

RÉSOLUTION OENO 24/2004

RECHERCHE DES MATIERES PROTEIQUES D'ORIGINE VEGETALE DANS LES VINS ET LES MOUTS

L'ASSEMBLEE GENERALE,

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 des méthodes d'analyse et d'appréciation des vins,

DECIDE de compléter l'Annexe A du Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et des moûts, par la méthode de type IV suivante:

RECHERCHE DES MATIERES PROTEIQUES D'ORIGINE VEGETALE DANS LES VINS ET LES MOUTS

La technique développée ci-après permet de déterminer la quantité de protéines d'origine végétale éventuellement restantes dans les moûts et les vins traités, après soutirage.

1. PRINCIPE

Les protéines du moût ou du vin sont précipitées par l'acide trichloroacétique, puis elles sont séparées par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium (SDS). L'ajout de bleu de Coomassie colore les protéines. L'intensité de la coloration permet de déterminer la teneur en protéine à l'aide d'une courbe étalon réalisée au préalable avec des solutions de protéine de concentration connue. Le pouvoir antigénique des moûts et des vins traités est recherché par un test d'immunoblotting.

2. PROTOCOLE

2.1. Concentration des protéines par précipitation à l'acide trichloroacétique (TCA)

2.1.1. Réactifs

2.1.1.1. Acide trichloroacétique pur

2.1.1.2. TCA à 0,1 %: préparé à partir de 2.1.1.1 : 0,1 g dans 100 ml d'eau

2.1.1.3. TCA à 100 % préparé à partir de 2.1.1.1 : 100 g dans 100 ml d'eau

2.1.1.4. Hydroxyde de sodium 0,5 M

2.1.1.5. Tampon Tris/HCl 0,25 M pH=6,8

30,27 g de Tris-(hydroxyméthyl)aminométhane sont dissous dans 300 ml d'eau distillée. Le pH est ajusté à 6,8 avec de l'acide chlorhydrique concentré pour analyses. Le volume est complété à 1 l avec de l'eau distillée. Le tampon est conservé à 4°C.

2.1.1.6. Glycérol pur

2.1.1.7. Dodécylsulfate de sodium (SDS) pur

2.1.1.8. 2-Mercaptoéthanol pur

2.1.1.9. Solution tampon pour les échantillons

Elle est composée de tampon Tris/HCl 0,25 M, pH=6,8 (2.1.1.5); de 7,5 % de glycérol pur (2.1.1.6); de 2 % de dodécylsulfate de sodium (SDS) (2.1.1.7) et de 5 % de 2-mercaptoéthanol pur (2.1.1.8). Les pourcentage et molarité des différents réactifs correspondent à la concentration finale dans la solution tampon.

2.1.2. Mode opératoire

3 ml d'acide trichloroacétique à 100 % (2.1.1.3) et 24 ml de vin ou de moût (traité ou non traité) sont successivement mis dans des tubes à centrifuger de 50 ml. La concentration finale en TCA ainsi obtenue est de 11 %.

Après 30 minutes à 4°C, les échantillons sont centrifugés à 10 000 rpm pendant 30 minutes à 4°C. Les culots sont lavés avec une solution aqueuse de TCA à 0,1 % (2.1.1.2), recentrifugés et remis en suspension dans 0,24 ml d'un mélange (1:1, v/v) d'hydroxyde de sodium 0,5 M (2.1.1.4) et de solution tampon pour les échantillons (2.1.1.9). Les échantillons sont chauffés à 100°C au bain d'eau pendant 10 minutes.

2.2. Electrophorèse en Gel de Polyacrylamide en présence de SDS

2.2.1. Réactifs

2.2.1.1. Tampon Tris/HCl 1,5 M pH=8,8

181,6 g de Tris-(hydroxyméthyl)aminométhane sont dissous dans 300 ml d'eau distillée. Le pH est ajusté à 8,8 avec de l'acide chlorhydrique concentré pour analyses.

Le volume est complété à 1 l avec de l'eau distillée. Le tampon est conservé à 4°C.

2.2.1.2. Mélange acrylamide (30 %)-bis-acrylamide (0,8 %)-glycérol (75 %)

Ajouter doucement 300 g d'acrylamide et 8 g de bis-acrylamide à 600 ml d'une solution de glycérol à 75 %. Après dissolution, ajuster le volume à 1 l avec du glycérol à 75 %. Le mélange est conservé à l'obscurité et à température ambiante.

2.2.1.3. SDS à 10 %

10 g de SDS sont dissous dans 100 ml d'eau distillée. Conserver à la température ambiante.

2.2.1.4. .N,N,N',N' tétraméthylènediamine (TEMED) pour électrophorèse

2.2.1.5. Persulfate d'ammonium à 10 %

1 g de persulfate d'ammonium sont dissous dans 10 ml d'eau distillée. Conserver à 4°C.

2.2.1.6. Solution de bleu de bromophénol

. 10 mg de bleu de bromophénol pour électrophorèse sont dissous dans 10 ml d'eau distillée.

2.2.1.7. Solution pour le gel de séparation (15 % d'acrylamide)

Elle est préparée juste avant utilisation :

- 1,5 ml de Tris/HCl 1,5 M, pH=8,8 (2.2.1.1),
- 1,5 ml d'eau distillée,
- 3 ml du mélange acrylamide glycérol (2.2.1.2),
- 50 µl de SDS 10 % (2.2.1.3),
- 10 µl de N,N,N',N'-tétraméthylènediamine (TEMED) pour électrophorèse (2.1.1.4),
- 20 µl de persulfate d'ammonium (2.2.1.5),
- 1 goutte de bleu de bromophénol (2.2.1.6).

2.2.1.8. Tampon Tris/HCl 0,5 M pH=6,8

60,4 g de Tris-(hydroxyméthyl)aminométhane sont dissous dans 400 ml d'eau distillée.

Le pH est ajusté à 6,8 avec de l'acide chlorhydrique concentré pour analyses. Le volume est complété à 1 l avec de l'eau distillée. Le tampon est conservé à 4°C.

2.2.1.9. Mélange acrylamide (30 %)-bis-acrylamide (0,8 %)-eau

Ajouter doucement 300 g d'acrylamide et 8 g de bis-acrylamide à 300 ml d'eau. Après dissolution, ajuster le volume à 1 l avec de l'eau distillée. Le mélange est conservé à l'obscurité et à température ambiante.

2.2.1.10. Gel de concentration à 3,5% d'acrylamide

Il est préparé juste avant utilisation :

- 0,5 ml de Tris/HCl 0,5 M pH=6,8 (2.2.1.8),
- 1,27 ml d'eau distillée,
- 0,23 ml du mélange acrylamide-eau (2.2.1.9),
- 20 µl de SDS 10 % (2.2.1.3),
- 5 µl de N,N,N',N'-tétraméthylènediamine (TEMED) pour électrophorèse (2.2.1.4),
- 25 µl de persulfate d'ammonium (2.2.1.5),
- 1 goutte de bleu de bromophénol (2.2.1.6).

2.2.1.11. Tampon de migration

30,27 g de Tris-(hydroxyméthyl)aminométhane, 144 g de glycine et 10 g de SDS sont dissous dans 600 ml d'eau distillée. Le pH doit être de 8,8. Si nécessaire, il est ajusté avec de l'acide chlorhydrique concentré pour analyses. Le volume est complété à 1 l avec de l'eau distillée. Le tampon est conservé à 4°C. Au moment de l'utilisation, la solution est diluée au 1/10 dans de l'eau distillée.

2.2.1.12. Solution de coloration

Sont successivement mélangés :

- 16 ml de bleu de Coomassie Brilliant G-250 ultrapur à 5 % (5 g dans 100 ml d'eau distillée),
- 784 ml provenant de 1 l d'une solution dans laquelle ont été dissous 100 g de sulfate d'ammonium et 13,8 ml d'acide orthophosphorique à 85 % pour analyses,

- 200 ml d'éthanol absolu pour analyses.

2.2.1.13. Solution de décoloration

Sont successivement mélangés :

- 100 ml d'acide acétique glacial 100 % pour analyses,
- 200 ml d'éthanol absolu pour analyses,
- 700 ml d'eau distillée.

2.2.2. Mode opératoire

La solution pour le gel de séparation (2.2.1.7) est coulée entre deux plaques de verre d'une taille de 7 x 10 cm. La surface supérieure du gel est nivelée par l'ajout de 2 gouttes d'eau distillée.

Après polymérisation du gel de séparation et élimination de l'eau, 1 ml de gel de concentration (2.2.1.10) est déposé sur le gel de séparation à l'aide d'une pipette de 1 ml. Puis on met en place le peigne dont les empreintes créeront les puits de dépôts.

Les échantillons nécessaires à la gamme étalon sont préparés dans un mélange (1:1, v/v), d'hydroxyde de sodium 0,5 M (2.1.1.4) et de solution tampon (2.1.1.9) de façon à ce que la gamme soit comprise entre 5 µg/ml et 50 µg/ml.

20 à 30 µl d'échantillons de vins et d'étalons sont déposés dans les puits

Après la migration (sous une tension constante de 90 V) à la température ambiante pendant 3-4 heures environ, les gels sont démoulés. Ils sont aussitôt plongés dans 50 ml d'une solution aqueuse de TCA 20 % pendant 30 minutes puis dans 50 ml de solution de coloration (2.2.1.12).

Les protéines apparaissent sous forme de bandes colorées en bleu. Le gel est ensuite décoloré avec 50 ml de solution de décoloration (2.2.1.13). Quand le fond du gel est transparent, il est placé dans de l'eau distillée pour conservation.

3. ANALYSE QUANTITATIVE

L'intensité de chaque tache est évaluée à l'aide d'un scanner pour gel équipé d'un logiciel d'analyseur d'image. La quantité de protéine présente sur le gel est déterminée par le calcul de la densité moyenne des pixels de la bande et par intégration de la largeur de la bande. La teneur en protéine de chaque échantillon est obtenue à l'aide d'une courbe étalon. Les points de cette courbe sont obtenus en traçant les valeurs de

concentrations connues de protéine végétale déposée sur le gel en fonction de la surface d'intégration correspondante.

La limite de quantification se situe à 0,030 ppm pour le pois et à 0,36 ppm pour le gluten, dans un milieu concentré 100 fois. Le coefficient de variation est toujours inférieur à 5%.

4. RECHERCHE PAR IMMUNOBLOTTING DU POUVOIR ANTIGENIQUE DES VINS ET DES MOUTS TRAITES

La capacité antigénique des protéines d'origine végétale éventuellement restantes dans les moûts et les vins traités, après soutirage, est ensuite évaluée.

4.1. PRINCIPE

Après l'électrophorèse, les gels sont soumis à la technique d'immunoblotting. Les protéines sont transférées sur une membrane où elles seront adsorbées. Un complexe antigène-anticorps est formé par l'ajout d'anticorps anti-protéine végétale (par exemple des anticorps anti-gliadines si la protéine végétale est du gluten). Le système est révélé par l'ajout d'anticorps dirigés contre les anticorps anti-protéine végétale couplés à la phosphatase. En présence du substrat chromogène de l'enzyme, une coloration dont l'intensité sera proportionnelle à la quantité d'immunocomplexes va se développer. Cette immunoréactivité sera quantifiée à l'aide d'une courbe étalon réalisée avec des solutions de protéine végétale de concentration connue.

4.2. PROTOCOLE

4.2.1. Réactifs

4.2.1.1. Tampon de transfert

3,03 g de Tris, 14,4 g de glycine (R) et 200 ml de méthanol (R) sont mélangés et complétés à 1 l avec de l'eau distillée.

4.2.1.2. Gélatine 1 %

8,77 g de chlorure de sodium (R), 18,6 g d'acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA) pour analyses, 6,06 g de Tris et 0,5 ml de Triton X sont dissous dans 800 ml d'eau distillée. Le pH est ajusté à 7,5 avec de l'acide chlorhydrique concentré pour analyses. 10 g de gélatine sont ajoutés et le volume est complété à 1 l.

4.2.1.3. Gélatine 0,25 %

8,77 g de chlorure de sodium (R), 18,6 g d'acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA) pour analyses, 6,06 g de Tris et 0,5 ml de Triton X sont dissous dans 800 ml d'eau distillée. Le pH est ajusté à 7,5 avec de l'acide chlorhydrique concentré pour analyses. 2,5 g de gélatine sont ajoutés et le volume est complété à 1 l.

4.2.1.4. Solution d'anticorps polyclonaux (du commerce ou décrits en annexe)

10 µl d'anticorps polyclonaux anti-protéine végétale q.s.p. 10 ml avec la gélatine 0,25 % (4.2.1.3).

4.2.1.5. Tampon TBS

A. 29,22 g de chlorure de sodium pour analyse et 2,42 g de Tris sont dissous dans 1 l d'eau distillée.

4.2.1.6. Tampon phosphatase alcaline

5,84 g de chlorure de sodium (R), 1,02 g de chlorure de magnésium (R) et 12,11 g de Tris sont dissous dans 800 ml d'eau distillée. Le pH est ajusté à 9,5 avec de l'acide chlorhydrique concentré et le volume est complété à 1 l.

4.2.1.7. Révélateur

15 g de phosphate de bromochloroindol phosphate (BICP), 30 g de bleu de nitrotétrazolium (NBT) sont dissous dans 100 ml de tampon phosphatase alcaline (4.2.1.6).

4.2.2. Mode opératoire

Après l'électrophorèse, les protéines sont transférées du gel vers une membrane de difluorure de polyvinylidène par élution électrophorétique: 16 heures à 4°C sous 30 V dans le tampon de transfert (4.2.1.1). Les membranes sont saturées avec de la gélatine à 1 % (4.2.1.2) et lavées 3 fois avec la gélatine 0,25 % (4.2.1.3). La gélatine se fixe sur les sites libres et empêche l'adsorption non spécifique des réactifs immunologiques. La membrane est ensuite plongée dans 10 ml de la solution d'anticorps polyclonaux anti-protéine végétale (4.2.1.4). Dans le cas du gluten, les anticorps anti-gliadines proviennent du commerce. Les autres types d'anticorps sont préparés selon la méthode figurant en annexe. Le complexe antigène-IgG est détecté par l'ajout de 10 µl d'anticorps anti-IgG de lapin marqués à la phosphatase alcaline. Les membranes sont

lavées deux fois avec la gélatine 0,25 % (4.2.1.3) et une fois avec le tampon TBS (4.2.1.5). Après incubation dans le révélateur (4.2.1.7), un précipité de couleur violet foncé se forme à l'endroit où l'enzyme s'est fixé.

4.3. ANALYSE QUANTITATIVE

Pour calculer la quantité d'immunoréactivité résiduelle d'un vin commercialisé, une courbe étalon est tracée : concentrations connues de protéine végétale déposée sur le gel (et transférée sur membrane) en fonction des surfaces obtenues par intégration de l'intensité des spots correspondant à la formation des immun-complexes. L'analyse se fait avec le même équipement que celui utilisé pour analyser les gels d'électrophorèse.

ANNEXE

Production des anticorps polyclonaux anti-pois

Les anticorps polyclonaux anti-pois nécessaires à la détermination de la capacité antigénique des protéines de pois dans les vins et les moûts traités se préparent chez l'animal.

1. Principe

Les sérums contenant les anticorps polyclonaux sont obtenus chez le lapin New Zealand après injection intradermique de l'antigène.

2. Protocole

2.1. Réactifs

2.1.1. Tampon phosphate PBS pH=7.4 : 8 g de NaCl, 200 mg de KCl, 1,73 de Na₂HPO₄ H₂O et 200 mg de KH₂PO₄ sont dissous dans 300 ml d'eau distillée. Le pH est ajusté à 7,4 avec de la soude 1 M. Le volume est complété à 1 l avec de l'eau distillée.

2.1.2. Antigènes :

10 mg de protéine de pois sont dissous dans 5 ml de tampon phosphate PBS (2.1.1). La solution est ensuite filtrée stérilement sur 0,2 µm et conservée à -20°C jusqu'au jour de l'immunisation.

2.2. Mode opératoire

1 ml de solution 2.1.2 est mélangé à 1 ml d'adjuvant complet de Freund. 1 ml de ce mélange est injecté en intradermique chez un lapin New Zealand d'un poids de 3 kg environ. Cette injection est répétée au 15^{ème}, 30^{ème} et 45^{ème} jour.

60 jours après la première injection, 100 µl de sang sont prélevés au niveau de la veine auriculaire et sont testés pour leur capacité à réagir avec les antigènes. Cette évaluation est réalisée par immunoblotting comme décrit dans le chapitre 4.2 de la méthode d'analyse à partir d'un gel sur lequel la protéine de pois a migré.

Après vérification de la formation d'un complexe antigène-anticorps, 15 ml de sang sont prélevés au niveau de la veine auriculaire. Le sang est placé à 37°C pendant 30 minutes. Le sérum contenant les anticorps polyclonaux anti-pois est prélevé après centrifugation du sang à 3000 rpm pendant 5 minutes.