



## RESOLUTION OIV-OENO 529-2017

### MISE EN EVIDENCE DES PROTEINES CHITINASE ET THAUMATIN-LIKE DANS LES VINS BLANCS

L'ASSEMBLÉE GÉNÉRALE,

Vu l'article 2 paragraphe 2 iv de l'Accord du 3 avril 2001 portant création de l'Organisation internationale de la vigne et du vin,

Sur proposition de la Sous-commission « Méthodes d'analyse »,

DÉCIDE de compléter le Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et des moûts avec la méthode suivante :

#### MISE EN EVIDENCE DES PROTEINES CHITINASE ET THAUMATIN-LIKE DANS LES VINS BLANCS (méthode de type IV)

### 1. Introduction

Pour mettre en évidence les protéines instables et les risques de casse protéique dans les vins blancs, de nombreux tests sont basés sur la chaleur ou la précipitation par un agent chimique. Ils donnent des résultats très différents peu fiables voire contradictoires. Cette méthode immunologique d'immunoempreinte semi-quantitative permet d'obtenir un résultat de présence ou d'absence des protéines instables dans les vins. Elle permet de détecter la thaumatin-like et la Chitinase à partir d'une concentration globale de 1 mg/l dans les vins. Cette valeur résulte de la comparaison des résultats avec la méthode d'électrophorèse SDS décrite dans le Recueil des méthodes d'analyse (OIV-MA-AS315-12) dont le seuil limite de détection est de 1 mg/l

### 2. Domaine d'application

Cette méthode immunologique d'immunoempreinte s'applique aux vins blancs.

### 3. Principe

La méthode immunologique d'immunoempreinte se déroule en 3 étapes :

- 3.1 Dépôt de l'échantillon de vin sur une membrane de nitrocellulose
- 3.2 Détection des protéines instables
- 3.3 Révélation de la présence des protéines instables

*Exemplaire certifié conforme  
Sofia, le 2 juin 2017  
Le Directeur Général de l'OIV  
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

*Jean-Marie AURAND*

L'intensité des spots colorés observés sur la membrane est proportionnelle à la quantité de protéines instables et au risque de casse protéique du vin.

#### 4. Réactifs et produits

##### 4.1 Liste des réactifs et produits

Sans indication contraire, les produits sont utilisés tels qu'ils sont commercialisés.

- 4.1.1 Eau ultra-pure : résistivité  $\geq 18 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$  à 25°C
- 4.1.2 Vin très riche en protéines et vin ne contenant pas de protéine suite à un traitement à la bentonite. Ces vins sont utilisés respectivement pour les témoins Positif et Négatif : la vérification et la quantification des protéines présentes dans ces vins peuvent être réalisées par électrophorèse SDS-PAGE (Méthode OIV-MA-AS315-12)
- 4.1.3 Anticorps polyclonaux de lapin dirigés contre les protéines instables du vin : voir Protocole en Annexe
- 4.1.4 Anticorps polyclonaux de Chèvre dirigé contre les anticorps IgA de lapin couplés à la peroxydase de raifort (noté par la suite : anticorps Goat anti-Rabbit-HRP)
- 4.1.5 Chlorure de sodium anhydre (NaCl) : N° CAS 7647-14-5
- 4.1.6 Tris-HCl anhydre : N° CAS 1185-53-1
- 4.1.7 HCl concentré en solution; pureté  $\geq 36,5\%$  : N° CAS 7647-01-0
- 4.1.8 Tween 20 : N° CAS 9005-64-5
- 4.1.9 Sérum Albumine Bovine (BSA) poudre lyophilisée; pureté  $\geq 96\%$  : N° CAS 9048-46-8
- 4.1.10 4-Chloro-1-naphthol; pureté  $\geq 99\%$  : N° CAS 604-44-4
- 4.1.11 Méthanol; pureté  $\geq 99,8\%$  : N° CAS 67-56-1
- 4.1.12 Eau Oxygénée en solution ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ); pureté  $\geq 30\%$  : N° CAS 7722-84-1

##### 4.2 Préparation des solutions de travail

Toutes les solutions peuvent être conservées 1 an à 4°C.

###### 4.2.1 Tampon TBS (Tris Buffered Saline)

Dissoudre 29,22 g de chlorure de sodium (4.1.5) et 2,42 g de Tris-HCl anhydre (4.1.6) dans 1 litre d'eau ultra-pure (4.1.1). Ajuster le pH à 7,5 avec une solution d'HCl concentré (4.1.7).

###### 4.2.2 Tampon TBS-Tween 20

Dans le tampon TBS (4.2.1), ajouter 0,05% de Tween 20 (4.1.8).

###### 4.2.3 Solution de blocage

Dans le tampon TBS (4.2.1), ajouter 4% de BSA (4.1.9).

###### 4.2.4 Solution d'anticorps polyclonaux (du commerce ou selon le protocole décrit en annexe)

*Exemplaire certifié conforme  
Sofia, le 2 juin 2017  
Le Directeur Général de l'OIV  
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

*Jean-Marie AURAND*

4.2.4.1 Diluer les anticorps polyclonaux anti-protéines instables (primaires) en fonction des recommandations commerciales ou de leurs titres dans un tampon TBS (4.2.1).

4.2.4.2 diluer les anticorps polyclonaux Goat anti-Rabbit-HRP (secondaires) en fonction des recommandations commerciales ou de leurs titres dans un tampon TBS (4.2.1)

#### 4.2.5 Solutions pour révéler les protéines instables

4.2.5.1 Dissoudre 30 mg de 4-Chloro-1-naphthol (4.1.10) dans 10 mL de méthanol (4.1.11). Placer cette solution à -20 °C et à l'obscurité jusqu'à utilisation.

4.2.5.2 Mettre 30 µL d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (4.1.12) dans 50 mL de TBS (4.2.1) extemporanément.

## 5. Matériel

### 5.1 Liste du matériel pour la réaction d'immunoempreinte :

5.1.1 Membrane de nitrocellulose avec des pores de 0,2 µm pour la réalisation de l'immunoempreinte

5.1.2 Pipettes automatiques de 0,5 – 10 µL et 100 – 1000 µL, cônes correspondants

5.1.3 Tubes, portoir à tubes pour les dilutions des anticorps

5.1.4 Éprouvettes graduées de classe A

5.1.5 Papier absorbant

5.1.6 Pince brucelles

5.1.7 Verrerie de laboratoire pour effectuer la réaction : petit cristalliseur, boîte de Petri, tubes, bouchons, etc.

5.1.8 Agitateur plateforme (pour réaction en boîte) ou rotatif (pour réaction en tube) de vitesse maximale 20 RPM.

### 5.2. Matériel nécessaire pour préparer les solutions:

5.2.1 Fioles jaugées classe A

5.2.2 pHmètre

5.2.3 Balance de précision au 0,1 mg

5.2.4 Centrifugeuse à 3000 g et tubes pour centrifugeuse.

## 6. Echantillonnage

Les échantillons doivent être prélevés et conservés à 4°C pour ne pas modifier les protéines naturellement présentes dans le vin.

### 6.1 Préparation de l'échantillon

Les échantillons (ou échantillons pour laboratoire) de vins sont déposés directement sur la membrane de nitrocellulose (5.1.1) à l'aide de la pipette (5.1.2), sans préparation préalable.

*Exemplaire certifié conforme  
Sofia, le 2 juin 2017  
Le Directeur Général de l'OIV  
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

*Jean-Marie AURAND*

## 7. Mode opératoire

L'analyse peut être réalisée sur des vins non filtrés à la seule condition que ces vins ne contiennent pas de bentonite en suspension. Si tel est le cas, réaliser une centrifugation à 3000 g (5.2.4) pendant 10 min à température ambiante.

Comme indiqué au (3), la méthode immunologique d'immunoempreinte se déroule en 3 étapes, les réactions se font à une température ambiante comprise entre 18°C et 25°C.

### 7.1 Dépôt de l'échantillon de vin

Déposer 5 µL (5.1.2) de prise d'essai des échantillons et solutions témoins sur la membrane de nitrocellulose (5.1.1).

Laisser sécher 15-20 min à température ambiante.

### 7.2 Ajout des anticorps monoclonaux

7.2.1 Placer la membrane dans la boîte ou le tube (5.1.7). Le volume des solutions sera fonction du contenant et de la taille de la membrane. Celle-ci doit être recouverte.

Les volumes ci-dessous sont pour un contenant de type petite boîte de Petri (5.1.7).

Ajouter la solution de blocage (4.2.3). Agiter pendant au moins 30 minutes (5.1.8)

7.2.2 Le lavage s'effectue ainsi : Eliminer la solution en bloquant la membrane si besoin avec une pince. Ajouter 20 mL de TBS (4.2.1), agiter pendant quelques minutes (5.1.8).

Laver une seconde fois comme décrit ci-dessus et éliminer la solution.

7.2.3 Ajouter 20 mL de solution d'anticorps primaires (4.2.4.1).

Agiter pendant une heure (5.1.8).

Laver 3 fois avec la solution de TBS-Tween 20 (4.2.2).

7.2.4 Ajouter 20 mL de solution l'anticorps secondaires Goat anti-Rabbit-HRP (4.2.4.2)

Agiter pendant une heure.

7.2.5 Laver avec la solution de TBS-Tween 20 (4.2.2) comme ci-dessus pendant 5 min.

Laver 2 fois pendant 15 min avec la solution de TBS (4.2.1) comme décrit ci-dessus.

Eliminer la solution.

### 7.3 Révélation de la présence des protéines instables

7.3.1 Mélanger les 2 solutions pour révéler les protéines instables (4.2.5.1 et 4.2.5.2) et mettre en contact avec la membrane (5.1.1) ayant reçu le dépôt de vin et préparée selon le protocole 7.1 et 7.2 et agiter.

Un précipité de couleur noir - violet foncé à mauve apparaît sur la membrane à l'endroit où les protéines instables sont présentes.

L'intensité de la coloration est fonction de la concentration en protéines instables et donc du risque de casse protéique.

Après 20-30 min lorsque le spot correspondant au dépôt de la solution témoin positif (4.1.2) est très intense, stopper la coloration par lavage de la membrane de nitrocellulose (5.1.1) dans de l'eau.

Mettre la membrane à sécher entre 2 feuilles de papier absorbant (5.1.5).

*Exemplaire certifié conforme  
Sofia, le 2 juin 2017  
Le Directeur Général de l'OIV  
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

*Jean-Marie AURAND*

Les résultats peuvent être interprétés lorsque la membrane est sèche.

## 8. Résultats

Pour que les résultats de la réaction soient interprétables :

- L'endroit du dépôt de la solution témoin colorimétrique positif doit présenter un spot d'intensité très intense (violet foncé-noir).
- L'endroit du dépôt de la solution témoin colorimétrique négatif ne doit présenter aucun spot.
- Le bruit de fond (endroit de la membrane ou aucun dépôt d'échantillon n'a été effectué) doit être très clair, voire blanc.

Un résultat semi-quantitatif peut être obtenu par réalisation d'une courbe étalon à partir d'un vin naturellement riche en protéine dont on réalisera une gamme de dilution. Cette courbe étalon sera fonction des surfaces obtenues par intégration de l'intensité des spots correspondant à la formation des immuno-complexes. L'analyse peut se faire avec le même équipement que celui utilisé pour analyser les gels d'électrophorèse décrits dans la Méthode OIV-MA-AS315-12.

L'interprétation des résultats peut également être réalisée visuellement.

### 8.1 Pour un contrôle direct sur le vin de la présence ou absence de protéines instables

Il y a présence de protéines dans l'échantillon pour le laboratoire si l'intensité du spot obtenu est plus intense que le spot de la solution témoin négatif.

L'intensité du spot obtenu après la réaction est proportionnelle à la quantité de protéines instables et de ce fait proportionnelle au risque de casse protéique dans ce vin.

### 8.2 Pour vérifier l'absence de protéines après un traitement (notamment à la bentonite)

Il y a présence de protéines dans l'échantillon si l'intensité du spot obtenu pour l'essai sans traitement bentonite est plus intense que le spot de la solution témoin colorimétrique négatif.

Dans le cas de l'application d'une « gamme de produits de traitement (bentonite) » en test de laboratoire, l'intensité des spots de chaque essai doit décroître parallèlement à l'augmentation de la concentration en produit de traitement. Lorsque pour un spot, cette intensité est nulle ou minimale mais constante vis-à-vis des autres points de gamme, on appliquera la dose de produit de traitement correspondante à ce spot pour obtenir la stabilité protéique du vin testé.

*Exemplaire certifié conforme  
Sofia, le 2 juin 2017  
Le Directeur Général de l'OIV  
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

*Jean-Marie AURAND*

## 9. Annexes

Production des anticorps polyclonaux dirigés contre les protéines instables

Les anticorps dirigés contre les protéines instables des vins blancs et rosés peuvent être préparés chez le lapin. C'est leur spécificité qui rend la méthode fiable et précise.

### 9.1 Réalisation de la purification des Chitinase et Thaumatin-like

#### 9.1.1 Liste des produits et du matériel

- 9.1.1.1 Eau ultra-pure : résistivité  $\geq 18 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$
- 9.1.1.2 Raisin de cuve récolté à maturité technologique (cépage Chardonnay ou Sauvignon blanc par exemple)
- 9.1.1.3 Acétate de sodium anhydre : N° CAS 127-09-3
- 9.1.1.4 Triton X-100 : N° CAS 9002-93-1
- 9.1.1.5 Sulfate d'ammonium anhydre : N° CAS 127-09-3
- 9.1.1.6 Chlorure de sodium anhydre (NaCl) : N° CAS 7647-14-5
- 9.1.1.7 Tris-HCl anhydre : N° CAS 1185-53-1
- 9.1.1.8 Acide chlorhydrique pur 37% (N°Cas 7647-01-0)
- 9.1.1.9 solution d'hydroxyde de sodium NaOH 1M (N°Cas 1310-73-2)
- 9.1.1.10 Verrerie de laboratoire dont fioles jaugées et pipettes de classe A
- 9.1.1.11 Pince brucelles
- 9.1.1.12 Centrifugeuse à 10 000 g
- 9.1.1.13 Balance de laboratoire à 0,1 mg
- 9.1.1.14 pHmètre
- 9.1.1.15 Résine anionique forte
- 9.1.1.16 Résine anionique
- 9.1.1.17 Membrane de seuil de coupure de 10 kDa
- 9.1.1.18 Appareil de chromatographie liquide basse pression avec pompe à gradient de concentration
- 9.1.1.19 Détecteur mesurant l'absorbance à 280 nm
- 9.1.1.20 Détecteur conductimétrique

#### 9.1.2 Préparation du tampon acétate de sodium (9.1.1.3) dilué à 50 mM, 0,25 % Triton X-100 (9.1.1.4) à pH 5

Dans une fiole jaugée de 1 L (9.1.1.10) placer successivement

- 4,1 g d'acétate de sodium (9.1.1.3)
- 2,5 g de triton X-100 (9.1.1.4)
- compléter à 1 L avec de l'eau ultra-pure (9.1.1.1) et agiter ; ajustement du pH à 5 au moyen de HCl à 37% (9.1.1.8) pour éviter d'avoir un milieu basique qui pourrait avoir un rôle néfaste sur les protéines à extraire ou gêner l'extraction de celles-ci

#### 9.1.3 Préparation du tampon Tris-HCl 50 mM, pH 8,0

Dans une fiole jaugée de 1 L (9.1.1.10) placer successivement

- 7,9 g de Tris HCl Anhydre (9.1.1.7)

*Exemplaire certifié conforme  
Sofia, le 2 juin 2017  
Le Directeur Général de l'OIV  
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

*Jean-Marie AURAND*

- Compléter à 1 litre avec de l'eau ultra pure (9.1.1.1), ajuster à pH 8 au moyen d'une solution de NaOH 1M (9.1.1.9)

#### 9.1.4 Préparation du tampon Tris-HCl 50 mM, 100 mM de NaCl

Dans une fiole jaugée de 1 L (9.1.1.10) placer successivement :

- 7,9 g de Tris Hcl Anhydre (9.1.1.7)
- 5,8 g de chlorure de sodium anhydre (9.1.1.6)
- Compléter à 1 L avec de l'eau ultra-pure (9.1.1.1) et agiter.

#### 9.1.5 Préparation solution de chlorure de sodium à 100 mM

Dans une fiole jaugée de 1 L (9.1.1.10) placer successivement :- 5,8 g de chlorure de sodium anhydre (9.1.1.6)

- Compléter à 1 L avec de l'eau ultra-pure (9.1.1.1) et agiter

### 9.2 Mode opératoire

Des raisins de cépage Pinot noir ou Chardonnay sont récoltés à maturité et congelés à -20 °C. Les pépins sont enlevés des baies congelées avant broyage. 3 g de baies épépinées sont broyées dans 10 mL de tampon acétate de sodium (9.1.2) dilué à 50 mM, pH 5 contenant 0,25% de Triton X-100 (9.1.1.4).

Le matériel insoluble est enlevé par centrifugation (5 min à 3000 g) (9.1.1.12). Le surnageant (2 mL) est alors congelé à -20 °C pendant la nuit pour clarification. L'extrait est alors centrifugé à 10000 g pendant 15 min pour éliminer le matériel insoluble.

Du sulfate d'ammonium (9.1.1.5) est ajouté au surnageant jusqu'à la concentration de 30%. Le mélange est agité 1 heure à 4 °C puis centrifugé à nouveau comme ci-dessus.

Du sulfate d'ammonium (9.1.1.5) est à nouveau ajouté au surnageant jusqu'à la concentration finale de 60%. Le mélange est agité 2 heures à 4 °C puis centrifugé à nouveau comme ci-dessus.

Le précipité protéique est collecté puis re-dissous dans 1 mL de tampon Tris-HCl 50 mM, pH 8,0 (9.1.3). Les protéines sont fixées sur une colonne contenant une résine anionique forte (5 x 30 cm) (9.1.1.15). La colonne est lavée avec le tampon Tris-HCl décrit ci-dessus. Chitinase et Thaumatin-like sont alors décrochées par un tampon Tris-HCl contenant 100 mM de NaCl. Toutes les fractions sont collectées puis dessalées sur une membrane de seuil de coupure de 10 kDa (9.1.1.17) avec le tampon Tris-HCl 50 mM, pH 8,0 (9.1.3). Les fractions protéines dessalées sont passées sur une colonne de chromatographie basse pression (9.1.1.18) contenant une résine anionique (9.1.1.16). L'élution est réalisée avec 120 mL d'un gradient de NaCl (9.1.5) allant de 0 à 100 mM au moyen d'une pompe à gradient de concentration utilisant une solution A d'eau ultra pure (9.1.1.1) et une solution B de chlorure de sodium à 100 mM (9.1.5). Les concentrations en protéines et en sel sont estimées respectivement en mesurant l'absorbance à 280 nm et la conductivité des fluides en sortie de colonne à l'aide des détecteurs (9.1.1.19 et 9.1.1.20). Les fractions protéiques de Chitinase et de Thaumatin-like ainsi purifiées et séparées sont utilisées pour la production des anticorps.

### 9.3 Production des anticorps polyclonaux anti-Chitinase et Thaumatin-like chez le lapin

Le protocole utilisé est identique à celui décrit dans la Méthode OIV-MA-AS315-12.

*Exemplaire certifié conforme  
Sofia, le 2 juin 2017  
Le Directeur Général de l'OIV  
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

*Jean-Marie AURAND*

## 10. Bibliographie

1. **Anonymous.** 2004. "Recherche Des Matières Protéiques D'origine Végétale Dans Les Vins Et Les Moûts," OIV, *Résolution Oeno 24/2004*. 1-7. (Méthode OIV-MA-AS315-12).
2. **Derckel, J. P.; J. C. Audran; B. Haye; B. Lambert and L. Legendre.** 1998. "Characterization, Induction by Wounding and Salicylic Acid, and Activity against *Botrytis cinerea* of Chitinases and Beta-1,3-Glucanases of Ripening Grape Berries." *Physiologia Plantarum*, 104(1), 56-64.
3. **Manteau, S.; B. Lambert; P. Jeandet and L. Legendre.** 2003. "Changes in Chitinase and Thaumatin-Like Pathogenesis-Related Proteins of Grape Berries During the Champagne Winemaking Process." *American Journal of Enology and Viticulture*, 54(4), 267-72.
4. **Manteau, S. and P. Poinssaut.** 2010. "Instabilité Protéique Des Vins Blancs Et Rosés. Partie 2/2: Comparaison Des Tests De Stabilité Protéique Dans Les Vins Blancs Et Rosés Et Mise Au Point D'un Nouveau Test: L'immunoTest <sup>®</sup>." *Revue des Œnologues*, 135, 23-27.
5. **Manteau, S.; F.-X. Sauvage; P. Poinssaut; B. Scotti; N. Sieczkowski and M. Moutounet.** 2006. "Haze in White Wine: Involvement of Proteins Other Than Pathogenesis-Related Proteins in Spontaneous Haze," P. Jeandet, C. Clement and A. Conreux, *Macrowine: Macromolecules and Secondary Metabolites of Grape and Wine*. Reims: Intercept Publishers - Lavoisier, 165-68.
6. **Ribéreau-Gayon, J. and E. Peynaud.** 1961. "Précipitation Des Protéines," *Traité D'oenologie. Tome II - Composition, Transformations Et Traitements Des Vins*. Librairie Polytechnique Ch. Béranger, 346-356.
7. **Waters, E.; Y. Hayasaka; D. Tattersall; K. Adams and P. Williams.** 1998. "Sequence Analysis of Grape (*Vitis Vinifera*) Berry Chitinases That Cause Haze Formation in Wines." *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(12), 4950-57.

Exemplaire certifié conforme  
Sofia, le 2 juin 2017  
Le Directeur Général de l'OIV  
Secrétaire de l'Assemblée Générale

Jean-Marie AURAND