



INRA



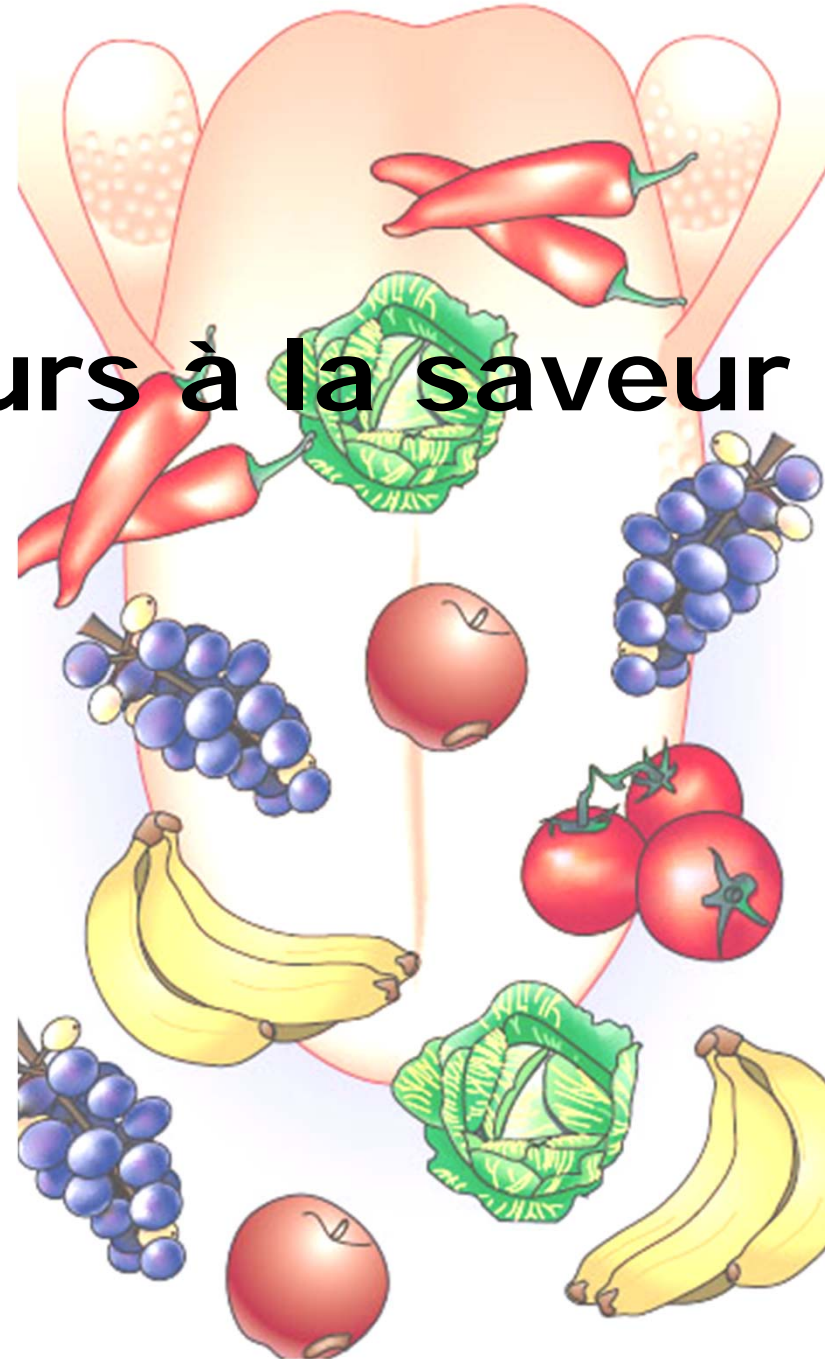
Goût: des récepteurs à la saveur

Loïc Briand

Centre des Sciences du Goût
et de l'Alimentation, Dijon

Journées Aromagri

Grasse, 13-14 octobre 2011

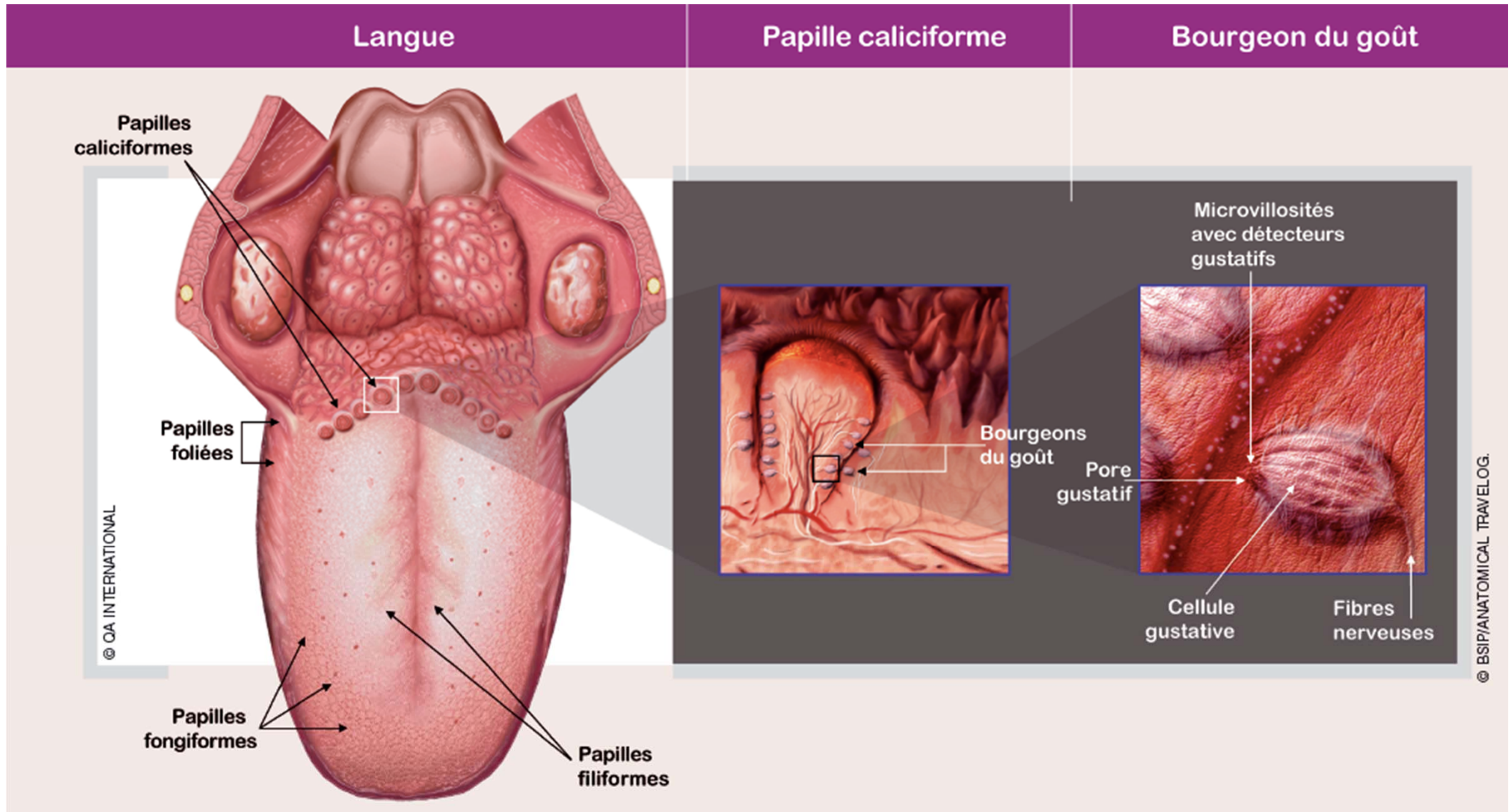


Gustation : sens essentiel

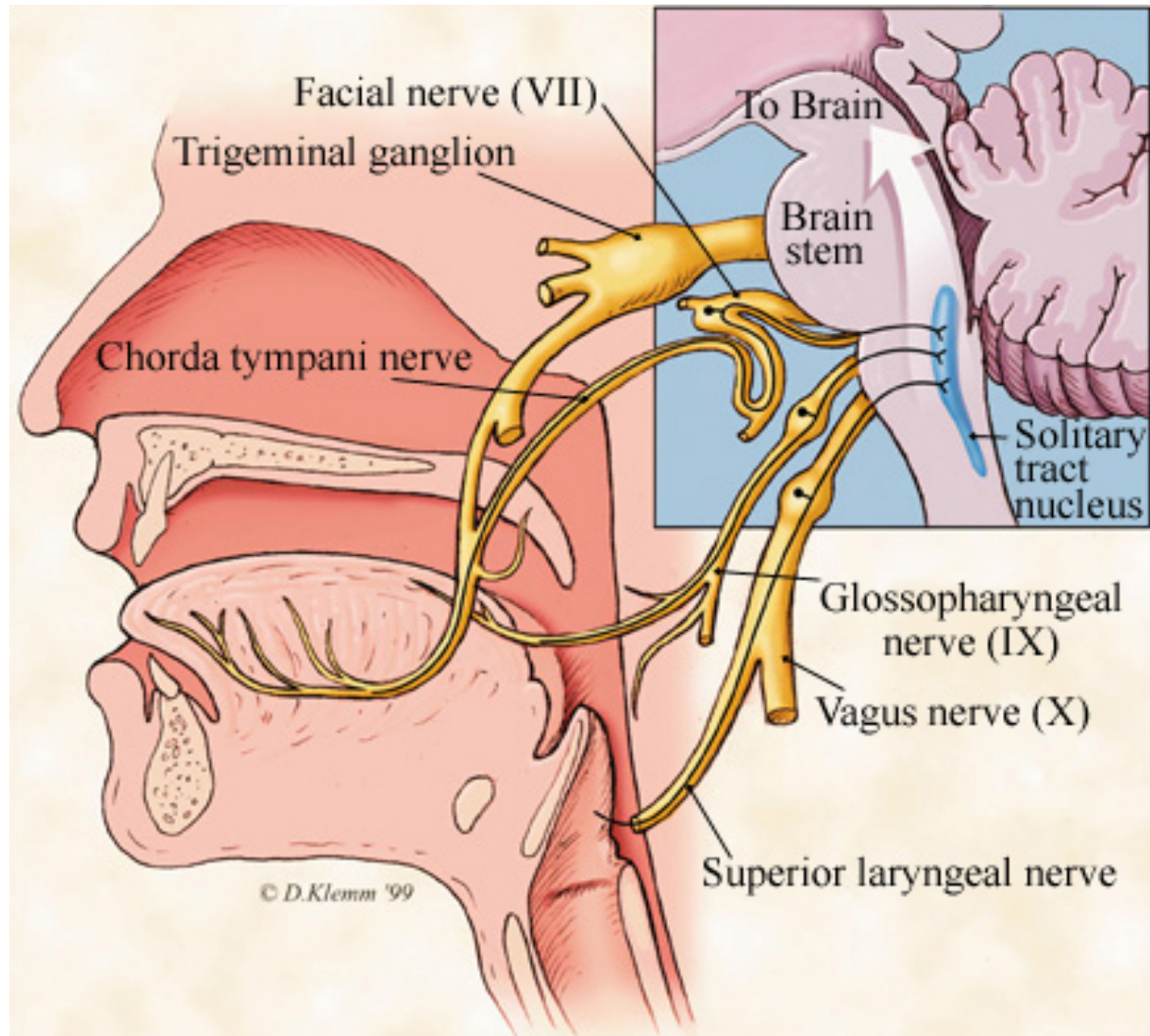
- Rôle déterminant dans la **perception sensorielle des aliments**
- Gustation résulte de **multiples informations sensorielles**
- Stimulation des **neurones olfactifs du nez**, les **papilles de la langue**, des récepteurs de la douleur (pour le piquant) et aussi des capteurs mécaniques ou thermiques
- Le mot « goût » désigne couramment la flaveur (mélange du goût et de l'odorat), le terme « gustation » ne doit s'appliquer au sens strict qu'aux **sensations perçues par les papilles gustatives** de la langue

Gustation : généralités

(1) Détecteurs gustatifs

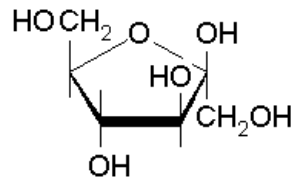


Gustation : généralités



(2) Les 5 saveurs primaires

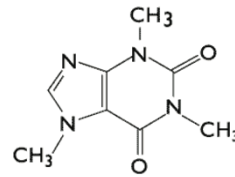
Sucré



fructose



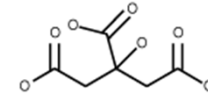
Amer



caféine



Acide



acide citrique

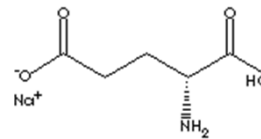
Salé

NaCl

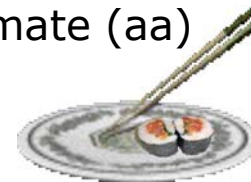


chlorure
de
sodium

Umami

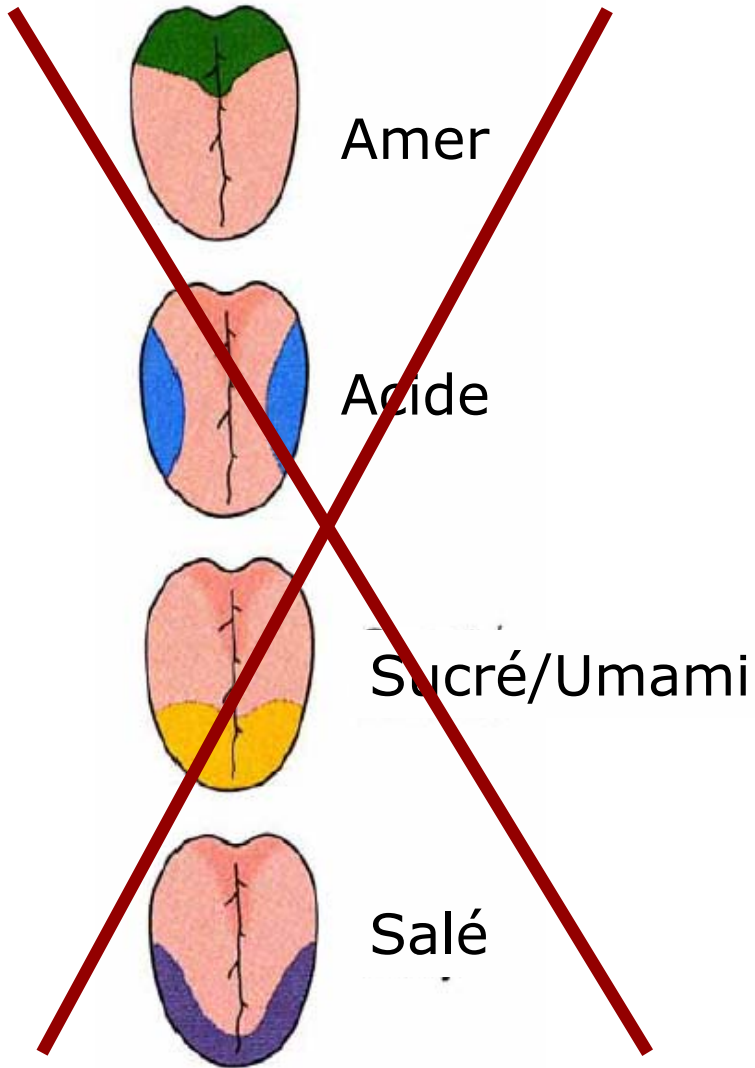


L-Glutamate (aa)



Henning (1916)

(3) Une palette de saveurs et disposition des régions les plus sensibles



La classification des goûts en cinq goûts primaires est réductrice. Il y a d'autres saveurs qui n'entrent pas dans cette classification:

- saveur astringente (airelles, thé, tanins)
- saveur de fraîcheur (menthe)
- saveur piquante (moutarde, piment, gingembre)
- saveurs métalliques
- saveur grasse
- saveur de l'amidon



Idée fausse : Selon Hanig (1901), les goûts primaires sont perçus par toutes les papilles quelle que soit leur localisation, mais la sensibilité à un goût particulier est plus grande dans certaines régions de la langue.

(4) Diversité des seuils de détection

Saveur	Substance	Seuil de perception
Sucré	Saccharose	0,01 M
Salé	NaCl	0,01 M
Acide	HCl	0,0009 M
Umami	L-Glutamate	0,0007 M
Amer	Quinine	0,000008 M (strychnine 100 nM)

Substances acides	Index	Substances amères	Index	Substances sucrées	Index	Substances salées	Index
Acide chlorhydrique	1	Quinine	1	Sucrose	1	NaCl	1
Acide formique	1,1	Brucine	11	1-propoxy-2-amino-4-nitrobenzène	5000	NaF	2
Acide chloracétique	0,9	Strychnine	3,1	Saccharine	675	CaCl ₂	1
Acide acétyllactique	0,85	Nicotine	1,3	Chloroforme	40	NaBr	0,4
Acide lactique	0,85	Phénylthiourée	0,9	Fructose	1,7	NaI	0,35
Acide tartarique	0,7	Caféine	0,4	Alanine	1,3	LiCl	0,4
Acide malique	0,6	Vératrine	0,2	Glucose	0,8	NH ₄ Cl	2,5
Tartrate de potassium	0,58	Pilocarpine	0,16	Maltose	0,45	KCl	0,6
Acide acétique	0,55	Atropine	0,13	Galactose	0,32		
Acide citrique	0,46	Cocaïne	0,02	Lactose	0,3		
Acide carbonique	0,06	Morphine	0,02				

(5) Variabilité inter-individus

Variabilité génétique : les réponses gustatives varient selon les individus. Par exemple, le goût du **phénylthiocarbamide** (saveur amère) n'est pas perçue par environ 35% de la population.

Pour le saccharose, la **variation inter-individuelle** s'étend sur un **facteur 10** en concentration.

Etat physiologique : l'équilibre hormonal influe sur les seuils. Les seuils de détection du saccharose sont, chez la femme, abaissés, dans la période qui précède l'ovulation.

Effet d'apprentissage

Une palette de saveurs

Salé

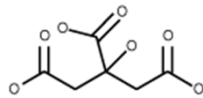


NaCl

Acide



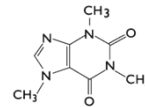
Acide citrique



Amer



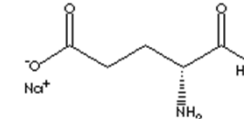
cafféine



Umami



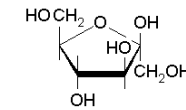
glutamate



Sucré



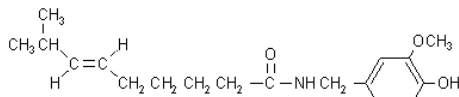
saccharose



Canaux ioniques

Récepteurs couplés aux
Protéines G (RCPG)

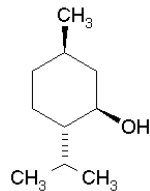
Pimenté



capsaïcine



Frais



menthol



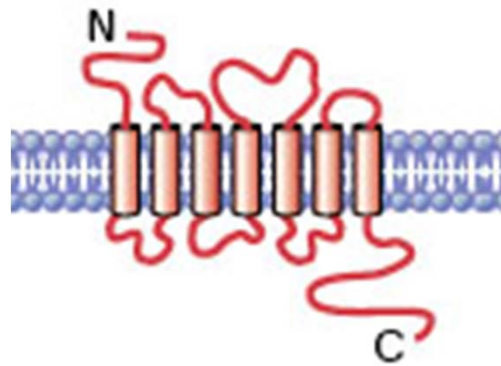
Perception trigéminale

Découverte des récepteurs gustatifs

- Découvertes assez récentes / Récepteurs olfactifs
- Récepteur du goût amer : **2000**
- Récepteurs du goût sucré : **2001**
- Récepteurs à l'umami (**1998 & 2001**)
- Échec des approches biochimiques
- Succès de l'approche de génétique moléculaire
- Séquençage des génomes murin et humain

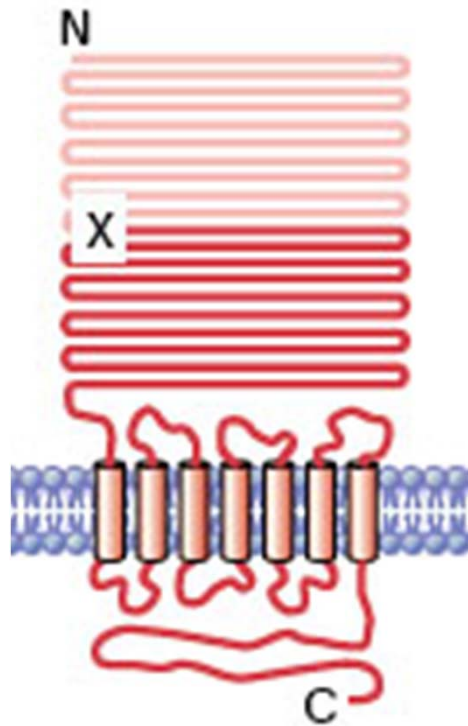
Récepteurs gustatifs

Amer



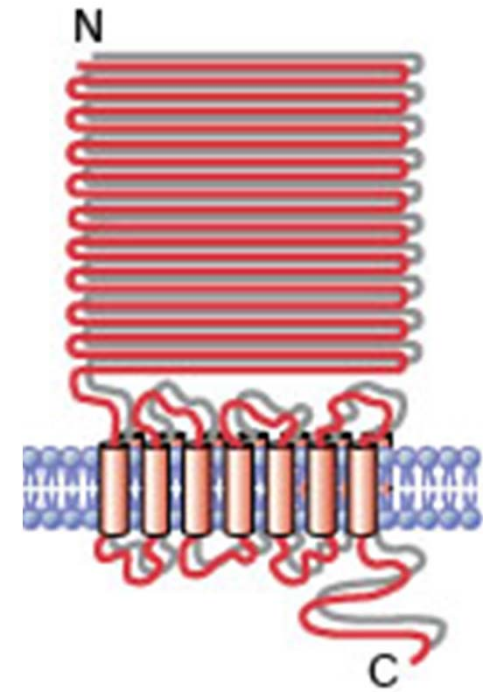
T2Rs

Umami



Taste mGluR4
T1R1/T1R3

Sucré



T1R2/T1R3

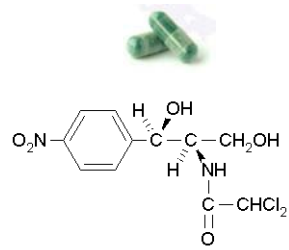
nombre \approx 25

1 ou 2

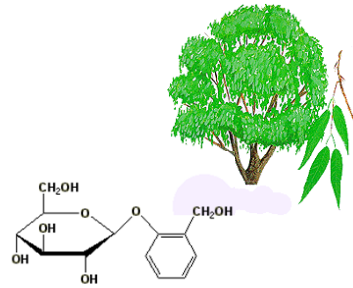
1

Récepteurs aux molécules amères

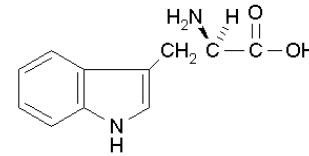
Diversité chimique des stimuli amers



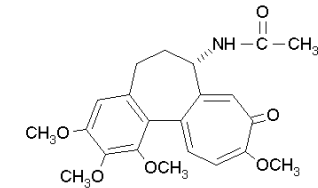
chloramphénicol



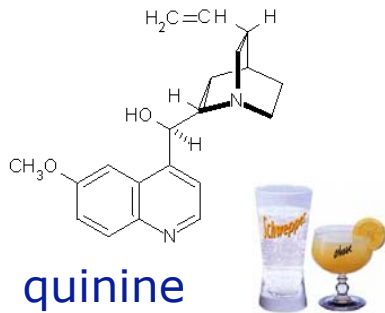
salicine



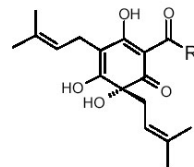
L-tryptophane



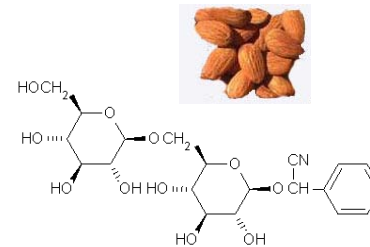
cochicine



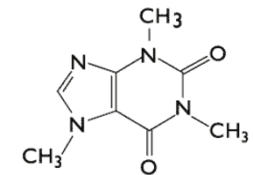
quinine



humulone



amygdaline

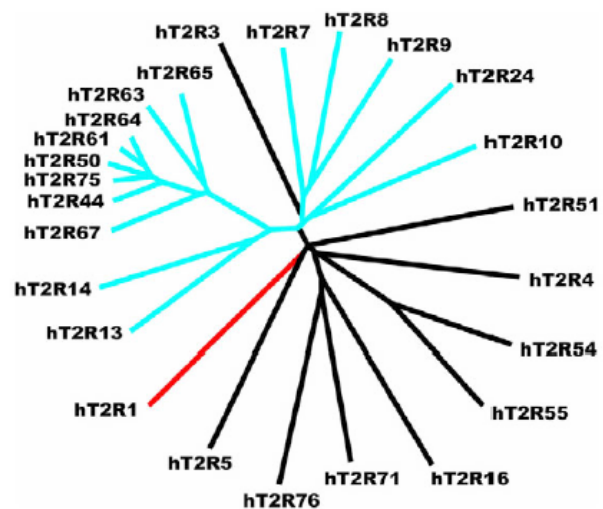


caféine



Les récepteurs aux molécules amères

- **24 récepteurs T2Rs** chez l' être humain (33 chez la souris)
- **Récepteurs divergents** (21 à 90% d'identité de séquence en acide-aminés)
- Récepteurs très **sensibles**
- **Variabilité** en accord avec le **diversité chimique** des ligands amers
- **Co-expression** dans les cellules gustatives => **absence de discrimination** des molécules amères
- T2R exprimés dans le **tractus gastro-intestinal** = rôle dans les réflexes vomitifs



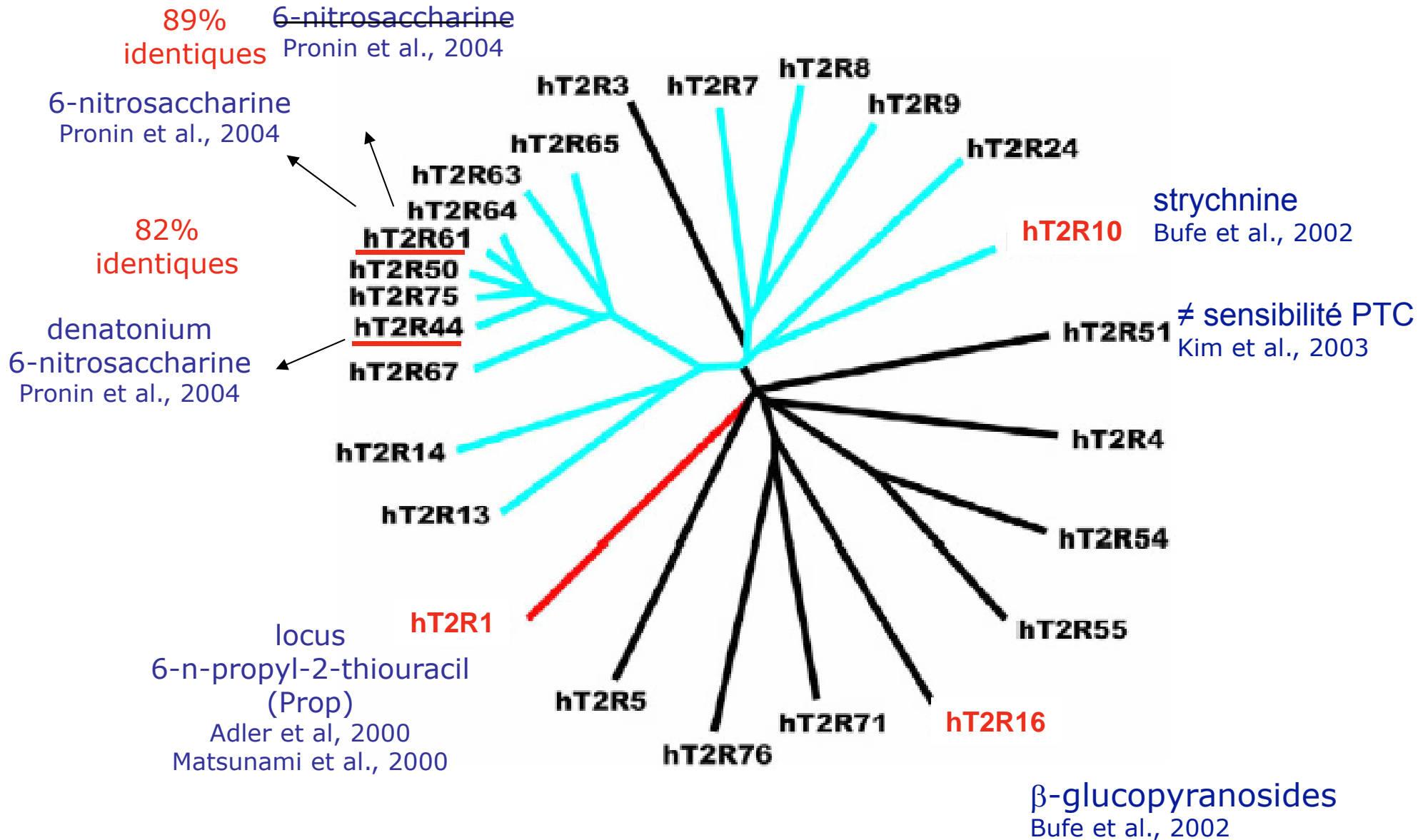
Chromosome 12 (15 membres)

Chromosome 5 (8)

Chromosome 7 (1)

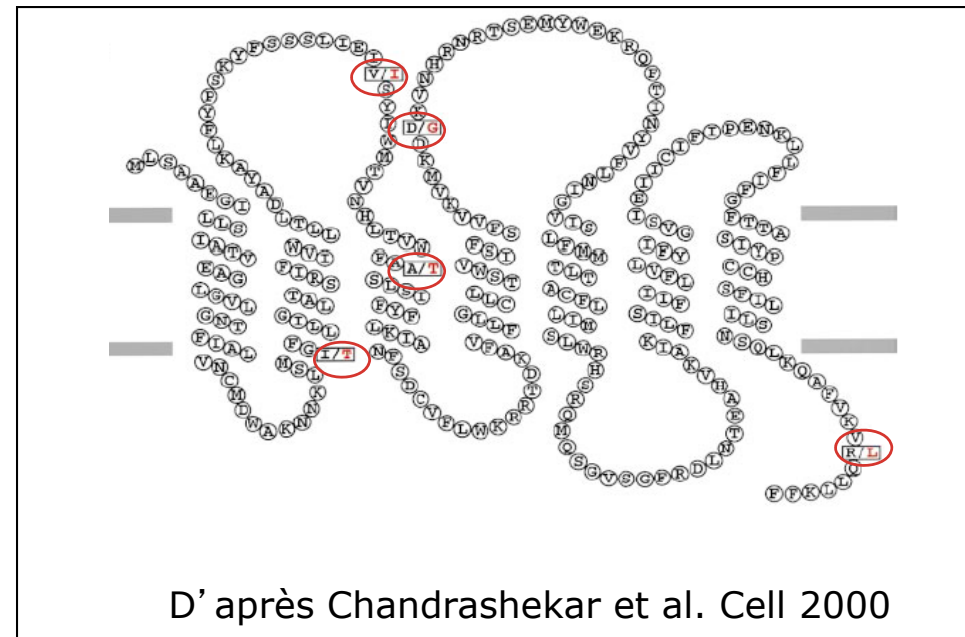
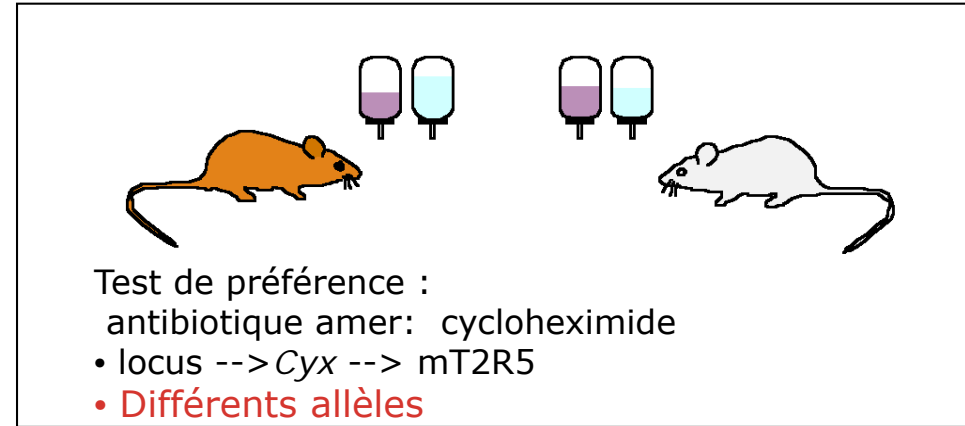
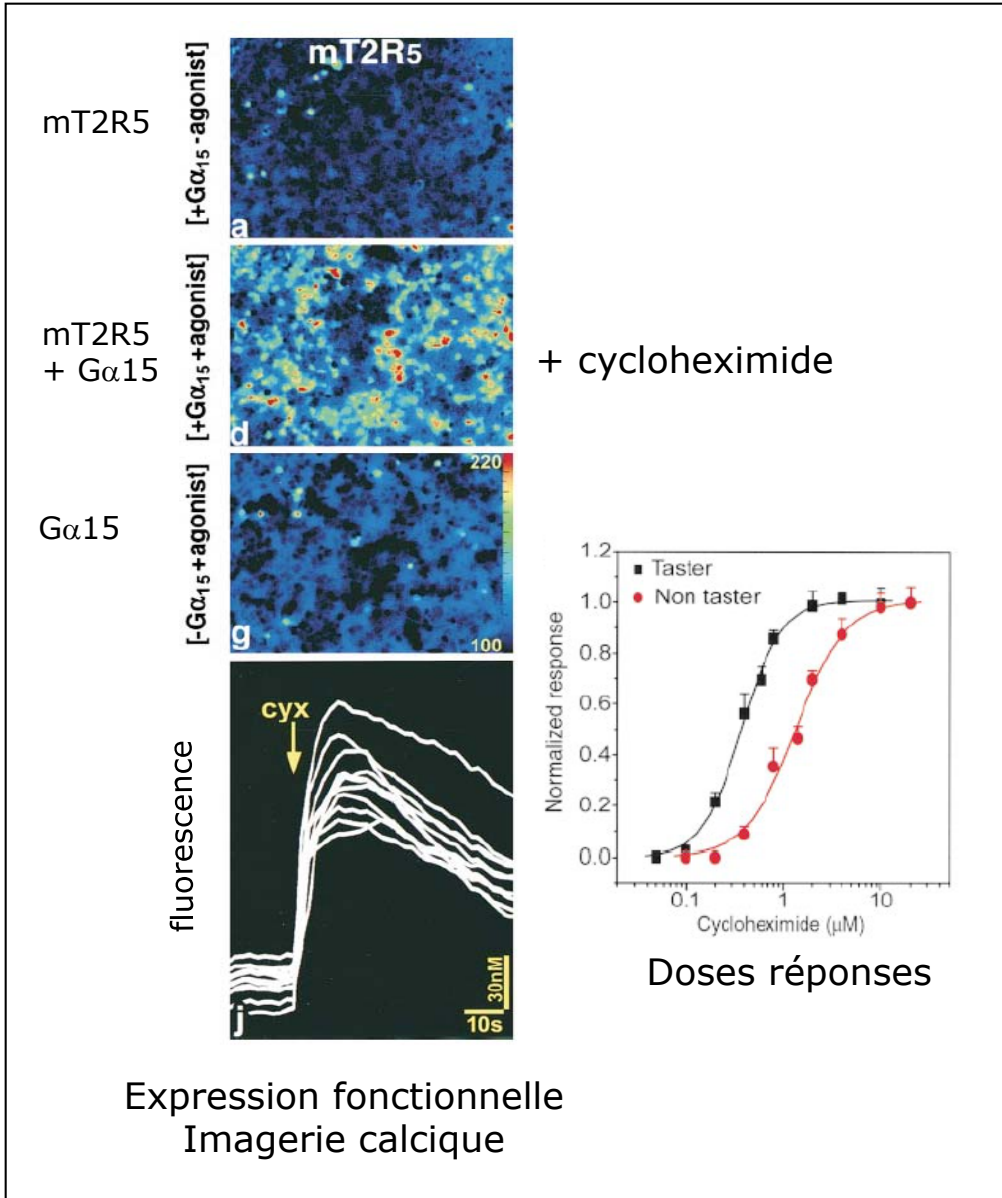
Adler et al Cell 2000
Matsunami et al Nature 2000
Chandrashekar et al Cell 2000

Répertoires des récepteurs T2R humains



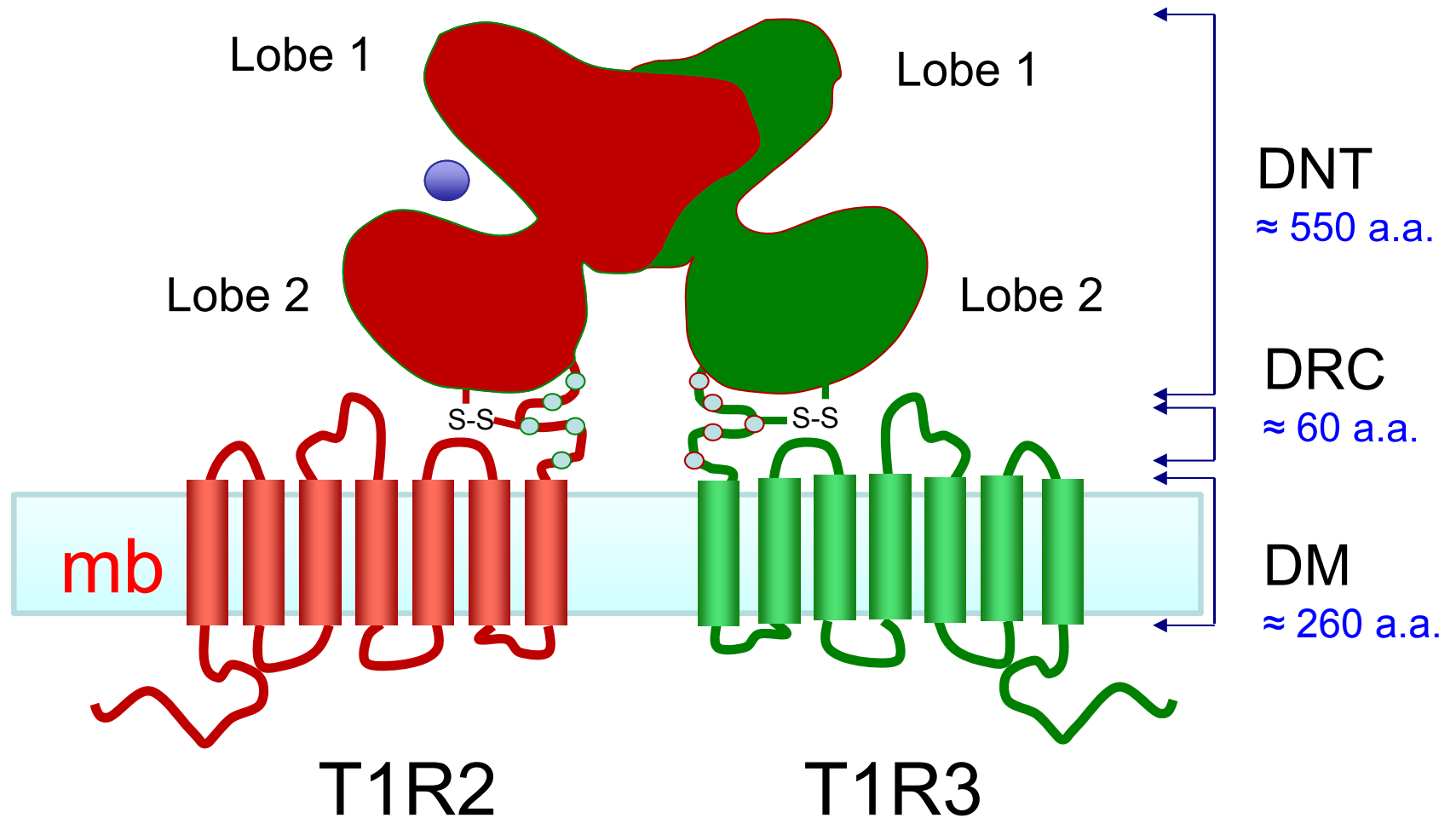
Les récepteurs aux molécules amères

Relation phénotype / génotype



Récepteurs aux molécules sucrées

Récepteur au goût sucré



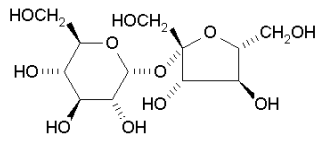
Montmayeur et al., *Nature Neuroscience* 4: 492-498 (2001)
Nelson et al., *Cell* 106: 381-86 (2001)
Zhao et al., *Cell* 115: 293-301 (2003)
Damak et al., *Science* 301: 850-3 (2003)

GPCR de Class C

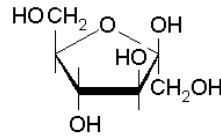
Stimuli sucrés divers



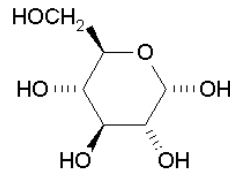
sucres



saccharose

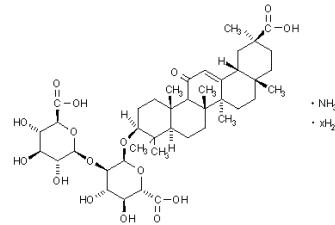


fructose

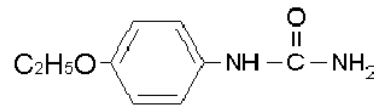


glucose

CHCl₃
chloroforme

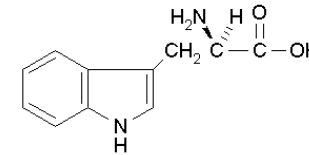


acide glycyrrhizique

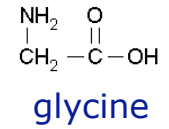


dulcine
4-éthoxyphénylurée

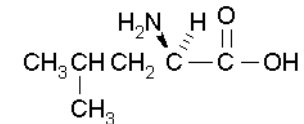
acides aminés



D-tryptophane

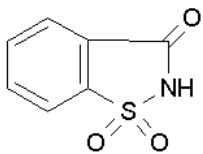


glycine

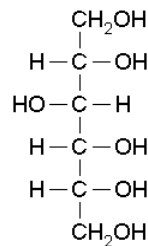


D-leucine

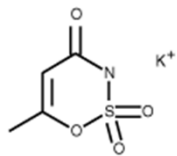
édulcorants



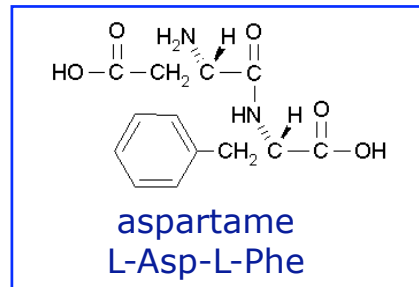
saccharine



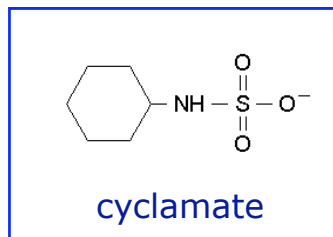
sorbitol



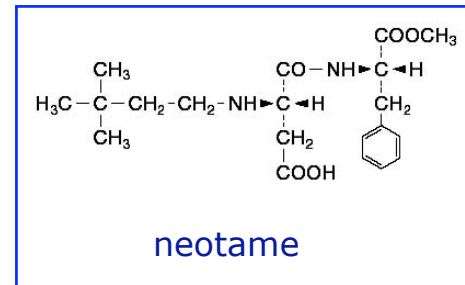
Acesulfame-K



aspartame
L-Asp-L-Phe



cyclamate



neotame

protéines

thaumatine
202 aa

curculine
114 aa

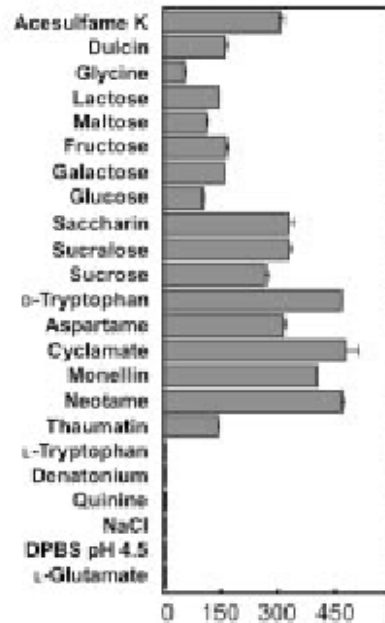


brazzéine
54 aa

Les récepteurs aux molécules sucrées

(1) Fonctionnalité de T1R2/T1R3 humain

HEK293 + G α 15

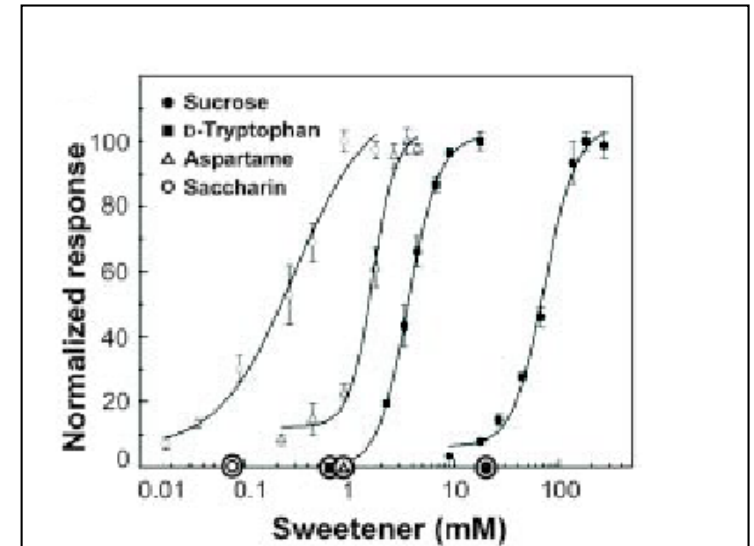


Activation :

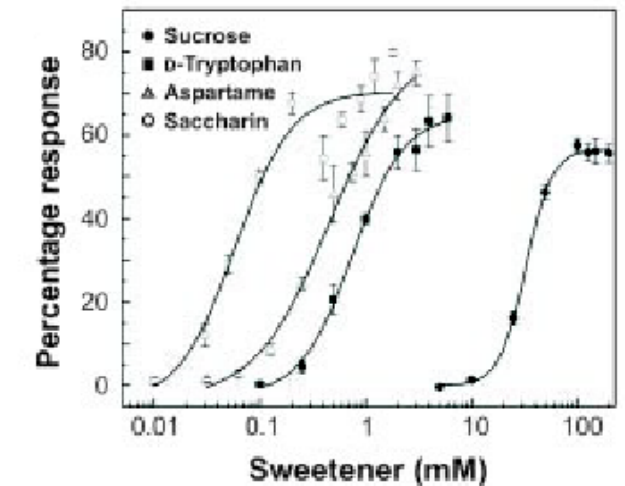
- sucres (fructose, galactose, ...)
- acides aminés sucrés (gly, D-tryp)
- protéines sucrées
- édulcorants synthétiques

Absence d'activation :

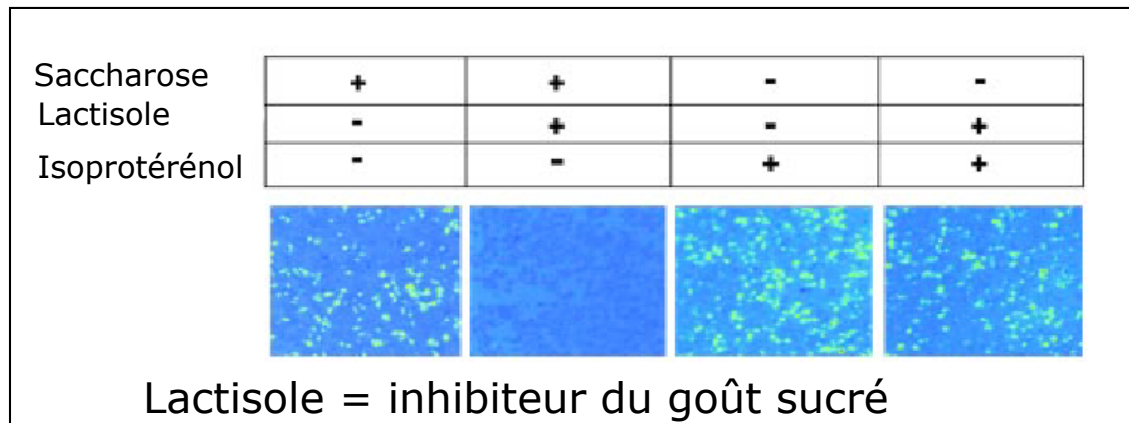
- L-Tryp = goût amer



Mesures psychophysiques



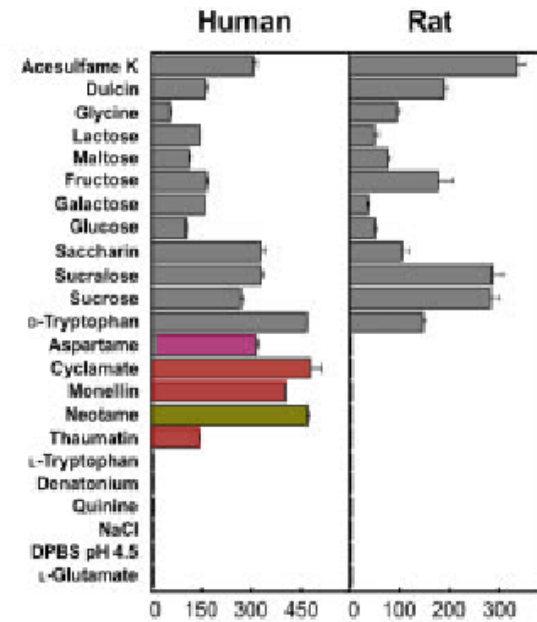
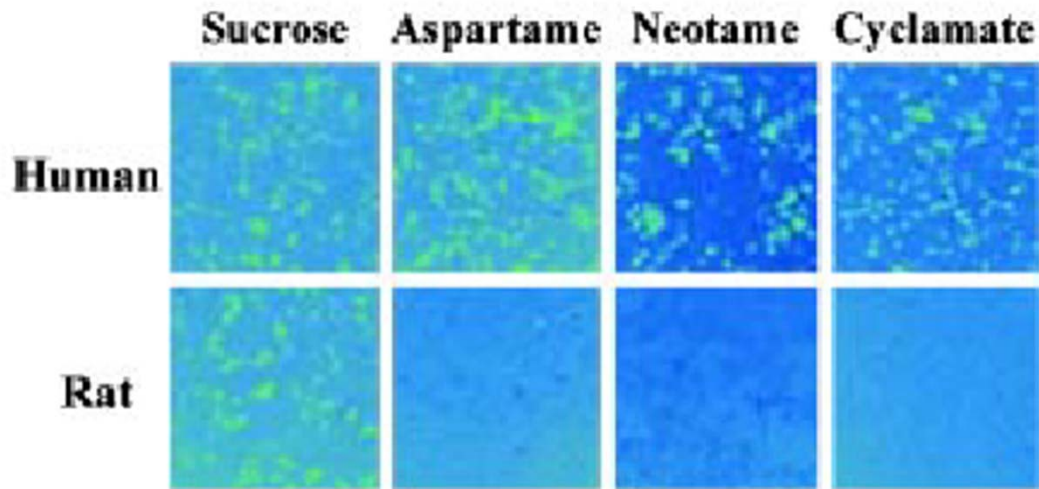
Réponses cellulaires



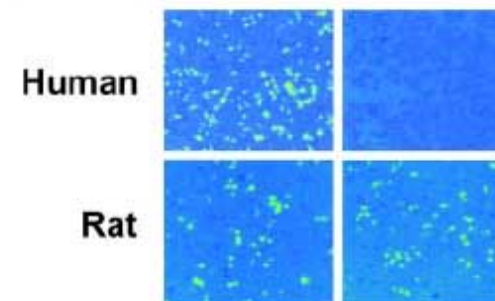
Les récepteurs aux molécules sucrées

(2) Différences T1R2/T1R3 Homme/rat

T1Rs Homme/rat \approx 75% d'identité



	Human	Rat
Sucrose	+	+
Lactisole	-	+
Isoproterenol	-	-

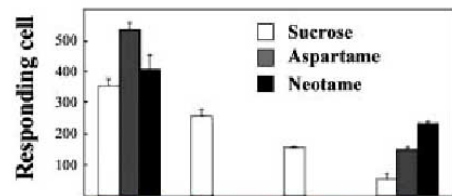


Absence d'activation des T1R2/T1R3 de rat par:

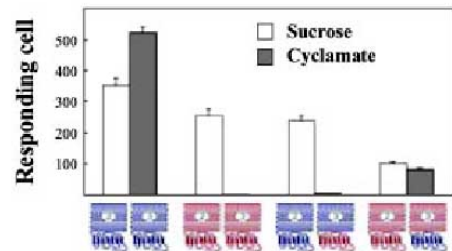
Aspartame, Cyclamate, Neotame, Thaumatine

Les récepteurs aux molécules sucrées

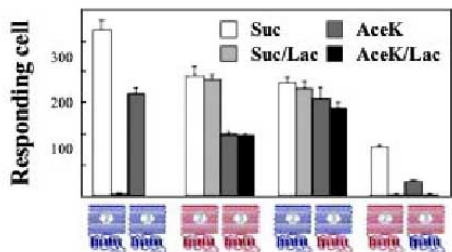
(3) Identification des sites de liaison



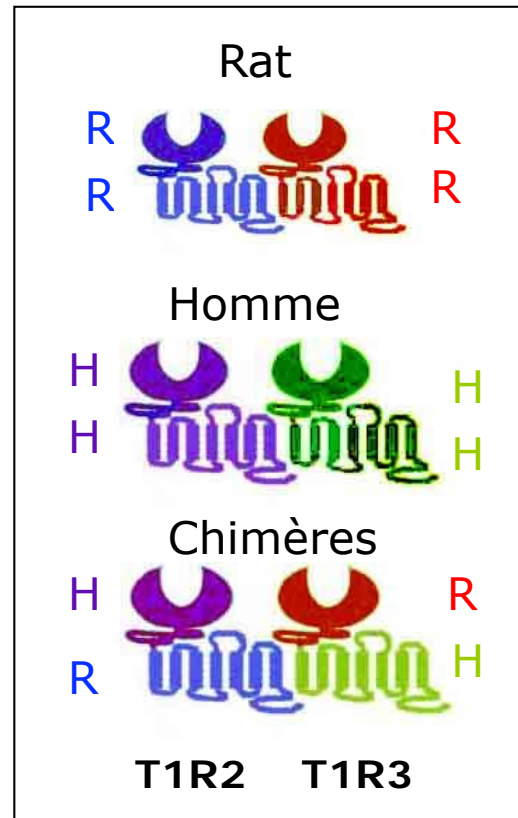
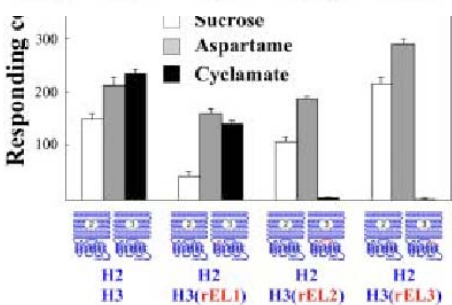
T1R2 H R R-H H-R
T1R3 H R H R



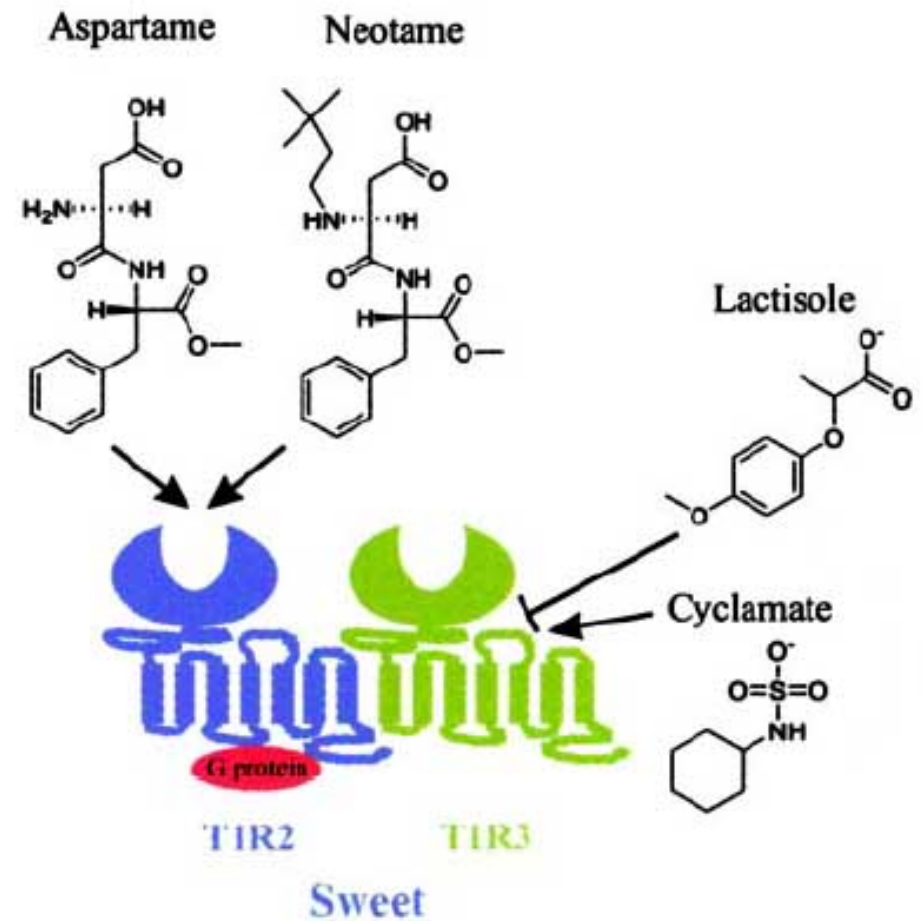
T1R2 H R H R
T1R3 H R H-R R-H



T1R2 H R H R
T1R3 H R H-R R-H



Stratégie



Indifférence des chats au sucré

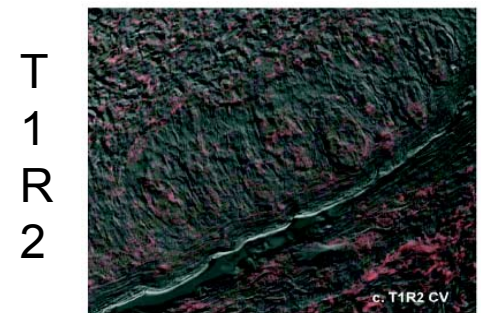
- Chat domestique : absence d'attractivité pour les composés sucrés et les édulcorants \neq omnivores (porc) ou d'autres carnivores (chien)
- Le chat est capable de détecter les acides aminés, l'acide, le salé ou l'amer = autres perceptions gustatives normales
- Etudes des bases moléculaires pour cette absence de détection:

- **T1R2 ==> pseudogène pas exprimé**



- Perte évolutive car animal exclusivement carnivore
- Pseudogénéisation observée aussi chez le tigre et le guépard

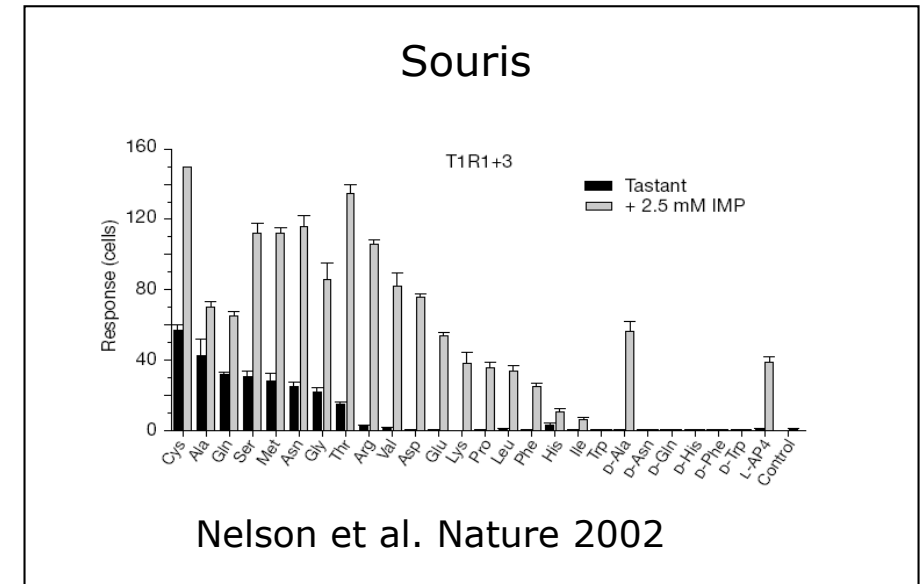
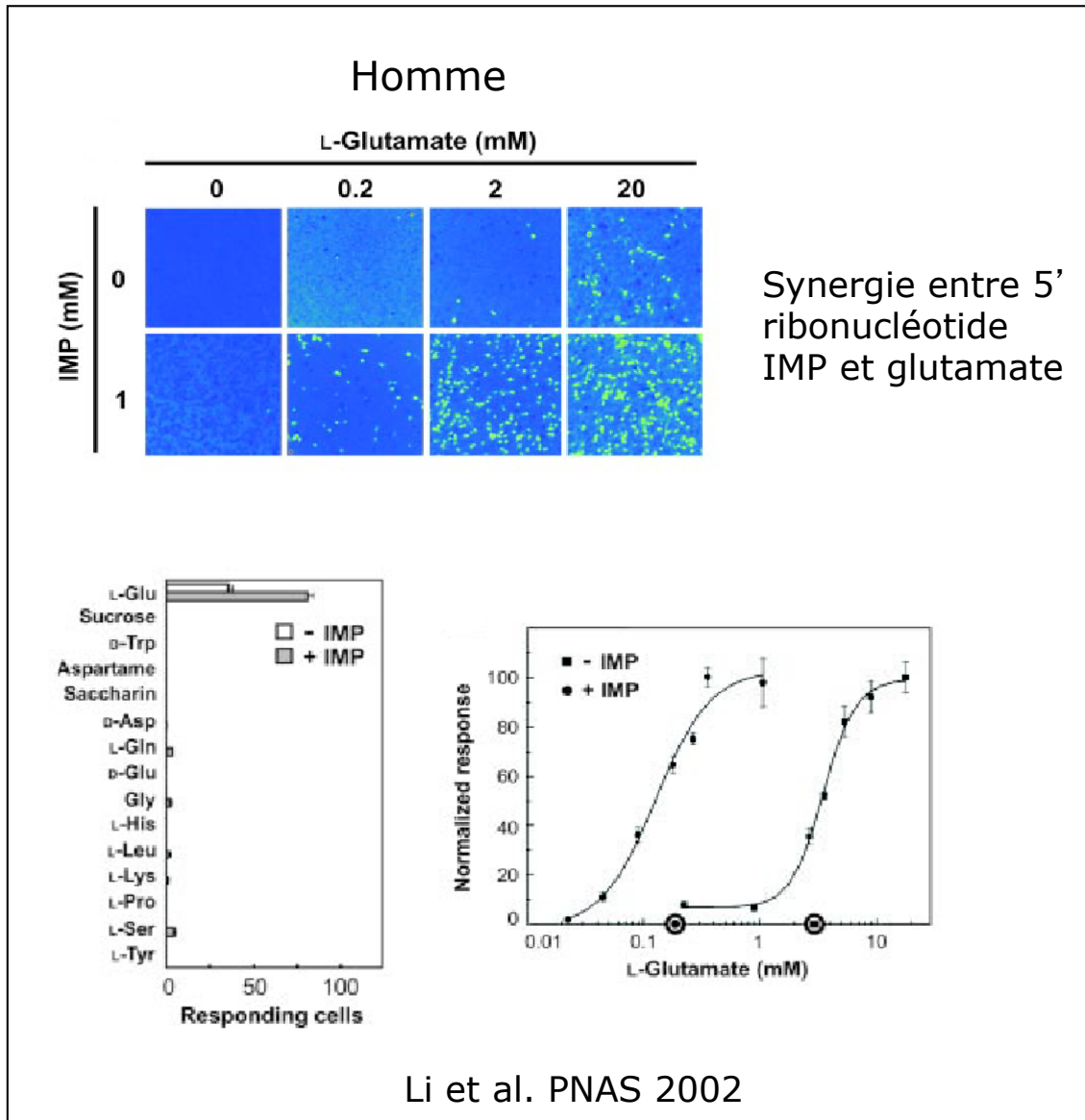
Li et al. PloS Genetics (2005) 1(1):e3



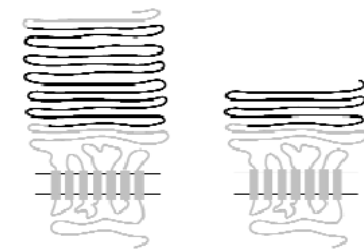
Récepteurs à l'umami

Les récepteurs aux acides aminés

T1R1/T1R3 : récepteurs aux acides aminés



Autre récepteur au glutamate?



Brain mGluR4 Taste mGluR4

mGluR4 = forme tronquée du récepteur métabotrope du cerveau

Chaudhary et al. Nature neurosci 2000

Les récepteurs gustatifs

salé

acide

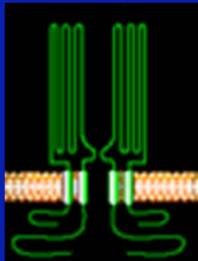
amer

sucré

umami

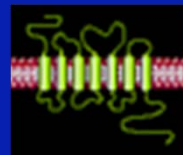
PKD2L1

canaux ioniques

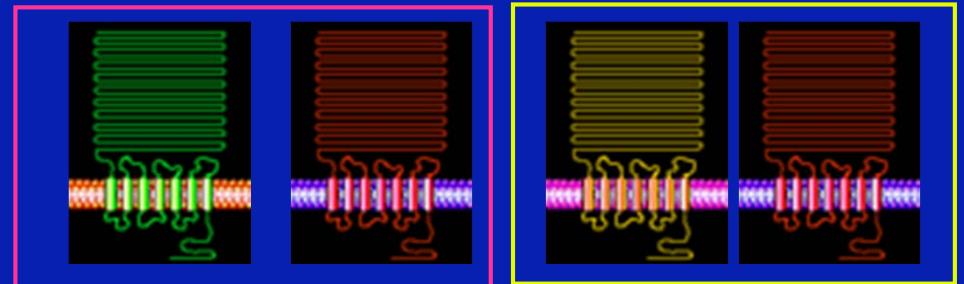


récepteurs couplés aux protéines G
7 domaines TM

famille
≈ 25 T2R



T1R2/T1R3 T1R1/T1R3

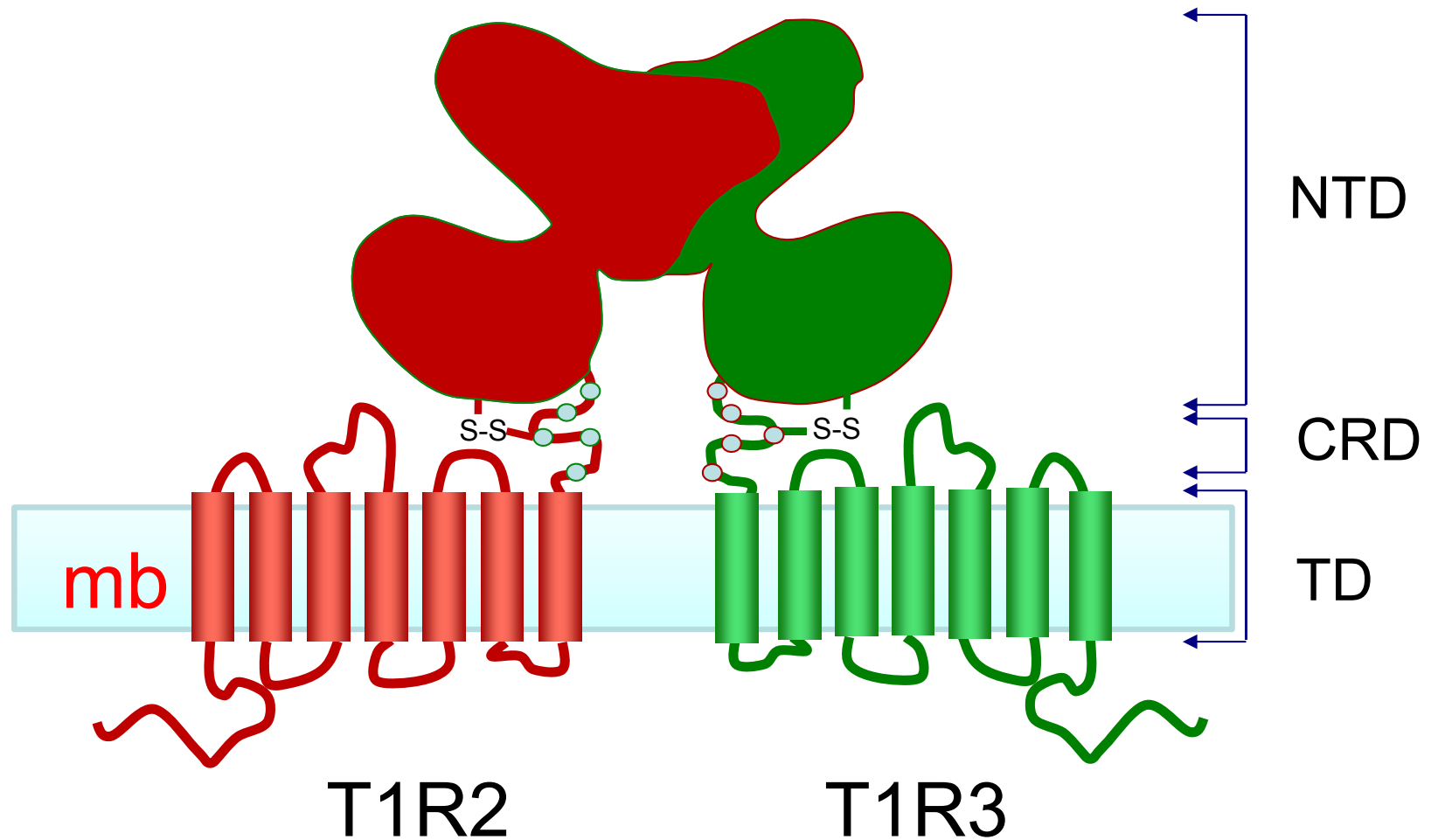


hétérodimères

Principaux objectifs

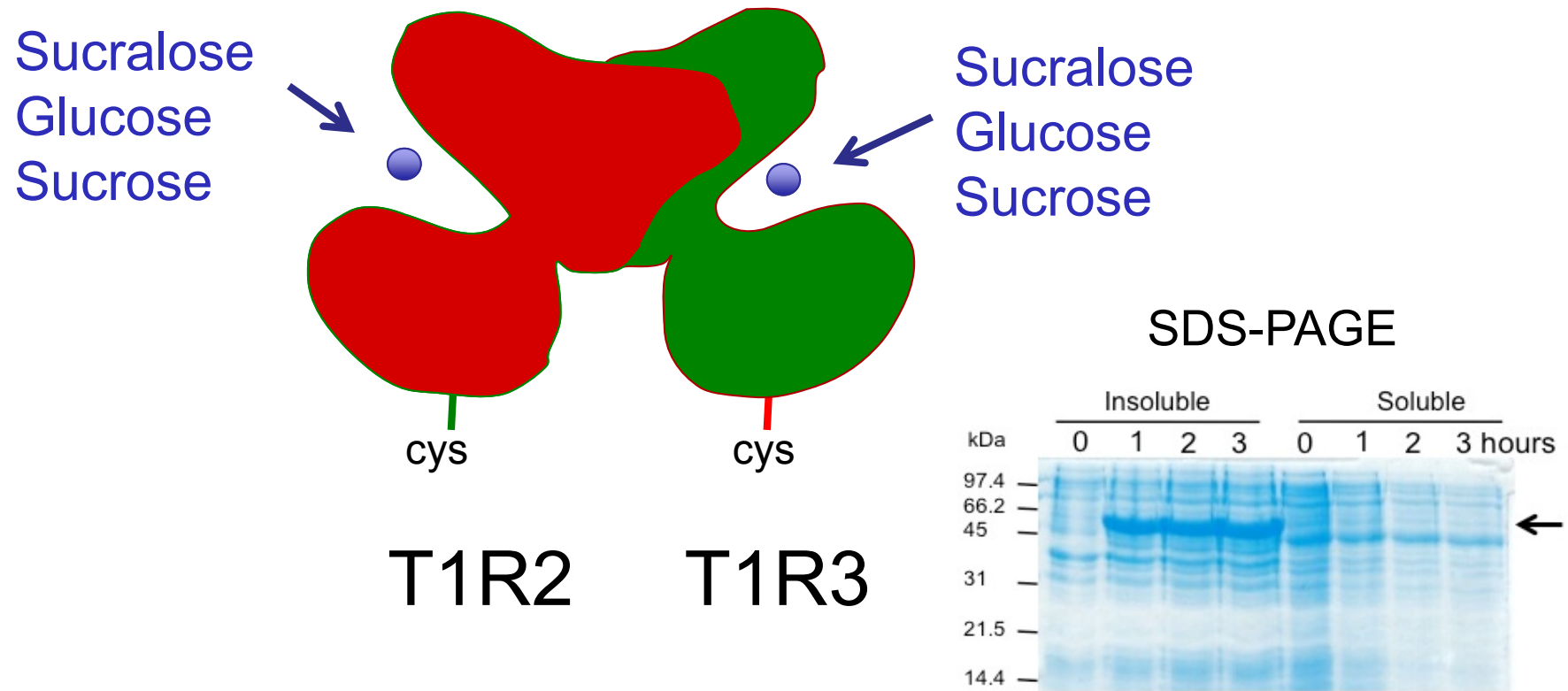
- 1- **Identifier les sites de liaison** du récepteur pour les molécules sucrées et les édulcorants et comprendre les **déterminants stéréochimiques** de leur saveur,
- 2- comprendre à un niveau moléculaire les **phénomènes de synergie**, et les **effets d'antagonismes** impliqués dans l'activation du récepteur humain,
- 3- comprendre les **relations structure–activité** des molécules sapides, identifier et concevoir de **nouveaux édulcorants** à l'aide du criblage virtuel,
- 4- comprendre les **variations inter-individuelles**.

Biochemical study of T1R NTD proteins



Nie et al., Cur Biol (2006)

Biochemical study of T1R-NTD proteins

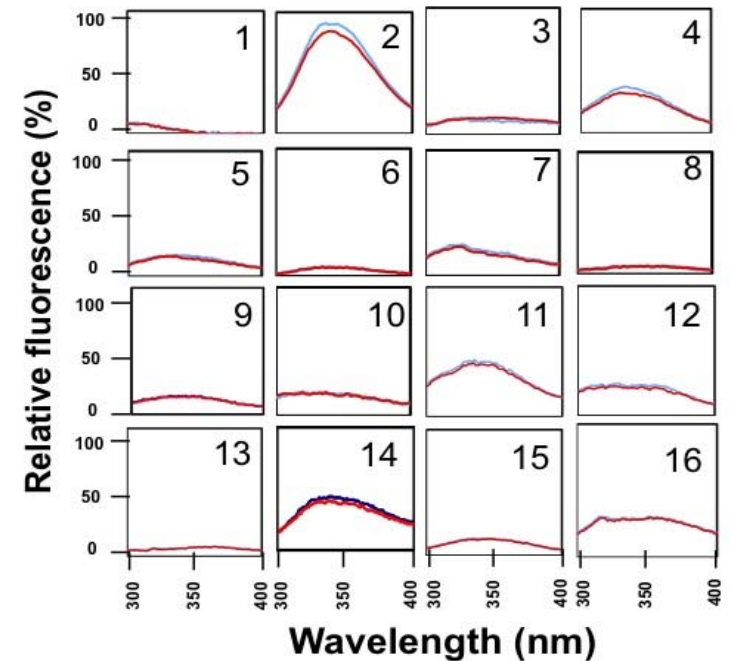
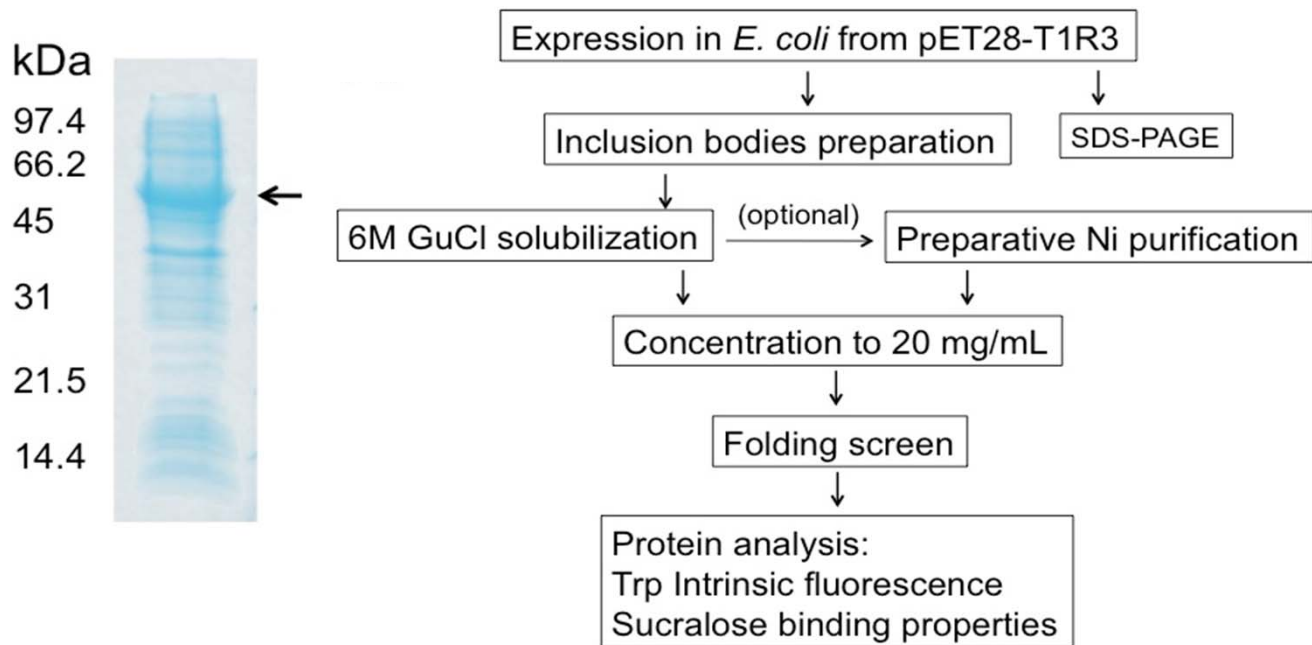


mT1R2 and mT1R3

Nie et al., Cur Biol (2006)

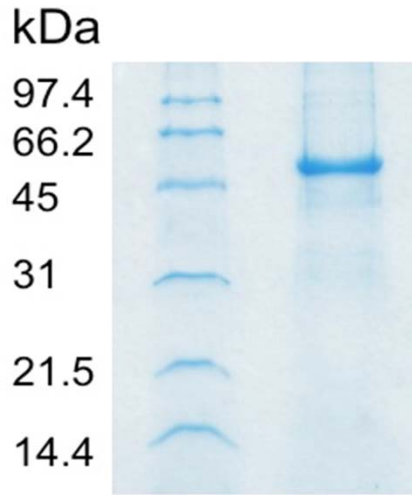
Expression in *E. coli* as
inclusion bodies

hT1R3-NTD refolding

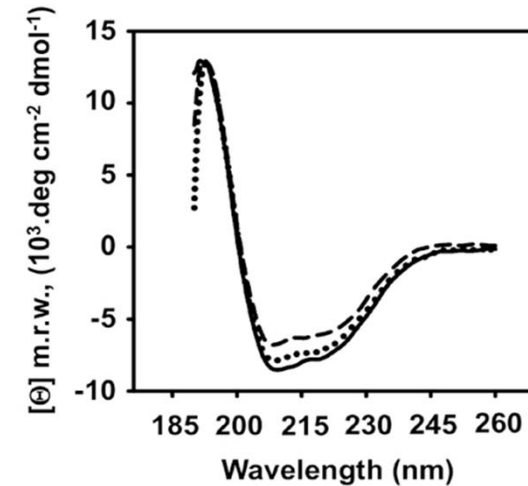
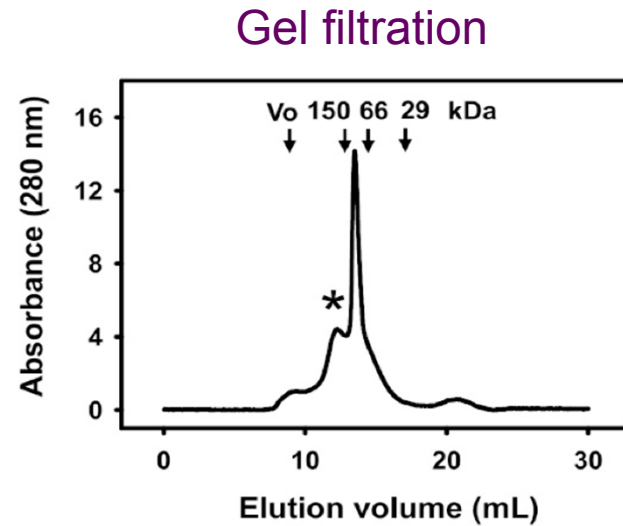


- Purification of inclusion bodies
- Refolding using a factorial screen

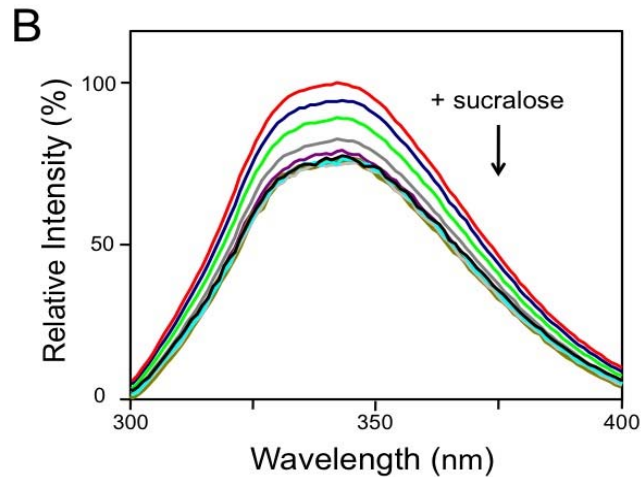
Human T1R3-NTD is functional



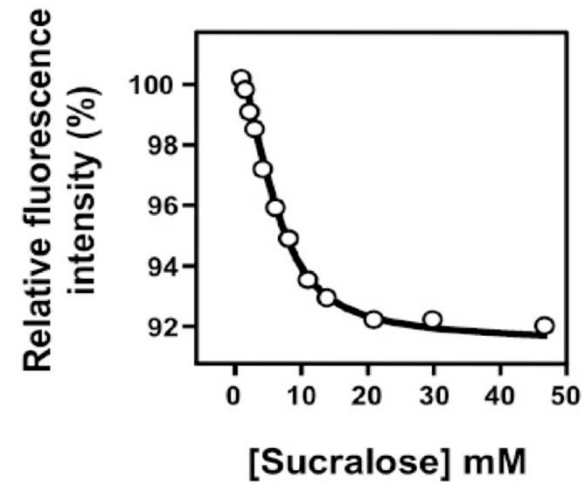
SDS-PAGE



Dichroisme circulaire

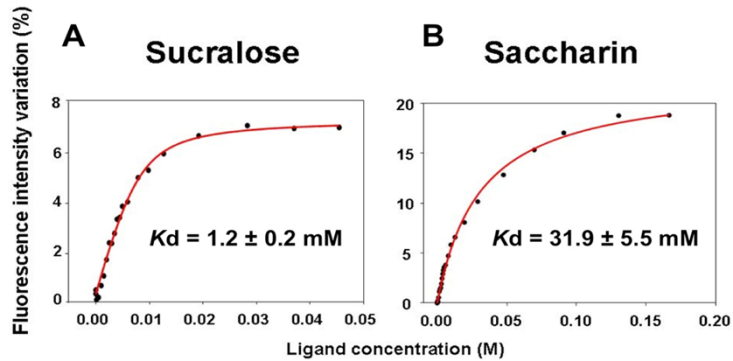


Trp fluorescence assay

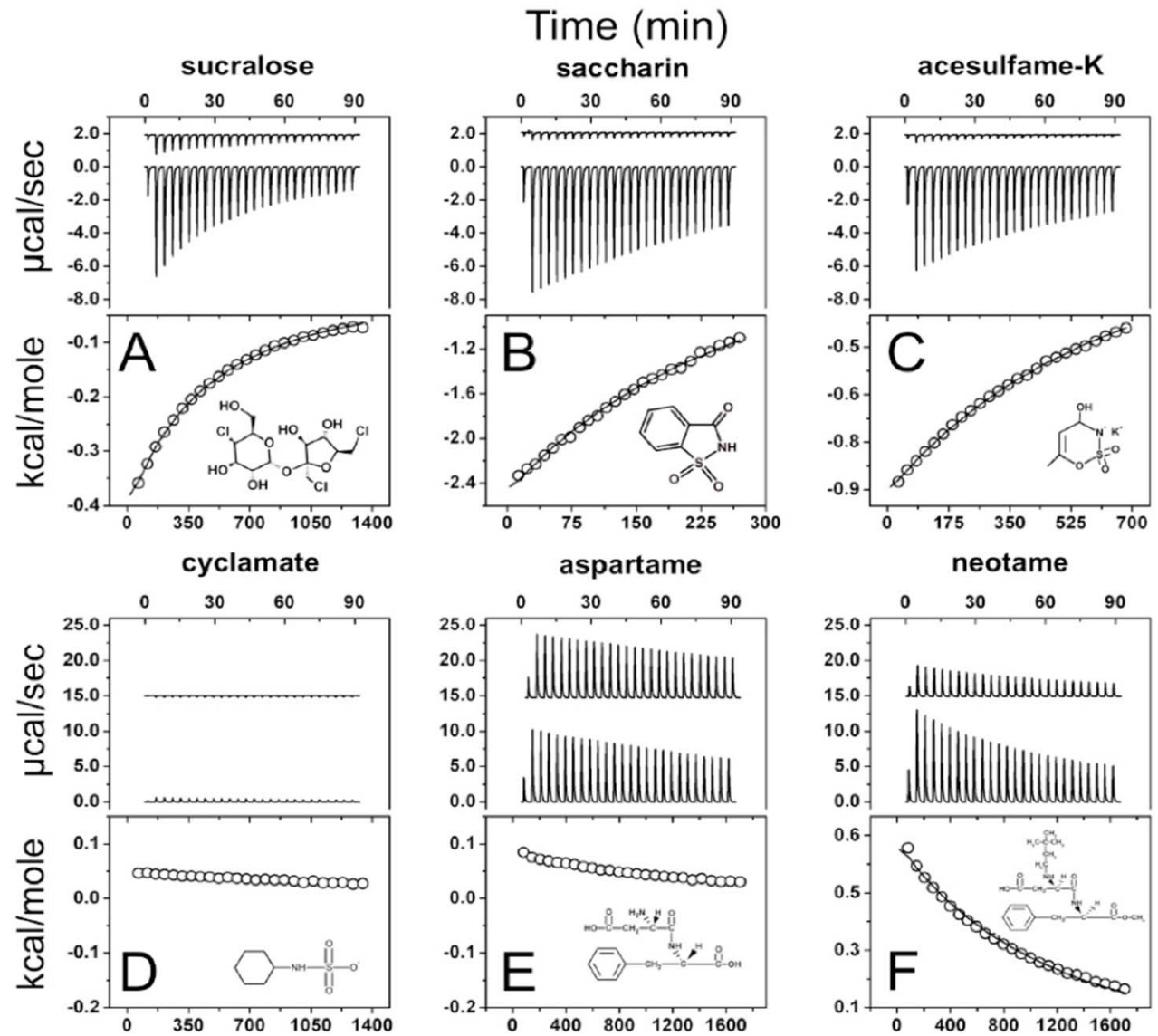


$K_d = 2.0 \pm 0.2 \text{ mM}$

hT1R3-NTD binds saccharin



Environmentally sensitive fluorophore probe



Brazzein

- Small soluble protein (6,5 kDa) from African plant *Pentadiplandra brazzeana*
- **500** sweeter than a 10% sucrose solution
- pH- and thermo- stability
- Sweet taste very close to that of sucrose
- Application in food industry

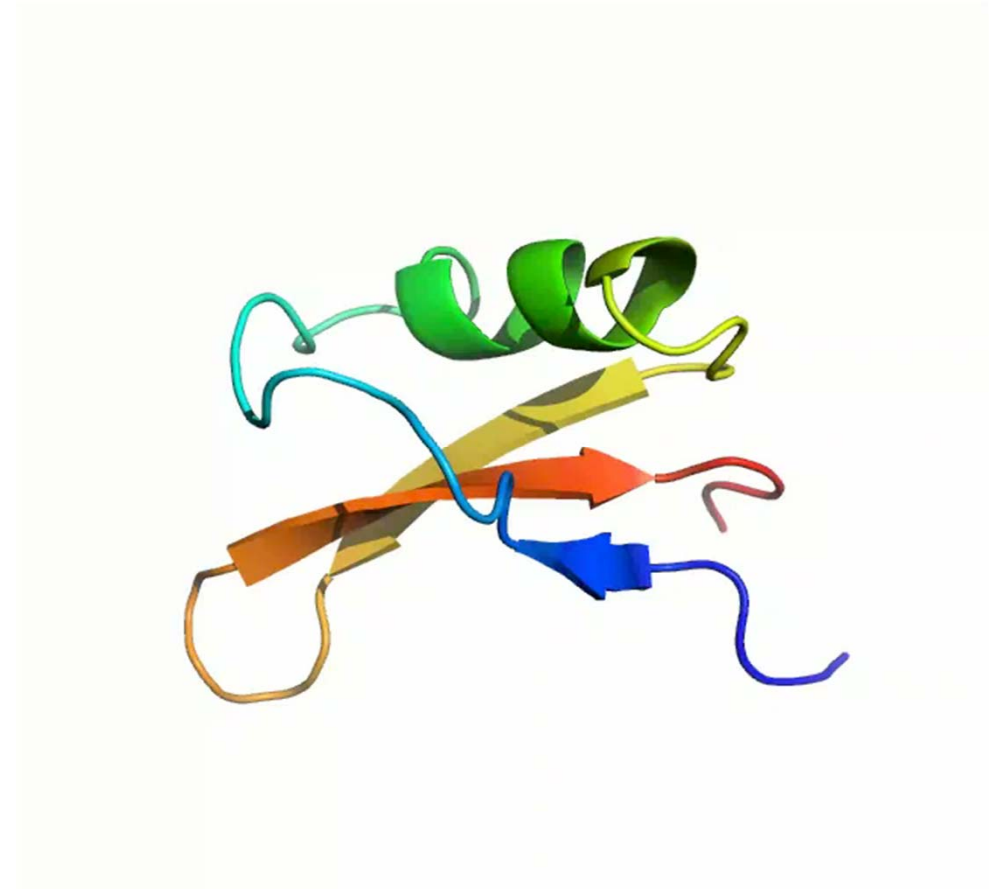


From Hellekant and Danilova,
Chem. Senses (2005)

3D Structure and structure – function relationships

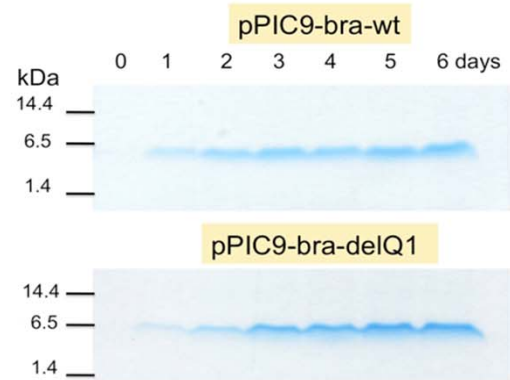
- Compact 3D-structure
- Four disulphide bonds
- One short alpha helix and three strands of antiparallel β sheets
- Refold different to that of other sweet proteins
- Structure- function studies :
importance of N- and C- terminal ends and charged AA on the surface

Hellekant and Danilova, Chem. senses (2005)

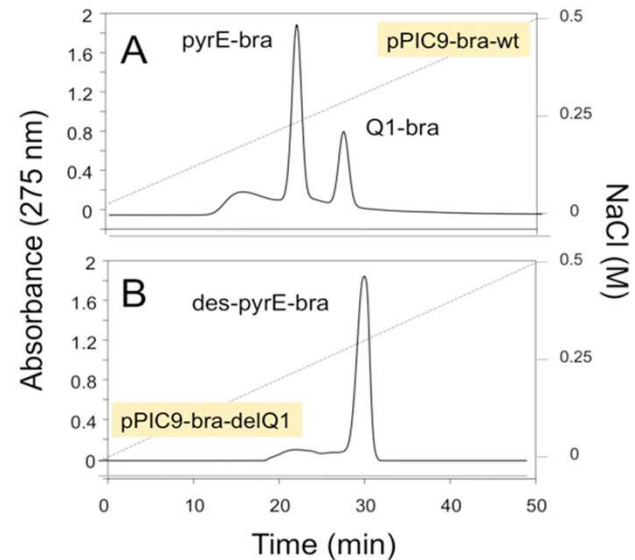


Caldwell et al., Nat Struct Biol (1998)

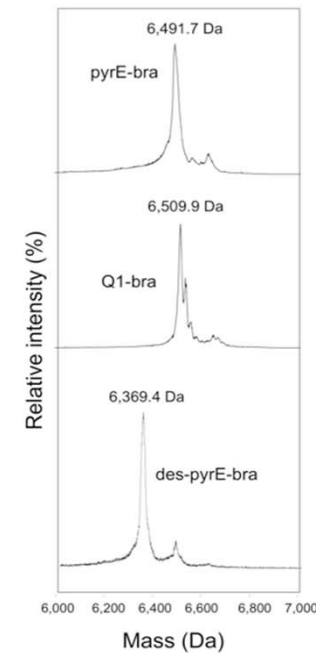
Secretion of brazzein by *P. pastoris*



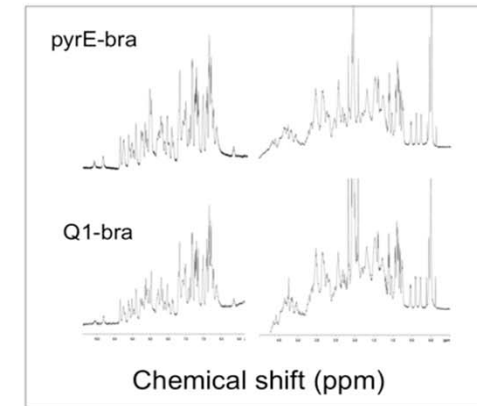
SDS-PAGE



Ion exchange chromatography



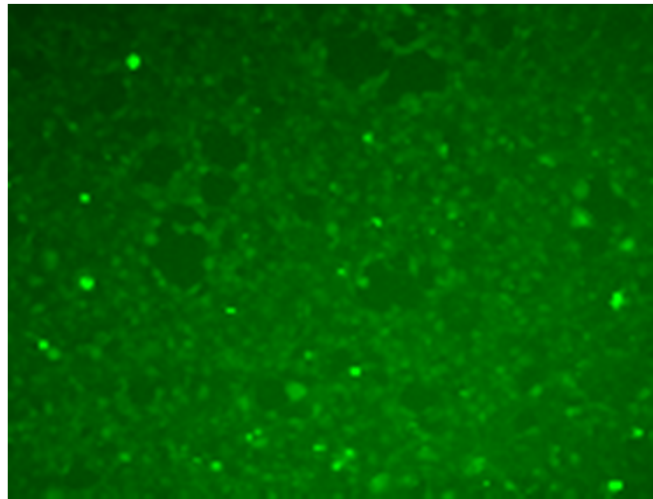
Mass spectrometry



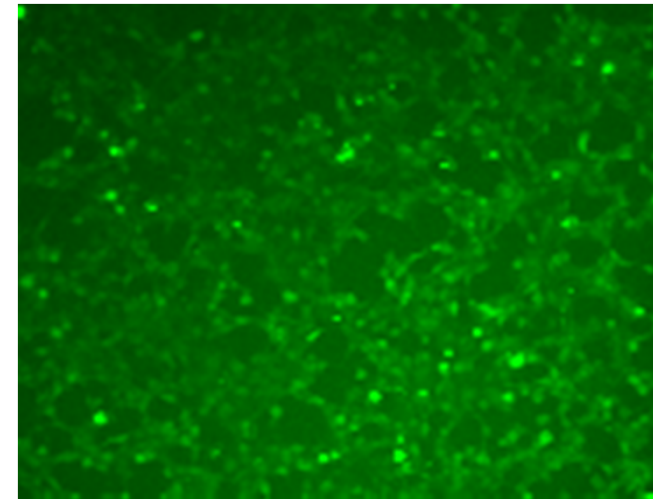
¹D ¹H NMR spectra

Brazzein activates T1R2/T1R3 receptor

mock



+ brazzein

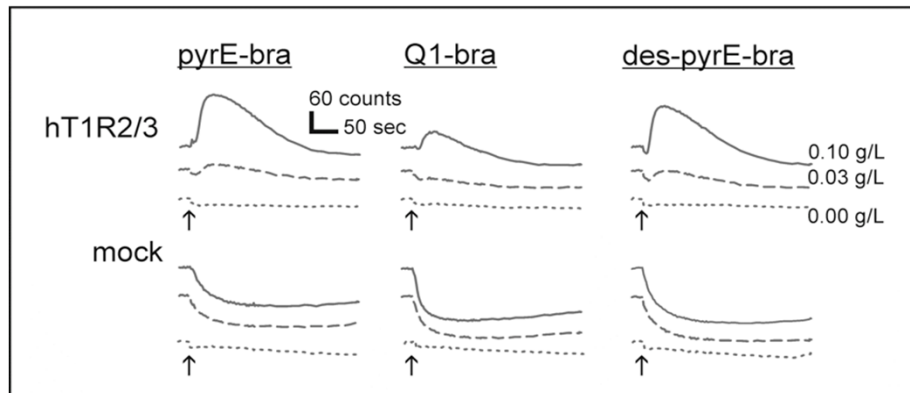


+ brazzein

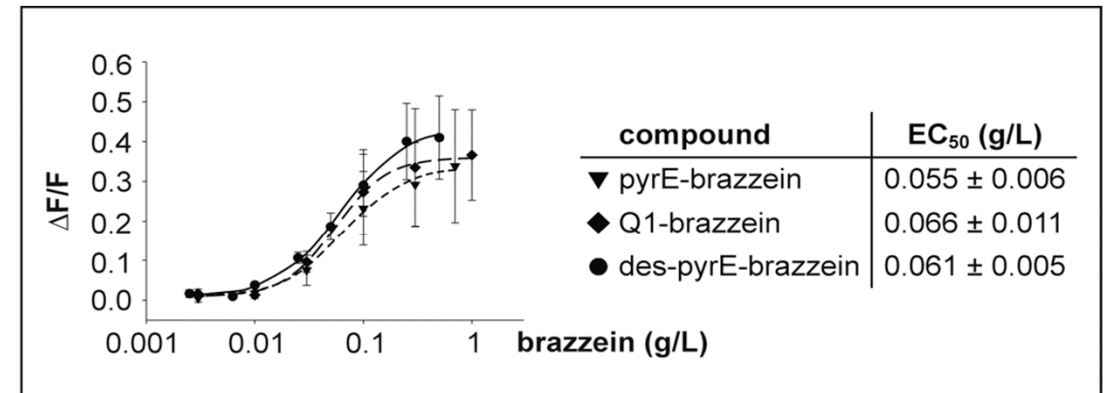
hT1R2/3



Collab. W. Meyerhoff



Calcium imaging - calcium traces



Calcium imaging - concentration responses

Confirmed by sensory analysis

Conclusion

- Enjeux socio-économiques en matière de nutrition et de santé humaine (diabète et obésité)
- Enjeux au niveau de l'agroalimentaire : développement de nouveaux édulcorants et des d'exhausteurs de goût
- Variabilité inter-individuelle importante = génotypage possible

