

COMPLEXATION DU PLOMB DANS LES VINS PAR LES DIMÈRES DE RHAMNOGALACTURONANE II, UN POLYSACCHARIDE PECTIQUE DU RAISIN

LEAD COMPLEXATION IN WINES WITH THE DIMERS OF THE GRAPE PECTIC POLYSACCHARIDE RHAMNOGALACTURONAN II

P. PELLERIN* et ¹, M.A. O'NEILL**, Cécile PIERRE*,
Marie-Thérèse CABANIS***, A.G. DARVILL**, P. ALBERSHEIM**
et M. MOUTOUNET*

*Institut National de la Recherche Agronomique, Institut des Produits de la Vigne,
Unité de Recherches des Polymères et des Techniques Physico-Chimiques,
2 place Viala, 34060 Montpellier Cedex (France)

**Complex Carbohydrate Research Center, The University of Georgia,
220 Riverbend Road, Athens, GA 30602-4712 (USA)

***Centre de Formation et de Recherche en Œnologie, Faculté de Pharmacie,
Université de Montpellier I, avenue Charles Flahault, 34060 Montpellier cedex (France)

Résumé : Le plomb est un contaminant des vins dont la teneur reste considérée comme trop élevée en raison de ses propriétés toxiques cumulatives. Le Rhamnogalacturonane II, un polysaccharide pectique des parois cellulaires du raisin, est présent dans les vins sous forme de dimères (dRG-II-B) reliés par un diester d'acide borique. Ces dimères forment des complexes de coordination avec des cations di- et trivalents spécifiques parmi lesquels les ions Pb^{2+} .

Sept échantillons de vins rouges et blancs, provenant de différents cépages, récoltés au cours d'années différentes et vinifiés selon des procédés variés contenaient entre 30 et 110 $\mu g/l$ de plomb. Deux étapes de chromatographie ont permis d'isoler un complexe dRG-II-B-plomb qui contenait plus de 85 p. cent du plomb total de chaque échantillon de vin. La capacité totale de complexation par les doses de RG-II habituellement rencontrées dans les vins excède largement les teneurs réelles en plomb des vins. La stabilité de ce complexe dans la gamme de pH des vins est confirmée par sa présence dans un vin de 1988. Ces travaux ouvrent de nouvelles perspectives pour les problèmes toxicologiques liés au plomb en œnologie. La description du vin comme source majeure de plomb dans l'alimentation humaine devra en particulier être vérifiée par des études de nutrition spécifiques.

Abstract : Wine is believed to be a significant source of lead in the human diet even though the lead content of wines has decreased considerably over the last thirty years. Nevertheless, the lead content of wines must be reduced to a minimum since this heavy metal is highly toxic.

The plant cell wall pectic polysaccharide rhamnogalacturonan II (RG-II) is a predominant anionic molecule in red wine. RG-II exists as a dimer (dRG-II-B) that is cross-linked by a 1:2 borate-diol ester and forms complexes *in vitro* with lead and other selected di- and tri-valent cations. One mole of dimer binds at least 1 mole of Pb^{2+} . We have now determined the amount of lead in wines that is bound to dRG-II-B since previous studies have suggested that most of the lead in wine is bound to an anionic macromolecule.

Seven wines, with lead concentrations between 30 and 110 $\mu g/l$, were obtained from different grape varieties harvested at different vintages and vinified by different procedures. Two chromatography steps, adsorption on a polystyrene-divinylbenzene resin and size-exclusion on a Superdex[®] 75-HR column, have been used to purify a d-RG-II-B-lead complex which contained at least 85 p. cent of the total lead of each wine. The dRG-II-B-Pb complex is stable at the pH of wine and is present in a wine that was produced in 1988. The dRG-II-B present in red (~ 100 mg/l) and white (~ 20 mg/l) wines can bind at least ten-fold more Pb^{2+} than is typically present in wine.

Our study is the first to show that in wine most of the lead is complexed with a pectic polysaccharide that is not degraded during vinification. dRG-II-B is also known to form complexes with other cations, including strontium and barium. However, it is not known what role dRG-II-B has in determining the metabolic fate in humans of toxic cations present in wine.

Mots clés : vin, plomb, Pb^{2+} , cation, rhamnogalacturonane II, polysaccharide pectique, nutrition, santé, toxicité

Key words : wine, lead, Pb^{2+} , cation, rhamnogalacturonan II, pectic polysaccharide, nutrition, health, toxicity

¹ auteur pour correspondance (e-mail : pellerin@ensam.inra.fr)

INTRODUCTION

Le plomb est un métal ubiquiste et toxique aux propriétés cumulatives ce qui a conduit l'Organisation Mondiale de la Santé à recommander une diminution de sa teneur dans les aliments dès 1972 (W.H.O., 1972). La présence de plomb dans les vins est connue depuis longtemps et son dosage réalisé depuis plusieurs décennies (FERRE et JAULMES, 1948 ; JAULMES *et al.*, 1960 ; JAULMES et HAMMELLE, 1971). Les boissons alcoolisées ont été désignées comme une source importante de plomb, en particulier sur la base d'une étude suédoise consacrée au taux de plomb dans le sang de patients souffrant d'alcoolisme chronique (ELINDER *et al.*, 1988). Un taux d'absorption de 20 p. cent du plomb à travers le tractus intestinal a pu être calculé dans le cas de consommation de bière (HEARD *et al.*, 1983). SMART *et al.* (1990) concluent, sans toutefois le démontrer, que l'adsorption de plomb lors d'ingestion de vin doit se faire dans les mêmes proportions. Ces auteurs retiennent des concentrations très élevées de plomb (obtenues dans le cas de bouteilles à capsule étain-plomb) pour désigner le vin comme une source majeure de plomb dans notre alimentation. C'est ainsi que le vin est considéré aujourd'hui encore comme une source importante de plomb bien que la teneur moyenne en ait fortement diminué au cours des dernières années (FERNANDEZ PEREIRA, 1988 ; HENICK-KLING et STOEWSAND, 1993 ; TUSSEAU *et al.*, 1996).

Le plomb présent dans un vin provient tout d'abord de la contamination de la vendange, soit par adsorption du plomb présent dans le sol, soit par une contamination du raisin par les particules de terre, les aérosols et la pluie (TEISSEDRE *et al.*, 1994). La teneur finale d'un vin résulte de deux phénomènes ultérieurs opposés, une diminution au cours de la fermentation (TEISSEDRE *et al.*, 1993) attribuée à la formation de précipités de sulfures de plomb (JAULMES *et al.*, 1960), un apport dû aux traitements technologiques (pompes, foudres, collages à la bentonite...) (JAULMES *et al.*, 1960 ; HENICK-KLING et STOEWSAND, 1993) ou aux capsules de surbouchage (MÉDINA *et al.*, 1977). Les efforts des vinificateurs pour réduire les sources d'apports en plomb ont été partiellement couronnés de succès et marqués par une diminution constante de la teneur en plomb des vins (0,07 mg/l en moyenne pour les vins français). La présence d'une teneur minimale ne semble pas pouvoir être évitée du fait de la contamination inévitable de la vendange. La permanence de ces teneurs dues aux contraintes géo-pédologiques, associée à une pression constante des pays importateurs (un abaissement à 0,2 mg/l a été décidé par l'OIV en novembre 1996 et

l'objectif de 0,1 mg/l ne peut être exclu dans un avenir proche) indique la nécessité pour la filière œnologique de poursuivre l'étude du statut et du devenir du plomb dans les vins.

Le plomb total est habituellement mesuré par dosage direct des vins par Spectrophotométrie d'Absorption Atomique sans flamme (EDWARDS et AMERINE, 1977 ; MÉDINA, 1978). Or, plusieurs études récentes indiquent la présence d'un complexe entre le plomb et une molécule organique (ARCOS *et al.*, 1993) chargée négativement (MINGUEZ *et al.*, 1996). La nature du complexant n'a pas été élucidée et MINGUEZ *et al.* (1996) suspectent la formation d'un complexe avec les acides tartrique ou malique, en contradiction avec les résultats de ESCHNAUER et SCOLLARY (1996) qui montrent que le plomb est retenu lorsque le vin est ultrafiltré sur une membrane à seuil de coupure de 30 kDa.

Le Rhamnogalacturonane II (RG-II), est un polysaccharide pectique des parois cellulaires primaires parfaitement conservé dans tout le règne végétal (O'NEILL *et al.*, 1990 ; ALBERSHEIM *et al.*, 1994). Le RG-II se caractérise par une composition très complexe, qui inclut la présence de nombreux sucres rares (Apiose, acide acérique, Kdo, Dha, 2-O-Méthyl-fucose et 2-O-Méthyl-xylose) et de types de liaisons glucidiques particuliers. Cette complexité le rend très difficile à analyser et il est resté longtemps non détecté dans de nombreux produits d'origine végétale. La présence de nombreuses liaisons osidiques rares lui confère une importante résistance aux enzymes pectolytiques connues et nous avons pu montrer qu'il est présent en quantité non négligeable dans les vins et les jus de fruits (DOCO et BRILLOUET, 1993 ; PELLERIN *et al.*, 1996, DOCO *et al.*, 1997). Les autres polysaccharides majeurs retrouvés dans les vins sont les mannoprotéines de levure (LLAUBERES *et al.*, 1987 ; FEUILLAT *et al.*, 1988 ; WATERS *et al.*, 1994), les arabinogalactanes de type II (SAULNIER et BRILLOUET, 1989 ; SAULNIER *et al.*, 1992 ; PELLERIN *et al.*, 1993 ; 1995) et les arabinanes (BELLEVILLE *et al.*, 1991).

Des travaux récents ont indiqué que le RG-II peut former des liaisons croisées au sein des parois végétales via la formation de ponts diesters d'acide borique (ISHII et MATSUNAGA, 1996 ; KOBAYASHI *et al.*, 1996 ; O'NEILL *et al.*, 1996). Les dimères ainsi formés semblent jouer un rôle important pour maintenir la cohésion des parois végétales en croissance et permettent d'expliquer le rôle du bore comme microaliment des plantes (O'NEILL *et al.*, 1996). Ces travaux ont conduit à une autre découverte tout aussi inattendue : les dimères de RG-II (dRG-II-B) peuvent former

des complexes de coordination avec des cations spécifiques di- ou trivalents et ayant un rayon ionique supérieur à 0,95 Å. Le plomb possède ces propriétés et il est présent dans les dimères de RG-II isolés à partir de parois de plantes (O'NEILL *et al.*, 1996). La formation de dimères peut être obtenue *in vitro* par incubation de monomère de RG-II en présence d'acide borique dans une gamme de pH de 3 à 5. La vitesse de dimérisation est fortement accrue en présence d'acétate de plomb, chaque molécule de dimère formée contenant alors un atome de plomb (O'NEILL *et al.*, 1996).

Cet article démontre que le plomb est complexé quantitativement par les dimères de RG-II dans les vins. Ces travaux éclairent les problèmes toxicologiques posés par le plomb en œnologie sous un jour entièrement nouveau.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

I — ÉCHANTILLONS DE VIN

Les échantillons de vins utilisés provenaient de la Station Expérimentale INRA de Pech-Rouge/Narbonne, ou nous ont été fournis par la Chambre d'Agriculture de la Gironde. Les vins choisis (tableau I) correspondaient à différents millésimes et cépages, vinifiés selon différents procédés susceptibles de modifier leur composition polysaccharidique (DOCO *et al.*, 1995).

II — DOSAGE DU PLOMB

La teneur en plomb des différents échantillons a été déterminée selon le mode opératoire de l'OIV (1990) par Spectrométrie d'Absorption Atomique sans flamme (TEISSEBRE *et al.*, 1993, 1994) à l'aide d'un spectrophotomètre Varian équipé d'un four graphite pyrolytique sans nacelle GTA-95. La longueur d'onde de mesure était de 283,3 nm et le correcteur de matrice composé d'une solution de 6 p. cent de phosphate acide d'ammonium dans l'acide nitrique à 1 p. cent.

III — FRACTIONNEMENT DES VINS PAR CHROMATOGRAPHIE D'ADSORPTION

Le fractionnement des vins (figure 1) a été réalisé par chromatographie d'adsorption sur colonne de 2,5 x 10 cm de résine Relite® DIAION® SP 411 (Mitsubishi, Japon). Avant chaque expérience, la résine a été régénérée par passage d'éthanol à 80 p. cent. Des échantillons de 40 ml de vin ont été désalcoolisés par concentration deux fois à l'évaporateur rotatif puis percolés sur la colonne de résine à un débit de 25 ml/h. La fraction A (non retenue sur la colonne) a été récupérée par lavage de la colonne par 40 ml d'eau désionisée.

La colonne a été alors éluée par 100 ml d'éthanol à 20 p. cent pour donner la fraction B.

IV — CHROMATOGRAPHIE D'EXCLUSION STÉRIQUE

L'analyse des profils polysaccharidiques des différents échantillons a été réalisée par chromatographie d'exclusion stérique sur colonne de 1 x 30 cm de Superdex®-75 HR (Pharmacia Biotech, Suède) éluée à 0,6 ml/min dans un tampon de formiate d'ammonium 30 mM à pH 5,6. L'éluion des polysaccharides était suivie par un réfractomètre ERC-7512 (Erma, Japon) couplé à un système d'analyse des données Waters Maxima (Millipore, USA).

Afin de purifier le complexe plomb-dRG-II-B, des aliquotes de 5 mg de fraction B, obtenues par chromatographie sur résine d'adsorption puis lyophilisées, ont été reprises dans 1 ml de tampon formiate d'ammonium 30 mM à pH 5,6 puis injectées sur colonne Superdex® 75-HR éluée comme décrit précédemment. Les fractions correspondant aux polyosides de haute masse molaire (élution de 13,5 à 18 min) et au RG-II (élution de 18,5 à 22 mn) ont été collectées manuellement puis lyophilisées.

V — ANALYSE DE COMPOSITION GLUCIDIQUE

La composition en monosaccharides neutres des fractions obtenues a été déterminée par analyse CPG sur colonne capillaire en silice fondue DB-225 (30 m x 0,32 mm, film de 0,25 µm d'épaisseur) des dérivés d'alditols peracétylés obtenus comme décrit précédemment (HARRIS *et al.*, 1984 ; DOCO et BRILLOUET, 1993).

VI — ÉLIMINATION DU COMPLEXE PLOMB-RG-II DIMÈRE D'UN VIN

Des échantillons de 10 ml du vin I (Merlot, 1995), ont été traités selon les protocoles suivants :

- addition de 1 g de charbon actif Norit CA 1 (Norit, Pays-Bas), agitation pendant 30 min puis filtration sur filtre 3,0 mm.

- ultrafiltration sur filtre Centricon 30 (Amicon, USA) et lavage du rétentat deux fois par 10 ml d'eau désionisée.

RÉSULTATS

I — TENEUR EN PLOMB DES ÉCHANTILLONS DE VINS

Les teneurs en plomb des différents échantillons de

TABLEAU I

Cépage, millésime, vinification et teneur en plomb (en µg/l) des échantillons de vin utilisés

Table I — Grape variety, year of production, wine-making procedure and lead content (µg/l) of the wine samples

Échantillon	1	2	3	4	5	6	7
Provenance	Chambre d'Agriculture de la Gironde	Chambre d'Agriculture de la Gironde	INRA Pech-Rouge	INRA Pech-Rouge	INRA Pech-Rouge	INRA Pech-Rouge	INRA Pech-Rouge
Cépage	Merlot	Sauvignon blanc	Grenache noir	Grenache noir	Carignan	Chardonnay	Muscat d'Alexandrie
Millésime	1995	1995	1995	1995	1988	1993	1994
Vinification	Foulage, éraflage cuvaïson 15 jours	Foulage, pressurage, débourbage	Egrappage, macération 15 jours	Flash détente	Vendange foulée	Pressurage direct, débourbage	Flash détente
Plomb	78	41	62	27	108	39	56

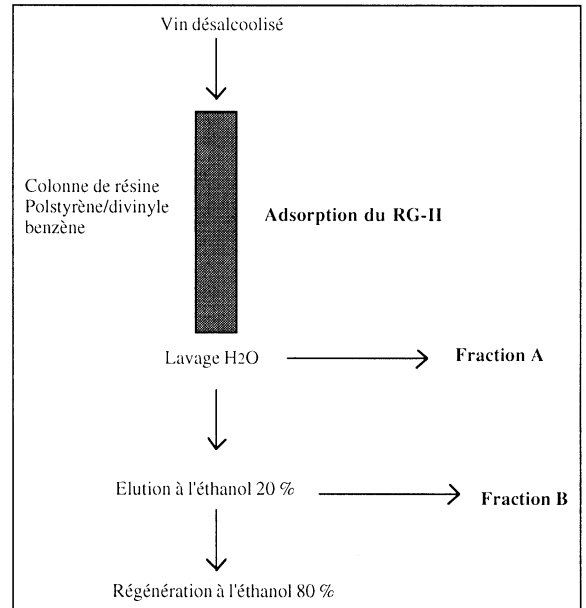


Fig. 1— Protocole de fractionnement des vins par chromatographie d'adsorption sur colonne de résine Polystyrène/divinyl benzène

Fig. 1— Fractionation of wines by adsorption chromatography on a polystyrene/divinyl benzene resin

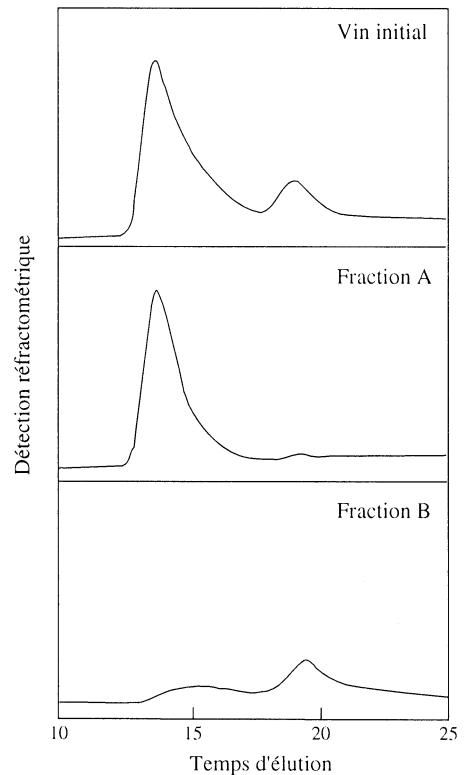


Fig. 2— Comparaison par chromatographie d'exclusion stérique sur colonne Superdex® 75-HR des profils polysaccharidiques du vin Merlot 1 et des fractions A et B correspondantes (figure 1)

Fig. 2— Superdex® 75-HR size-exclusion chromatography of total polysaccharides of wine Merlot 1 and the corresponding fractions A and B (figure 1)

vin utilisés dans le cadre de cette étude (tableau I) se situaient de 25 à 110 µg/l, dans la gamme des valeurs moyennes rencontrées pour les vins produits en Europe.

II — FRACTIONNEMENT DES VINS PAR CHROMATOGRAPHIE D'ADSORPTION

Le protocole de chromatographie d'adsorption sur résine copolymérique de polystyrène et divinylbenzène mis au point (figure 1) permet d'adsorber spécifiquement et quantitativement le RG-II et de le récupérer par élution à l'éthanol 20 p. cent. La comparaison des profils polysaccharidiques sur colonne Superdex® 75-HR (figure 2) des fractions A et B obtenues pour le vin 1 (Merlot, 1995) avec celui du vin initial confirme cette séparation : la fraction A contient les polysaccharides de haute masse molaire, mannoprotéines et arabinogalactanes principalement, élués de 13 à 18 min, alors que le pic correspondant au RG-II (élué de 18,5 à 22 min) est retrouvé quantitativement dans la fraction B. Le fractionnement a été confirmé par la présence des oses neutres caractéristiques du RG-II, apiose, 2-O-Méthyl-fucose et 2-O-Méthyl-xylose (PELLE-RIN *et al.*, 1996), dans les fractions B (tableau II).

TABLEAU II

Composition en oses neutres (en % molaire) des différentes fractions obtenues à partir du vin Merlot 1

Table II — Neutral sugar composition (Mol %) of the fractions obtained from a red wine (Merlot 1)

Monosaccharide	A	B	B1	B2
Rhamnose	4,2	15,0	4,8	24,9
2-O-Méthyl-Fucose	*	3,5		4,2
Fucose		4,5	0,5	5,6
2-O-Méthyl-Xylose		2,7		4,5
Apiose		4,0		6,7
Arabinose	26,5	32,5	65,0	27,0
Galactose	27,5	20,2	18,2	17,2
Mannose	39,1	10,9	9,7	5,2
Glucose	2,7	6,7	1,8	4,7

* < 0,5 %

III — TENEUR EN PLOMB DES FRACTIONS SÉPARÉES PAR CHROMATOGRAPHIE D'ADSORPTION

Les teneurs en plomb des différentes fractions A et B obtenues ont été exprimées en pourcentage de la quantité totale de plomb contenu dans chaque échan-

tilon de vin correspondant. L'analyse des résultats obtenus indique la présence majoritaire du plomb dans la fraction contenant le RG-II. Le plomb retrouvé dans les fractions A représentait en effet moins de 8 p. cent du plomb total dans le cas des vins rouges (figure 3a) et 15 p. cent dans le cas des vins blancs (figure 3b). Le plomb a en fait été retrouvé presque quantitativement dans les fractions B contenant le RG-II, les pourcentages calculés étant dans tous les cas supérieurs à 85 p. cent. Les valeurs relatives élevées (> 100 p. cent du plomb initial) obtenues pour les fractions B de certains échantillons peuvent s'expliquer par la différence de matrice entre les vins (due en particulier à leur contenu en sels minéraux) par rapport aux fractions B qui ne contiennent que le modificateur de matrice ajouté (RIANDEY, 1979).

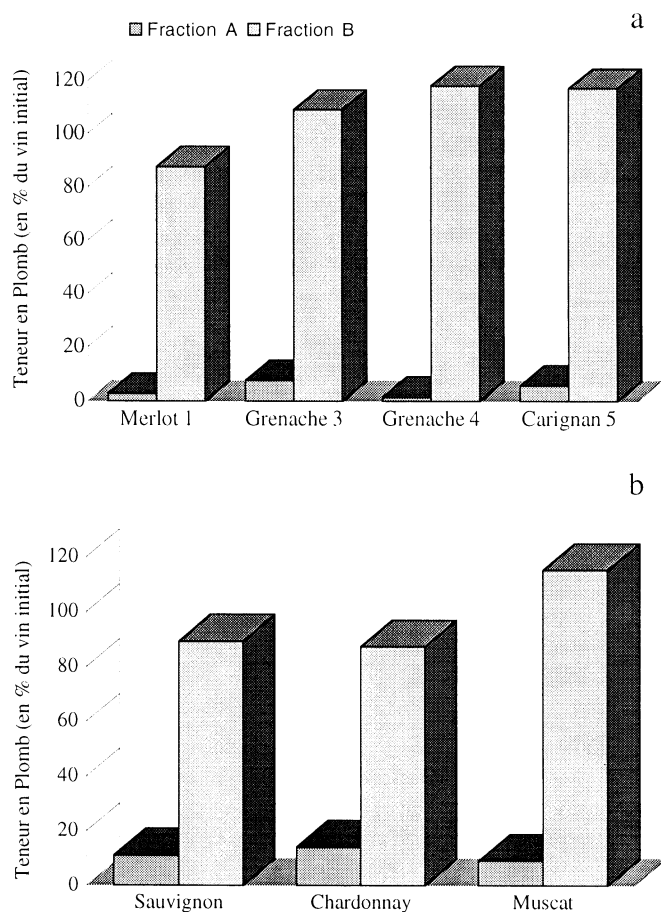


Fig. 3 — Pourcentage du plomb de chaque vin retrouvé dans les fractions A et B séparées par chromatographie d'adsorption sur résine Polystyrène/divinyl benzène

a : cas des vins rouges - b : cas des vins blancs

Fig. 3 — Percent of total lead present in fractions A and B separated by adsorption chromatography on a polystyrene/divinyl benzene resin

a : red wines - b : white wines

La présence du plomb des vins étudiés dans les fractions B contenant le RG-II est donc indépendante du cépage, du mode de vinification mais aussi du millésime. Le cas du vin 5, vinifié en 1988 indique que le complexe présente une grande stabilité dans le temps.

IV — ISOLEMENT ET IDENTIFICATION DU COMPLEXE PLOMB-RG-II DIMÉRIQUE

L'analyse du profil chromatographique (figure 2) et de la composition (tableau II) des fractions B obtenues (exemple du vin 1) montre que le RG-II y est associé à des constituants de plus haute masse molaire composés essentiellement d'arabinose, de galactose et de mannose. L'isolement du complexe plomb-dRG-II-B a donc nécessité une seconde étape de purification sur colonne de Superdex® 75-HR qui permet une bonne séparation du RG-II et des polysides de haute masse molaire. Les fractions B des vins 1 (Merlot) et 2 (Sauvignon blanc) ont été fractionnées (figure 4) pour donner les fractions B1, contenant les polysides de haute masse molaire (arabinanes, arabinogalactanes et mannanes), et B2 contenant le dimère de RG-II (tableau II).

La teneur en plomb des différentes fractions obtenues a été déterminée et exprimée en pourcentage de

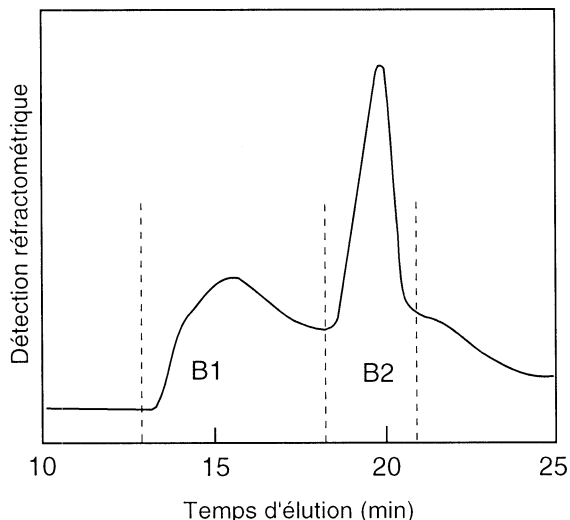


Fig. 4 — Fractionnement par chromatographie d'exclusion stérique sur colonne Superdex® 75-HR de la fraction B (figure 1) d'un vin rouge (Merlot 1) Les fractions B1 (polysaccharides de haute masse molaire) et B2 (correspondant au dRG-II-B) ont été collectées comme indiqué.

Fig. 4 — Superdex® 75-HR size-exclusion chromatography fractionation of fraction B (figure 1) from a red wine (Merlot 1)

Fractions B1 (high molecular weight polysaccharides) and B2 (DRG-II-B peak) have been collected as indicated

la quantité totale de plomb présent dans l'échantillon correspondant. La totalité du plomb a bien été retrouvée dans la fraction de RG-II dimère isolée (figure 5) confirmant ainsi la présence d'un complexe plomb-dRG-II-B représentant 85 à 95 p. cent du plomb total dans les vins étudiés.

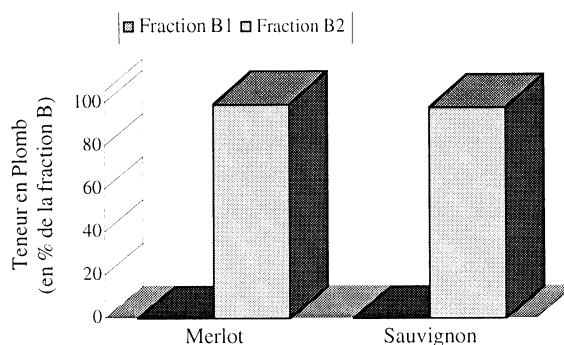


Fig. 5 — Pourcentage du plomb des fractions B d'un vin rouge (Merlot 1) et d'un vin blanc (Sauvignon 2) retrouvé dans les fractions B1 et B2 obtenues par chromatographie d'exclusion stérique sur colonne Superdex® 75-HR

Fig. 5 — Percent of lead present in fractions B1 and B2 separated by Superdex® 75-HR size-exclusion chromatography

V — CAPACITÉ TOTALE DE COMPLEXATION DU PLOMB PAR LE RG-II PRÉSENT DANS LES VINS

La capacité totale de fixation du plomb par le dRG-II-B présent dans les vins peut-être calculée sur la base de la fixation de 1 mole de plomb (masse atomique de 207) par mole de dimère de RG-II (masse molaire de 9 500 environ).

$$1 \text{ mole de plomb/dimère de RG-II} = 207/9\ 500 = 0,0218$$

Le RG-II peut donc complexer une quantité de plomb équivalente à 2 p. cent environ de son poids. Les teneurs moyennes en RG-II sont comprises entre 20 et 60 mg/l dans le cas des vins blancs et 100 à 150 mg/l dans le cas des vins rouges (DOCO *et al.*, 1995 ; PELLERIN *et al.*, 1996). Ces valeurs permettent donc d'évaluer la capacité totale du RG-II des vins à complexer le plomb :

- 0,4 à 1,2 mg/l dans les vins blancs,
- 2 à 3 mg/l dans les vins rouges.

Ces valeurs sont donc très largement supérieures aux valeurs rencontrées dans la plupart des vins, ce qui indique que la capacité totale de complexation par le RG-II est loin d'être saturée.

VI — EXPÉRIENCES PRÉLIMINAIRES D'ÉLIMINATION DU COMPLEXE PLOMB-RG-II DIMÈRE D'UN VIN

Le vin 1 a été soumis à quelques essais préliminaires de décontamination du plomb. L'addition du charbon actif comme le passage sur membrane d'ultrafiltration ont permis l'élimination totale du RG-II qui a été vérifiée par chromatographie d'exclusion stérique sur Superdex® 75-HR ainsi que l'élimination quantitative (> 99 p. cent) du plomb présent dans le vin.

DISCUSSION - CONCLUSION

La mise en évidence de la présence dans les vins d'un complexe plomb-dRG-II-B qui rend compte de la présence de la quasi-totalité du plomb appelle de nombreux commentaires. La nature et les propriétés de ce complexe donnent une explication parfaitement cohérente aux observations non expliquées jusqu'alors de la présence d'un complexe dissocié à pH 1 (ARCOS *et al.*, 1993), de charge négative (MINGUEZ *et al.*, 1996) et retenu sur membrane d'ultrafiltration à seuil de coupure de 30 kDa (ESCHNAUER et SCOLLARY, 1996). La liaison diester d'acide borique formant les dimères de RG-II est, en effet, labile à pH < 1,5 (O'NEILL *et al.*, 1996). Le RG-II se caractérise de plus par une charge négative importante (VERNHET *et al.*, 1996) et par son pouvoir colmatant sur les membranes de microfiltration tangentielle (BELLEVILLE *et al.*, 1991).

Le choix de vins issus de différents cépages, récoltés sur plusieurs années et vinifiés selon différentes technologies montre que le phénomène de complexation du plomb est général en œnologie. Les travaux sur la formation du dimère *in vitro* (O'NEILL *et al.*, 1996) indiquent que la zone de pH (3 à 5) favorable est parfaitement compatible avec la gamme de pH des vins et que la présence de plomb favorise la formation et la stabilité du dimère. Cette stabilité du complexe plomb-dRG-II-B dans le temps est confirmée par l'analyse du vin 5 correspondant au millésime 1988.

Le RG-II est un polysaccharide abondant dans les vins mais sa concentration est liée aux technologies de vinification, en particulier aux phénomènes de macération des parties solides. Les faibles teneurs en plomb détectées dans les fractions A, non retenues lors de la chromatographie d'adsorption sur résine polystyrène/divinyle benzène peuvent toutefois être dues à une adsorption non totale du RG-II sur la résine plus qu'à la présence de plomb libre en solution dans les vins. La capacité totale de complexation du plomb par le dRG-II-B présent dans les différents échantillons est,

en effet, largement supérieure aux taux dosés dans les différents échantillons.

Le RG-II a été retrouvé majoritairement sous forme dimère dans les 7 échantillons étudiés. Dans le cas d'un vin obtenu à partir de Carignan noir, le RG-II a été retrouvé pour moitié sous forme monomère (PELLERIN *et al.*, 1996). La présence de monomère de RG-II dans un vin pourrait en fait être le signe d'une carence en bore de la vigne. Une telle interprétation reste toutefois à confirmer lors d'études physiologiques plus approfondies sur le rôle de la dimérisation du RG-II dans la croissance des plantes et de la maturation des fruits, en particulier du raisin.

Concernant les conséquences de cette découverte sur les problèmes toxicologiques posés par la présence de plomb dans les vins, trois pistes semblent désormais possibles :

- L'influence de la complexation du plomb sur son assimilation dans le tractus intestinal doit être évaluée. Les polysaccharides pectiques sont en effet décrits comme appartenant au groupe des fibres alimentaires car ils ne sont pas dégradés dans l'estomac ou l'intestin grêle. C'est particulièrement vrai lors d'ingestion de vin au cours des repas, le pH de l'estomac se trouvant alors largement tamponné par le bol alimentaire (BERNIER *et al.*, 1988). Compte-tenu de la résistance importante du RG-II aux enzymes pectolytiques (DOCO *et al.*, 1997), sa dégradation par la flore intestinale doit d'ailleurs être démontrée. Les hypothèses d'assimilation du plomb basées sur la comparaison avec la consommation de bière (HEARD *et al.*, 1983 ; SMART *et al.*, 1990) et donc la mise en cause du vin comme source importante de plomb dans l'alimentation doivent être reconsidérées avec attention. Le RG-II ingéré avec le vin possède de plus la capacité à fixer d'autres métaux toxiques absorbés avec le reste de l'alimentation.

- L'observation d'une diminution des teneurs en plomb des moûts lors de la fermentation (TEISSEDRE *et al.*, 1993) doit être prise en compte à la lumière de cette nouvelle donnée. Le complexe plomb-dRG-II-B pourrait en effet soustraire une partie du plomb à la précipitation sous forme de sulfure. Ou, bien au contraire, le plomb peut être complexé par le RG-II encore présent dans les mares.

- Enfin, la mise au point d'une technologie d'élimination spécifique du complexe semble une voie intéressante à suivre. Les essais préliminaires réalisés montrent qu'il est possible d'éliminer totalement le plomb en adsorbant ou retenant le complexe qu'il forme avec le RG-II. La difficulté d'une telle démarche réside dans la nécessité de trouver un procédé qui soit par-

faitement spécifique et acceptable pour la qualité des produits.

Dans tous les cas, la mise en évidence de la complexation par un polysaccharide pectique d'un métal connu pour sa toxicité et dont la présence dans les vins est fortement contestée pour des raisons de santé humaine et des intérêts commerciaux, ouvre un champ de recherche entièrement nouveau. La capacité du RG-II comme complexant ne se restreint pas au plomb, d'autres métaux toxiques comme le Baryum sont en effet potentiellement concernés (O'NEILL *et al.*, 1996). Notre conviction est donc que l'étude des polysaccharides pectiques du vin peut être un facteur important à prendre en compte dans les démarches en cours sur les effets des produits dérivés du raisin sur la santé humaine, efforts regroupés dans la démarche « Vin et Santé ».

Remerciements : Nous remercions Messieurs Jacques Blouin de la Chambre d'Agriculture de la Gironde et Alain Samson de la Station Expérimentale INRA de Pech-Rouge/Narbonne de nous avoir fourni les échantillons de vins utilisés dans cette étude et le Dr. Martine Champ du Laboratoire de Technologie Appliquée à la Nutrition de l'INRA de Nantes pour nos discussions sur le rôle des fibres alimentaires en nutrition humaine.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ALBERSHEIM P., AN J., FRESHOUR G., FULLER M.S., GUILLEN R., HAM K.-S., HAHN M.G., HUANG J., O'NEILL M.A., WHITCOMBE A., WILLIAMS M.V., YORK W.S. et DARVILL A.G., 1994. Structure and function studies of plant cell wall polysaccharides. *Biochem. Soc. Trans.*, **22**, 374-378.
- ARCOS M.T., ANCIN M.C., ECHEVIERRA J.C., GONZALEZ A. et GARRIDO J., 1993. Study of lability of heavy-metals in wines with different degrees of aging through differential-pulse anodic stripping voltammetry. *J. Agric. Food Chem.*, **41**, 2333-2339.
- BELLEVILLE M.P., WILLIAMS P. et BRILLOUET J. M., 1993. A linear arabinan from a red wine. *Phytochem.*, **33**, 227-229.
- BELLEVILLE M.P., BRILLOUET J.-M., TARODO DE LA FUENTE B., SAULNIER L. et MOUTOUNET M., 1991. Differential roles of red wine colloids in the fouling of a cross-flow microfiltration alumina membrane. *Vitic. Enol. Sci.*, **46**, 100-107.
- BERNIER J., ADRIAN J. et VIDON N. 1988. *Les aliments dans le tube digestif*. Doin ed., Paris.
- DOCO T. et BRILLOUET J.-M., 1993. Isolation and characterization of a rhamnogalacturonan II from red wine. *Carbohydr. Res.*, **243**, 333-343.
- DOCO T., LECAS M., PELLERIN P., BRILLOUET J.-M. et MOUTOUNET M., 1995. Les polysaccharides pectiques de la pulpe et de la pellicule de raisin. Quel devenir pendant la phase pré-fermentaire ? *Rev. Fr. Œnol.*, **153**, 16-23.
- DOCO T., WILLIAMS P., VIDAL S. et PELLERIN P., 1997. Rhamnogalacturonan II, a main polysaccharide in juices produced by enzymic liquefaction of fruits and vegetables. *Carbohydr. Res.*, **297**, 89-94.
- EDWARDS M.A. et AMERINE M.A., 1977. Lead content of wines determined by atomic adsorption spectrophotometry using flameless atomization. *Am. J. Enol. Vitic.*, **28**, 239-240.
- ELINDER C.G., LIND B., NILSSON B. et OSKARSSON A., 1988. Wine : an important source of lead exposure. *Food Add. Contam.*, **5**, 641-644.
- ESCHNAUER H.R. et SCOLLARY G., 1996. Oenology and Ecology of lead in wine. *Vitic. Enol. Sci.*, **51**, 6-12.
- FERNANDEZ-PEREIRA C., 1988. The importance of metallic elements in wine. A literature survey. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **186**, 295-300.
- FERRE L.J. et JAULMES P., 1948. Les capsules en étain plombifère cause de la présence de plomb dans les vins. *C.R. Acad. Agric.*, **34**, 864-865.
- FEUILLAT M., CHARPENTIER C., PICCA G. et BERNARD P., 1988. Production de colloïdes par les levures dans les vins mousseux élaborés selon la méthode champenoise. *Rev. Franç. Œnol.*, **11**, 36-45.
- HARRIS P.J., HENRI R.J., BLAKENEY A.B. et STONE B.A., 1984. An improved method for the methylation analysis of oligosaccharides and polysaccharides. *Carbohydr. Res.*, **127**, 59-73.
- HEARD M.J., CHAMBERLAIN A.C. et SHERLOCK J.C., 1983. Uptake of lead by humans and effect of mineral and foods. *Science Total Environ.*, **38**, 245-253.
- HENICK-KLING T. et STOEWESAND G.S., 1993. Lead in wine. *Am. J. Enol. Vitic.*, **44**, 459-463.
- ISHII T. et MATSUNAGA T., 1996. Isolation and characterization of a boron-rhamnogalacturonan II complex from cell walls of sugar beet pulp. *Carbohydr. Res.*, **284**, 1-9.
- JAULMES P., HAMELLE G. et ROQUES J., 1960. Le plomb dans les moûts et les vins. *Ann. Tech. Agric.*, **9**, 189-245.
- JAULMES P. et HAMELLE G., 1971. *Plomb. Ann. Nutr. Alim.*, **25B**, 168-170
- KOBAYASHI M., MATOH T. et AZUMA J.-L., 1996. Two chains of rhamnogalacturonan II are cross-linked by borate-diol ester bonds in higher plant cell walls. *Plant Physiol.*, **110**, 1017-1020.

- LLAUBERES R.M., DUBOURDIEU D. et VILLETAZ., 1987. Exocellular polysaccharides from *Saccharomyces* in wine. *J. Sci. Food Agric.*, **41**, 277-286.
- MÉDINA B., GUIMBERTEAU G. et SUDRAUD P., 1977. Dosage du Plomb dans les vins. Une cause d'enrichissement : les capsules de surbouchage. *Connaissance Vigne Vin*, **11**, 183-193.
- MÉDINA B. 1978. Application de la spectrométrie d'absorption atomique sans flamme au dosage de quelques métaux dans les vins. *Thèse Doctorat*, Université de Bordeaux II.
- MINGUEZ S., HERNANDEZ P. et GONZALO M., 1996. Selective extraction of lead from wine with ionic exchange resins. *Œnologie 95*. Lavoisier, Paris, London, New-York, 632-635.
- O'NEILL M.A., ALBERSHEIM P. et DARVILL A.G., 1990. *The pectic polysaccharides of primary cell walls. Methods in Plant Biochem.*, vol. 2, P.M. Dey (Ed.), Academic Press, London, 1990, pp 415-441.
- O'NEILL M.A., WARENFELTZ D., KATES K., PELLERIN P., DOCO T., DARVILL A. et ALBERSHEIM P., 1996. Rhamnogalacturonan II, a pectic polysaccharide in the walls of growing plant cells, forms a dimer that is covalently cross-linked by a borate ester. *J. Biol. Chem.*, **271**, 22923-22930.
- PELLERIN P., WATERS E.J. et BRILLOUET J.-M., 1993. Characterization of two arabinogalactan-proteins from red wine. *Carbohydr. Polym.*, **22**, 187-192.
- PELLERIN P., VIDAL S., WILLIAMS P. et BRILLOUET J.-M., 1995. Characterization of five type II arabinogalactan-proteins from red wine of increasing uronic acid content. *Carbohydr. Res.*, **277**, 135-143.
- PELLERIN P., DOCO T., VIDAL S., WILLIAMS P., BRILLOUET J.-M. et O'NEILL M.A., 1996. Structural characterization of red wine rhamnogalacturonan II. *Carbohydr. Res.*, **290**, 183-197.
- RIANDEY C. 1979. *Les perturbations. Spectrométrie d'Absorption Atomique*. Pinta (ed.), Masson, Paris.
- SAULNIER L. et BRILLOUET J.-M., 1989. An arabinogalactan-protein from the pulp of grape berries. *Carbohydr. Res.*, **188**, 137-144.
- SAULNIER L., BRILLOUET J.-M., MOUTOUNET M., HERVÉ DU PENHOAT C. et MICHON V., 1992. New investigations of the structure of grape arabinogalactan-protein. *Carbohydr. Res.*, **224**, 219-235.
- SMART G.A., PICKFORD C.J. et SHERLOCK J.C., 1990. Lead in alcoholic beverages, a second survey. *Food Add. Contam.*, **7**, 93-99.
- TEISSEDRE P.L., CABANIS M.T., DAUMAS F. et CABANIS J.C., 1993. Evolution de la teneur en plomb au cours de l'élaboration des vins des Côtes du Rhône et de la vallée du Rhône. *Rev. Fr. Œnol.*, **140**, 6-18.
- TEISSEDRE P.L., CABANIS M.T., CHAMPAGNOL F. et CABANIS J.C., 1994. Lead distribution in grape berries. *Am. J. Enol. Vitic.*, **45**, 220-228.
- TUSSEAU D., VALADE M. et MONCOMBLE D., 1996. Le plomb dans les vins. *Le Vigneron Champenois*, **5**, 6-14.
- VERNHET A., PELLERIN P., PRIEUR C., OSMIANSKI J. et MOUTOUNET M., 1996. Charge properties of some grape and wine polysaccharide and polyphenol fractions. *Am. J. Enol. Vitic.*, **47**, 25-30.
- WATERS E., PELLERIN P. et BRILLOUET J.-M., 1994. A *Saccharomyces* mannoprotein that protects wine from protein haze. *Carbohydr. Polym.*, **23**, 185-191.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION., 1972. Evaluation of certain food additives and the contaminant mercury, lead and calcium. Joint FAO/WHO expert committee on food additives. *WHO Technical Report Series 505 WHO Geneva*.

Manuscrit reçu le 8 janvier 1997 ;
 accepté pour publication le 24 février 1997

