

L'immunotechnologie au service de l'oenologie

©Tous droits réservés



Karima Mezghenna

MCF Biotechnologies/Immunologie

DNO1 - 2023

L'immunologie et l'immunotechnologie au service de l'œnologie

I. Introduction: l'immunologie

II. Ag recherchés en œnologie

1. Définition

2. Ag « œnologique » :

- collage,
- contaminants

3. Anticorps « sonde de dépistage/dosage »

III. Techniques ELISA

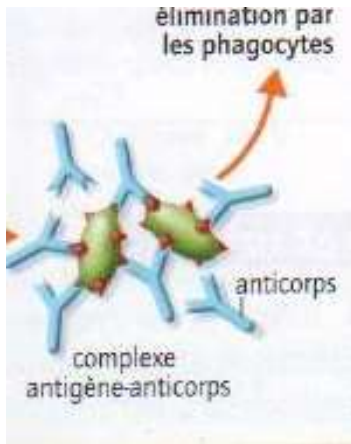
IV. Immunoblotting

V. Immunochromatographie d'affinité



I. Introduction: l'immunologie

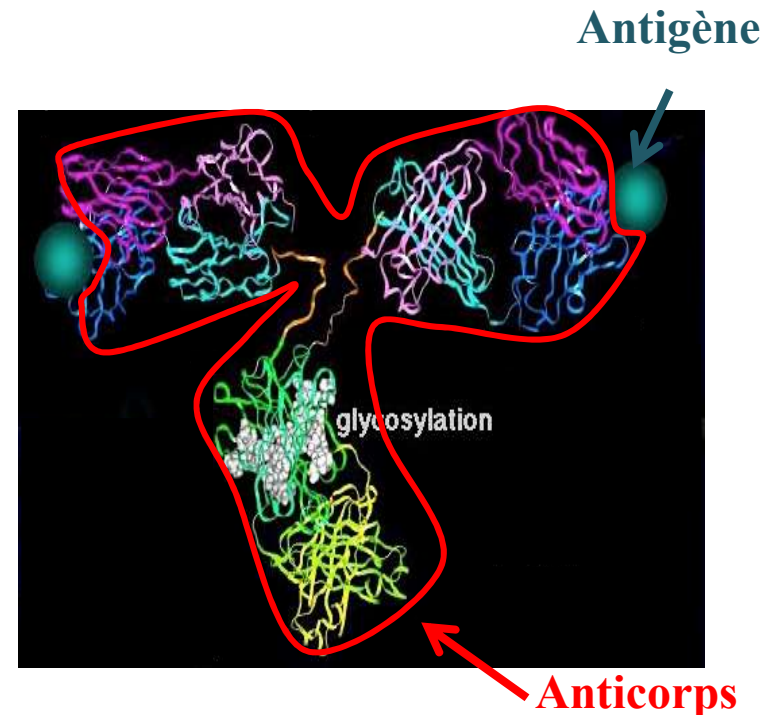
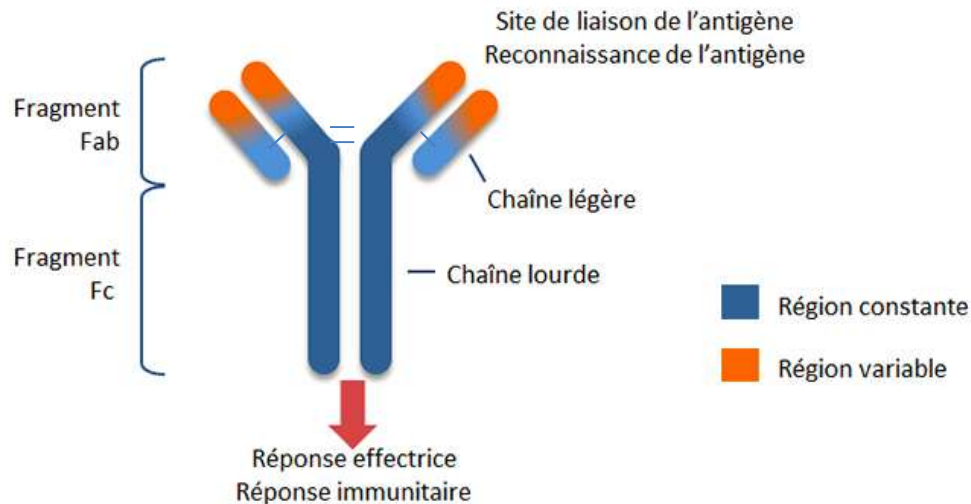
I. Introduction: l'immunologie



Antécors=sonde immunologique capable de reconnaître un **antigène** (élément du non-soi) et d'induire une réaction immunitaire.

Antigène: toute substance capable de se lier spécifiquement à un antécors.

Structure d'un antécors



II. Antigènes recherchés en œnologie(Ag « œnologiques »)

Substance **antigénique** susceptible d'être présent dans les vins et moûts et pouvant entraîner chez l'homme une réaction immunologique exagérée (allergie), une intolérance ou une intoxication (ex: effet d'une toxine bactérienne).

Vin= produit alimentaire dans lequel les

Ag « œnologiques » proviennent de 2 processus:

a) Le collage

**b) Les contaminants
(d'origine microbienne)**

a) Le collage

Ce que l'on peut doser immunologiquement (c.à.d avec un Anticorps)

- **Gélatines** (collagène animal)
- **Ovalbumine** (albumine de l'œuf)
- **Lysozyme** (hydrolase du blanc de l'oeuf)
- **Les alginates** (issus d'algues)
- **Ichtyocolle** (gélatine de poisson)
- **Caséine** (lait)
- **Matières protéiques d'origine végétale** blé, pois, lupin (gliadine, protéine de blé)
- **Extraits protéiques lévuriens** (EPL)

II. Antigènes « œnologiques »

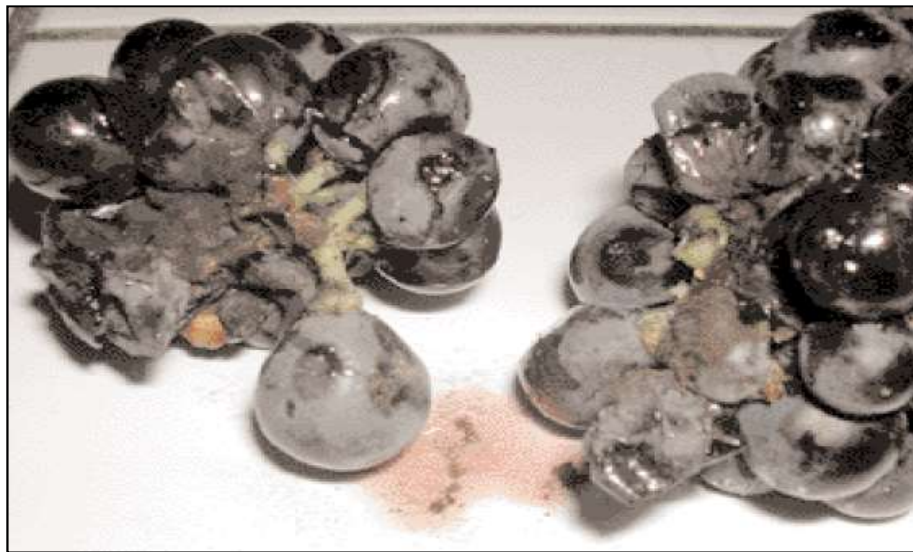
b) Les contaminants d'origine microbienne

✓ Mycotoxines:

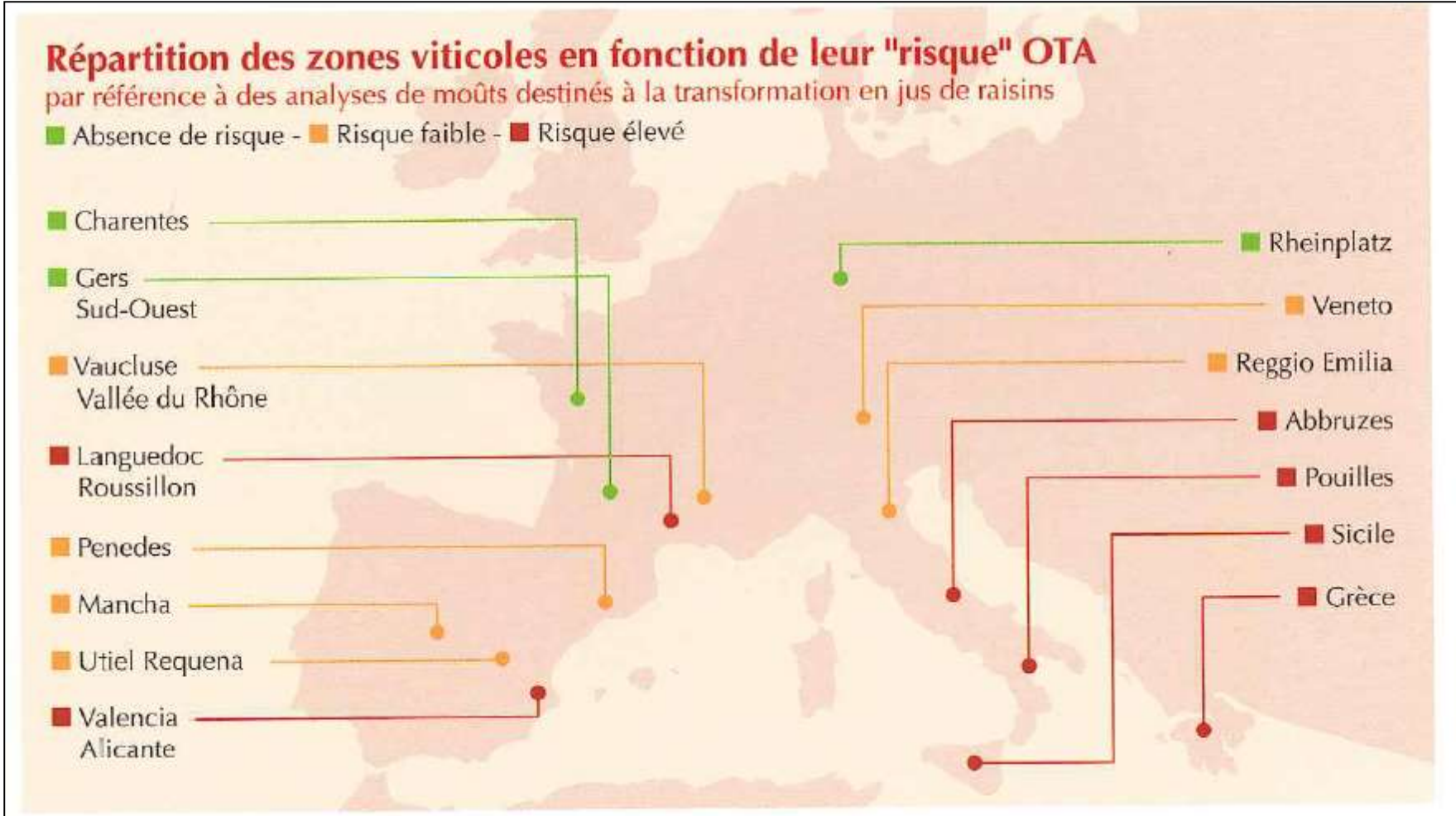
Métabolites issus de champignons filamenteux contaminant des produits alimentaires (céréales, vins, bières).

Aflatoxines B1,B2, G1,G2 (*Aspergillus*), **Ochratoxine A (OTA)** (*penicillium* et *aspergillus ochraceus, carbonarius*).

-Majorité des vins français <1µg/L OTA. (Limite réglementation européenne= 2 µg/L)



Aspergillus carbonarius



Majorité des vins français : <math><1\mu\text{g/L}</math> d'OTA

b) Les contaminants d'origine microbienne

✓ Les amines biogènes:

Histamine : jusqu'à 15 mg/L

Tyramine : jusqu'à 20 mg/L

Sérotonine : jusqu'à 20 mg/L ;

Ethanolamine : jusqu'à 20 mg/L ;

Ethylamine : jusqu'à 20 mg/L ;

Méthylamine : jusqu'à 10 mg/L ;

Isopropylamine : jusqu'à 20 mg/L ;

Propylamine : normalement absente ;

Isobutylamine : jusqu'à 15 mg/L ;

Butylamine : jusqu'à 10 mg/L ;

Tryptamine : jusqu'à 20 mg/L ;

Phenylethylamine : jusqu'à 20 mg/L ;

Putrescine ou 1,4-diaminobutane : jusqu'à 40 mg/L ;

2-Méthylbutylamine : jusqu'à 20 mg/L ;

3-Méthylbutylamine : jusqu'à 20 mg/L ;

Cadavérine ou 1,5-diaminopentane : jusqu'à 20 mg/L ;

Hexylamine : jusqu'à 10 mg/L.

-Synthèse par bactéries

-Faible qté , bière, cidre, liqueurs

← -Teneur dépend de l'activité décarboxylase des bactéries **lactiques** (ex *Pediococcus damnosus*)

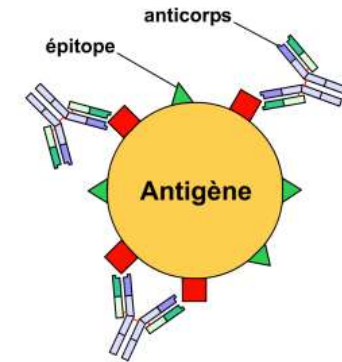
-Maux de tête, réactions de type allergique

Dosage de ces produits → anticorps

-Garantir Q sanitaire, respect réglementation (+/-)

II. Antigènes recherchés en œnologie(Ag « œnologiques »)

c) Anticorps « sonde de dépistage/dosage »



Dualité fonctionnelle de l'Ac

Capture de l'Ag

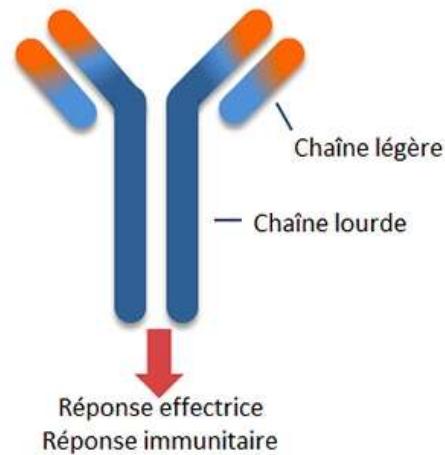


Fragment Fab

Permet visualisation
du complexe Ag/Ac



Fragment Fc



III. Techniques ELISA = "microméthodes"

Dosage de résidus protéiques du collage et d'amines biogènes
ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

1. ELISA sandwich direct

a) Principe



- Réalisé sur **support solide** ,
plaque de microtitration **96** ou **384** puits.
Immobilisation de l'Ag ou de l'AC

- **Grande sensibilité de détection**(ex:pg/mL)

Technique immunométrique

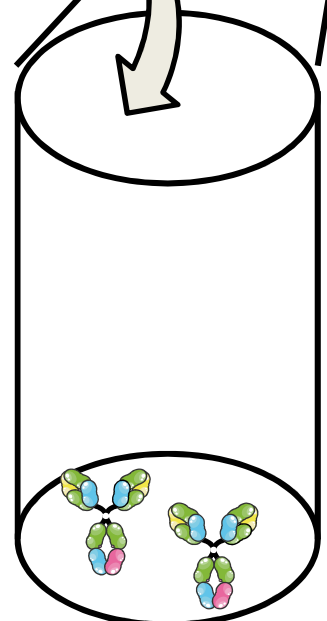
- Réactif en excès/ élément à doser
- Croissance du signal en fonction de la quantité de complexes Ag-Ac
- Différents formats (directe, indirecte, sandwich, de compétition...)

b) Méthode de l'ELISA sandwich direct

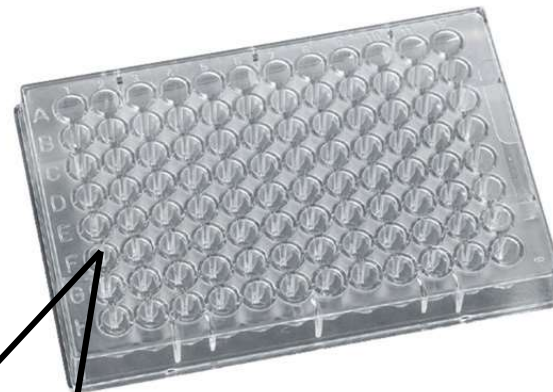
Réalisé par le fournisseur

1) Coating (revêtement)

Ac de capture



puit de plaque de microtitration



Microplaque de 96 puits

➤ **Coating/Revêtement = étape d'adsorption des molécules sur la microplaque**

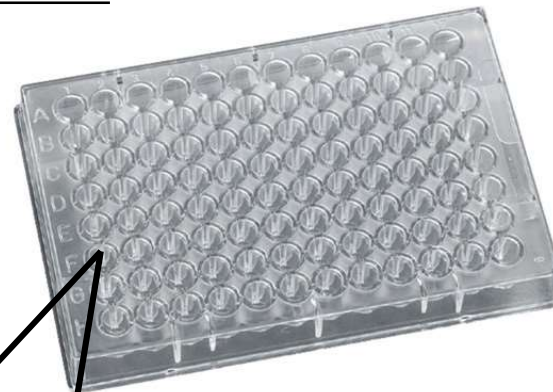
Phénomène d'adsorption passive directe.

- *L. hydrophobes et ioniques* entre plastique et résidus non polaires ou ioniques des protéines.

- *En milieu alcalin*: tampon PBS (pH 7,4) ou carbonate-bicarbonate (pH 9,6) (ionisation des molécules)

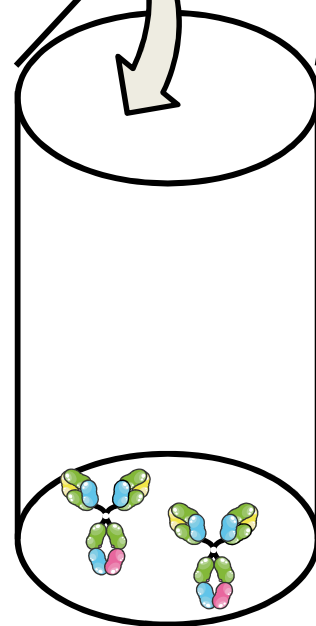
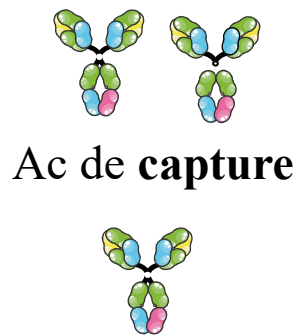
b) Méthode

Réalisé par le fournisseur



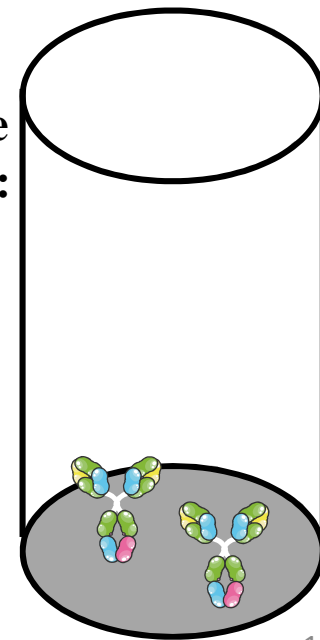
Microplaque de 96 puits

1) Coating (revêtement)

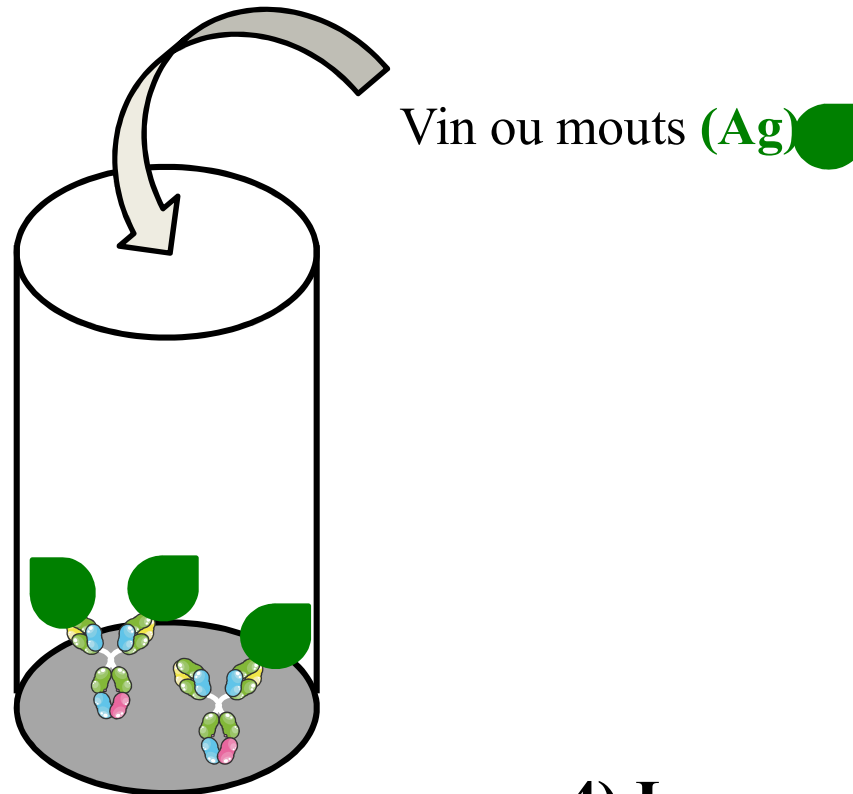


puits de plaque de microtitration

**2) Saturation
par une protéine inerte
(protéine de lait, BSA) :**



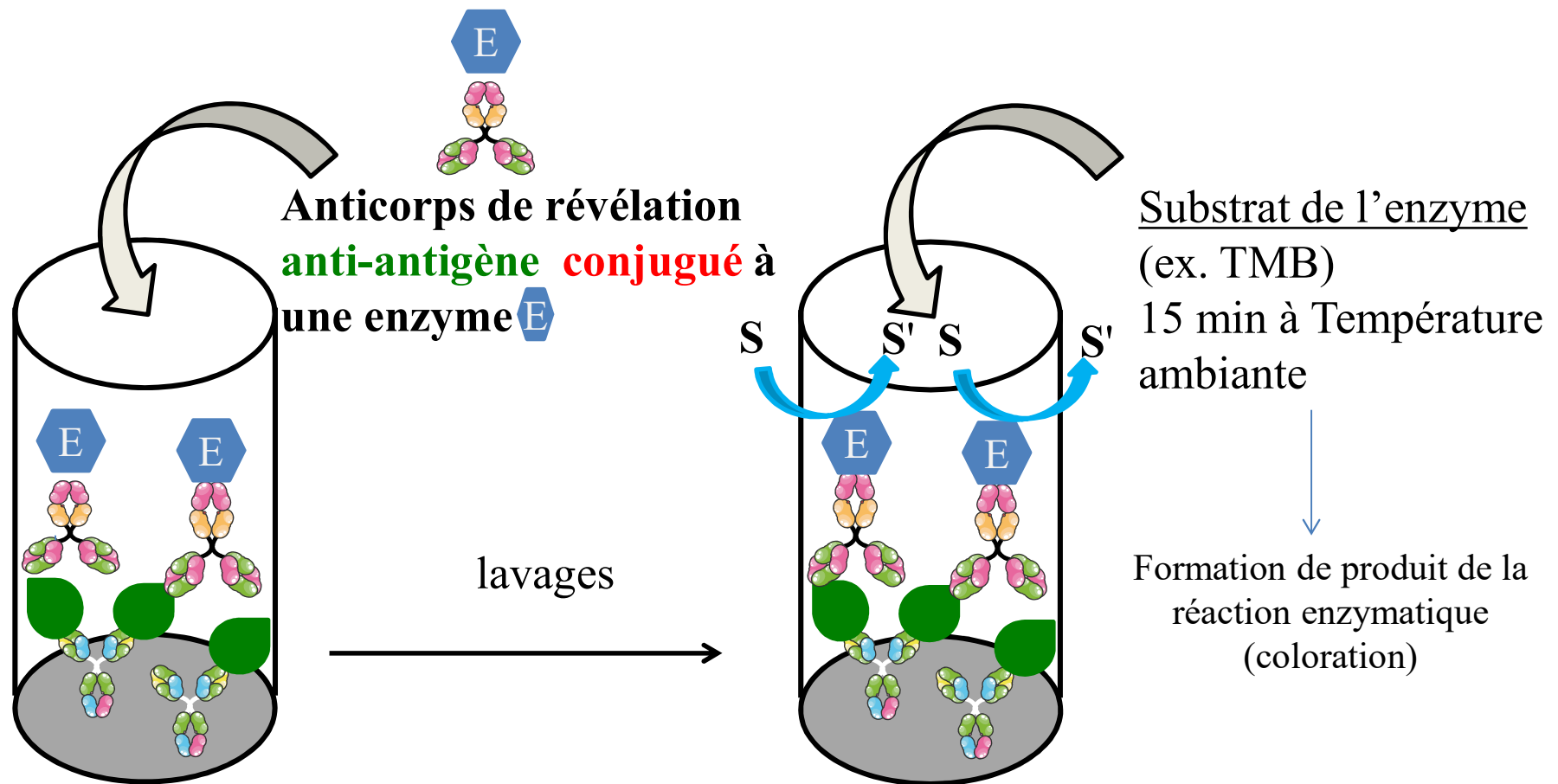
3) Incubation de l'Ag contenu dans le vin ou moût



4) Lavage
Élimination des Ags non fixés

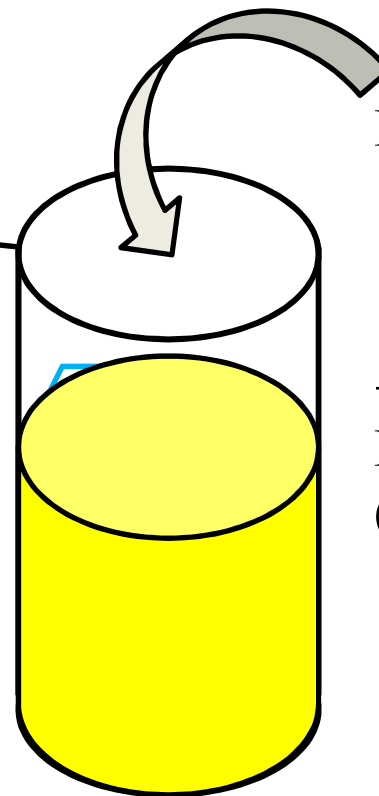
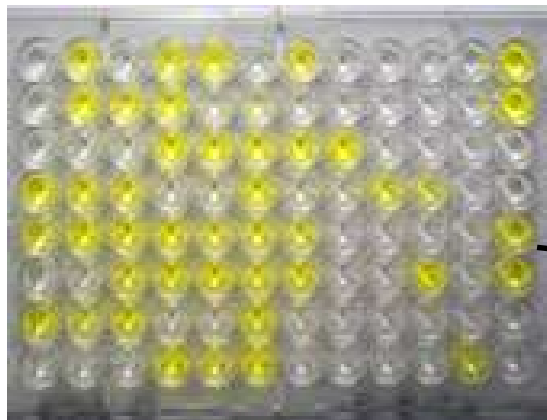
Réalisé par l'expérimentateur

4) Révélation «enzymatique» directe



Réalisé par l'expérimentateur

5) Révélation



H_2SO_4 pour arrêter la réaction

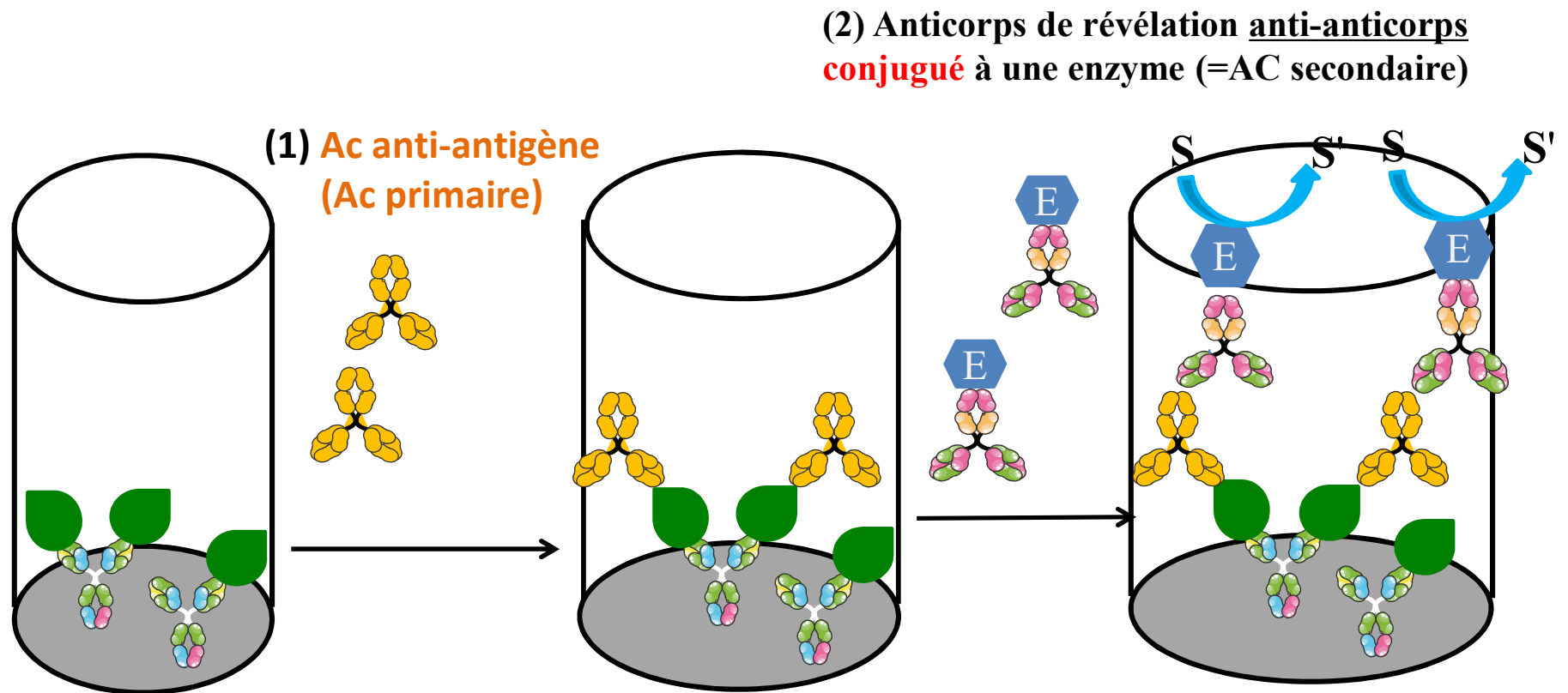
→ **coloration jaune**

Dosage par spectrophotométrie
(≈ 450 nm)

Marqueurs enzymatiques les plus courants

	ENZYME	ORIGINE	SUBSTRAT	
+++	Peroxydase (1)	Raifort (radis noir)	Diaminobenzidine, H ₂ O ₂ Tétraaminobenzidine, H ₂ O ₂	DAB TMB
	Phosphatase alcaline (2)	<i>E. coli</i> ou muqueuse intestinale de veau	4-nitro-phényl-phosphate	
	β-D galactosidase (3)	<i>E. coli</i>	2-nitro-phényl-β-D-galactopyrannoside (ONPG)	
	Glucose oxydase	<i>Aspergillus niger</i>	Chromogène + H ₂ O ₂	
	Glucose 6 phosphate déshydrogénase	<i>Leuconostoc mesenteroïdes</i>	Glucose 6 phosphate + NAD ⁺	

2. ELISA sandwich indirect



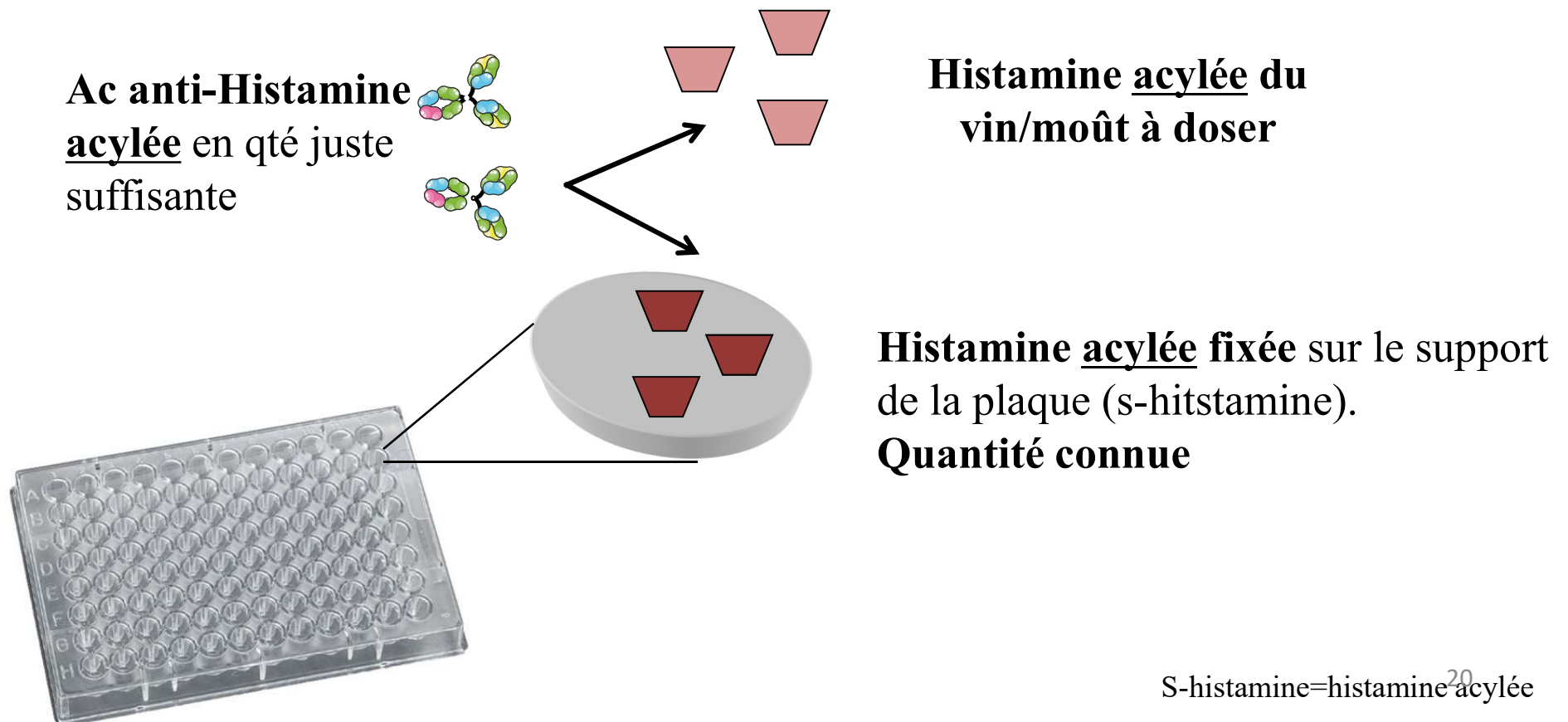
c) Intérêt

- Simple et rapide
- Gd nbre d'échantillons à la fois (microplaque 96 puits)
- Application à tous les produits d'origine animale et végétale

2. ELISA de compétition

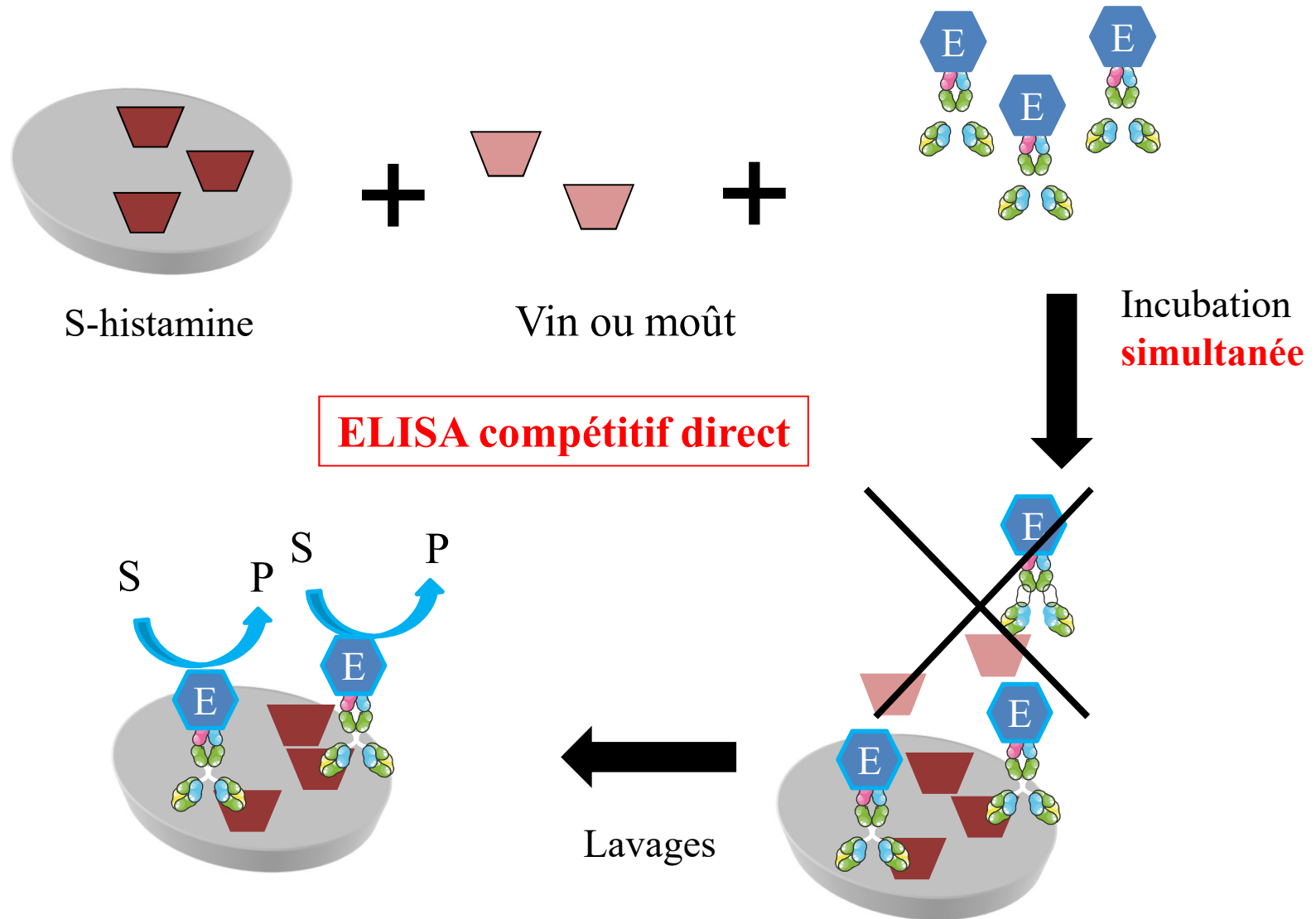
a) Principe

Ex: Histamine ELISA kit (Techna)

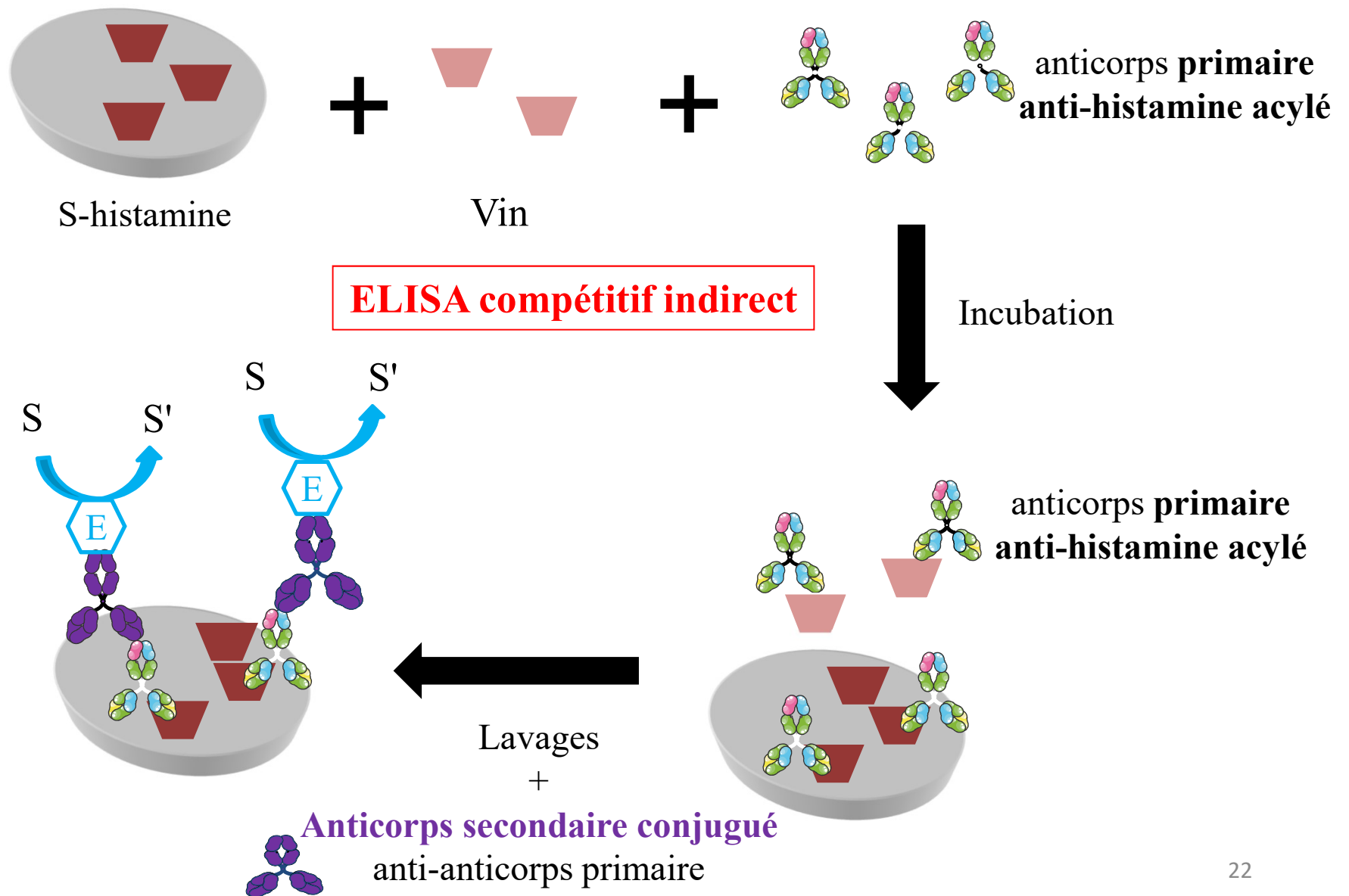


2. ELISA compétition

b) Méthode



2. ELISA compétition



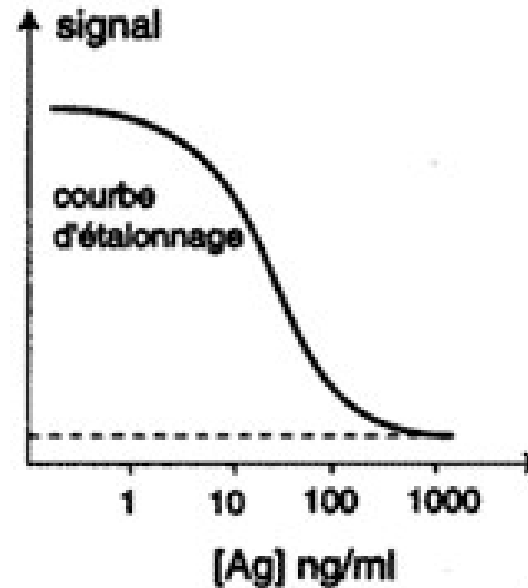
2. ELISA compétition

c) Interprétation et intérêt

Dosage des échantillons

Courbe étalon (solutions étalons)

Contrôles + et –



Pas de réglementation claire sur la teneur limite mais recommandation

Cahier des charges Exportation, grande distribution...

Belgique : 5-6 mg/L

Pays Bas : 3 mg/L

Allemagne : 2 mg/L

France: 8mg/L

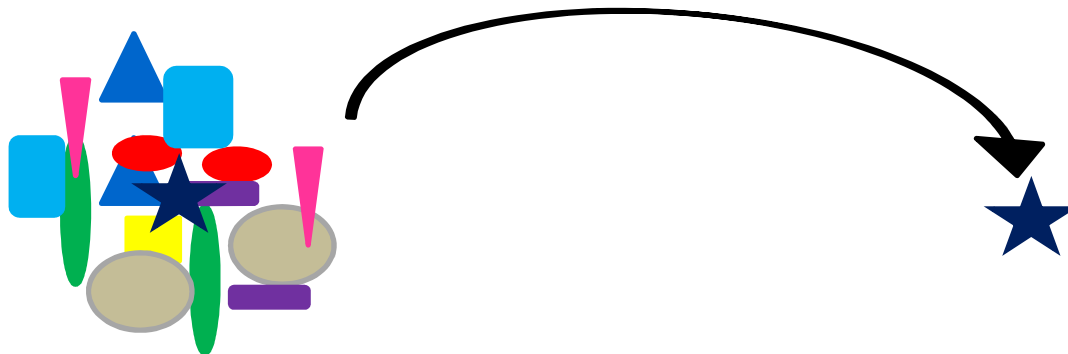
IV. SDS-PAGE-Immunoblot (ou Western blot)

➔ Analyse des matières protéiques d'origine végétale ou microbienne (ex:gluten du blé, protéine de pois, de lupin, levure ...) restantes **après soutirage**

Résolution Oenologique 24/2004

Complète l'annexe A du recueil des méthodes d'analyse et d'appréciation des vins et moûts

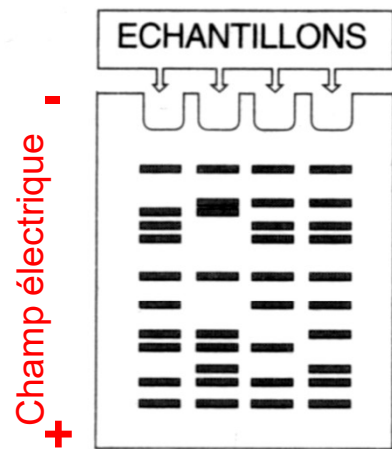
a) Principe



Identification d'une protéine à partir d'un mélange complexe de protéines

a) Principe

Les différentes étapes du Western blot



séparation
des protéines
en fonction de leur
poids moléculaire

↔

**Electrophorèse sur
gel polyacrylamide
(SDS-PAGE)**

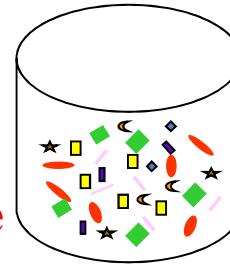
b) Méthode

1) Concentration des protéines

Vin (ou moûts)



+ Acide trichloracétique



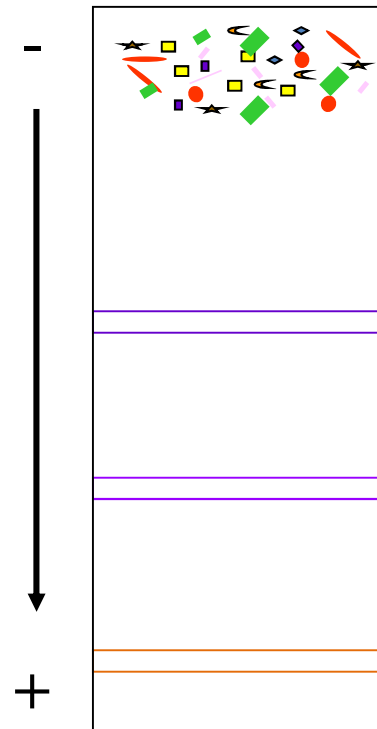
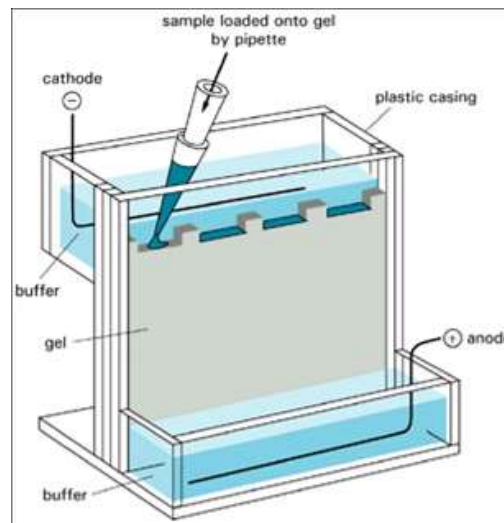
Précipité de protéines
après centrifugation

2) Migration sur gel polyacrylamide+SDS (SDS-PAGE) SDS-PAGE

Précipité+
hydroxyde de Na et SDS
10 min à 100° C



Dénaturation

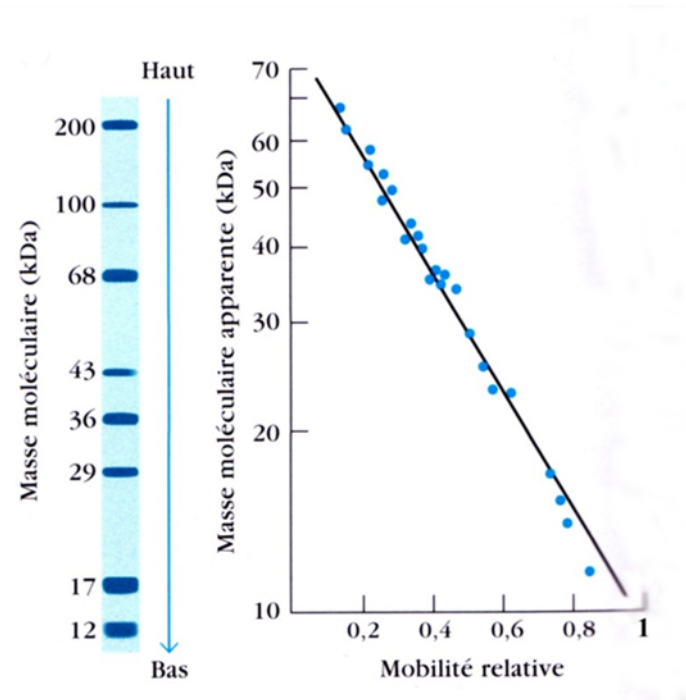


**Migration
en gel de
polyacrylamide
+
SDS**

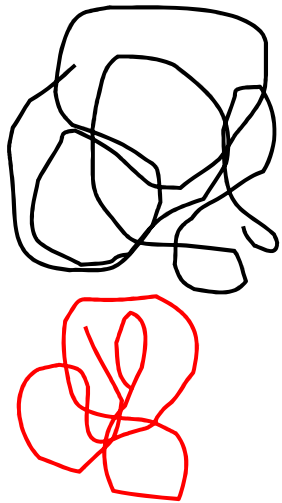
SDS=Sodium Dodécyl Sulfate
PAGE=Polyacrylamide Gel Electrophoresis

3. Migration

- tampon de migration (pH 8,8)
- Dépôt échantillons
- Log PM/ distance



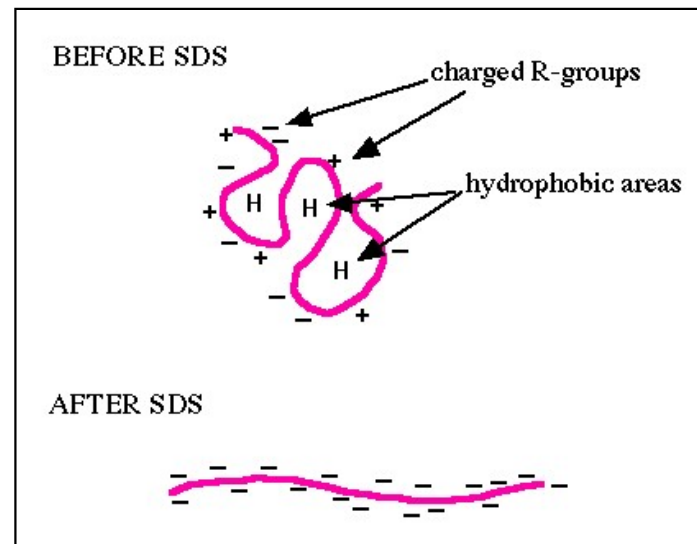
Electrophorèse en condition dénaturante (SDS-PAGE)



Protéines caractérisées par
-Charge intrinsèque
-Poids
-Structure I, II, III, IV

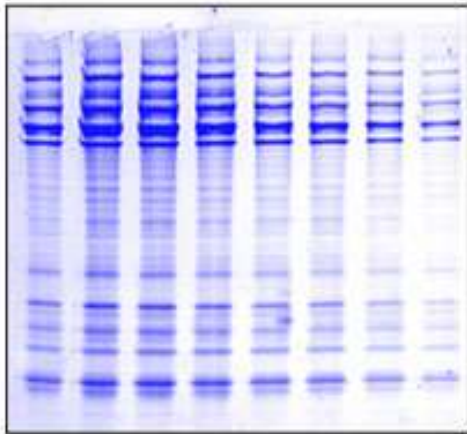
Objectif: Uniformiser la charge et la structure des protéines,

**Ajout de SDS
(Sodium Dodecyl
Sulfate) dans la
préparation du gel**

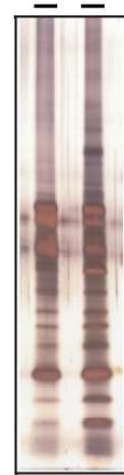


1^{ère} méthode de détection :
Coloration des protéines totales par coloration de gels

29



Bleu de Coomassie
(limite de détection **100 ng/bande**)



Nitrate d'argent
0,1ng

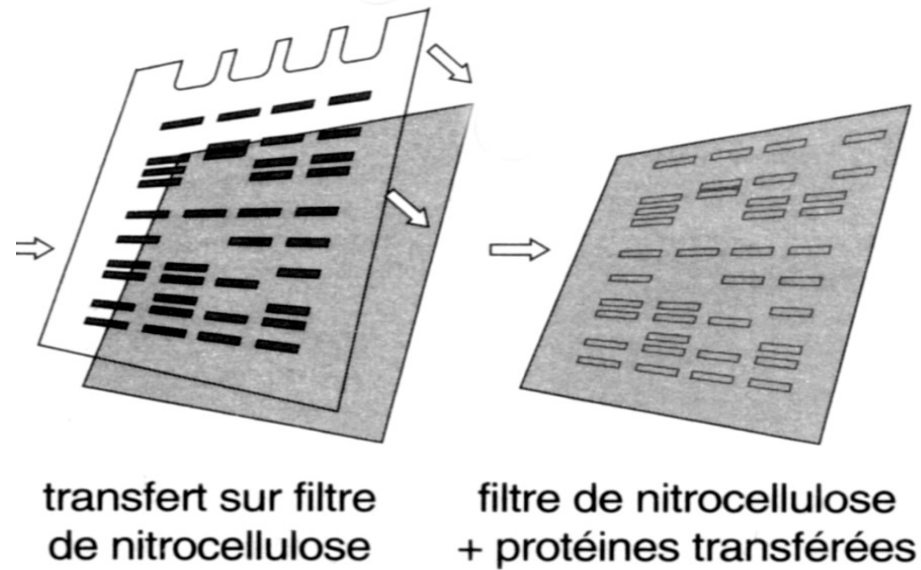


Visualisation de la **totalité** des protéines



Impossible de distinguer une protéine d'intérêt

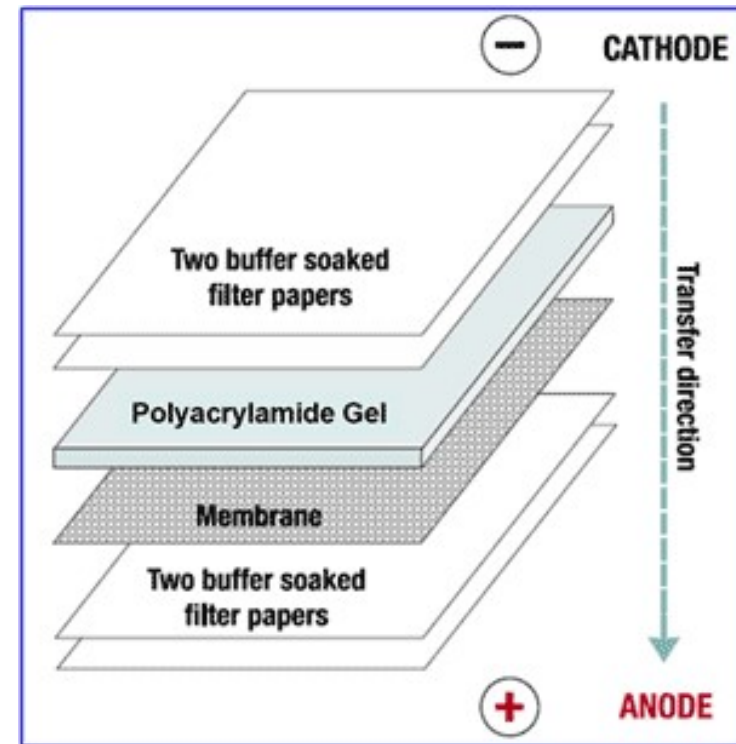
2^{ème} méthode de détection :
Transfert sur membrane (Immuno blot)



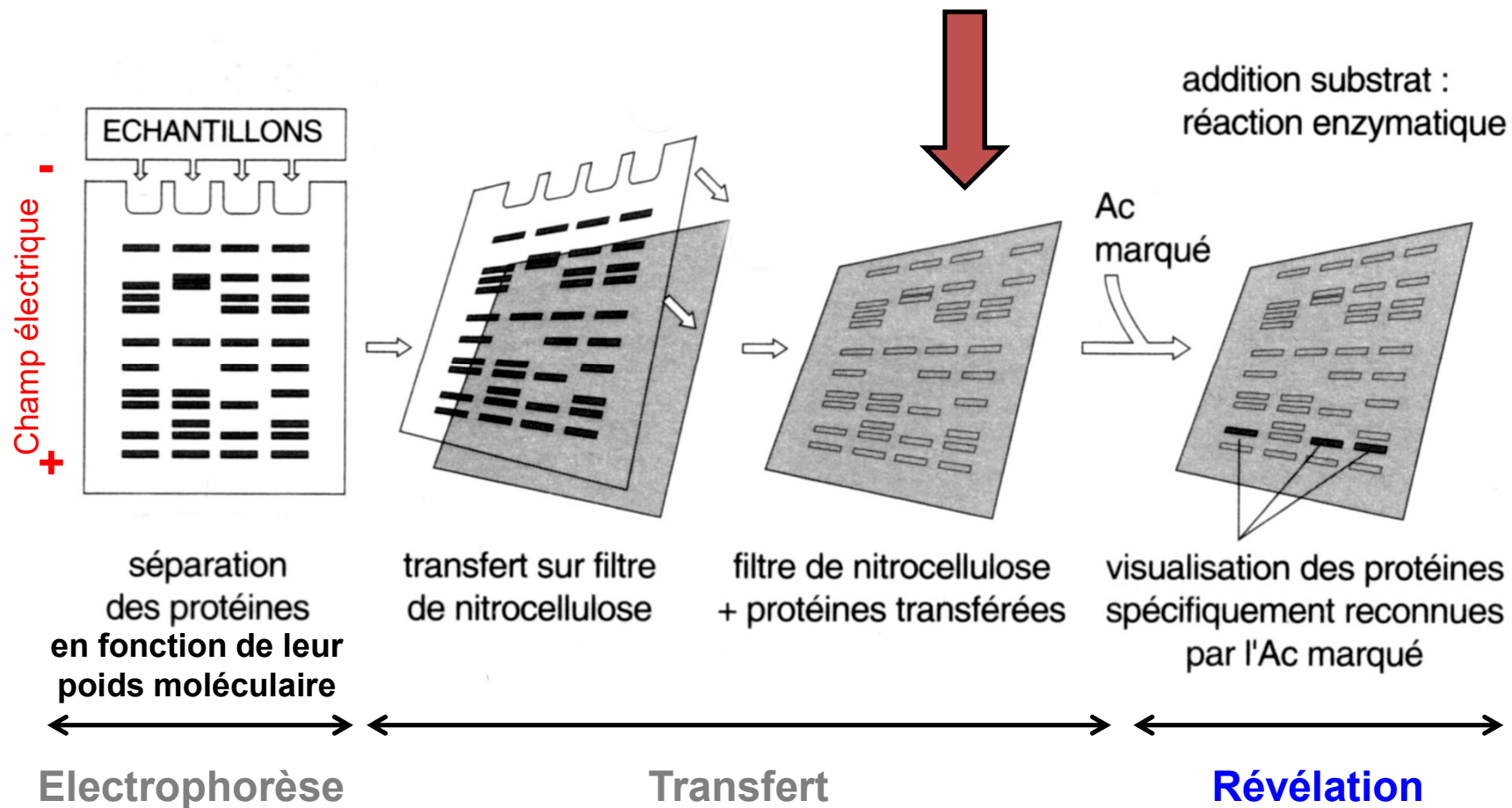
**Transfert
sous champ électrique**

**Superposition Gel +
Feuille de nitrocellulose ou
de PVDF**

**Nitrocellulose ou
PVDF (polyfluorure
de vinylidène)**



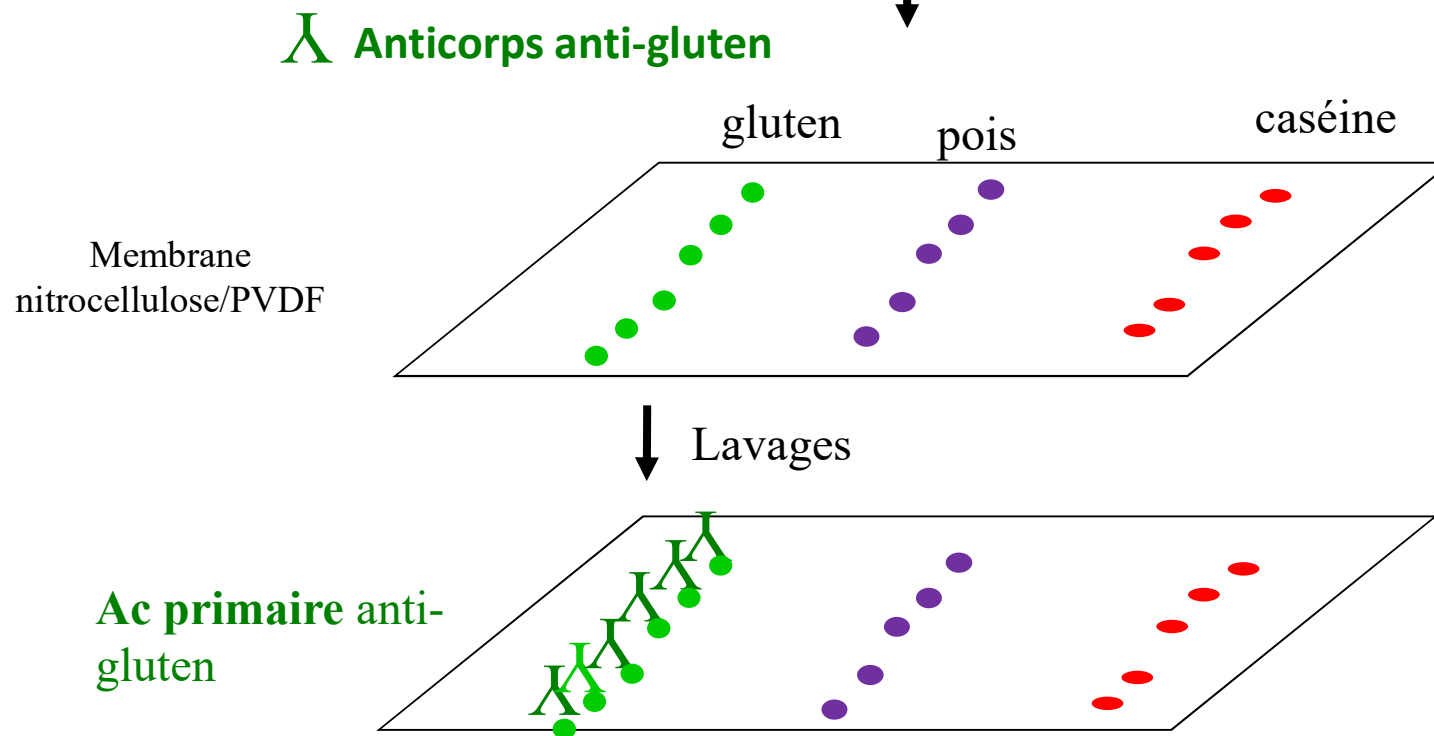
"Sandwich"



2^{ème} méthode de détection : **Transfert sur mb (Immuno blot)**

- Saturation de la mb avec une protéine inerte (albumine, prot. de lait) pour assurer la spécificité de la réaction Ag-Ac
- **Ac primaire anti-protéine X** (pois, gluten, caséine ...)

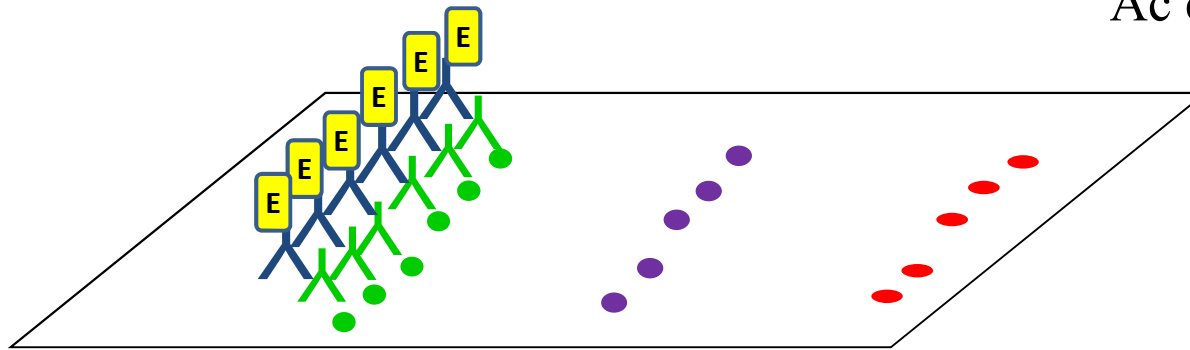
Ex: recherche du gluten



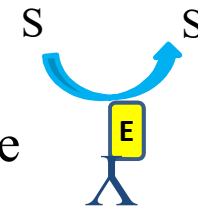
2^{ème} méthode de détection :
Transfert sur mb (Immuno blot)



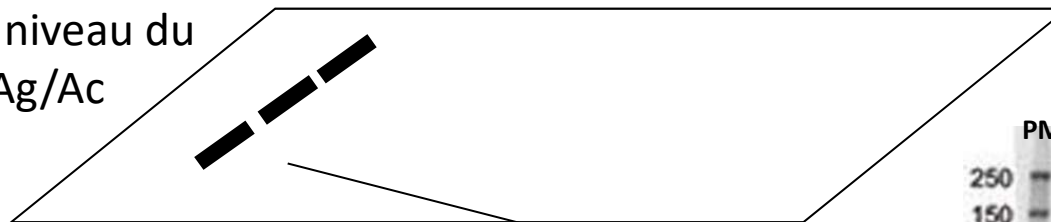
Révélation **indirecte** avec anticorps secondaire anti-Ac couplé à une enzyme (ex Peroxydase)



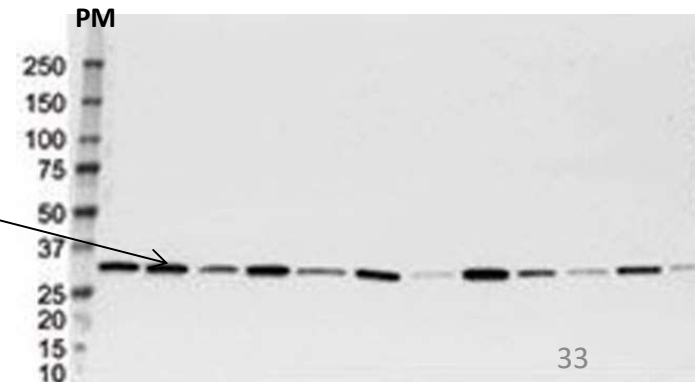
Ajout Substrat de l'enzyme



Apparition de bandes au niveau du complexe Ag/Ac



Gluten



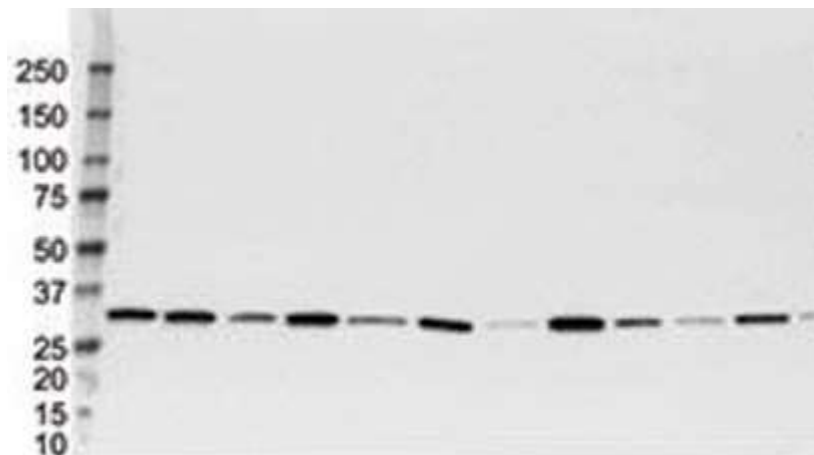
IV. Western blot

c) Intérêt

Très sensible

Technique de référence notamment pour les protéines d'origine végétale

Assez longue = réservée aux laboratoires d'analyse



V. Immunoaffinité

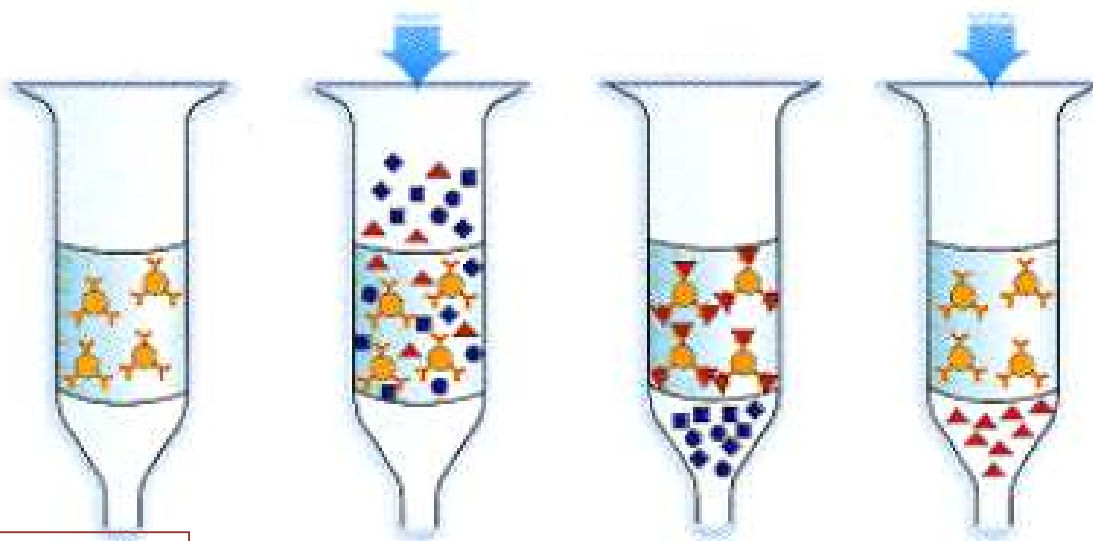
Résolution Oeno 16/2001: méthode référence de dosage

« Dosage par HPLC phase inverse de l'ochratoxine A après passage sur colonne d'immunoaffinité »

Vins/moûts + PEG + hydrogénocarbonate de Na

Filtration 10 ml vin + 10 ml sol de dilution
Lavage 5 ml sol de dilution puis 5ml d'eau
Elution 2 ml de méthanol

Phase solide couplée à un Anticorps anti-OTA



Normes
CEE → 2µg/L
Canada → 1µg/L

Evaporer l'éluat à sec à 50° C sous azote
Reprendre avec 250 µl de la phase mobile
HPLC et stocker à 4° C → analyse
HPLC

V. Test immunochromatographique sur bandelette

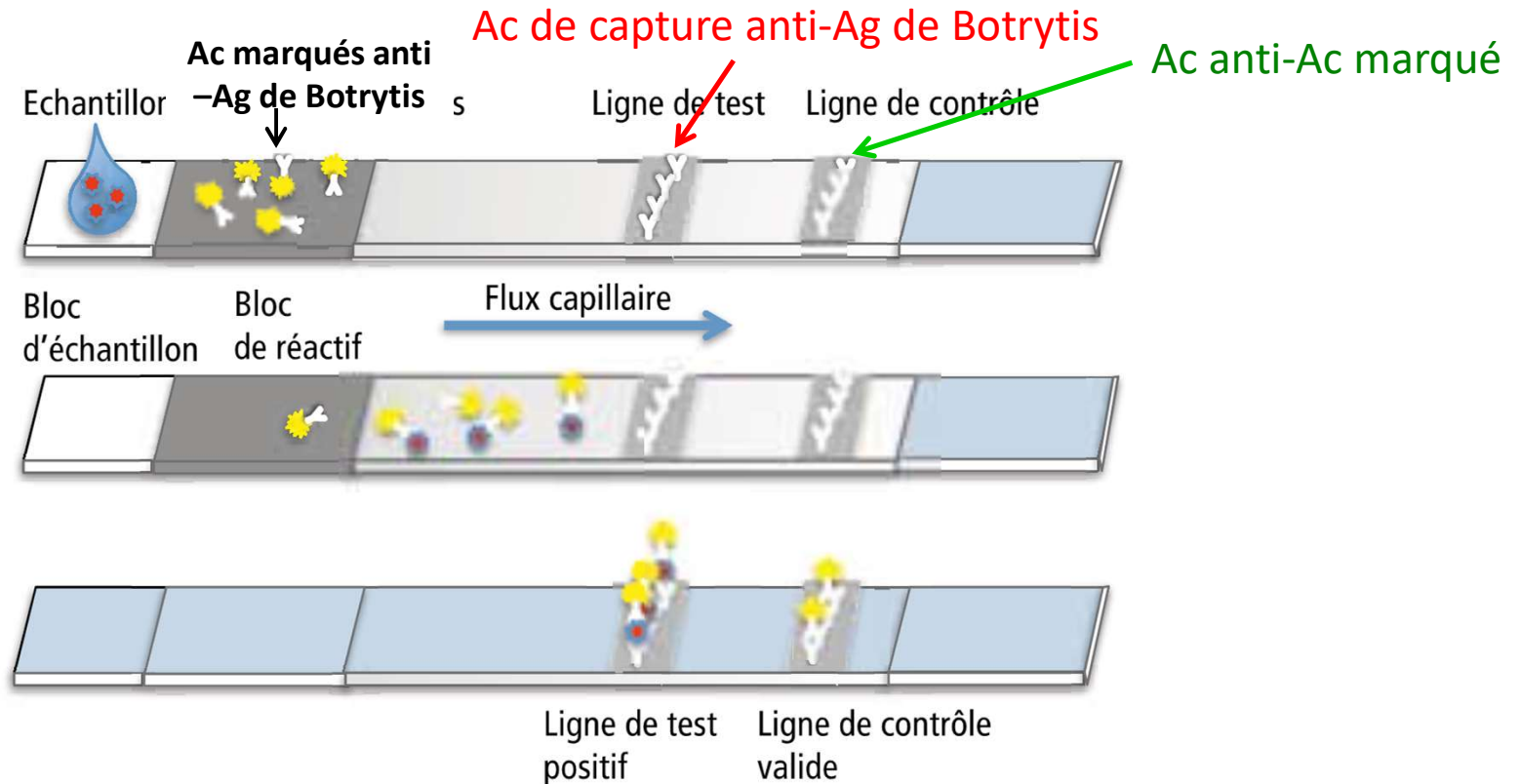


Figure 1 | Schéma de fonctionnement des tests immunologiques sur bandelette.

Ex. Kit de détection de pourriture grise de raisin par *Botrytis cinerea* (QuickStix kit)

Botrytis Cinerea