

PROTÉINES RÉSIDUELLES ISSUES DE COLLE DE SANG APRES TRAITEMENT D'UN VIN BLANC SEC

PERSISTENCE OF BLOOD PASTE PROTEINS IN A DRY WHITE WINE AFTER CLARIFICATION

J.-P. DOUET* et 1, B. MÉDINA* et M. CASTROVIEJO**

*Direction Générale de la Concurrence de la Consommation et de la Répression des Fraudes
(DGCCRF), 351 cours de la Libération, 33405 Talence (France)

**IBGC-CNRS, 1 rue Camille Saint-Saëns, 33077 Bordeaux cedex (France)

Résumé : Jusqu'à fin 1997, les protéines du sang (albumine - colle de sang) étaient autorisées pour la clarification des vins. Nous montrons que la concentration résiduelle des ces protéines dans un vin blanc sec après sédimentation et filtration est fonction d'une part des doses utilisées et d'autre part du temps de contact. L'utilisation de bentonite ainsi qu'une filtration diminuent fortement la présence de ces protéines. La porosité de la membrane avec laquelle la filtration est effectuée (0,2 ou 0,45 μ) n'a par contre aucune incidence.

Summary : Until the end of 1997, plasmatic proteins and blood cells could be used to clarify wines. The aim of our work was to study the persistence of these animal proteins in a dry white wine during clarification. The effects of some clarification parameters were also estimated.

We used two protocols to discriminate between blood paste proteins and native proteins of unclarified wine (e.g. from grapes, yeasts, bacteria). The first protocol was a radiolabel of blood paste proteins with chloroglycouril and Na¹²⁵I. The ¹²⁵I-labelled animal proteins were revealed with autoradiography of sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and quantified with a gamma scintillator. The second protocol was purification with affinity chromatography. The antibodies of this affinity chromatography were specific of whole beef serum. After this purification, harvested proteins were loaded onto two-dimensional gel electrophoresis (2D). After migration, proteins were silver-stained.

With the radiolabel protocol, we show that the concentration of animal proteins found in dry white wine after clarification and filtration increased with the concentration of blood paste proteins used during clarification. This relation is almost linear. The duration of the blend blood paste / wine incubation step is also a significant parameter. After incubation for one minute, about 40 p. cent of animal proteins were found in clarified and filtered wine. After four days of incubation, a maximum of 88 p. cent blood paste proteins were found in both clarified and filtered wine. The use of bentonite decreased 4-to 6-fold the concentration of blood paste proteins. The filtration step also strongly decreased the concentration of these proteins : quantitation with a phosphoimager showed that wine clarified (with 250 μ g of blood paste proteins in 4 heures of incubation time, without bentonite) and filtered retained 6 p. cent, i.e. 12 mg of blood paste proteins. The membrane porosity (0,2 or 0,45 μ) for the filtration had no effect.

Affinity chromatography and 2D procedures also showed that proteins of animal origin could subsist in wine after clarification, while others in the original composition of wine disappeared.

Mots clés : vin, clarification, protéine.

Key words : wine, clarification, protein.

INTRODUCTION

Le plasma (improprement appelé albumine) ou les cellules du sang (improprement appelées colle de sang), étaient encore, il y a peu, utilisés pour clarifier les vins blancs et les vins rouges. L'utilisation de ces protéines d'origine animale a été interdite par le règlement (CE) n° 2087/97 du Conseil du 20 octobre 1997 modifiant le règlement (CEE) n° 822/87. Cette interdiction est consécutive à une prise de conscience des problèmes engendrés par les prions, agents supposés responsables

d'encéphalopathies spongiformes subaiguës transmissibles (ESST) notamment chez la vache.

De nombreuses études ont déjà été effectuées sur les protéines du vin (ACEDO *et al.*, 1994 ; DAWES *et al.*, 1994 ; DORRESTEIN *et al.*, 1995 ; LUBBERS *et al.*, 1995 ; SANTORO, 1995). Mais, à notre connaissance, aucune ne concerne la mise en évidence de protéines hématologiques d'origine animale dans un vin. Dans ce travail, nous avons étudié, sur un vin blanc sec, l'influence de la dose de colle de sang, de sa durée de contact avec le vin, de la filtration et d'un

traitement simultané avec de la bentonite, sur la quantité résiduelle des protéines constitutives de la colle de sang.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

I - MATÉRIELS

La poudre de sang (références HEMATOX, lot n°6040 dont la commercialisation a cessé fin 1996) et la bentonite (Bentonite Volclay granulée, Microcol) utilisées durant ce travail sont des produits de la société LAFFORT & Cie (Bordeaux, France). Le vin blanc sec non clarifié (année 1996) provient de la région de Bordeaux.

II - DOSAGE DES PROTÉINES DE LA COLLE DE SANG

Les protéines contenues dans la colle de sang sont d'abord solubilisées avec du désoxycholate de sodium, puis précipitées avec du TCA (PINSON, 1996). Elles sont ensuite dosées selon la méthode colorimétrique de LOWRY *et al.* (1951). Une gamme étalon est réalisée avec de l'albumine sérique bovine dans le même tampon que celui de l'échantillon à doser.

250 µg de la colle de sang utilisée dans ce travail contiennent 200 µg de protéines.

III - MARQUAGE DES PROTÉINES DE LA COLLE DE SANG

Le marquage est effectué selon le protocole établi par MARKWELL et FOX (1978) modifié par HOWARD et BUCKLEY (1982). Il nécessite de l'Iode 125 et du 1,3,4,6-tetrachloro-3 α ,6 α -diphénylglycoluril appelé aussi chloroglycoluril ou iodogène. Une fois les protéines radiomarquées, l'Iode libre ou en excès est éliminé par trois diafiltrations successives.

Le chloroglycoluril (Sigma Chimie, Saint-Quentin Fallavier, France) est dissous dans du chloroforme à la concentration de 200 µg/ml. Un volume de 1 ml de cette solution est déposé dans de petits flacons de verre et le chloroforme évaporé dans une étuve à 37°C. Sont ensuite ajoutés 1,5 mg de colle de sang dans 2 ml de PBS (tampon phosphate 20 mM pH7, NaCl 0,15 M) et 5 mCi d'Iode (ICN Pharmaceuticals, Orsay, France). L'ensemble est incubé 10 min à température ambiante avec une légère agitation. Pour arrêter la réaction, le substrat est ôté du récipient : le chloroglycoluril, insoluble en phase aqueuse, reste adsorbé sur les parois du flacon.

Le substrat est ensuite réparti dans quatre tubes Microcon M10 (Amicon Grace S.A., Epernon, France) et subit trois diafiltrations. Toutes les centrifugations

ont lieu à 13 000 g pendant 30 min à 10 °C. Les culots sont repris dans 500 µl de PBS, sauf ceux issus de la dernière centrifugation qui sont poolés et repris dans 1 ml de PBS.

L'activité spécifique de la colle de sang ainsi iodée oscille entre 0,2 et 1,6.10⁶ cpm/µg de colle.

IV - CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE

Les immunoglobulines (Ig) anti-sérum total de bœuf sont purifiées à l'aide d'une colonne contenant de la protéine A. Elles sont ensuite couplées au support d'une autre colonne pour constituer une colonne d'affinité.

Le vin, clarifié ou non, est ensuite déposé sur cette dernière. Les protéines du vin affines pour les Ig anti-sérum total de bœuf sont éluées, puis séparées par électrophorèse bidimensionnelle.

1) Purification des immunoglobulines

Les Ig d'un lapin anti-sérum total de bœuf (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Baltimore Pike, West Grove, PA, USA) sont purifiées grâce à une colonne HiTrap Protéine A de 1 ml (Pharmacia Biotech, Saclay, France). Le protocole utilisé est celui, légèrement modifié, de TERNINCK et AVRAMEAS (1987).

La colonne est d'abord équilibrée avec du tampon PBS. L'échantillon de 1 ml est dilué au demi avec ce même tampon avant d'être appliqué sur la colonne. Après élution des protéines non affines vis-à-vis de la protéine A, les Ig sont éluées avec un tampon acide acétique 0,1 N pH 3, NaCl 0,15 M. Le débit est de 1 ml/min. Les Ig sont ensuite diafiltrées à l'aide de Microcon M10 (centrifugation à 13 000 g pendant 30 min à 10 °C) et le culot repris dans 1 ml de tampon NaHCO₃ 0,2 M pH 8,3, NaCl 0,5 M.

2) Préparation de la colonne d'affinité

Après avoir été purifiées, les immunoglobulines sont couplées au support d'une colonne HiTrap NHS-activated de 1 ml (Pharmacia Biotech). Le protocole appliqué est celui de la société Pharmacia Biotech.

La colonne est lavée avec six fois son volume d'HCl 1 mM. Les Ig (2,4 mg dans un volume de 1 ml) y sont injectées et l'ensemble est incubé 30 min à température ambiante. La désactivation des groupes de la matrice en excès ainsi que l'élution des protéines non couplées ont lieu grâce à trois séries de deux lavages successifs avec du tampon éthanolamine 0,5M pH 8,3, NaCl 0,5 M et du tampon acétate 0,1 M pH 4, NaCl 0,5 M. Le volume employé, pour chacun de ces lavages, est toujours égal à six fois celui de la colonne.

Un même vin a été chromatographié après différents collages à 250, 50 et 0 µg de colle de sang par ml. La durée de ces clarifications est de 4 heures.

Le protocole de cette étape de purification des protéines d'origine bovine, présentes ou non dans le vin, est celui modifié de AUSUBEL *et al.* (1987).

La colonne est équilibrée avec du tampon Tris-HCl 0,01 M pH 8, NaCl 0,14 M, NaN₃ 0,025 p. cent. Un volume de 5 ml de vin est dilué au demi avec une solution de Tris-HCl 0,02 M pH 8, NaCl 0,14 M, NaN₃ 0,025 p. cent, Triton X-100 0,5 p. cent, sodium deoxycholate 0,5 p. cent. Le débit de chargement de cet échantillon sur la colonne est de 0,1 ml/min. La colonne est ensuite lavée avec du tampon Tris-HCl 0,01 M pH 8, NaCl 0,14 M, NaN₃ 0,025 p. cent. Pendant le lavage, le débit est graduellement remonté à 0,5 ml/min. L'éluion des protéines affines pour les Ig a lieu avec du tampon triéthanolamine 50 mM pH 11,5, NaCl 0,14 M. Les fractions éluées sont alors poolées. La concentration en protéines de ce pool est évaluée à 280 nm par rapport à une solution d'albumine sérique bovine.

V - ELECTROPHORÈSE SUR GEL DE POLY-ACRYLAMIDE (SDS-PAGE)

1) Electrophorèse en conditions dénaturantes

Ce type d'électrophorèse, qui permet la séparation des protéines en fonction de leur poids moléculaire, est réalisé selon la méthode de LAEMMLI (1970).

Les protéines sont récupérées dans 60 µl de tampon échantillon plus 5 µl de NaOH 10 N. Le tampon échantillon contient du dodécyl sulfate de sodium (SDS) 2 p. cent et du β-mercaptoéthanol 5 p. cent. Un volume de 10 µl de chaque échantillon est déposé par puits. Les gels de concentration et de séparation sont respectivement à la concentration de 5 et 12,5 p. cent d'acrylamide. Le tampon de migration est composé de Tris-glycine-SDS. Les différents marqueurs de poids moléculaire (Pharmacia Biotech) sont : la phosphorilase b, l'albumine bovine sérique, l'ovalbumine, l'anhydrase carbonique, l'inhibiteur de trypsine de soya et l'α-lactalbumine (poids moléculaires respectifs : 94 kDa, 67 kDa, 43 kDa, 30 kDa, 20,1 kDa, 14,4kDa).

Après une migration à 60 volts pendant la nuit, les protéines sont colorées puis autoradiographiées.

2) Electrophorèse bidimensionnelle (2D)

a) Première dimension

La première dimension d'une 2D est une électrophorèse en gradient de pH non équilibré (NEPHGE)

(CHARRON *et al.*, 1987). Celle-ci permet une résolution des protéines basiques bien meilleure que celle obtenue avec la focalisation électrique (IEF).

La composition d'un gel NEPHGE est : acrylamide 3,99 p. cent (p/v), urée 55 p. cent (p/v), NP40 20 p. cent (v/v), ampholytes pH 3-10 5 p. cent (v/v) (Pharmalyte 3-10 de Pharmacia Biotech), persulfate d'ammonium 0,014 p. cent (v/v) et de TEMED 0,08 p. cent (v/v).

Les échantillons, après diafiltration (centrifugations pendant 30 min à 10°C), sont repris dans du tampon échantillon [urée 28,5 p. cent (p/v), NP40 1 p. cent (v/v), β-mercaptoéthanol 2,5 p. cent (v/v), ampholytes pH 3-10 2,5 p. cent (v/v)]. Un volume de 10 µl d'échantillon est alors déposé dans chaque tube et recouvert de 10 µl de solution « overlay » [urée 50,1 p. cent (p/v), ampholytes pH 3-10 2,5 p. cent (v/v)]. Les tampons anode et cathode sont respectivement de l'acide orthophosphorique 0,01M et de la soude 0,02 M. La migration des échantillons est de 6 heures à 500 volts.

b) Deuxième dimension

Le gel de la première dimension est démoulé puis incubé 15 min dans 5 ml de tampon SDS [Tris 1 p. cent (p/v), glycérol 13,33 p. cent (p/v), β-mercaptoéthanol 6,66 p. cent (v/v), SDS 3,06 p. cent (p/v)]. Il est ensuite déposé sur un gel de séparation d'acrylamide dont la composition est celle développée dans le chapitre « Electrophorèse monodimensionnelle ». Les deux gels sont rendus solidaires avec 1 ml d'une solution d'agarose 1 p. cent (p/v), [Tris 1 p. cent (p/v), glycérol 13,33 p. cent (p/v), β-mercaptoéthanol 6,66 p. cent (v/v), SDS 3,06 p. cent (p/v)]. Après une migration à 60 volts pendant la nuit, les protéines sont colorées.

VI - COLORATION DES GELS

Les protéines des gels sont colorées au nitrate d'argent (ESCHENBRUCH et BURK, 1982 ; OAKLEY *et al.*, 1980).

VII - CLARIFICATION

La clarification du vin est effectuée avec de la colle de sang, en présence ou non de bentonite. Le rapport entre le volume de colle et celui du vin est de 1 pour 6.

Le traitement du vin clarifié varie ensuite en fonction du fait que les protéines utilisées sont radiomarquées ou non. Dans le premier cas, il est déshydraté à l'aide d'un Speedvac (Savant Instruments, INC, Farmingdale, NY, USA) puis repris dans du tampon échantillon en vue d'une électrophorèse monodimensionnelle ; dans le second, il est soumis à une chroma-

tographie d'affinité suivie d'une électrophorèse bidimensionnelle.

1) Avec la bentonite et la colle de sang

La concentration de bentonite utilisée pour clarifier ce vin blanc a été déterminée par un test de stabilité thermique des protéines (DUBOURDIEU *et al.*, 1988 ; MOINE-LEDOUX, 1996). Succinctement, 50 ml du vin préalablement filtré sur une membrane 0,45 μ ont été soumis à un traitement thermique de 80°C pendant 30 min. La différence de turbidité mesurée par néphélométrie (turbidimètre Hach Ratio/XR) avant chauffage et après refroidissement est fonction de la stabilité protéique du vin. Ce dernier est considéré comme stable si la différence de turbidité n'excède pas 2 NTU. La quantité minimale de bentonite à utiliser permettant de stabiliser ce vin est de 500 μ g/ml.

La bentonite, sous forme de granulés, est d'abord dissoute dans 10 fois son volume de PBS puis incubée 24 h à 4 °C. Elle est ensuite ajoutée au vin, à la concentration minimale déterminée par le test de stabilité thermique. La suspension obtenue est aussitôt agitée avant d'y ajouter la colle de sang aux conditions énoncées dans le paragraphe ci-dessous.

2) Avec la colle de sang

La poudre de sang est reprise dans du PBS. Ainsi en suspension, les protéines du sang peuvent être marquées à l'Iode 125 selon le protocole spécifié dans le paragraphe « Marquage des protéines ».

Des clarifications de 0 à 250 μ g de colle de sang/ml de vin ont été effectuées. Une fois le mélange vin et colle réalisé, celui-ci est incubé à température ambiante pendant une durée pouvant aller de quelques heures à plusieurs jours. Il est ensuite filtré ou non à l'aide d'une membrane d'acétate de cellulose 0,2 ou 0,45 μ d'un diamètre de 13 mn (Poly Labo Paul Block & Cie, Strasbourg, France).

RÉSULTATS

I - MISE EN EVIDENCE DES PROTÉINES IODINÉES DE LA COLLE DE SANG DANS LE VIN

1) En fonction de la concentration de ces protéines utilisées lors de la clarification, avec ou sans bentonite

Les figures 1A et 1B représentent respectivement la mesure de la radioactivité et l'autoradiographie de l'électrophorèse des protéines d'origine animale présentes dans un vin clarifié. La clarification a été effectuée d'une part en absence et en présence de bentonite (500 μ g/ml de vin) et d'autre part en fonction de la

concentration de la colle de sang (de 0 à 250 μ g/ml de vin). Ces essais, après un temps de contact de 4 heures, ont été filtrés sur une membrane 0,2 μ .

Sur la figure 1A et à concentration de colle de sang équivalente, on constate que la radioactivité des filtrats issus des clarifications sans bentonite est nettement plus importante que celle des filtrats issus des collages avec bentonite. Par exemple, à la concentration de colle de sang de 50 μ g/ml et en absence de bentonite, la radioactivité de 10 μ l de vin est de $479,2 \cdot 10^3 \pm 11,6 \cdot 10^3$ cpm. Celle-ci diminue à $79,1 \cdot 10^3 \pm 2,5 \cdot 10^3$ cpm si la clarification a été effectuée avec en plus 500 μ g de bentonite/ml. Le rapport entre ces deux mesures est de 6. Il ne varie presque pas pour une concentration allant de 25 à 125 μ g de colle de sang/ml. Par contre, pour une clarification effectuée avec 250 μ g de colle de sang/ml il devient égal à 3,9.

Pour les deux courbes (avec ou sans bentonite), on constate que plus on augmente la concentration de colle de sang, plus on retrouve de ses protéines dans le vin filtré. Cette relation est d'ailleurs presque linéaire. Avec 25 μ g de colle de sang/ml et en absence de bentonite, la radioactivité est de $243,1 \cdot 10^3 \pm 7,6 \cdot 10^3$ cpm. Pour une concentration de colle dix fois plus élevée (250 μ g de colle/ml), la quantité de protéines radiomarquées retrouvée dans le vin augmente d'un facteur neuf (soit $2183,3 \cdot 10^3 \pm 57,4 \cdot 10^3$ cpm). En présence de bentonite et de 25 μ g/ml de colle de sang, la radioactivité du vin est de $41,9 \cdot 10^3 \pm 1,3 \cdot 10^3$ cpm. Elle est augmentée d'un facteur treize ($552,7 \cdot 10^3 \pm 16,1 \cdot 10^3$ cpm) lorsque toujours en présence de bentonite la concentration de colle de sang est dix fois plus élevée.

Le rapport entre la radioactivité de 10 μ l d'un vin clarifié avec 250 μ g de colle de sang/ml ($2183,3 \cdot 10^3 \pm 57,4 \cdot 10^3$ cpm) et celle de 10 μ l d'un vin clarifié avec 500 μ g de bentonite et 50 μ g de colle de sang/ml ($79,1 \cdot 10^3 \pm 2,5 \cdot 10^3$ cpm) est égal à 27,6.

Les moyennes et écarts-types ont été calculés à partir d'un test effectué en huit exemplaires.

L'autoradiographie de l'électrophorèse d'une partie des filtrats (figure 1B) confirme ces résultats. Les protéines radiomarquées des profils de 1 à 4 correspondant à des clarifications effectuées sans bentonite, sont en quantité nettement plus importantes que celles des profils de 5 à 8, correspondant à des clarifications effectuées avec bentonite. De plus, que les clarifications aient été effectuées avec bentonite ou sans, les intensités des profils sont bien fonction de la concentration de colle de sang utilisée. A la concentration la plus faible, des protéines radiomarquées sont encore retrouvées dans le vin (la bande la plus intense étant toujours au niveau du front de migration).

En comparant les différents profils de cette même figure (le 8 avec le 1, 2 ou 3 par exemple), on constate aussi que les protéines radiomarquées que l'on retrouve après clarification sont toujours les mêmes. Ceci est encore plus évident quand on fait varier le temps d'exposition du film de l'autoradiographie sur le gel d'électrophorèse. La présence de bentonite ou non et l'utilisation de différentes concentrations de colle de sang ne semble donc pas avoir d'effet sur le nombre des protéines d'origine animale retrouvées, mais uniquement sur leur quantité.

Donc, afin de pouvoir plus facilement visualiser et quantifier les protéines d'origine animale, lors de l'étude d'autres paramètres de la clarification (ex. : temps de contact, filtration, etc.), la bentonite a été omise.

2) En fonction du temps (cinétique)

Des clarifications ont été effectuées après différents temps de contact du mélange colle de sang/vin. Durant ces essais, la concentration de la colle de sang était de 50 µg/ml de vin et les filtrations ont été effectuées sur des membranes de 0,2 µ.

La figure 2A représente la radioactivité des filtrats (volume 10 µl) en fonction du temps. Celle du mélange colle de sang et vin avant filtration est de $64,0 \cdot 10^3 \pm 4,2 \cdot 10^3$ cpm. Après une minute de contact, elle est de $25,4 \cdot 10^3 \pm 1,6 \cdot 10^3$ cpm, ce qui représente 39 p. cent de la radioactivité initiale. Au-delà d'une minute, elle augmente rapidement, pour atteindre après quatre jours un plateau de $52,2 \cdot 10^3 \pm 1,3 \cdot 10^3$ cpm ou 88 p. cent

de la radioactivité initiale. Les moyennes et les écarts-types sont calculés à partir d'un test effectué en huit exemplaires.

L'autoradiographie de l'électrophorèse d'aliqotes des différents points de cette cinétique (figure 2B) démontre que l'intensité des bandes, et donc la quantité de protéines radiomarquées, augmente aussi en fonction du temps. La majeure partie de ces protéines radiomarquées se situe au niveau du front de migration.

3) En fonction de la filtration

a) Du diamètre des pores de la membrane filtrante

Des filtrations à 0,2 ou 0,45 µ d'un vin collé pendant 4 heures avec 50 µg de colle de sang/ml ont été faites.

Chaque moyenne et l'écart-type sont calculés à partir d'un test effectué en sept exemplaires. La radioactivité de 10 µl de filtrat lorsque la filtration est égale à 0,2 µ est de $106,1 \cdot 10^3 \pm 16,6 \cdot 10^3$ cpm. Pour une filtration égale à 0,45 µ ces valeurs sont $109,5 \cdot 10^3 \pm 17,6 \cdot 10^3$ cpm.

Le test de comparaison de ces moyennes, donne pour un degré de liberté (d.d.l.) égal à 12 une valeur t de 0,25. Or, avec ce même d.d.l., la valeur donnée par la table de t (SCHWARTZ, 1990) pour le risque 5 p. cent est t = 2,17. La différence observée n'est donc pas significative.

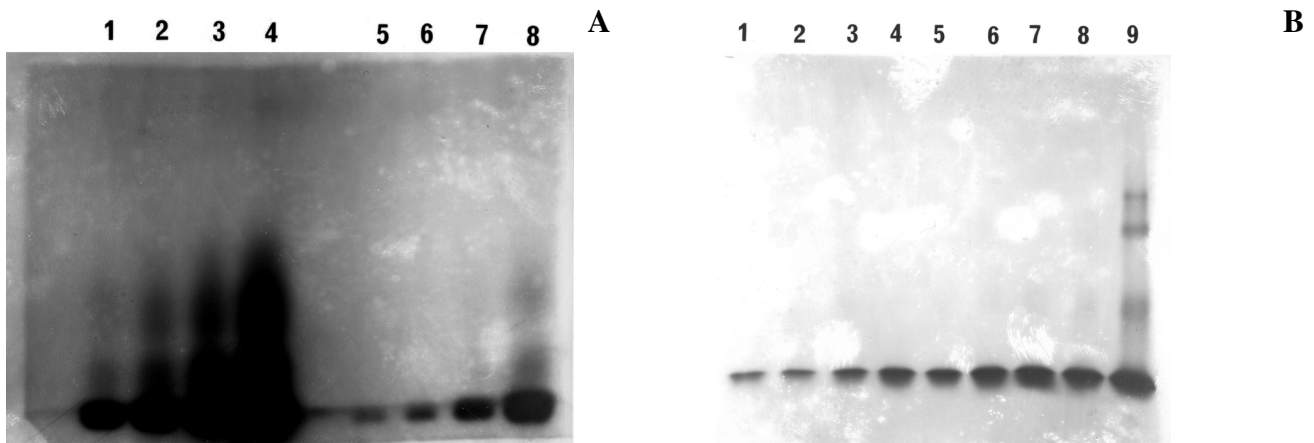


Fig. 1 - Mise en évidence des protéines d'origine animale dans le vin clarifié en fonction de la concentration de colle de sang avec ou sans bentonite.

(A), mesure de la radioactivité du vin clarifié avec uniquement de la colle de sang (■) ou avec de la colle de sang et de la bentonite (▲)
 (B), autoradiographie de la SDS-PAGE des protéines du vin clarifié avec uniquement de la colle de sang (profils de 1 à 4) puis avec de la colle de sang et de la bentonite (profils de 5 à 8). La concentration de colle de sang est de 25 µg/ml pour les profils 1 et 5, 50 pour 2 et 6, 125 pour 3 et 7 et 250 pour 4 et 8.

Fig. 1 - Animal proteins in clarified wine in relation to concentration of blood paste proteins with or without bentonite.

(A), rate of radioactivity in wine clarified only with blood paste (■) or with blood paste and bentonite (▲).
 (B), SDS-PAGE autoradiography of proteins of wine clarified only with blood paste (lanes 1-4) then with blood paste and bentonite (lanes 5-8). Concentration of blood paste is 25 µg/ml for lanes 1 and 5, 50 for lanes 2 and 6, 125 for lanes 3 and 7, 250 for lanes 4 and 8.

b) De la présence ou de l'absence de la filtration

La figure 3A représente l'électrophorèse des protéines d'un vin après différents collages. La figure 3B correspond à l'autoradiographie de ce même gel. Les protocoles de clarification sont au nombre de quatre. Leurs conditions générales sont : une absence de bentonite, une concentration de 250 µg de colle de sang (dont les protéines ont été iodées)/ml de vin, un temps de contact de 4 heures à température ambiante suivie ou non d'une filtration avec une membrane 0,2 µ.

Le premier essai (profil 1, figures 3A et 3B) correspond à un vin clarifié et filtré dans ces conditions ;

Le second (profil 2, figures 3A et 3B) au mélange vin et colle de sang incubé dans ces mêmes conditions, mais n'ayant pas subi de filtration ;

Le troisième (profil 3, figures 3A et 3B) à un essai où le vin a été remplacé par de l'eau Milli Q et pour lequel aucune filtration n'a été effectuée ;

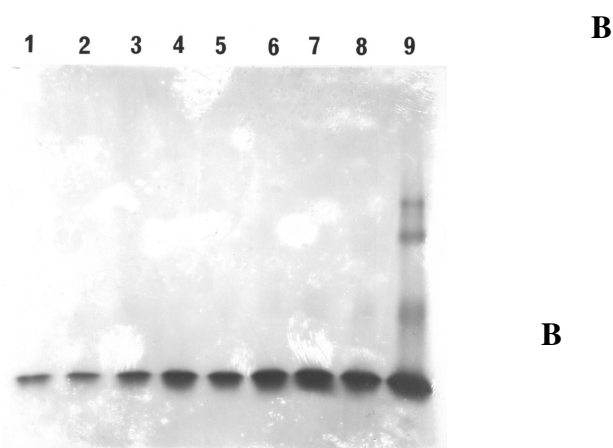
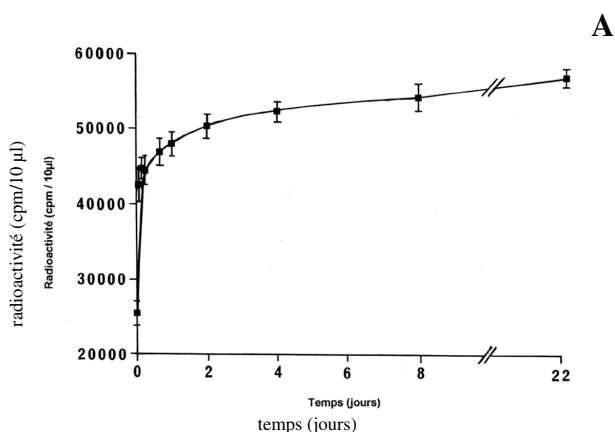


Fig. 2 - Mise en évidence des protéines d'origine animale dans le vin après différents temps de contact du mélange colle/vin.

A : mesure de la radioactivité dans le vin clarifié.

B : autoradiographie de la SDS-PAGE des protéines du vin clarifié. Les temps de contact des profils de 1 à 9 sont respectivement de 0, 2, 4, 6, 16, 24, 48, 96 et 192 heures.

Fig. 2 - Animal proteins in wine after different incubation times with wine/paste mixture.

A : radioactivity in clarified wine

B : SDS-PAGE autoradiography of clarified wine proteins. Incubation times of lanes 1-9 are 0, 2, 4, 6, 16, 24, 48, 96 et 192 hours respectively.

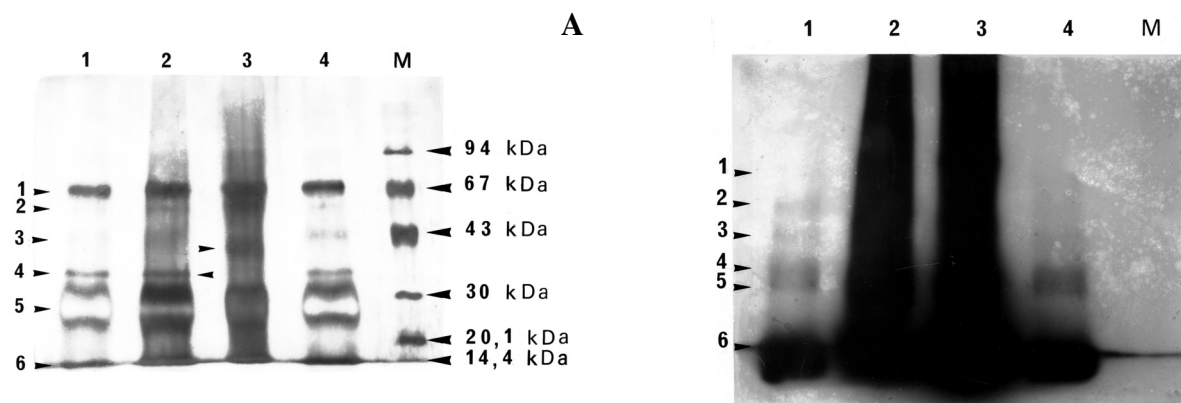


Fig. 3 - Mise en évidence sur SDS-PAGE des protéines du vin

A : coloration par le nitrate d'argent - **B :** autoradiographie

Les différents profils correspondent :

piste 1 : au vin clarifié avec de la colle de sang puis filtré, piste 2 : au mélange non filtré vin et colle de sang, piste 3 : au mélange non filtré eau et colle de sang, piste 4 : à un vin clarifié deux fois avec des protéines d'origine animale et filtré, piste M : à des marqueurs de différents poids moléculaires.

Fig. 3 - Wine proteins evidence by SDS-PAGE

A : silver nitrate stain - **B :** autoradiography

The different lanes are as follows :

1 : wine clarified with blood paste, then filtered, 2 : non-filtered wine/blood paste mixture, 3 : non-filtered water/blood paste mixture, 4 : wine clarified twice with animal proteins, then filtered, lane M : markers of different molecular weights.

Le quatrième (profil 4, figures 3A et 3B) à un vin clarifié deux fois puis filtré (le premier collage, contrairement au second, avait un temps de contact de 4 jours et a été effectué avec des protéines non radiomarquées).

La coloration au nitrate d'argent du gel d'électrophorèse (figure 3A) révèle que les profils 1 et 4, qui représentent respectivement les protéines subsistant après un collage et une filtration et celles persistant après deux collages suivi d'une filtration, sont très proches. En effet, sur chacun d'entre eux, on distingue six protéines aux Rf identiques deux à deux (voir flèches de 1 à 6 à gauche du profil 1).

Le profil 2, représentant l'ensemble des protéines de la colle de sang plus celles du vin, semble contenir les protéines déjà présentes dans le profil 1 ou 4. L'intensité de sa coloration étant cependant plus importante, une partie des protéines (dont on ne peut encore déterminer l'origine) doit être éliminée par la filtration.

L'intensité de la coloration du profil 3, représentant uniquement les protéines de la colle de sang, elle aussi beaucoup importante que celle du profil 1 ou 4 confirme l'élimination d'une partie des protéines par la filtration.

Les profils 2 et 3 ont de nombreuses bandes qui leurs sont communes. Deux néanmoins les différencient : une de 33 kDa présente dans le profil 2 et une de 41 kDa dans le 3 (voir flèches entre profils 2 et 3).

L'autoradiographie de ce même gel d'électrophorèse (figure 3B), révèle qu'avec un temps d'exposition du film de 12 heures, 6 protéines au moins issues de la colle de sang sont retrouvées dans le vin collé et filtré (voir flèches de 1 à 6 à gauche du profil 1).

La comparaison des profils 1 et 4 confirme que clarifier un vin une fois ou deux, puis le filtrer ne modifie pas ce résultat.

La quantification au Phospho-Imager (Molecular Dynamics, Evry, France) des profils 1 et 2 donne comme valeurs respectives $5,6 \cdot 10^6$ et $95,2 \cdot 10^6$. Ceci signifie qu'environ 6 p. cent des protéines d'origine animale sont retrouvés dans le vin une fois clarifié et filtré. La quantité de protéines contenue dans 250 µg de colle de sang étant de 200 µg, environ 12 mg de protéines d'origine animale sont présents dans un litre de vin clarifié et filtré.

II - MISE EN ÉVIDENCE DES PROTÉINES DE LA COLLE DE SANG DANS LE VIN APRÈS CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITÉ

Les électrophorèses bidimensionnelles, d'une fraction des éluats des chromatographies d'affinité d'un vin non collé ou collé pendant 4 heures avec 250 µg de colle de sang/ml sont représentées figure 4 (respectivement A et B). Elles attestent que certaines protéines du vin disparaissent après le collage (voir flèche 1 figures 4A et 4B). A cette dernière concentration, des protéines qui ne peuvent être alors que d'origine animale apparaissent aussi (voir flèche 2, figure 4B).

DISCUSSION-CONCLUSION

Au cours de cette étude, nous avons mis en évidence qu'après une clarification effectuée à des concentrations de bentonite et de colle de sang dites « normales » (respectivement 500 et 50 µg/ml) et un temps de contact de quatre heures avant filtration, des traces de protéines d'origine animale subsistaient dans le vin.

Quelle que soit la concentration de colle de sang utilisée, en présence ou non de bentonite, des protéines d'origine animale sont retrouvées dans le vin. La concentration de ces dernières est fonction de la quantité de colle de sang utilisée.

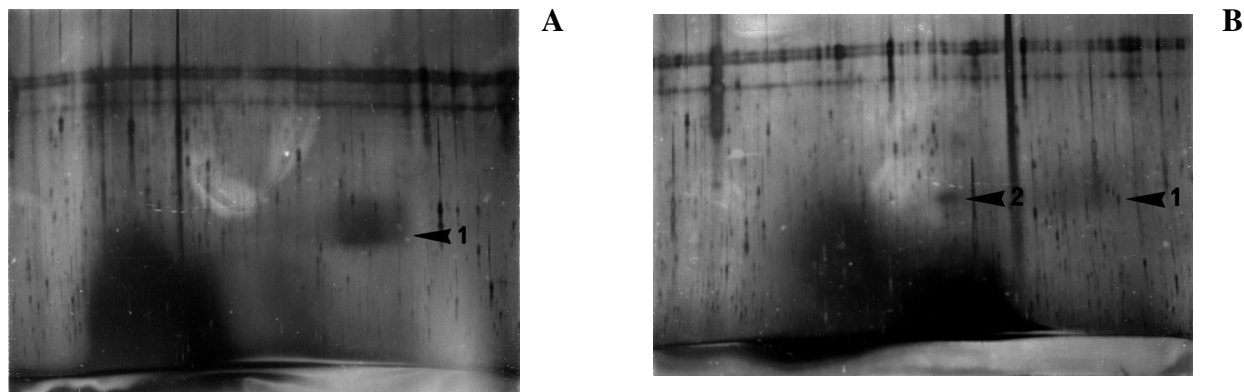


Fig. 4 - Electrophorèses bidimensionnelles. (A), d'un vin non collé, (B), d'un vin collé avec 250 µg de colle de sang/ml.

Fig. 4 - 2D electrophoresis (A), non-clarified wine, (B), wine clarified with 250 µg of blood paste /ml.

L'absence de bentonite augmente d'un facteur de 4 à 6 la quantité de protéines d'origine animale retrouvée dans un vin clarifié avec uniquement de la colle de sang.

La présence de bentonite ne semble avoir qu'une incidence sur la quantité de protéines d'origine animale qui est éliminée lors de la clarification et non sur la nature de celles-ci. Donc, afin de détecter plus facilement les protéines d'origine animale lors des expériences suivantes (cinétique, filtration, etc.) nous avons clarifié sans bentonite.

La quantité de protéines d'origine animale retrouvée dans le vin après clarification est fonction du temps de contact du mélange colle de sang/vin. Elle augmente très rapidement pour atteindre, au bout de quatre jours un plateau. Ce phénomène pourrait être dû à la présence de protéases. Elles hydrolyseraient les protéines d'origine animale en petits peptides qui échapperaient ainsi plus facilement à la clarification et que l'on retrouve au niveau du front de migration de l'autoradiographie (figure 2B). Un autre argument en faveur de la présence de protéases est donné figure 3A ou le profil 3 (correspondant au mélange non filtré eau et colle de sang) diffère légèrement du 2 (correspondant au mélange non filtré vin et colle de sang) par une bande supplémentaire de 41 kDa. Puisque cette protéine d'origine animale est hydrolysée en présence de vin et qu'une autre de 33 kDa (qui pourrait être un produit de dégradation intermédiaire) apparaît alors, nous pensons que les protéases responsables de cette transformation sont contenues dans le vin et non dans la colle de sang.

L'élimination d'une protéine d'origine animale, après collage et filtration, est fonction de son poids moléculaire. Plus une protéine a un poids moléculaire élevé, moins on la retrouve dans le vin clarifié. Pour preuve les intensités des six bandes présentes dans les pistes 1 et 4 de la figure 3B augmentent au fur et à mesure que leurs poids diminuent.

La quantification au Phospho-Imager des profils 1 et 2 figure 3 démontre que la filtration d'un vin clarifié sans bentonite mais avec 250 µg de colle de sang/ml, élimine 94 p. cent des protéines d'origine animale. Le rendement de cette étape n'est pas modifié de façon significative si la porosité de la membrane passe de 0,45 à 0,2 µ. Comme déjà spécifié dans le chapitre « Dosage des protéines de la colle de sang » dans « Matériels et Méthodes », 250 µg de colle de sang contiennent 200 µg de protéines. Les 6 p. cent de protéines d'origine animale qu'il est donc possible de retrouver dans le vin représentent 12 mg de protéines/litre.

Le rapport entre la radioactivité d'un vin clarifié avec 250 µg de colle de sang / ml et celle d'un vin cla-

rifié avec 500 µg de bentonite et 50 µg de colle de sang/ml est égal à 27,6 (figure 1A). La concentration en protéines d'origine animale qu'il est donc possible de retrouver dans ce dernier cas est de (12 mg/27,6) soit 0,4 mg de protéines/litre de vin.

Les électrophorèses bidimensionnelles des éluats des chromatographies d'affinité démontrent qu'après une clarification avec 250 µg de colle de sang/ml suivi d'une filtration, des protéines d'origine animale apparaissent dans le vin. Elles démontrent aussi une disparition de certaines protéines entrant dans la constitution initiale du vin.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ACEDO M.I., PUEYO E. et POLO M.C., 1994. Preliminary studies on peptides in wine by HPLC. *Am. J. Enol. Vitic.*, **45**, 167-172.
- AUSUBEL F.M., BRENT R., KINGSTON R.E., MOORE D.D., SEIDMAN J.G., SMITH J.A. et STRUHL K., 1987. Immunoaffinity chromatography. In : *Current protocols in molecular biology*, Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience, p. 10.11.1-10.11.7.
- CHARRON D., TEYTON L. et LOTTEAU V., 1987. Electrophorèse bidimensionnelle : Technique d'analyse des antigènes de membrane. In : *Techniques biochimiques d'analyse des antigènes de membrane*, INSERM eds., p. 11-31.
- DAWES H., BOYES S., KEENE J. et HEATERBELL D., 1994. Protein instability of wines : influence of protein isoelectric point. *Am. J. Enol. Vitic.*, **45**, 319-326.
- DORRESTEIN E., FERREIRA R., LAUREANO O. et TEIXEIRA A.R., 1995. Electrophoretic and FPLC analysis of soluble proteins in four portuguese wines. *Am. J. Enol. Vitic.*, **46**, 235-242.
- DUBOURDIEU D., SERRANO M., VANNIER A.C. et RIBÉREAU-GAYON P., 1988. Etude comparée des tests de stabilité protéique. *Connaissance Vigne Vin*, **22**, 4, 261-273.
- ESCHENBRUCH M. et BURK R.R., 1982. Experimentally improved reliability of ultrasensitive silver staining of protein in polyacrylamide gels. *Anal. Biochim.*, **125**, 96-99.
- HOWARD S.P. et BUCKLEY T., 1982. Membrane glycoprotein receptor and hole-forming properties of a cytolytic protein toxin. *Biochim.*, **21**, 1662-1667.
- LAEMMLI U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (Lond.)*, **227**, 680-685.
- LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L. et RANDALL R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275.
- LUBBERS S., GUERREAU J. et FEUILLAT M., 1995. Étude de l'efficacité déprotéinisante de bentonites com-

- merciales sur un moût et des vins des cépages Chardonnay et Sauvignon. *Bull. O.I.V.*, **769-770**, 224-243.
- MARKWELL M.A.K. et FOX C.F., 1978. Surface-specific iodination of membrane proteins of viruses and eucaryotic cells using 1,3,4,6-tetrachloro-3 α ,6 α -diphenylglycoluril. *Eucaryotic Biochim.*, **17**, 4807-4817.
- MOINE-LEDOUX V., 1996. Recherches sur le rôle des mannoprotéines de levure vis-à-vis de la stabilisation protéique et tartrique des vins. *Thèse Doctorat*, Université de Bordeaux II.
- OAKLEY B.R., KIRSCH D.R. and MORRIS N.R., 1980. A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels. *Anal. Biochim.*, **105**, 361-363.
- PINSON B., 1996. Purification et caractérisations chimique et fonctionnelle de la purine-cytosine perméase de la membrane plasmique de la levure *Saccharomyces cerevisiae*. *Thèse Doctorat*, Université de Bordeaux II.
- SANTORO M., 1995. Fractionation and characterization of must and wine proteins. *Am. J. Enol. Vitic.*, **46**, 250-254.
- SCHWARTZ D., 1990. Méthodes statistiques à l'usage des médecins et biologistes. Flammarion Médecine Sciences eds., 13^e tirage, p. 285.
- TERNINCK T. et AVRAMEAS S., 1987. Purification des anticorps. *In : Techniques immuno-enzymatiques*, ed. INSERM, p. 13-29.

Reçu le 21 mai 1999
accepté pour publication le 12 novembre 1999
