterial aggregation induced by saliva, lysozyme, and zinc. Infection and Immunity. 48, 204-210.

Goncalves, L.D., Soares, M.R., Nogueira, F.C.S., Garcia, C., Camisasca, D.R., Domont, G., Feitosa, A.C.R., Pereira, D.D., Zingali, R.B. and Alves, G., 2010. Comparative proteomic analysis of whole saliva from chronic periodontitis patients. Journal of Proteomics. 73, 1334-1341.

Grosso, L.M. and Bracken, M.B., 2005. Caffeine metabolism, genetics, and perinatal outcomes: A review of exposure assessment considerations during pregnancy. Annals of Epidemiology. 15, 460-466.

Grushka, M. and Epstein, J.B., 1997. Burning Mouth Syndrome. In Seiden A, editor, Taste and smell disorders: Rhinology and Sinusology. New York : Thieme p159-169.

Guillouzo, A., 1998. Liver cell models in in vitro toxicology. Environmental Health Perspectives. 106, 511-532.

Guo, S.W. and Reed, D.R., 2001. The genetics of phenylthiocarbamide perception. Annals of Human Biology. 28, 111-142.

Hamosh, M. and Burns, W.A., 1977. Lipolytic activity of human lingual glands (Ebner). Laboratory Investigation. 37, 603-608.

Hansen, J.L., Reed, D.R., Wright, M.J., Martin, N.G. and Breslin, P.A.S., 2006. Heritability and genetic covariation of sensitivity to PROP, SOA, quinine HCl, and caffeine. Chemical Senses. 31, 403-413.

Harries, J.T., 1982. Fat absoprtion in the newborn. Acta Pædiatrica. 71, 17-23.

Hattori, T. and Wang, P.-L., 2007. Calcium antagonists cause dry mouth by inhibiting resting saliva secretion. Life Sciences. 81, 683-690.

Heckman, M.A., Weil, J. and de Mejia, E.G., 2010. Caffeine (1, 3, 7-trimethylxanthine) in Foods: A Comprehensive Review on Consumption, Functionality, Safety, and Regulatory Matters. Journal of Food Science. 75, R77-R87.

Henkin, R.I., Martin, B.M. and Agarwal, R.P., 1999. Decreased parotid saliva gustin/carbonic anhydrase VI secretion: An enzyme disorder manifested by gustatory and olfactory dysfunction. The American Journal of the Medical Sciences. 318, 380-391.

Henskens, Y.M.C., Vandervelden, U., Veerman, E.C.I. and Amerongen, A.V.N., 1993. Protein, Albumin and Cystatin Concentrations in Saliva of Healthy-Subjects and of Patients with Gingivitis or Periodontitis. Journal of Periodontal Research. 28, 43-48.

Hershkovich, O. and Nagler, R.M., 2004. Biochemical analysis of saliva and taste acuity evaluation in patients with burning mouth syndrome, xerostomia and/or gustatory disturbances. Archives of Oral Biology. 49, 515-522.

Hiraki, A., Shirasuna, K., Ikari, T., Shinohara, M. and Garrod, D.R., 2002. Calcium induces differentiation of primary human salivary acinar cells. Journal of Cellular Physiology. 193, 55-63.

Hirtz, C., Chevalier, F., Centeno, D., Rofidal, V., Egea, J.C., Rossignol, M., Sommerer, N. and Deville de Perière, D., 2005. MS characterization of multiple forms of alpha-amylase in human saliva. Proteomics. 5, 4597-4607.

Hirtz, C., Chevalier, F., Sommerer, N., Raingeard, I., Bringer, J., Rossignol, M. and Deville de Perière, D., 2006. Salivary protein profiling in type I diabetes using two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry. Clinical Proteomics. 2, 117-127.

Hoffman, M.P., Kibbey, M.C., Letterio, J.J. and Kleinman, H.K., 1996. Role of laminin-1 and TGF-beta 3 in acinar differentiation of a human submandibular gland cell line (HSG). Journal of Cell Science. 109, 2013-2021.

Holsinger, F.C. and Bui, D.T., 2007. Anatomy, Function, and Evaluation of the Salivary Glands. In Myers E.N. & Ferris R.L., editors. Salivary Gland Disorders. Berlin: Springer p1-16.

Horrigan, L.A., Kelly, J.P. and Connor, T.J., 2004. Caffeine suppresses TNF-alpha production via activation of the cyclic AMP/protein kinase A pathway. International Immunopharmacology. 4, 1409-1417.

Hu, S., Arellano, M., Boontheung, P., Wang, J.H., Zhou, H., Jiang, J., Elashoff, D., Wei, R., Loo, J.A. and Wong, D.T., 2008. Salivary Proteomics for Oral Cancer Biomarker Discovery. Clinical Cancer Research. 14, 6246-6252.

Huang, M., Ida, H., Kamachi, M., Iwanaga, N., Izumi, Y., Tanaka, F., Aratake, K., Arima, K., Tamai, M., Hida, A., Nakamura, H., Origuchi, T., Kawakami, A., Ogawa, N., Sugai, S., Utz, P.J. and Eguchi, K., 2005. Detection of apoptosis-specific autoantibodies directed against granzyme B-induced cleavage fragments of the SS-B (La) autoantigen in sera from patients with primary Sjogren's syndrome. Clinical and Experimental Immunology. 142, 148-154.

Huq, N.L., Cross, K.J., Ung, M., Myroforidis, H., Veith, P.D., Chen, D., Stanton, D., He, H., Ward, B.R. and Reynolds, E.C., 2007. A review of the salivary proteome and peptidome and saliva-derived peptide therapeutics. International Journal of Peptide Research and Therapeutics. 13, 547-564.

Hyde, R.J. and Feller, R.P., 1981. Age and sex effects on taste of sucrose, NaCl, citric acid and caffeine. Neurobiology of Aging. 2, 315-318.

Imfeld, T., 1999. Chewing gum-facts and fiction: A review of gum-chewing and oral health. Critical Reviews in Oral Biology & Medicine. 10, 405-419.

Inzitari, R., Vento, G., Capoluongo, E., Boccacci, S., Fanali, C., Cabras, T., Romagnoli, C., Giardina, B., Messana, I. and Castagnola, M., 2007. Proteomic analysis of salivary acidic proline-rich proteins in human preterm and at-term newborns. Journal of Proteome Research. 6, 1371-1377.

Jafari, M. and Rabbani, A., 2000. Dose and time dependent effects of caffeine on superoxide release, cell survival and DNA fragmentation of alveolar macrophages from rat lung. Toxicology. 149, 101-108.

Jarvis, M.J., 1993. Does caffeine intake enhance absolute levels of cognitive performance. Psychopharmacology. 110, 45-52.

Jessie, K.., Pang, W.W., Rahim, Z.H.A. and Hashim, O.H., 2010. Proteomic Analysis of Whole Human Saliva Detects Enhanced Expression of Interleukin-1 Receptor Antagonist, Thioredoxin and Lipocalin-1 in Cigarette Smokers Compared to Non-Smokers. International Journal of Molecular Science. 11, 4488-4505.

Johnson, L.C., Spinweber, C.L. and Gomez, S.A., 1990. BENZODIAZEPINES AND CAFFEINE - EFFECT ON DAYTIME SLEEPINESS, PERFORMANCE, AND MOOD. Psychopharmacology. 101, 160-167.

Joraku, A., Sullivan, C.A., Yoo, J. and Atala, A., 2007. In-vitro reconstitution of three-dimensional human salivary gland tissue structures. Differentiation. 75, 318-324.

Jung, D.W., Hecht, D., Ho, S.W., O'Connell, B.C., Kleinman, H.K. and Hoffman, M.P., 2000. PKC and ERK1/2 regulate amylase promoter activity during differentiation of a salivary gland cell line. Journal of Cellular Physiology. 185, 215-225.

Kamagata-Kiyoura, Y., Ohta, M., Cheuk, G., Yazdani, M., Saltzman, M.J. and Nakamoto, T., 1999. Combined effects of caffeine and prostaglandin E-2 on the proliferation of osteoblast-like cells (UMR106-01). Journal of Periodontology. 70, 283-288.

Kasamatsu, A., Uzawa, K., Nakashima, D., Kouzu, Y., Endo, Y., Koike, H., Yokoe, H., Harada, K., Sato, M. and Tanzawa, H., 2006. A proteomics approach to characterizing human submandibular gland cell lines by fluorescent two-dimensional differential in-gel electrophoresis. International Journal of Molecular Medicine. 17, 253-260.

Katan, M.B. and Schouten, E., 2005. Caffeine and arrhythmia. American Journal of Clinical Nutrition. 81, 539-540.

Katsukawa, H. and Ninomiya, Y., 1999. Capsaicin induces cystatin S-like substances in submandibular saliva of the rat. Journal of Dental Research. 78, 1609-1616.

Keast, R.S.J. and Roper, J., 2007. A complex relationship among chemical concentration, detection threshold, and suprathreshold intensity of bitter compounds. Chemical Senses. 32, 245-253.

Kim, J.-H., Park, S.-H., Moon, Y.W., Hwang, S., Kim, D., Jo, S.-H., Oh, S.B., Kim, J.S., Jahng, J.W., Lee, J.-H., Lee, S.J., Choi, S.-Y. and Park, K., 2009. Histamine H1 Receptor Induces Cytosolic Calcium Increase and Aquaporin Translocation in Human Salivary Gland Cells. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. 330, 403-412.

Kim, U.K., Jorgenson, E., Coon, H., Leppert, M., Risch, N. and Drayna, D., 2003. Positional cloning of the human quantitative trait locus underlying taste sensitivity to phenylthiocarbamide. Science. 299, 1221-1225.

Kivela, J., Laine, M., Parkkila, S. and Rajaniemi, H., 2003. Salivary carbonic anhydrase VI and its relation to salivary flow rate and buffer capacity in pregnant and non-pregnant women. Archives of Oral Biology. 48, 547-551.

Kivela, J., Parkkila, S., Parkkila, A.K., Leinonen, J. and Rajaniemi, H., 1999. Salivary carbonic anhydrase isoenzyme VI. Journal of Physiology. 520, 315-320.

Kleinman, H.K. and Martin, G.R., 2005. Matrigel: Basement membrane matrix with biological activity. Seminars in Cancer Biology. 15, 378-386.

Krut, L.H., Perrin, M.J. and Bronte-Stewart, B., 1961. Taste perception in smokers and non-smokers. British Medical Journal. 1, 384-387.

Kurihara, K., Nakanishi, N. and Ueha, T., 1997. A calcium channel in human submandibular duct cell line, HSG cells, not regulated by P-2U purinergic receptor-mediated intracellular calcium mobilization. Archives of Oral Biology. 42, 547-557.

Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. Nature. 227, 680-685.

Lam, K., Zhang, L.F., Bewick, M. and Lafrenie, R.M., 2005. HSG cells differentiated by culture on extracellular matrix involves induction of S-adenosylmethione decarboxylase and ornithine decarboxylase. Journal of Cellular Physiology. 203, 353-361.

Lane, J.D., Adcock, R.A., Williams, R.B. and Kuhn, C.M., 1990. caffeine effects on cardiovascular and neuroendocrine responses to acute psychosocial stress and their relationship to level of habitual caffeine consumption. Psychosomatic Medicine. 52, 320-336.

Lee, M.G., Xu, X., Zeng, W.Z., Diaz, J., Wojcikiewicz, R.J.H., Kuo, T.H., Wuytack, F., Racymaekers, L. and Muallem, S., 1997. Polarized expression of Ca2+ channels in pancreatic and salivary gland cells - Correlation with initiation and propagation of [Ca2+](i) waves. Journal of Biological Chemistry. 272, 15765-15770.

Leinonen, J., Parkkila, S., Kaunisto, K., Koivunen, P. and Rajaniemi, H., 2001. Secretion of carbonic anhydrase isoenzyme VI (CA VI) from human and rat lingual serous von Ebner's glands. Journal of Histochemistry & Cytochemistry. 49, 657-662.

Lelo, A., Miners, J.O., Robson, R. and Birkett, D.J., 1986. Assessment of Caffeine Exposure - Caffeine Content of Beverages , Caffeine Intake, and Plasma-Concentrations of Methylxanthines. Clinical Pharmacology & Therapeutics. 39, 54-59.

Lenander-Lumikari, M. and Loimaranta, V., 2000. Saliva and dental caries. Advances in Dental Research. 14, 40-47.

Li, J.C., Ha, Y.M., Ku, N.Y., Choi, S.Y., Lee, S.J., Oh, S.B., Kim, J.S., Lee, J.H., Lee, E.B., Song, Y.W. and Park, K., 2004. Inhibitory effects of autoantibodies on the muscarinic receptors in Sjogren's syndrome. Laboratory Investigation. 84, 1430-1438.

Lillibridge, C.D. and O'Connell, B.C., 1997. In human salivary gland cells, overexpression of E2F1 overcomes an interferon-gamma- and tumor necrosis factor-alpha-induced growth arrest but does not result in complete mitosis. Journal of Cellular Physiology. 172, 343-350.

Liu, X., Liao, D. and Ambudkar, I.S., 2001. Distinct mechanisms of Ca2+ (i) oscillations in HSY and HSG cells: Role of Ca2+ influx and internal Ca2+ store recycling. Journal of Membrane Biology. 181, 185-193.

Liu, Y.F. and Steinacker, J.M., 2001. Changes in skeletal muscle heat shock proteins: Pathological significance. Frontiers in Bioscience. 6, D12-D25.

Loesche, W.J., 1986. Role of streptococcus-mutans in human dental decay. Microbiological Reviews. 50, 353-380.

Ma, X.F., Yu, J.G. and Jin, F., 2004. Urea and formamide as a mixed plasticizer for thermoplastic starch. Polymer International. 53, 1780-1785.

Maria, O.M., Maria, O., Liu, Y.F., Komarova, S.V. and Tran, S.D., 2011. Matrigel improves functional properties of human submandibular salivary gland cell line. The International Journal of Biochemistry and Cell Biology. 43, 622-631.

Matsuo, R., 2000. Role of saliva in the maintenance of taste sensitivity. Critical Reviews in Oral Biology & Medicine. 11, 216-229.

Mela, D.J., Mattes, R.D., Tanimura, S. and Garciamedina, M.R., 1992. Relationships between ingestion and gustatory perception of caffeine. Pharmacology Biochemistry and Behavior. 43, 513-521.

Mennella, J.A., Pepino, M.Y., Duke, F.F. and Reed, D.R., 2010. Age modifies the genotype-phenotype relationship for the bitter receptor TAS2R38. BMC Genetics. 11: 60.

Meshnick, S. R., and Dobson, M. J., 2001. The history of antimalarial drugs. In: Rosenthal, P. J., editor. Antimalarial chemotherapy. Mechanism of Action, Resistance and New Directions in Drug Discovery. Totowa, New Jersey: Humana. pp. 15-25

Mese, H. and Matsuo, R., 2007. Salivary secretion, taste and hyposalivation. Journal of Oral Rehabilitation. 34, 711-723.

Meyerhof, W., 2005. Elucidation of mammalian bitter taste. Reviews of Physiology Biochemistry and Pharmacology,154, 37-72.

Meyerhof, W., Batram, C., Kuhn, C., Brockhoff, A., Chudoba, E., Bufe, B., Appendino, G. and Behrens, M., 2010. The Molecular Receptive Ranges of Human TAS2R Bitter Taste Receptors. Chemical Senses. 35, 157-170.

Mojet, J., Christ-Hazelhof, E. and Heidema, J., 2001. Taste perception with age: Generic or specific losses in threshold sensitivity to the five basic tastes? Chemical Senses. 26, 845-860.

Moore, L.M., Nielsen, C.R. and Mistretta, C.R, 1982.Sucrose taste thresholds: age-related differences. Journal of Gerondotology. 37, 64-69.

Morris-Wiman, J., Sego, R., Brinkley, L. and Dolce, C., 2000. The effects of sialoadenectomy and exogenous EGF on taste bud morphology and maintenance. Chemical Senses. 25, 9-19.

Morzel, M., Jeannin, A., Lucchi, G., Truntzer, C., Pecqueur, D., Nicklaus, S., Chambon, C. and Ducoroy, P., 2012. Human infant saliva peptidome is modified with age and diet transition. Journal of Proteomics. 75, 3665-3673.

Morzel, M., Palicki, O., Chabanet, C., Lucchi, G., Ducoroy, P., Chambon, C. and Nicklaus, S., 2011. Saliva electrophoretic protein profiles in infants: Changes with age and impact of teeth eruption and diet transition. Archives of Oral Biology. 56, 634-642.

Nascimento, M.M., Gordan, V.V., Garvan, C.W., Browngardt, C.M. and Burne, R.A., 2009. Correlations of oral bacterial arginine and urea catabolism with caries experience. Oral Microbiology and Immunology. 24, 89-95.

Nawrot, P., Jordan, S., Eastwood, J., Rotstein, J., Hugenholtz, A. and Feeley, M., 2003. Effects of caffeine on human health. Food Additives and Contaminants Part a-Chemistry Analysis Control Exposure & Risk Assessment. 20, 1-30.

Neyraud, E., Palicki, O., Schwartz, C., Nicklaus, S. and Feron, G., 2012. Variability of human saliva composition: Possible relationships with fat perception and liking. Archives of Oral Biology. 57, 556-566.

Neyraud, E., Sayd, T., Morzel, M. and Dransfield, E., 2006. Proteomic analysis of human whole and parotid salivas following stimulation by different tastes. Journal of Proteome Research. 5, 2474-2480.

Nurminen, M.L., Niittynen, L., Korpela, R. and Vapaatalo, H., 1999. Coffee, caffeine and blood pressure: a critical review. European Journal of Clinical Nutrition. 53, 831-839.

O'Connell, A. C., Lillibridge, C. D., Zheng, C., Baum, B. J., O'Connell, B. C. and Ambudkar, I. S., 1998. γ-Irradiation-induced cell cycle arrest and cell death in a human submandibular gland cell line: Effect of E2F1 expression. Journal of Cellular Physiology. 177, 264–273.

Oehlke, O., Martin, H.W., Osterberg, N. and Roussa, E., 2011. Rab11b and Its Effector Rip11 Regulate the Acidosis-Induced Traffic of V-ATPase in Salivary Ducts. Journal of Cellular Physiology. 226, 638-651.

Ohlsson, M., Jonsson, R. and Brokstad, K.A., 2002. Subcellular redistribution and surface exposure of the Ro52, Ro60 and La48 autoantigens during apoptosis in human ductal epithelial cells: A possible mechanism in the pathogenesis of Sjogren's syndrome. Scandinavian Journal of Immunology. 56, 456-469.

Oppenheim, F.G., Salih, E., Siqueira, W.L., Zhang, W. and Helmershorst, E.J., 2007. Salivary proteome and its genetic polymorphisms. Annals of the New York Academy of Sciences. 1098, 22-50.

Padiglia, A., Zonza, A., Atzori, E., Chillotti, C., Calo, C., Tepper, B.J. and Barbarossa, I.T., 2010. Sensitivity to 6-n-propylthiouracil is associated with gustin (carbonic anhydrase VI) gene polymorphism, salivary zinc, and body mass index in humans. American Journal of Clinical Nutrition. 92, 539-545.

Pedersen, A.M., Bardow, A., Jensen, S.B. and Nauntofte, B., 2002. Saliva and gastrointestinal functions of taste, mastication, swallowing and digestion. Oral Diseases. 8, 117-129.

Pepino, M.Y., Love-Gregory, L., Klein, S. and Abumrad, N.A., 2012. The fatty acid translocase gene CD36 and lingual lipase influence oral sensitivity to fat in obese subjects. Journal of Lipid Research. 53, 561-566.

Pisano, E., Cabras, T., Montaldo, C., Piras, V., Inzitari, R., Olmi, C., Castagnola, M. and Messana, I., 2005. Peptides of human gingival crevicular fluid determined by HPLC-ESI-MS. European Journal of Oral Sciences. 113, 462-468.

Poduval, P., Sillat, T., Virtanen, I., Porola, P. and Konttinen, Y.T., 2009. Abnormal Basement Membrane Type IV Collagen alpha-Chain Composition in Labial Salivary Glands in Sjogren's Syndrome. Arthritis and Rheumatism. 60, 938-945.

Poronnik, P., O'Mullane, L.M., Harding, E.A., Greger, R. and Cook, D.I., 1998. Use of replication deficient adenoviruses to investigate the role of G proteins in Ca2+ signalling in epithelial cells. Cell Calcium. 24, 97-103.

Proctor, G.B., 1998. Secretory protein synthesis and constitutive (vesicular) secretion by salivary gland. In: Garrett JR, Ekström J & Anderson LC, editors. Glandular mechanisms of salivary secretion. Basel: Karger. p73-88.

Quintana, M., Palicki, O., Lucchi, G., Ducoroy, P., Chambon, C., Salles, C. and Morzel, M., 2009a. Inter-individual variability of protein patterns in saliva of healthy adults. Journal of Proteomics. 72, 822-830.

Quintana, M., Palicki, O., Lucchi, G., Ducoroy, P., Chambon, C., Salles, C. and Morzel, M., 2009b. Short-Term Modification of Human Salivary Proteome Induced by Two Bitter Tastants, Urea and Quinine. Chemosensory Perception. 2, 133-142.

Rao, P.V., Reddy, A.P., Lu, X., Dasari, S., Krishnaprasad, A., Biggs, E., Roberts, C.T. and Nagalla, S.R., 2009. Proteomic Identification of Salivary Biomarkers of Type-2 Diabetes. Journal of Proteome Research. 8, 239-245.

Reed, D.R., Zhu, G., Breslin, P.A.S., Duke, F.F., Henders, A.K., Campbell, M.J., Montgomery, G.W., Medland, S.E., Martin, N.G. and Wright, M.J., 2010. The perception of quinine taste intensity is associated with common genetic variants in a bitter receptor cluster on chromosome 12. Human Molecular Genetics. 19, 4278-4285.

Reijenga, J.C., Aben, G.V.A., Lemmens, A.A.G., Verheggen, T., Debruijn, C. and Everaerts, F.M., 1985. Determination of quinine in beverages, pharmaceutical preparations and urine by isotachophoresis. Journal of Chromatography. 320, 245-252.

Ribeiro, J.A. and Sebastiao, A.M., 2010. Caffeine and adenosine. JAD, Journal of Alzheimer's Disease. 20, 3-15.

Riva, A., Valentino, L., Lantini, M.S., Floris, A. and Riva, F.T., 1993. 3D-structure of cells of human salivary glands as seen by SEM. Microscopy Research and Technique. 26, 5-20.

Robertson, D., Wade, D., Workman, R., Woosley, R.L. and Oates, J.A., 1981. Tolerance to the Humoral and Hemodynamic-Effects of Caffeine in Man. Journal of Clinical Investigation. 67, 1111-1117.

Robinson, K.M., Klein, B.P. and Lee, S.Y., 2005. Utilizing the R-index measure for threshold testing in model caffeine solutions. Food Quality and Preference. 16, 283-289.

Rodgers, S., Busch, J., Peters, H. and Christ-Hazelhof, E., 2005. Building a tree of knowledge: Analysis of bitter molecules. Chemical Senses. 30, 547-557.

Royce, L.S., Kibbey, M.C., Mertz, P., Kleinman, H.K. and Baum, B.J., 1993. Human neoplastic submandibular intercalated duct cells express an acinar phenotype when cultured on a basement membrane matrix. Differentiation. 52, 247-255.

Sato, M., Azuma, M., Hayashi, Y., Yoshida, H., Yanagawa, T. and Yura, Y., 1987. 5-AZACYTIDINE induction of stable myoepithelial and acinar cells from a human salivary intercalated duct cell clone. Cancer Research. 47, 4453-4459.

Sawyer, D.A., Julia, H.L. and Turin, A.C., 1982. caffeine and human behavior - Arousal, anxiety, and performance effects. Journal of Behavioral Medicine. 5, 415-439.

Scannapieco, F.A., 1994. Saliva bacterium interactions in oral microbial ecology. Critical Reviews in Oral Biology and Medicine. 5, 203-248.

Schaeffer, W.I., 1979. Proposed usage of animal tissue culture terms (revised 1978). Usage of vertebrate cell, tissue and organ culture terminology. In vitro. 15, 649-653.

Schenkels, L.C.P.M., Veerman, E.C.I. and Amerongen, A.V.N., 1995. Biochemical composition of human saliva in relation to other mucosal fluids. Critical Reviews in Oral Biology and Medicine. 6, 161-175.

Schiffman, S.S., Gatlin, L.A., Frey, A.E., Heiman, S.A., Stagner, W.C. and Cooper, D.C., 1994. Taste Perception of Bitter Compounds in Young and Elderly Persons - Relation to Lipophilicity of Bitter Compounds. Neurobiology of Aging. 15, 743-750.

Schiffman, S.S., Zervakis, J., Heffron, S. and Heald, A.E., 1999. Effect of protease inhibitors on the sense of taste. Nutrition. 15, 767-772.

Seo, J.T., Sugiya, H., Lee, S.I., Steward, M.C. and Elliott, A.C., 1999. Caffeine does not inhibit substance P-evoked intracellular Ca2+ mobilization in rat salivary acinar cells. American Journal of Physiology-Cell Physiology. 276, C915-C922.

Shao, Z.M., Nguyen, M., Alpaugh, M.L., O'Connell, J.T. and Barsky, S.H., 1998. The human myoepithelial cell exerts antiproliferative effects on breast carcinoma cells characterized by p21(WAF1/CIP1) induction, G(2)/M arrest, and apoptosis. Experimental Cell Research. 241, 394-403.

Shatzman, A.R. and Henkin, R.I., 1981. Gustin Concentration Changes Relative to Salivary Zinc and Taste in Humans. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 78, 3867-3871.

Shimamura, K., Moriyama, K. and Sunano, S., 1991. Caffeine-induced contraction of rat portal vein and effects of K-depolarization, Na-removal and low temperature. Journal of smooth muscle research = Nihon Heikatsukin Gakkai kikanshi. 27, 75-85.

Shirasuna, K., Sato, M. and Miyazaki, T., 1981. A neoplastic epithelial duct cell line established from an irradiated human salivary gland. Cancer. 48, 745-752.

Silletti, E., Bult, J.H.F. and Stieger, M., 2012. Effect of NaCl and sucrose tastants on protein composition of oral fluid analysed by SELDI-TOF-MS. Archives of Oral Biology. 57, 1200-1210.

Silva, T.H.A., Oliveira, A.B. and DeAlmeida, W.B., 1997. Conformational analysis of the antimalarial agent quinine. Structural Chemistry. 8, 95-107.

Singh, B.B., Liu, X.B. and Ambudkar, I.S., 2000. Expression of truncated transient receptor potential protein 1 alpha (Trp1 alpha) - Evidence that the Trp1 C terminus modulates store-operated Ca2+ entry. Journal of Biological Chemistry. 275, 36483-36486.

Smith, D.V. and Margolskee, R.F., 2006. Making sense of taste. Scientific American. 284, 32-39.

Spielman, A.I., 1990. Interaction of saliva and taste. Journal of Dental Research. 69, 838-843.

Spindel, E.R., Wurtman, R.J., McCall, A., Carr, D.B., Conlay, L., Griffith, L. and Arnold, M.A., 1984. Neuroendocrine effects of caffeine in normal subjects. Clinical Pharmacology & Therapeutics. 36, 402-407.

Stevens, A. and Lowe, J., 1997. Salivary Glands. In: Human Histology, 2nd Ed. Saint Louis: Mosby. p. 188-190.

Stewart, J.E., Feinle-Bisset, C., Golding, M., Delahunty, C., Clifton, P.M. and Keast, R.S.J., 2010. Oral sensitivity to fatty acids, food consumption and BMI in human subjects. British Journal of Nutrition. 104, 145-152.

Streckfus, C.F., Mayorga-Wark, O., Arreola, D., Edwards, C., Bigler, L. and Dubinsky, W.P., 2008. Breast cancer related proteins are present in saliva and are modulated secondary to ductal carcinoma in situ of the breast. Cancer Investigation. 26, 159-167.

Szlavik, V., Vag, J., Marko, K., Demeter, K., Madarasz, E., Olah, I., Zelles, T., O'Connell, B.C. and Varga, G., 2008. Matrigel-induced acinar differentiation is followed by apoptosis in HSG cells. Journal of Cellular Biochemistry. 103, 284-295.

Tabak, L.A., 1995. Defense of the oral cavity - structure, Biosynthesis and function of salivary mucins. Annual Review of Physiology. 57, 547-564.

Tandler, B., 1993. Introduction to mammalian salivary glands. Microscopy Research and Technique. 26, 1-4.

Tandler, B. and Phillips, C.J., 1998. Microstructure of mammalian salivary glands and its relationship to diet In: Garrett JR, Ekström J & Anderson LC, editors. Glandular mechanisms of salivary secretion. Basel: Karger. p 21-35.

Tang-Liu, D.D., Williams, R.L. and Riegelman, S., 1983. Disposition of Caffeine and Its Metabolites in Man. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. 224, 180-185.

Tobon, G.J., Renaudineau, Y., Hillion, S., Cornec, D., Devauchelle-Pensec, V., Youinou, P. and Pers, J.-O., 2010. The Fms-like Tyrosine Kinase 3 Ligand, a Mediator of B Cell Survival, Is Also a Marker of Lymphoma in Primary Sjogren's Syndrome. Arthritis and Rheumatism. 62, 3447-3456.

Toko, K., 2000. Taste sensor. Journal of the Food Hygienic Society of Japan. 41, J336-J341.

Tsuboi, H., Matsumoto, I., Wakamatsu, E., Nakamura, Y., Iizuka, M., Hayashi, T., Goto, D., Ito, S. and Sumida, T., 2010. New epitopes and function of anti-M3 muscarinic acetylcholine receptor antibodies in patients with Sjogren's syndrome. Clinical and Experimental Immunology. 162, 53-61.

Turner, R.J. and Sugiya, H., 2002. Understanding salivary fluid and protein secretion. Oral Diseases. 8, 3-11.

Turner, S., Manuele, M.G., Davicino, R., Ferraro, G., Filip, R. and Anesini, C., 2009. Effect of caffeine on the secretion of peroxidase in rat submandibular gland: A study of its mechanism of action. Archives of Oral Biology. 54, 179-184.

Vag, J., Byrne, E.M., Hughes, D.H., Hoffman, M., Ambudkar, I., Maguire, P. and O'Connell, B.C., 2007. Morphological and functional differentiation of HSG cells: Role of extracellular matrix and trpc 1. Journal of Cellular Physiology. 212, 416-423.

Wada, O.H., Yamamori, T., Shimazaki, N., Ishibashi, K. and Seino, K., 2010. Function of salivary histatin 5 for bitter substances. 88th General Session and Exhibition of the IADR (International Association for Dental Research), Barcelone, Espagne, 14th-17th July 2010.

Warburton, D.M., 1995. Effects of caffeine on cognition and mood without caffeine abstinence. Psychopharmacology. 119, 66-70.

Wells, J.N. and Kramer, G.L., 1981. Phosphodiesterase inhibitors as tools in cyclic-nucleotide research - A precautionary comment. Molecular and Cellular Endocrinology. 23, 1-9.

Woodfield, R., Goodyear-Smith, F. and Arroll, B., 2005. N-of-1 trials of quinine efficacy in skeletal muscle cramps of the leg. British Journal of General Practice. 55, 181-185.

Wu, Y., Shu, R., Luo, L.J., Ge, L.H. and Xie, Y.F., 2009. Initial comparison of proteomic profiles of whole unstimulated saliva obtained from generalized aggressive periodontitis patients and healthy control subjects. Journal of Periodontal Research. 44, 636-644.

Young, J.A. and Schneyer, C.A., 1981. Composition of saliva in mammalia. Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science. 59, 1-53.

Zheng, C.Y., Hoffman, M.P., McMillan, T., Kleinman, H.K. and O'Connell, B.C., 1998. Growth factor regulation of the amylase promoter in a differentiating salivary acinar cell line. Journal of Cellular Physiology. 177, 628-635.

Zotta, E. and Yeyati, N.L., 2007. New concepts on urea transport by facilitated diffusion. Revista De Nefrologia Dialisis Y Trasplante. 27, 77-84.