

UNIVERSITE DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE

U.F.R. DES SCIENCES EXACTES & NATURELLES

Laboratoire d'Oenologie et de Chimie Appliquée

THESE

Présentée par

Thierry DAMBROUCK

En vue de l'obtention du grade de Docteur d'Université

Spécialité : Biologie et Biochimie Appliquée

Option : Oenologie

Contribution à l'étude des protéines des moûts et des vins de

Champagne :

Détermination de leur origine

Etude d'une glycoprotéine majeure, l'invertase de raisin

Soutenue publiquement le 18 octobre 2004 devant la commission d'examen :

Rapporteurs : M. B. DONÈCHE Professeur – Faculté d'œnologie de Bordeaux II

M. M. MOUTOUNET Dir. Recherches – INRA de Montpellier

Examineurs : M. C. FLAHAUT Maître de Conférences, Lens

M. P. JEANDET Professeur, Reims, Directeur de thèse

M. R. MARCHAL Maître de Conférences, Reims, Co-Directeur de thèse

M. B. ROBILLARD Docteur, Chef de Projet Moët et Chandon, Epernay

M. J.-P. ZANETTA Dir. Recherches, CNRS Lille-1, Co-Directeur de thèse

UNIVERSITE DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE

U.F.R. DES SCIENCES EXACTES & NATURELLES

Laboratoire d'Oenologie et de Chimie Appliquée

THESE

présentée par

Thierry DAMBROUCK

En vue de l'obtention du grade de Docteur d'Université

Spécialité : Biologie et Biochimie Appliquée

Option : Oenologie

Contribution à l'étude des protéines des moûts et des vins de

Champagne :

Détermination de leur origine

Etude d'une glycoprotéine majeure, l'invertase de raisin

Soutenue publiquement le 18 octobre 2004 devant la commission d'examen :

Rapporteurs : M. B. DONÈCHE Professeur – Faculté d'œnologie de Bordeaux II

M. M. MOUTOUNET Dir. Recherches – INRA de Montpellier

Examineurs : M. C. FLAHAUT Maître de Conférences, Lens

M. P. JEANDET Professeur, Reims, Directeur de thèse

M. R. MARCHAL Maître de Conférences, Reims, Co-Directeur de thèse

M. B. ROBILLARD Docteur, Chef de Projet Moët et Chandon, Epernay

M. J.-P. ZANETTA Dir. Recherches, CNRS Lille-1, Co-Directeur de thèse

REMERCIEMENTS

Je tiens à exprimer ma reconnaissance à Monsieur le Professeur Bernard Donèche, de la Faculté d'œnologie de Bordeaux II, et Monsieur Michel Moutounet, Directeur de Recherches à l'INRA de Montpellier, pour avoir accepté la charge d'être Rapporteur de ce mémoire.

Je remercie Monsieur le Professeur Philippe Jeandet, Directeur du Laboratoire d'Oenologie pour son accueil, sa confiance, nos discussions constructives et les heures passées à l'élaboration de ce manuscrit, mais également de m'avoir permis d'obtenir un ATER afin de finaliser ce travail.

Mes remerciements s'adressent également à Monsieur Jean-Pierre Zanetta, Directeur de Recherches dans l'Unité CNRS 8576, pour m'avoir accueilli au sein de son équipe du C9 lors de mon DEA et de mes retours « aux sources » durant cette thèse, de m'avoir fait partager ses connaissances et d'être examinateur de ce travail de thèse.

Je tiens à remercier Monsieur Christophe Flahaut, Maître de Conférence de l'Université d'Artois Lens et ancien du C9, pour m'avoir consacré un peu de son temps et ceci malgré toutes ses obligations, pour ses conseils avisés et pour avoir accepté d'être examinateur de ce travail.

J'adresse mes remerciements à Monsieur Richard Marchal, Maître de Conférence au Laboratoire d'Oenologie, pour son aide et sa disponibilité.

Je remercie Monsieur Bertrand Robillard, Chef de Projets Moët & Chandon, pour sa disponibilité et pour avoir accepté d'être examinateur de ce travail de thèse.

Cette thèse labellisée Europol'Agro a pu bénéficier du soutien financier de la Région Champagne-Ardenne ainsi que de la Maison de Champagne Moët & Chandon, qui était également porteur industriel de ce projet. Ces institutions nous ont permis de réaliser ce travail, qu'elles en soient ici remerciées.

Sans oublier l'AROCU, association bienfaitrice de la recherche œnologique en Champagne et son président emblématique M. Colson.

Je profite de ces quelques lignes pour remercier « Dom » Lenoir, de la Maison Moët & Chandon, pour son aide dans le traitement des moûts et des vins.

Je remercie Alexandre Pons pour le temps et l'énergie qu'il a bien voulu me consacrer et ceci malgré son propre travail de thèse.

Je tiens également à remercier Hervé Lemaesquier, Maître de Conférence à l'UFR Sciences, pour son aide, pour son encadrement lors de mon ATER et pour m'avoir fait découvrir d'autres « mousses ».

Je tiens à adresser un gros merci aux autres membres du Laboratoire d'Oenologie. Merci à Laurence et Maryline pour votre aide et votre sourire. Merci à Gégé Hamalian pour tes histoires, ta disponibilité et tes talents de bricoleur. Merci également à Yann, Gérard, Cédric, et aux deux nouvelles, Clara et Magda, pour m'avoir supporté et aidé pour cette fin de thèse.

Sans oublier les « anciens », Laurent et Christelle, Isabelle tout particulièrement en ces moments difficiles, ainsi que M. Maujean, qui malgré nos courtes rencontres m'a toujours apporté une parole réconfortante.

Un merci aux adocamen et women pour leur barbecue, le Bioseb, ses « fondefrigos » et découvertes de vins en tout genre ; Boris « barbar » et le Vice.

Sans oublier les membres de la BH®, les footbisseurs (c'est promis j'achète du scotch !) le bébert, Johnny, à vous tous je lance un « wech ».

Merci à mes parents qui m'ont épaulé dans les premières étapes de ces études (trop) longues et pour leurs encouragements pour (enfin !) finaliser cette thèse.

Et, un énorme merci à Corinne et Emilie, pour leur soutien et pour tout ce qu'elles m'apportent et bien plus encore ...

ABBREVIATIONS

Abréviations

µg	microgramme
µL	microlitre
AGP	arabinogalactane protéine
Arg	arginine
Asn	asparagine
Asp	acide aspartique
BSA	bovine sérum albumine
Con A	concanavaline A
cv.	cultivar
Da	dalton
DEAE	diéthyl amino éthyl (échangeur anionique faible)
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
FA	fermentation alcoolique
FML	fermentation malolactique
FNR	fraction non retenue
FR	fraction retenue
Fuc	fucose
Gal	galactose
Glc	glucose
GlcNAc	N-acétylglucosamine
HRGP	glycoprotéines riches en hydroxyproline
LCA	<i>Lens culinaris</i> agglutinin (agglutinine de lentille)
LSA	levure sèche active
Lys	lysine
Man	mannose
ML	millilitre
Mg	milligramme
MM	millimolaire
pI	point isoélectrique
PM	poids moléculaire
Pro	proline

Abréviations

PTA-ELISA	plate trapping antigen ELISA
RE	réticulum endoplasmique
SDS-PAGE	sodium dodécyl sulfate-polyacrylamide gel électrophoresis
Ser	sérine
TBS et TBST	tampon Tris salin ert tampon Tris salin avec Tween-20
Tris	tris(hydroxyméthyl)aminométhane
Triton X-100 et Tween-20	étergents non ioniques
Thr	thréonine
v/v	volume volume
Xyl	xylose

SOMMAIRE

INTRODUCTION	1
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	3
I. LES PROTEINES DU VIN	7
II. LES GLYCOPROTEINES VEGETALES : GENERALITES	8
II.1. Introduction sur les N-glycannes d'origine végétale	9
II.2. Biosynthèse et maturation des N-glycoprotéines d'origine végétale	10
II.2.1. Structures des N-glycannes d'origine végétale	11
II.2.1.1. Les glycannes de type oligomannosidique	11
II.2.1.2. Les glycannes de type complexe	12
II.2.1.3. Les glycannes de type paucimannosidique	12
II.2.1.4. Les glycannes de type hybride	12
II.2.2. Hétérogénéité des N-glycannes des glycoprotéines végétales	13
II.2.3. Rôles de la glycosylation chez les glycoprotéines végétales	14
II.2.3.1. Rôle dans la conformation des glycoprotéines	14
II.2.3.2. Rôle dans la stabilité protéique	15
II.2.3.3. Rôle des glycannes dans l'adressage des glycoprotéines	15
II.2.3.4. Rôle dans la solubilité et la stabilité thermique des glycoprotéines	16
II.2.3.5. Rôle dans le développement de la plante	16
II.2.3.6. Rôle dans la signalisation moléculaire	16
II.3. Les O-glycoprotéines des plantes supérieures	17
II.3.1. Introduction	17
II.3.1.1. Les extensines	18
II.3.1.2. Les « Proline/Hydroxyproline-Rich Glycoproteins » (P/HRGPs)	19
II.3.1.3. Les lectines de Solanacées	20
II.3.1.4. Les Arabinogalactanes-Protéines (AGPs)	21
II.3.2. Synthèse des O-glycoprotéines des plantes supérieures	22

III. LES GLYCOPROTEINES LEVURIENNES	23
III.1. Introduction et généralités	23
III.2. Synthèse des N-glycannes levuriens	24
III.2.1. Synthèse du précurseur oligosaccharidique et transfert sur la protéine	24
III.2.2. Elongation de la chaîne oligosaccharidique	25
III.3. Les O-glycannes	28
III.3.1. Synthèse des O-glycannes	28
III.4. Rôle de la glycosylation chez <i>S. cerevisiae</i>	29
III.4.1. Les constituants structuraux	29
III.4.2. Les enzymes levuriennes	29
III.4.3. Flocculation et agglutination sexuelle	30
IV. LES GLYCOPROTEINES DES MOUTS ET DES VINS	31
IV.1. Généralités	31
IV.2. L'invertase	35
IV.2.1. Généralités sur les invertases végétales	35
IV.2.2. Invertases vacuolaires et extracellulaires – Invertases acides	37
IV.2.3. Organisation génomique et régulation	39
IV.2.4. Invertases cytoplasmiques - Invertases alcalines	40
IV.2.5. Rôles et fonctions de l'invertase	41
IV.3. L'invertase du raisin	42
IV.4. Invertases d'autres origines	49
MATERIELS ET METHODES	51
I. MATERIELS	51
I.1. Macromolécules du moût	51
I.2. Macromolécules du vin	51
I.3. Macromolécules levuriennes	52

Sommaire

I.4. Macromolécules bactériennes	52
I.5. Traitements de collage sur moût et sur vin	55
I.5.1. Traitements de collage sur moût	55
I.5.2. Traitements de collage sur vin	55
II. METHODES	58
II.1. Méthodes de dosage protéique	58
II.1.1. Méthode de Bradford modifiée (Marchal et al., 1997)	58
II.2. Dosages des protéines purifiées à l'acide bicinchoninique (BCA)	59
II.3. Méthodes de fractionnement des protéines par chromatographie liquide	59
II.3.1. Fractionnement par chromatographie d'échange d'anions	59
II.3.2. Fractionnement par chromatographie d'affinité sur lectines immobilisées	60
II.3.2.1. Chromatographie d'affinité sur Concanavaleine A (ConA)	60
II.3.2.2. Concentration et dessalage des solutions protéiques	60
II.4. Techniques électrophorétiques	60
II.4.1. Electrophorèses analytiques	60
II.4.1.1. Electrophorèse SDS-PAGE	61
II.4.1.2. Electrotransfert sur filtre de nitrocellulose	62
II.4.2. Electrophorèse préparative SDS-PAGE	62
II.5. Tests d'activité enzymatique	63
II.5.1. Contrôle de l'activité enzymatique en gel	63
II.5.2. Dosage de l'activité enzymatique β fructofuranosidase en solution	63
II.6. Production d'anticorps polyclonaux	64
II.6.1. Purification des anticorps polyclonaux dirigés contre l'invertase de raisin	64
II.7. Réactivité et révélation des protéines transférées sur membrane de nitrocellulose	65
II.8. Détection de l'invertase de raisin dans le vin et suivi au cours de la vinification	66
II.8.1. Protocole standard du PTA-ELISA	66

II.9. Détermination de la structure glycanique de l'invertase	67
II.9.1. Digestions protéasiques en gel de l'invertase	67
II.9.2. Extraction des peptides	68
II.9.3. Digestion des fragments glycopeptidiques par la PNGase A	69
II.9.4. Purification des peptides et des glycopeptides	69
II.9.5. Extraction et purification des glycannes libérés par la PNGase A	70
II.9.6. Analyse en spectrométrie de masse	70
II.10. Analyse des propriétés moussantes des vins (le Mosalux)	71

RESULTATS ET DISCUSSION

PREMIERE PARTIE : DETERMINATION DE L'ORIGINE DES PROTEINES DU VIN

I. INTRODUCTION	73
II. DETERMINATION DE L'ORIGINE DES PROTEINES	75
II.1. Détermination de l'origine des protéines par utilisation de techniques électrophorétiques classiques	75
II.2. Test de spécificité des lots d'anticorps polyclonaux	78
II.3. Immunorévélation des protéines du moût dans le vin	80
II.3.1. Immunorévélation des protéines totales d'origine végétale	80
II.3.2. Fractionnement des protéines du vin sur Con A	81
II.4. Immunodétection des protéines bactériennes solubles dans le vin	82
II.5. Immunodétection des protéines levuriennes solubles dans le vin	84
III. CONCLUSION	87

DEUXIEME PARTIE : STRUCTURE GLYCANNIQUE DE L'INVERTASE DE RAISIN

I. INTRODUCTION	88
-----------------	----

II. PRE-PURIFICATION DE L'INVERTASE	89
II.1. Fractionnement par chromatographie liquide d'échange d'ions	89
II.2. Chromatographie d'affinité sur Concanavaleine A	90
III. STRUCTURE GLYCANNIQUE DE L'INVERTASE	93
III.1. Activité en gel de l'invertase de raisin	93
III.2. Digestion trypsique en gel	94
III.3. Détermination des structures glycaniques de l'invertase	101
III.4. Utilisation d'autres digestions en gel	106
III.4.1. Digestion par la chymotrypsine	106
III.4.1.1. Libération et analyse des glycanes de l'invertase	108
III.4.1.2. Analyse des peptides après déglycosylation	109
III.4.2. Digestion par l'Endoprotéinase Glu-C (V8)	110
III.4.2.1. Analyse des glycanes libérés après digestion par la Glu-C (V8)	110
IV. CONCLUSION	113
TROISIEME PARTIE : L'INVERTASE DANS LE VIN	
I. INTRODUCTION	115
II. PURIFICATION DE L'INVERTASE DE RAISIN D'UN MOUT DE CEPAGE CHARDONNAY	118
III. PRODUCTION ET PURIFICATION D'ANTICORPS SPECIFIQUES DE L'INVERTASE DE RAISIN	120
III.1. Mise au point du test PTA-ELISA anti-Invertase	121
III.1.1. Détermination des dilutions optimales	121
III.1.2. Réalisation de la courbe de calibration	123
III.1.3. Influence de la présence d'alcool dans les échantillons	124
III.1.4. Quantification de l'invertase dans les échantillons	125

IV. INFLUENCE DE TRAITEMENTS DE COLLAGE	125
IV.1. Mise en place des traitements de collage	126
IV.1.1. Traitements de collage effectués sur moût	126
IV.1.2. Traitements de collage sur vin	127
IV.1.2.1. Effets des traitements de collage sur le pool protéique global	127
IV.1.2.2. Effets des traitements de collage sur l'invertase	129
IV.1.2.3. Influence des traitements de collage des vins sur les propriétés moussantes	131
V. CONCLUSION	135
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	137
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	141
ARTICLES ET COMMUNICATIONS	172

INTRODUCTION

Le champagne est un vin mondialement connu et reconnu. Il doit cette reconnaissance, en grande partie, à son effervescence et à ses propriétés moussantes. Ainsi, à nos yeux, un champagne semble de qualité si, lors de son versement, la chute de sa mousse est lente, si son effervescence est régulière et durable, assurant ainsi une collerette de bulles fines et persistantes.

Afin de répondre à ces soucis de qualité, il est rapidement apparu qu'il était important de mieux comprendre les mécanismes physico-chimiques impliqués dans ces phénomènes.

L'étude des propriétés moussantes des vins de champagne et, par delà, l'étude des composés qualifiés de « pro-mousse » impliqués dans ces phénomènes, est une thématique centrale du Laboratoire d'œnologie et de chimie appliquée de l'UFR Sciences de Reims. Divers travaux dédiés à l'étude de la mousse ont montré, notamment, l'importance du pool protéique dans les propriétés moussantes des vins de Champagne. Ces recherches ont été réalisées depuis 1987 en collaboration avec le laboratoire de recherche du Champagne Moët et Chandon, le Comité Interprofessionnel des Vins de Champagne (C.I.V.C.), la Station Oenotechnique de Champagne ainsi que l'Unité de Physico-Chimie et Biotechnologie des Polymères de l'INRA.

Trois thèses ont déjà été soutenues sur ce sujet (Brissonnet, 1992 ; Marchal, 1995 et Berthier, 1999). Lors de la première thèse, Brissonnet (1992) démontre l'implication des protéines dans les propriétés moussantes et, ceci, même à de faibles concentrations. De plus, cet auteur montre que la teneur en protéines d'un vin de mousse (c'est à dire obtenu en recueillant la mousse produite par un vin soumis à une effervescence continue) est supérieure à celle du vin de base dont la mousse est issue. Marchal (1995) démontre lui la présence de glycoprotéines dans les vins de Champagne. Des travaux issus de l'industrie brassicole (Roberts, 1975, 1977) ont démontré que les glycoprotéines sont plus à même de stabiliser une mousse que des protéines non glycosylées. Ainsi, les glycoprotéines apparaissent comme de bons composés « pro-mousse » du fait de la dualité de leur partie glycanique hydrophile associée à la partie hydrophobe de leur cœur protéique, ce qui leur confère des propriétés tensioactives intéressantes pour la stabilisation de la mousse. L'étude des glycoprotéines des vins de Champagne est donc apparue pour cela très opportune. Berthier (1999) isole du moût

Introduction

et du vin, deux glycoprotéines, l'une d'origine végétale et l'autre d'origine levurienne, ces deux protéines ayant une activité lectinique.

Une autre approche de la physico-chimie d'un vin de Champagne, réalisée au laboratoire d'œnologie et de chimie appliquée, concerne l'étude de l'effervescence du champagne. Liger-Belair et al. (2000) ont montré, qu'au cours de son ascension vers la surface du liquide, une bulle de champagne « couvre » son interface de molécules tensioactives présentes dans le vin. L'adsorption de molécules sur la surface de la bulle va entraîner un ralentissement de sa vitesse ascensionnelle et contribue également à former une « peau » autour de la bulle, prolongeant ainsi sa durée de vie lorsque la bulle se retrouve à la surface du vin, formant le cordon de mousse ou collerette en périphérie du verre. Liger-Belair et al. (2000) suggèrent que les composés de nature glycoprotéique pourraient largement être impliqués dans ces phénomènes.

Les moûts et les vins sont des milieux biologiques extrêmement complexes contenant des macromolécules diverses et variées (polyphénols, polysaccharides, protéines...). Les protéines, même si elles jouent un rôle primordial dans les vins (en participant notamment à la casse protéique, aux précipitations bi-tartrique), n'y sont présentes qu'en de faibles quantités. L'objet du présent travail est donc d'apporter une contribution à la connaissance du pool protéique du vin. Dans une première partie, les différentes origines (végétale, levurienne ou bactérienne) des protéines d'un vin seront déterminées par l'utilisation d'une technique immunospécifique.

Dans une deuxième partie, nous étudierons plus spécifiquement une glycoprotéine majeure du raisin et du vin, l'invertase de raisin, notamment sa caractérisation au niveau structural et, en particulier, la détermination de la nature et la structure des glycannes qu'elle comporte. Dans une troisième partie, nous apporterons également une contribution à l'étude de l'impact des traitements œnologiques des vins sur leurs propriétés moussantes, sur leurs teneurs en protéines et, plus spécifiquement, sur l'invertase de raisin.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Le processus de vinification selon la méthode champenoise est constitué de plusieurs étapes, résumées dans les figures 1 & 2. Chacune de ces étapes peut modifier à elle seule le contenu macromoléculaire et, en particulier, le pool protéique du produit final, le Champagne. Ce vin est dans la majorité des cas un vin d'assemblage qui peut être réalisé à partir de trois cépages différents : le Chardonnay, le Pinot noir et le Pinot meunier. L'apport protéique sera donc différent d'un cépage à l'autre, mais également différent pour un même cépage en fonction de facteurs pédoclimatiques liés à la localisation géographique, au sein des terroirs de l'appellation Champagne, au millésime, à la maturation du raisin mais aussi en fonction des pratiques culturales.

A la vendange, les raisins sont récoltés manuellement puis pressurés dans des conditions douces avec des pressions de 1 bar pour la cuvée. Ce type de pressurage permet de limiter l'extraction des composés polyphénoliques mais limite également, dans une proportion importante, l'extraction d'autres macromolécules d'origine végétale, les protéines en particulier. Par la suite, le moût débourbé estensemencé avec la levure *Saccharomyces cerevisiae* var. bayanus (première fermentation alcoolique), suivie le plus souvent par la fermentation malolactique, réalisée par la bactérie *Oenococcus oeni*. Ensuite interviennent les opérations de stabilisation bitartrique, de collage et de filtration, afin d'obtenir un vin limpide et stable vis à vis des troubles cristallins et colloïdaux, le vin de base champenois.

Ainsi que nous venons de le voir, le pool protéique peut déjà varier en fonction de paramètres liés au cépage lui-même, avec les conditions de culture et avec les facteurs pédoclimatiques. De plus, le vinificateur peut aussi intervenir sur ce pool macromoléculaire lors des étapes de filtration ou lors des traitements de collage, ces traitements pouvant intervenir sur le moût (c'est à dire le jus de raisin), afin de faciliter le débourbage (élimination des pectines, en particulier, améliorant la limpidité des jus avant fermentation), mais également sur vin. Tous ces traitements peuvent largement amoindrir la teneur en protéines des moûts et des vins. On peut supposer, d'autre part, que, lors des deux fermentations, en l'occurrence la première fermentation alcoolique et la fermentation malolactique mais également au cours de la deuxième fermentation alcoolique (ou prise de mousse), il y a libération de composés d'origine microbienne (levurienne et bactérienne), voire consommation du pool de protéines végétales par ces mêmes microorganismes. Il a été également montré que, lors de vendanges contaminées par le champignon phytopathogène, *Botrytis cinerea* (l'agent responsable de la pourriture grise de la vigne), ce microorganisme

peut dégrader les protéines végétales et les remplacer par ses propres protéines (Marchal et al., 1998).

Ainsi, les protéines solubles d'un vin peuvent être modifiées tant sur le plan qualitatif que sur le plan quantitatif, avec des conséquences importantes (bien que pas toujours connues) sur ses propriétés moussantes. En effet, ces macromolécules ont été décrites comme étant largement impliquées dans la stabilisation de la mousse des boissons effervescentes, et en particulier, une sous-classe de protéines, les glycoprotéines. C'est l'objet du présent travail que de préciser en premier lieu l'origine des protéines d'un vin, de réaliser l'étude structurale d'une glycoprotéine majeure, l'invertase de raisin et, enfin, de déterminer leur rôle dans les propriétés moussantes d'un vin de Champagne.

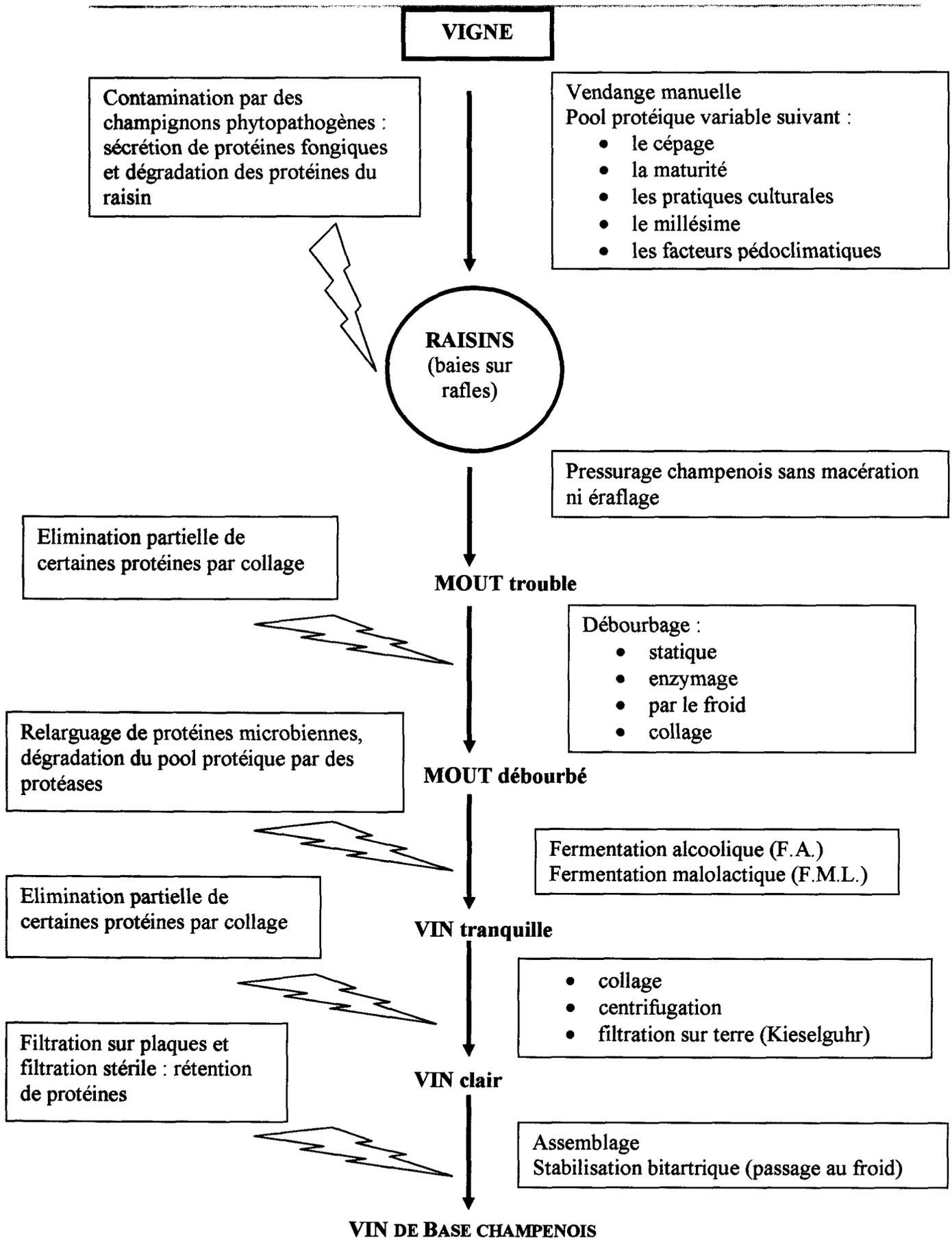


Figure 1 : Elaboration du vin de base. De la baie de raisin au vin tranquille.

VIN DE BASE CHAMPENOIS

- Levures (relarguage de protéines)
- Sucres
- Adjuvant de remuage (adsorption de protéines)

Prise de mousse

VIN CHAMPAGNISE SUR LATTES
(de 1 à 20 ans)

Vieillissement sur lies :
libération de protéines
pariétales et endocellulaire
(autolyse)

- Dégorgement
- Dosage (liqueur d'expédition)
- Bouchage

CHAMPAGNE
(Brut, Sec, Demi-Sec)

Figure 2 : Champagnisation. Du vin tranquille au Champagne.

I. LES PROTEINES DU VIN

Le vin contient des quantités variables de composés azotés, composés parmi lesquels les protéines semblent représenter qualitativement le groupe le plus important en particulier pour leur implication dans les propriétés moussantes des vins effervescents. Les protéines sont faiblement concentrées dans les vins de Champagne, de 10 à 20 mg selon Marchal (1995). La détermination de la teneur en protéines des moûts et des vins est rendue difficile du fait de la présence, dans ces milieux, de composés interférant avec les méthodes de dosage, notamment des polyphénols (Marchal et al., 1997), de sorte que les valeurs données précédemment ne sont qu'une estimation de la teneur en protéines des moûts et des vins.

Cependant, même si les protéines sont en quantités mineures dans un vin, elles jouent un rôle important dans ses propriétés de surface. Elles peuvent, d'un côté, jouer un rôle positif en stabilisant la mousse des vins effervescents (Brissonnet et Maujean, 1993), en contribuant à diminuer la casse protéique des vins blancs (Waters et al., 1994 a et b), interagir avec les composés d'arômes (Lubbers et al., 1994), ou encore en protégeant les vins contre les précipitations bitartriques, effet connu sous le nom « d'effet colloïde protecteur » (Lubbers et al., 1993 ; Moine-Ledoux et al., 1997). En revanche, certaines protéines, et notamment celles d'origine végétale, peuvent également provoquer des précipitations protéiques en bouteille, et ainsi déprécier grandement le produit final (Waters et al., 1996).

Les protéines du vin peuvent avoir plusieurs origines : elles peuvent provenir du raisin, mais également de la levure, voire des bactéries lactiques. La levure peut modifier le pool protéique de deux façons, d'un côté il y a transfert de protéines de la levure vers le vin lors de la fermentation alcoolique par les cellules vivantes (Llaubères et al., 1987), ou lors de l'élevage sur lies par autolyse des cellules mortes (Feuillat et al., 1988) ; de l'autre, le pool protéique intrinsèque du vin est susceptible d'être modifié par hydrolyse des protéines du moût via les protéases exocellulaires des levures. Cependant, récemment, une équipe portugaise (Ferreira et al., 2000) a démontré que les protéines du vin auraient une origine exclusivement végétale et que la plupart proviendraient de la pulpe du raisin.

La synthèse protéique s'accroît dans la baie de raisin à partir de la véraison (cette période correspond au changement de couleur de la baie) jusqu'à la maturité du raisin. Les

protéines s'accumulent ensuite principalement dans la pellicule du fruit et peuvent représenter jusqu'à 15 % de son poids. Ainsi, les protéines de la pulpe ne représentent qu'une faible proportion des protéines totales du raisin. Le pressurage permet l'extraction des composés de la pellicule mais, et surtout de la pulpe (ceci est d'autant plus vrai pour le pressurage champenois, qui est un pressurage « doux » limitant de façon importante l'extraction de composés de la pellicule). Il faut garder à l'esprit que les protéines du vin ne correspondent pas à une image exacte des protéines du moût (qui sont essentiellement les protéines de la pulpe), du fait de la faible extraction des protéines du raisin, mais également du fait de l'insolubilisation ou de l'hydrolyse de certaines d'entre elles tout au long du processus de vinification. Les protéines végétales qui se retrouvent finalement dans le vin sont celles qui sont solubles au faible pH du vin (entre 3,0 et 3,8), mais celles également qui seront résistantes aux protéases présentes dans le vin. Une fraction spécifique d'entre elles semble répondre à ce critère : ce sont les glycoprotéines (Waters et al., 1992). La dualité de leur structure comportant une partie hydrophobe protéique et une partie hydrophile glycannique, semble leur conférer de bonnes propriétés de surface pour jouer un rôle majeur dans les caractères de mousse des vins de Champagne. Il nous est donc apparu opportun de les étudier plus particulièrement dans la suite de cet exposé bibliographique.

II. LES GLYCOPROTEINES VEGETALES : GENERALITES

Les glycoprotéines constituent une classe de glycoconjugués au même titre que les glycosaminoglycannes, glycopeptides et autres glycolipides. Elles sont formées d'une partie glucidique liée de façon covalente sur une chaîne polypeptidique. Le nombre et la complexité des glycannes fixés sur la protéine sont assez variables. Les proportions de la partie protéique et de la partie glycannique varient beaucoup d'un composé à l'autre et, suivant l'importance de la partie glycosylée, on parlera de glycoprotéines (si les glycannes représentent jusqu'à 50 % de la molécule) ou de protéoglycannes (si à l'inverse la partie glycannique représente plus de 50 %). Très exceptionnelles chez les procaryotes, il faut attendre les eucaryotes pour voir apparaître des protéines glycosylées.

Les glycannes sont fixés par deux types de liaisons sur les protéines, ce qui permet de différencier deux types de glycoprotéines : les **N-glycoprotéines** et les **O-glycoprotéines** (figure 3).

Ainsi, la liaison N-osidique résulte de la conjugaison de la fonction réductrice de la N-acétylglucosamine avec la fonction amide de l'asparagine. Quant à la liaison O-glycosidique, qui est caractéristique des O-glycoprotéines, elle est constituée de la liaison d'une fonction réductrice terminale d'un glycanne avec un hydroxyle d'une sérine ou d'une thréonine.

La partie glucidique des N-glycoprotéines végétales a pour origine une structure oligosaccharidique, appelée noyau, commune à tous les glycannes de cette classe de glycoconjugués. Il s'agit du trimannosyl-N-N'-diacétylchitobiose ($\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$) lié à un résidu asparaginyne (figure 4). La substitution de ce noyau invariant par des sucres donne les divers N-glycannes. Les bras de composition variable, qui substituent ce noyau, sont appelés antennes en raison de leur flexibilité et de leur aptitude à être reconnus en tant que signaux.

En revanche, il n'existe pas de noyau chez les O-glycoprotéines végétales, pour lesquelles la diversité structurale est très réduite en comparaison des N-glycoprotéines végétales.

II.1. Introduction sur les N-Glycoprotéines d'origine végétale

Chez les végétaux, comme chez les autres eucaryotes, les N-glycannes sont liés de manière covalente à un résidu d'Asparagine (Asn) (figure 4) faisant partie d'un site de glycosylation constitué d'un tripeptide Asn-X-Ser/Thr, où X peut être n'importe quel acide aminé excepté la proline.

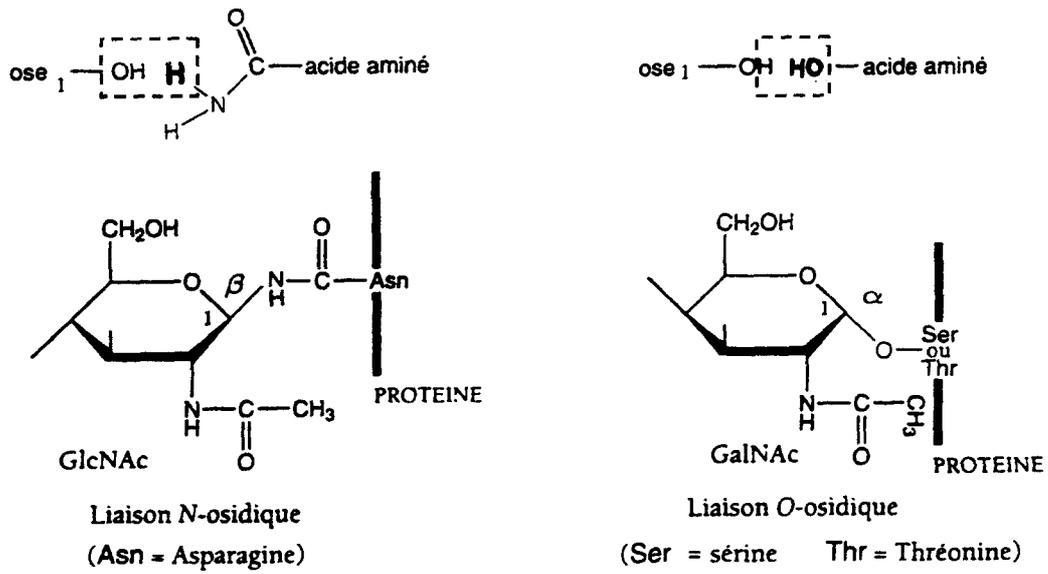


Figure 3 : Les deux types de liaisons covalentes osides-protéines.

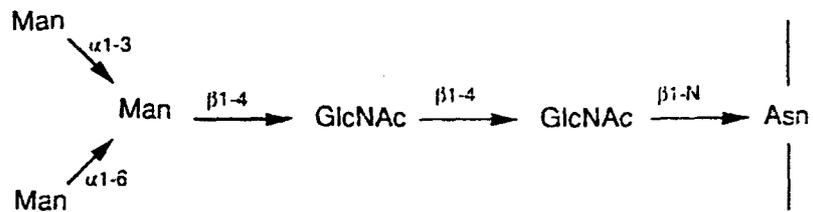


Figure 4 : Le noyau des N-glycannes.

II.2. Biosynthèse et maturation des N-Glycoprotéines d'origine végétale

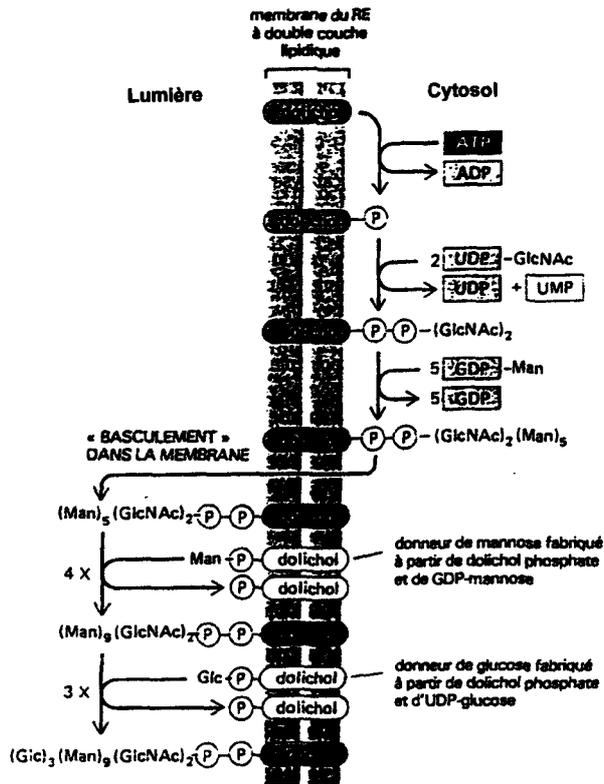
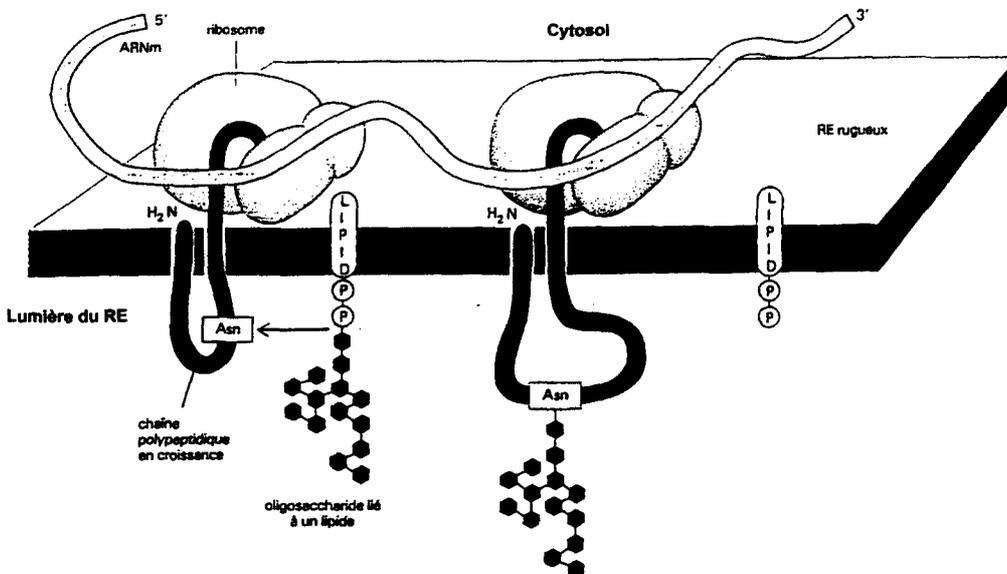


Figure 5 : Synthèse de l'oligosaccharide précurseur dans le RE. (d'après Alberts et al., 1986)



mannoses (Kaushal et al., 1990b) et une N-acétylglucosaminyl transférase de type II (GNT II)

La suite des phénomènes de maturation se déroulera au niveau de l'appareil de Golgi (figure 7) où le glycanne subit l'action d'une α -mannosidase de type I (α -Man I), spécifique des liaisons $\alpha(1,2)$. Cette enzyme élimine les quatre mannoses liés en $\alpha(1,2)$ pour aboutir à la structure Man₅GlcNAc₂. C'est à ce niveau que débute la synthèse des glycanes de type complexe, par addition d'un résidu N-acétylglucosamine par une N-acétylglucosaminyl transférase de type I (GNT I) sur le manose lié en $\alpha(1,3)$ de la structure oligomannosidique Man₅GlcNAc₂. On obtient alors la structure GlcNAcMan₅GlcNAc₂, base des structures de type hybride. Ensuite, une α -mannosidase de type II (α -Man II) élimine deux autres

les glycanes complexes et hybrides.

Par la suite, le précurseur oligosaccharidique subit des phénomènes de maturation par action de glycosyltransférases, tout au long de sa voie de transport vers son lieu de localisation finale. Cette maturation débute dans le RE (figure 7) par l'action de deux glycosidases qui éliminent les trois glucoses terminaux pour arriver à la structure Man₆GlcNAc₂ (Szumilo et al., 1986; Kaushal et al., 1990a). C'est cette structure qui constitue la base des voies de biosynthèse des glycanes de type oligomannosidique ainsi que

mécanisme co-traductionnel.

Lorsque le précurseur oligosaccharidique arrive à sa structure définitive (Glc₃Man₆GlcNAc₂), il est transféré en bloc sur une protéine naissante et fixé par une liaison pyrophosphate sur un résidu asparagine spécifique contenu dans une séquence signal (ou séquen) constituée d'un tri-peptide Asn-X-Ser/Thr (où X peut être n'importe quel acide aminé excepté la proline) (figure 6) (Kornfeld et Kornfeld, 1985). La glycosylation est donc un

après basculement du dolichol-phosphate, dans la face luminale du RE (figure 5).
synthèse du précurseur glycanique débute dans la face cytosolique du RE puis se termine, lié sur un transporteur lipidique, le dolichol-phosphate ancré dans la membrane du RE. La deux résidus N-acétylglucosamine (GlcNAc), neuf mannoses (Man) et trois glucoses (Glc), réticulum endoplasmique (RE) par la synthèse d'un oligosaccharide précurseur constitué de Chez les plantes, comme chez les autres eucaryotes, la N-glycosylation débute dans le

II.2. Biosynthèse et maturation des N-Glycoprotéines d'origine végétale

Chez les plantes, comme chez les autres eucaryotes, la N-glycosylation débute dans le réticulum endoplasmique (RE) par la synthèse d'un oligosaccharide précurseur constitué de deux résidus N-acétylglucosamine (GlcNAc), neuf mannoses (Man) et trois glucoses (Glc), lié sur un transporteur lipidique, le dolichol-phosphate ancré dans la membrane du RE. La synthèse du précurseur glycanique débute dans la face cytosolique du RE puis se termine, après basculement du dolichol-phosphate, dans la face luminale du RE (figure 5).

Lorsque le précurseur oligosaccharidique arrive à sa structure définitive ($\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$), il est transféré en bloc sur une protéine naissante et fixé par une liaison pyrophosphate sur un résidu asparaginyle spécifique contenu dans une séquence signal (ou séquen) constituée d'un tri-peptide Asn-X-Ser/Thr (où X peut être n'importe quel acide aminé excepté la proline) (figure 6) (Kornfeld et Kornfeld, 1985). La glycosylation est donc un mécanisme co-translationnel.

Par la suite, le précurseur oligosaccharidique subit des phénomènes de maturation par action de glycosidases et de glycosyltransférases, tout au long de sa voie de transport vers son lieu de localisation finale. Cette maturation débute dans le RE (figure 7) par l'action de deux glycosidases qui éliminent les trois glucoses terminaux pour arriver à la structure $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ (Szumilo et al., 1986 ; Kaushal et al., 1990a). C'est cette structure qui constitue la base des voies de biosynthèse des glycanes de type oligomannosidique ainsi que les glycanes complexes et hybrides.

La suite des phénomènes de maturation se déroulera au niveau de l'appareil de Golgi (figure 7) où le glycanne subit l'action d'une α -mannosidase de type I (α -Man I), spécifique des liaisons $\alpha(1,2)$. Cette enzyme élimine les quatre mannoses liés en $\alpha(1,2)$ pour aboutir à la structure $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$. C'est à ce niveau que débute la synthèse des glycanes de type complexe, par addition d'un résidu N-acétylglucosamine par une N-acétylglucosaminyl transférase de type I (GNT I) sur le mannose lié en $\alpha(1, 3)$ de la structure oligomannosidique $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$. On obtient alors la structure $\text{GlcNAcMan}_5\text{GlcNAc}_2$, base des structures de type hybride. Ensuite, une α -mannosidase de type II (α -Man II) élimine deux autres

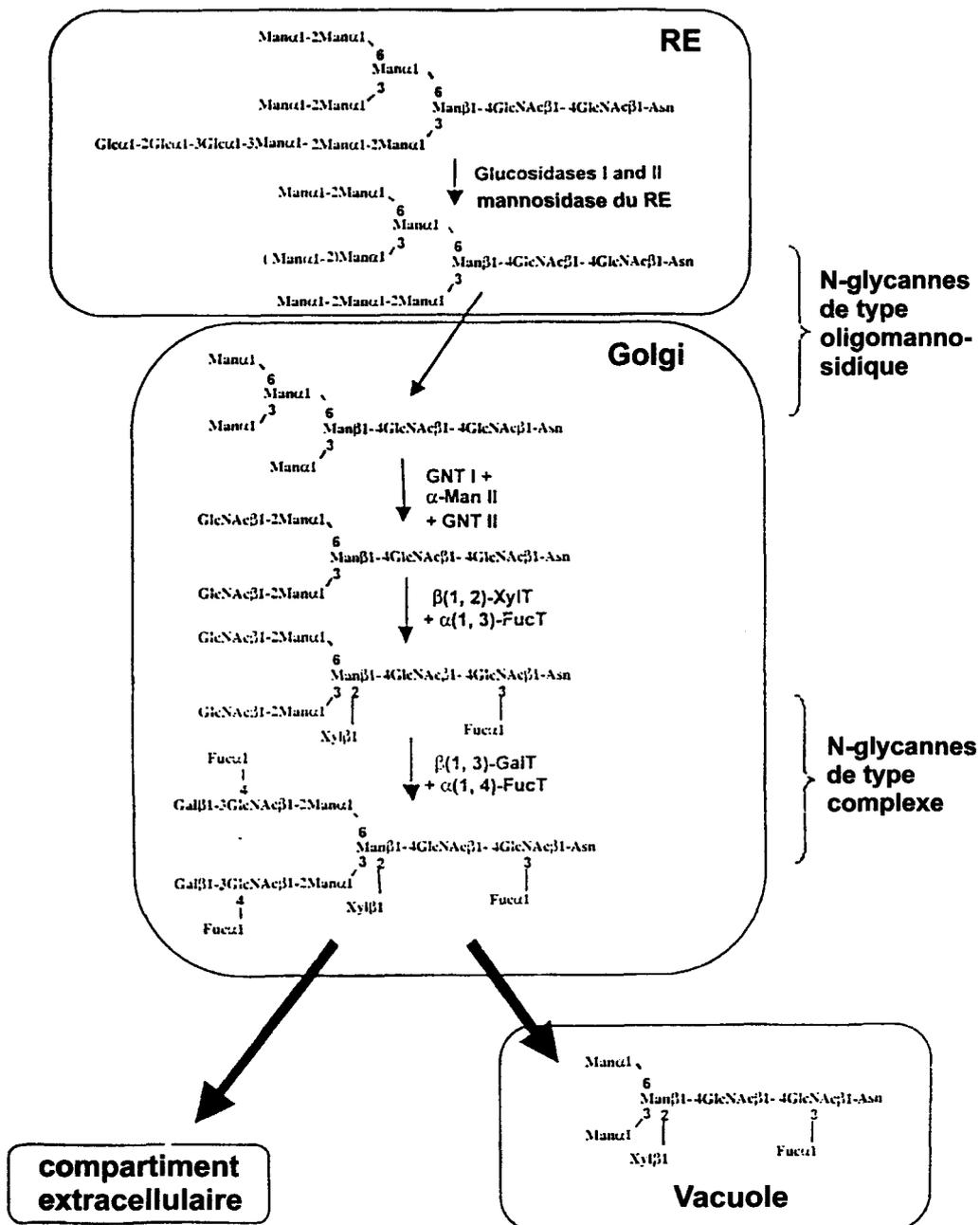


Figure 7 : Maturation des N-glycannes dans le réticulum endoplasmique (RE) et l'appareil de Golgi chez les plantes. Abréviations : GNT I, N-acétylglucosaminyltransférase I; GNT II, N-acétylglucosaminyltransférase II; $\beta(1,2)$ -XylT, $\beta(1,2)$ -xylosetransférase ; $\alpha(1,3)$ -FucT, $\alpha(1,3)$ -fucosyltransférase ; $\beta(1,3)$ -GalT, $\beta(1,3)$ -galactosyltransférase ; $\alpha(1,4)$ -FucT, $\alpha(1,4)$ -Fucosyltransférase. (d'après Lerouge et al., 1998)

mannoses (Kaushal et al., 1990b) et une N-acétylglucosaminyl transférase de type II (GNT II) ajoute un nouveau résidu GlcNAc sur le mannose lié en $\alpha(1, 6)$, pour conduire au glycanne qui sera la base des glycanes de type complexe (Johnson et Chrispeels, 1987 ; Tezuka et al., 1992).

Il peut y avoir ensuite transfert de résidus fucose et/ou xylose, sur les structures complexes ou hybrides (Tezuka et al., 1992 ; Zeng et al., 1997), le fucose étant lié en $\alpha(1,3)$ sur la N-acétylglucosamine proximale, le xylose étant, quant à lui, lié en $\beta(1,2)$ sur le premier résidu mannose. Ces deux résidus ainsi que leur liaison forment la spécificité de la glycosylation des plantes. Les glycanes de type complexe peuvent subir une autre modification par transfert d'un fucose lié en $\alpha(1,4)$ et/ou d'un résidu galactose lié en $\beta(1,3)$ sur les résidus GlcNAc terminaux (Fichette-Lainé et al., 1997 ; Melo et al., 1997).

II.2.1. Structures des N-glycanes d'origine végétale

Comme nous venons de le voir, les glycanes sont liés de manière covalente à la protéine par l'intermédiaire d'un résidu asparginyle spécifique. Quelle que soit leur structure définitive, tous les N-glycanes portent une structure minimum $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$, appelée « noyau » des N-glycanes et constituée d'une unité trimannosyl-N-N'-diacétylchitobiose (figure 4). La substitution de ce « noyau » par d'autres sucres permet d'obtenir les diverses structures des N-glycanes. Les N-glycanes des plantes sont classés en quatre groupes : les glycanes de type oligomannosidique, ceux de type complexe, ceux de type paucimannosidique et enfin les glycanes de type hybride (figure 8) (Lerouge et al., 1998).

II.2.1.1. Les glycanes de type oligomannosidique

Les glycanes oligomannosidiques sont constitués, comme leur nom l'indique, par l'enchaînement de plusieurs mannoses pouvant aller de cinq à neuf mannoses, et dérivent de l'élimination des résidus Glc et Man du précurseur oligosaccharidique ($\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$)

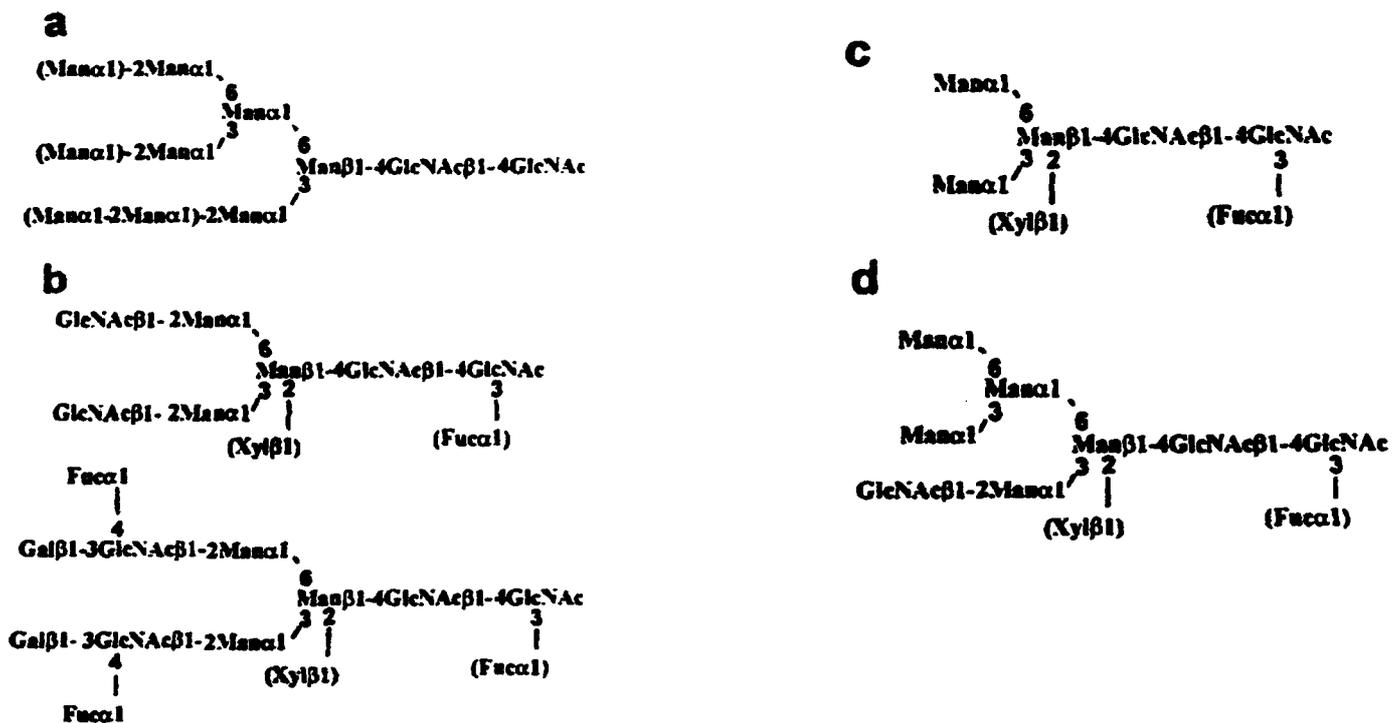


Figure 8 : Structure des N-glycannes végétaux. (d'après Lerouge et al., 1998)

(figure 8a). Ce type de glycanne se retrouve dans les N-glycannes de nombreuses glycoprotéines vacuolaires ou extracellulaires.

II.2.1.2. Les glycannes de type complexe

Ces glycannes sont caractérisés par la présence d'un $\alpha(1,3)$ -fucose et/ou d'un $\beta(1,2)$ -xylose lié sur le noyau des N-glycannes et par la présence de GlcNAc liées sur les α -mannoses (figure 8b). Il a été également démontré que ces structures peuvent porter des résidus additionnels de galactose et de fucose sur les GlcNAc des antennes (figure 8b), ces séquences glycaniques étant dénommées antigène Lewis a (Le^a) (Fichette-Lainé et al., 1997 ; Melo et al., 1997).

II.2.1.3. Les glycannes de type paucimannosidique

Ce glycanne est constitué du noyau complet ($Man_3GlcNAc_2$) ou réduit ($Man_2GlcNAc_2$) des N-glycannes sur lesquels vient se fixer un $\alpha(1,3)$ -fucose et/ou un $\beta(1,2)$ -xylose lié respectivement sur la GlcNAc proximale et le résidu β -mannose (figure 8c). Ce glycanne est la résultante de l'élimination des résidus terminaux des glycannes de type complexe et il peut être considéré comme étant un glycanne type des glycoprotéines vacuolaires.

II.2.1.4. Les glycannes de type hybride

Les glycannes de type hybride résultent de la maturation d'une seule antenne vers le type complexe, l'autre antenne étant de type oligomannosidique (figure 8d). Il peut y avoir également des résidus fucose et xylose liés sur le noyau glycanique (Oxley et al., 1996).

II.2.2. Hétérogénéité des N-glycannes des glycoprotéines végétales

On observe chez les plantes une grande hétérogénéité de glycosylation. Cette hétérogénéité s'exprime à trois niveaux différents : le nombre de glycannes présents au sein d'une même protéine, la nature des glycannes fixés sur une protéine ; on observe également une micro hétérogénéité au sein des sites individuels de glycosylation.

Quelles peuvent être les raisons d'une telle hétérogénéité ? Afin de répondre à cette question nous allons nous appuyer sur quelques exemples :

Le premier niveau d'hétérogénéité peut s'expliquer par le fait qu'il y aurait une inefficacité dans le processus de glycosylation avec pour conséquence une glycosylation « aléatoire » d'un site bien précis. Cette efficacité aléatoire serait liée à la structure intrinsèque de la protéine (Galili et al., 1998) ; ainsi la présence d'une proline aux alentours proches du site de glycosylation serait défavorable à sa glycosylation. De même, un site de glycosylation Asn-X-Ser serait plus défavorable à la glycosylation qu'un site Asn-X-Thr. En outre, les sites localisés dans la partie C-terminale de la protéine sont moins fréquemment glycosylés que ceux localisés dans la partie N-terminale, ces premiers ayant un temps d'utilisation moindre avant relargage de la protéine dans la lumière du RE. Ainsi, chez la phaséoline, protéine de réserve du haricot commun (*Phaseolus vulgaris*), un des deux sites de glycosylation est partiellement utilisé. La protéine mature porte de manière aléatoire un ou deux glycannes (Bollini et al., 1983).

D'autre part, l'hétérogénéité observée d'un site à l'autre au sein d'une même protéine peut s'expliquer par l'accessibilité que les glycannes présentent aux enzymes de maturation. Ainsi les glycannes qui restent accessibles à ces enzymes subissent tout le processus de maturation et sont alors convertis en glycannes complexes. A l'inverse, ceux qui sont peu ou pas accessibles restent à l'état initial de glycanne oligomannosidique. De nouveau, reprenons l'exemple de la phaséoline, glycoprotéine qui possède aléatoirement un ou deux glycannes. Lorsque la protéine porte deux glycannes sur les Asn 252 et 341, ces deux glycannes sont de nature oligomannosidique. En revanche, lorsque seul l'Asn 252 est glycosylé, le N-glycanne qu'il porte est, alors, de type paucimannosidique. Ainsi, l'absence de glycosylation sur l'Asn

341 permettrait une meilleure accessibilité du glycanne fixé sur l'Asn 252 par les enzymes de maturation.

Comme nous l'avons déjà exposé, il peut y avoir une micro hétérogénéité au sein d'un même site de glycosylation. Cette micro hétérogénéité peut résulter d'une modification partielle des glycanes par les enzymes de maturation de l'appareil de golgi ou d'une dégradation partielle de ces mêmes glycanes par les exoglycosidases dans le compartiment où la glycoprotéine est stockée, toutes les glycoprotéines prises à un instant donné n'étant pas dans le même état de maturation.

II.2.3. Rôles de la glycosylation chez les glycoprotéines végétales

On sait que, chez les eucaryotes, la glycosylation joue un rôle primordial. Ainsi, les glycanes permettent de protéger la protéine contre les enzymes protéolytiques et d'améliorer le repliement de la protéine. Ces mêmes glycanes jouent également un rôle dans l'adressage des glycoprotéines et interviennent aussi dans les phénomènes de reconnaissance des protéines ou de reconnaissance de cellule à cellule. Chez les plantes, également, la glycosylation ne semble pas correspondre à une fonction générale mais à un ensemble de fonctions. Nous allons donc étudier les rôles des glycanes des glycoprotéines végétales au cas par cas.

II.2.3.1. Rôle dans la conformation des glycoprotéines

Chez les plantes, la glycosylation joue un rôle important dans la conformation des glycoprotéines, jouant par delà un rôle dans l'activité biologique de ces glycoprotéines. Ainsi, Shaanan et al. (1991) ont observé que, pour la lectine Ecor L d'*Erythrina corallodendron*, son volumineux glycanne oblige les dimères à adopter une structure quaternaire précise, permettant ainsi la liaison avec le galactose.

II.2.3.2. Rôle dans la stabilité protéique

Les parois des cellules de carotte (*Daucus carota*) renferment une β -fructosidase, une invertase, portant trois glycannes (Sturm, 1991). Lorsque ces cellules sont mises en culture avec de la tunicamycine, inhibiteur de la glycosylation, la protéine est certes synthétisée normalement mais elle est très rapidement dégradée au cours du transport intracellulaire nécessaire à sa sécrétion ou immédiatement après son insertion dans la membrane, contrairement à la protéine normalement glycosylée. Une étude récente (Pagny et al., 2003), effectuée également sur une invertase du tabac, démontre clairement le rôle protecteur joué par les N-glycannes. Ainsi, les glycannes jouent un rôle de protection de la chaîne protéique vis-à-vis des enzymes protéolytiques.

II.2.3.3. Rôle des glycannes dans l'adressage cellulaire des glycoprotéines ?

Le rôle joué par les glycannes dans l'adressage cellulaire des glycoprotéines a été largement étudié. Ainsi, il a été démontré (Bollini et al., 1985), que chez le haricot (*Phaseolus vulgaris*) en présence d'inhibiteurs de la glycosylation, il n'y a aucune modification dans l'adressage vacuolaire des glycoprotéines. De plus, Voelker et al. (1989) ont montré, en faisant exprimer chez le tabac une phytohématagglutinine (PHA) dont les deux sites de glycosylation ont été éliminés, que cette lectine même non glycosylée s'accumulait encore dans les corps protéiques des feuilles de tabac. Lerouge et al. (1996) observent, en inhibant dans une suspension de cellules d'érable la maturation des N-glycannes par la castanospermine, que la glycosylation n'intervient pas dans la sécrétion des glycoprotéines.

Ainsi, les N-glycannes ne joueraient aucun rôle précis dans l'adressage des glycoprotéines dans la cellule végétale.

II.2.3.4. Rôle dans la solubilité et la stabilité thermique des glycoprotéines

La concanavaline A (Con A) est synthétisée sous forme d'une prolectine glycosylée et inactive (pro-Con A). La suite du processus de maturation de la Con A se déroule dans les corps protéiques où il y a enchaînement de plusieurs étapes protéolytiques post-traductionnelles, ceci se traduisant par la perte du fragment glycosylé et le réarrangement des chaînes polypeptidiques afin d'obtenir la lectine active. L'inhibition de la glycosylation du précurseur réduit fortement la solubilité de cette pro-lectine et donc son expression (Faye et Chrispeels, 1987).

II.2.3.5. Rôle dans le développement de la plante

Lorsque des cellules de *Catharanthus rosea* (Pervenche de Madagascar) sont cultivées en présence de tunicamycine, Ettliger et al. (1986) observent un arrêt de la division cellulaire et de la synthèse d'ADN au stade G₁. Quand ces cellules bloquées sont remises dans un milieu sans tunicamycine, le cycle cellulaire reprend son cours normal. Ces résultats démontrent que une ou plusieurs glycoprotéines sont nécessaires aux cellules végétales pour franchir le stade G₁.

II.2.3.6. Rôle dans la signalisation moléculaire

Chez les plantes, des glycannes libres ont été identifiés (Priem et al., 1990a). Ces glycannes auraient des rôles biologiques variés dans le métabolisme de la plante (Priem et al., 1990b). Ainsi, lorsqu'ils sont injectés à des tomates immatures, ils sont capables de stimuler le mûrissement des fruits. De plus, les structures de dix glycannes libres (de type oligomannosidique et complexe) purifiés à partir de péricarpes de tomate ont été établies (Priem et al., 1993). Ces auteurs montrent que les rapports entre les différentes catégories de glycannes évoluent au cours de la maturation des fruits. Ces N-glycannes libres peuvent également agir comme facteur de croissance durant le développement des jeunes plants de lin (Priem et Gross, 1992).

Etude Bibliographique

Ces glycannes libres proviendraient de la dégradation (déglycosylation) de glycoprotéines ou de glycolipides dans le compartiment cytosolique.

Tous les exemples cités montrent bien le rôle primordial joué par les N-glycannes des glycoprotéines. De plus, des études récentes ont identifié la présence de l'épitope Lewis a (Le^a) sur certains glycannes végétaux provenant de glycoprotéines de sécrétion ou de glycoprotéines de la surface cellulaire (Fitchette-Lainé et al., 1997). Sachant que l'épitope Le^a est largement impliqué, chez les mammifères, dans la reconnaissance et l'adhésion cellulaire, on peut facilement faire une extrapolation et penser que cette épitope joue le même rôle chez les végétaux. Cependant, ceci n'a pour le moment pas été démontré. L'étude des glycoprotéines végétales, même si elle est restée plus discrète ces dernières années, connaît un très fort regain d'activité, du fait notamment de l'utilisation des plantes pour produire des protéines recombinantes utilisables en thérapie humaine.

Par ailleurs, le rôle joué par les N-glycannes dans les propriétés physico-chimiques des glycoprotéines est encore très mal connu et très peu étudié.

II.3. Les O-glycoprotéines des plantes supérieures

II.3.1. Introduction

A côté de la grande classe des N-glycoprotéines, il existe une autre classe de glycoprotéines, les O-glycoprotéines, dénommées ainsi du fait de la nature de la liaison O-glycosidique qui les caractérise, où la fonction réductrice terminale d'un glycanne est engagée avec l'hydroxyle d'une Sérine ou d'une Thréonine. Du fait de leur richesse en hydroxyproline (Hyp), les O-glycoprotéines sont également dénommées « Hydroxyproline Rich Glycoproteins » (HRGPs). Elles se classent en quatre grandes catégories : les extensines, les « proline/hydroxyproline-rich glycoproteins » (P/HRGPs), les lectines de Solanacées et les arabinogalactanes-protéines (AGPs) (pour une revue voir : Sommer-Knudsen et al., 1998).

II.3.1.1. Les extensines

Ces macromolécules, appelées extensines en raison de leur rôle supposé dans l'extension cellulaire, sont des glycoprotéines ayant une structure assez simple. Elles sont riches en hydroxyproline et en sérine, et sont constituées de motifs répétitifs dont le plus abondant est le motif pentapeptidique Ser(Hyp)₄, qui peut représenter jusqu'à 60 % de la chaîne polypeptidique (figure 9) (Showalter, 1993). Les extensines sont fortement glycosylées, avec des glycannes pouvant représenter de l'ordre de 50 à 60 % (en poids) de la protéine totale. Cette glycosylation est représentée en majorité (90 – 97 %) par des petites chaînes latérales d'arabinose liées sur l'hydroxyproline, allant de un à quatre arabinoses (Hyp-Ara₁₋₄), avec une forte proportion de tri- et tétra-arabinoses (Akiyama et al., 1980), et par des petites chaînes latérales galactosylées (3 - 7 %) (Smith et al., 1986) composées de un à deux résidus galactose liés en α sur une sérine (figure 9) (Lamport et al., 1973). Les extensines sont sécrétées dans la paroi cellulaire sous forme de monomères solubles, elles sont par la suite insolubilisées en formant des liens inter-tyrosine.

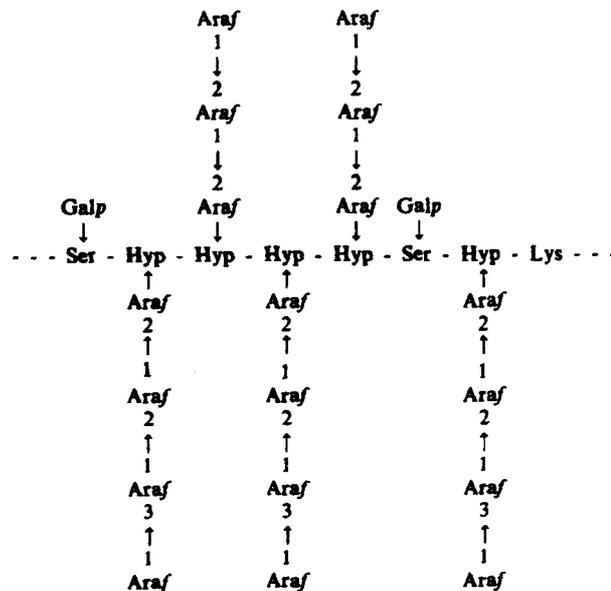


Figure 9 : structure de l'extensine. (d'après Clarke et al., 1979)

Les extensines se trouvent sous la forme d'une hélice polyproline II (van Holst et Varner, 1984). Cette structure en hélice semble être stabilisée par les glycannes (chaînes latérales d'arabinosyles) (Stafstrom et Staehelin, 1986) ; il semblerait d'ailleurs que ce soit leur principal rôle (Swords et Staehelin, 1989).

Motifs peptidiques	Origine	Références
PPRHK PP	Pois	Scheres et al., 1990
PPVHK PP	Carotte	Chen et Varner, 1985
T OVYK	Betterave	Li et al., 1990
K POVEK	Haricot	Millar et al., 1992a
PPIYK	Soja	Datta et al., 1989
PPTYK P	Riz, Sorgho	Caelles C. et al., 1992
K PPTPK P	Maïs	Stiefel et al., 1990
PPHVK PP	Tomate	Salts et al., 1991
K PPATK PP	Sorgho	Raz et al., 1991
P PPAT PPP	Coton	John et Keller, 1995

Tableau 1 : Quelques exemples de motifs des P/HRGPs.

II.3.1.2. Les « Proline/Hydroxyproline-Rich Glycoproteins » (P/HRGPs)

Cette famille de molécules regroupe des composés qui ont, certes, une forte concentration en proline et en hydroxyproline, mais qui ne peuvent être classées dans aucune des autres classes de HRGPs (extensines, AGPs ou autres lectines de Solanacées).

Les P/HRGPs possèdent, tout comme les extensines, des motifs répétitifs (tableau 1), dont la nature et l'importance peuvent varier grandement. Cependant, on observe un motif commun constitué de la séquence Pro-Pro-Xaa-Yaa-Lys, où Xaa peut être soit Val, His, Thr ou Ala, et où Yaa est soit Tyr, Thr, Glu ou Pro. Cette séquence peut être allongée par ajout d'un résidu de Lys et de un ou deux résidus de Pro pour donner la séquence : (Lys)-Pro-Pro-Xaa-Yaa-Lys-(Pro-Pro) (Kieliszewski et al., 1992). D'autres motifs assez proches peuvent également être présents. Ces divers motifs peuvent coexister au sein de la même chaîne polypeptidique et être répétés à plusieurs reprises (Datta et Marcus, 1990). Toutes ces structures riches en proline pourraient aboutir à la formation d'une hélice β (Waite, 1992).

La glycosylation peut représenter de l'ordre de 3 à 70 % de la molécule, et être soit entièrement constituée d'arabinose (Datta et al., 1989) soit d'arabinose et de galactose (Kieliszewski et al., 1992). La glycosylation semble être moins importante que dans le cas des extensines, avec une proportion plus grande d'hydroxyprolines non-glycosylées en comparaison avec les extensines (Kieliszewski et al., 1992). De plus, on observe, sur certaines P/HRGPs, la présence des deux types de glycosylation, la N- et la O-glycosylation (Sommer-Knudsen et al., 1996).

Cette famille contient également le groupe des protéines riches en proline (« proline-rich proteins » ou PRP) qui sont très peu glycosylées.

Les P/HRGPs semblent, du fait de leur localisation pariétale et de leur structure très répétitive, avoir un rôle structural dans la cellule végétale (Datta et al., 1989). Elles pourraient également avoir une implication dans les défenses de la plante vis à vis des infections : en effet, l'expression de certaines P/HRGPs est concomitante de l'infection par un pathogène (Showalter, 1993 ; Balestrini et al., 1994). En outre, on observe très rapidement après une blessure ou après un traitement par des éliciteurs (de l'ordre de deux à cinq minutes), une

insolubilisation de certaines P/HRGPs de la paroi cellulaire, ce qui permettrait de renforcer la paroi et ainsi, de lutter contre l'invasion par le pathogène (Bradley et al., 1992 ; Brisson et al., 1994). D'autres observations vont d'ailleurs dans ce sens et accèdent la thèse selon laquelle les P/HRGPs auraient un rôle dans les phénomènes de défense de la plante. Ainsi, les P/HRGPs pourraient avoir une activité d'agglutination envers les pathogènes. En effet, Mellon et Helgeson (1982) observent que certaines P/HRGPs fortement glycosylées et isolées, soit de la paroi de cellules de tubercules de pomme de terre, soit de plants de tabac, sont capables d'agglutiner des souches uniquement non-virulentes de bactéries ou de champignons. Cette agglutination ne semble pas être liée à une activité lectinique ; de plus, elle est fortement réduite par de fortes concentrations en sels, ce qui suggère que cette activité serait, en fait, liée à des interactions ioniques entre les charges basiques des P/HRGPs et les charges négatives des lipopolysaccharides bactériens (Mellon et Helgeson, 1982). Les souches virulentes bactériennes, produisant une gangue polysaccharidique extracellulaire, ne peuvent donc pas être agglutinées par les P/HRGPs (Sequeira et Graham, 1977). En revanche, Millar et al. (1992 a) ont isolé du haricot vert une P/HRGP capable de se lier à la chitine. Cette P/HRGP est capable par l'intermédiaire de cette activité spécifique, de se fixer à l'hyphe d'un pathogène fongique du haricot (Millar et al., 1992 a).

II.3.1.3. Les lectines de Solanacées

Plusieurs lectines ont été isolées à partir de diverses Solanacées avec une spécificité de fixation pour des oligomères de N-acétylglucosamine. Les plus étudiées sont celles de la pomme de terre (*Solanum tuberosum*), celles de la pomme de pin (*Datura stramonium*) et la lectine de la tomate (*Lycopersicon esculentum*). La lectine de la pomme de terre est constituée de deux domaines bien distincts : le premier domaine non-glycosylé est riche en cystéine et en glycine et contient le site lectinique ; le second domaine lui est glycosylé et riche en hydroxyproline (Allen et al., 1978 ; Ashford et al., 1982 ; van Holst et al., 1986). La lectine de la pomme de terre contient également un motif pentapeptidique Ser-(Hyp)₄ identique à celui des extensines (Kieliszewski et al., 1994), constituant une hélice sous forme de polyproline II (van Holst et al., 1986). La partie glycosylée représente 50 % en poids de la lectine, avec une forte proportion d'arabinose (95 %) et une faible quantité de galactose (5 %) (Allen et al., 1978 ; Ashford et al., 1982). D'autre part, une autre glycoprotéine capable de fixer la chitine a été isolée à partir de la racine de pomme de terre (Millar et al., 1992 b).

Les fonctions remplies par ces lectines restent pour le moment assez peu connues. Elles sembleraient jouer un rôle dans les mécanismes de défense de la plante, notamment par leur possibilité de se lier spécifiquement à la chitine, structure qui peut être présente sur la surface de certains pathogènes (Millar et al., 1992 b). Ces lectines peuvent, également, être impliquées dans divers mécanismes, tels que les mécanismes d'interactions intercellulaires, dans le transport des sucres, dans la stabilisation des protéines de stockage, le contrôle de la division cellulaire ainsi que dans la cicatrisation cellulaire (Showalter, 1993).

II.3.1.4. Les Arabinogalactanes-Protéines (AGPs)

Les arabinogalactanes-protéines (AGPs) sont des macromolécules extracellulaires des plantes et sont constituées d'une faible partie protéique, qui ne représente que 2 à 10 % de la macromolécule (Showalter, 1993 ; Fincher et al., 1983) et d'une très grande partie glucidique. De ce fait, elles sont caractérisées comme étant des protéoglycannes. Les AGPs sont riches en Hyp et Ser qui servent de sites de glycosylation pour les chaînes latérales (Clarke et al., 1979). Elles contiennent des courts motifs répétitifs Hyp/Pro-Ala ou Ala-Hyp/Pro (Showalter, 1993). Les AGPs possèdent une structure en hélice partielle polyproline β (van Holst et Fincher, 1984). La partie glycanique de ces macromolécules représente généralement plus de 90 % (en poids) de la molécule. Les sucres sont majoritairement des arabinoses et des galactoses (Brillouet et al., 1990 ; Pellerin et al., 1995). La principale chaîne glycosidique est un arabinogalactane, fixé à l'Hyp (figure 10). Les AGPs sont également appelées « β -lectines » car elles sont capables d'interagir avec le réactif β -glycosylé de Yariv (Yariv et al., 1967) et de former ainsi un complexe rouge-orange ou un précipité (Showalter et Varner, 1989). Les AGPs sont des molécules solubles rencontrées dans les membranes plasmiques, les parois, l'espace intercellulaire des tissus végétaux, les exsudats, ainsi que dans les milieux de culture liquide (Kreuger et van Holst, 1993). La charge nette des AGPs est hétérogène (van Holst et Clarke, 1985). Même si aucune fonction n'a vraiment été mise en évidence pour les AGPs, des travaux récents démontrent l'implication de ces molécules dans la signalisation cellulaire, le développement (Kreuger et van Holst, 1996 ; Schindler et al., 1995 ; Dolan et al., 1995 ; Egertsdotter et von Arnold, 1995), l'expansion cellulaire (Willats et Knox, 1996) ou la prolifération cellulaire (Langan et Nothnagel, 1997). Les AGPs pourraient également

jouer un rôle dans l'adhésion entre la paroi cellulaire et la membrane plasmique (Pennell et al., 1989).

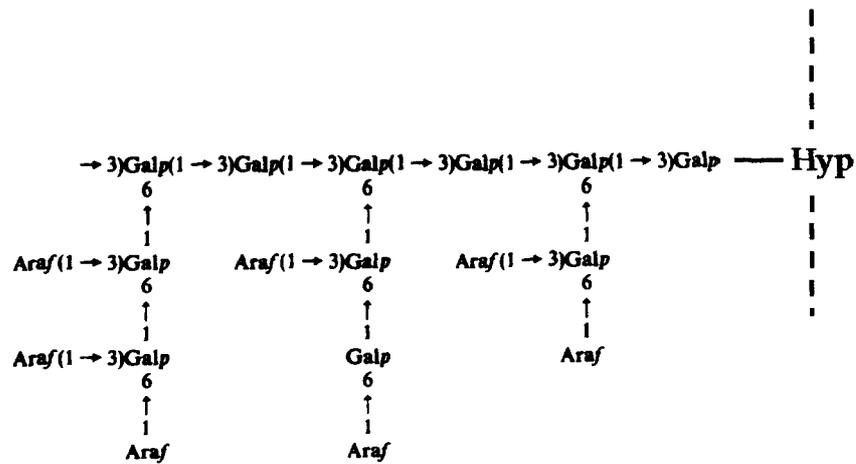


Figure 10 : Structure d'Arabinogalactane-Protéine (AGPs). (d'après Saulnier et al., 1992)

II.3.2. Synthèse des O-glycoprotéines des plantes supérieures

La connaissance des processus de biosynthèse des O-glycoprotéines, et notamment des enzymes (O-glycosyltransférases) intervenant dans ces voies de synthèse, reste pour le moment assez limitée.

La glycosylation des HRGPs est constituée de deux modifications consécutives : la première modification, qui se réalise dans le RE (Wojtaszek et al., 1999), est l'hydroxylation de certains résidus spécifiques de proline par des prolyl-hydroxylases. La seconde étape est la glycosylation de certains résidus d'hydroxyproline par des glycosyltransférases. Cette O-glycosylation se déroulerait dans l'appareil de Golgi (Kieliszewski, 2001), même s'il subsiste de nombreuses polémiques à ce sujet, notamment du fait que l'activité arabinosyl-transférase a été également localisée dans le RE (Moore et al., 1991). Seules les arabinosyl-transférases impliquées dans la formation de la liaison Hyp-Ara et dans les phénomènes d'élongation des chaînes latérales Hyp-arabinoside ont été étudiées. Il y aurait, de plus, présence de séquences peptidiques qui déterminerait la spécificité de glycosylation (Kieliszewski, 2001).

III. LES GLYCOPROTEINES LEVURIENNES

III.1. Introduction et généralités

La levure a pendant longtemps servi de modèle d'étude en biologie et, notamment, pour l'étude des mécanismes de la glycosylation. Les connaissances actuelles sur la levure et, plus particulièrement, chez *Saccharomyces cerevisiae* sont de ce fait très étendues.

On classe les N-glycoprotéines levuriennes en trois catégories suivant leur localisation : les glycoprotéines vacuolaires, les glycoprotéines de la paroi cellulaire et enfin les glycoprotéines secrétées (extracellulaires). La N-glycosylation chez la levure est exclusivement de nature oligomannosidique. Ce qui va varier c'est la longueur des chaînes oligomannosidiques. Ainsi, si nous reprenons la classification abordée plus haut, nous remarquons que les glycoprotéines vacuolaires possèdent de courtes chaînes oligosaccharidiques de l'ordre d'une dizaine de mannoses. Les protéines secrétées portent, quant à elles, des chaînes oligomannosidiques plus longues de l'ordre d'une cinquantaine ou plus de résidus mannose. Quant aux protéines pariétales, elles portent de très longues chaînes polysaccharidiques composées de plus d'une centaine de mannoses, avec un rapport très élevé en faveur de la teneur en sucre par rapport à la teneur en protéine : on parle alors de mannoprotéine.

Il faut noter également que la levure peut ajouter sur ses glycannes des groupements phosphates sous forme de mannosyl-phosphate, deux résidus mannoses liés à un résidu phosphate, l'ensemble étant lié à la chaîne oligomannosidique par le phosphate. Il peut y avoir également addition de groupements galactose (pour une revue voir : Gemmill et Trimble, 1999).

Il n'est pas rare de voir chez la levure la coexistence des deux types de glycosylation (N- et O-glycosylation) au sein d'une même glycoprotéine (figure 11) contrairement aux glycoprotéines végétales chez lesquelles les deux modes de glycosylation sont très bien distincts.

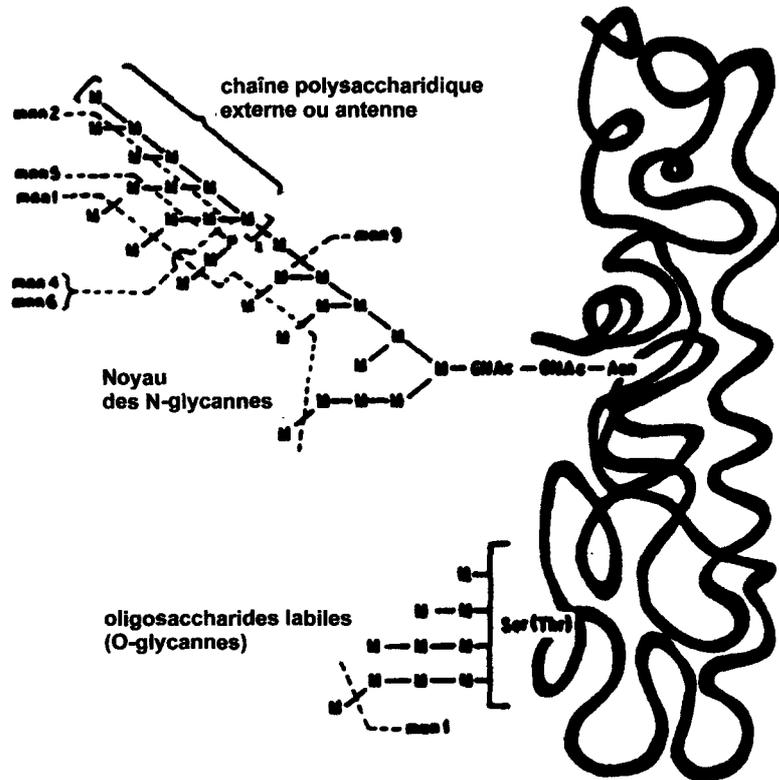


Figure 11 : Structure d'une mannoprotéine levurienne. (d'après Jigami et Odani, 1999)

III.2. Synthèse des N-glycannes levuriens

III.2.1. Synthèse du précurseur oligosaccharidique et transfert sur la protéine

Tout comme pour les mammifères ou les végétaux, les premières étapes de la glycosylation débutent par la synthèse du précurseur oligosaccharidique ($\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$) au niveau de la membrane du RE (face cytosolique puis luminale), le précurseur étant lié à un transporteur lipidique, le dolichol-phosphate (figure 12). Le précurseur est ensuite transféré en bloc sur un résidu Asn de la séquence Asn-X-Ser/Thr de la protéine naissante (figure 13).

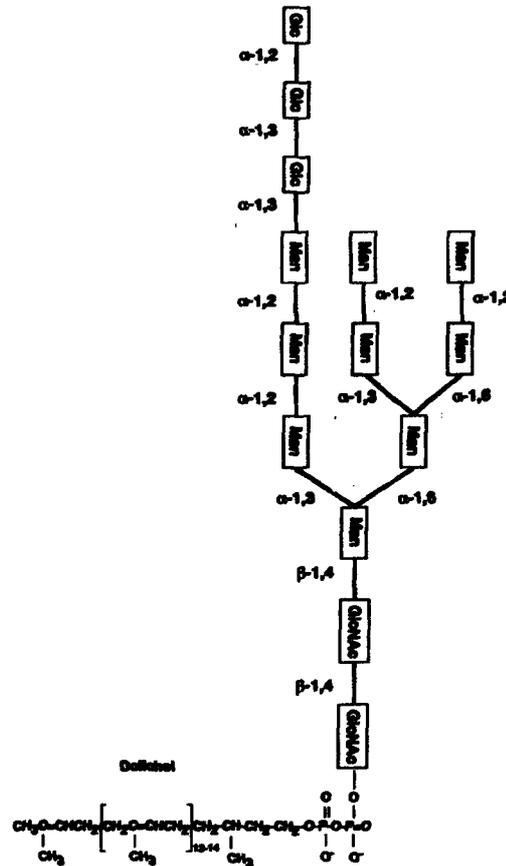


Figure 12 : Le complexe dolichol-phosphate / précurseur oligosaccharidique.

(d'après Dean, 1999)

III.2.2. Elongation de la chaîne oligosaccharidique

Après transfert du précurseur oligosaccharidique sur la protéine, il y a maturation du glycanne avec l'élimination des trois glucoses et d'un mannose lié en α (1, 2) terminal. Cette première étape se déroule encore dans le RE (figure 13). Les glycoprotéines sont ensuite transportées vers le Golgi. Elles vont subir alors, tout au long de leur parcours au travers des vésicules golgiennes, les phénomènes d'élongation par action de diverses glycosyltransférases. C'est dans ces phénomènes de maturation et d'élongation que la glycosylation levurienne diffère des autres espèces. En effet, *S. cerevisiae* ne dégrade pas le glycanne précurseur au-delà de $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ et se limite ensuite, dans les phénomènes d'élongation, uniquement, à additionner à cette structure d'autres mannoses, formant ainsi un

Etude Bibliographique

squelette constitué d'une chaîne de mannoses liés en α (1, 6), sur laquelle viennent se fixer des chaînes latérales liées en α (1, 2) et en α (1, 3) (figure 14). Au final, on observe généralement une structure conservée, constituée d'un cœur contenant moins de 15 mannoses et d'une chaîne externe, qui peut contenir jusqu'à plus de 200 mannoses (Figure 11).

De plus, comme chez les plantes, on observe une glycosylation qui est spécifique d'un site donné ; ainsi l'ampleur de l'élongation semble liée à des contraintes stériques (Trimble et al., 1983).

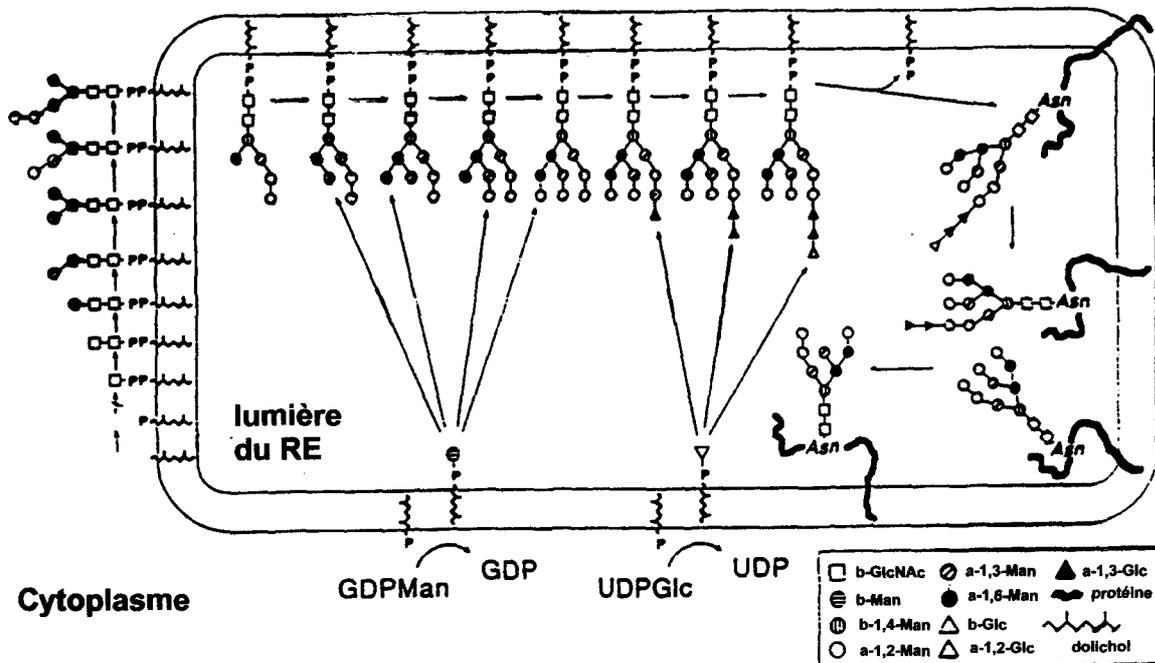


Figure 13 : Synthèse des N-glycannes levuriens dans le RE. (d'après Herscovics et Orlean, 1993)

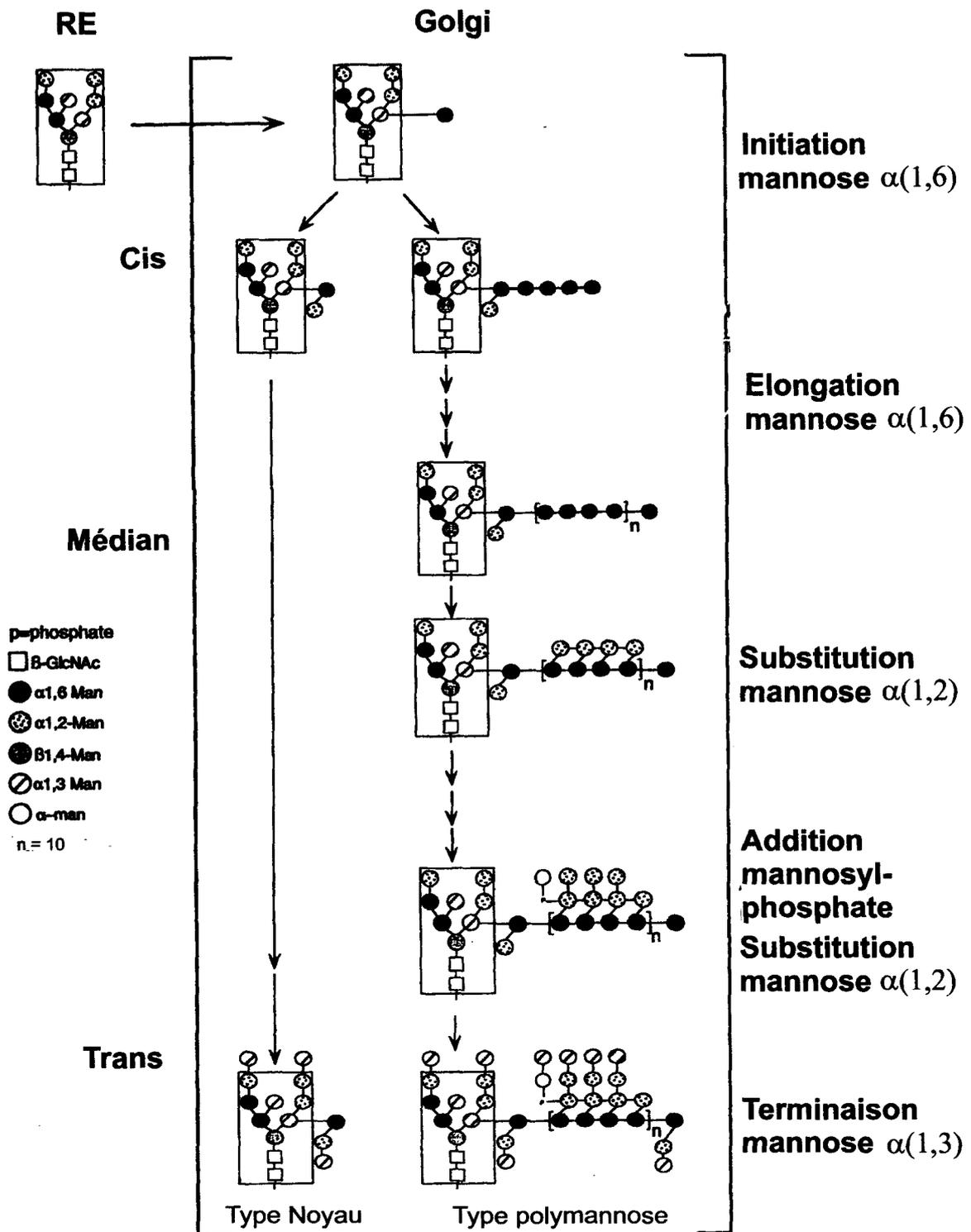


Figure 14 : Maturation des N-glycannes levuriens dans l'appareil de Golgi.
(d'après Dean, 1999)

III.3. Les O-glycannes

III.3.1. Synthèse des O-glycannes

A l'instar de la N-glycosylation levurienne, la O-glycosylation est aussi très différente chez la levure par rapport aux autres espèces. La biosynthèse débute par l'addition dans le RE d'un résidu mannose qui est transféré d'un transporteur Dol-P-Man sur une sérine ou une thréonine (figure 15). Les mannoses additionnels sont ensuite transférés dans le Golgi à partir, cette fois, d'un transporteur GDP-Man (Bause et Lehle, 1979). Les trois premiers mannoses sont liés les uns aux autres par des liaisons α (1, 2). Les mannoses additionnels sont liés en α (1, 3). Les structures des O-glycannes sont très simples avec des chaînes linéaires de mannoses n'excédant pas huit résidus mannose. Il peut y avoir également, chez certaines espèces levuriennes, addition de résidus galactose et/ou de groupements phosphate.

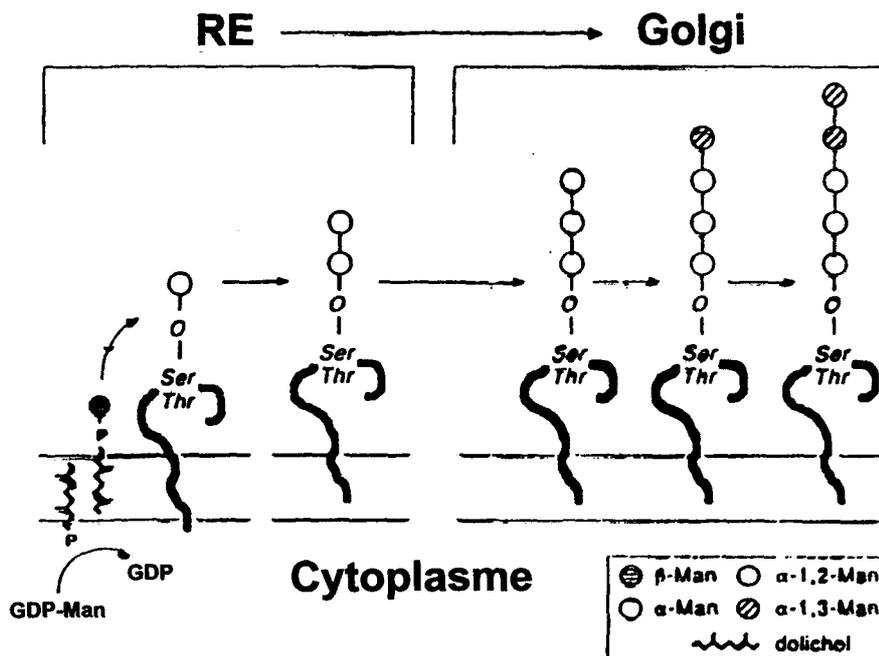


Figure 15 : Synthèse des O-glycannes levuriens. (d'après Herscovics et Orlean, 1993)

III.4. Rôle de la glycosylation chez *S. cerevisiae*

La levure *S. cerevisiae* renferme une part énorme de glycoprotéines, vacuolaires ou pariétales. Ces composés sont donc susceptibles de se retrouver dans le vin, soit directement après la fermentation alcoolique par simple libération, soit après l'élevage sur lies (12 mois minimum en Champagne lors de la prise de mousse) par le biais de l'autolyse.

III.4.1. Les constituants structuraux

Chez *S. cerevisiae*, la majeure partie des glycoprotéines synthétisées se retrouve intégrée à la paroi cellulaire. Ainsi, les mannoprotéines levuriennes en association avec les glucanes sont les deux composants majeurs de la paroi levurienne. La paroi cellulaire représente à elle seule 20 % du poids sec de la levure et les glycoprotéines représentent 50 % de ce poids (Klis, 1994). Dans la paroi, 12 % du mannose peut être libéré par β -élimination (réaction chimique permettant de libérer de manière spécifique les glycannes liés par un résidu sérine ou thréonine par une liaison O-glycosidique) ; ainsi, ces mannoses sont donc liés de manière O-glycosidique sur une sérine ou une thréonine. Les 88 % restants sont donc liés à l'Asn par l'intermédiaire du N, N'-diacétyl-chitobiose (Klis, 1994).

III.4.2. Les enzymes levuriennes

L'invertase (EC 3.2.1.26 ; β -D-fructofuranoside fructohydrolase) enzyme qui hydrolyse le saccharose, existe chez *S. cerevisiae* sous deux formes : une forme glycosylée externe et une forme non-glycosylée interne (Gascon et al., 1968). La forme glycosylée possède une masse de 97 kDa, et 50 % de cette masse est représentée par les mannoses (Zeng et Biemann, 1999). Cette enzyme contient 14 sites potentiels de glycosylation ; en réalité sur ces 14 sites, 13 sont glycosylés. Cette invertase possède une hétérogénéité de glycosylation. Ainsi, quatre sites ont une glycosylation de type oligomannosidique avec de longues chaînes de mannoses contenant plus de 30 mannoses, les neuf autres sites possédant des glycannes plus petits avec des chaînes inférieures à 20 mannoses (Zeng et Biemann, 1999).

Etude Bibliographique

La phosphatase acide est une enzyme extracellulaire qui est excrétée dans l'espace périplasmique. L'enzyme active est un dimère. Chacune des sous-unités porte huit N-glycannes de type oligomannosidique (Barbaric et al., 1984). L'enzyme fait apparaître en électrophorèse SDS-PAGE une tache diffuse comprise entre 82 et 165 kDa, dénotant une forte hétérogénéité de glycosylation (Barbaric et al., 1984). Cette hétérogénéité a d'ailleurs été démontrée par Kozulic et al. (1984) qui observent que, sur les huit sites glycosylés, cinq sont glycosylés avec des petits glycannes constitués en moyenne de 14 unités mannose. Les trois sites restants le sont avec de gros glycannes oligomannosidiques avec, respectivement, 48, 92 et 150 unités mannoses. De plus, un traitement avec l'endo H (enzyme de déglycosylation) provoque la perte de l'activité enzymatique par suite de la désorganisation structurale. Ce traitement rend également l'enzyme très sensible à l'action des protéases (Barbaric et al., 1984).

La carboxypeptidase Y (CPY) est une enzyme dont la masse varie entre 53 et 61 kDa selon l'origine de la souche (Margolis et al., 1978). L'étude de diverses préparations enzymatiques montre que la composition en acides aminés est stable, alors que le pourcentage de sucres (9 à 20 %) et le rapport Man / GlcNAc sont variables, indiquant une variabilité de la glycosylation (Margolis et al., 1978). Cette enzyme vacuolaire intervient dans la digestion des nutriments et joue un rôle dans les phénomènes d'autolyse des levures en permettant la libération des acides aminés (Behalova et Beran, 1979).

III.4.3. Flocculation et agglutination sexuelle

Les mannoprotéines jouent un rôle important dans l'agglutination sexuelle des levures. Ainsi chez *S. cerevisiae*, la conjugaison de deux partenaires haploïdes, de type α et a, passe par une étape d'agrégation des cellules faisant intervenir des agglutinines de nature O-glycoprotéique (Lipke et Kurjan, 1992).

IV. LES GLYCOPROTEINES DES MOÛTS ET DES VINS

IV.1. Généralités

Comme nous l'avons évoqué plus haut, la teneur en protéines des moûts et des vins peut très largement varier en fonction de divers paramètres, tels que le cépage, les pratiques culturales, le millésime, la maturation des raisins ainsi que les méthodes de vinification. Ces variations peuvent également être reliées aux méthodes de dosage utilisées. En effet, des composés du vin, les polyphénols ou l'éthanol, sont susceptibles d'interférer avec les méthodes de dosage (Marchal et al., 1997), rendant difficile la détermination de la teneur en protéines totales des moûts et des vins.

L'étude plus particulière des glycoprotéines des vins a fait l'objet de nombreuses publications. Ainsi, Hsu et Heatherbell (1987 a et b) démontrent la présence de telles molécules dans le vin. En réalisant une électrophorèse dénaturante (LDS-PAGE), puis un transfert sur filtre de nitrocellulose et enfin une révélation par la concanavaleine A (Con A) couplée à la peroxydase, ces auteurs montrent la présence, dans un vin de Gewürztraminer, de trois glycoprotéines ayant des masses moléculaires, respectives, de 12,5, 25 et 28 kDa. Ils démontrent également la présence de ces mêmes glycoprotéines dans un vin de Riesling à l'exception de la plus petite fraction qui n'est pas détectée. Ces fractions glycoprotéiques ont une gamme de points isoélectriques variant de 4,1 à 5,8, et sont largement impliquées dans l'instabilité protéique des vins. De plus, ces mêmes auteurs démontrent, qu'après un traitement à la bentonite (50 à 80 g/hL), traitement utilisé pour éliminer les protéines du vin, ces fractions glycoprotéiques deviennent pratiquement indétectables.

En utilisant la même technique, Tusseau et van Laer (1993) démontrent la présence de deux complexes protéines-polysaccharides dans des moûts et des vins de Champagne, ayant des masses moléculaires respectives de 10 kDa et 15-28 kDa. Ces fractions pouvaient de nouveau être éliminées par un traitement à la bentonite. Ces complexes protéines-polysaccharides semblent donc correspondre, en partie tout au moins, à ceux décrits précédemment par Hsu et Heatherbell (1987 a et b).

Paetzold et al. (1990) publient des résultats assez similaires concernant les glycoprotéines d'un moût de Sauvignon. Ils séparent d'abord les protéines par une technique de chromatofocalisation en sept fractions et démontrent que ces fractions protéiques sont étroitement liées à des glucides du fait de leur double réponse positive en ultraviolet ainsi qu'en réfractométrie. Par la suite, ils soumettent ces fractions à une hydrolyse acide (TFA) des sucres, suivie d'une dérivation (TMS). Ils analysent ensuite les dérivés triméthylsilylés en chromatographie en phase gazeuse (CPG) et identifient du glucose, du mannose, du galactose et de l'arabinose. On peut s'étonner, au passage, qu'ils dénomment ces fractions « glycoprotéines » sans trouver, dans l'analyse des sucres, la présence de GlcNAc, constituant obligatoire des N-glycannes, ni d'ailleurs de fucose ou de xylose, monosaccharides habituellement constitutifs des glycannes végétaux.

Yokotsuka et al. (1991) observent, quant à eux, après électrophorèse PAGE puis révélation avec la coloration de Schiff (PAS) (Zaccharius et al., 1969) que toutes les protéines d'un moût et la plupart des protéines du vin correspondant (cépage Koshu) sont des glycoprotéines. De nouveau, il faut noter que cette technique PAGE non dénaturante ne permet pas de dissocier les complexes protéines-polysaccharides non-covalents et qu'il apparaît de ce fait hâtif de parler de réelles glycoprotéines.

Il faut attendre Yokotsuka et al. (1994) et Yokotsuka et Singleton (1997) pour qu'il y ait identification de GlcNAc dans des fractions isolées du vin. En effet, ces auteurs mettent en évidence certains sucres caractéristiques des glycoprotéines tels que la GlcNAc, le mannose ou le fucose. De plus, ils observent que la proportion des sucres par rapport à la fraction polypeptidique est moindre (de l'ordre de 0,3 à 33 % selon les fractions), ce qui plaide en faveur de la réelle nature glycoprotéique de ces fractions isolées du vin. Ces auteurs observent également une diminution de la teneur en sucres des fractions protéiques tout au long de la vinification. Ceci pourrait s'expliquer par l'existence d'une activité glycanase dans les moûts fermentés. Le cœur protéique lui ne subit aucune modification au cours de la fermentation, ce qui semble en accord avec l'observation de Waters et al. (1992), selon laquelle les glycoprotéines du vin sont résistantes aux dégradations protéolytiques.

Ces mêmes auteurs (Waters et al., 1993) isolent et caractérisent, à partir d'un vin blanc australien (Muscat d'Alexandrie), une molécule capable de protéger ce vin contre les troubles

Etude Bibliographique

protéiques. Cette molécule de haut poids moléculaire, notée HPF (« haze protective factor ») est constituée d'une petite partie protéique (4 %) riche en sérine et en thréonine et d'une très forte partie glucidique (96 %) constituée en grande majorité de mannose (78 %). En raison de sa composition et de ses caractéristiques en SDS-PAGE (coloration au PAS mais pas avec le BBC), les auteurs suggèrent, dans un premier temps, que cette glycoprotéine est une mannoprotéine d'origine levurienne. Ils isolent également le même type de glycoprotéine à partir d'un vin rouge (Waters et al., 1994 a). Ils observent que cette mannoprotéine levurienne a une masse moléculaire de 420 kDa avec une partie glucidique qui représente 70 % de la protéine. De plus, elle possède les deux types de glycosylation : 60 % des glycannes sont liés de manière O-osidique, le reste des mannoses étant lié de manière N-osidique. Cette mannoprotéine est libérée par la levure en cours de fermentation alcoolique et lors de l'élevage sur lies (Dupin et al., 2000).

A côté des mannoprotéines levuriennes, d'autres composés riches en sucres mais d'origine végétale sont présents dans le vin : il s'agit des arabinogalactanes-protéines (AGP). Ainsi, Brillouet et al. (1990) et, plus récemment, Waters et al. (1994 b) ainsi que Pellerin et al. (1995) ont isolé ce type de macromolécules de vins rouges. Ces polysaccharides sont également présents dans les vins blancs (Pellerin et Cabanis, 1998). Ces macromolécules ont une masse moléculaire élevée, supérieure à 200 kDa, et sont composées essentiellement de polysaccharides complexes et ramifiés, constitués de chaînes linéaires d'arabinose liés en $\beta(1, 3)$ sur une ossature polymérique constituée de $\beta(1, 6)$ galactose (Brillouet et al., 1990 ; Pellerin et al., 1995). Ces chaînes glucidiques sont fixées sur une petite partie protéique qui peut représenter de l'ordre de 4 à 13 % en poids de la molécule totale.

Il faudra attendre Marchal et al. (1996) pour avoir la démonstration de la présence de réelles glycoprotéines dans les vins de Champagne. Ces auteurs isolent sept protéines (comprises entre 14 et 62/64 kDa) d'un vin de base champenois sur colonne de lectines immobilisées Con A. De plus, cinq de ces sept protéines présentent une double affinité Con A/LCA (*Lens culinaris* agglutinine). En outre, ils traitent une protéine (qu'ils nomment « protéine 24/25 kDa » ayant un point isoélectrique de 3,9), par la PNGase F (enzyme de déglycosylation), et observent une perte de masse de l'ordre de 3100 Da. Cette perte étant bien le résultat d'une déglycosylation, Marchal et al. (1996) mettent donc en évidence la présence de véritables glycoprotéines dans le vin.

Ruiz-Larrea et al. (1998) observent que, dans un vin espagnol de Viura (issu de *Vitis vinifera* L. cv. Viura), seules les protéines ayant une masse moléculaire supérieure à 32 kDa sont sensibles à un traitement par une glycosidase, l'endo H. Ils en concluent que seules ces protéines de haut poids moléculaire sont de nature glycoprotéique.

Berthier et al. (1999) isolent, quant à eux, à partir d'un moût de Chardonnay, une lectine monomérique qui semblerait, du fait de son affinité pour la Con A, être une glycoprotéine. Cette lectine possède une masse moléculaire d'environ 13 kDa et une gamme de points isoélectriques comprise entre 4,1 et 4,9. Cependant, cette lectine végétale est éliminée lors du processus de vinification.

Une autre classe de protéine a été isolée du vin et semble jouer un rôle très important, notamment, dans l'apparition du trouble protéique : il s'agit des protéines de défense ou PR-protéines (« pathogenesis-related proteins ») (Waters et al., 1996). Ces protéines ont des caractéristiques biochimiques bien précises : elles ont une masse moléculaire assez faible, des points isoélectriques bas et une forte résistance à la dégradation protéolytique (Waters et al., 1992, 1995). Ainsi Waters et al. (1996) isolent d'un vin blanc du cépage Muscat d'Alexandrie plusieurs fractions protéiques. Certaines de ces fractions possèdent une grande homologie de séquence entre leur partie N-terminale et celles de PR-protéines issues d'autres plantes, notamment avec des chitinases et des « thaumatin like proteins ». Monteiro et al. (2001) parviennent à la même conclusion mais, cette fois, à partir de polypeptides isolés de deux vins blancs portugais (Moscatel et Arinto). Ces deux familles de protéines représentent d'ailleurs la majorité des protéines de certains moûts ; ainsi selon Pocock et al. (2000), elles pourraient représenter de l'ordre de 80 à 100 % des protéines totales. Ces PR-protéines sont localisées essentiellement dans la peau des baies de raisin. Elles sont extraites notamment lors de la dilacération des baies survenant lors des vendanges mécaniques et cette extraction est d'autant plus efficace que le transport de la vendange est long entre le vignoble et le centre de pressurage (Pocock et al., 1998). Manteau et al. (2003) confirment ces résultats et montrent la présence de deux PR-protéines, une chitinase (CHV 5) et une « thaumatine-like » (TL), dans un moût de Pinot Noir champenois. La concentration de ces deux PR-protéines diminue progressivement tout au long du processus de vinification jusqu'à leur disparition totale dans le produit final, le Champagne.

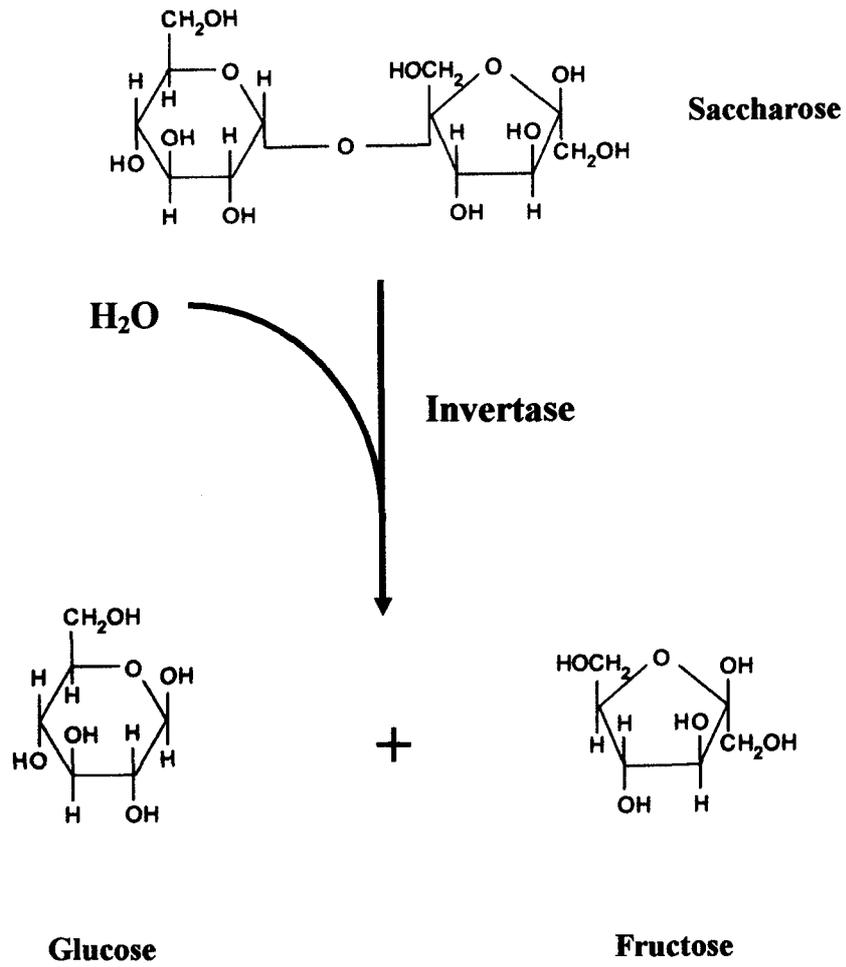


Figure 16 : Schéma d'hydrolyse du saccharose par l'invertase.

Etude Bibliographique

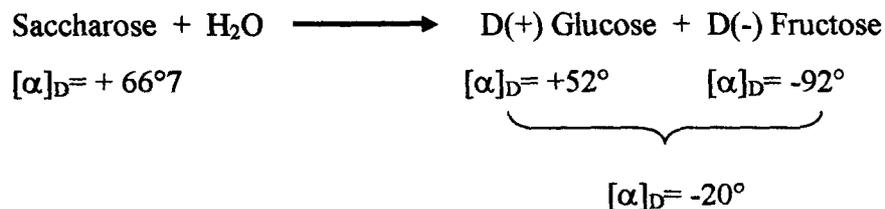
La littérature fait donc état de la présence de glycoprotéines dans les vins. Ces protéines, présentant à la fois une partie hydrophile glycannique et une partie hydrophobe protéique, pourraient présenter de bonnes propriétés aux interfaces et donc participer aux caractères de mousse d'un vin de Champagne. Certaines glycoprotéines des vins sont également des enzymes. C'est le cas de l'invertase de raisin, qui est une β -fructofuranosidase fructohydrolase et dont la présence a été démontrée dans les vins en quantité relativement importante (Nakanishi et Yokotsuka, 1990). Il nous a donc semblé intéressant, du fait de son abondance, de sa nature glycoprotéique (Ruffner et al., 1995) et de son activité enzymatique, de l'étudier plus précisément.

IV.2. L'invertase

IV.2.1. Généralités sur les invertases végétales

L'invertase (EC 3.2.1.26, β -fructosidase) est une enzyme ubiquitaire qui hydrolyse le saccharose (sucrose), son substrat principal, diholoside non-réducteur constitué d'une molécule de glucose et d'une molécule de fructose toutes deux liées par une liaison ($\alpha 1 \rightarrow \beta 2$) (figure 16).

Par cette hydrolyse, l'invertase provoque l'inversion du pouvoir rotatoire entre le substrat (saccharose, dextrogyre) et le produit (mélange glucose et fructose, lévogyre), d'où le nom de sucre inversé pour ce mélange et par extrapolation invertase pour l'enzyme.



Du fait de son action, l'invertase joue un rôle primordial chez les plantes. En effet, le saccharose, qui est synthétisé au niveau des feuilles (organes photosynthétiques) est le résultat de l'assimilation du carbone par la plante et devient ainsi un transporteur de carbone. Le saccharose est ensuite dirigé vers les organes non-photosynthétiques où l'invertase

Etude Bibliographique

l'hydrolyse, libérant ainsi les deux monosaccharides que sont le glucose et le fructose, lesquels peuvent être utilisés ensuite comme source de carbone ou source énergétique. Il faut noter que le saccharose peut être également clivé par une autre enzyme, la saccharose synthase (EC 2.4.1.13) qui est une enzyme cytoplasmique, soit soluble, soit liée à la membrane.

Il existe plusieurs formes d'invertase, chacune des isoformes ayant ses caractéristiques biochimiques propres et une localisation cellulaire particulière (Tymowska-Lalanne et Kreis, 1998). Ainsi, la plupart des espèces végétales possèdent deux isoformes d'invertase vacuolaire, également appelées invertases acides, qui s'accumulent dans le compartiment acide qu'est la vacuole. De plus, il y a présence d'isoformes d'invertase extracellulaire, également appelées invertases liées à la membrane car elles sont liées par des interactions ioniques à la membrane cellulaire. Ces deux types d'invertases ont un pH optimum compris entre 4,5 et 5,0. Ces deux isoformes enzymatiques attaquent le saccharose par le résidu fructose, c'est pourquoi elles sont également dénommées β -fructofuranosidases. Elles sont également capables d'hydrolyser d'autres oligosaccharides contenant un β -fructose, tel que le raffinose par exemple.

A côté de ces deux types, co-existe un troisième type d'invertase possédant également plusieurs isoformes qui, elles, possèdent un optimum d'activité à des pH compris entre 7,0 et 7,8. Ces invertases sont localisées dans le cytoplasme et dénommées invertases alcalines. En revanche, ces enzymes sont très spécifiques du saccharose et ne peuvent hydrolyser que ce substrat.

Voyons maintenant plus en détails les caractéristiques de ces deux classes enzymatiques, les invertases acides (vacuolaires et extracellulaires) et les invertases alcalines (cytoplasmiques).

IV.2.2. Invertases vacuolaires et extracellulaires – Invertases acides

Les invertases acides possèdent une forte affinité pour leur substrat principal, le saccharose, avec des K_m faibles (de l'ordre de quelques millimolaires). L'activité enzymatique est inhibée par addition d'ions métalliques (Hg^{2+} ou Ag^+), ce qui suggère la présence de groupements sulfhydriles au niveau du site catalytique. L'enzyme est également inhibée par les produits d'hydrolyse du saccharose ; ainsi le glucose agit comme un inhibiteur non compétitif et le fructose comme un inhibiteur compétitif. Ces invertases acides sont localisées dans la vacuole et dans la paroi cellulaire, liées à la paroi par des liaisons ioniques.

Les invertases acides sont glycosylées et ont une masse moléculaire comprise entre 55 et 80 kDa (Tymowska-Lalanne et Kreis, 1998). Cependant, la grande majorité des invertases acides possède une masse de l'ordre de 60 kDa. Cette glycosylation ne semble pas être impliquée dans l'activité ou la stabilité enzymatique (Faye et al., 1981). L'analyse en SDS-PAGE de la plupart des polypeptides purifiés montre la présence de fragments protéolytiques. Ainsi, Unger et al. (1994) observent que l'isoforme I de l'invertase vacuolaire de carotte possède une masse moléculaire de 68 kDa. Cependant, ce monomère se fragmente en deux sous-fragments, le fragment N-terminal et le fragment C-terminal, ayant des masses moléculaires respectives de 43 et 25 kDa. Ces deux fragments sont étroitement associés dans des conditions natives. De même, Hashizume et al. (2003) purifient, chez une variété de poire japonaise, deux invertases acides dont l'une d'entre elles, AVII, semble être monomérique avec une masse moléculaire de 80 kDa et donne naissance en SDS-PAGE à deux autres fragments, l'un de 52 kDa et l'autre de 34 kDa. Cette fragmentation ne semble pas être due à une protéolyse accidentelle, mais serait étroitement contrôlée et pourrait jouer un rôle physiologique. Cependant, le rôle exact joué par cette fragmentation n'est pas encore connu.

Ainsi que nous l'avons déjà évoqué, il existe plusieurs isoformes d'invertases acides, chacune des isoformes étant codée par un gène spécifique (Sturm, 1996 ; Tymowska-Lalanne et Kreis, 1998).

Les invertases vacuolaires et pariétales sont synthétisées sous-forme d'une pré protéine (figure 17), avec une longue séquence signal, constituée d'une centaine d'acides aminés, qui est excisée durant son transport et sa maturation. Cette séquence signal est elle-

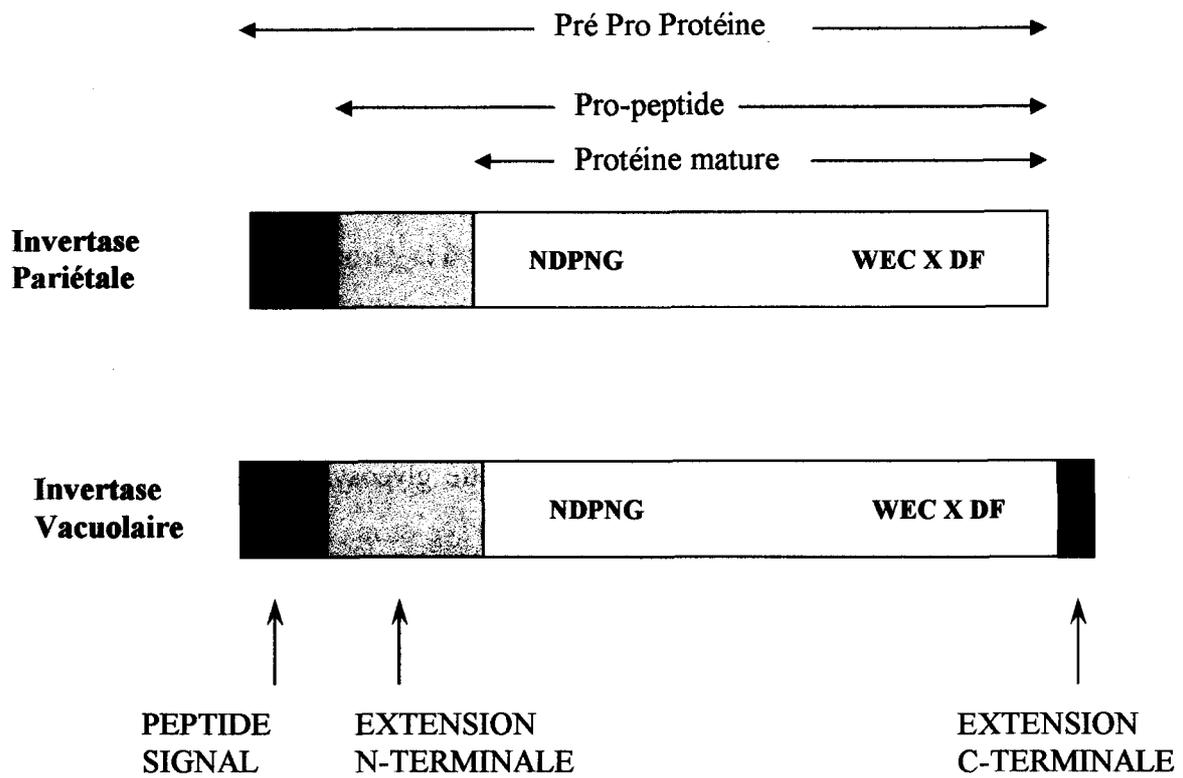


Figure 17 : Représentation schématique de la séquence polypeptidique déduite des ADNc des invertases vacuolaires et pariétales. La séquence NDPNG appelée motif β F est le marqueur des invertases acides des plantes. La séquence WECXDF représente le site catalytique.

Etude Bibliographique

même constituée d'un peptide signal et d'une séquence qui reste fixée à la protéine, l'extension N-terminale. Jusqu'à ce jour, toutes les séquences peptidiques des invertases dérivées des ADNc montrent la présence de ce peptide signal, ce peptide étant nécessaire pour l'entrée de la protéine dans le RE et, plus tard, dans la voie de sécrétion (Blobel, 1980). Ce peptide signal est constitué d'une région basique, d'un noyau hydrophobe d'une vingtaine d'acides aminés et d'une région polaire. Le rôle joué par l'extension N-terminale reste assez flou ; cependant, par analogie avec les autres préproenzymes, on peut penser que cette petite séquence, restant fixée à la protéine, jouerait probablement un rôle dans la régulation de l'activité enzymatique (Hasilik et Tanner, 1987) et/ou dans le repliement et la stabilité protéique (Klionsky et al., 1988) ; elle pourrait également servir d'adressage cellulaire (Klionsky et al., 1988). De plus, on peut observer, au sein de cette séquence polypeptidique, la présence de deux séquences distinctes. La première, proche du côté N-terminal, est un pentapeptide NDPNG : il est appelé motif β F et c'est un marqueur spécifique des invertases acides (Sturm et Chrispeels, 1990). Le second motif, lui, est plus proche du côté C-terminal : c'est un domaine peptidique très conservé et il est constitué d'un résidu cystéine entouré de cinq acides aminés spécifiques (WECXDF ; où X peut être n'importe quel acide aminé). Ces deux domaines, très conservés dans la famille des invertases, seraient des constituants importants du site actif des invertases acides.

La séquence de l'invertase vacuolaire contient, au contraire de l'invertase pariétale, une petite extension du côté C-terminal (figure 17). Cette petite séquence pourrait servir dans l'adressage vacuolaire de cette enzyme (Bednarek et Raikhel, 1992).

Weil et al. (1994) identifient, lors de la purification d'une invertase pariétale à partir d'une suspension cellulaire de tabac, un peptide inhibiteur. Ce petit polypeptide possède une masse de 17 kDa et inhibe, de manière spécifique et pH-dépendante, cette invertase (avec un maximum d'inhibition à pH 4,5 c'est à dire correspondant également au pH optimum d'activité de l'invertase pariétale). Cet inhibiteur peptidique est localisé, tout comme sa cible, dans la paroi cellulaire. La fixation de ce peptide avec sa cible, l'invertase pariétale, est fortement inhibée par de faibles concentrations de saccharose. De plus, ce peptide est capable d'inhiber l'activité de diverses invertases acides végétales, qu'elles soient pariétales ou vacuolaires (Greiner et al., 1998).

IV.2.3. Organisation génomique et régulation

La structure des gènes codant pour les différentes invertases acides suit une même organisation. Ainsi, les gènes sont constitués de six à huit exons, entre lesquels viennent s'insérer six ou sept introns (Tymowska-Lalanne et Kreis, 1998). Dans cette structure, on observe la présence d'un très petit exon (exon 2) qui code pour un tripeptide (DPN). Ce tripeptide fait partie du motif β F, pentapeptide NDPNG très conservé des invertases acides. Jusqu'à présent, seule une invertase vacuolaire isolée de la carotte (InvDC1) (Ramloch-Lorenz et al., 1993) ne présente pas cet exon. Cependant, il a été observé, chez la pomme de terre (Bourney et al., 1996), que, dans des conditions de stress dû au froid, et uniquement dans ces conditions, ce petit exon peut être excisé. Le véritable rôle joué par cette excision n'a pas été pour le moment élucidé.

Sturm (1996) comparent l'organisation de cinq gènes d'invertase chez la carotte et n'observent aucune séquence commune dans la région 5' non codante, laissant supposer qu'il y aurait des modes spécifiques et indépendants de régulation. Ainsi, certains gènes d'invertase acide pourraient être exprimés indépendamment à des temps et des localisations différents durant le développement de la plante (Sturm, 1995, Godt et Roitsch, 1997).

En plus des régulations liées aux organes et au développement de la plante, il existe une régulation de l'expression sucre-dépendante (Xu et al., 1996). On observe la présence de deux types de gène régulés suivant la concentration en sucre : l'un est activé quand la concentration en sucre est élevée, l'autre étant inhibé en présence d'une forte concentration en sucre et, au contraire, activé lorsque cette concentration diminue. Cette régulation est indépendante de la nature du sucre métabolisable (glucose, saccharose ou tout autre sucre métabolisable).

Il peut y avoir également régulation par certaines hormones, telles que l'auxine (Morris et Arthur, 1984), la gibbérelline (Wu et al., 1993) ou les cytokinines (Ehness et Roitsch, 1997). Pour le moment, le rôle exact joué par ces hormones dans la régulation n'est pas très clair. Agissent-elles directement sur l'expression des gènes ou de manière indirecte ? En effet, Ehness et Roitsch (1997) observent, chez des cellules de *Chenopodium rubrum* (chénopode rouge ou patte d'oie rouge), une augmentation, lors de l'addition de cytokinines,

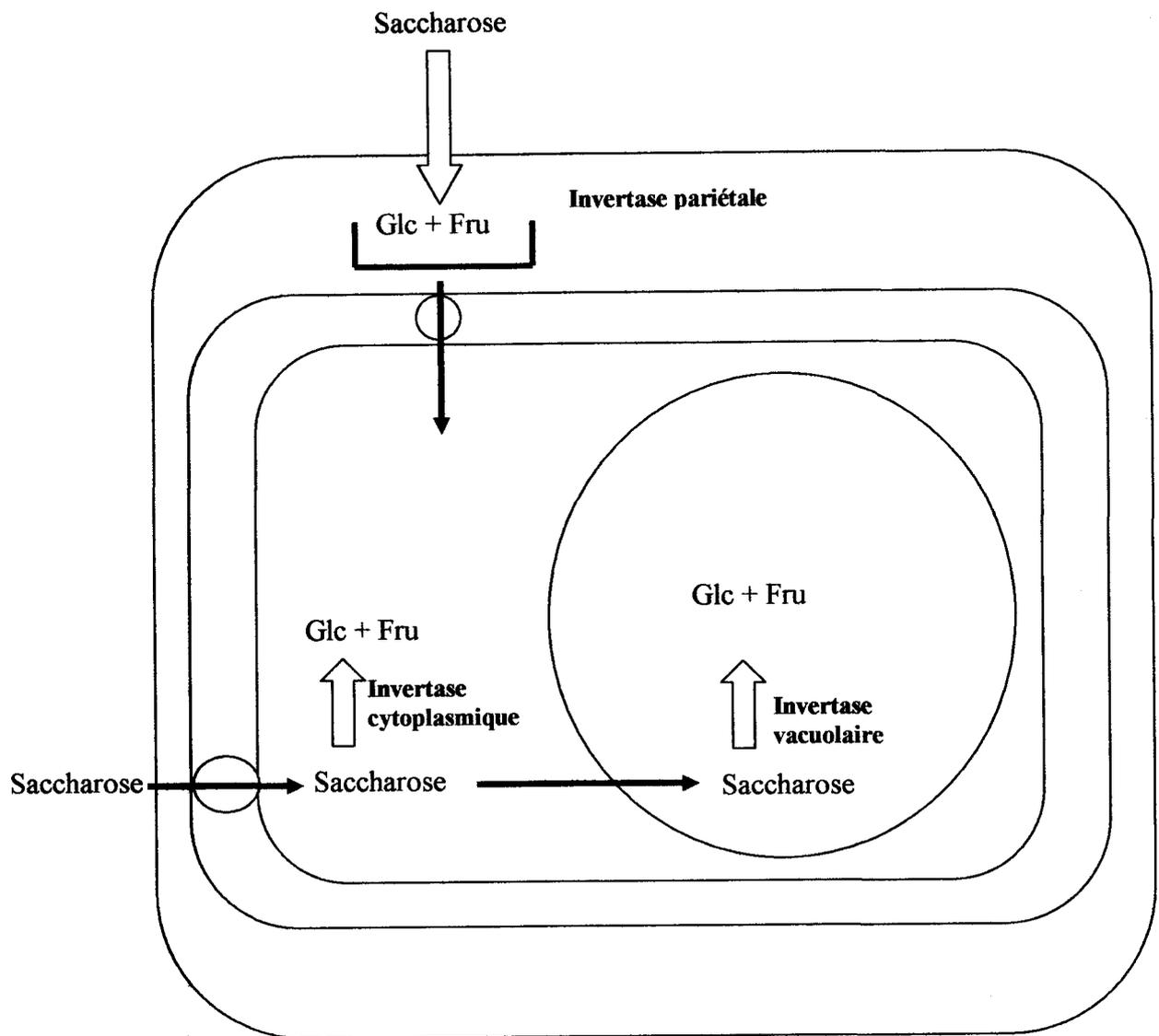


Figure 18 : Localisation cellulaire de l'invertase chez la plante. (D'après Sturm et Tang, 1999)

de l'expression des ARNs messagers de l'invertase pariétale mais également une augmentation parallèle de l'expression des transcrits d'un transporteur de glucose, provoquant par ce biais une augmentation de la concentration en sucre.

IV.2.4. Invertases cytoplasmiques - Invertases alcalines

Ces invertases ont un pH optimum compris entre 7,0 et 7,8 et ne sont présentes que dans le cytoplasme (figure 18). Du fait de l'extrême labilité de ces enzymes, leur purification reste difficile, ce qui explique le peu de connaissances à leur sujet. Cependant, on sait qu'elles ne sont pas glycosylées, qu'elles hydrolysent préférentiellement le saccharose avec une affinité moindre que celle des invertases acides, ces invertases alcalines ayant, en effet, des Km de l'ordre de 10 à 25 mM. Elles sont fortement inhibées par le glucose, le fructose et le tampon Tris. Cependant, au contraire des invertases acides, les ions métalliques n'ont aucun effet sur leur activité enzymatique, ce qui suggère qu'il existe une différence significative dans la structure des sites actifs des invertases acides et alcalines. Elles ont, pour la plupart, une structure tétramérique, constituée de quatre sous-unités identiques ayant des masses moléculaires variant de 54 à 65 kDa. Gallagher et Pollock (1998) ont isolé un ADNc chez *Lolium temulentum* L. (ivraie enivrante ou herbe à couteau) codant pour une protéine ayant une activité invertase neutre ou alcaline. Ils ont introduit ce gène chez une levure mutante ne possédant pas d'activité invertase. Ils ont fait exprimer cette invertase et isolé les clones exprimant cette activité. Ces auteurs ont observé que les extraits cellulaires étaient capables d'hydrolyser le saccharose avec un maximum d'activité dans une gamme de pH allant de 7,0 à 7,5. Cette enzyme, qui n'est pas une β -fructofuranosidase, est inhibée par le fructose et le tampon Tris. Cet ADNc code pour une protéine de 571 acides aminés et de masse moléculaire estimée de 63 kDa.

Parallèlement à cette étude, Sturm et al. (1999) ont également isolé chez la carotte un ADNc codant pour une invertase alcaline. Cette invertase possède 71 % d'homologie (dont 63 % d'identité) avec la séquence codée par *L. temulentum*. La séquence N-Terminale diffère assez largement entre les deux espèces, toutes deux présentant, cependant, une séquence très conservée constituée de 450 acides aminés. Sturm et al. (1999) observent également d'autres différences significatives entre les deux structures et, notamment, la présence dans la séquence de *L. temulentum* de quatre acides aminés NDPN, c'est à dire une séquence

similaire à celle observée dans le motif- β F, marqueur des β -fructofuranosidases acides, mais absente chez la carotte. Ceci laisse donc penser que cette séquence ne semble pas essentielle dans l'activité des invertases alcalines au contraire des invertases acides. Sturm et al. (1999) ont ensuite fait exprimer cette invertase chez *E. coli*. L'enzyme, ainsi exprimée, est riche en résidus cystéine et ne présente aucune similitude de séquence avec les invertases acides. En revanche, il y a une certaine homologie avec des séquences présentes uniquement chez des bactéries photosynthétiques ou des plantes, laissant supposer que ces protéines ont eu un développement indépendant par rapport aux invertases acides. Les invertases alcalines n'ont pas d'activité β -fructofuranosidase et le saccharose semble être leur seul substrat. Des transcrits de ces invertases alcalines ont été détectés dans tous les organes et à chacun des stades du développement des plantes avec, cependant, un maximum d'expression dans les organes en pleine croissance, ce qui suggère qu'il existe une relation croissance / invertase alcaline chez la carotte.

IV.2.5. Rôles et fonctions de l'invertase

L'invertase clive le saccharose, molécule de transport des glucides chez la plupart des végétaux supérieurs, en glucose et fructose, qui sont des hexoses métabolisables. Ces hexoses constituent la source de carbone pour toutes les cellules non chlorophylliennes, alimentant la respiration et les voies de biosynthèse.

Cependant, en comparaison avec les rôles joués par le saccharose chez les végétaux, rôles dans l'osmorégulation et dans la signalisation cellulaire, l'invertase pourrait intervenir dans bien d'autres fonctions. Ainsi, l'invertase pourrait être impliquée indirectement dans le transport du saccharose en permettant l'instauration d'un gradient de concentration dans le phloème. De plus, le clivage du saccharose en fructose et glucose permettrait d'accroître grandement la pression osmotique interne des cellules et, par ce biais, l'invertase pourrait jouer un rôle dans l'élongation cellulaire et la croissance de la plante (Gibeaut et al., 1990).

Dans les tissus en croissance rapide, on trouve une activité invertase très élevée avec de faibles teneurs en saccharose (Ricardo et Ap Rees, 1970 ; Morris et Arthur, 1985 ; Sebkova et al., 1995). En fait, le rôle principal joué par l'invertase est d'hydrolyser le saccharose afin de fournir les sucres utilisables par les tissus en plein développement et qui ont un énorme

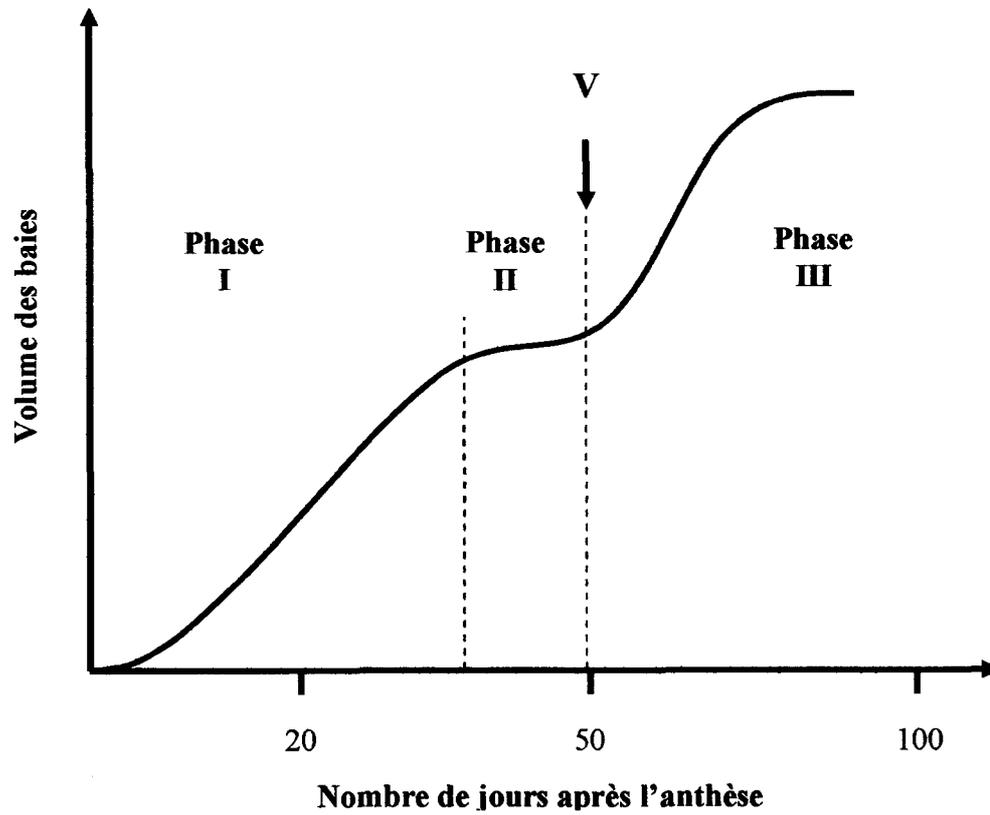


Figure 19 : Courbe de croissance des baies de raisin après l'anthèse (V = véraison). L'anthèse correspond au stade d'ouverture de la fleur. (d'après Coombe, 1992)

besoin en nutriments carbonés. L'action de l'invertase et, notamment, l'invertase pariétale (Chin et Weston, 1973), pourrait également permettre d'approvisionner la cellule en substrats pour la biosynthèse de la paroi cellulaire. Il semblerait que l'invertase vacuolaire et l'invertase pariétale jouent un rôle primordial dans ces phénomènes (Chin et Weston, 1973 ; Morris et Arthur, 1985).

Certes, les tissus en développement ont besoin d'hexoses en tant que sources de carbone et d'énergie, mais ils interviennent également dans les phénomènes d'élongation cellulaire, notamment en agissant sur la pression osmotique.

L'invertase joue également un rôle important dans la réponse à l'infection par un pathogène (Roitsch et al., 2003). Ainsi, on observe une augmentation de l'activité invertase, en réponse à une infection de la plante par un organisme pathogène (bactérie ou champignon) (Benhamou et al., 1991). De nombreux gènes sont alors activés en réponse à cette infection. On observe, en conséquence, la synthèse et l'accumulation de métabolites secondaires ainsi qu'une large gamme de protéines, incluant les protéines de défense (PR-protéines), des inhibiteurs enzymatiques, des enzymes hydrolytiques ou des enzymes des métabolismes secondaires (Benhamou et al., 1991). Ainsi, Sturm et Chrispeels (1990) observent, chez des cellules racinaires de carotte infectées par le pathogène bactérien *Erwinia carotovora*, une augmentation importante des transcrits de l'invertase avec un maximum une heure après le contact, suivie d'une chute assez rapide. L'induction des gènes est uniquement limitée à la zone d'infection (Benhamou et al., 1991).

IV.3. L'invertase du raisin

Chez la vigne (cv *Vitis vinifera*), comme chez la plupart des végétaux supérieurs, le carbone assimilé au niveau des cellules sources (cellules photosynthétiques) est acheminé vers les cellules hétérotrophiques sous forme d'un disaccharide, le saccharose. Ainsi, le saccharose est transporté des feuilles, au travers du phloème, vers la baie de raisin (Coombe, 1992 ; Mullins et al., 1992).

La croissance de la baie de raisin est constituée de trois phases bien distinctes et possède un profil en double sigmoïde (Coombe, 1992) (figure 19). La phase initiale est une phase de croissance herbacée de la baie, qui se traduit par une augmentation rapide de la taille

de la baie. Cette phase est suivie par une période durant laquelle il n'y a aucune augmentation du volume de la baie de raisin, période correspondant à la phase de maturation des pépins. Ensuite, survient une deuxième phase de croissance durant laquelle prennent place les phénomènes de maturation (figure 19). Pendant cette phase qui débute à la véraison, le développement de la baie est certes caractérisé par une accélération de la croissance du fruit mais également par un ramollissement de la baie, une accumulation d'hexoses (glucose et fructose), une diminution de la quantité d'acides organiques et un changement de couleur de la baie dû, en particulier, à une accumulation d'anthocyanes chez les cépages noirs. Le glucose et le fructose sont les principaux sucres accumulés dans la baie de raisin ; en effet, ils représentent à eux seuls plus de 90 % des sucres d'un jus de raisin (Winkler et al., 1974) et 20 % du poids frais d'une baie mûre (Davies et Robinson, 2000). Ces deux hexoses proviennent du clivage du saccharose, produit de la photosynthèse, dans la baie de raisin où ils s'accumuleraient en quantités à peu près égales (Kliwer, 1965) ; en effet le rapport de ces deux sucres est en général voisin de un avec une légère prédominance du fructose. L'accumulation d'hexoses dans la vacuole de la baie, sous forme de glucose et de fructose, débute donc dès la véraison (Coombe, 1989) et se poursuit de manière exponentielle tout au long de la maturation (Maujean et al., 1987).

L'invertase (β -fructosidase ; EC 3.2.1.26) est l'enzyme qui catalyse le clivage du saccharose en ses deux monosaccharides constitutifs que sont le glucose et le fructose. Dans la baie de raisin, cette enzyme serait responsable de cette réaction et donc, responsable de l'accumulation de ces deux hexoses dans la vacuole du raisin. En effet, During et Alleweldt (1984) observent une augmentation de l'activité de l'invertase parallèlement à l'accumulation des hexoses dans la baie de raisin. Ces données sont d'ailleurs comparables aux observations effectuées chez la tomate (Stommel, 1992). En effet, la tomate accumule de grandes quantités de glucose et de fructose et Stommel (1992) observe qu'une forte activité de l'invertase est concomitante d'une faible concentration en saccharose, et réciproquement (Ohyama et al., 1995). De plus, Pérez et Gomez (2000) observent, après stimulation de baies de Sultana par l'acide gibbérellique (GA_3), une augmentation de la taille des baies traitées. Ils mettent également en évidence une corrélation entre la teneur en hexoses (glucose et fructose) et l'activité invertase, et une augmentation de ces deux valeurs lors de la croissance de la baie (Pérez et Gomez, 2000).

Hawker (1969a) observe, dans la baie de Sultana, une augmentation de l'activité enzymatique de l'invertase immédiatement après la floraison. Cette activité enzymatique

Etude Bibliographique

atteint son maximum huit à neuf semaines après, lors de la véraison, entraînant une accumulation rapide d'hexoses dans la baie.

Par comparaison avec d'autres espèces végétales, où l'on observe la présence de plusieurs isoformes d'invertases : acides (vacuolaire ou liée à la membrane) ou basique (cytoplasmique), il semblerait exister également, chez *Vitis vinifera* L., plusieurs types d'invertase. En effet, les invertases de raisin isolées principalement de cépages blancs sont présentes sous deux formes bien distinctes : une forme soluble et une forme insoluble (liée à la membrane) (Arnold, 1965 ; Hawker, 1969b, Ishikawa et al., 1989, Ruffner et al., 1995). On observe, cependant, une représentation prédominante de l'activité enzymatique liée à la fraction soluble par rapport à la fraction insoluble (Ishikawa et al., 1989), même si quelques variations peuvent apparaître suivant le protocole d'extraction utilisé. Ainsi, la fraction soluble regroupe à elle seule plus de 90 % de l'activité enzymatique observée (Ishikawa et al., 1989, Ruffner et al., 1995). En outre, Ishikawa et al. (1989) isolent de la baie de raisin (*Vitis vinifera* L. cv. Delaware) quatre isoformes d'invertase solubles, différenciées par leurs caractéristiques biochimiques observées lors de leur purification, après une chromatographie échangeuse d'ions (DEAE) puis une chromatographie sur colonne de lectines immobilisées (concanavaleine A). Elles possèdent également des pH optimums différents, compris dans une gamme allant de 3,5 à 5,0. Ce sont toutes des β -fructofuranosidases et elles sont inhibées par les ions métalliques, mais également par les produits réagissant avec les groupements thiols tel que le pCMP (acide *p*-chloromercuriphénylsulfochromique) ou le NEM (*N*-éthyl maléimide) (Ishikawa et al., 1989).

D'autres travaux ont permis de purifier et de caractériser des invertases issues de divers cépages. Ainsi, Nakanishi et Yokotsuka (1990) testent l'activité enzymatique dans des jus de raisin provenant de quatorze variétés différentes de raisins, de cépages blancs ou noirs, ainsi que dans les vins correspondants. Ils observent des différences significatives de cette activité enzymatique d'un cépage à l'autre. Ces auteurs constatent de plus que l'activité de l'invertase est encore présente dans le vin correspondant, bien qu'elle diminue après la vinification, cette chute d'activité étant généralement de l'ordre de 30 % par rapport à celle observée dans le moût. Ces activités enzymatiques, dosées à partir d'extraits bruts, possèdent des pH optimums compris entre 3,5 et 4,0, une température optimum de l'ordre de 75 °C ainsi qu'une forte stabilité vis à vis de l'éthanol, des pH bas et de la température. Lors de cette étude, Nakanishi et Yokotsuka (1990) purifient une invertase d'un jus de raisin de Sémillon. Cette invertase possède une masse moléculaire, estimée en SDS-PAGE, de 65 kDa ; de plus, elle est glycosylée et possède un pHi de 4,2.

Nakanishi et al. (1991), quant à eux, isolent une invertase acide d'un vin de Sémillon. Cette invertase possède les mêmes caractéristiques biochimiques que celle purifiée à partir du jus de raisin de Sémillon (Nakanishi et Yokotsuka, 1990). De plus, ces deux invertases possèdent des compositions en acides aminés et en sucres identiques. De ce fait, ils suggèrent que ces deux enzymes sont identiques. Ainsi, l'invertase issue du moût serait stable tout au long du processus de vinification et se retrouverait dans le vin où elle serait encore active.

Porntaveewat et al. (1994) isolent également une invertase mais, cette fois, à partir d'un jus de raisin de Muscat Bailey A. Cette enzyme possède des caractéristiques biochimiques identiques aux invertases précédemment purifiées (Ishikawa et al., 1989, Nakanishi et Yokotsuka, 1990 ; Nakanishi et al., 1991). Ils démontrent que cette glycoprotéine possède une masse moléculaire en gel filtration égale à 72 kDa. Cependant, lorsqu'ils soumettent cette invertase à une analyse en SDS-PAGE, ils montrent qu'elle se fragmente en trois bandes distinctes ayant des masses moléculaires respectives de 56, 25 et 24 kDa. Ruffner et al. (1995) observent également ce même type de fragmentation lorsqu'ils soumettent l'invertase purifiée à partir d'un hybride Riesling x Sylvaner, à un chauffage avant analyse en électrophorèse SDS-PAGE. Ainsi, l'enzyme native, possédant une masse de 60 kDa, laisse apparaître après chauffage un fragment vers 25 kDa. Cette fragmentation de l'invertase est également observée chez d'autres espèces végétales (Krishnan et Pueppke, 1990 ; Arai et al., 1991, Unger et al., 1992, Konno et al., 1993). Le rôle joué par cette fragmentation reste pour le moment assez flou (Sturm, 1999). Ces deux fragments sont glycosylés. Cependant, ils ont une sensibilité différente vis à vis de la PNGase F (N-Glycosidase F, enzyme de déglycosylation). Le fragment natif de 60 kDa y est insensible tandis que le fragment de 25 kDa est déglycosylé par cette enzyme. Ceci suggère que ces deux fragments ont une glycosylation différente avec, pour la fraction 60 kDa, la présence de résidus xylose ou fructose sur la GlcNAc proximale du noyau des N-glycannes, lui conférant ainsi une résistance à la déglycosylation par la PNGase F. De plus, Ruffner et al. (1995) observent une différence dans le nombre de fragments formés lors du chauffage en fonction de l'origine de l'invertase (baies ou feuilles). Ces auteurs suggèrent qu'il existerait une hétérogénéité de glycosylation entre les deux formes ainsi qu'une compartimentation différentielle (Ruffner et al., 1995).

Davies et Robinson (1996) ont cloné par PCR, à partir de baies de *Vitis vinifera* L. cv. Sultana, deux ADNc (GIN1 et GIN2). Les deux séquences protéiques (figures 20a et 20b) déduites de ces deux ADNc sont à 62 % identiques l'une à l'autre et semblent être, toutes deux, des formes vacuolaires de l'invertase. Elles sont constituées de 642 acides aminés pour

GIN1 (figure 20a) et de 664 acides aminés pour GIN2 (figure 20b). Les auteurs déduisent de ces séquences la masse moléculaire des protéines matures ; ainsi les deux invertases matures (GIN1 et GIN2) auraient la même masse moléculaire de 61 kDa.

Les auteurs démontrent ensuite que les deux gènes sont exprimés dans divers types tissulaires comprenant les baies, les feuilles, les racines, les pépins et les fleurs. Cependant, ils observent que ces deux gènes ont des types d'expression bien distincts. Davies et Robinson (1996) suivent ensuite l'évolution des transcrits de ces deux gènes, GIN1 et GIN2, tout au long du développement de la baie. Ils constatent ainsi que l'activité de l'invertase s'accroît à partir de la floraison, qu'elle atteint son maximum huit semaines après et reste constante pendant toute la maturation. Ils observent également que l'expression, dans les baies, des deux gènes GIN1 et GIN2, qui était élevée pendant le développement des baies, baisse fortement au début de l'accumulation des hexoses. Pour ces auteurs, bien que les invertases vacuolaires soient impliquées dans l'accumulation des hexoses dans la baie, l'expression des gènes de ces invertases précède de quelques semaines le début de l'accumulation des hexoses. En conséquence, les auteurs suggèrent que d'autres mécanismes pourraient être impliqués dans la régulation de ce processus.

Invertase Vacuolaire 1, GIN1 - Vitis vinifera (numéro d'accension : Q9S944) :

642 AA

MDTHHATSHDLLHDEAYAPLPYSPLPDHPVPAGAPALGQRRPLKVCVTLSLMFLV
SLVSFIRVHVTVDNDGPSMEREGRGVAQGVSEKSFLGFSGRRLSYNWTTAMLAW
QRTAFHFQPEKNWMNDPDGPLFHMGWYHLFYQYNPDSAVWGNITWGHAVSRD
MIHWLYLPLAMVPDRWFDLNGVWTGSATILPNGQIIMLYTGDTNDSVQVQNLAYP
ANLSDPLLLHWIKYENNPVMVPPAGIGSDDFRDPTTMWVGADGNWRVAVGSLVN
TTGIVLVFQTTNFTDFELFDGELHGVPGTGM XXXXXXXXXX **FYPVSINGVYGLD TSAHGPG**
IKHVLKASMDDNRHDYYALGEYDPMTDTWTPDDPELDVGIGLRLDYERYYASKTF
YDQVKKRRILYGWISEGDIESDDLKKGWASLQSIPRTLHDNKTGTYL LLLWPIEEV
ESLRTNSTEFEDV LLEPGSIVPLDIGSASQLDIVAEFEVDNETLEAMVEADVIYNCST
SAGAARGALGPFGLLVLADDTLSELTPYFYIAKDTDGSYKTF FCTDL SRSSLAV
DDVDQRIYGSIVPALDDEKPTMRVLVDHSIVEGFSQGGRSCITTRVYPT EAIYGAAR
LFLFNATGVNVTASIKIWEMASADIHPYPLDQP

Figure 20a: Séquence putative déduite du gène d'invertase de raisin (GIN-1 numéro d'accension Q9S944). (D'après Davies et Robinson, 1996).

Invertase Vacuolaire 2, GIN2 - Vitis vinifera (numéro d'accension : Q9S943) :

664 AA

MADPNPARTFADPEDPIIAATVPDHYTPLLDVDPPAGENSRRPLKGFLVILSGLVLV
GLLMALISENGPSVSQDSQQNDLTLNAPAESTNISAQFLEPASRGPSTGVSEKSFR
LHSGVRAPFPWSNTMLTWQRTGYHFQPEKNWMNDPNGPMFYGGWYHFFYQYN
PDAAVWGNIVWGHAVSKDLIEWLHLPLAMVADQWYDTNGVWTGSATLLSDGQVI
MLYTGATNESVQVQNLAYPADLSDPLLVDWVKYPGNPVLVPPPIDDKDFRDPTT
AWYWPDGKWRIAIGSKVNKTGISLVYNTEDFKKYELIEGVLHAVPGTGM ████████ **L**
YPVSLKEDNGLDTSFNGPGVKHVLKASLDDDKNDYYAIGTYSLESGNWTPDNPNL
DVGIGLRYDYGKIFYASKTFYDQNKQRRILWGWIGETDGESADIKKGWASVQSIPR
TVVFDKKTGTNILQWPVAEIKSLRKSSKFKDKLEVGPSSVTLEVEKATQMDITAE
FEIDKEALKRIGESDVEYSCRTSGGSAQRGELGPFGLLLLADEGRCEQTPVYFYVA
KGTDGQLKTFCTDESRLANDVDKRIFGSTVPVIKGEKLSMRILVDHSIIESFAQ
GGRTCITSRVYPTKAIYGAAQLYVFNNATSASITASIQTWAMKSAYIRPYSSHQES

Figure 20b: Séquence putative déduite du gène d'invertase de raisin (GIN-2 numéro d'accension Q9S943).

MDTHHATSH : Peptide Signal supposé ; **DPDG** ou **DPNG** : motifs β -fructosidase ; ████████ : motif contenant la cystéine impliquée dans le site catalytique et la valine adjacente caractéristique des invertases vacuolaires.

NAT : sites potentiels de glycosylation (séquen) sur le modèle [NXS/T].

(d'après Davies et Robinson, 1996).

IV.4. Invertases d'autres origines

La présence d'invertase a été notée chez de nombreuses espèces, chez les plantes supérieures comme nous venons de l'évoquer, mais également chez certaines bactéries, les champignons et chez certains animaux.

Nous allons évoquer uniquement les organismes intervenant ou pouvant intervenir dans les processus de vinification.

La levure (*S. cerevisiae*), champignon unicellulaire, est l'organisme le plus utilisé tant au niveau industriel que scientifique. L'invertase, ou plutôt les invertases levuriennes ont été de ce fait largement étudiées. *S. cerevisiae* possède deux types d'invertase, une forme externe fortement glycosylée possédant une masse moléculaire de 97 kDa (Zeng et Biemann, 1999), localisée dans l'espace périplasmique et, une forme interne non glycosylée (notons que la plupart des autres espèces levuriennes possèdent l'une ou l'autre forme d'invertase). Moine-Ledoux et Dubourdiou (1999) isolent d'un vin blanc, élevé sur lies, un fragment de cette invertase pariétale. Cette mannoprotéine serait re-larguée dans le vin pendant le processus d'autolyse.

Botrytis cinerea, champignon responsable de la pourriture grise, possède également plusieurs invertases. Ainsi, Geissmann et al. (1991) extraient trois fractions contenant chacune une activité enzymatique, une fraction soluble, une autre soluble mais dans un gradient de sel et enfin une troisième qui reste insoluble. L'invertase est exprimée de manière constitutive chez *Botrytis cinerea* (Geissmann et al., 1991). L'enzyme serait localisée à la périphérie des

Etude Bibliographique

tissus fongiques mais ne serait pas secrétée dans le milieu externe (Geissmann et al., 1991). Cette invertase acide aurait une masse apparente de 120 kDa (Ruiz et Ruffner, 2002) et serait fortement glycosylée car retenue sur Con A (Ruffner et al., 1992).

Quant à *Oenococcus oeni*, bactérie lactique responsable de la fermentation malolactique, cet organisme étant incapable de croître sur un milieu dont le seul apport carboné est le saccharose, il semblerait qu'elle ne possède pas d'invertase.

MATERIELS ET METHODES

I. MATÉRIELS

I.1. Macromolécules du moût

Les moûts (jus de raisin) (60 L) de cépage Chardonnay proviennent de la coopérative de Nogent l'Abbesse. Lors du pressurage, les moûts ont été additionnés de SO₂ à 5 g/hL (sous la forme de métabisulfite de potassium) afin de diminuer les phénomènes d'oxydation. Ces moûts n'ont subi aucun traitement œnologique. Après la floculation naturelle (débouillage traditionnel de 24 h), les moûts sont centrifugés à 8 000 g pendant 10 minutes puis concentrés et dialysés contre de l'eau Milli-Q® sur une membrane SGI 30 UFIB en polysulfone hydrophile avec un seuil de coupure à 10 kDa à 4 ° C (chambre froide) sous atmosphère d'azote.

Cette ultrafiltration permet d'éliminer les molécules de petite taille (peptides, acides aminés ainsi que les composés osidiques de faible masse moléculaire) et de récupérer ainsi la fraction macromoléculaire. Cette fraction est ensuite lyophilisée (Sérail CS5L) puis conservée à – 20°C.

I.2. Macromolécules du vin

Après débouillage, le moût de Chardonnay (1998) est soutiré etensemencé par la levure *Saccharomyces bayanus* (LSA) réhydratée. En fin de fermentation alcoolique, le vin subit les mêmes traitements que l'échantillon de moût (voir paragraphe précédent). Pour la réhydratation des levures, le protocole est utilisé est le suivant : 3,2 g de levures sèches actives du genre *S. bayanus* (LSA) sont réhydratées durant 15 min à 32°C dans 500 mL de moût dilué au demi avec de l'eau. 1 litre de moût est ajouté à cette solution, les levures étant ensuite mélangées pendant 15 min à 25°C puis ajoutées dans le moût.

I.3. Macromolécules levuriennes

Afin de purifier les macromolécules d'origine levurienne, il a fallu s'affranchir de toutes « contaminations », c'est à dire de protéines provenant de diverses origines (végétale, bactérienne ou fongique) tout en restant dans des conditions proches de celles rencontrées lors de la vinification. Dans ce but, un milieu synthétique de composition très proche de celle du moût mais exempt de toute molécule d'origine végétale a été fermenté. Ainsi, les colloïdes levuriens sont issus d'un moût synthétique (160 L) fermenté par la levure *S. bayanus* (LSA). Le milieu, dont la composition est donnée dans le tableau 2, contient tous les nutriments nécessaires au développement des levures. Un suivi de densité a été effectué tout au long de la fermentation et, ceci, par des mesures quotidiennes à l'aide d'un densimètre. Lorsque la densité atteint $0,995 \text{ g/cm}^3$, c'est à dire correspondant à la quasi-disparition des sucres fermentescibles, le milieu modèle fermenté subit alors les mêmes traitements que les macromolécules du moût et du vin. Ce protocole nous permet d'obtenir environ 50 mg de colloïdes par litre de vin synthétique.

I.4. Macromolécules bactériennes

Afin d'isoler les macromolécules d'origine bactérienne, des bactéries sont mises à croître dans un milieu synthétique. La souche bactérienne utilisée est la souche *Oenococcus oeni* BL01 (Station Oenotechnique de Champagne Martin Vialatte, Epernay, France). La composition du milieu est donnée au tableau 3. Le pH du milieu est ajusté à $\text{pH} = 4,5$ avec de la soude (NaOH). Le milieu (2L) est ensuiteensemencé à la concentration de 10^7 cellules par millilitre et incubé à 28°C pendant trois semaines. Le milieu subit ensuite les mêmes traitements que ceux précédemment cités pour le moût.

	Composés	Masse/Litre de moût
Sels minéraux (mg)	KH ₂ PO ₄	934,6
	NH ₄ H ₂ PO ₄	561,0
	(NH ₄) ₂ SO ₄	187,0
	MgSO ₄	467,0
	NaCl	93,5
	CaCl ₂	93,5
Vitamines (mg)	Biotine	0,0187
	Inositol	1,87
	Pyridoxal	1,87
	Pantothénate de Ca	1,87
	Thiamine chlorhydrate	1,87
	Acide nicotinique	0,468
Oligoéléments (mg)	H ₃ BO ₃	0,47
	KI	0,094
	FeCl ₃	0,752
	ZnSO ₄	0,188
	CuSO ₄	0,0376
	MnSO ₄	0,376
	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄	0,188
Sucre (g)	Glucose	187,5
Acides (g)	Acide citrique	0,5
	Acide DL-tartrique	3
	Acide DL-malique	6
Facteurs de croissance (mg)	Tween 80	13,5
	Ergostérol	0,3125

Tableau 2 : Composition du moût synthétique mis en fermentation alcoolique.

	Composés	Masse/Litre de milieu
Sels minéraux	K ₂ HPO ₄	1 g/L
	KH ₂ PO ₄	1 g/L
	FeSO ₄	10 mg/L
	MnSO ₄	10 mg/L
	MgSO ₄	100 mg/L
Bases azotées	Adénine	5 mg/L
	Cytosine	5 mg/L
	Guanine	5 mg/L
	Thymidine	5 mg/L
Vitamines	Acide ascorbique	200 mg/L
	Pyridoxal	15 mg/L
	Acide pantothénique	7,5 mg/L
	Acide nicotinique	0,75 mg/L
	Acide folique	0,75 mg/L
	Biotine	0,75 mg/L
	Riboflavine	0,75 mg/L
	Thiamine	0,75 mg/L
Sucre	D-glucose	8 g/L
Acide	Acide L-malique	5 g/L
	Acétate de sodium	1 g/L
Facteur de croissance	Tween	1 mg/L
Acides aminés (en mg/L)		
L-alanine : 300	L-histidine : 500	Proline : 300
L-arginine : 400	L-isoleucine : 200	L-sérine : 400
L-aspartique : 500	L-leucine : 200	L-thréonine : 200
L-cystéine : 200	L-lysine : 500	L-tryptophane : 200
L-glutamine : 500	L-méthionine : 150	L-tyrosine : 100
L-glycine : 200	L-phénylalanine : 200	L-valine : 300

Tableau 3 : Composition du milieu synthétique pour la culture bactérienne.

I.5. Traitements de collage sur moût et sur vin

Tous les essais de collage sont supplémentés avec 60 mg/L de SO₂ pour les vins et 100 mg/L pour les moûts afin d'éviter le départ en fermentation alcoolique et les accidents bactériens.

I.5.1. Traitements de collage sur moût

Après adjonction du produit de collage, le moût de chardonnay trouble est homogénéisé (les doses de produits ajoutées aux moûts sont spécifiées sur le schéma récapitulatif, figure 21). Les cinétiques de clarification sont effectuées à 12 °C et suivies par mesure de turbidité (Hach 2100 AN). Le moût est soutiré, puis soumis à une centrifugation de 5 minutes à 1 000 g. Il est ensuiteensemencé (*S. bayanus*) afin de subir la fermentation alcoolique. Le vin ainsi obtenu est soumis à une stabilisation tartrique, par un passage de trois semaines en chambre froide (4 °C). Le vin stabilisé est ensuite centrifugé 10 minutes à 10 000 g et soumis à une filtration stérilisante sur filtre coupant à 0,45 µm.

I.5.2. Traitements de collage sur vin

Le moût de Chardonnay trouble est fermenté (*S. bayanus*), puis additionné du produit de collage (figure 22), l'ensemble étant homogénéisé. De nouveau, la cinétique de clarification est effectuée à 12 °C et le suivi par mesure des turbidités. Le vin est ensuite soutiré, soumis à une stabilisation tartrique, puis centrifugé (10 minutes à 10 000 g) et enfin filtré sur membrane coupant à 0,45 µm.

Figure 21 : Protocole expérimental des clarifications effectuées sur moût pour l'étude ultérieure des propriétés moussantes, des teneurs en protéines totales et en invertase de raisin

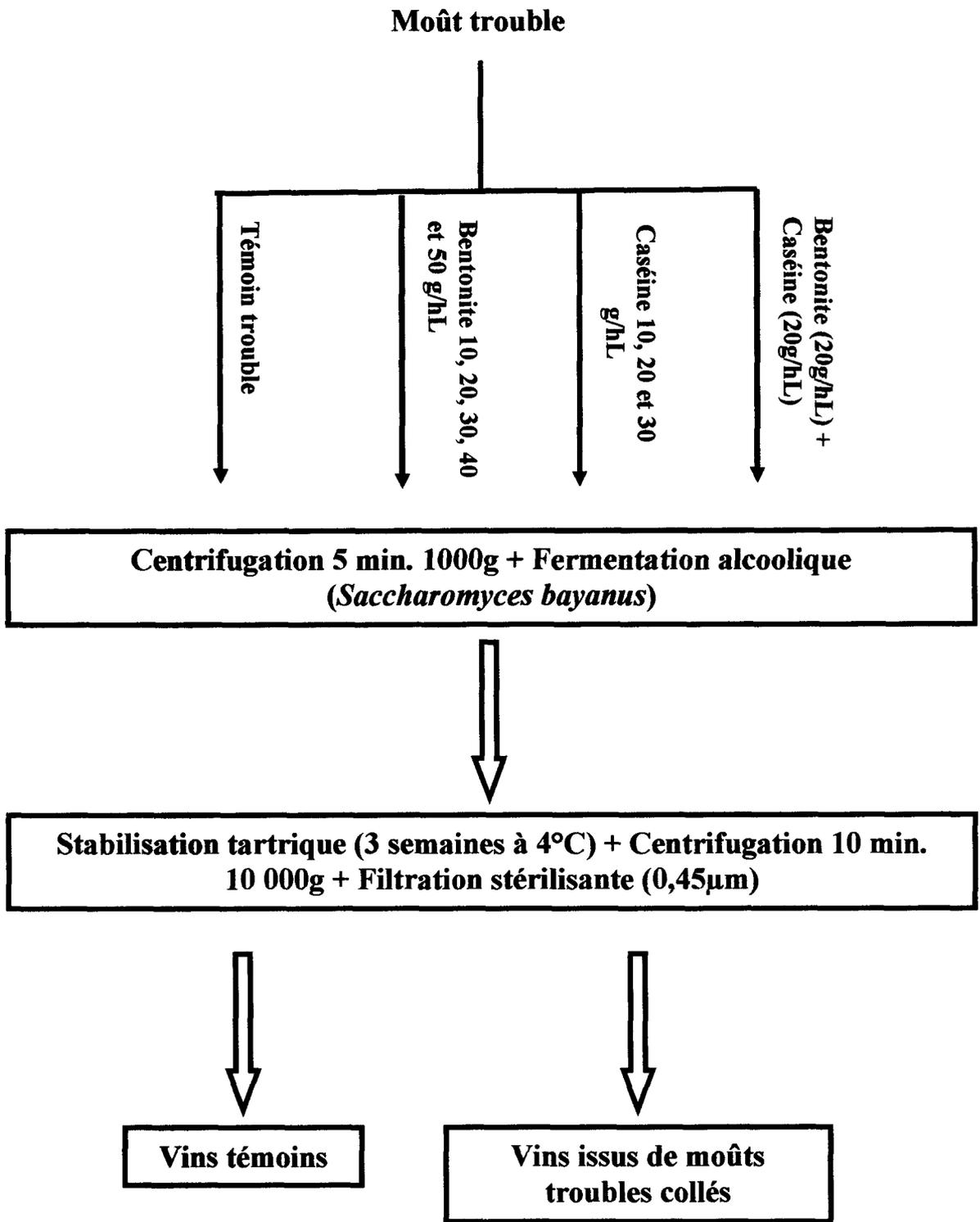
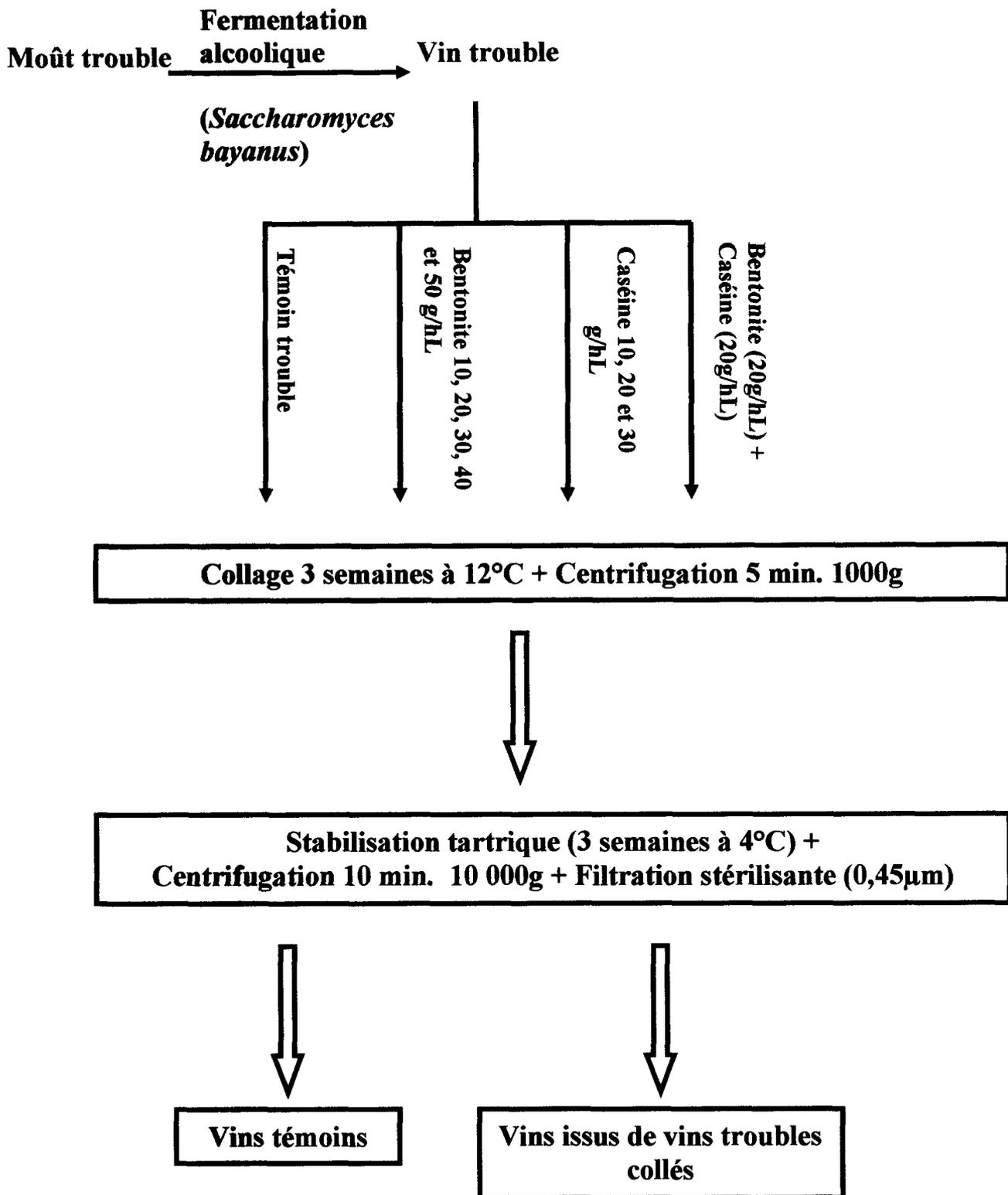


Figure 22 : Protocole expérimental des clarifications effectuées sur vin pour étude ultérieure des propriétés moussantes, des teneurs en protéines totales et en invertase de raisin



II. MÉTHODES

II.1. Méthodes de dosage protéique

Deux méthodes de dosage protéique ont été utilisées : la méthode de Bradford modifiée (Marchal et al., 1997) et la méthode de dosage à l'acide bicinchoninique (Kit BCA Pierce). La première a été utilisée uniquement pour les dosages protéiques sur moûts ou sur vins. La seconde a été appliquée uniquement au dosage des fractions protéiques pré-purifiées ou purifiées.

II.1.1. Méthode de Bradford modifiée (Marchal et al., 1997)

Afin de s'affranchir des interférences liées à la présence de certains composés des moûts et des vins (éthanol, polyphénols), Marchal et al. (1997) ont développé une technique dérivée du dosage de Bradford (1976). Cette technique consiste à ultrafiltrer au préalable le moût ou le vin sur membranes coupant à 10 kDa, à récupérer l'ultrafiltrat et à effectuer un dosage de Bradford directement sur le moût ou le vin puis sur l'ultrafiltrat correspondant. La valeur correspondant à l'ultrafiltrat (provenant des interférences) est alors retranchée à celle du moût ou du vin initial. La valeur ainsi obtenue permet de déterminer la teneur protéique des moûts ou des vins, en mg/L d'équivalent BSA et, ceci, par extrapolation à partir d'une courbe étalon de BSA variant de 0 à 20 mg/L.

Le protocole consiste à ajouter aux 400 μ L de la solution à doser (BSA, échantillons ou ultrafiltrats), 400 μ L d'eau Milli-Q[®], puis 200 μ L de réactif de Bradford concentré (Bio-Rad). Après un temps d'incubation variant de 5 à 10 minutes, la lecture des absorbances de la gamme de BSA à 595 nm est effectuée à l'aide d'un détecteur UV-Visible Saphas. Pour les échantillons (vins ou ultrafiltrats), le temps d'incubation est porté à 50 minutes. La mesure des absorbances est également effectuée à 595 nm. Trois dosages successifs sont réalisés pour chacune des valeurs.

II.2. Dosages des protéines purifiées à l'acide bicinchoninique (BCA)

Ce dosage est effectué en plaques de microtitration (Nunc). Le kit de dosage (Kit Pierce) contient deux solutions prêtes à l'emploi. Le réactif de dosage est préparé en mélangeant 50 volumes d'une solution A (BCA) avec un volume d'une solution B (sulfate de cuivre). 25 μ L d'échantillon ou de standard sont déposés, échantillons auxquels 200 μ L de réactif de dosage (préparé comme précédemment) sont ajoutés. La plaque est agitée pendant 30 secondes, recouverte puis incubée à 37 °C pendant 30 minutes. L'absorbance à 570 nm est mesurée avec un lecteur de microplaques (Model 550 de Bio-Rad). La teneur en protéines est calculée par rapport à une gamme de BSA variant de 0 à 2 mg/L.

II.3. Méthodes de fractionnement des protéines par chromatographie liquide

Les lyophilisats sont repris dans les tampons de fixation appropriés puis filtrés, avant injection, sur filtres Sartorius coupant à 0,3 μ m.

II.3.1. Fractionnement par chromatographie d'échange d'anions

Cette technique chromatographique permet de séparer les protéines en fonction de leurs charges (leurs points isoélectriques).

Les lyophilisats de moût du cépage Chardonnay ou de vins de base sont remis en suspension dans du tampon Tris-HCl 50 mM pH 7,5, puis injectés sur une colonne échangeuse d'anions (DEAE 5 PW Waters, 150 x 5 mm) sur une chaîne moyenne pression Waters 650 E. La colonne est préalablement équilibrée avec du tampon Tris-HCl 50 mM pH 7,5 ; le débit est fixé à 0,8 mL par minute. Les protéines retenues sont éluées de la colonne par un gradient de sels (tampon Tris-HCl 50 mM, pH 7,5 + NaCl 1M). La détection des protéines est effectuée à 280 nm au moyen d'un détecteur UV Spectra Physics SP 100 relié à un système d'acquisition de données (Millenium-32[®] Waters).

II.3.2. Fractionnement par chromatographie d'affinité sur lectines immobilisées

II.3.2.1. Chromatographie d'affinité sur Concanavoline A (ConA)

Les lyophilisats sont repris dans du tampon de fixation Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, NaCl 0,3 M, CaCl₂, MnCl₂, MgCl₂ (1 mM chacun). Ils sont injectés sur une colonne de Con A-Sepharose (Sigma) (150 x 25 mm), préalablement équilibrée avec le tampon de fixation. L'élution des protéines retenues s'effectue en ajoutant, dans le tampon de fixation, le sucre compétiteur à la concentration voulue (α , D-méthyl mannopyranoside à 5 mM ou 300 mM). Le débit de la colonne est fixé à 0,5 mL/min. La détection des protéines est effectuée à 280 nm au moyen d'un détecteur UV Saphas.

II.3.2.2. Concentration et dessalage des solutions protéiques

Les protéines fractionnées par chromatographie sont concentrées et dialysées contre de l'eau Milli-Q[®], au moyen d'unités d'ultrafiltration Centriprep[®]-10 (coupant à 10 kDa) (Amicon).

II.4. Techniques électrophorétiques

II.4.1. Electrophorèses analytiques

Les extraits protéiques sont traités directement par du tampon de solubilisation pour échantillons ou tampon de Laemmli (SDS-PAGE), excepté pour les échantillons destinés à un test d'activité enzymatique en gel de l'invertase auxquels on n'ajoute pas de β -mercaptoéthanol.

II.4.1.1. Electrophorèse SDS-PAGE

Les protéines sont analysées au moyen du système Mini-Protean II[®] (Bio-Rad) en conditions dénaturantes SDS-PAGE (12 %) suivant la méthode de Laemmli (1970). La composition des gels (0,75 mm d'épaisseur) est la suivante :

Gel de concentration :

Le gel de concentration est obtenu en mélangeant 1 mL d'eau, 0,5 mL de solution mère d'acrylamide/bisacrylamide à 30 % (Biorad) et 1,5 mL de tampon Tris-HCl 0,5 M pH = 6,8. La polymérisation est assurée en ajoutant au milieu 4 µL de TEMED (N, N, N', N'-Tétraéthylméthylènediamine) (Bio-Rad) et 8 µL de persulfate d'ammonium (Bio-Rad) à 10 % (p/v).

Gel de séparation :

Le gel de séparation est obtenu en mélangeant 10 mL d'eau, 4 mL de solution mère d'acrylamide/bisacrylamide à 30 % (Biorad) et 2,5 mL de tampon Tris-HCl 1,5 M pH = 8,8. La polymérisation est assurée en ajoutant au milieu, comme précédemment, 5 µL de TEMED (N, N, N', N'-Tétraéthylméthylènediamine) (Bio-Rad) et 40 µL de persulfate d'ammonium (Bio-Rad) à 10 % (p/v).

La migration s'effectue dans un tampon Tris 25 mM, Glycine 192 mM avec 0,1 % de SDS (p/v), sous un voltage de 150 V pendant 40 à 50 minutes. La détermination des tailles moléculaires des protéines séparées par électrophorèse se fait par rapport à des marqueurs de taille standards, ici, avec une gamme de masses moléculaires variant de 14 400 à 94 000 Da (Pharmacia). Si l'électrophorèse est soumise à un électrotransfert sur membrane de nitrocellulose ou colorée au PAS, on utilise alors des marqueurs pré-colorés avec une gamme variant de 19 400 à 104 000 Da (Bio-Rad). En fin de migration, les gels sont colorés au Bleu Brillant de Coomassie R-250 (Sigma) (BBC 0,15 %, acide acétique 10 %, méthanol 50 %), ou par le nitrate d'argent selon la méthode de Wray et al. (1981). Les sucres peuvent être révélés par une coloration au PAS (Riebe et Thorn, 1991). Les échantillons sont repris dans un mélange de solubilisation constitué de 100 µL de tampon Tris pH = 6,8, 100 µL de glycérol, 50 µL de β-mercaptoéthanol et 300 µL de SDS à 10 % (P/V). Dans le cas des électrophorèses

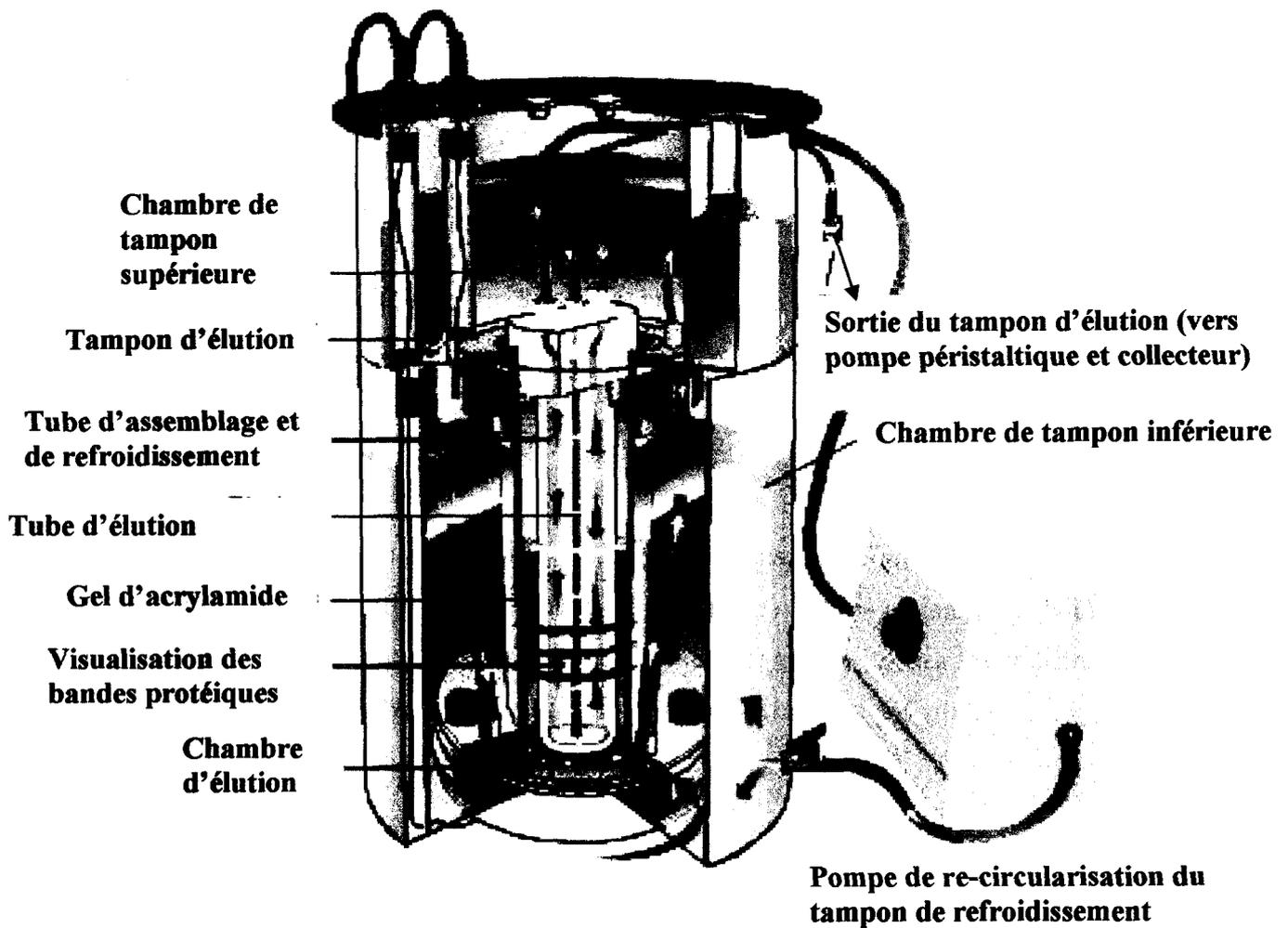


Figure 23 : Schéma descriptif de l'électrophorèse préparative, Prep-Cell modèle 491 (Bio-Rad).

destinées au contrôle de l'activité enzymatique en gel, il n'y a pas ajout de β -mercaptoéthanol. Les marqueurs de tailles subissent le même traitement.

II.4.1.2. Electrotransfert sur filtre de nitrocellulose

Les protéines séparées par électrophorèse analytique sont transférées sur filtre de nitrocellulose (diamètre des pores 0,22 μ m) pour révélation par des méthodes immunochimiques. Les protéines sont transférées sur filtre de nitrocellulose à + 4 °C durant 1h sous un courant électrique de 100 volts. Le tampon de transfert se compose de Tris 25 mM, glycine 190 mM, 20 % de méthanol (Towbin et al., 1979) et 0,04 % de SDS. Afin, de vérifier la bonne qualité du transfert, le filtre est coloré au rouge Ponceau (solution d'acide trichloroacétique à 3 % (p/v) contenant 0,2 % de rouge Ponceau (p/v)).

II.4.2. Electrophorèse préparative SDS-PAGE

Les protéines de moût et de vin peuvent être fractionnées par électrophorèse préparative SDS-PAGE au moyen d'un système Prep-Cell Model 491 (Bio-Rad) (Figure 23). Les protéines sont séparées par SDS-PAGE classique (Laemmli, 1970), mais sur un gel cylindrique. Le gel de concentration (5 mL contenant 4 % d'acrylamide) et le gel de séparation (35 mL contenant 9 % d'acrylamide) sont polymérisés dans un tube d'assemblage d'un diamètre de 37 mm. La chambre supérieure et inférieure ainsi que le réservoir d'élution, sont remplis avec du tampon de migration identique à celui utilisé lors des électrophorèses analytiques. Ce tampon circulant de la chambre inférieure dans le tube de refroidissement avec un débit de 60 mL/min, permet ainsi le refroidissement de l'ensemble. L'électrophorèse préparative est réalisée à 4 °C (chambre froide). L'échantillon (5 mL) est ensuite déposé sur la totalité du gel de concentration. L'électrophorèse est soumise à un courant de 200 V, 40 mA et 12 W (puissance limitante) pendant 16 h. A la sortie du gel, les protéines sont déversées dans la chambre d'élution équipée d'une membrane de dialyse (coupure à 6 kDa) interdisant leur diffusion. Le tampon d'élution qui alimente la chambre est pompé en continu (0,8 mL/min) par une pompe péristaltique et collecté, dès l'arrivée du Bleu de Bromophénol dans la chambre d'élution, grâce à un collecteur de fractions (RediFrac[®], Pharmacia). Les fractions collectées (4 mL) sont ensuite analysées en électrophorèse analytique (Mini-Protean II, Bio-

Rad) et les gels sont colorés par le nitrate d'argent selon la méthode de Wray et al. (1981). Les fractions présentant le même profil électrophorétique sont rassemblées, puis concentrées et dialysées afin d'éliminer le SDS par ultrafiltration sur des unités d'ultrafiltration Centriprep®-10 (Amicon).

II.5. Tests d'activité enzymatique

II.5.1. Contrôle de l'activité enzymatique en gel

Afin de révéler et de visualiser l'invertase en gel d'électrophorèse, les gels sont soumis à une détection d'activité (Ruiz et Ruffner, 2002). Après migration électrophorétique, les gels sont lavés dans de l'eau Milli-Q® sous agitation douce. Ils sont ensuite incubés sous agitation légère dans un bain d'une solution d'acétate de sodium 100 mM, pH = 4,00, contenant du saccharose 0,6 M, pendant 30 à 60 min. Après un court lavage avec de l'eau Milli-Q®, les sucres réducteurs sont visualisés sur le gel par incubation dans un bain de chlorure de 2,3,5-triphényltétrazolium (0,2 % (P/V) dans de la soude chaude 1 M). La coloration est arrêtée par ajout d'acide acétique 1 %. Ainsi, l'activité en gel est déterminée par détection inverse : la présence des sucres, produits de l'activité enzymatique, est ainsi visualisée.

II.5.2. Dosage de l'activité enzymatique β fructofuranosidase en solution

L'invertase (EC 3.2.1.26) ou β fructofuranosidase est une enzyme qui hydrolyse son substrat principal, le saccharose ou sucrose (diholoside non réducteur, constitué d'un glucose lié en α 1, 2 sur un fructose). Le glucose (sucre réducteur), ainsi libéré, est dosé par réduction du dinitrosalicylate de sodium à 90 °C durant 5 minutes (Miller, 1959). Il se forme alors un complexe coloré brun dont on mesure l'intensité à 540 nm. Le dinitrosalicylate de sodium est obtenu en ajoutant lentement 10 g d'acide dinitrosalicylique (Sigma) dans 200 mL d'hydroxyde de sodium 2M. A cette solution sont alors ajoutés 500 mL d'eau distillée puis 300 g de tartrate double de sodium et de potassium. L'ensemble est complété à 1 L avec de l'eau distillée. Le dosage de l'activité enzymatique s'effectue en mélangeant 50 μ L de

saccharose 0,2 M, 50 μ L de solution enzymatique et 100 μ L de dinitrosalicylate de sodium. Le mélange est porté à 90 °C durant 5 minutes. L'activité est déterminée par rapport à une gamme de glucose variant de 0 à 5 g/L.

II.6. Production d'anticorps polyclonaux

L'antigène (macromolécules totales ou protéine purifiée) est mélangé à 0,3 mL d'acrylamide à 3 % ainsi que 0,9 mL d'adjuvant complet de Freund (Sigma-Aldrich) (Freund, 1956) afin d'obtenir une concentration finale de 1 mg/mL d'antigène. Ce mélange est injecté par voie intradermique à des lapins et, ceci, en six sites différents (injection de 6 x 0,15 mL de la solution immunogène). Par la suite, deux autres injections seront réalisées avec le même mélange antigénique, l'adjuvant complet de Freund étant simplement remplacé par un adjuvant incomplet (Sigma-Aldrich), et ceci avec un intervalle de trois semaines entre chaque injection. Après la huitième semaine suivant la première injection, les lapins sont saignés au niveau de l'oreille. Le sérum, contenant les anticorps, est scindé par centrifugation (10 minutes à 6 000 g) du sang préalablement coagulé durant 1 h à 30 °C. Le sérum ainsi obtenu est stocké à - 80 °C.

Cette technique a permis d'obtenir plusieurs lots d'anticorps polyclonaux dirigés contre, soit des mélanges de macromolécules (moût, vin, protéines secrétées de levures ou de bactéries), soit des protéines purifiées (invertase de raisin). La spécificité et l'absence de réactions croisées sont ensuite vérifiées.

II.6.1. Purification des anticorps polyclonaux dirigés contre l'invertase de raisin

Le point isoélectrique des anticorps est plus basique que celui de la plupart des autres protéines sériques, ce qui permet de les purifier par chromatographie échangeuse d'ions. Nous avons utilisé une colonne échangeuse d'anions DEAE Affi-Gel blue (Bio-Rad). Dans cette méthode, le pH est maintenu au-dessous du point isoélectrique des anticorps, qui ne seront donc pas retenus sur la résine échangeuse d'anions. Le sérum contenant les anticorps polyclonaux dirigés contre l'invertase de raisin, est concentré et dialysé contre du tampon Tris-HCl 0,02 M, pH = 8,00 et contenant du NaCl à 0,028 M, par ultrafiltration sur des unités d'ultrafiltration Centriprep[®]-10 (Amicon).

Le sérum ainsi dialysé est ensuite injecté (1 mL) sur la colonne d'échange d'anions, équilibrée au préalable avec du tampon Tris-HCl 0,02 M, NaCl 0,028 M, pH = 8,00. Elle est ensuite lavée trois fois par le même tampon. La fraction non-retenue, contenant les IgG, est collectée et rassemblée. La colonne est ensuite lavée par 3 volumes de tampon Tris-HCl 0,02 M, pH = 8,00 contenant de la guanidine 2 M. Puis, elle est ré-équilibrée avec le tampon Tris-HCl 0,02 M, NaCl 0,028 M, pH = 8,00.

Les Immunoglobulines ainsi recueillies sont dialysées et concentrées sur des unités d'ultrafiltration Centriprep®-10 (Amicon).

II.7. Réactivité et révélation des protéines transférées sur membrane de nitrocellulose

Les protéines, ainsi que le sérum préimmunitaire, sont déposés (5 µL) sur une membrane de nitrocellulose (Pharmacia). Les membranes sont ensuite lavées sous agitation douce dans du tampon Tris Buffer Saline (TBS) (constitué de 2,42 g de Tris auxquels sont ajoutés 29,2 g de NaCl), l'ensemble étant complété à 1 L avec de l'eau distillée, le pH étant ajusté à 7,5 avec de l'HCl 1 M. Elles sont ensuite bloquées avec une solution de tampon TBS contenant du lait écrémé à 2 % sous agitation pendant 30 à 60 min, afin de saturer les sites non spécifiques de fixation de la membrane. La membrane est ensuite lavée trois fois avec du tampon TBS et incubée pendant 3 h avec les anticorps appropriés (dilution des sérums au 1/1500^e dans du tampon TBS contenant 2 % de lait écrémé). La membrane est ensuite successivement lavée avec du tampon TBS, TBS + Tween 20 à 0,05 % et enfin du TBS seul. La révélation des protéines s'effectue en incubant, pendant 1 h, la membrane avec la solution d'anticorps secondaires conjugués à la peroxydase du raifort (Sigma) (anticorps de chèvre dirigés contre les protéines sériques du lapin). Après le protocole de lavage identique au précédent, on ajoute une solution de 4-chloro-1-naphtol à 1,2 g/L dans du méthanol glacial et du tampon phosphate comprenant 0,4 % d'H₂O₂ afin de révéler en bleu/violet les complexes anticorps/antigènes formés.

Les membranes de transfert ou Western Blot sont traitées de la même façon.

Adsorption de l'antigène
100 µL de solution antigénique



1 nuit à 4°C

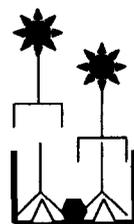
Lavages (x3)
(PBS, PBS + Tween-20, PBS)

Incubation avec l'anticorps anti-invertase
(Révélation indirecte)



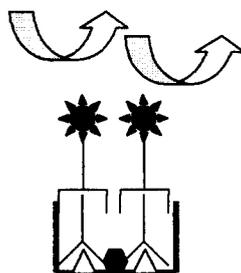
Lavages (x3)
(PBS, PBS + Tween-20, PBS)

Reconnaissance du complexe antigène-anticorps par les IgG de révélation



Lavages (x3)
(PBS, PBS + Tween-20, PBS)

Réaction colorimétrique avec le substrat
Puis arrêt (15 min) par ajout d'H₂SO₄, 3 M



Mesure des absorbances à 490 nm

Figure 24 : Protocole standard du PTA-ELISA (Plate Trapping Antigen).

△ Invertase de raisin

anticorps spécifiques de l'invertase

anticorps spécifique couplé à la peroxydase

dégradation de l'OPD

→ coloration jaune

II.8. Détection de l'invertase de raisin dans le vin et suivi au cours de la vinification

Du fait de la probable présence dans les vins d'une invertase d'origine levurienne, nous n'avons pu mettre à profit l'activité de cette enzyme pour la quantifier. Il a donc été nécessaire pour suivre l'invertase de raisin au cours de la vinification, de mettre en place un test ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), PTA-ELISA (Plate Trapping Antigen), utilisant des anticorps polyclonaux dont la spécificité a été étudiée grâce à un test western blot.

II.8.1. Protocole standard du PTA-ELISA

Ce test se déroule en quatre étapes principales :

- 1- adsorption de l'antigène sur la plaque de microtitration,
- 2- reconnaissance de l'antigène par les anticorps spécifiques,
- 3- reconnaissance spécifique des premiers anticorps par un second anticorps couplé à une enzyme, ici la peroxydase de raifort,
- 4- ajout du substrat de l'enzyme de révélation.

Protocole détaillé du PTA-ELISA (figure 24) :

100 μ L de la solution contenant l'antigène (vin ou invertase purifiée) sont ajoutés dans chacun des puits de la plaque de microtitration (Imm lux 2HB, DYNEX Technologies). La plaque est ensuite couverte et mise à incuber une nuit à 4°C. Le surnageant est éliminé et la plaque est lavée trois fois (3 X 5 minutes) avec du tampon phosphate (PBS). Une première fois avec du tampon phosphate seul, puis avec du PBS contenant 0,05 % de Tween-20 et enfin de nouveau avec du PBS seul. 200 μ L de tampon PBS contenant 3 % de sérum albumine bovine (BSA) sont ajoutés dans chacun des puits, afin de bloquer les sites additionnels. La

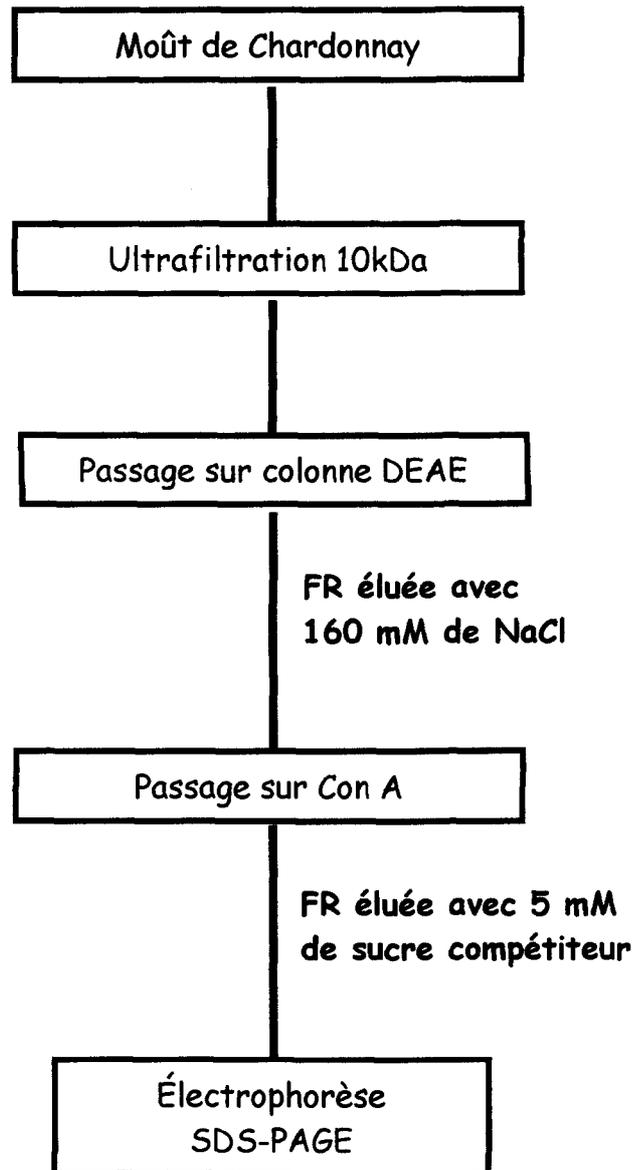


Figure 25 : Schéma récapitulatif de la pré-purification de l'invertase de raisin.

plaque est mise à incuber deux heures à température ambiante sous agitation. Elle est ensuite lavée suivant le même protocole que précédemment (PBS, PBS + Tween-20, PBS). On ajoute ensuite 100 μL de la solution d'anticorps (anticorps de lapin anti-invertase), à la dilution appropriée, dans du tampon PBS contenant 1 % de BSA. La plaque est alors couverte et mise à incuber deux heures à 37°C (ou une nuit à 4°C). Puis, la plaque est de nouveau lavée suivant le protocole standard de lavage. 100 μL de la solution contenant le second anticorps conjugué à l'enzyme de révélation (anticorps anti-IgG de lapin couplé à la peroxydase de raifort) (anti-rabbit IgG peroxydase conjugate, Sigma) sont ajoutés dans chacun des puits. La plaque est couverte et mise à incuber une nuit à 4°C. Puis, elle est lavée. On ajoute ensuite dans chacun des puits 100 μL du substrat de révélation, constitué de 25 mL de tampon citrate phosphate 0,1 M, pH = 5,00, auquel on ajoute 6 μL d'hydrogène peroxyde et 10 mg d'orthophényldiamine (OPD). La réaction de révélation est arrêtée, après 15 minutes, par ajout de 50 μL d'acide sulfurique dilué (H_2SO_4 , 3 M). Les lectures des absorbances sont effectuées à 490 nm en utilisant un lecteur de microplaque (Model 550, BioRad).

II.9. Détermination de la structure glycanique de l'invertase

II.9.1. Digestions protéasiques en gel de l'invertase

Le protocole de digestion en gel est adapté de celui publié par Jensen et al. (1997, 1999). Trois protéases différentes ont été utilisées : la trypsine (Trypsine modified sequencing grade, Promega), la chymotrypsine (Chymotrypsine sequencing grade, Roche) et l'endoprotéinase Glu-C (V8) (Protease V8 sequencing grade, Roche).

Les échantillons protéiques de moût, après avoir subi une pré-purification sur colonne échangeuse d'anions puis sur colonne de lectine immobilisée Con A, sont soumis à une électrophorèse semi-préparative SDS-PAGE (gel de 12 %, 0,75 mm) (Laemmli, 1970) (figure 25). Les gels sont ensuite colorés au Bleu de Coomassie (BBC) suivant une procédure modifiée (Rosenfeld et al., 1992). Une solution à 0,2 % de BBC (P/V) est ajoutée dans un mélange contenant 20 % de méthanol, 0,5 % d'acide acétique, le tout dans de l'eau Milli-Q[®] exclusivement. Les gels sont colorés, sans fixation préalable, dans ce mélange pendant 20 min. Les gels sont ensuite décolorés dans du méthanol 30 % (v/v), uniquement, jusqu'à

obtention du contraste suffisant pour visualiser les bandes d'intérêt. Les gels sont ensuite rincés abondamment avec de l'eau Milli-Q® pendant 48 h (Rosenfeld et al., 1992).

Les spots d'intérêt sont excisés du gel à l'aide d'un scalpel, en petits morceaux de 1 ou 2 mm³ puis placés dans des microtubes. Ils sont ensuite lavés trois fois pendant 20 min dans 250 µL d'une solution d'acétonitrile et de bicarbonate d'ammonium (NH₄HCO₃) 20 mM, pH = 8,00, (50/50, v/v) sous agitation vigoureuse, permettant une élimination du colorant résiduel le bleu de coomassie, puis 15 min dans 250 µL d'acétonitrile pur (Jensen et al., 1999). Les morceaux de gels sont ensuite lyophilisés (Speed-vac) jusqu'à évaporation totale.

Les fragments sont ensuite regonflés et réduits par ajout d'une solution de 10 mM de Dithiothréitol (DTT) dans du tampon NH₄HCO₃ 20 mM pH = 8,00 (Küster et al., 1997). Les gels sont agités vigoureusement afin d'améliorer leur réhydratation. Ils sont ensuite incubés pendant 1h à 56 °C. Après élimination du surnageant, la solution d'alkylation (Iodoacétamide 55 mM dans NH₄HCO₃ 20 mM, pH = 8,00) est ajoutée. L'ensemble est incubé pendant 45 min à température ambiante et à l'obscurité. Le surnageant est de nouveau éliminé, et les gels sont rincés dans deux bains successifs de NH₄HCO₃ 20 mM pH = 8,00, pendant 15 min chacun sous agitation, suivis par un bain d'acétonitrile 100 % (également sous agitation) pendant 15 min (Küster et al., 1998). Les gels sont ensuite séchés en totalité au Speed-vac.

Les gels lyophilisés sont réhydratés dans 20 µL d'une solution contenant l'enzyme, sous agitation vigoureuse, afin d'améliorer la pénétration de l'enzyme dans les mailles du gel (Jensen et al., 1997, 1999). Cette solution de réhydratation est constituée de la protéase (diluée au rapport approprié) diluée dans une solution de 5 mM de CaCl₂ et de 20 mM de NH₄HCO₃ à pH = 8,00. L'enzyme est ajoutée dans un rapport 1/50 (enzyme/substrat) pour la trypsine, 1/20 pour la chymotrypsine et la protéase V8. Les protéases sont initialement dissoutes dans 20 µL d'acide trifluoroacétique 0,01 %. Après un passage de 45 min dans la glace, l'excès de solution de réhydratation contenant l'enzyme est éliminé. 250 µL de tampon 20 mM NH₄HCO₃ pH = 8,00 sans enzyme sont ensuite ajoutés afin de maintenir les gels immergés. L'ensemble est incubé pendant une nuit à 37 °C.

II.9.2. Extraction des peptides

Après récupération du surnageant, les gels sont lavés dans 50 µL d'acide formique 1 % pendant 15 min à 37 °C (Jensen et al., 1999). Le surnageant est collecté et regroupé avec le

précédent. Les gels sont ensuite lavés trois fois pendant 15 min avec une solution d'acétonitrile 50 % dans du tampon NH_4HCO_3 20 mM, pH = 8,00, 50 %. De nouveau, les surnageants sont récupérés. Aux gels sont alors ajoutés 100 μL d'une solution d'acétonitrile 95 % avec 5 % d'acide formique, l'ensemble étant agité pendant 15 min à 37 °C. Le surnageant est de nouveau récupéré et ajouté aux précédents. L'ensemble des surnageants est évaporé au Speed-vac.

II.9.3. Digestion des fragments glycopeptidiques par la PNGase A

Une aliquote de chacun des échantillons digérés par l'une des protéases est écartée afin d'effectuer une analyse en spectrométrie de masse et d'obtenir ainsi une carte d'identification peptidique (« peptide mapping »). Les échantillons sont repris dans du tampon acétate d'ammonium 25 mM, pH = 5,00. Afin d'inactiver l'activité protéasique résiduelle, l'échantillon est chauffé deux fois à 95 °C pendant 5 min. Entre les deux chauffages, l'échantillon est refroidi dans la glace. Après refroidissement, un passage aux ultrasons et une brève centrifugation, 30 μU de peptide-N-glycosidase A (PNGase A) (Roche) sont rajoutés à l'échantillon. La digestion est conduite pendant une nuit à 37 °C (Kolarich et Altmann, 2000).

II.9.4. Purification des peptides et des glycopeptides

Les peptides et glycopeptides sont purifiés sur micro colonne de C18 (Altech). 10 μL de phase C18 sont déposés dans un cône muni d'un filtre (Tips de 10 μL , QSP), puis lavés avec 600 μL de méthanol pur, et rincés avec 600 μL d'acide formique à 1 % (Küster et al., 1997). L'échantillon est ensuite déposé sur la partie supérieure du gel et passé trois fois au travers de cette micro colonne. La colonne est ensuite rincée avec 600 μL d'acide formique à 1 %. La fraction retenue est éluée par un premier passage de 150 μL d'une solution d'acétonitrile/0,5 % d'acide formique (50/50, v/v) puis par un deuxième passage de 150 μL d'acétonitrile/0,2 % d'acide formique (rapport 80/20, v/v). Les fractions ainsi recueillies sont évaporées sous Speed-vac puis redissoutes dans 3 μL d'acide formique avant analyse en spectrométrie de masse.

II.9.5. Extraction et purification des glycanes libérés par la PNGase A

Les fractions, issues des différentes digestions protéasiques et non retenues sur la micro colonne de C18, sont ensuite injectées sur micro colonne de charbon (Altech) afin de purifier les glycanes (Packer et al., 1998). La phase (10 μ L) est déposée sur cône avec filtre (QSP), puis lavée avec 600 μ L de méthanol 100 % et rincée avec 600 μ L d'acide formique 1 %. L'échantillon est de nouveau recyclé trois fois sur cette colonne. Après ces passages, la colonne est rincée avec 600 μ L d'acide formique 1 %. La fraction retenue est ensuite éluée avec 300 μ L d'acétonitrile/acide trifluoroacétique 0,1 % (rapport 50/50, v/v). Les fractions sont évaporées au Speed-vac avant l'analyse en spectrométrie de masse.

II.9.6. Analyse en spectrométrie de masse

Les échantillons sont redissous dans 3 μ L d'acide formique 1 % puis sont passés dans un bain à ultrasons (afin de décoller les peptides des parois des microtubes) et déposés dans la glace. La matrice utilisée est une solution saturée d'acide 2,5-dihydroxybenzoïque (acide gentisique) (DHB) dans de l'acide trifluoroacétique (TFA) à 0,1 % (Strupat et al., 1992). L'échantillon et la matrice (0,5 μ L chacun) sont déposés puis mélangés sur la cible MALDI selon la technique de la goutte séchée (« dried droplet »). Les spectres MALDI-TOF des échantillons sont obtenus avec un appareil « Voyager-DE STR Workstation » (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) de la plate-forme protéomique IFR 118 de l'UMR CNRS/USTL 8576 de Lille 1. Les analyses sont menées en mode positif avec réflecteur, sous 20 000 V d'accélération et 100 ns de délai d'extraction. 100 à 200 acquisitions sont accumulées pour obtenir un spectre. Le logiciel « Data Explorer » (PE Biosystems) est utilisé pour l'analyse du spectre. Les spectres obtenus sont calibrés en externe avec les ions $[M + H]^+$ des peptides Des-Arg Bradykin (Mr 842,5100 Da) et ACTH (Mr 2211,1046 Da). L'autoprotéolyse de la trypsine produit des ions utilisés comme étalons internes (le fragment 132-142, Mr 1153,57 Da et le fragment 56-75, Mr 2163,06 Da).

II.10. Analyse des propriétés moussantes des vins (le Mosalux)

Toutes les mesures des propriétés moussantes des vins ont été effectuées par utilisation du Mosalux (figure 26) (Maujean et al., 1990), qui est une version automatisée du tube de Rudin (Rudin, 1957). Cette méthode permet une mesure des propriétés moussantes dans des conditions standardisées d'effervescence. Le module de mesure est constitué d'une éprouvette graduée de 4 cm de diamètre et 40 cm de long, à la base de laquelle est placé un fritté de porosité calibrée (16 à 40 μm). Sous ce fritté, se trouve l'arrivée de gaz. Cette arrivée de gaz sert également de vanne anti-retour, permettant au vin de ne pas s'écouler au travers du fritté lorsque l'arrivée de gaz est coupée. L'appareil est placé dans une enceinte climatisée (12 °C). L'éprouvette est lavée entre chaque mesure avec un mélange éthanol 20 %, ce lavage étant suivi d'un rinçage à l'eau Milli-Q[®], et enfin d'un avinage avec le vin à étudier. Les vins sont filtrés (0,45 μm) avant chaque mesure de moussabilité. Le vin (100 mL) est déposé dans la cellule de mesure. Le débit de CO₂ est fixé à 7 L/h, sous une pression de 1 bar. La hauteur de mousse (en millimètres) est mesurée en continu par des cellules photoélectriques éclairées par une source de lumière infrarouge placées d'un côté de l'éprouvette. Chaque mesure est effectuée trois fois. Les graphiques sont tracés avec une mesure toutes les cinq secondes, chaque point étant la valeur moyenne des trois mesures. Toutes les mesures sont effectuées le même jour dans les mêmes conditions. On mesure ainsi la hauteur de mousse maximum (H_m) correspondant à la hauteur maximale atteinte par la colonne de mousse, cette dernière étant enregistrée dans les premières minutes suivant l'injection de gaz. La colonne de mousse s'affaisse pour se stabiliser à une hauteur généralement constante, que l'on nomme hauteur au plateau, notée H_p.

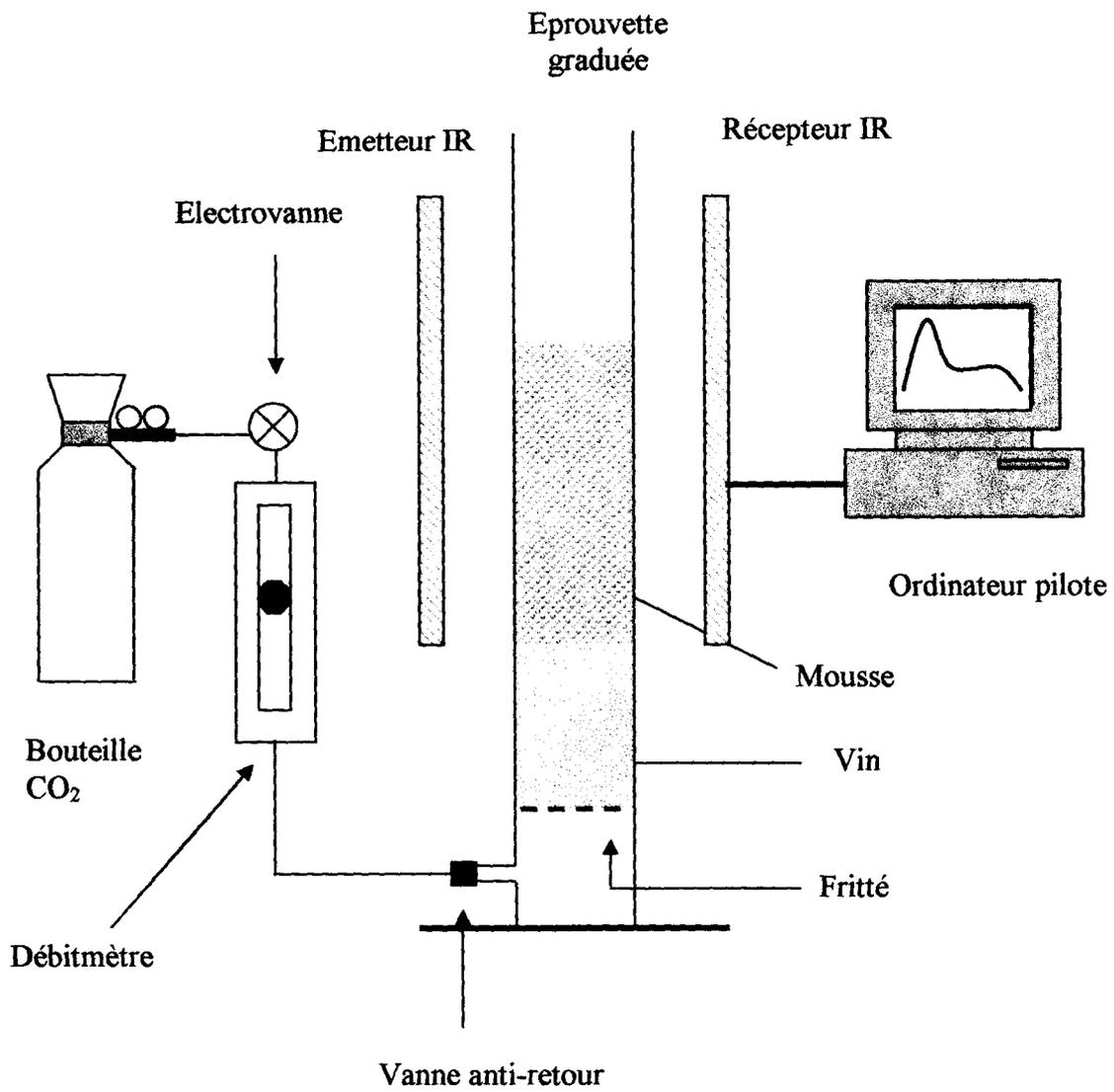


Figure 26 : Schéma du Mosalux (d'après Maujean et al., 1990)

RESULTATS ET DISCUSSION

PREMIERE PARTIE

DETERMINATION DE L'ORIGINE DES PROTEINES DU VIN

I. INTRODUCTION

Les protéines, même si elles sont en quantité assez faible dans le vin, jouent sur le plan œnologique un rôle prépondérant. En effet, elles sont impliquées dans de nombreux phénomènes qui peuvent améliorer ou diminuer la qualité du produit fini. D'autre part, elles peuvent avoir un effet positif sur la stabilisation de la mousse des vins effervescents (Brissonnet et Maujean, 1991 ; Malvy et al., 1994, Pueyo et al., 1995 ; Andrés-Lacueva et al., 1996) ; elles peuvent également contribuer à la réduction de la casse protéique chez les vins blancs, ce rôle étant principalement dévolu aux mannoprotéines d'origine levurienne (Waters et al., 1993, 1994 a et b) ; elles peuvent interagir avec les composés d'arôme (Lubbers et al., 1994) ; enfin, elles sont capables de protéger le vin contre les précipitations bitartriques (Lubbers et al., 1993 ; Gerbaud et al., 1997 ; Moine-Ledoux et al., 1997). D'autre part, les protéines du vin, et plus particulièrement celles originaires du raisin, peuvent avoir un rôle négatif en provoquant une casse protéique en bouteille et déprécier ainsi grandement le produit fini (Paetzold et al., 1990 ; Ledoux et al., 1992 ; Waters et al., 1996).

Depuis plusieurs années des travaux ont été menés afin d'étudier le pool protéique des vins (pour une revue voir : Moreno-Arribas et al., 2002) et déterminer, en particulier, l'origine de ces macromolécules. On peut noter, cependant, que la plupart de ces travaux restent assez contradictoires. Ainsi, Ruiz-Larrea et al. (1998) comparent par SDS-PAGE le profil électrophorétique de moûts issus de raisins blancs (variété Viura) avec le profil des vins correspondants. Ils arrivent à la conclusion surprenante que, dans ces vins, les protéines proviennent exclusivement du raisin. Lugera et al. (1998), quant à eux, séparent les protéines d'un vin de Chardonnay par chromatographie d'échange d'ions et observent qu'il y a une diminution de la teneur en protéines après la fermentation alcoolique ainsi qu'après les traitements de stabilisation colloïdale. Ils démontrent également, de manière toute aussi surprenante, que les protéines levuriennes ne sont pas relarguées pendant la fermentation alcoolique mais, seulement, après 18 mois d'élevage sur lies. Ferreira et al. (2000) obtiennent des résultats similaires. Ils utilisent pour cela une technique immunospécifique avec des anticorps dirigés contre les protéines totales ou fractionnées du vin (Monteiro et al., 1999). Leurs résultats suggèrent que les protéines du vin proviennent uniquement du raisin et, plus particulièrement, de la pulpe du raisin (Ferreira et al., 2000).

D'autre part, Yokotsuka et Singleton (1997) fractionnent les protéines d'un vin rouge par gel filtration suivie d'une chromatographie d'échange d'ions et démontrent que certaines glycoprotéines auraient une origine microbienne et seraient relarguées, soit lors de la fermentation alcoolique, soit lors de la fermentation malolactique. Marchal et al. (1996) isolent d'un vin de Chardonnay, par chromatographie sur concanavaleine A, sept glycoprotéines. En comparant les profils électrophorétiques des protéines fractionnées sur Con A d'un moût de Chardonnay et du vin correspondant, ces auteurs suggèrent que certaines glycoprotéines de ce vin proviennent du raisin alors que d'autres seraient libérées par la levure. Waters et al. (1994a) isolent deux mannoprotéines, l'une d'un vin rouge et l'autre d'un vin blanc, tous deux fermentés par *Saccharomyces cerevisiae*. Dupin et al. (2000) démontrent que ces deux mannoprotéines sont libérées par la levure aussi bien lors de la fermentation alcoolique que lors de l'élevage sur lies. Enfin, Monteiro et al. (2001) démontrent, par séquençage des extrémités N-terminales, que certaines protéines purifiées d'un vin de Moscatel ont une forte homologie de séquence avec des protéines d'origine levurienne ou bactérienne.

Ces résultats démontrent bien, par la diversité des méthodes utilisées et la disparité des résultats, la réelle difficulté rencontrée dans la détermination de l'origine exacte des protéines d'un vin.

La connaissance de l'origine des protéines est une donnée essentielle afin de mieux comprendre et mieux maîtriser des phénomènes tels que la casse protéique ou les propriétés moussantes des vins de Champagne, mais également afin d'optimiser l'utilisation des procédés de traitement de stabilisation colloïdale.

Il apparaît donc essentiel de mettre en place une technique fiable afin de déterminer l'origine des protéines d'un vin. C'est l'objet du présent chapitre.

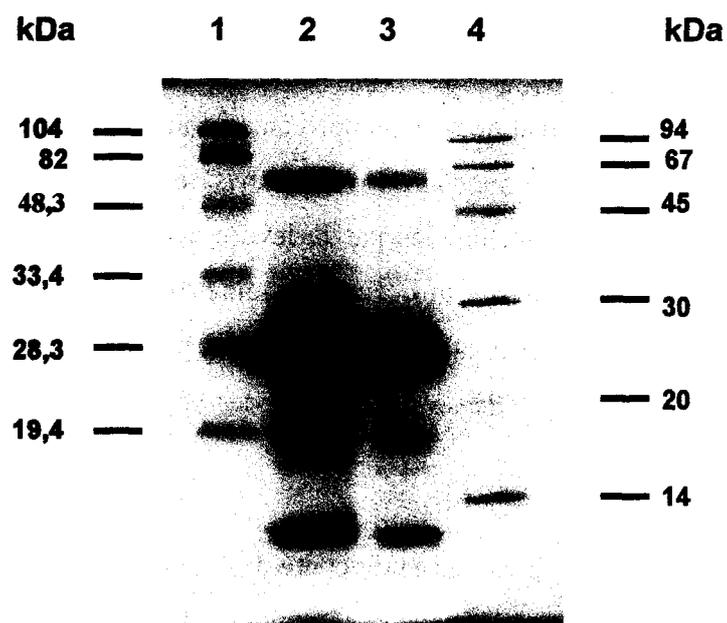


Figure 27 : Comparaison des profils électrophorétiques d'un moût de Chardonnay et du vin correspondant. Les extraits bruts de moût (piste 2) et de vin (piste 3), ainsi que des marqueurs de taille (piste 1 et 4), sont déposés sur un gel SDS-PAGE 12 % et colorés par le bleu de Coomassie.

II. DETERMINATION DE L'ORIGINE DES PROTEINES

II.1. Détermination de l'origine des protéines par utilisation de techniques électrophorétiques classiques

Dans une première partie de cette étude, nous avons voulu comparer tout d'abord les profils électrophorétiques d'un moût et du vin correspondant après révélation au Bleu de Coomassie. La figure 27 représente les deux profils électrophorétiques d'un moût (piste 2) et du vin correspondant (piste 3) après avoir été soumis à une électrophorèse SDS-PAGE. On remarque que le moût est composé de six fractions protéiques majeures, ces fractions étant comprises dans une gamme de masses moléculaires variant de 14 à 64 kDa. Parmi ces six protéines majoritaires, une bande intense et diffuse est présente entre 25 et 30 kDa. Sous cette fraction majeure, de nombreuses protéines mineures sont également révélées dans une gamme de masses moléculaires assez large et peu élevée variant de 14 à 20 kDa. Enfin, quatre autres protéines majeures apparaissent nettement colorées au Bleu de Coomassie, avec des masses moléculaires respectives de 14, 20, 32 et 60/64 kDa.

Le profil électrophorétique du vin (figure 27, piste 3) fait apparaître, quant à lui, un profil assez similaire à celui observé pour le moût, avec quelques fractions protéiques majeures et d'autres mineures, le tout dans une gamme de poids moléculaire similaire à celle observée pour les protéines du moût. Cependant, on observe que certaines bandes tendent à disparaître (piste 3), telles les bandes à 20 et 30 kDa qui semblent ne plus être présentes dans le vin. Pour d'autres protéines, en revanche, c'est l'intensité de leur révélation qui diminue, laissant penser que leur concentration diminue dans le vin. Cette diminution des concentrations relatives en protéines entre le moût et le vin est une donnée qui a été démontrée en œnologie et rapportée à de nombreuses reprises dans la littérature (Bayly et Berg, 1967 ; Marchal et al., 1996 ; Canals et al., 1998). La comparaison des profils électrophorétiques d'un moût et d'un vin, ne permet pas d'observer des différences dans ces profils, à l'exception bien sûr des diminutions d'intensité ou de la disparition de certaines bandes. Ainsi, par l'utilisation de cette technique, il semble qu'il n'y ait pas libération de protéines dans le vin par les levures ou les bactéries lors des processus fermentaires. Il faut noter, cependant, que dans les articles faisant mention de libération de macromolécules

levuriennes dans le vin, celles-ci sont décrites comme étant des mannoprotéines (Waters et al., 1994a ; Dupin et al., 2000) qui sont des molécules très riches en glycanes et qui possèdent une partie protéique très minoritaire. Ces macromolécules seraient, de ce fait, très difficilement détectées et colorées avec les techniques classiques, que ce soit la technique au Bleu de Coomassie ou, celle, plus sensible, à l'argent (Frevert et Ballou, 1985 ; Waters et al., 1993). Toutefois, les mannoprotéines peuvent être assez bien révélées en utilisant la coloration au PAS-fuchsine (PAS).

Ces mêmes électrophorèses ont donc été soumises à une coloration avec la méthode au PAS. Cette coloration, comme le montre la figure 28, permet de révéler la présence de nombreuses protéines associées à des sucres. Dans le moût, on observe la présence de quatre bandes mauves, deux bandes diffuses l'une à 20 kDa et l'autre entre 25 et 30 kDa, une bande aux environs de 60 kDa et enfin une zone intensément colorée dans la partie supérieure du gel et correspondant à des macromolécules avec des hautes masses moléculaires, supérieures à 200 kDa.

Par comparaison des deux colorations, celle au BBC et celle au PAS, on remarque facilement que les trois bandes colorées au PAS, 20, 25/30 et 60 kDa sont également présentes sur le gel coloré au BBC. Cette double réactivité PAS et BBC indique qu'il s'agit de complexes protéines-polysaccharides, mais n'autorise pas à utiliser le terme glycoprotéine. De plus, les macromolécules de haut poids moléculaire colorées par le PAS, n'apparaissent pas au BBC.

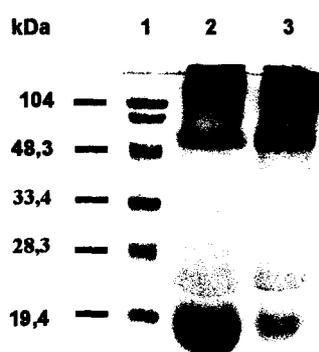


Figure 28 : Comparaison des profils électrophorétiques d'un moût de Chardonnay et du vin correspondant. Les extraits bruts de moût (piste 2) et de vin (piste 3), ainsi que des marqueurs de taille (piste 1), sont déposés sur un gel SDS-PAGE 12 % et colorés par le PAS.

Nos résultats sont assez similaires de ceux obtenus par Marchal (1995) sur des moûts de la variété Pinot Meunier. Ainsi, la coloration au PAS des protéines d'un moût séparées par SDS-PAGE montre deux bandes mauves à 25 et 63 kDa et une troisième, plus diffuse, comprise entre 90 et environ 150 kDa. En revanche, la bande présente à 20 kDa n'est pas observée. Le complexe 90-150 kDa apparaît également uniquement lors de la coloration au PAS. En raison de cette coloration spécifique, ces molécules de haut poids moléculaire semblent renfermer une partie protéique très minoritaire, voire inexistante, par rapport à la partie glycanique. Elles peuvent donc être aisément assimilées aux arabinogalactanes protéines (AGPs). Elles possèdent, en effet, les mêmes caractéristiques que les AGPs décrites par Saulnier et Brillouet (1989).

Le vin montre un profil très similaire à celui du moût (figure 28), avec la présence de ces quatre bandes mauves, bien distinctes, avec cependant un léger accroissement d'intensité de la bande présente dans la partie supérieure du gel, ce qui semblerait être lié à l'apparition d'autres macromolécules de haut poids moléculaire. Waters et al. (1993), ainsi que Frevert et Ballou (1985) font une description assez similaire en utilisant une technique identique (SDS-PAGE/PAS). Ces auteurs concluent qu'il s'agit, d'après la composition en sucres, de mannoprotéines d'origine levurienne. La partie protéique très minoritaire (environ 5 %) ne peut être révélée au BBC.

Cependant, dans notre cas, la très faible différence d'intensité entre ces deux bandes (figure 28), celle du moût et celle du vin, ne nous permet pas d'affirmer qu'il y a effectivement eu libération de mannoprotéines levuriennes lors des processus de fermentation.

L'utilisation de ces techniques ne permet pas finalement de conclure sur la mise en évidence de macromolécules d'origine microbienne dans le vin.

On peut noter, cependant, que ces résultats, ainsi que ceux présentés en préambule dans l'étude bibliographique font appel, dans leur grande majorité, à des techniques de révélation électrophorétiques classiques, mais non spécifiques. Pour répondre à cette interrogation quant à l'origine des protéines du vin, il nous est apparu opportun de mettre en place et d'utiliser une technique immunospécifique afin de détecter les protéines du vin, qu'elles soient d'origine végétale, levurienne ou bactérienne. Pour cela, il a été nécessaire,

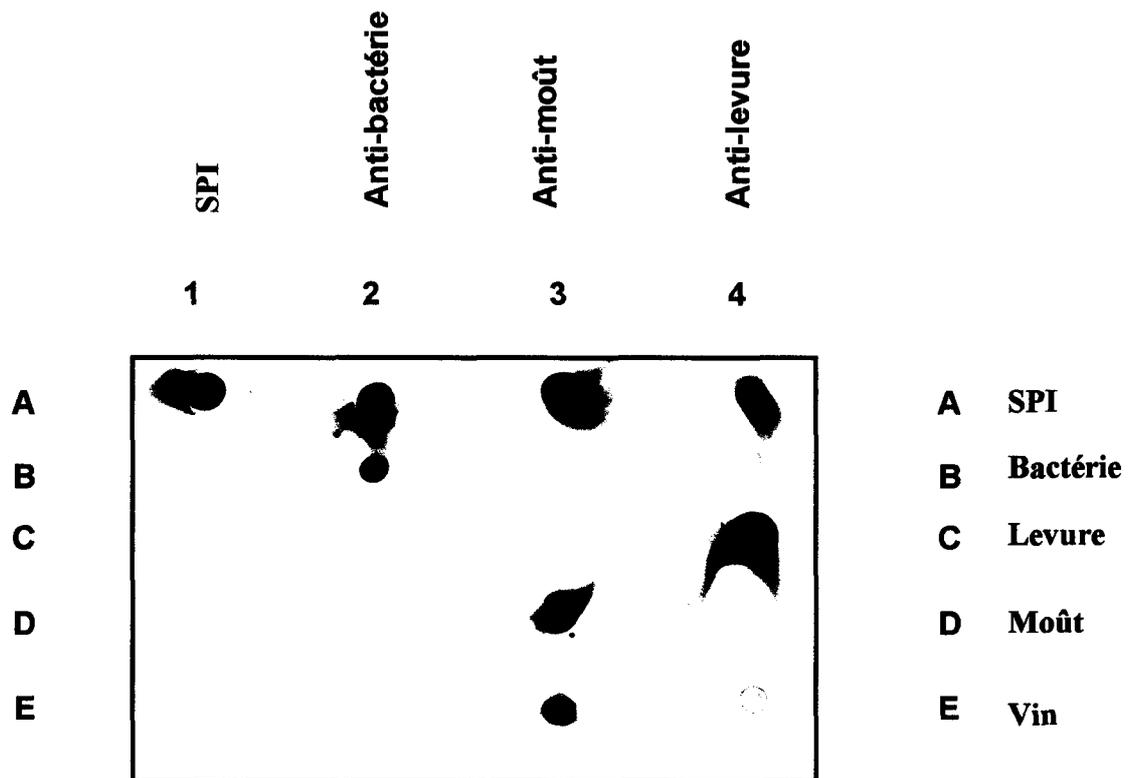


Figure 29 : Dot-Blot de contrôle des fractions sériques. Avec respectivement, bandelette 1, révélation avec le sérum pré-immunitaire (SPI) de lapin ; bandelette 2, révélation avec le sérum anti-macromolécules bactériennes secrétées ; bandelette 3, révélation avec le sérum anti-macromolécules du moût ; bandelette 4, révélation avec le sérum anti-macromolécules excrétées de levures ; dépôt A, sérum pré-immunitaire de lapin ; dépôt B, macromolécules bactériennes secrétées, dépôt C, macromolécules levuriennes secrétées, dépôt D, macromolécules du moût, dépôt E, macromolécules du vin.

dans un premier temps, d'isoler les macromolécules solubles provenant de ces trois origines (jus de raisin, levure et bactérie).

Pour les cultures microbiennes, des moûts « synthétiques » ont été utilisés (voir Matériels et Méthodes) et dont la composition était proche d'un véritable moût mais ne contenant aucune macromolécule végétale. Ces moûts modèles ont été utilisés afin d'obtenir spécifiquement les macromolécules solubles libérées par les microorganismes (levures ou bactéries) pendant les fermentations (alcoolique ou malolactique) dans des conditions très proches de celles rencontrées lors de la vinification. Les différents milieux ont ensuite été centrifugés, filtrés stérilement, concentrés, dialysés puis lyophilisés. Par la suite, ces trois types de macromolécules ont été utilisés comme antigènes afin d'obtenir trois lots d'anticorps distincts (voir Matériels et Méthodes) :

- un premier lot dirigé contre les macromolécules solubles du raisin.
- un autre lot spécifique des macromolécules libérées par la levure
- un dernier lot spécifique des macromolécules libérées par les bactéries.

Ces trois lots d'anticorps polyclonaux vont donc nous permettre de révéler spécifiquement les différentes macromolécules présentes dans le vin.

II.2. Test de spécificité des lots d'anticorps polyclonaux

Avant l'utilisation des lots d'anticorps par la technique d'immunorévélation, il fallait s'assurer de leur spécificité de reconnaissance. Pour cela, un test de contrôle ou Dot-Blot a été réalisé. Les diverses macromolécules : le sérum préimmunitaire, les protéines libérées par les bactéries, celles libérées par les levures, les protéines du moût et les protéines du vin sont déposées sur des bandelettes de nitrocellulose. Puis chaque sérum, les trois sérums polyclonaux plus le sérum préimmunitaire, sont testés par hybridation avec l'une des bandelettes de nitrocellulose (voir Matériels et Méthodes). Les résultats de ces hybridations sont présentés à la figure 29. Le sérum préimmunitaire ne montre aucune réaction croisée avec les autres constituants (figure 29, bande 1).

Les autres sérums polyclonaux sont capables de reconnaître spécifiquement leur propre antigène (figure 29). Le sérum anti-moût reconnaît spécifiquement les protéines du

moût (figure 29, bande 3, spot D), mais il est également capable d'interagir avec les protéines du vin, laissant apparaître une révélation assez soutenue (spot E). Cette observation permet donc de confirmer la présence de nombreuses protéines d'origine végétale, dans le vin ; de plus, aucune réaction croisée n'est observée, que ce soit avec les protéines solubles d'origine bactérienne ou bien avec celles d'origine levurienne.

Les anticorps dirigés contre les protéines libérées par les bactéries sont capables d'interagir avec leurs propres antigènes (figure 29, bande 2, spot B) mais pas avec les autres antigènes, qu'ils soient levuriens ou végétaux, ce qui démontre la bonne spécificité des anticorps anti-protéines bactériennes. On peut également remarquer qu'il n'y a aucune hybridation avec les protéines totales du vin (figure 29, bande 2, spot E), ce qui laisse penser qu'il n'y aurait peut être pas de protéines bactériennes dans le vin, ou qu'elles seraient en trop faibles quantités pour pouvoir être révélées par cette technique.

Les anticorps anti-protéines de levure, quant à eux, réagissent très bien avec leurs propres antigènes (figure 29, bande 4, spot C). Aucune réaction croisée n'est là encore observée, que ce soit avec les protéines bactériennes ou avec les protéines végétales (figure 29, bande 4, respectivement spot D et B). Ces deux observations confirment la très bonne spécificité de ces anticorps anti-protéines de levure. Une très légère coloration observée au niveau du dépôt correspondant au vin (figure 29, bande 4, spot E), suggère la présence de macromolécules d'origine levurienne dans le vin.

Ces premiers résultats confirment la présence de protéines végétales dans le vin : celles-ci proviennent du moût et résisteraient aux fermentations et aux divers traitements de stabilisation pour se retrouver dans le vin ; il semblerait également qu'il y ait présence de protéines levuriennes dans le vin, mais pas de protéines bactériennes.

De plus, chacun des anticorps polyclonaux est spécifique de son antigène ; en effet il n'existe aucune réaction croisée. Nous allons donc pouvoir utiliser ces anticorps afin de valider ou d'invalider ces premières observations.

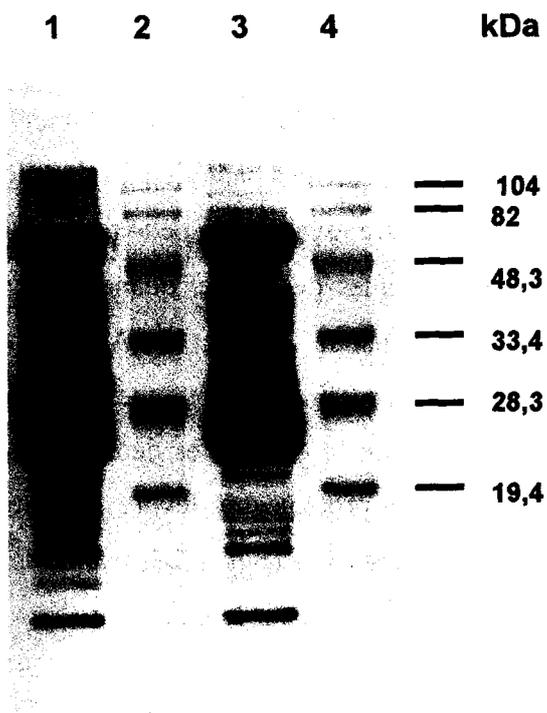


Figure 30 : Immunodétection des macromolécules du moût dans un moût de Chardonnay et dans le vin correspondant après SDS-PAGE. Piste 1, macromolécules du moût ; piste 3, macromolécules du vin ; pistes 2 et 4, marqueurs de taille.

II.3. Immunorévélation des protéines du moût dans le vin

II.3.1. Immunorévélation des protéines totales d'origine végétale

Les protéines totales du moût et du vin ont été soumises à une électrophorèse SDS-PAGE puis à un transfert sur filtre de nitrocellulose. Ce filtre a ensuite été hybridé avec le sérum contenant les anticorps polyclonaux anti-protéines de moût. Le western blot correspondant est présenté à la figure 30. On peut remarquer que ce blot possède quelques ressemblances avec le profil électrophorétique du moût coloré au Bleu de Coomassie (figure 27), avec, cependant, une meilleure résolution se traduisant par des bandes plus fines et plus nombreuses. Ceci est lié à la spécificité et la grande sensibilité de la technique immunospcifique. Les anticorps anti-moût reconnaissent six protéines majeures avec des gammes de masses moléculaires variant de 14 à 60/64 kDa, ainsi que plusieurs autres protéines mineures intercalées entre ces protéines majeures. De plus, certaines protéines ayant des masses supérieures à 70 kDa sont révélées grâce à cette technique (figure 30). Ceci n'est pas surprenant dans la mesure où, comme nous l'avons déjà évoqué précédemment, ces macromolécules de haut poids moléculaire sont généralement assimilées à des AGPs (Saulnier et Brillouet, 1989 ; Saulnier et al., 1992), macromolécules constituées presque exclusivement de polysaccharides et donc difficilement révélées au BBC (Frevert et Ballou, 1985 ; Waters et al., 1993).

L'immunodétection des protéines du moût dans le vin est présentée à la figure 30. On observe une certaine similitude entre le profil du moût et celui du vin (figure 30), avec, de nouveau, une diminution d'intensité de certaines protéines, corrélée probablement à une diminution en quantité de ces protéines, même si l'observation d'un western-blot n'est que semi-quantitative.

Cependant, avec cette technique, nous voyons qu'aucune protéine ne semble disparaître, *a contrario* de ce qui avait été observé lors de la coloration au BBC. Ainsi, la plupart des protéines du moût se retrouve dans le vin, avec, cependant, une diminution en concentration de certaines protéines qui, probablement, s'insolubilisent lors du processus de vinification. Ces observations sont d'ailleurs en accord avec ce que nous avons déjà observé lors de la coloration au BBC (figure 27).

II.3.2. Fractionnement des protéines du vin sur Con A

Nous nous sommes attaché par la suite à caractériser les protéines végétales présentes dans le vin, et, en particulier, à rechercher si certaines d'entre-elles sont de nature glycoprotéique. Pour cela, les macromolécules totales du vin ont été soumises à une chromatographie sur concanavaline A, puis révélées par western blot avec les anticorps anti-protéines de moût. La fraction protéique isolée sur Con A et provenant du raisin (figure 31) montre une gamme de masses moléculaires variant de 25 à plus de 70 kDa, avec la présence de quatre protéines majeures : une de 24/25 kDa, une de 30 kDa, une autre à 32 kDa et enfin la dernière bande, plus diffuse, de 60 à 64 kDa. En outre, de nombreuses glycoprotéines mineures sont également visualisées avec une gamme de masses moléculaires variant de 32 à 44 kDa et, enfin, certaines glycoprotéines sont faiblement révélées au-delà de 70 kDa.

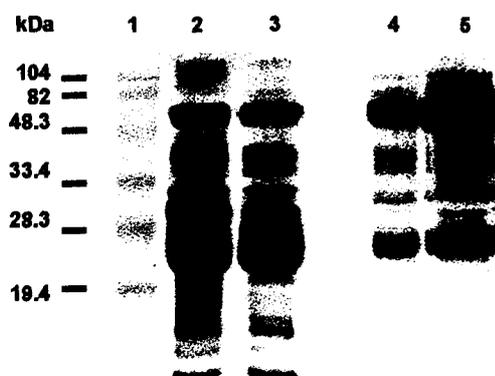


Figure 31 : Immunorévélation des macromolécules végétales dans le vin après chromatographie sur Con A. Piste 1, marqueurs de taille ; piste 2, macromolécules du moût ; piste 3, macromolécules du vin ; pistes 4 et 5, macromolécules du vin retenue sur Con A (les quantités déposées vont respectivement du simple au double).

On peut s'interroger sur la nature de la bande à 62/64 kDa. En effet, cette glycoprotéine originaire du raisin semblerait présenter les mêmes caractéristiques électrophorétiques que celles décrites pour l'invertase de raisin. Ainsi, Ruffner et al. (1995)

trouvent que l'invertase d'un hybride Riesling x Silvaner possède une masse de 60 kDa estimée par SDS-PAGE, et qu'elle est glycosylée. Cette observation est confirmée par Davies et Robinson (1996), qui, eux, clonent deux gènes pouvant correspondre à deux gènes d'invertase vacuolaire, et démontrent qu'elle aurait une masse de 61 kDa. Cependant, la caractérisation de cette glycoprotéine fera l'objet d'un travail particulier dans ce manuscrit, et c'est pourquoi nous n'approfondirons pas son étude dans ce chapitre.

Nous avons donc démontré que de nombreuses protéines du vin ont une origine végétale, ces protéines couvrent une large gamme de masses moléculaires variant de 14 à plus de 70 kDa. Il faut remarquer que la plupart des protéines végétales du vin, comprises entre 25 et plus de 70 kDa, sont en fait de nature glycoprotéique, alors que celles qui sont inférieures à 25 kDa ne semblent pas être glycosylées.

II.4. Immunodétection des protéines bactériennes solubles dans le vin

Les vins de Champagne subissent deux types de fermentation : une fermentation alcoolique, pendant laquelle les sucres sont transformés en alcool et gaz carbonique, provoquée par les levures (*S. cerevisiae*) ; et une fermentation malolactique, durant laquelle il y a transformation de l'acide L-malique en acide L-lactique, ce qui provoque une désacidification du vin par action de bactéries (*Oenococcus oeni*). La plupart des études portant sur la détermination de l'origine des protéines du vin font référence à deux origines potentielles : le raisin, bien sûr, et les levures. Cependant, pour les vins ayant subi la fermentation malolactique, on peut raisonnablement s'interroger sur le fait que les bactéries pourraient, elles aussi, relarguer dans le vin certaines de leurs protéines, d'autant que, récemment, Monteiro et al. (2001) ont démontré que certaines protéines du vin avaient des homologies de séquence avec des protéines bactériennes. Ces microorganismes possèdent également des exoprotéases qui peuvent être excrétées dans le milieu (Farias et Manca de Nadra, 2000).

Dans le but de rechercher des protéines bactériennes, nous avons donc appliqué la même technique immunospécifique que celle utilisée pour la détection des protéines du moût. Pour cela, les protéines solubles libérées par les bactéries ont été isolées spécifiquement dans un milieu synthétique très proche des conditions rencontrées lors de la vinification. Seules les protéines susceptibles d'être libérées par les bactéries dans ces conditions seront donc

recueillies. Les protéines solubles libérées par les bactéries ont été ensuite concentrées, dialysées et utilisées comme antigènes afin de produire un sérum polyclonal dirigé contre ces protéines. Ce sérum contenant les anticorps polyclonaux a été utilisé afin de détecter la présence des protéines bactériennes.

Les résultats du western blot sont présentés à la figure 32. La piste 3 représente l'hybridation des anticorps polyclonaux avec leurs propres antigènes isolés du milieu synthétique. On observe que les bactéries libèrent dans le milieu synthétique un certain nombre de macromolécules de haut poids moléculaire (figure 32, piste 3) formant une succession de protéines presque continue du sommet du gel jusqu'à des masses moléculaires d'environ 30 kDa, avec quelques protéines majeures à 40/48 kDa, une autre à 70 kDa et une de haute masse moléculaire à plus de 200 kDa.

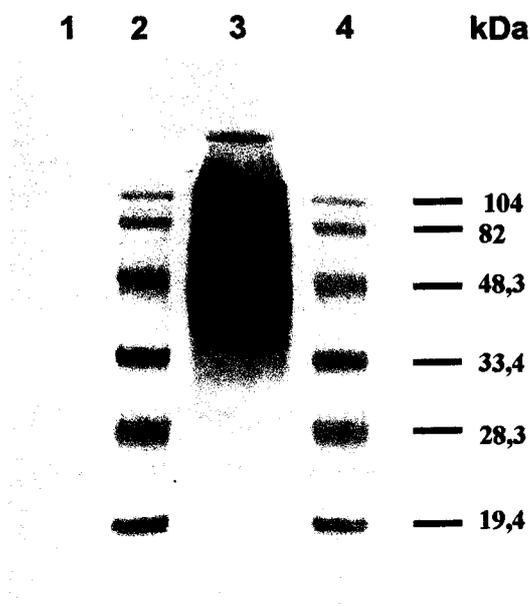


Figure 32 : Immunorévélation des macromolécules d'origine bactérienne dans le vin.

Piste 1, macromolécules du vin ; piste 3, macromolécules bactériennes secrétées dans le milieu synthétique, pistes 1 et 4, marqueurs de taille.

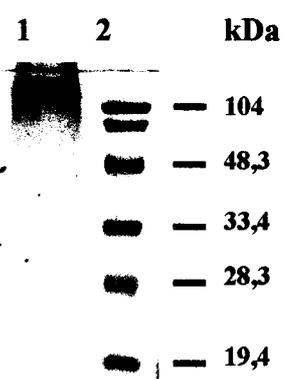


Figure 33 : Profil électrophorétique des macromolécules secrétées par les levures dans le moût modèle. Piste 1, macromolécules levuriennes ; piste 2, marqueurs de taille.

Il est important de noter que ces macromolécules n'ont pu être visualisées qu'en utilisant la technique d'immunodétection, les colorations classiques (argent ou BBC) ne donnaient que de piètres résultats.

Aucune hybridation entre les anticorps anti-protéines bactérienne et les protéines du vin n'apparaît au niveau des protéines totales du vin (figure 32, piste 1). Les protéines d'origine bactérienne seraient donc absentes du vin aux limites de détection de la méthode utilisée.

II.5. Immunodétection des protéines levuriennes solubles dans le vin

Afin de détecter la présence de protéines d'origine levurienne dans le vin, nous avons mis en place un protocole identique à celui utilisé pour la détection des protéines bactériennes, c'est à dire dans des conditions très proches de celles rencontrées au cours de la vinification. Les levures sont mises en culture dans un moût synthétique dont la composition est très proche de celle d'un moût. Le milieu de culture est ensuite filtré, concentré, dialysé et utilisé afin de produire des anticorps polyclonaux.

Les macromolécules libérées par la levure et isolées du moût synthétique sont visualisées après SDS-PAGE. Les colorations classiques (argent BBC) ne donnent aucun résultat. La coloration au PAS (figure 33, piste 1) montre, en revanche, une bande assez diffuse dans la partie supérieure du gel et fortement colorée dans son extrême partie supérieure, puis plus diffuse et moins nette dans sa partie inférieure. Ceci indique donc que les macromolécules libérées par la levure dans le milieu synthétique, sont composées en grande majorité de glycannes. De plus, nous pouvons également faire un parallèle avec ce que nous avons observé lors de la coloration du vin au PAS (figure 28). En effet, cette même zone de masses moléculaires (supérieure à 200 kDa) paraissait plus intense dans le vin que dans le moût, laissant supposer qu'il y aurait relargage de macromolécules par les levures. Ces premières observations valideraient donc la présence de macromolécules levuriennes dans le vin.

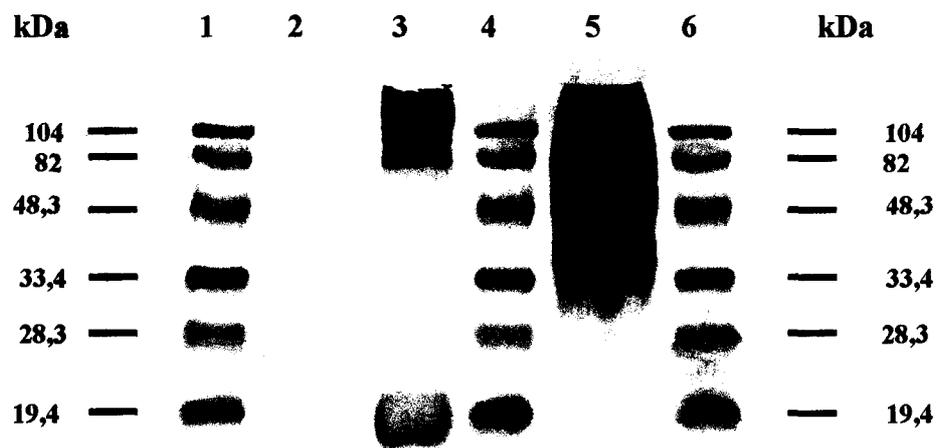


Figure 34 : Immunodétection des macromolécules levuriennes dans le vin. Pistes 1, 4 et 6, marqueurs de taille ; piste 2, macromolécules du moût ; piste 3, macromolécules du vin ; piste 5, macromolécules secrétées par les levures dans le moût synthétique.

Afin de démontrer, sans aucune ambiguïté, la présence (ou l'absence) de protéines levuriennes dans le vin, le moût, ainsi que les protéines de levure isolées après fermentation alcoolique ont été soumises à une immunorévélation en utilisant le sérum d'anticorps polyclonaux anti-protéines levuriennes. Le résultat de cet immunoblot est présenté à la figure 34. L'absence de réaction croisée entre ce sérum et les protéines du moût (figure 34, piste 2) démontre, de nouveau, la bonne spécificité de ces anticorps. L'interaction de ces anticorps avec leurs propres antigènes libérés dans le moût synthétique (figure 34, piste 5) conduit à un profil assez proche de celui observé avec les protéines bactériennes (figure 32), c'est à dire une très large bande continue de 25 kDa à plus de 200 kDa, la partie supérieure de cette bande étant la plus réactive et la plus colorée. De plus, les anticorps réagissent également, mais plus faiblement avec des protéines dans une gamme de masses moléculaires centrée autour de 20 kDa. Ainsi, lorsque les levures sont cultivées en moût synthétique, elles libèrent un grand nombre de protéines. Qu'en est-il dans le vin ?

Pour répondre à cette question, nous avons donc hybridé ces anticorps avec les protéines du vin. Ainsi, trois zones distinctes d'interaction des anticorps avec des protéines apparaissent (figure 34). Ces résultats indiquent la présence de protéines levuriennes dans le vin. La première zone est très large et diffuse, localisée dans la partie supérieure du gel dans des gammes de masses moléculaires variant de 60 à plus de 200 kDa. Ces macromolécules correspondraient aux mannoprotéines levuriennes colorées au PAS (figure 33). La deuxième bande, elle, est au contraire beaucoup plus fine et beaucoup moins intense, et localisée à environ 38 kDa. La troisième zone de révélation est également assez diffuse, et centrée autour de 20 kDa.

Nos résultats démontrent qu'il y a indiscutablement présence dans le vin de protéines d'origine levurienne. En effet, nous visualisons, lors de la révélation d'un western blot de vin, trois zones bien distinctes. La première zone qui est présente dans la partie supérieure du gel possède des PM hétérogènes et correspond à la zone colorée positivement au PAS ; il s'agirait donc des mannoprotéines levuriennes décrites dans la littérature (Waters et al., 1993, 1994 a ; Dupin et al., 2000), et libérées lors de la fermentation alcoolique.

Quant aux autres macromolécules, nous pouvons faire un parallèle avec des travaux antérieurs. Ainsi Marchal et al. (1996) isolent, par chromatographie d'affinité (Con A), les fractions protéiques du moût et du vin correspondant. En comparant les deux profils

électrophorétiques, ces auteurs observent que certaines protéines (dont quelques protéines mineures comprises entre 32 et 44 kDa ainsi qu'une large gamme de protéines dans la zone des 20 kDa et une bande supérieure à 100 kDa) sont présentes dans le vin et absentes du moût. Ces observations conduisent Marchal et al. (1996) à conclure que ces protéines seraient relarguées par les levures pendant la fermentation alcoolique. Il y a donc concordance entre nos résultats et ceux de Marchal et al. (1996). Cependant, les diverses molécules, isolées par Marchal et al. (1996), seraient de nature glycoprotéique car, fixées sur la Con A, ce que nous n'avons pu démontrer. En effet, afin de révéler les glycoprotéines, ou plutôt les glycannes associés aux protéines, nous avons utilisé la coloration au PAS. Avec cette technique, seules les mannoprotéines de haut poids moléculaire présentes à la partie supérieure du gel sont visualisées et, ceci, probablement du fait de la sensibilité assez faible de cette coloration. Ces deux bandes, celles comprises entre 32 et 44 kDa ainsi que celle centrée autour de 20 kDa, pourraient être également des fragments de glycoprotéines levuriennes. En effet, Moine-Ledoux et Dubourdieu (1999) isolent dans le vin un fragment d'invertase pariétale de levure. Ce fragment de 31,8 kDa est glycosylé. Cependant, aucune des molécules qui sont mises en évidence ne possède la même masse que ces fragments. Pourrait-il s'agir d'autres fragments de l'invertase ou d'autres glycoprotéines ? La question reste posée.

III. CONCLUSION

Cette étude démontre, sans ambiguïté, la présence de nombreuses protéines végétales et levuriennes dans les vins blancs. De plus, la plupart des protéines du moût sont présentes dans le vin champenois, et un grand nombre d'entre elles sont en fait de nature glycoprotéique. Il y a également présence dans le vin de protéines levuriennes

Ces résultats sont en contradiction avec ceux publiés par Ferreira et al. (2000). En effet, ces auteurs qui avaient utilisé également une technique immunospécifique, arrivent à la conclusion que le vin étudié ne renferme que des protéines d'origine végétale. Les méthodologies différentes utilisées dans les deux études sont probablement à l'origine de cette divergence de résultats (Monteiro et al., 1999). En effet, Ferreira et al (2000) utilisent des anticorps dirigés contre les protéines totales du vin, et utilisent ces anticorps afin de détecter chez le raisin et la levure la présence de ces protéines. De plus, ces auteurs utilisent des extraits totaux de levure après broyage. Leur étude a donc été réalisée dans des conditions très éloignées de celles rencontrées lors de la vinification.

Après s'être interrogés sur l'origine des protéines totales du vin, nous allons nous focaliser maintenant sur une protéine particulière : l'invertase de raisin, protéine majeure des vins de Champagne.

DEUXIEME PARTIE

STRUCTURE GLYCANNIQUE DE L'INVERTASE DE RAISIN

I. INTRODUCTION

L'invertase de raisin a été décrite à plusieurs reprises comme étant une glycoprotéine (Nakanishi et Yokotsuka, 1990 ; Pornaveewat et al., 1994 ; Ruffner et al., 1995). Rappelons que ce type de composé semble jouer, d'un point de vue physico-chimique, un rôle primordial dans les propriétés de surface des vins effervescents. En effet, grâce à leur ambivalence structurale, un cœur protéique hydrophobe associé à une partie glycanique hydrophile, les glycoprotéines, molécules dites tensioactives, pourraient jouer un rôle prépondérant dans la stabilisation des bulles et donc de la mousse des vins de Champagne (Brissonnet et Maujean, 1991 et 1993).

Afin d'approfondir notre connaissance de ces composés, nous allons nous intéresser plus particulièrement à une de ces glycoprotéines, l'invertase de raisin, et notamment étudier sa structure glycanique. Pourquoi avoir choisi cette glycoprotéine ? D'une part, l'invertase est une protéine prédominante des vins de Champagne, cette enzyme pouvant représenter, en effet, de l'ordre de 12 à 40 % des protéines totales d'un champagne (Robillard, communication personnelle). D'autre part, cette enzyme possède une hydrophobie élevée (1050 kcal/résidus) et un point isoélectrique (pI) proche de celui du vin de l'ordre de 3,9 (Marchal, 1995), données importantes et décrites comme étant primordiales pour conférer à une protéine de bonnes propriétés moussantes.

Tout au long de cette étude, nous nous appuyerons sur les séquences publiées par Davies et Robinson (1996) et faisant référence à deux invertases vacuolaires clonées à partir de baies de *Vitis vinifera* L. cv. Sultana (figures 20 a et b). L'étude de ces séquences fait apparaître la présence de cinq sites potentiels de glycosylation (ou séquons : Asn-X-Ser/Thr) pour la séquence GIN2 (figure 20 b) et de douze sites potentiels pour la séquence GIN1 (figure 20 a).

Deux questions se posent avant de mettre en place cette étude :

- De quelle séquence dérive l'invertase exprimée dans les baies de Chardonnay et présente dans les moûts champenois, GIN1, GIN2 ou des deux ?
- Quels sont les sites réellement glycosylés et avec quelles structures glycaniques ?

Afin de répondre à ces diverses questions, nous avons dû, dans un premier temps, chercher à purifier l'invertase de raisin d'un moût de Chardonnay.

Afin de nous affranchir d'une éventuelle « contamination » par des invertases d'autres origines (levurienne ou fongique), nous avons décidé de travailler à partir d'un moût de la variété Chardonnay exempt de toute moisissure (visuellement). Pour toute cette étude, le cépage Chardonnay a été retenu. Le Chardonnay est utilisé pour l'élaboration des champagnes « blancs de blancs ». Ce cépage rentre en association avec les cépages Pinot noir et Pinot meunier dans l'élaboration des vins d'assemblage. Ceci permet également de comparer nos travaux avec ceux précédemment réalisés au sein de notre laboratoire et qui portaient sur le même cépage (Marchal et al., 1996 ; Berthier et al., 1999).

II. PRE-PURIFICATION DE L'INVERTASE

II.1. Fractionnement par chromatographie liquide d'échange d'ions

Avec ce type de support chromatographique, le partage des solutés s'effectue en fonction de leur charge. En effet, la colonne porte un groupement chimique ionisable, et cette partie chargée peut interagir fortement avec des ions présents dans la solution chromatographiée. Ainsi, des molécules chargées peuvent s'adsorber réversiblement sur l'échangeur d'ions, et être ensuite relarguées de la résine.

La colonne utilisée, dans le cadre de cette étude, est une DEAE Waters 5 PW (10 X 100 mm) échangeuse d'anions. Nous avons privilégié l'utilisation de ce type de colonne par rapport aux colonnes échangeuses de cations car, compte tenu des points isoélectriques acides des protéines du vin (c'est à dire compris entre 2,5 et 5), le support échangeur de cations n'est pas adapté à leur séparation. En effet, comme l'avait déjà remarqué Berthier (1999), plus des trois-quarts des protéines, dont l'invertase, ne sont pas retenues sur une colonne échangeuse de cations.

200 mg de macromolécules lyophilisées (moût) sont solubilisés dans le tampon de fixation puis filtrés à 0,45 µm. Ils sont ensuite injectés sur la colonne échangeuse d'anions. Les fractions éluées sont ensuite analysées en SDS-PAGE après concentration et dialyse par ultrafiltration (Centriprep®- 10 Amicon). Le gradient mis en place est celui utilisé par Berthier (1999). Il est constitué d'un premier palier de NaCl à 80 mM, suivi d'un deuxième à 160 mM (c'est avec cette concentration en sel que l'invertase est éluee de la colonne) puis un dernier

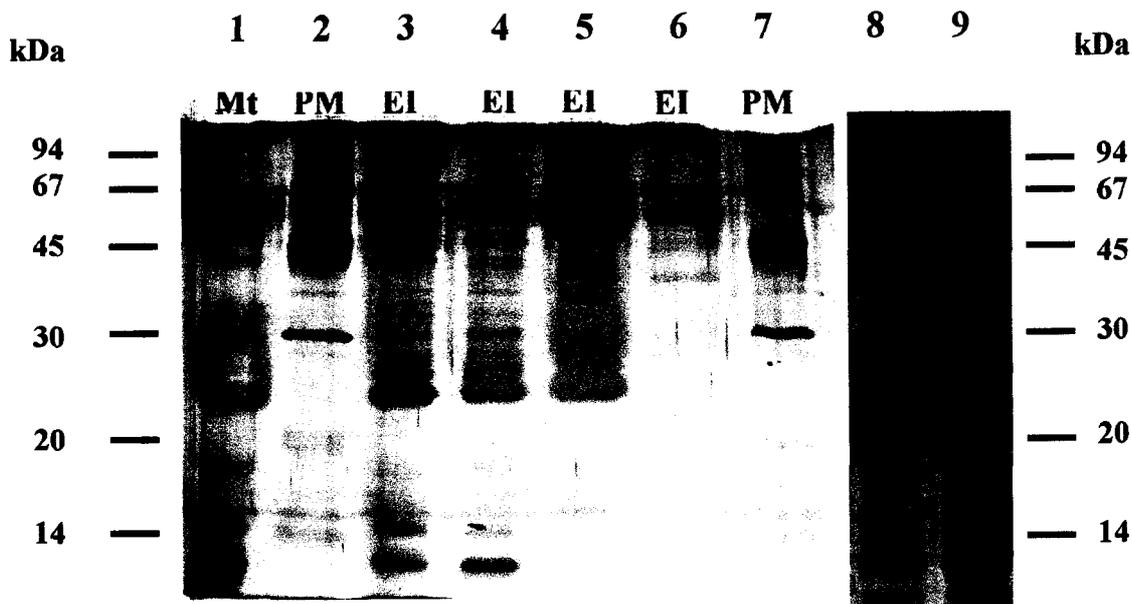


Figure 35 : SDS-PAGE des fractions issus du fractionnement des macromolécules du moût sur DEAE (pistes 1 à 7) puis sur Con A (pistes 8 et 9).

Piste 1 : colloïdes du moût (Mt 2001)

Piste 3 : Fraction non retenue sur colonne échangeuse d'ions (DEAE) (EI NR)

Piste 4 : Fraction retenue et éluée avec 80 mM de NaCl sur DEAE (EI 80)

Piste 5 : Fraction retenue et éluée avec 160 mM de NaCl sur DEAE (EI 160)

Piste 6 : Fraction retenue et éluée avec 0,5 M de NaCl sur DEAE (EI 0.5)

Piste 8 : Fraction retenue sur Con A et éluée avec 5 mM de sucre compétiteur

Piste 9 : Fraction retenue sur Con A et éluée avec 300 mM de sucre compétiteur

Pistes 2 et 7 : Marqueurs de poids moléculaires (PM)

palier à 0,5 M de NaCl afin de décrocher en totalité les protéines et les polyphénols encore fixés sur la colonne. Les fractions correspondant à chacun des paliers sont rassemblées et concentrées. Les concentrats sont ensuite analysés en SDS-PAGE par coloration au nitrate d'argent selon la méthode de Wray et al. (1981). D'autre part, chacune des fractions est soumise à un test d'activité enzymatique et à un dosage protéique. La fraction contenant l'activité enzymatique la plus élevée et éluée avec 160 mM de sel sur la colonne échangeuse d'anions est ensuite soumise à une chromatographie d'affinité sur lectines immobilisées.

II.2. Chromatographie d'affinité sur Concanavoline A

La fraction éluée de la colonne échangeuse d'anions est injectée sur une colonne de concanavoline A (Con A). La Con A est une lectine de plante, considérée comme spécifique des mannosides qui reconnaît, parmi les N-glycannes des glycoprotéines, les glycannes oligomannosidiques, mais aussi les glycannes de type hybride et les glycannes complexes bi-antennés. Ce type de colonne permet donc de retenir les macromolécules glycosylées comportant des résidus α -D mannopyranosyl présents, soit dans le noyau (cœur) des N-glycannes, soit au niveau des antennes. On sait que l'invertase de raisin est une glycoprotéine (Ruffner et al., 1995), nous allons donc mettre à profit cette spécificité afin de purifier l'invertase de raisin avec cette colonne de lectines immobilisées. Les fractions retenues sont éluées avec deux paliers de sucre compétitif, l'un à 5 mM d' α -D-méthyl mannoside et l'autre à 300 mM d' α -D-méthyl mannoside. Les fractions ainsi éluées sont ensuite concentrées, ultrafiltrées et dialysées sur des unités d'ultrafiltration (Centiprep[®]-10 Amicon), puis analysées en SDS-PAGE et soumises à un test d'activité enzymatique. On remarque que la fraction contenant l'activité enzymatique est celle éluée avec la teneur en sucre compétiteur la plus faible (figure 35). Ainsi, l'invertase de raisin présente une affinité faible pour la phase d'affinité, ce qui laisse supposer que cette enzyme aurait une glycosylation, dans son ensemble, de type complexe ; en effet ces glycannes ont une affinité pour la Con A plus faible que ceux de types manno- et oligomannosidique (Ohyama et al., 1985) qui restent plus fortement retenus sur la colonne et sont élués avec des teneurs en sucre plus élevées. De plus, certains glycannes végétaux portent dans leur structure un xylose lié en β (1, 2) sur le mannose central du noyau des N-glycannes (figure 8c), la présence de ce xylose diminuant fortement

l'affinité de la con A (Wilson et Altmann, 1998). Ainsi, l'invertase porterait sur ces glycanes des résidus xylose.

Les profils électrophorétiques des fractions isolées sur con A et éluée avec deux concentrations en sucre compétiteur (5 mM et 300 mM) sont sensiblement identiques (figure 35, pistes 8 et 9 respectivement). Sur ces profils, on observe la présence de cinq protéines majeures. Une première bande diffuse est centrée autour de 60/62 kDa. Cette bande pourrait correspondre à l'invertase de raisin. En effet, Ruffner et al. (1995) démontrent que l'invertase d'un hybride Riesling x Silvaner possède une masse moléculaire de 60 kDa. Cette large gamme de masses moléculaires pourrait s'expliquer par une glycosylation très hétérogène de cette glycoprotéine.

De plus, on peut noter la présence d'une bande protéique centrée sur 24/25 kDa. Ce doublet de bande avait également été observé par Ruffner et al. (1995). Ces auteurs démontrent d'ailleurs que, lorsqu'ils chauffent un échantillon purifié d'invertase (bande à 60 kDa), il y a fragmentation partielle de l'enzyme puisqu'une bande protéique apparaît après chauffage autour de 24 kDa. Nos échantillons ont toujours subi ce traitement. Sur la base de ces observations, il semblerait donc que cette large bande provienne de l'invertase.

On remarque, cependant, pour cette protéine quelques différences. Ainsi, l'intensité de la bande correspondant à l'invertase (60/62 kDa) diminue de façon importante dans la fraction éluée avec 300 mM de sucre (figure 35, piste 9). Cette observation est en total accord avec les données obtenues lors du test d'activité enzymatique, où l'on observait une chute de l'activité dans cette fraction par rapport à la fraction éluée avec 5 mM. Ceci traduit, ainsi que nous l'avons déjà évoqué, une faible affinité de la Con A immobilisée pour l'invertase, du fait probablement de sa spécificité de glycosylation. De plus, la bande centrée autour de 20/25 kDa traduit la même spécificité : en effet, elle est éluée spécifiquement avec la concentration en sucre la plus faible (figure 35, piste 8).

Nous notons la présence, dans ces deux fractions, de trois autres protéines à 14, 25 et 30 kDa. Les protéines de 14 et 30 kDa semblent être en quantités équivalentes dans les deux fractions. Quant à la protéine de 25 kDa, elle semble avoir une affinité plus forte pour la Con A ; en effet, elle est éluée préférentiellement avec la concentration en sucre la plus forte (figure 35, piste 9).

On observe également la présence de nombreuses protéines mineures séparées en deux zones bien distinctes. La première de faible masse moléculaire, comprise entre 14 et 20 kDa,

présente dans la fraction éluée avec 5 mM (figure 35, piste 8) mais semble absente de la seconde fraction (figure 35, piste 9).

La seconde, quant à elle, est localisée dans une gamme de masses moléculaires variant de plus de 30 kDa à 45 kDa et semble être éluée plus spécifiquement avec la concentration en sucre la plus élevée (figure 35, piste 9).

Cette première étape permet ainsi de confirmer la présence de plusieurs glycoprotéines dans un moût de Chardonnay. En comparaison avec l'étude précédente concernant la détermination de l'origine des protéines du vin, il semblerait que, seules les glycoprotéines de hautes masses moléculaires (25 à 70 kDa), soient stables au cours des processus fermentaires et soient présentes dans le vin.

Même si la fraction éluée avec 5 mM de sucre semble être enrichie en invertase, la bande protéique (60/62 kDa) correspondant à l'invertase n'est pas majoritaire par rapport aux autres protéines. Toutes ces techniques de fractionnement ne permettent pas, comme nous venons de le voir, la purification de l'invertase de raisin. Ceci nous permet cependant d'obtenir une pré-purification de cette enzyme.

Parallèlement à notre étude, une aliquote d'une fraction enrichie en invertase de raisin a été fournie à l'Unité de Physico-chimie et biotechnologie des Polymères (INRA de Reims) dirigée par le Dr R. Douillard. A partir de cette fraction, l'équipe de l'INRA a mené une étude portant sur les propriétés interfaciales de l'invertase de raisin (Puff et al., 2001). Ces auteurs ont étudié l'effet de différentes concentrations d'éthanol sur l'adsorption de la caséine β , l'invertase et les molécules du vin à l'interface gaz-liquide. Ils observent que l'éthanol n'entrave pas l'adsorption des molécules à l'interface. Ils comparent également le module dilatationnel et la pression de surface pour un vin désalcoolisé, une solution d'invertase à 100 mg/L et une solution de β -caséine à 10 mg/L. Leurs résultats indiquent que l'invertase, au contraire de la β -caséine, semble ne pas être un bon modèle moléculaire pour décrire le comportement des couches d'adsorption d'un vin sans éthanol, sans pourtant préjuger de ses propriétés moussantes, qui font l'objet d'une partie de cette thèse (voir chapitre III).

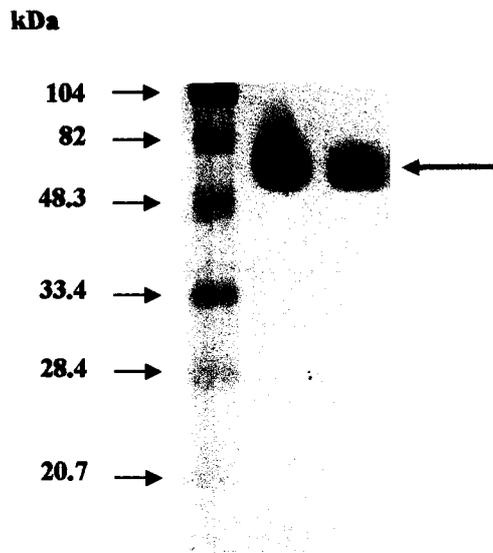
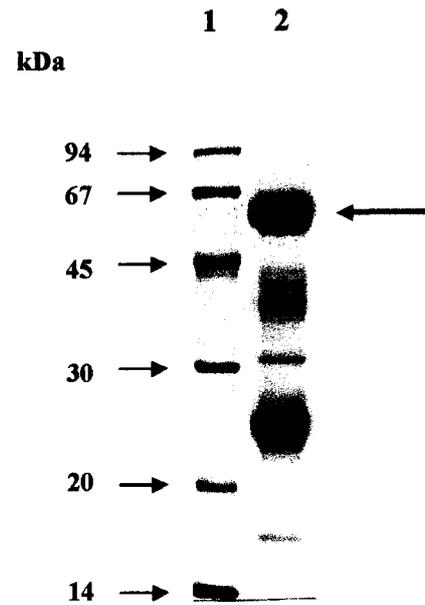
A**B**

Figure 36 : Profils électrophorétiques SDS-PAGE d'un moût de Chardonnay après purification sur colonne d'échange d'ions et sur colonne d'affinité sur Concanavaleine A (élution avec 5 mM de sucre compétiteur).

(A) Suivi de l'activité en gel de l'invertase : (1) marqueurs de poids moléculaire précolorés, (2) et (3) Moût de Chardonnay, concentration de dépôt du double (2) au simple (3).

(B) Coloration au bleu de coomassie : (1) marqueurs de poids, (2) Moût de Chardonnay.

III. STRUCTURE GLYCANNIQUE DE L'INVERTASE

Récemment, des techniques permettant l'analyse directe des glycoprotéines sur gel SDS-PAGE et ne nécessitant pas une purification totale des protéines, ont démontré une réelle efficacité dans l'analyse structurale des glycanes et, notamment, des glycanes d'origine végétale (Kolarich et Altmann, 2000). Nous avons décidé de nous orienter par la suite vers l'utilisation de cette technique de digestion en gel afin de déterminer la structure et l'implantation des glycanes de l'invertase de raisin.

III.1. Activité en gel de l'invertase de raisin

Des travaux antérieurs font état, pour l'invertase de raisin, de masses moléculaires variables mais toujours proches de 60 kDa (Ruffner et al., 1995 ; Davies et Robinson, 1996). L'observation de nos profils électrophorétiques (fractions purifiées sur colonne échangeuse d'anions et sur Con A) démontre, certes, la présence d'une large bande autour de 60 et 62 kDa (figure 35), mais ces données ne suffisent pas à identifier sans ambiguïté l'invertase de raisin. Il nous fallait donc, avant d'effectuer cette digestion en gel, localiser spécifiquement l'invertase dans ce profil électrophorétique. Nous avons soumis le gel à un test d'activité (zymogramme). Le résultat de ce test est présenté figure 36. Nous observons une zone unique d'activité enzymatique centrée autour de 60 – 62 kDa. Au départ du protocole de purification, nous sommes partis d'un moût de raisins sains. Ce moût ne comportait donc aucune protéine levurienne et, de ce fait, aucune invertase autres que celle du raisin (cf invertases de la levure ou fongique). La zone d'activité enzymatique observée sur gel ne peut correspondre qu'à l'invertase de raisin.

La zone contenant l'activité enzymatique a été ensuite soumise à une digestion trypsique en gel.

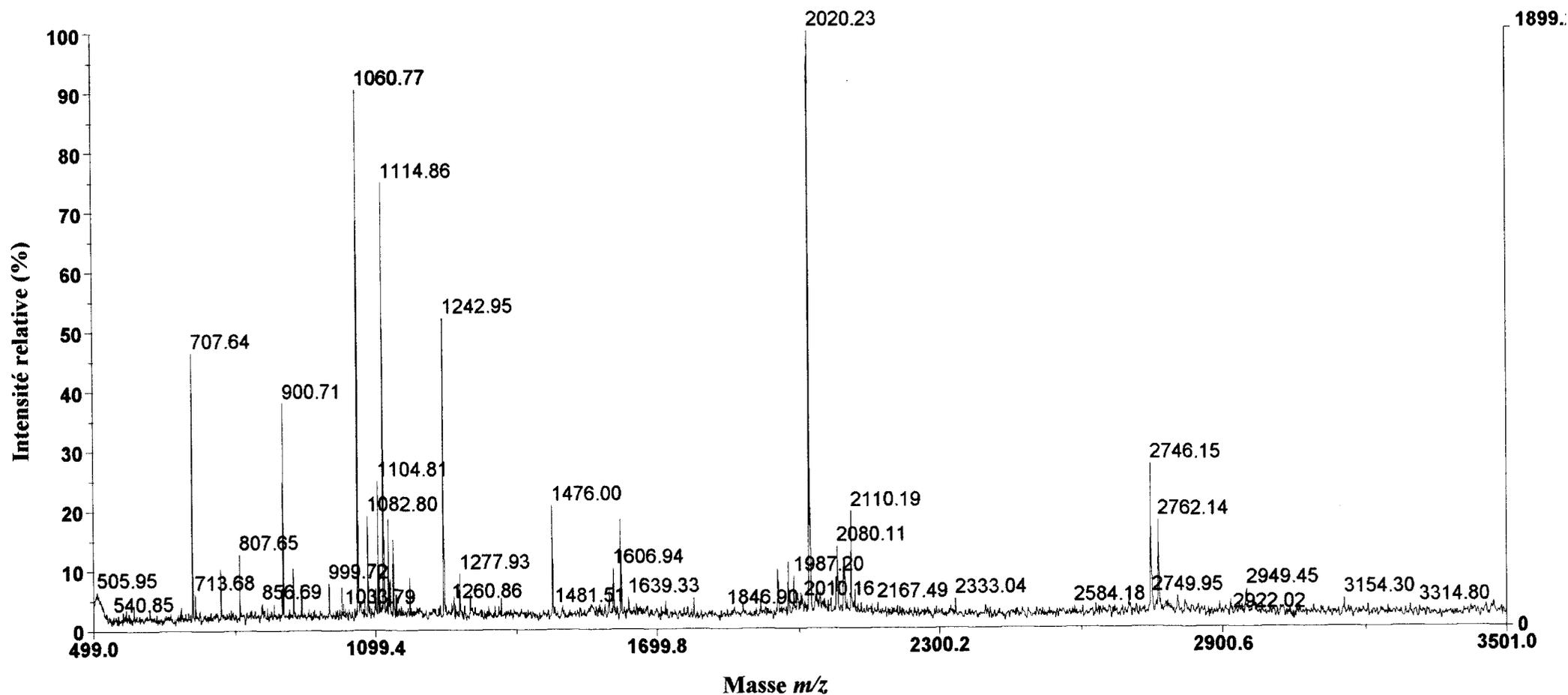


Figure 37 : Spectre MALDI des peptides provenant de la digestion trypsique en gel du spot électrophorétique contenant l'activité enzymatique. Les masses moléculaires sont indiquées et correspondent aux masses mono isotopiques des peptides visualisés sous forme d'ions $[M + H]^+$.

III.2. Digestion trypsique en gel

Nous avons déposé sur le gel électrophorétique 25 μ L d'échantillon correspondant à 12,5 μ g de protéines totales. Après migration et coloration au Bleu de Coomassie (figure 36), la bande contenant l'activité enzymatique est excisée du gel, soumise à une réduction et à une alkylation (notons que la bande correspondant à l'invertase représente à elle seule, après analyse du gel par densitométrie, 50 % des protéines totales soit en fait 6,25 μ g d'invertase équivalant à 100 pmol). Puis, l'invertase est digérée par la trypsine suivant le protocole décrit par Shevchenko et al. (1996) (figure 40). Cette digestion s'effectue pendant une nuit à 37 °C. Nous avons ensuite extrait du gel les peptides et glycopeptides issus de cette digestion. La trypsine hydrolyse spécifiquement les liaisons peptidiques où sont engagés par leur carboxyle des acides aminés basiques (Arginine ou Lysine). Les peptides et glycopeptides obtenus sont au préalable dessalés sur Zip-Tip C18, puis analysés par spectrométrie de masse MALDI-TOF, la matrice utilisée étant l'acide 2,5- dihydroxybenzoïque (DHB). Les spectres obtenus sont présentés à la figure 37. L'analyse par spectrométrie de masse nous permet de visualiser les peptides et glycopeptides issus de la digestion trypsique et ainsi d'obtenir une empreinte peptidique en masse (ou « peptide mapping »). Cette empreinte de masse permet ainsi d'identifier le spot électrophorétique comme étant l'invertase (figure 37). En effet, l'ensemble des masses des peptides issus d'une digestion constitue la carte peptidique massique d'une protéine, carte qui peut être comparée à une véritable « empreinte digitale » de cette protéine. La protéine peut être identifiée en comparant la carte peptidique massique obtenue expérimentalement aux cartes peptidiques massiques théoriques déduites des séquences de chaque protéine présente dans les banques de données.

Afin de réaliser l'identification de la bande excisée, nous avons utilisé la banque de données du serveur de l'EMBL (European Molecular Biology Laboratory) et son algorithme de recherche « PeptideSearch» (<http://www.narrador.embl-heidelberg.de/GroupPages/Homepage.html>), ainsi que la base de données « PeptideMass » du serveur ExPASy (<http://us.expasy.org/cgi-bin/peptide-mass.pl>) qui nous a permis de comparer les masses prédictives mono isotopiques m/z des fragments de digestion trypsique de l'invertase de raisin avec les valeurs expérimentales.

Score: 1.00, 19 matching peptides: **Q9S944 (Q9S944)** pI: 4.60, Mw: 71546.48
 Vacuolar invertase 1, GIN1. - Vitis vinifera (Grape).

Masses monoisotopiques <i>m/z</i> observées (M+H) ⁺	Masses monoisotopiques <i>m/z</i> calculées (M+H) ⁺	Δmasse (Dalton)	#MC	modification	position	peptide
631.311	631.3086	-0.0023	0		375-379	YYASK
808.331	808.3254	-0.0055	0		333-339	ASMDDNR
900.401	900.4462	0.0452	0		380-386	TFYDQVK
1089.501	1089.5034	0.0024	0		538-546	TFFCTDLR
1104.551	1104.5473	-0.0036	0		112-120	TAFHFQPEK
1114.591	1114.6004	0.0094	0		408-417	GWASLQSIPR
1242.691	1242.6953	0.0043	1		407-417	KGWASLQSIPR
1605.701	1605.7114	0.0104	0		249-262	DPTTMWVGADGNWR
1952.941	1952.9487	0.0077	0		390-406	ILYGWISEGDIESDD LK
1970.011	1970.0027	-0.0082	0		161-176	DMIHWLYLPLAMVPD R
1982.941	1982.9317	-0.0092	0		626-642	IWEMASADIHPYPLD QP
2019.101	2019.0797	-0.0212	0		425-441	TGTYLLLWPIEEVES LR
2077.961	2077.9647	0.0037	0		230-248	YENNPVMVPPAGIGS DDFR
2109.051	2109.0498	-0.0011	1		389-406	RILYGWISEGDIESD DLK
2748.401	2748.3827	-0.0182	2		89-111	SFLGFSGRRLSYNWT TAMLAWQR
2764.331	2764.3776	0.0466	2	MSO: 106	89-111	SFLGFSGRRLSYNWT TAMLAWQR
3454.551	3454.5419	-0.009	0		340-369	HDYYALGEYDPM TDT WTPDDPELDVGIGLR
3664.651	3664.6583	0.0073	1		230-262	YENNPVMVPPAGIGS DDFRDPTTMWVGADG NWR
4243.851	4243.8495	-0.0014	1		333-369	ASMDDNRHDYYALGE YDPM TDTWTPDDPEL DVGIGLR

Tableau 4 : Liste des peptides obtenus par MALDI-TOF après digestion trypsique de la bande 60/62 kDa. Le peptide contenant le site de glycosylation est en rouge.

Dans notre cas, la digestion de la protéine et l'analyse en spectrométrie de masse nous permettent de visualiser 19 peptides au total, dont les masses sont indiquées dans le tableau 4. Chaque ion est représenté sous la forme $[M + H]^+$: en effet cette matrice, le DHB, produit préférentiellement ce type d'ions avec les peptides (Küster et al., 1998). En comparant cette carte peptidique massique avec celles des banques de données (« PeptideSearch »), on observe que tous ces peptides proviennent de l'invertase vacuolaire de raisin déduite de la séquence GIN1 et uniquement de cette séquence (figures 37 et 38). Nous n'observons en effet aucun peptide spécifique de la séquence GIN2, qui correspond également à une invertase vacuolaire. Ainsi, nos résultats confirment les travaux de Davies et Robinson (1996) selon lesquels, il existerait une expression préférentielle de GIN1 dans le raisin par rapport à GIN2 ; ce dernier gène serait quant à lui exprimé préférentiellement lors de la floraison. Cette sur-expression de GIN1 par rapport à GIN2 a également été démontrée par Sarry et al. (2004). Ces mêmes auteurs observent la présence, dans le raisin, de deux isoformes d'invertase dérivant de GIN1. Ces deux isoformes possèdent des masses moléculaires légèrement différentes 62,7 et 63 kDa et des pHi également légèrement différents de 0,1 unité, respectivement 4,6 pour l'une et 4,7 pour l'autre (Sarry et al, 2004).

Ainsi, la bande excisée puis digérée correspond bien à une invertase de raisin et dérive uniquement de la séquence GIN1 décrite par Davies et Robinson (1996) (figure 38). Il s'agit donc d'une invertase vacuolaire du raisin (Davies et Robinson, 1996). De plus, nous observons que cette invertase possède une forte hétérogénéité de masse moléculaire variant de 60 à 64 kDa (figure 36 B). Cette hétérogénéité de masse pourrait s'expliquer par une hétérogénéité dans la glycosylation de cette invertase. En effet, on observe chez les végétaux une forte hétérogénéité dans leur glycosylation (Lerouge et al., 1998). De plus, l'invertase qui provient de l'expression de GIN1 contient, comme nous l'avons déterminé à partir de la séquence décrite par Davies et Robinson (1996), 12 sites potentiels de glycosylation (figure 38). L'ensemble de ces données (un grand nombre de sites potentiels et une hétérogénéité de glycosylation) ne peut qu'accréditer notre hypothèse selon laquelle cette large gamme de masses moléculaires serait attribuée à une forte hétérogénéité de glycosylation.

(A)

PeptIdent :

1 match found:

Score	# peptide matches	AC	ID	Description	pI	Mw
1.00	<u>19</u>	<u>Q9S944</u>	Q9S944	Vacuolar invertase 1, GIN1. - Vitis vinifera (Grape).	4.60	71546.48

Score: 1.00, 19 matching peptides: Q9S944 (Q9S944) pI: 4.60, Mw: 71546.48
 Vacuolar invertase 1, GIN1. - Vitis vinifera (Grape).

(B)

Recouvrement de la séquence : 31,5 %

	1	11	21	31	41	51	
1	mdthhatshd	llhdeayapl	pysplpdhvp	pagapalgqr	rplkvcvtls	lmflvslvsf	60
61	irvhvtvdnd	gpsmeregrg	vaggvsekSF	LGFSGRRLSY	NWTTAMLAWQ	RTAFHFQPEK	120
121	nwmndpdgpl	fmgwyhlfy	qynpdsavwg	nitwghavsr	DMIHWLYLPL	AMVPDRwfdl	180
181	ngvwtgsati	lpngqiimly	tgdtndsvqv	qnlaypanls	dp1llhwikY	ENNPVMVPPA	240
241	GIGSDDFRDP	TTMWVGADGN	WRvavgslvn	ttgivlvfqt	tnftdfelfd	gelhgvpptg	300
301	mwecvdfypv	singvygldt	sahgpgikhv	lKASMDDNRH	DYYALGEYDP	MTDTWTPDDP	360
361	ELDVGIGLRL	dYERYASKT	FYDQVKkrRI	LYGWISEGDI	ESDDLKKGWA	SLQSIPrvl	420
421	hdnkTGTYLL	LWPIEEVESL	Rtnstefedv	llepgsivpl	digsasqldi	vaefevdnet	480
481	leamveadvi	yncstsagaa	grgalgpfgl	lvladdtlse	ltpiyfyiak	dtgdgsykTFF	540
541	CTDLSRssla	vddvdqriyg	sivpaldek	ptmrvlvdhs	ivegfsqggr	scittrvypt	600
601	eaiygaarlf	lfnnatgvnv	tasikiWEMA	SADIHPYPLD	QP		

Figure 38 : Résultat de l'identification de l'invertase après digestion trypsique en gel.

(A) Résultat de l'interrogation de la banque de donnée ExPASy « PeptIdent ».

(B) Les peptides visualisés lors de l'analyse MALDI sont écrits en majuscules rouges.

MDTHHATSHDLLHDEAYALPYSPLPDHPVPAGAPALGQRRPLKVCVTLSLMFLVSLVSFIR
 VHVTVDNDGSMEREGR6VAQ6VSEKSFLGFSGRRLSYNWTTAMLAWQRTAFHFQPEK
 NWMNDPDGPLFHMGWYHLFYQYNPDSAVWGNITWGHAVSRDMIHWLYLPLAMVPDR
 WFDLNGVWT6SATILPNGQIIMLYTGDTNDSVQVQNLAYPANLSDPLLLHWIKYENNPV
 MVPPAGIGSDDFRDPTTMWVGADGNWRVAVGSLVNTTGIVLVFQTTNFTDFELFDGELH
 GVP6T6MWECVDFYPVSINGVYGLDTSAHGPGIKHVLKASMDNRRHDYYALGEYDPMTDT
 WTPDDPELDV6IGLRLDYERYYASKTFYDQVKKRRILYGWISEGDIESDDLKKGWASLQSI
 PRTLHDNKT6TYLLLWPIEEVESLRTNSTEFEDVLEP6SIVPLDIGSASQLDIVAEFEVD
 NETLEAMVEADVIYNCSTSAGAAGRGAL6PFGLLVLADDTLSELTPIYFYIAKDTD6SYKTF
 FCTDLSSRLAVDDVDQRIY6SIVPALDDEKPTMRVLVDHSIVEGF6SQ6GRSCITTRVYPT
 EAIYGAARLFLFNAT6VNVTASIKIWEMASADIHPYPLDQP

GIN1 invertase vacuolaire
Séquence déduite 642 acides aminés
12 sites potentiels de glycosylation (séquons) [NXS/T]

Figure 39 : Séquence protéique déduite du gène de l'invertase de raisin GIN1 (numéro d'accèsion : Q9S944, Davies et Robinson, 1996). Le peptide signal potentiel est souligné. Les sites potentiels de glycosylation sont en rouge.

On observe également une forte représentation des peptides contenant une arginine (70 %) par rapport à ceux contenant une lysine (30 %). Cette différence de réponse est en total accord avec les précédentes observations faites par Krause et al. (1999). Ces auteurs démontrent, en effet, que l'intensité de la réponse des peptides contenant une arginine est très largement supérieure à celle des peptides contenant une lysine. Ceci s'explique par la présence, dans les groupements arginine, d'un groupement guanidique basique qui améliore l'ionisation de ces peptides et améliore donc fortement leur détection.

Ces peptides correspondent à 31,5 % de la séquence totale de l'invertase (figure 38). Ce faible recouvrement peut s'expliquer par la faible réponse des peptides contenant une lysine, ainsi que nous venons de le voir, mais également par la forte glycosylation de l'invertase telle que l'ont décrite Ruffner et al. (1995). En effet, ces auteurs démontrent que, lorsqu'ils déglycosylent chimiquement l'invertase, celle-ci perd 10 000 Da de masse après traitement, soit 16 % de la masse protéique totale. Ce qui, par déduction, en prenant une masse relative pour chaque glycanne de plus de 1 000 Da, laisse à penser que huit à neuf sites de glycosylation, parmi les 12 potentiels, pourraient être réellement glycosylés, couvrant ainsi une grande partie de la protéine. Cette forte glycosylation formerait une carapace qui protégerait l'invertase des attaques par les protéases, et limiterait ainsi la protéolyse, provoquant dans notre cas une faible libération de peptides. Cependant, ce recouvrement de séquence est suffisant pour identifier la protéine digérée : en effet, la plupart des travaux publiés font état d'un recouvrement compris entre 20 et 40 % (Mortz et al., 1996 ; Krause et al., 1999).

L'analyse du spectre de digestion trypsique ne fait apparaître aucun glycopeptide. Cette première étape ne nous permet d'obtenir aucune indication sur la structure glycanique de l'invertase de raisin. Cette perte de données s'explique facilement du fait de l'effet « supprimeur » de l'analyse en spectrométrie de masse MALDI-TOF (Kratzer et al., 1998). En effet, certains peptides ou glycopeptides, obtenus notamment après digestion trypsique, ne sont pas visualisés lors de l'analyse en spectrométrie de masse en raison de leurs propriétés intrinsèques telles que la présence d'acides aminés aromatiques, de chaînes latérales chargées, leur hydrophobicité ou bien leur taille (Kratzer et al., 1998).

Cette analyse des peptides de digestion nous permet également d'obtenir d'autres données importantes sur l'état de glycosylation de l'invertase. Ainsi, le peptide visualisé avec une masse mono isotopique m/z de 2748,401 correspond au fragment peptidique portant les acides aminés 89 à 111 (tableau 4). Ce peptide porte dans sa séquence une asparagine (asparagine numérotée 101 sur la séquence issue de GIN1) faisant partie d'un site potentiel de glycosylation. De plus, on observe également son « double oxydé » ($m/z = 2764,331$), c'est à dire ce même peptide ($m/z = 2748,401$) dont la méthionine-106 a été réduite et oxydée par formation d'une méthionine sulfoxyde (ajout de 16 Da). Le fait de retrouver ce peptide intact, ainsi que son double oxydé, dans le mélange provenant de la digestion trypsique semblerait indiquer qu'il ne serait pas glycosylé. Ainsi, l'**asparagine-101** appartenant au premier site potentiel (séquon) de glycosylation (se reporter à la séquence protéique, figures 38 et 39) semble ne pas subir de modification post traductionnelle et ne semble donc pas être glycosylée. Cependant, afin d'éliminer toute ambiguïté, il serait opportun d'effectuer, sur ce peptide, un séquençage par l'utilisation, par exemple, d'un spectromètre de masse en tandem (MS/MS). N'ayant pour le moment pas accès à ce type de technique, nous ne pouvons donc qu'émettre de fortes présomptions sur la non glycosylation de cette asparagine 101.

Nous avons cherché, par la suite, à purifier les glycopeptides issus de la digestion trypsique afin de les isoler de ce mélange de peptides et glycopeptides pour tenter de les visualiser en spectrométrie de masse. Pour ce faire, nous avons mis en place des microcolonnes de Con A. Le mélange issu de la digestion protéasique est déposé sur la colonne de Con A et recyclé au travers de celle-ci à plusieurs reprises, la fraction non retenue est conservée (figure 40). Afin d'éluer les fractions retenues, deux modes d'élution ont été utilisés: une élution par acidification du milieu (TFA 0,1 %) et une autre élution par addition d'un compétiteur l' α , D-méthyl mannopyranoside à la concentration de 300 mM. Les différentes fractions sont ensuite analysées en MALDI-MS. Malheureusement, nous ne sommes toujours pas parvenus à visualiser les glycopeptides, que ce soit dans les fractions retenues (éluées par acidification ou compétiteur) ou dans la fraction non retenue sur Con A. L'utilisation de ce type de lectine n'est peut être pas assez spécifique. En effet, nous avons vu dans le paragraphe dédié à la purification de l'invertase que celle-ci possède une affinité assez faible pour la concanavaleine A ; ainsi le (ou les) glycopeptide(s) provenant de l'invertase, du fait de leur structure glycanique, ne seraient pas ou très faiblement retenus par la concanavaleine A, se retrouvant ainsi toujours dans la fraction peptides-glycopeptides et donc toujours non visualisés du fait de l'effet « supprimeur » en MALDI-MS (Kratzer et al., 1998).

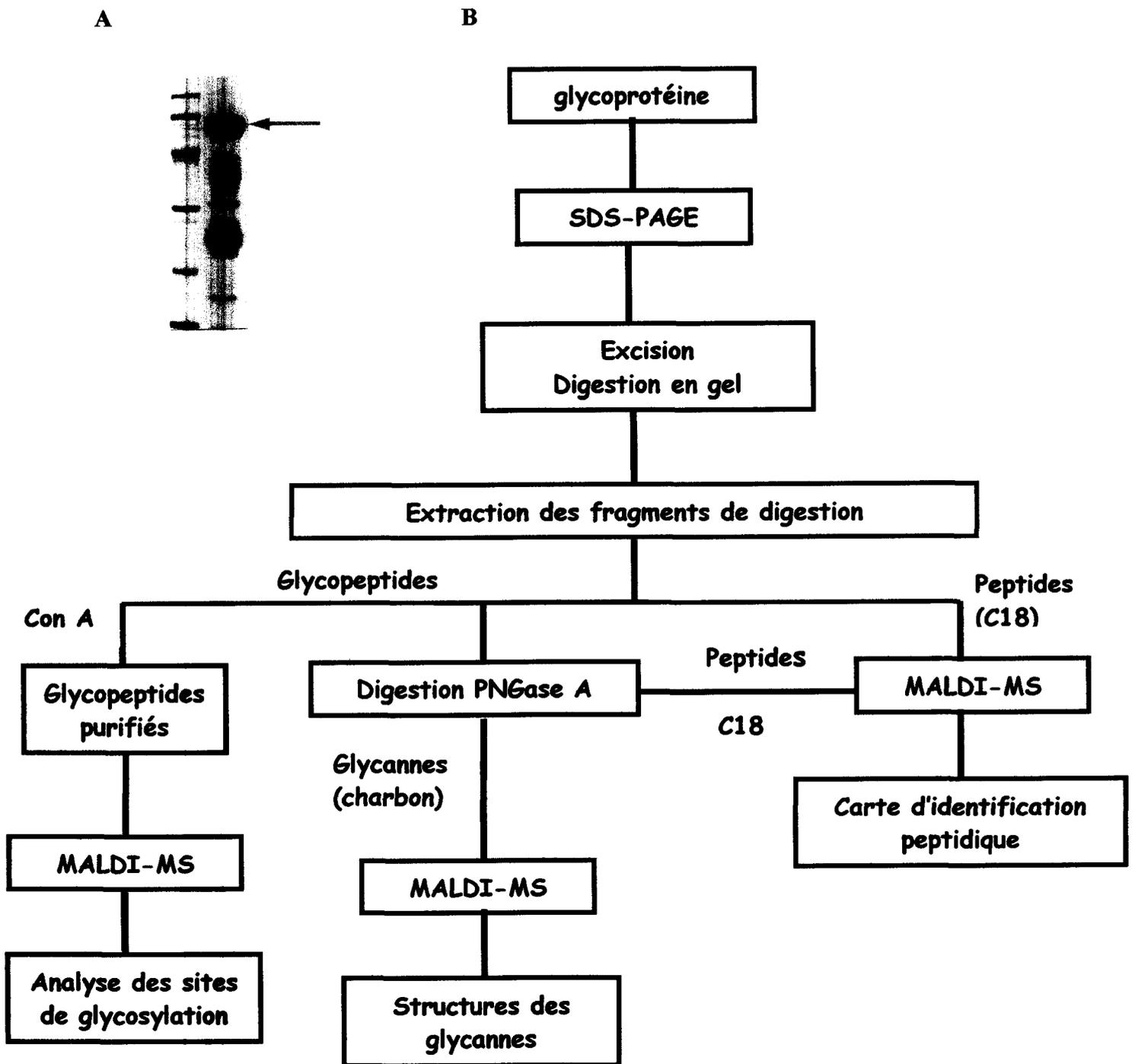


Figure 40 : Schéma récapitulatif de l'analyse en gel SDS-PAGE de l'invertase de raisin.

(A) 100 pmoles de l'échantillon sont déposés sur le gel. Après coloration au Bleu de Coomassie, la bande contenant l'activité enzymatique est excisée du gel et soumise au protocole détaillé dans le schéma B.

(B) Schéma du protocole employé pour l'analyse de la glycosylation de l'invertase.

III.3. Détermination des structures glycaniques de l'invertase

Au vu des problèmes rencontrés précédemment et, afin d'accéder aux structures glycaniques de l'invertase, nous avons mis en pratique la technique décrite par Küster et al. (1997 et 1998). Ces auteurs libèrent les glycannes par déglycosylation en gel, les purifient et les analysent en spectrométrie de masse. Nous allons, cependant, apporter quelques modifications à cette technique, modifications assez similaires à celles publiées par Kolarich et Altmann (2000). L'enzyme de déglycosylation utilisée par Küster et al (1998), la PNGase F ne peut agir sur les glycannes portant un résidu fucose lié en α 1, 3 sur la N-acétyl glucosamine proximale, c'est à dire des glycannes très spécifiques des végétaux. Ainsi, l'emploi de cette enzyme ne nous permettrait pas de libérer la totalité des glycannes présents sur la protéine, n'obtenant ainsi qu'un aperçu limité des structures glycaniques de l'invertase. Ce problème peut être contourné par l'utilisation, en remplacement de la PNGase F, de la PNGase A qui, elle, est active sur ces glycannes. Cette enzyme ne pouvant agir, cependant, que sur des glycopeptides, il faut donc, au préalable, digérer la glycoprotéine par une protéase. Nous avons choisi d'utiliser, dans un premier temps, la trypsine afin de générer des peptides et des glycopeptides. Le spot électrophorétique localisé dans la zone de masses moléculaires variant de 60 à 64 kDa, et identifié comme étant l'invertase de raisin, est excisé du gel puis soumis, comme précédemment, à une digestion trypsique en gel. Le mélange de peptides et glycopeptides, issu de cette digestion trypsique et purifié au préalable sur microcolonne de C18, est soumis à une seconde digestion par la PNGase A (Peptide N-glycosylase A, enzyme de déglycosylation) (Roche) afin de libérer les glycannes.

Les peptides ont ensuite été purifiés spécifiquement sur microcolonne de phase inverse C18 (Altech). Les glycannes libérés sont purifiés, quant à eux, sur microcolonne de charbon (Altech). Ces fractions purifiées sont ensuite analysées en spectrométrie de masse MALDI-TOF. Le schéma récapitulatif de l'ensemble du protocole utilisé est présenté à la figure 40.

L'analyse de la fraction glycanique, libérée après digestion par la PNGase A et purifiée sur microcolonne de charbon, fait apparaître la présence de plusieurs espèces glycaniques. Alors qu'elle produit avec les peptides, des ions $[M + H]^+$ (figure 37), la matrice utilisée (DHB) produit avec les glycannes, des ions $[M + Na]^+$ (Küster et al., 1998).

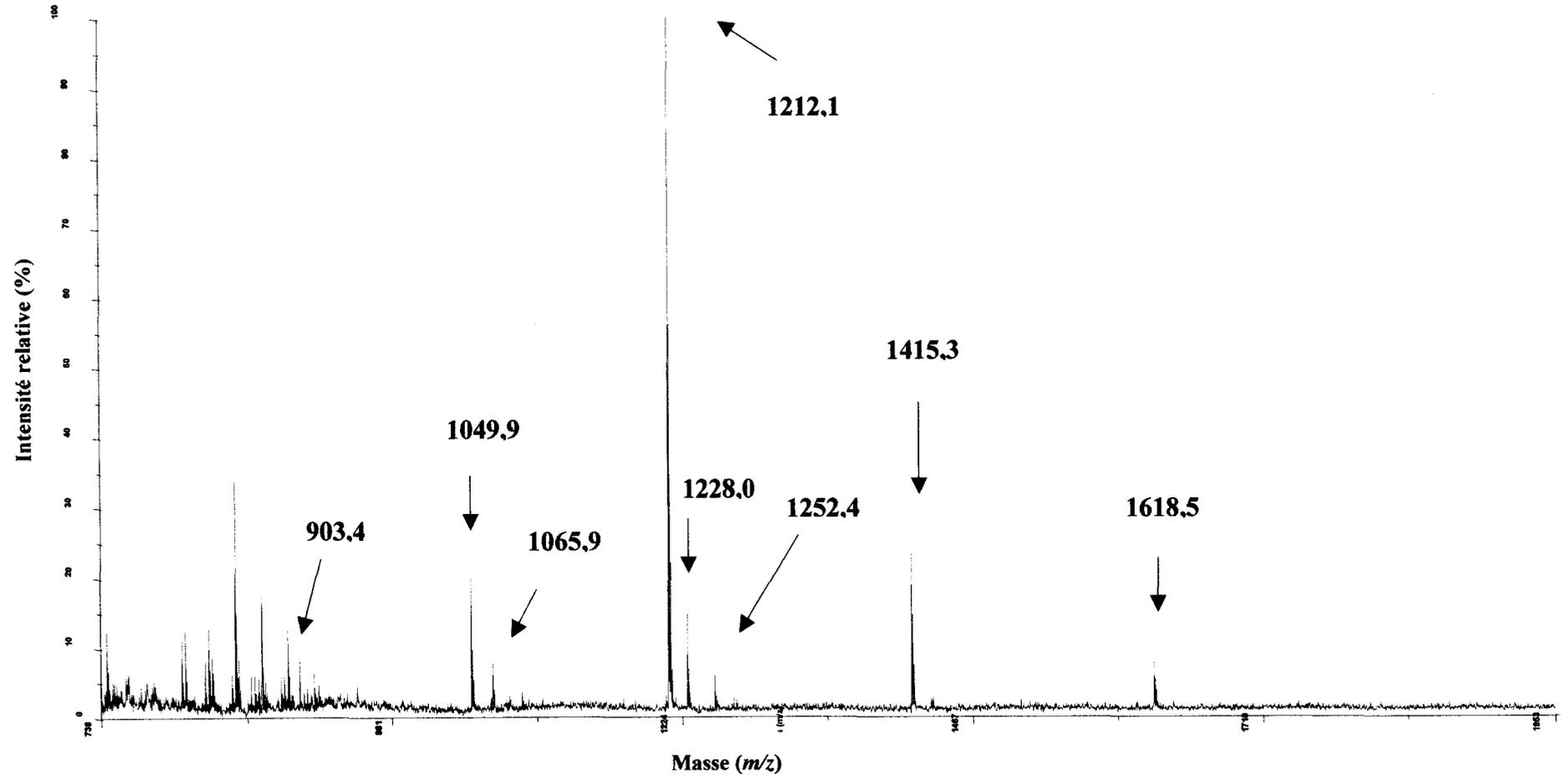


Figure 41 : Analyse MALDI-MS des sucres libérés par voie enzymatique (PNGase A) à partir des peptides tryptiques de l'invertase GIN1. Le spectre MALDI de ces glycanes est obtenu à partir d'une matrice DHB ; les pics identifiés correspondent aux ions $[M + Na]^+$ des glycanes.

<p style="text-align: center;">MUX</p>	<p style="text-align: center;">MUXF³</p>	<p style="text-align: center;">GnMXF³ ou MGnXF³</p>
<p style="text-align: center;">MMX</p>	<p style="text-align: center;">MMXF³ (glycane paucimannosidique)</p>	<p style="text-align: center;">GnGnXF³</p>
<p style="text-align: center;">Man4X</p>	<p style="text-align: center;">GnMUXF³</p>	<div style="border: 1px solid black; padding: 10px; text-align: center;"> <p>Tableau 5 : Structures détaillées des N-glycannes retenus sur charbon après digestion trypsique.</p> </div>

En tenant compte de ces données et en comparant les masses des pics observés avec celles des structures glycaniques connues chez les végétaux, nous pouvons donc identifier huit pics correspondant à huit structures glycaniques bien définies (figure 41) avec, cependant, une forte disparité dans l'intensité de chacun des pics (figure 41). Mais, contrairement à ce que l'on observe pour les peptides où l'intensité du pic est fonction des propriétés intrinsèques du peptide et, notamment, de sa capacité à s'ioniser, il existe pour les glycannes une relation entre la quantité de glycannes présents dans la matrice et l'intensité du signal (Harvey, 1993), apportant ainsi une valeur quantitative aux analyses MALDI. Cette technique nous permet donc, non seulement d'obtenir les structures glycaniques, mais également de quantifier chacune des espèces présentes (tableau 6). Le spectre MALDI fait apparaître huit structures glycaniques différentes avec, comme nous venons de le voir, de grandes disparités dans la proportion de chacun des glycannes (tableau 6).

Le premier pic visualisé ($m/z=903,4$) correspond au glycanne nommé MUX (figure 41), dont la structure détaillée (tableau 5) est constituée par $\text{Man}_2\text{XylGlcNAc}_2$; il n'est pas fucosylé. Ce glycanne représente 4,3 % des glycannes totaux (la quantification est obtenue en calculant l'aire relative de chaque pic) (tableau 6).

Le second pic observé ($m/z=1049,9$) correspond lui au glycanne MUXF³ (figure 41); sa structure détaillée est $\text{Man}_2\text{XylFucGlcNAc}_2$. Ce glycanne fait partie des glycannes les plus importants, représentant, en effet, 11,3 % des glycannes totaux.

Le troisième est le glycanne MMX ($m/z=1065,9$). Il est assez peu abondant (4 %) et a pour structure : $\text{Man}_3\text{XylGlcNAc}_2$; lui, non-plus, n'est pas fucosylé.

Le quatrième glycanne observé est le plus abondant de tous les glycannes puisqu'il représente, en effet, à lui seul 53 % des glycannes totaux (figure 41 et tableau 6). Ce glycanne, qui a pour structure $\text{Man}_3\text{XylFucGlcNAc}_2$ ($m/z=1212,1$), est également appelé glycanne de type paucimannosidique et est très représentatif, voire typique, des glycoprotéines vacuolaires (Sturm, 1995; Lerouge et al., 1998).

Le glycanne visualisé avec la masse $m/z=1228,0$ correspond à la structure Man_4X ; il est constitué du noyau des N-glycannes, c'est à dire trois mannoses et deux N-acétyl glucosamines sur lequel vient s'ancrer un xylose et un quatrième mannose ($\text{Man}_4\text{XylGlcNAc}_2$). En revanche, ce glycanne n'est pas, non plus, fucosylé. Sa structure ne peut être que celle représentée dans les tableaux 5 et 6. En effet, au regard de la voie de biosynthèse des N-glycannes végétaux (voir le chapitre 1 figure 7) (Lerouge et al, 1998) et de

la spécificité de l' α -mannosidase II (Altmann et März, 1995), le quatrième mannose ne peut être que lié en $\alpha(1, 3)$ sur le mannose lié, lui, en $\alpha(1, 6)$ du noyau du glycanne. Il représente 7,8 % des glycanes totaux (abondance relative) (tableau 6).

Le pic de masse $m/z=1252,4$ correspond lui au glycanne GnMUXF³. Ce glycanne a pour structure détaillée : GlcNAcMan₂XylFucGlcNAc₂. C'est le moins important de tous les glycanes, ne représentant, en effet, que 2,7 % des glycanes (figure 41).

Le pic ($m/z=1415,3$) correspond au glycanne paucimannosidique sur lequel vient s'ancrer, sur l'un de ses mannoses, une N-acétyl glucosamine et est appelé GnMXF³ ou MGnXF³. En effet, avec la technique d'analyse en spectrométrie de masse, on ne peut différencier les deux isomères. Ce glycanne est l'un des plus abondants, puisqu'il représente 12,6 % des glycanes totaux (figure 41).

Le dernier pic ($m/z=1618,5$) correspond au glycanne GnGnXF³ (GlcNAc₂Man₃XylFucGlcNAc₂) ; il est assez peu abondant et représente 4,3 % des glycanes totaux (tableau 6).

Le spectre analytique des peptides, isolés sur microcolonne de C18, permet de visualiser les peptides spécifiques de l'invertase et ainsi d'identifier clairement la bande digérée, mais il ne fait apparaître aucun peptide contenant un séquen, déglycosylé après le traitement par la PNGase A.

Si nous arrivons à visualiser une partie des glycanes de l'invertase, nous ne pouvons, en revanche, identifier le site de glycosylation. Nous ne pouvons donc pas identifier leur point d'ancrage sur la protéine et nous ne pouvons déterminer si ces glycanes proviennent d'un ou de plusieurs sites.

En tout état de cause, cette première étape de l'étude de la glycosylation de l'invertase de raisin, permet d'observer l'existence d'une forte hétérogénéité de glycosylation. Cette hétérogénéité s'exprime non seulement par le nombre d'espèces présentes, huit au total (tableau 5), mais également par l'abondance de chacune des espèces (tableau 6), avec une espèce prédominante : le glycanne MMXF³ ou forme paucimannosidique, qui représente à lui seul plus de la moitié des glycanes totaux. On peut noter également que tous les glycanes portent un xylose lié en $\beta(1, 2)$ sur le mannose central du noyau des N-glycanes, tandis que, seuls cinq espèces glycaniques sur huit portent un $\alpha(1,3)$ -fucose sur la N-acétyl glucosamine proximale (tableaux 5 et 6). Ces cinq espèces de glycanes fucosylés représentent tout de

même 72,6 % des glycanes totaux. La présence de résidus xylose sur tous les glycanes accrédite entièrement les premières observations réalisées au cours des étapes de purification. En effet, lors de ces étapes, l'invertase n'était que faiblement retenue par la Con A, démontrant une faible affinité pour cette phase. Nous avons alors évoqué la possibilité que la nature de la glycosylation de l'invertase, avec la présence de xylose lié en $\beta(1, 2)$, en soit responsable.

[M+Na] ⁺ calculées en Da	Dénomination des N-glycannes	Structures des N-Glycannes	Pourcentage de chacun des glycannes (abondance relative)
903,4	MUX		4,3 %
1049,9	MUXF ³		11,3 %
1065,9	MMX		4 %
1212,1	MMXF ³		53 %
1228,0	Man4X		7,8 %
1252,4	GnMUXF ³		2,7 %
1415,3	GnMXF ³ ou MGnXF ³		12,6 %
1618,5	GnGnXF ³		4,3 %

Tableau 6 : Tableau récapitulatif des structures glycaniques observées après digestion trypsique en gel de l'invertase et libération par la PNGase A. N-acétyl glucosamine (■), mannose (○), fucose (▽), xylose (◇). Le pourcentage (abondance) de chacune des structures glycaniques est obtenu en calculant l'aire relative de chacun des pics.

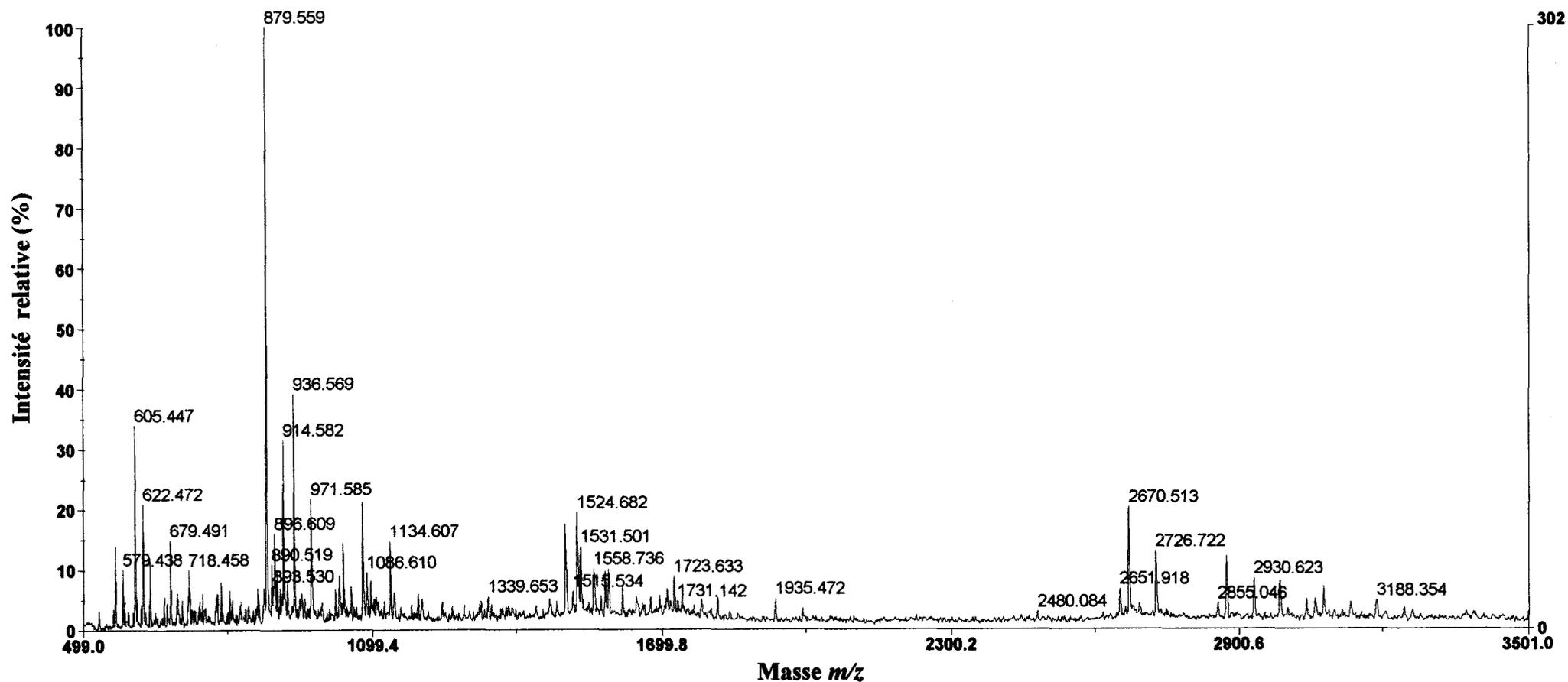


Figure 42 : Spectre MALDI des peptides provenant de la digestion en gel par la chymotrypsine du spot électrophorétique contenant l'activité enzymatique. Les masses moléculaires sont indiquées et correspondent aux masses mono isotopiques des peptides visualisés sous forme d'ions $[M + H]^+$.

III.4. Utilisation d'autres digestions en gel

L'étude des peptides résultant de la digestion trypsique (« PeptideMass » du serveur ExPASy) fait apparaître de très gros peptides, dont certains possèdent en leur cœur plusieurs sites potentiels de glycosylation. Afin de limiter la taille des peptides et d'obtenir des peptides ne possédant qu'un site unique de glycosylation, nous avons soumis la bande électrophorétique correspondant à l'invertase à des digestions par d'autres protéases : la chymotrypsine (pancréas de bœuf) et l'endoprotéinase Glu-C (la protéase V8 du staphylocoque doré).

Ces différentes digestions protéasiques suivent le même protocole que celui utilisé lors de la digestion par la trypsine.

III.4.1. Digestion par la chymotrypsine

La chymotrypsine, protéase sécrétée par le pancréas, coupe du côté C-terminal, préférentiellement les liaisons peptidiques auxquelles participent un tryptophane, une phénylalanine ou une tyrosine. Cependant, elle peut agir également avec un rendement plus faible, toujours du côté C-terminal, sur une leucine, une méthionine, une alanine, un acide aspartique ou un acide glutamique.

Le spot correspondant à l'invertase de raisin est excisé et digéré par la chymotrypsine. Les peptides issus de cette digestion sont ensuite de nouveau purifiés sur microcolonne de C18 puis analysés en spectrométrie de masse (figure 42), les résultats de cette analyse sont soumis à une confrontation avec les bases de données (« peptide mapping » ; « PeptideSearch » du serveur de l'EMBL). Ceux-ci correspondent bien aux peptides de l'invertase (tableau 7).

De plus, cette analyse des peptides issus de la digestion chymotrypsique de l'invertase permet de visualiser de nouveau un peptide contenant l'asparagine-101. Ce peptide avec la masse mono isotopique $m/z=1712,6$ (tableau 7) correspond au peptide portant les acides aminés 101 à 114 dont la méthionine-106 a été oxydée. En revanche, nous n'observons pas le peptide non-oxydé, qui avait été visualisé lors de la digestion trypsique. La présence de ce peptide non modifié apporte une nouvelle preuve à notre hypothèse selon laquelle le séquen portant l'asparagine-101 ne serait pas glycosylé. Cependant, il convient d'y apporter la même réserve que précédemment : cette hypothèse demande tout de même une vérification de séquence afin d'identifier clairement ce peptide.

A :

Q9S944 **Masse: 71773** **Score: 50** **Expect: 1.5** **Queries matched: 11** Vacuolar invertase 1, GIN1.- Vitis vinifera (Grape).

B :

Position	Masses monoisotopiques m/z observées (M+H)⁺	Masses monoisotopiques m/z calculées (M+H)⁺	Peptides
101 - 114	1712,6	1711,5	NWTTAMLAWQRTAF
103 - 116	1696,8	1695,8	TTAMLAWQRTAFHF
108 - 114	879,5	878,4	AWQRTAF
110 - 114	622,3	621,2	QRTAF
110 - 131	2674,0	2674,2	QRTAFHFQPEKNWMNDPDGPLF
136 - 142	1033,5	1032,4	YHLFYQY
137 - 140	579,4	578,3	HLFY
141 - 149	1079,5	1078,5	QYNPDSAVW
393 - 409	1933,4	1933,9	GWISEGDIESDDLKKGW
545 - 559	1723,0	1722,8	SRSSLAVDDVDQRIY
605 - 612	893,4	893,5	GAARLFLF

Tableau 7 : Résultat de l'identification (A) et liste des peptides obtenus par MALDI-TOF après digestion Chymotrypsique de la bande 60/62 kDa (B). Le peptide contenant le site de glycosylation (Asn-101) est en rouge.

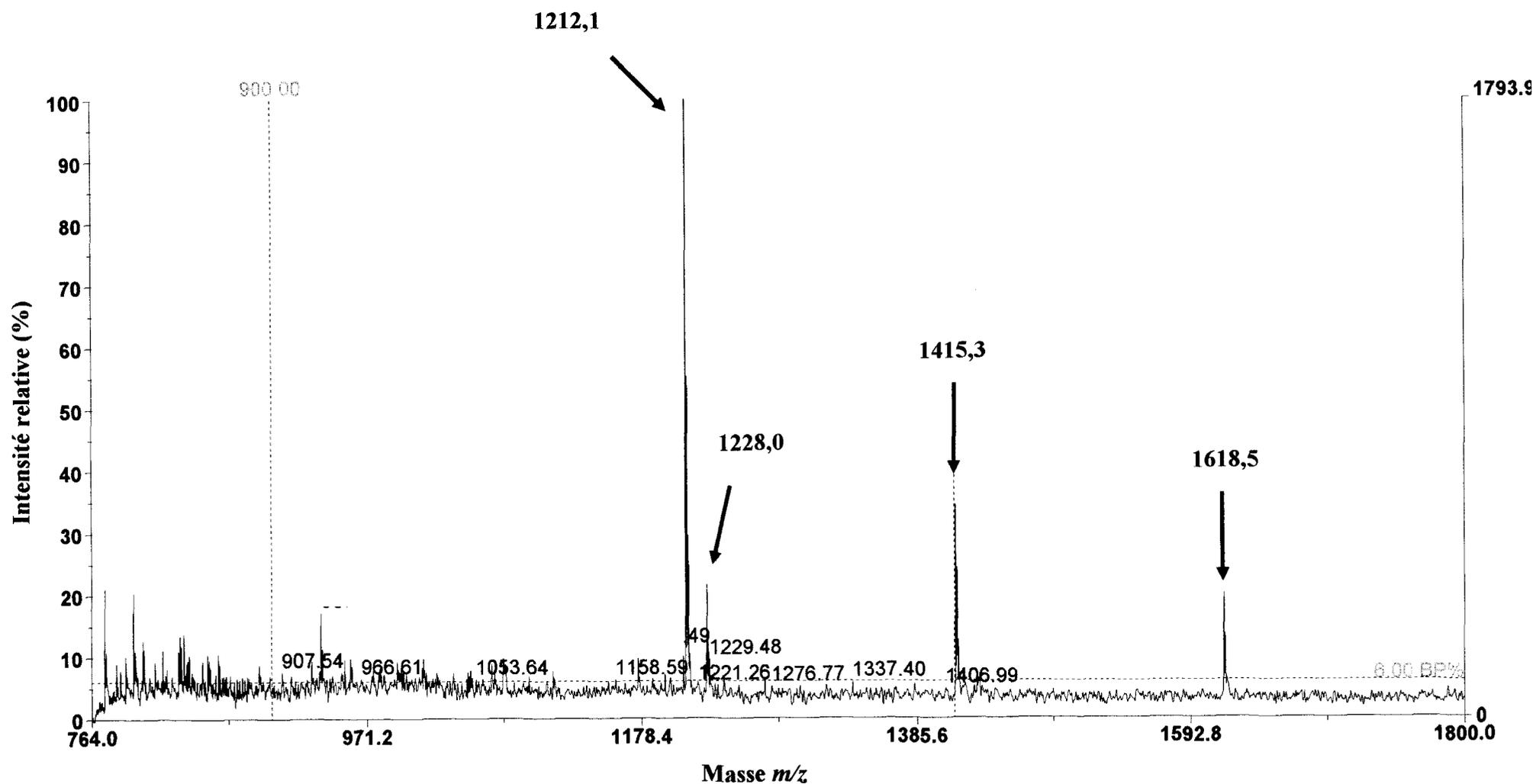


Figure 43 : Spectre MALDI-MS des glycanes isolés de l'invertase de raisin après digestion par la chymotrypsine et libération par la PNGase A. Le spectre MALDI de ces glycanes est obtenu à partir d'une matrice DHB ; les pics identifiés correspondent aux ions $[M + Na]^+$ des glycanes.

III.4.1.1. Libération et analyse des glycanes de l'invertase

Par la suite, le mélange peptidique-glycopeptidique est soumis à une digestion par une glycosidase, la PNGase A. Les peptides sont purifiés sur microcolonne de phase inverse et les glycanes sur microcolonnes de charbon, puis analysés en spectrométrie de masse MALDI-MS (figure 43).

L'analyse des glycanes ainsi isolés fait apparaître, cette fois, quatre espèces glycaniques différentes, avec de nouveau une abondance relative différente d'un glycanne à l'autre (figure 43).

Par comparaison avec les résultats obtenus lors de la digestion trypsique, on observe encore la très forte abondance du glycanne de type paucimannosidique (MMXF^3 ; $m/z=1212,1$) qui représente, à lui-seul, également plus de la moitié (53,6 %) des glycanes totaux (tableau 8).

Le second glycanne le plus représenté est le glycanne nommé GnMXF^3 (ou MGnXF^3 , car, ainsi que nous l'avons évoqué précédemment, nous ne pouvons pas, par cette technique, déterminer la structure réelle de ce glycanne). Ce glycanne ($m/z=1415,3$) représente 23,6 % des glycanes totaux (tableau 8).

Enfin, les deux dernières classes de glycanne sont les glycanes Man4X ($m/z=1228,0$) et GnGnXF^3 ($m/z=1618,5$) qui représentent respectivement 11,5 et 11,3 % des glycanes totaux (tableau 8).

Les glycanes libérés, après digestion par la chymotrypsine, montrent un profil légèrement différent de celui observé après digestion par la trypsine, différent dans le nombre d'espèces glycaniques (quatre, cette fois, au lieu de huit avec la trypsine). Cependant, on peut remarquer que tous ces glycanes observés étaient déjà présents lors de la libération par la trypsine. On observe de nouveau une très large prépondérance de l'espèce MMXF^3 ou paucimannosidique ($m/z=1212,1$) qui représente également plus de la moitié des glycanes totaux (tableau 8). Trois des quatre espèces glycaniques portent en leur cœur un fucose, alors que, là encore, tous les glycanes contiennent un xylose (tableau 8). Les glycanes fucosylés représentent 88,5 % des glycanes totaux.

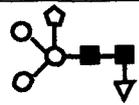
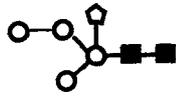
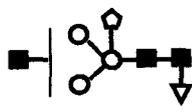
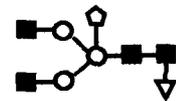
[M+Na] ⁺ calculées en Da	Dénomination des N-glycannes	Structures des N-Glycannes	Pourcentage de chacun des glycannes (abondance relative)
1212,1	MMXF ³		53,6 %
1228,0	Man4X		11,5 %
1415,3	GnMXF ³ ou MGnXF ³		23,6 %
1618,5	GnGnXF ³		11,3 %

Tableau 8 : Tableau récapitulatif des structures glycaniques observées après digestion chymotrypsique en gel de l'invertase et libération par la PNGase A. N-acétyl glucosamine (■), mannose (○), fucose (▽), xylose (◇). Le pourcentage (abondance) de chacune des structures glycaniques est obtenu en calculant l'aire relative de chacun des pics.

III.4.1.2. Analyse des peptides après déglycosylation

Après la digestion par la chymotrypsine et la libération des glycannes par la PNGase A, nous avons purifié les peptides sur microcolonne de C18.

L'observation du spectre massique des peptides, libérés de leurs glycannes, ne nous permet pas de mettre en évidence des peptides pouvant correspondre à un site de glycosylation.

Cependant, au vu du profil glycanique, on peut supposer qu'il s'agit d'un site différent de celui déglycosylé lors de la digestion trypsique.

III.4.2. Digestion par l'Endoprotéinase Glu-C (V8)

Cette endoprotéase clive du côté C-terminal les liaisons peptidiques dans lesquelles intervient un acide glutamique ou, mais avec un moindre rendement, un acide aspartique.

De nouveau, l'invertase est digérée dans le gel d'acrylamide. Les peptides et les glycopeptides libérés sont purifiés et analysés en spectrométrie de masse. Par la suite, les glycannes ont été libérés par la PNGase A et purifiés sur microcolonne de charbon.

III.4.2.1. Analyse des glycannes libérés après digestion par la Glu-C (V8)

L'analyse des glycannes libérés après digestion par l'endoprotéase Glu-C (V8) fait apparaître, cette fois, cinq espèces glycaniques distinctes.

Le premier pic ($m/z=903,4$) (figure 44) correspond au N-glycane dénommé MUX et représente 11,7 % des glycannes totaux de cette fraction (tableau 9).

Le second glycane observé est le glycane paucimannosidique ou MMXF³ ($m/z=1212,1$) (figure 44). Ce glycane est, de nouveau, le plus abondant, il représente 50,6 % des glycannes totaux.

Le troisième glycane visualisé est le glycane Man4X ($m/z=1228,0$) (figure 44). Il représente 11,7 % des glycannes de cette fraction.

Le quatrième pic correspond au glycane GnMXF³ (ou MGnXF³) ($m/z=1415,3$) et représente 18,2 %.

Le dernier glycane est le moins abondant de cette fraction, il représente 7,8 % (tableau 9) et correspond au glycane GnGnXF³ ($m/z=1618,5$) (figure 44).

La digestion par la protéase V8 laisse apparaître des caractéristiques communes avec les autres digestions. Ainsi, le glycane MMXF³ est de nouveau le glycane le plus représenté avec plus de 50 % des glycannes totaux (50,6 %). Tous les glycannes observés portent un xylose lié en $\beta(1, 2)$. En revanche, tous ne portent pas un fucose, même si ceux qui en portent un représentent une très large majorité (76,6 % des glycannes totaux).

De nouveau, nous ne sommes pas parvenus à visualiser le ou les peptides d'ancrage de ces glycannes.

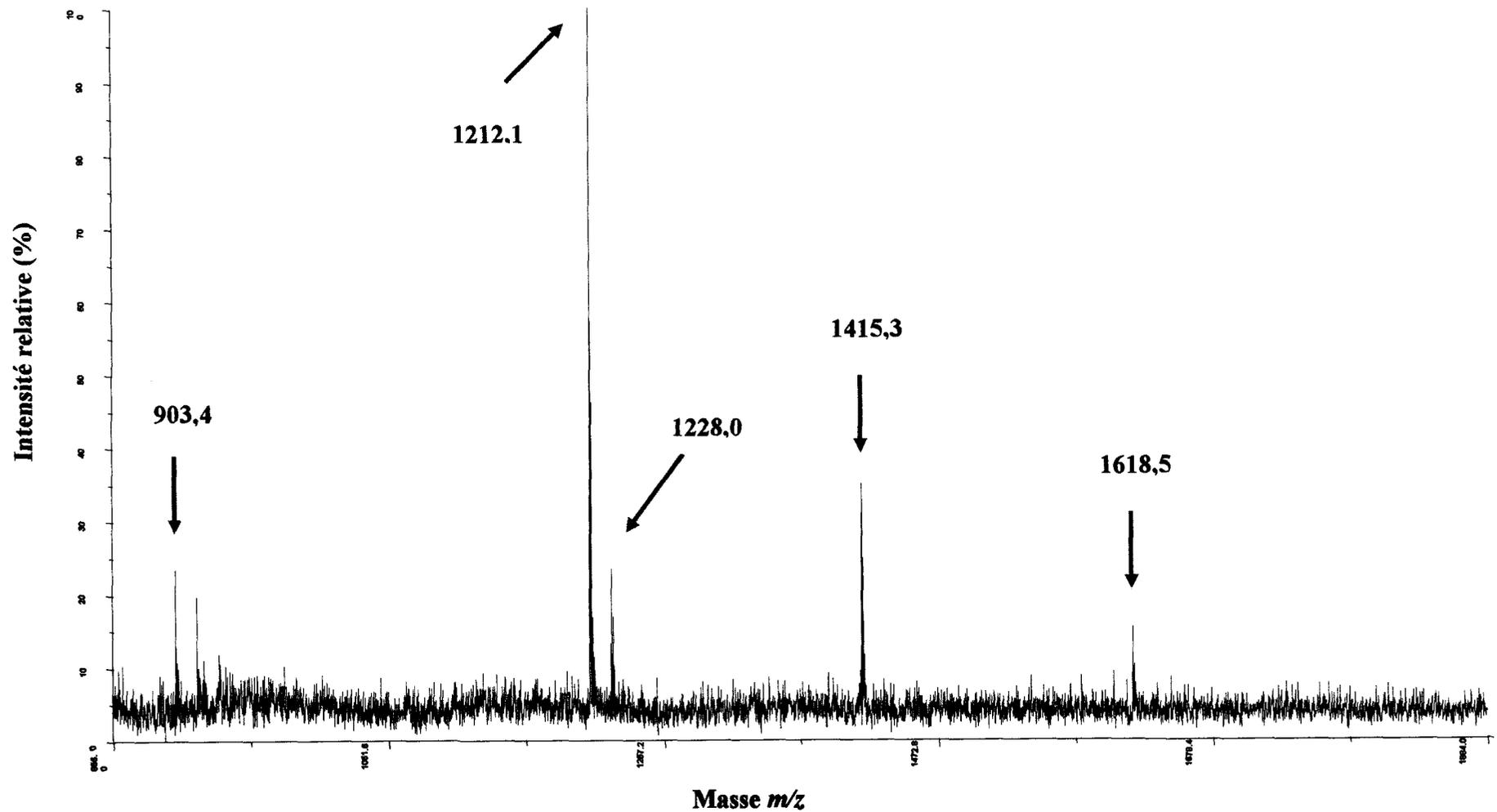


Figure 44 : Spectre MALDI-MS des glycanes isolés de l'invertase de raisin après digestion par l'Endoprotéinase Glu-C (V8) et libération par la PNGase A. Le spectre MALDI de ces glycanes est obtenu à partir d'une matrice DHB ; les pics identifiés correspondent aux ions $[M + Na]^+$ des glycanes.

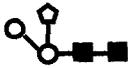
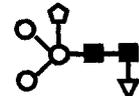
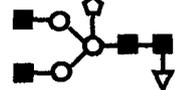
[M+Na] ⁺ calculées en Da	Dénomination des N-glycannes	Structures des N-Glycannes	Pourcentage de chacun des glycannes (abondance relative)
903,4	MUX		11,7 %
1212,1	MMXF ³		50,6 %
1228,0	Man4X		11,7 %
1415,3	GnMXF ³ ou MGnXF ³		18,2 %
1618,5	GnGnXF ³		7,8 %

Tableau 9 : Tableau récapitulatif des structures glycaniques observées après digestion en gel par l'Endoprotéinase Glu C (V8) de l'invertase et libération par la PNGase A. N-acétyl glucosamine (■), mannose (○), fucose (▽), xylose (◇). Le pourcentage (abondance) de chacune des structures glycaniques est obtenu en calculant l'aire relative de chacun des pics.

IV. CONCLUSION

Après avoir pré-purifié l'invertase de raisin, isolée d'un moût de chardonnay, nous avons soumis cette glycoprotéine à différentes digestions en gel SDS-PAGE, par l'intermédiaire de plusieurs endoprotéases. La digestion trypsique a permis, dans un premier temps, d'obtenir quelques informations d'ordre général et, en premier lieu, le fait que l'invertase de raisin présente dans le moût semble provenir uniquement de la séquence GIN1 décrite par Davies et Robinson (1996) et correspond à une invertase vacuolaire. Les autres digestions protéasiques ont d'ailleurs entièrement corroboré cette hypothèse. La séquence GIN1 contenant douze sites potentiels de glycosylation, nous avons tenté de caractériser la glycosylation de cette protéine et de déterminer les sites d'ancrage de ces glycanes.

L'étude du profil glycanique global laisse apparaître de grandes lignes communes aux trois types de digestion. On observe ainsi une forte hétérogénéité de glycosylation, hétérogénéité qui s'exprime par la présence de plusieurs espèces glycaniques, mais également par l'abondance de chacune des espèces. Tous les glycanes sont de type complexe et portent dans leur structure un xylose lié en β (1, 2) sur le mannose central. Une très forte majorité d'entre eux porte également un fucose en α (1, 3) sur la N-acétylglucosamine proximale. Une espèce glycanique semble prédominante, la forme MMXF³ ou paucimannosidique qui représente, en effet, à elle seule plus de la moitié des glycanes totaux. Cette observation est en total accord avec le fait que l'invertase présente dans le moût aurait, dans la cellule végétale, une localisation vacuolaire. De nombreuses études ont démontré, en effet, que le glycanne MMXF³ est un N-glycanne typique des glycoprotéines vacuolaires (Sturm, 1995). Ce glycanne est, de plus, très abondant dans la plupart des glycoprotéines d'origine végétale (Zeleny et al., 1999). Ces N-glycannes comportant un fucose et/ou un xylose sont spécifiques des glycanes végétaux. Ils ne sont d'ailleurs pas présents chez les mammifères chez lesquels ils provoquent une forte réaction antigénique (Wilson et al., 1998 ; van Ree et al., 2000).

Cependant, nous ne sommes pas parvenus à déterminer quels sont, parmi les douze sites potentiels, ceux qui sont réellement glycosylés. L'un de ces sites, le peptide 89-111, semble ne pas être glycosylé. Ruffner et al. (1995) ont montré la forte glycosylation de l'invertase de raisin ; en effet, les glycanes de l'invertase représentent 16 % de la masse

totale de l'enzyme. Celle-ci, perdant 10 000 Da après déglycosylation chimique (Ruffner et al., 1995), posséderait en fait huit à neuf sites de glycosylation. Ces données illustrent donc bien l'extrême complexité de la glycosylation de l'invertase et, toute la difficulté de cette étude.

Cette étude nous a permis, de plus, de confirmer l'extraordinaire complexité de glycosylation des glycoprotéines végétales.

TROISIEME PARTIE

ÉTUDE DE L'INVERTASE DE RAISIN :

**SUIVI IMMUNOLOGIQUE AU COURS DES
TRAITEMENTS DE COLLAGE**

**MISE EN RELATION AVEC LES PROPRIETES
MOUSSANTES D'UN VIN DE BASE
CHAMPENOIS**

I. INTRODUCTION

Lors du versement d'un vin de Champagne dans un verre, il y a formation d'une mousse importante qui s'effondre en quelques secondes. Cette mousse, abondante et fugace, est la résultante d'un dégazage violent du liquide sursaturé en CO₂ du fait de l'agitation et du contact du liquide avec les parois du verre. La mousse remplit alors le verre et ne laisse qu'une infime partie de liquide. Lorsque la mousse s'effondre après arrêt du versement, la partie centrale de la surface du liquide se découvre alors presque entièrement, laissant un cordon constitué d'une ou de plusieurs couches de bulles au contact direct du verre, la collerette. Cette couche est ensuite alimentée par l'arrivée en surface d'autres bulles de CO₂. Ces bulles naissent, grossissent et se détachent à partir de poches de gaz présentes dans le vin, et emprisonnées dans des particules solides (fibres de cellulose, cristaux ...) (Casey, 1988 ; Liger-Belair et al., 1999, 2000). Les bulles migrent ensuite vers la surface du vin, dans un mouvement ascensionnel. Arrivées à la surface, elles se rassemblent puis gagnent la périphérie formant ainsi la collerette. La durée de vie et l'abondance de cette collerette sont fonction de deux paramètres : l'effervescence et la durée de vie des bulles à la surface. L'effervescence est liée, certes, à la sursaturation en CO₂, mais également au nombre de sites de nucléation présents dans le verre et, de ce fait, elle est donc variable. La durée de vie des bulles est, quant à elle, reliée à la teneur intrinsèque du vin en tensioactifs (protéines, glycoprotéines ...).

Cette collerette de mousse joue un rôle primordial dans l'appréciation de la qualité d'un Champagne. En effet, un cordon de mousse blanche persistant à la périphérie du verre et composé de fines bulles, constitue un critère essentiel et un gage de qualité lors de la dégustation.

On sait que l'apparition de ce cordon de mousse à la surface du vin et sa tenue dans le temps sont dépendantes de la capacité à mousser de ce vin et de la stabilité de la mousse formée. Il est donc intéressant d'étudier le rôle joué par certaines macromolécules, qu'il s'agisse des protéines ou des glycoprotéines, et de l'impact de certains traitements vitivinicoles sur ces deux paramètres.

Certains travaux antérieurs ont déjà porté sur l'étude de quelques aspects phénoménologiques de ces processus. Ainsi, Maujean et al. (1990) observaient déjà une

corrélation entre la concentration en protéines et la moussabilité de 31 vins pris au hasard. De plus, ils montrent qu'un traitement à 50 g/hL de bentonite sur moût provoque une diminution significative de la teneur en protéines (66 %) corrélée avec une chute de la moussabilité de 57%. La bentonite sert à éliminer les protéines d'un moût ou d'un vin en vue de le stabiliser vis-à-vis des casses protéiques, mais également pour faciliter le remuage des vins effervescents avec prise de mousse en bouteille. Brissonnet et Maujean (1991) montrent que des fractions de mousses extraites de vin s'enrichissent de façon significative en macromolécules. De plus, ils observent que les propriétés moussantes des vins issus de ces mousses, sont nettement accrues par rapport au vin de base originel.

Enfin, Brissonnet et Maujean (1993) observent, en fractionnant les macromolécules d'un vin de mousse et du vin résiduel par chromatographie d'interactions hydrophobes et en comparant les deux profils, que le vin de mousse est enrichi en protéines les plus hydrophobes et appauvri en protéines hydrophiles par rapport au vin résiduel.

Malvy et al. (1994) fractionnent, par ultrafiltration, un vin de base champenois puis ils réalisent, à partir de ces fractions, des vins expérimentaux avec des teneurs en macromolécules variables et démontrent que l'aptitude à mousser, la stabilité et la tenue de mousse d'un vin sont étroitement corrélées à sa teneur en protéines.

Andrés-Lacueva et al. (1996) démontrent également qu'une corrélation existe entre teneur en protéines et formation de la mousse, alors qu'ils n'observent aucune corrélation entre protéines et stabilité de la mousse. López-Barajas et al. (1998) observent de même que la moussabilité d'un vin est inversement proportionnelle à la stabilité de sa mousse. Ils constatent que la moussabilité décroît alors que la stabilité de la mousse s'accroît, tout au long du processus de vinification du Cava (vin effervescent espagnol), respectivement du vin de base au vin final.

Moreno-Arribas et al. (2000), quant à eux, montrent une bonne corrélation entre les propriétés moussantes d'un vin de Cava et sa teneur en protéines. Ils observent, en revanche, que cette corrélation n'est pas liée à la teneur en peptides du vin.

Puig-Deu et al. (1999) rapportent que des traitements de collage réalisés sur les moûts améliorent grandement la stabilité de la mousse des vins qui en résultent. Cette augmentation de la stabilité de la mousse serait corrélée avec la diminution de la teneur en protéines du fait du collage.

Toutes ces données bibliographiques, bien que contradictoires pour certaines, démontrent l'importance du rôle joué par les protéines dans les propriétés moussantes des vins effervescents. Notons que la plupart de ces études dosent les protéines par la méthode

directe de Bradford (1976), méthode extrêmement sensible aux interférences (composés phénoliques, éthanol par exemple) (Marchal et al., 1997) ; de plus, certains composés du vin comportant une partie protéique minoritaire (AGP, mannoprotéines...) ont une affinité pour le BBC très faible, ce qui tend à minorer grandement leur estimation. Toutes ces données démontrent bien, par ailleurs, les difficultés rencontrées pour déterminer la teneur en protéines d'un vin.

Toutes les protéines ne contribuent pas de la même manière aux propriétés moussantes des vins. Ainsi, les glycoprotéines qui sont des molécules constituées d'une partie protéique hydrophobe et d'une partie glycanique hydrophile, semblent être de bons composés « promoteuse », c'est à dire capables d'améliorer la formation et la stabilisation de la mousse.

Il nous est donc apparu opportun d'étudier, dans le cadre de ce travail, les glycoprotéines présentes dans le vin et, notamment, l'une d'entre-elles, l'invertase de raisin (Porntaveewat et al., 1994 ; Ruffner et al., 1995). En effet, Nakanishi et Yokosuka (1990) ont démontré la présence d'invertase dans des jus de raisin de diverses origines et, particulièrement, dans des moûts de Chardonnay où l'enzyme y est active. Ces auteurs purifient l'invertase à partir d'un moût (Nakanishi et Yokosuka, 1990), mais également à partir du vin correspondant (Nakanishi et al., 1991). Ces deux enzymes possédant les mêmes caractéristiques biochimiques (propriétés biochimiques et composition), ces auteurs en concluent que les deux invertases sont identiques. Ainsi, l'invertase de raisin se retrouverait dans le vin avec, cependant, une diminution de son activité liée à une insolubilisation lors du processus de vinification (Nakanishi et al., 1991). De plus, l'invertase de raisin semblerait représenter une fraction importante des protéines du vin (de l'ordre de 12 à 40 % des protéines totales d'un vin de Chardonnay) (Robillard, communication personnelle). Cette protéine possède un pHi proche du pH du vin (Marchal, 1995). Cette donnée est très importante puisque l'on sait, en effet, depuis Yokoi et al. (1989) et Le Meste et al. (1990), que les propriétés moussantes d'une protéine sont maximales à proximité de son pI. L'invertase possède également une hydrophobicité élevée (Marchal, 1995), autre caractéristique importante laissant supposer que cette glycoprotéine jouerait un rôle primordial dans les propriétés moussantes d'un vin de Champagne. En effet, il a été démontré (Slack et Bamforth, 1983 ; Yokoi et al., 1989) que l'hydrophobicité d'une protéine joue un rôle prépondérant vis-à-vis de ses propriétés de surface : ainsi plus une fraction protéique est hydrophobe, plus elle est apte à stabiliser une mousse (Slack et Bamforth, 1983 ; Yokoi et al., 1989).

Toutes ces données tendent à montrer que l'invertase est une glycoprotéine qui possède des qualités intrinsèques majeures susceptibles de lui conférer un rôle non-négligeable dans la mousse du Champagne.

Qu'en est-il dans la réalité d'une matrice aussi complexe que le Champagne ?

Afin de répondre à cette question, des traitements de collage ont été mis en place sur des moûts et des vins de Chardonnay (traitements résumés dans le chapitre Matériels et Méthodes). L'impact de ces traitements a été étudié sur les propriétés moussantes des vins ainsi traités, mais également sur leur teneur en invertase.

Dans un premier temps, une technique immunospécifique (ELISA) a été développée afin de quantifier spécifiquement l'invertase de raisin et de suivre son évolution tout au long du processus de vinification. Parallèlement au suivi immunologique de l'invertase, l'évolution des protéines totales a été étudiée. Toutes ces données seront enfin mises en relation avec l'évolution des propriétés moussantes des vins traités.

II. PURIFICATION DE L'INVERTASE DE RAISIN D'UN MOUT DE CEPAGE CHARDONNAY

Le moût étudié est issu d'un pressurage de type champenois. Il renferme essentiellement les protéines solubles de la pulpe de la baie. Nous sommes partis d'un moût de raisin afin de nous affranchir de la présence d'invertases d'origine levurienne.

Le moût est ultrafiltré et lyophilisé afin d'obtenir une fraction colloïdale contenant les macromolécules de ce moût de Chardonnay. La fraction colloïdale est ensuite resolubilisée (500 mg dans 180 mL de tampon de fixation) et soumise à un dosage protéique (Bradford, 1976) et à un test d'activité invertase. Ainsi, suivant ces résultats, les protéines (270 mg) semblent représenter moins de 10 % des colloïdes resolubilisés (2,75 g). Cette valeur est cependant à nuancer du fait, notamment, de la faible réponse que peuvent engendrer certains composés, tels que les glycoprotéines ou les AGP, à ce type de dosage. De plus, nos travaux portent sur des fractions colloïdales issues de l'ultrafiltration de moût et ne comportent donc que les macromolécules ayant des masses moléculaires supérieures au seuil de coupure du système d'ultrafiltration (10 kDa), et de ce fait ne peuvent être comparés avec des études antérieures (pour une revue de la littérature voir Charpentier, 1998). Cependant, ceci illustre

A

Fractions éluées de l'électrophorèse préparative

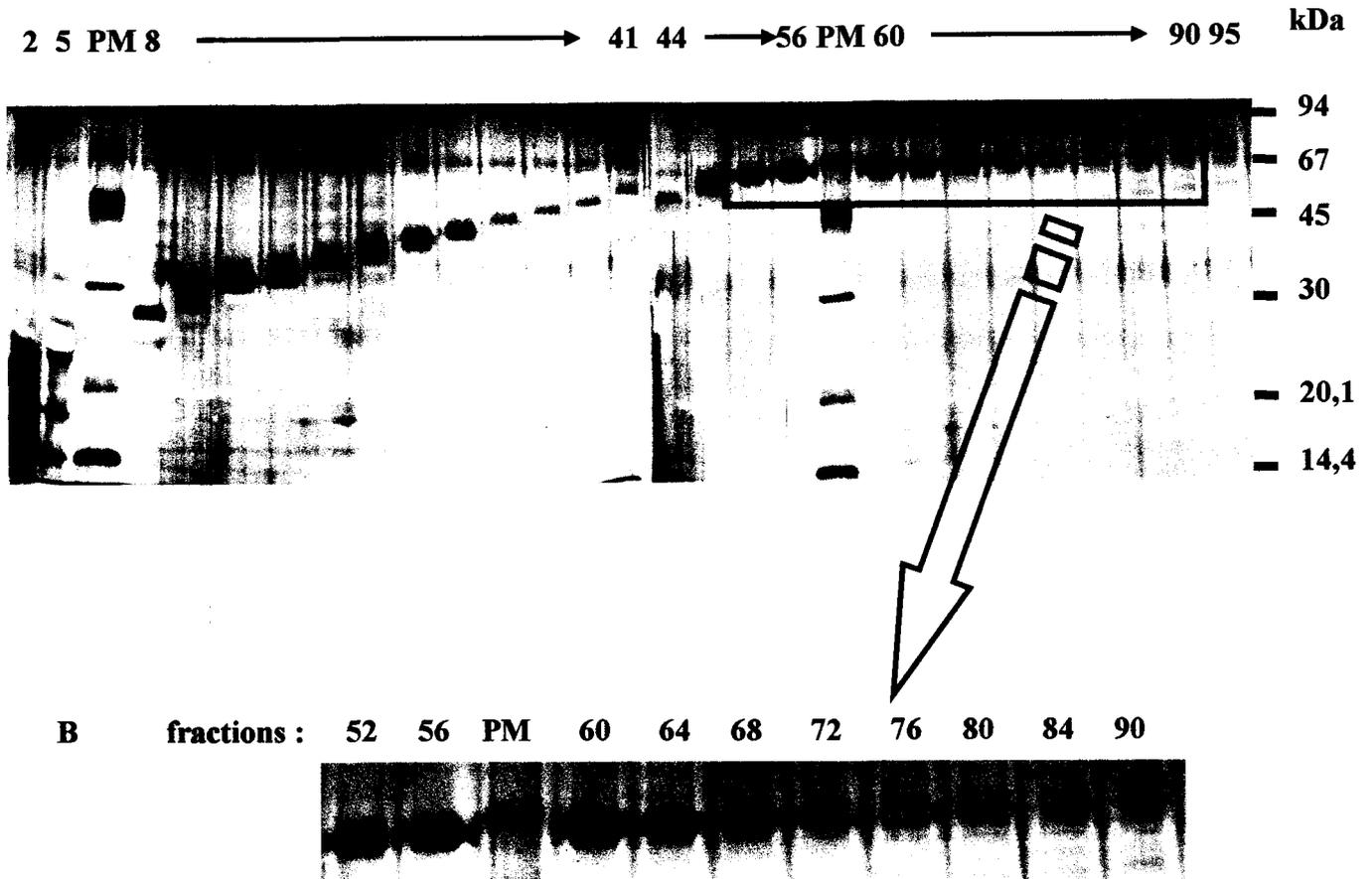


Figure 45 : Profils électrophorétiques des fractions isolées en sortie de Prep-Cell. Chacun des numéros correspond à une fraction éluee de la Prep-Cell et déposée en SDS-PAGE analytique (12,5 µL). La coloration est effectuée à l'argent. PM : poids moléculaire.

(A) Profil global.

(B) Zoom sur les fractions 52 à 90, correspondant à l'invertase de raisin avec des masses allant de 60 à 67 kDa.

bien la faible teneur en protéines des moûts et des vins. Cette faible teneur constitue une difficulté importante dans l'étude des protéines des vins de Champagne.

Dans la suite de ce travail, nous nous intéresserons au processus de purification de l'invertase de raisin. Le protocole de purification suit les mêmes étapes que celles décrites dans le chapitre précédent. Ainsi, la fraction colloïdale, qui possède une activité invertase (tableau 10), est soumise à une chromatographie liquide d'échange d'anions (DEAE) ; la fraction retenue et éluée avec 160 mM de NaCl contient l'activité enzymatique. On observe, dès cette première étape, une perte de 75 % des protéines (tableau 10). Par la suite, cette fraction est soumise à une chromatographie d'affinité sur lectine immobilisée (con A). Nous allons profiter de la faible affinité de la con A pour l'invertase (du fait, comme nous l'avons évoqué dans le chapitre précédent, de sa spécificité de glycosylation) pour éluer l'invertase avec la teneur en sucre compétiteur la plus faible (5mM). On peut remarquer que la seconde fraction éluée avec une teneur en sucre plus élevée (300 mM) contient également une activité invertase, cependant moindre comparée à la précédente (tableau 10).

Ces deux étapes ne suffisent pas, cependant, à purifier l'invertase de raisin.

La première fraction éluée de la con A est ensuite dialysée et concentrée et soumise à une électrophorèse préparative (Prep-Cell, Bio-Rad) sur un gel contenant 9 % d'acrylamide. Les profils électrophorétiques des fractions isolées en sortie de cette électrophorèse préparative sont présentés figure 38. Dans le chapitre précédent, la bande protéique comprise entre 60 et 67 kDa avait été identifiée comme correspondant à l'invertase de raisin. Sur le profil électrophorétique (figure 45), on peut observer que l'invertase est éluée du gel au sein d'un grand nombre de fractions (tubes 52 à 90). Ces profils permettent de visualiser la forte disparité de poids moléculaire de l'invertase de raisin. Nous avons d'ailleurs démontré, dans le chapitre précédent, que cette disparité de poids moléculaire était liée à une forte hétérogénéité de glycosylation de l'invertase.

Les fractions contenant l'invertase sont ensuite rassemblées, concentrées et dialysées par ultrafiltration sur des unités d'ultrafiltration Centriprep[®]-10 (Amicon), afin d'éliminer le SDS résiduel. Elles serviront d'antigène afin d'obtenir un sérum polyclonal dirigé contre l'invertase de raisin.

Etapes	Volume (mL)	Quantité totale de protéine (mg) (Bradford)	Activité Totale (nkat)	Rendement (%)	Activité Spécifique (nkat.mg⁻¹)	Degré de Purification
Extrait brut (colloïdes totaux 2,75 g/L)	180	270	1340	100	4,96	1
DEAE FR 160 mM	160	67,7	858	64	12,7	2,56
Con A 5 mM	80	9,84	560	41,8	56,91	11,47
Con A 300 mM	60	5,04	60	4,5	11,9	2,4

Tableau 10 : Purification de l'invertase de raisin. (1 nkat = 1 nmol de glucose formée par seconde)

Les premières étapes de purification sont résumées dans le tableau 10. On peut remarquer une forte perte de la teneur en protéines tout au long de ce processus de purification. De plus, la fraction purifiée sur con A (5 mM) ne représente plus que 3,6 % des protéines totales du départ. Sachant que l'invertase ne représente qu'une partie de cette fraction et que le dosage que nous réaliserons par la suite, grâce à notre technique Elisa, démontrera que l'invertase représente 17 % des protéines totales, on imagine facilement la perte en invertase qui survient tout au long de ces étapes. Cette perte peut également être visualisée grâce au suivi de l'activité invertase totale (tableau 10).

III. PRODUCTION ET PURIFICATION D'ANTICORPS SPECIFIQUES DE L'INVERTASE DE RAISIN

L'invertase de raisin, isolée après électrophorèse préparative, est utilisée comme fraction antigénique et injectée à un lapin. Le sérum, contenant les anticorps spécifiques de l'invertase, est isolé. Les anticorps sont ensuite dissociés des protéines sériques sur colonne échangeuse d'anions DEAE Affi-Gel blue (Bio-Rad), puis ils sont concentrés et dialysés sur des unités d'ultrafiltration Centriprep[®]-10 (Amicon).

Les anticorps purifiés ont ensuite été testés par immunoblots (western blot) (figure 46). Ces anticorps polyclonaux anti-invertase démontrent une grande affinité et une forte spécificité pour leur antigène, l'invertase de raisin (figure 46).

Les immunoglobulines se lient avec leur antigène purifié (figure 46, piste D). On remarque que ces anticorps réagissent de manière similaire lorsqu'ils sont mis au contact d'échantillons de moût ou de vin (figure 46, pistes A et C), se liant de manière spécifique avec l'invertase. En effet, ces anticorps purifiés réagissent dans le moût avec l'invertase de raisin, bande localisée à 60/67 kDa (figure 46, piste C). Ils ne montrent aucune réaction croisée avec aucune autre protéine d'origine végétale (figure 46, piste C). De plus, lorsque ces mêmes anticorps sont mis en contact avec les colloïdes du vin, ceux-ci se lient uniquement avec l'invertase d'origine végétale et ne montrent aucune réaction croisée avec d'autres protéines présentes dans cet échantillon (figure 46, piste A). Ces anticorps sont capables de se lier spécifiquement avec l'invertase de raisin présente dans le vin et uniquement avec elle. De

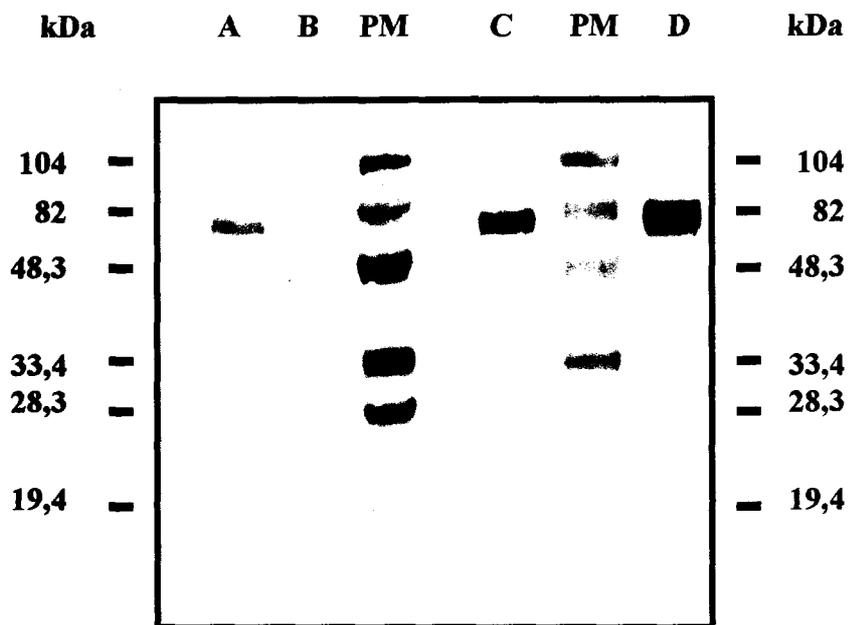


Figure 46 : Test de spécificité des anticorps polyclonaux anti-invertase de raisin, produits à partir de lapin, par western-blot. Les anticorps sont dilués au 1/1500^e. PM : Poids Moléculaires.

- (A) Colloïdes du vin (150 µg)**
- (B) Invertase de levure (Sigma) (10 µg)**
- (C) Colloïdes du moût (150 µg)**
- (D) Invertase purifiée (10 µg)**

plus, ces anticorps ne montrent aucune réaction croisée avec l'invertase d'origine levurienne (Sigma) (figure 46, piste B).

Ces anticorps polyclonaux pourront donc être utilisés pour mettre au point la méthode ELISA qui nous permettra de différencier et de suivre spécifiquement l'invertase de raisin.

III.1. Mise au point du test PTA-ELISA anti-Invertase

La mise au point de ce test s'est déroulée en plusieurs étapes :

Il a fallu chercher à déterminer les dilutions des divers anticorps (anticorps primaire anti-invertase et secondaire couplé à la peroxydase) les plus appropriées.

Il a fallu également déterminer l'influence (ou non) de l'alcool présent dans les échantillons.

III.1.1. Détermination des dilutions optimales

Afin de déterminer quelle est la dilution optimale pour l'emploi des anticorps primaires anti-invertase, une gamme de dilution de l'antigène a été mise en place sur les plaques de microtitration, variant de 0,1 pg/mL à 10 µg/mL d'invertase purifiée.

D'un autre côté, le sérum a subi plusieurs dilutions allant de 1/1 000^e à 1/1 000 000^e. Les résultats obtenus sont présentés figure 47.

On observe une réponse réellement significative avec des dilutions du sérum inférieures au 1/10 000^e. Cette gamme a permis de retenir la dilution du sérum au 1/1 000^e comme étant la plus appropriée pour la réalisation du test ELISA (tableau 11). En effet, les trois autres dilutions ont donné un signal trop faible notamment, dans les concentrations d'antigènes les plus faibles (figure 47).

Pour l'anticorps de révélation, l'optimum de dilution retenu est la dilution au 1/3 000^e (tableau 10), en effet, les dilutions supérieures à celle-ci donnent des réponses trop faibles pour être utilisées.

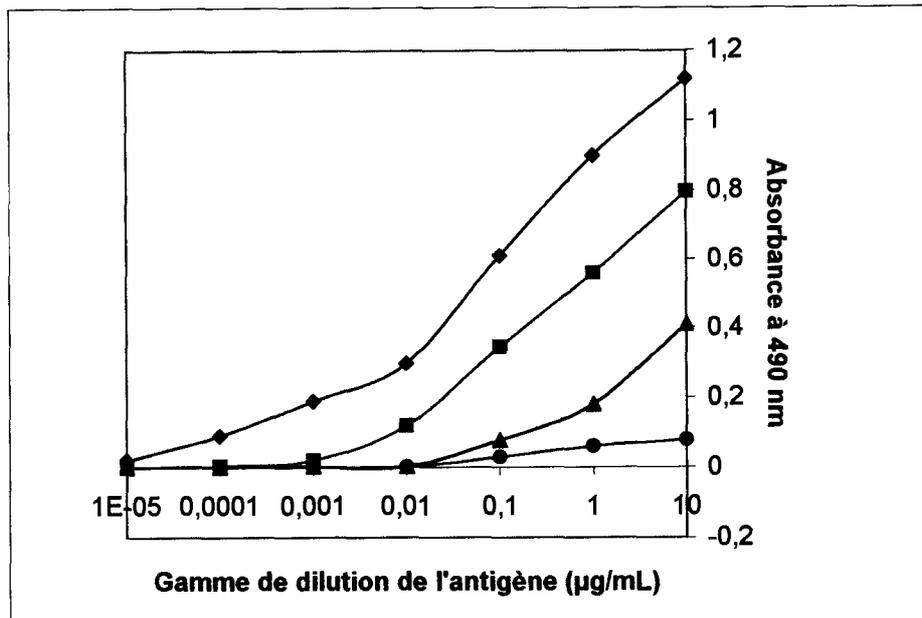


Figure 47 : Courbes des dilutions du sérum polyclonal anti-invertase (courbes semilog).

◆ , dilution du sérum au 1/ 1 000° ; ■ , dilution au 1/10 000° ; ▲ , dilution au 1/100 000° ; ● , dilution au 1/1 000 000°.

	Différents essais réalisés	Optima retenus
Dilutions de l'anticorps primaire	De 1/1 000° à 1/1 000 000°	1/1 000°
Dilutions de l'anticorps de révélation	De 1/1 500° à 1/8 000°	1/3 000°

Tableau 11 : Différents paramètres testés et conditions optimales retenues pour le PTA-ELISA

III.1.2. Réalisation de la courbe de calibration

Afin d'obtenir cette courbe de calibration, nous avons solubilisé une gamme d'invertase purifiée dans du tampon PBS, que nous avons ensuite déposée sur les plaques de microtitration. Cette gamme de dilution est comprise entre 100 $\mu\text{g/mL}$ et 0,1 pg/mL d'invertase. Les anticorps primaires ont été dilués au 1/ 1 000^e, tandis que les anticorps de révélation couplés à l'enzyme sont, eux, dilués au 1/3 000^e.

Le résultat est présenté à la figure 48. Cette gamme de concentrations a permis de déterminer le seuil de détection du test (seuil de sensibilité). Notre méthode ELISA permet de détecter jusqu'à 0,1 ng/mL d'invertase, avec une zone de détection comprise entre 1 ng/mL et 4 $\mu\text{g/mL}$ (figure 48). Les concentrations comprises dans cette zone seront utilisées comme standards afin de réaliser le dosage ELISA.

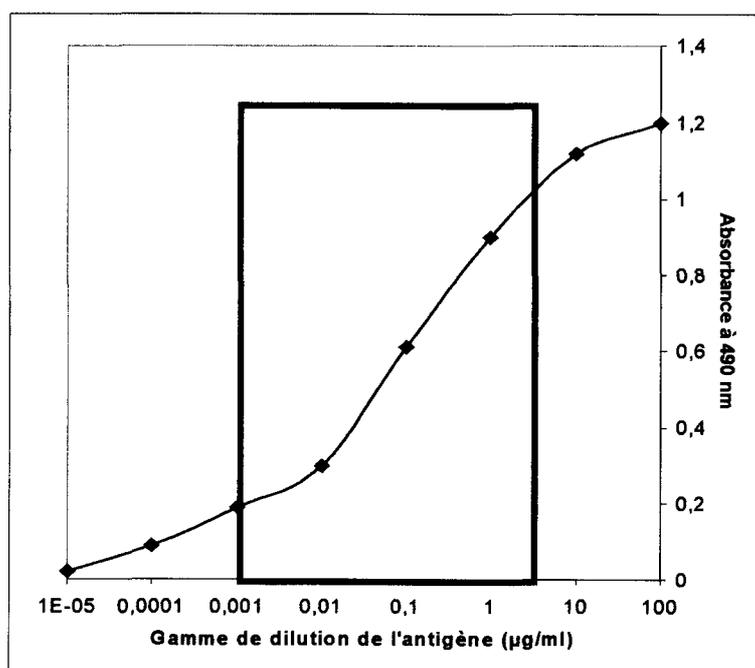


Figure 48 : Courbe standard d'invertase. Courbe semi-log d'une gamme d'invertase purifiée. Les concentrations comprises dans la zone encadrée seront utilisées comme standards afin de réaliser le dosage ELISA.

III.1.3. Influence de la présence d'alcool dans les échantillons

L'un des points importants de cette étude était de déterminer si, oui ou non, l'alcool présent dans les échantillons de vin pouvait interférer avec le dosage ELISA. Pour cela, un vin témoin a été ultrafiltré avec des unités d'ultrafiltration coupant à 3 000 Da. Puis, nous avons récupéré l'ultrafiltrat et mis en place, à partir de cet ultrafiltrat, une gamme étalon d'invertase purifiée. Cette courbe étalon a été ensuite comparée avec celle de référence obtenue avec un tampon PBS. Les deux courbes sont présentées à la figure 49. Aucune variation significative n'est observée entre les deux courbes (figure 49). Ainsi, la présence d'alcool (12 %) n'interfère pas dans ce dosage ELISA. On peut également ajouter que la présence de composés ayant des masses inférieures à 3 kDa et présents dans l'ultrafiltrat n'interfèrent pas non plus avec le dosage.

Les échantillons de vin pourront donc être utilisés tels quels, sans avoir à subir de traitement avant dosage sur microplaques.

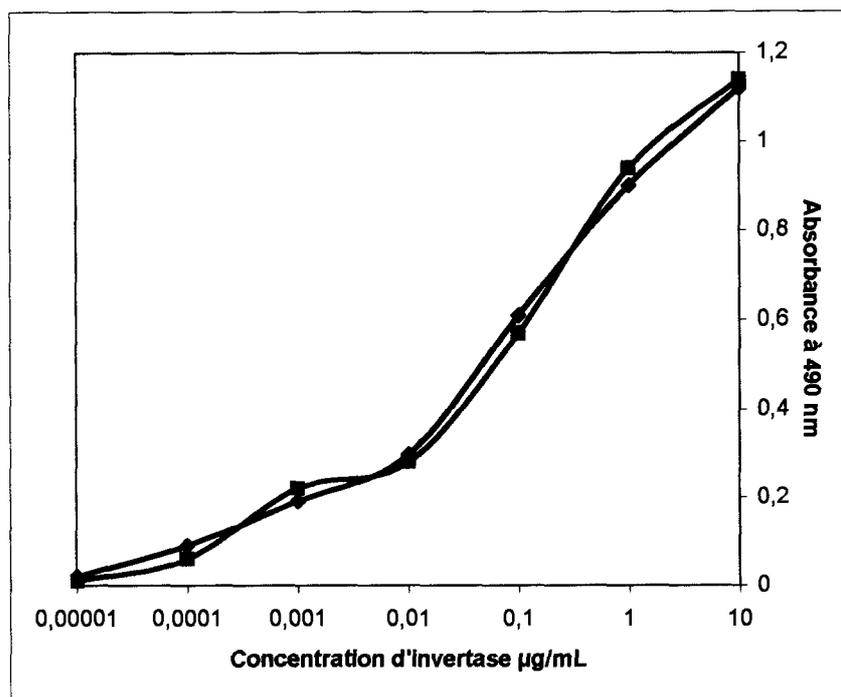


Figure 49 : Etude de l'effet de la présence d'éthanol sur la courbe de calibration.

◆, courbe de calibration standard ; ■, courbe de calibration réalisée par dilution de l'invertase dans des ultrafiltrats de vin.

III.1.4. Quantification de l'invertase dans les échantillons

Chacun des échantillons de vin (quatre essais par échantillon) (100 μ L) a été déposé dans les puits des microplaques. Les résultats de ces dosages sont rassemblés dans les tableaux 15 et 16. Pour le vin témoin (non traité), nous obtenons 1,9 μ g/mL d'invertase. Les protéines totales ont également été quantifiées. Ce vin contient également 10,8 μ g/mL de protéines totales. Ainsi, l'invertase représente, dans cet échantillon, de l'ordre de 17 à 18 % des protéines totales. Cette valeur est en total accord avec les données de Robillard (communication personnelle), selon lequel l'invertase représenterait de 12 à 40 % des protéines.

Les concentrations d'invertase concernant les échantillons traités seront abordées dans les paragraphes suivants.

IV. INFLUENCE DES TRAITEMENTS DE COLLAGE

L'élaboration d'un Champagne comprend un nombre variable d'étapes de vinification capables de modifier grandement la composition macromoléculaire du vin. En particulier, les traitements de collage, notamment ceux utilisant la caséine ou la bentonite, sont susceptibles d'affecter considérablement la composition d'un vin et ainsi d'en minorer les propriétés moussantes (Maujean et al., 1990). Bien que de nombreux travaux aient porté sur l'étude de ces phénomènes, ils en restent néanmoins très peu compris. Jusqu'à présent, toutes les recherches ont porté sur l'effet des traitements de collage sur le pool protéique global d'un vin (Puig-Deu et al., 1999).

Afin de mieux connaître l'impact des traitements de collage sur le pool protéique global d'un vin et également sur une protéine individuelle, l'invertase de raisin, des traitements de collage ont été mis en place sur moûts ou sur vins. Parallèlement, l'effet de ces traitements sur les propriétés moussantes des vins de base sera quantifié.

	Hm (mm)	Protéines (µg/mL)
Témoin	113	10,8
Bentonite 10 g/hL	82	6,31
Bentonite 40 g/hL	88	3,42
Bentonite 50 g/hL	108	3,31
Caséine 10 g/hL	85	9,35
Caséine 20 g/hL	86	7,43

Tableau 12 : Influence des traitements de collage (au stade moût) sur les teneurs en protéines totales et la moussabilité (Hm). Les mesures de moussabilité sont réalisées dans des conditions standardisées d'effervescence (Mosalux).

IV.1. Mise en place des traitements de collage

Avant de rentrer dans le détail des collages mis en place, nous allons faire un bref rappel sur le collage.

Le collage est l'opération qui consiste à incorporer dans un vin plus ou moins trouble ou plus ou moins instable une substance appelée colle, qui peut être de la bentonite, des caséines, des gélatines, des tanins, ou des associations des composés précédemment cités. Cette colle va coaguler et former des floculats qui vont sédimenter. Cette sédimentation entraîne les particules fines du trouble qui sont en suspension en formant des lies qui se déposent au fond de la cuve. Le vin surnageant étant devenu limpide, il est alors séparé de ses lies par soutirage. La coagulation de la colle fait appel à des notions de charges électriques des particules. Les buts du collage sont d'obtenir un vin limpide et stable, sur le plan colloïdal.

IV.1.1. Traitements de collage effectués sur moût

Lors de cette étude, divers traitements de collage ont été utilisés. Un premier traitement à la bentonite a été effectué sur moût à des doses croissantes, variant de 10 à 50g/hL. La bentonite sodique a été au préalable gonflée pendant 24 h dans l'eau. Nous avons également mis en place des collages avec deux doses différentes de caséine (10 et 20 g/hL), ainsi qu'un troisième traitement à la bentocaséine, c'est à dire constitué d'un mélange de bentonite et de caséinate de potassium à 20 g/hL chacun. Tous ces collages ont été effectués sur des moûts de Chardonnay. Les moûts ont été ensuite centrifugés puis fermentés. Après la fermentation alcoolique, les vins ont subi une stabilisation tartrique (trois semaines à 4°C), puis ont été centrifugés et filtrés stérilement (0,45 µm).

La mesure des propriétés moussantes des vins issus des différents collages sur moût conduit, dans certains cas, à des résultats très incohérents. Ainsi, suivant le type de collage, nous observons de fortes variations des propriétés moussantes et, plus particulièrement, de la hauteur du plateau (Hm), d'un vin issu d'un traitement sur moût à l'autre (tableau 12). Pour la première dose de bentonite (10 g/hL), on observe une chute de la teneur en protéines totales, qui passe de 10,8 µg/mL pour le témoin non traité à 6,31 µg/mL pour le vin traité (tableau

12). On observe également une chute de la moussabilité avec une hauteur de mousse pour ce vin égale à 82 mm contre 113 mm pour le témoin (tableau 12). Lorsque les doses de bentonite augmentent, on note une chute de la teneur en protéines (3,42 $\mu\text{g/mL}$ et 3,31 $\mu\text{g/mL}$ pour les doses, respectivement à 40 et 50 g/hL de bentonite) (tableau 12). En revanche, les valeurs de moussabilité (Hm) augmentent jusqu'à atteindre pratiquement la valeur du témoin pour la plus forte dose de bentonite (50 g/hL) (tableau 12). Pour les traitements de collage utilisant la caséine (10 et 20 g/hL), on observe une perte en protéines qui semble être dose dépendante (tableau 12). Cependant, la moussabilité reste identique entre les deux doses de caséine, même si elle chute par rapport au témoin (tableau 12).

Nous ne pouvons pas donner d'explications à l'incohérence des résultats obtenus sur moûts d'autant plus que, comme nous allons le voir, les traitements effectués sur vins conduisent, eux, à des résultats tout à fait cohérents. Les résultats obtenus sur moûts ne seront donc pas exploités.

IV.1.2. Traitements de collage sur vin

Les traitements de collage effectués au cours de cette étude sont les mêmes que ceux réalisés précédemment lors du collage des moûts. Après collage, les vins sont centrifugés. Les vins ont, ensuite, subi une stabilisation tartrique (trois semaines à 4°C), puis sont centrifugés et filtrés stérilement (0,45 μm), avant d'être analysés au Mosalux. Les vins sont, au préalable, filtrés et dégazés.

IV.1.2.1. Effets des traitements de collage sur le pool protéique global

Traitement à la bentonite

On sait que les traitements à la bentonite provoquent une élimination des protéines du vin (c'est à dire les protéines d'origine végétale et levurienne) (Maujean et al., 1990). Nous avons cherché à montrer dans quelles proportions les protéines étaient éliminées du vin après

	Protéines ($\mu\text{g/mL}$)	Perte (en %)
Témoin	10,8	
Bentonite 10 g/hL	8,87	- 18 %
Bentonite 20 g/hL	6,04	- 44 %
Bentonite 40 g/hL	5,03	- 53 %
Bentonite 50 g/hL	3,05	- 72 %

Tableau 13 : Influence des traitements de collage à la bentonite (au stade vin) sur les teneurs en protéines totales. Les dosages protéiques ont été effectués en utilisant la méthode de Bradford modifié (Marchal et al., 1997).

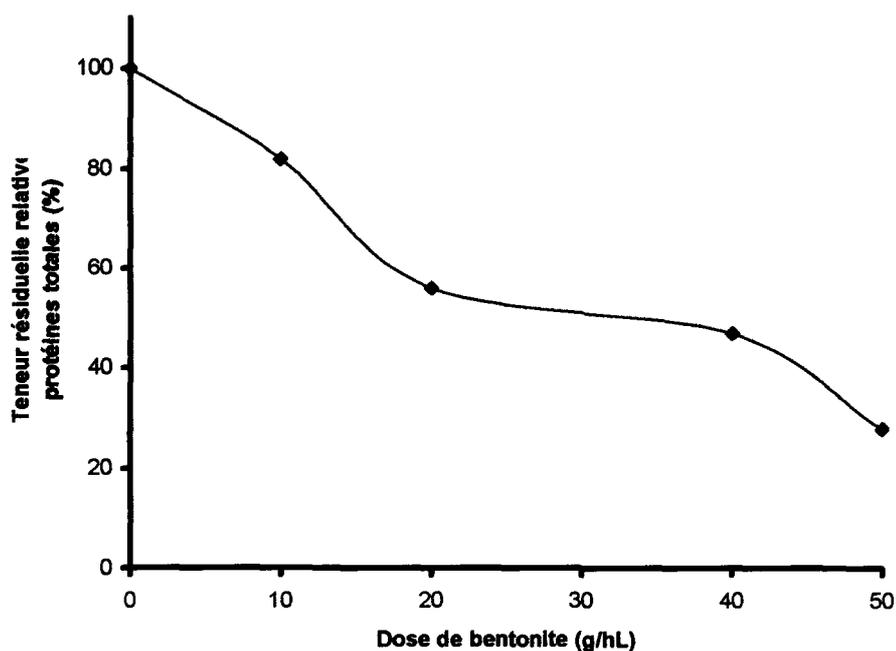


Figure 50 : Influence d'un traitement à la bentonite sur les teneurs en protéines totales.

ce type de traitement. Nous avons, pour cela, suivi l'évolution du pool protéique du vin en dosant les protéines totales suivant le protocole de Bradford modifié (Marchal et al., 1997).

Les résultats présentés au tableau 13 montrent clairement que, lors des traitements à la bentonite, on observe une diminution de la teneur en protéines totales. Cette diminution est d'autant plus forte que la dose de bentonite ajoutée est élevée (tableau 13). La figure 50 illustre, d'autant mieux, cette observation. Sur cette courbe, on note que dès les premières doses de bentonite les concentrations en protéines chutent fortement (- 18 % pour la dose à 10 g/hL et - 44 % pour la dose à 20 g/hL). Par la suite, un doublement de la dose de bentonite (passage de 20 à 40 g/hL) n'apporte que peu d'effet sur l'élimination des protéines, avec une différence de 9 % entre les deux doses (figure 50). Ce type de profil avait déjà été observé par Marchal (1996). En effet, cet auteur observait également une forte diminution de la teneur en protéines avec les premières doses de bentonite, de 5 à 20 g/hL, puis il observait une chute dans l'efficacité d'élimination des protéines avec de plus fortes doses en bentonite. La plus forte dose à 50 g/hL semble, en revanche, provoquer une perte plus importante en protéines (- 72 %).

Traitement à la caséine

Les traitements à la caséine n'induisent, en comparaison avec ceux utilisant la bentonite, qu'une perte faible en protéines totales (tableau 14). Ainsi, un traitement à 10 g/hL de caséine ne provoque qu'une diminution de la teneur en protéines totales de 8 %.

Lorsque l'on double les doses de caséine (20 g/hL), on observe, de nouveau, une légère perte en protéines totales (- 20 %).

Les traitements à la caséine semblent avoir un effet moindre sur l'élimination des protéines par rapport aux traitements à la bentonite, à doses égales (tableau 14).

Traitement à la bentocaséine

Pour ces collages avec les bentocaséines, un mélange de bentonite (20 g/hL) additionné de caséine de vache (20 g/hL) a été utilisé. Lors de ces traitements, on observe une perte faible en protéine (- 7 %) (tableau 14). Il est d'ailleurs étonnant d'observer que le

	Protéines ($\mu\text{g/mL}$)	Perte (en %)
Témoin	10,8	
Caséine 10 g/hL	9,90	- 8 %
Caséine 20 g/hL	8,61	- 20 %
BentoCaséine (20 g/hL + 20 g/hL)	10,1	- 7 %

Tableau 14 : Influence des traitements de collage à la caséine et la bentocaséine (au stade vin) sur les teneurs en protéines totales. Les dosages protéiques ont été effectués en utilisant la méthode de Bradford modifié (Marchal et al., 1997).

	Teneur en Invertase ($\mu\text{g/mL}$)	Perte (en %)	Perte en protéines totales (en %)
Témoin	1,90		
Bentonite 10 g/hL	1,58	- 17 %	- 18 %
Bentonite 20 g/hL	1,20	- 37 %	- 44 %
Bentonite 40 g/hL	0,85	- 55 %	- 53 %
Bentonite 50 g/hL	0,51	- 73 %	- 72 %

Tableau 15 : Influence des traitements de collage à la bentonite (au stade vin) sur les teneurs en invertase (dosage ELISA) et en protéines totales (dosage de Bradford modifié).

traitement avec le mélange de bentocaséine semble être moins efficace que les mêmes traitements (bentonite, d'une part et caséine, d'autre part) effectués séparément.

Ces résultats sont, cependant, en accord avec ceux obtenus par Maujean et al. (1990) qui observaient, après traitement par des bentocaséines, une perte minime en protéines.

IV.1.2.2. Effets des traitements de collage sur l'invertase

Après s'être intéressé à l'effet des traitements de collage sur le pool protéique total, nous allons étudier l'impact que peuvent avoir ces traitements sur une protéine individuelle du vin. Pour ce faire, l'invertase de raisin sera quantifiée par utilisation du protocole ELISA mis en place précédemment.

Traitement à la bentonite

Les résultats de ces quantifications sont présentés tableau 15. On observe, et ceci pour de faibles doses de bentonite (de 10 à 20 g/hL), que l'invertase de raisin est éliminée par ce traitement de collage de manière dose dépendante : ainsi, plus la dose de bentonite employée est élevée plus la quantité d'invertase éliminée est grande (tableau 15). Avec 10 g/hL de bentonite, 17 % d'invertase sont éliminés. Cette proportion passe à 37 % lorsque l'on ajoute 20 g/hL de bentonite (tableau 15). En revanche, l'ajout de 40 g/hL de bentonite ne provoque qu'une perte minime en invertase (- 55 %), en comparaison notamment avec la dose précédente (20 g/hL).

L'ajout de 50 g/hL de bentonite semble avoir un effet plus importante ; en effet, on observe une perte en invertase qui atteint 73 % (tableau 15).

Lorsque l'on compare l'effet de ces traitements sur le pool protéique total et sur l'invertase, on observe, de façon surprenante, que l'évolution de l'invertase suit, de manière parallèle, et quasiment superposable, l'évolution des protéines totales (figure 51).

La droite de régression, teneur résiduelle en invertase vs teneur résiduelle en protéines totales, illustre d'autant mieux cette observation. En effet, cette droite met en évidence une

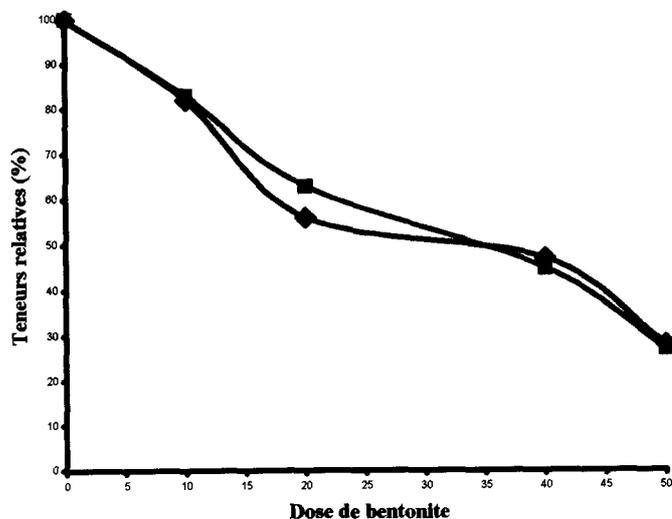


Figure 51 : Influence d'un traitement à la bentonite sur les teneurs en invertase (■) et en protéines totales (◆).

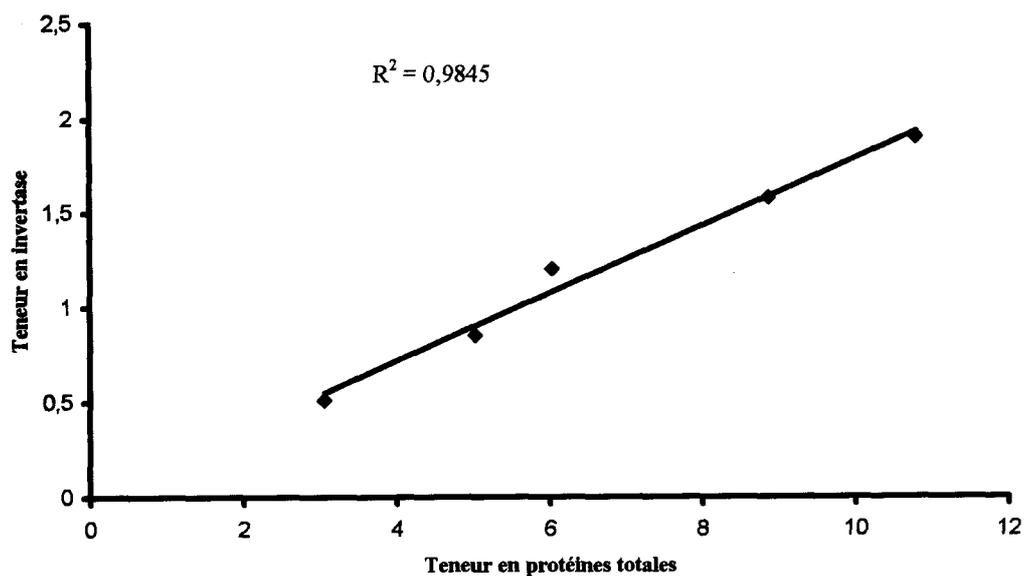


Figure 52 : Relation entre la teneur en protéines totales et la teneur en invertase après traitements à la bentonite.

très bonne corrélation ($R^2 = 0,98$) entre ces deux variables (figure 52). Il existe donc une relation entre l'élimination de l'invertase et l'élimination des protéines totales. L'invertase est éliminée de manière similaire au pool protéique dans son ensemble. Autrement dit et, comme l'illustre parfaitement la figure 52, il ne semble pas exister d'adsorption différentielle de l'invertase et des autres protéines du vin vis à vis des traitements à la bentonite.

La figure 51 tend à confirmer les premiers résultats que nous avons obtenus lors de l'étude de l'effet de la bentonite sur le pool protéique du vin. En effet, nous observons que, pour les premières doses de bentonite (10 et 20 g/hL), il y a une forte élimination d'invertase. Puis, lorsque l'on double la quantité de bentonite, l'effet sur l'élimination de l'invertase n'est pas du même ordre. En revanche, lorsque l'on ajoute 50 g/hL de bentonite l'efficacité d'élimination tend à s'améliorer (figure 51).

Traitement à la caséine

Le traitement à la caséine ne provoque qu'une faible élimination d'invertase et ceci pour les deux doses que nous avons employées, respectivement - 11 % pour une dose de 10 g/hL et - 18 % pour celle à 20 g/hL (tableau 16). De nouveau, on peut remarquer que l'invertase est éliminée dans des proportions identiques aux protéines totales. Les traitements à la caséine, en comparaison de ceux utilisant la bentonite, semblent toucher de manière identique les protéines totales et l'invertase. La droite de régression teneur résiduelle en invertase vs teneur résiduelle en protéines totales permet d'observer, en effet, une bonne corrélation entre ces deux données avec un $R^2 = 0,95$ (figure 53).

Les traitements à la caséine semblent, cependant, avoir un effet moins « déprotéinisant » par rapport aux traitements à la bentonite, à doses égales.

Traitement à la bentocaséine

Avec ce traitement, on observe une perte faible en invertase (- 10 %) (tableau 16). On peut également noter que, de nouveau, l'invertase est éliminée dans des proportions identiques aux protéines totales (tableau 16).

	Teneur en Invertase ($\mu\text{g/mL}$)	Perte (en %)	Perte en protéines totales (en %)
Témoin	1,90		
Caséine 10 g/hL	1,69	- 11 %	- 8 %
Caséine 20 g/hL	1,55	- 18 %	- 20 %
BentoCaséine (20 g/hL + 20 g/hL)	1,71	- 10 %	- 7 %

Tableau 16 : Influence des traitements de collage (au stade vin) sur les teneurs en invertase et en protéines totales.

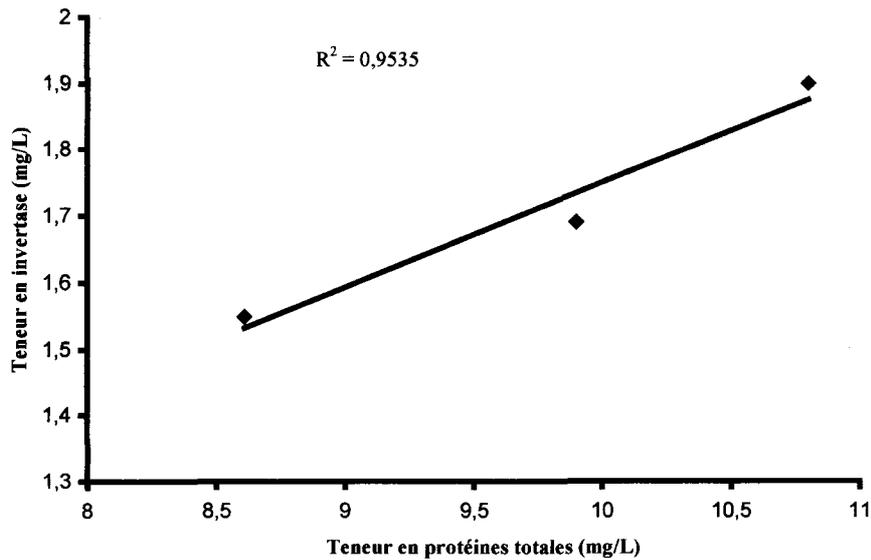


Figure 53 : Relation entre la teneur en protéines totales et la teneur en invertase après traitements à la caséine (10 et 20 g/hL).

Ainsi, et ceci quelque soit le traitement de collage utilisé, l'invertase de raisin semble avoir un comportement similaire aux protéines totales, bien qu'elle possède une masse moléculaire élevée et une forte glycosylation. Cependant, des travaux récents réalisés au sein de notre laboratoire tendent à montrer que les interactions entre argiles et protéines mettent en jeu les charges positives portés par les chaînes latérales des protéines, le squelette polypeptidique ne pénétrant pas au sein des espaces interfoliaires (Gougeon et al., 2002 et 2003). La partie glycosylée de l'invertase ainsi qu'une grande partie de la protéine demeurerait hors de ces espaces interfoliaires. Cette hypothèse nécessiterait toutefois une confirmation en RMN du solide.

IV.1.2.3. Influence des traitements de collage des vins sur les propriétés moussantes

L'étude des propriétés moussantes des vins de base a été effectuée à l'aide de la méthode de mesure utilisant le Mosalux (Maujean et al., 1990). Cette méthode permet une mesure des propriétés moussantes dans des conditions standardisées d'effervescence. On observe généralement, avec ce type d'appareil, un profil typique pour tous les vins (figure 54) : le vin présente un pic de moussabilité relativement important avec une montée de mousse rapide après la mise en place de l'effervescence, et une redescente plus ou moins abrupte. Par la suite, un équilibre entre la destruction et la formation des bulles se met en place. Cet équilibre permet la formation d'un plateau stable et régulier jusqu'à l'arrêt de l'effervescence. Le graphe obtenu permet d'acquérir deux paramètres : la hauteur maximale de mousse (Hm) et la hauteur au plateau (Hp) (figure 54). Pour chacun des échantillons testés, trois répliques de la mesure ont été effectuées.

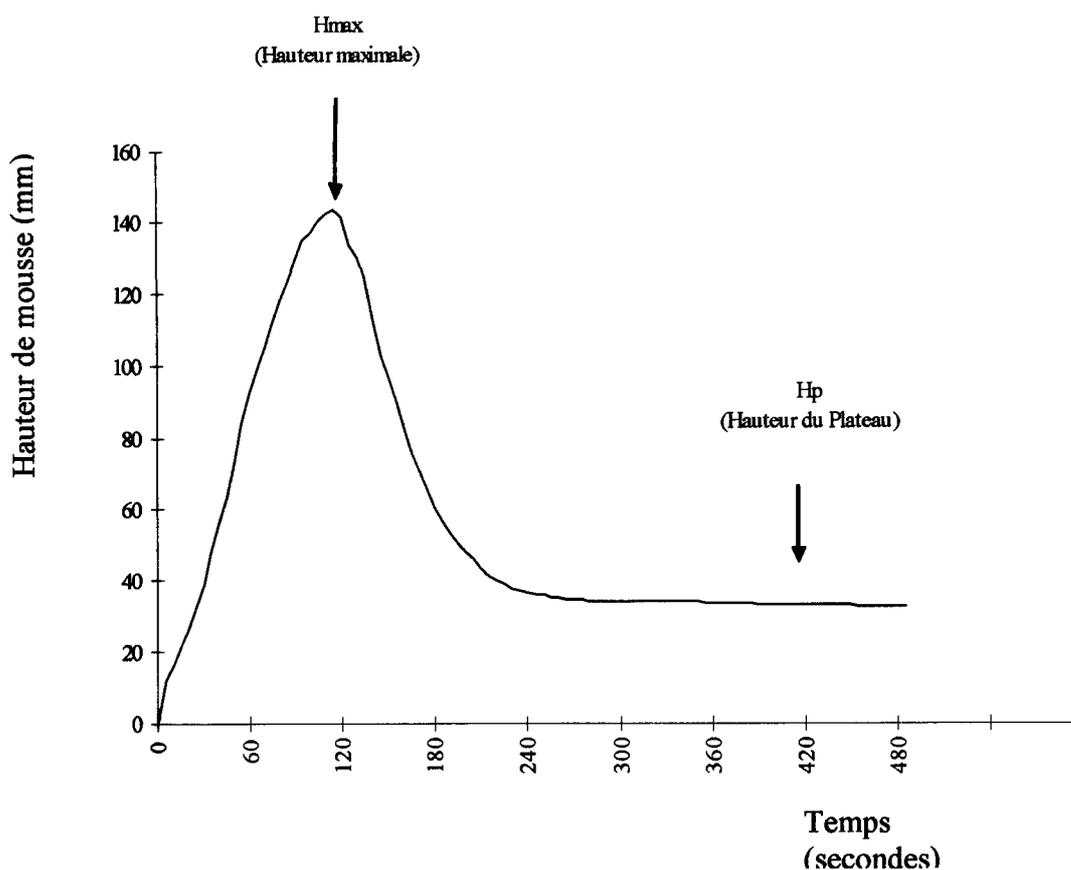


Figure 54 : Profil des propriétés moussantes d'un vin de base champenois (équipement MOSALUX).

Traitement à la bentonite

Comme nous l'avons vu, les traitements à la bentonite provoquent une élimination des protéines du vin. Cette chute de la teneur en protéines totales du vin peut également être mise en relation avec la chute de moussabilité de ces mêmes vins.

En effet, lorsque le vin est traité avec des doses croissantes de bentonite (de 10 à 50 g/hL), on observe une diminution de la hauteur de mousse (H_m) des vins. Ainsi, lorsque le vin de Chardonnay est traité avec une dose de 10 g/hL de bentonite, on note une diminution de 13 % de sa moussabilité (tableau 17). Cette chute de moussabilité atteint respectivement 33 % pour un traitement à 40 g/hL de bentonite et 47 % pour 50 g/hL (tableau 17). Maujean et al. (1990) avaient déjà montré qu'un traitement à 50 g/hL de bentonite diminue la moussabilité

	Perte en protéines (en %)	Hm (mm)	I.C.	Variations (%)	Hp (mm)
Témoin		113	113 ± 7		17
Bentonite 10 g/hL	- 18 %	98	98 ± 8,6	- 13 %	11
Bentonite 20 g/hL	- 44 %	96	96 ± 7	- 15 %	45 (très instable)
Bentonite 40 g/hL	- 53 %	76	76 ± 8,6	- 33 %	23 (instable)
Bentonite 50 g/hL	- 72 %	60	60 ± 9	- 47 %	21 (instable)
Caséine 10 g/hL	- 8 %	99	99 ± 10	- 12 %	13
Caséine 20 g/hL	- 20 %	95	95 ± 3	- 16 %	15
BentoCaséine (20 g/hL + 20 g/hL)	- 7 %	108	90 ± 12	- 5 %	17

Tableau 17 : Influence des traitements de collage (au stade vin) sur les teneurs en protéines totales, la moussabilité (Hm) et la hauteur du plateau (Hp). Les mesures de moussabilité et de stabilité sont réalisées dans des conditions standardisées d'effervescence (Mosalux).
I.C. = Intervalle de confiance = $m \pm t.s$ (avec m : moyenne de la série de mesure, t : valeur de Student pour une probabilité de 95%, s : erreur type de la moyenne.)

des vins de base étudiés de l'ordre de 40 à 60 %. L'ajout de bentonite au vin diminue sa moussabilité et ceci de manière dose-dépendante.

Cependant, on observe, après traitement du vin par la bentonite, l'apparition d'une instabilité de mousse, et ceci quelle que soit la dose de bentonite employée. Seul le vin traité à 10 g/hL voit sa hauteur au plateau (Hp) légèrement diminuer par rapport au témoin (- 6 mm) (tableau 17). Tous les autres traitements provoquent une instabilité plus ou moins forte de la mousse. Marchal et al. (2002) avaient également observé ce caractère instable des mousses des vins traités par la bentonite. Pour le moment, ce phénomène reste inexpliqué.

Ces premiers résultats confirment donc la relation qui existe entre teneur en protéines et moussabilité d'un vin.

Traitement à la caséine

Les traitements à la caséine n'induisent, comme nous l'avons vu précédemment, qu'une perte assez minime en protéines. Ces pertes limitées, en terme de protéine, se répercutent également sur l'effet de ces traitements sur les propriétés moussantes des vins. En effet, un traitement à 10 g/hL de caséine ne provoque qu'une diminution de la teneur en protéines totales de 8 %. Ce traitement provoque également une diminution (faible) des propriétés moussantes du vin traité. On observe ainsi une baisse de la hauteur maximale de mousse (Hm) et de la hauteur du plateau (Hp), de respectivement moins 12 % et moins 23 %. Lorsque l'on double les doses de caséine (20 g/hL), on observe, de nouveau, une légère perte en protéine (- 20 %). Cette élimination de protéine se traduit également par une diminution de la hauteur de mousse (- 16 %). En revanche, la hauteur du plateau semble être augmentée (tableau 17). Ces observations mettent de nouveau en évidence une relation entre teneur en protéines et propriétés moussantes.

Traitement à la bentocaséine

Pour ces traitements avec les bentocaséinates, nous avons utilisé un mélange de bentonite (20 g/hL) et de caséine (20 g/hL).

Ces traitements provoquent une perte faible en protéines (7%). Ces pertes assez mineures en protéines se traduisent par une légère baisse de la moussabilité (- 5 % par rapport au témoin). En revanche, la tenue de mousse reste inchangée ($H_p = 17$ mm dans les deux cas, tableau 17). Il est étonnant d'observer que le traitement avec le mélange de bentocaséine semble être moins efficace que les mêmes traitements (bentonite, d'une part et caséine, d'autre part) effectués séparément. Ces résultats sont, cependant, en accord avec ceux obtenus par Maujean et al. (1990) qui observaient, après traitement par des bentocaséines, une légère perte en protéines ainsi qu'une baisse non significative de la moussabilité du vin traité. A l'inverse, des travaux réalisés par une équipe espagnole (Puig-Deu et al., 1999) démontrent qu'un traitement avec un mélange de bentocaséine (50 g/hL de chacun des composés) fait chuter fortement la teneur en protéines endogènes d'un vin ainsi que sa moussabilité. Ces auteurs observent, de plus, que ces pertes en protéines et la diminution de la moussabilité qui en résulte sont beaucoup plus élevées lors de ce traitement qu'avec un traitement comparatif à 20 g/hL de bentonite. Cependant, il faut noter que le mélange de bentocaséine utilisé par Puig-Deu et al. (1999) renferme en fait 2,25 fois plus de bentonite que lorsqu'elle est utilisée seule. Cette forte proportion en bentonite peut expliquer les différences observées vis à vis d'un traitement à la bentonite seule, que ce soit dans leur étude ou dans la nôtre, où les doses de bentonites sont identiques et égales à 20 g/hL.

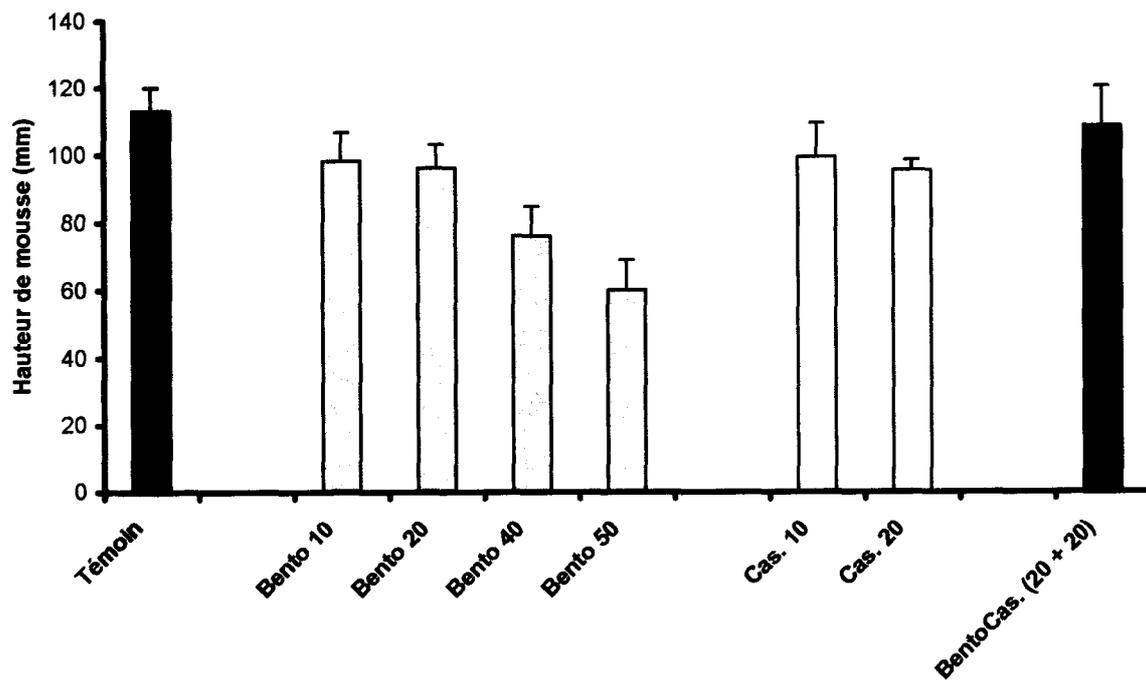


Figure 55 : Influence des traitements de collage sur la hauteur de mousse H_m (mm). Les mesures de moussabilité sont réalisées dans des conditions standardisées d'effervescence (Mosalux).

V. CONCLUSION

L'étude que nous venons de présenter ici portait sur l'impact que pouvaient avoir des traitements de collage sur un vin de base champenois, sur son pool protéique endogène et ses propriétés moussantes. L'originalité de ce travail consiste également à avoir réalisé, au cours de l'élaboration d'un Champagne, le suivi d'une protéine particulière, l'invertase de raisin.

Les principaux résultats obtenus ont montré ainsi que les traitements de collage, et notamment ceux utilisant la bentonite, tendent à éliminer une grande partie du pool protéique d'un vin provoquant ainsi une détérioration de ses propriétés moussantes (figure 55). Ainsi, à l'instar d'autres travaux (Maujean et al, 1990 ; Andrés-Lacueva et al., 1996), notre étude confirme clairement qu'il existe une bonne corrélation entre teneur en protéine et moussabilité d'un vin (caractérisée par sa hauteur de mousse Hm).

L'invertase de raisin a un comportement similaire aux protéines endogènes totales vis à vis des traitements de collage.

Ainsi, l'invertase pourrait servir de « protéine modèle » pour simuler cette matrice complexe qu'est le pool protéique d'un vin, permettant ainsi de suivre l'évolution des protéines totales au cours de la vinification, notamment par l'utilisation du test ELISA mis en place lors de cette étude, même si d'autres travaux (Puff et al., 2001) indiquent que cette enzyme ne peut pas servir de modèle pour l'étude des propriétés de surface d'un vin, ces auteurs ayant démontré que l'invertase ne semble pas être un bon modèle moléculaire pour décrire le comportement des couches d'adsorption d'un vin.

Nous venons de montrer clairement, dans cette étude, la relation directe qui existe entre le contenu en protéines totales d'un vin et les principaux paramètres qui définissent ses propriétés moussantes (hauteur de mousse, hauteur de plateau). C'est, à notre connaissance, le seul travail qui rapporte de façon précise l'évolution de la quantité de protéines endogènes d'un vin au cours de son élaboration, notamment vis à vis des traitements de collage, et sa mise en relation avec les propriétés moussantes. Cette étude objective le choix qui a été fait d'appréhender la moussabilité d'un vin au travers des composés pro-mousse que sont les

protéines et les glycoprotéines, même si cette idée n'est pas entièrement partagée par d'autres équipes, notamment celle du Dr R. Douillard à l'INRA de Reims, qui attribuent les caractères de mousse d'un vin, non pas exclusivement aux protéines du vin, mais également à des polymères (y compris non-protéiques), d'identités encore non définies d'un point de vue moléculaire et dont les masses varieraient de 10 à 100 kDa (Péron et al., 2000).

Enfin, la surprenante corrélation observée entre la diminution des protéines totales d'un vin comme suite à un traitement par la bentonite, et celle de l'invertase démontre que l'invertase est sans aucun doute une protéine représentative du pool protéique endogène d'un vin et justifie pleinement le choix qui a été fait initialement d'étudier cette glycoprotéine au cours de ce travail de thèse.

**CONCLUSION GENERALE ET
PERSPECTIVES**

Les caractéristiques de la mousse d'un champagne sont d'une extrême importance, notamment sur la perception que le consommateur se fait de la qualité du champagne dégusté. Les propriétés moussantes d'un vin effervescent sont largement tributaires de composés endogènes tels que les protéines et, plus particulièrement, les glycoprotéines.

L'étude de ces composés nous apparaît comme primordiale afin de mieux comprendre et mieux maîtriser ces phénomènes instables, que sont les mousses d'un Champagne. Notre travail, centré sur l'étude plus particulière d'une glycoprotéine majeure du raisin, l'invertase, s'articulait autour de plusieurs axes.

Dans une première partie, nous avons cherché à déterminer quelles étaient les origines des protéines d'un vin de base champenois. En effet, plusieurs études avaient déjà été entreprises sur ce sujet conduisant, cependant, à des conclusions assez contradictoires (Ferreira et al., 2000 ; Dupin et al., 2000). Afin de répondre à cette question, nous avons mis en place une technique immunospcifique permettant de déterminer l'origine exacte des protéines du vin (Dambrouck et al., 2003). Les résultats obtenus démontrent, à l'instar d'études antérieures, qu'un grand nombre des protéines du vin ont une origine végétale et proviennent du moût. La plupart de ces protéines végétales sont, en fait, des glycoprotéines. De plus, nous démontrons sans ambiguïté la présence, dans les vins blancs champenois, de nombreuses protéines levuriennes. Cette fraction protéique levurienne est composée, en majorité, de mannoprotéines de haut poids moléculaire, qui sont libérées lors de la fermentation alcoolique. La présence de protéines bactériennes n'est pas détectée dans ces vins dans la limite de sensibilité de la méthode mise en oeuvre.

Ainsi, cette étude qui démontre, sans ambiguïté, la présence de protéines d'origine végétale et levurienne dans un vin de base champenois, devra être poursuivie afin de déterminer plus précisément le contenu d'un vin en protéines végétales (de cépage « sain » et liées à la pathogénèse), des travaux récents ayant démontré, en effet, la présence de protéines de défense ou PR-protéines (*Pathogenesis-Related proteins*) dans les moûts et les vins de Champagne (Manteau et al., 2003).

Après nous être intéressés au pool protéique dans sa globalité, nos travaux se sont portés sur l'étude d'une glycoprotéine majeure des vins de Champagne, l'invertase de raisin et, en premier lieu, l'étude de sa structure glycanique. Les premiers résultats, déduits de la

digestion en gel de cette glycoprotéine, démontrent que l'invertase isolée d'un moût de Chardonnay dérive entièrement de la séquence GIN1 décrite par Davies et Robinson (1996).

Cette séquence contient 12 sites potentiels de glycosylation, nos premiers résultats montrant que l'un de ces sites, celui contenant l'Asn-101, semble ne pas être glycosylé.

Les structures glycaniques isolées au cours des différentes opérations de digestion de cette glycoprotéine, révèlent une forte hétérogénéité de glycosylation de l'invertase. Cette hétérogénéité avait déjà été évoquée lors de l'analyse du profil électrophorétique de l'invertase. Nos observations mettent, cependant, en évidence la présence d'un glycanne majeur, le glycanne paucimannosidique (MMXF³) qui représente à lui seul plus de 50 % des glycannes totaux.

La suite de ces travaux consistera donc à déterminer les points d'ancrage des glycannes sur le noyau protéique et à montrer la spécificité de glycosylation de chacun des sites.

Dans ce but, nous pourrions, à partir du protocole de purification de l'invertase en sortie d'électrophorèse préparative, mettre en place plusieurs types de digestions protéasiques, voire des doubles digestions, afin d'isoler chacun des séquons de l'invertase. En effet, en étudiant la séquence décrite par Davies et Robinson (1996), on observe la présence de plusieurs sites assez proches les uns des autres, de telle sorte qu'une digestion protéasique unique ne permet pas d'individualiser chaque site de glycosylation. Après ces digestions, les glycopeptides pourront être purifiés par HPLC et analysés en spectrométrie de masse. Ceci devrait donc permettre d'accéder à la structure glycanique complète d'une glycoprotéine dont l'extraordinaire complexité de glycosylation mérite d'être soulignée.

La troisième partie de notre étude a mis en évidence que, lorsque le vin est soumis à des traitements de collage préalables, l'invertase subit la même évolution que le pool protéique global. Ainsi, cette glycoprotéine semble être un bon modèle pour simuler le pool protéique et, notamment, pour simuler l'impact de certains traitements sur le vin. Les résultats obtenus démontrent, de plus, que les protéines sont largement impliquées dans le maintien des propriétés moussantes d'un vin, bien qu'ils ne nous permettent pas d'extrapoler cette observation au rôle spécifique de l'invertase dans les propriétés moussantes d'un vin de Champagne. Il serait donc intéressant d'étudier l'activité « pro-mousse » exercée par cette glycoprotéine. Cette étude passe, préalablement, par la mise en place d'un protocole de purification de l'invertase différent de celui utilisé actuellement. En effet, ce protocole fait appel, en dernière étape, à une électrophorèse préparative nécessitant la présence de SDS. La

présence de ce composé est, bien sûr, rédhibitoire à toute étude de moussabilité. Par la suite, l'ajout de l'invertase dans des solutions modèles par exemple, pourra être envisagée, permettant ainsi d'étudier l'implication de cette glycoprotéine sur la mousse. Nous pourrions également étudier l'impact que peut avoir l'invertase sur l'effervescence d'un vin en liaison avec des travaux réalisés, dans ce domaine, au laboratoire sur la relation existant entre l'état de surface d'une bulle et sa dynamique ascensionnelle (Liger-Belair et al., 2000). De plus, il serait intéressant de prolonger le suivi de l'invertase tout au long du schéma de vinification, en effet, dans cette étude nous avons étudié l'impact des traitements de collage sur la teneur en invertase mais, qu'en est-il pour la suite du schéma de vinification (avec la prise de mousse notamment) ?

Dans la continuité de ce travail, d'autres perspectives sont envisageables, dans le cadre de la thématique concernant l'étude des protéines et l'étude des mousses des vins de Champagne.

Le fait que la levure libère des macromolécules lors de la fermentation alcoolique permet de s'interroger sur l'influence des protéines (ou glycoprotéines) d'origine levurienne sur les propriétés moussantes d'un Champagne.

Qu'en est-il des protéines libérées au cours de la première fermentation alcoolique ?

Qu'en est-il de la prise de mousse et de l'autolyse des levures (Charpentier et Feuillat, 1993) ?

Il serait intéressant d'étudier les composés tensio-actifs, libérés au cours des fermentations alcooliques, afin de les caractériser par une étude protéomique utilisant, par exemple, l'électrophorèse bidimensionnelle couplée à la spectrométrie de masse. En parallèle, il serait également important d'étudier le rôle joué par les mannoprotéines levuriennes dans les propriétés moussantes d'un vin (cette thématique fait l'objet d'une thèse qui vient de débiter au sein du laboratoire d'œnologie ; thèse de C. Cilindre).

On sait que les colloïdes d'un vin subissent de nombreuses modifications ; dégradation ou insolubilisation des macromolécules provenant du raisin (Doco et al., 2003 ; Fukui et Yokotsuka, 2003) et relargage de mannoprotéines levuriennes lors de la fermentation alcoolique (Llaubères et al., 1987 ; Waters et al., 1994a) ou lors des phénomènes d'autolyse (Leroy et al., 1990 ; Docco et al., 2003). Cependant, la plupart des données restent contradictoires dans la quantification de ces composés. Il serait intéressant de mettre à profit

Conclusion générale et perspectives

les anticorps spécifiques que nous avons produit et qui sont dirigés contre ces composés (Dambrouck et al., 2003) et de mettre en place une technique immunospécifique afin de quantifier et de suivre leur évolution tout au long du schéma de vinification.

Un autre microorganisme *Botrytis cinerea*, agent pathogène de la pourriture grise, apparaît comme très intéressant et, notamment, l'implication qu'il peut avoir sur la qualité d'un vin. En effet, si les conséquences œnologiques de la pourriture grise ont été étudiées (pour une revue de la littérature voir Donèche, 1993 ; Marchal et al., 1998 et Jeandet et al., 1999), l'influence de *B. cinerea* sur les propriétés d'un Champagne sont, en revanche, moins bien connues même si des travaux réalisés au sein de notre laboratoire ont démontré l'impact très négatif de ce microorganisme sur le vin (Marchal et al., 2001). En effet, *B. cinerea* est capable, lors d'une contamination élevée, de dégrader fortement les protéines végétales d'un moût et de les remplacer par ses propres protéines (Marchal et al., 1998). De plus, la contamination de raisins par *B. cinerea* conduit à des vins dont les propriétés moussantes sont fortement altérées (Marchal et al., 2001).

La caractérisation des macromolécules secrétées par ce champignon pourrait être abordée, de nouveau, par l'utilisation d'une approche de type protéomique.

Dans ce cadre, un travail est en cours de réalisation au sein de notre laboratoire et porte sur la caractérisation de l'activité protéasique de ce champignon (Etude réalisée par M. Warchol et C. Cilindre).

Cette étude pourrait également rebondir sur les PR-protéines, défenses mises en place par le raisin en réponse à ce microorganisme pathogène.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

A

Akiyama Y., Mori M. et Kato K., (1980), "C-NMR analysis of hydroxyproline arabinoside from *Nicotiana tabacum*." *Agric. Food Chem.*, **44**, 2487-2489.

Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K. et Watson J.D., (1986), "Biologie moléculaire de la cellule.", (2^{ième} édition). Médecine-Sciences, Flammarion, Paris.

Allen A.K., Desai N.N., Neuberger A. et Creeth J.M., (1978), "Properties of potato lectin and the nature of its glycoprotein linkages." *Biochem J.*, **171**, 665-74.

Altmann F. et März L., (1995), "Processing of asparagine-linked oligosaccharides in insect cells. Evidence for α -mannosidase II." *Glycoconj. J.*, **12**, 150-155.

Andrés-Lacueva C., Gallard M., Lopez-Tamames E. et Lamuela-Raventos R.M., (1996), "Influence of variety and ageing on foaming properties of sparkling wine (cava)." *J. Agric. Food Chem.*, **44**, 3826-3829.

Arai M., Mori H. et Imaseki H., (1991), "Roles of sucrose-metabolizing enzymes in growth of seedlings. Purification of acid invertase from growing hypocotyls of mung bean seedlings." *Plant Cell Physiol.*, **32**, 1291-1298.

Arnold W., (1965), " β -fructofuranosidase from grape berries." *Biochim. Biophys. Acta*, **110**, 134-147.

Ashford D., Desai N.N., Allen A.K., Neuberger A., O'Neill M.A. et Selvendran R.R., (1982), "Structural studies of the carbohydrate moieties of lectins from potato (*Solanum tuberosum*) tubers and thorn-apple (*Datura stramonium*) seeds." *Biochem J.*, **201**, 199-208.

B

Balestrini R., Romera C., Puigdomenech P. et Bonfante P., (1994), "Location of cell-wall hydroxyprolin-rich glycoprotein, cellulose and β -1,3-glucans in apical and differentiated regions of maize mycorrhizal roots." *Planta*, **195**, 201-209.

Barbaric S., Kozulic B., Ries B. et Midler P., (1984), "Physicochemical and kinetic properties of acid phosphatase from *Saccharomyces cerevisiae*." *J. Biol. Chem.*, **259**, 878-883.

Bause E. et Lehle L., (1979), "Enzymatic N-glycosylation and O-glycosylation of synthetic peptide acceptors by dolichol-linked sugar derivatives in yeast." *Eur. J. Biochem.*, **101**, 531-540.

Bayly F.C. et Berg H.W., (1967), "Grape and wine proteins of white wine varieties." *Am. J. Enol. Vitic.*, **24**, 18-32.

Bednarek S.Y. et Raikhel N.V., (1992), "Intracellular trafficking of secretory proteins." *Plant Mol. Biol.*, **32**, 133-155.

Behalova B. et Beran K., (1979), "Activation of proteolytic enzymes during autolysis of disintegrated baker's yeast." *Folia Microbiol (Praha)*, **24**, 455-461.

Benhamou N., Genier J. et Chrispeels M.J., (1991), "Accumulation of β -fructosidase in the cell walls of tomato roots following infection by a fungal wilt pathogène." *Plant Physiol.*, **97**, 739-750.

Berthier L., Marchal R., Debray H., Bonnet E., Jeandet P. et Maujean A., (1999), "Isolation of isolectins from *Vitis vinifera* L. Cv. Chardonnay grape berries." *J. Agric. Food Chem.*, **47**, 2193-2197.

Références Bibliographiques

Berthier L., (1999), "Contribution à l'étude des protéines des moûts et des vins de Champagne : Purification d'une lectine végétale et d'une protéine levurienne." Thèse de Doctorat, Université de Reims.

Blobel G., (1980), "Intracellular protein topogenesis." *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **77**, 1496-1500.

Bollini R., Vitale A. et Chrispeels M.J., (1983), "In vivo and in vitro processing of seed reserve protein in the endoplasmic reticulum : evidence for two glycosylation steps." *J. Cell Biol.*, **96**, 999-1007.

Bollini R., Ceriotti A., Daminati M.G. et Vitale A., (1985), "Glycosylation is not needed for the intracellular transport of phytohemagglutinin in developing *Phaseolus vulgaris* cotyledons and for the maintenance of its biological activities." *Physiol. Plant*, **65**, 15-22.

Bourney A.S., Hedley P.E., Maddison A., Waugh R. et Machray G.C., (1996), "Exon skipping induced by cold stress in a potato invertase gene transcript." *Nucleic Acids Res.*, **24**, 2347-2351.

Bradford M.M., (1976), "A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254.

Bradley D.J., Kjellbom P. et Lamb C.J., (1992), "Elicitor- and wound-induced oxidative cross-linking of a proline-rich plant cell wall protein : a novel, rapid defence response." *Cell*, **70**, 21-30.

Brillouet J.M., Bosso C. et Moutounet M., (1990), "Isolation, purification and characterization of an arabinogalactan from a red wine." *Am. J. Enol. Vitic.*, **41**, 29-36.

Brisson L.F., Tenhaken R. et Lamb C., (1994), "Function of Oxidative Cross-Linking of Cell Wall Structural Proteins in Plant Disease Resistance." *Plant Cell*, **6**, 1703-1712.

Références Bibliographiques

Brissonnet F. et Maujean A., (1991), "Identification of some foam-active compounds in champagne base wine." *Am. J. Enol. Vitic.*, **44**, 97-102.

Brissonnet F., (1992), "Identification de composés mousse-actifs des vins de Champagne.", Thèse de Doctorat, Université de Reims.

Brissonnet F. et Maujean A., (1993), "Characterisation of foaming proteins in a champagne base wine." *Am. J. Enol. Vitic.*, **44**, 297-301.

C

Caelles C., Delseny M. et Puigdomenech P., (1992), "The hydroxyproline-rich glycoprotein gene from *Oryza sativa*." *Plant Mol Biol.*, **18**, 617-9.

Canals J.M., Arola L. et Zamora F., (1998), "Proteins fraction analysis of white wine by FPLC." *Am. J. Enol. Vitic.*, **49**, 383-388.

Charpentier C. et Feuillat M., (1993), "Yeast autolysis." In "*Wine: Microbiology and biotechnology*", Fleet G. H., Ed. Harwood Academic Publisher: Chur, Switzerland, 225-242.

Charpentier C., (1998), "Les protéines." In "*Œnologie – Fondements scientifiques et technologiques.*", Flanzy C., Ed. Tech & Doc, Lavoisier, Paris, 99-107.

Casey J.A., (1988), "Bubble size, bubble frequency and rate of gas loss in sparkling wine." *The Australian Grapegrower & Winemaker*, July, 19-22.

Chen J. et Varner J.E., (1985), "Isolation and characterization of cDNA clones from carrot extensin and proline-rich 33-kDa protein." *Proc. Natl. Acad. U.S.A.*, **82**, 4399-4403.

Chin C.K. et Weston G.D., (1973), "Distribution in excised *Lycopersicon esculentum* roots of the principal enzymes involved in sucrose metabolism." *Phytochem.*, **12**, 1229-1235.

Références Bibliographiques

Clarke A.E., Anderson R.L. et Stone B.A., (1979), "Form and fonction of arabinogalactans and arabinogalactan-proteins." *Phytochem.*, **18**, 521-540.

Coombe B.G., (1989), "The grape berry as a sink." *Acta Hortic.*, **29**, 149-158.

Coombe B.G., (1992), "Research on development and ripening of the grape berry.", *Am. J. Enol. Vitic.*, **43**, 101-110.

D

Dambrouck T., Marchal R., Marchal-Delahaut L., Parmentier M., Maujean A. et Jeandet P., (2003), "Immunodetection of proteins from grapes and yeast in a white wine." *J. Agric. Food Chem.*, **51**, 2727-2732.

Datta K., Schmidt A., Marcus A., (1989), "Characterization of two soybean repetitive proline-rich proteins and a cognate cDNA from germinated axes.", *Plant Cell*, **1**, 945-952.

Datta K. et Marcus A., (1990), "Nucleotide sequence of a gene encoding soybean repetitive proline-rich protein 3.", *Plant Mol Biol.*, **14**, 285-286.

Davies C. et Robinson S.P., (1996), "Sugar accumulation in grape berries. Cloning of two putative vacuolar invertase cDNAs and their expression in grapevine tissues." *Plant Physiol.*, **111**, 275-283.

Davies C. et Robinson S.P., (2000), "Differential screening indicates a dramatic change in mRNA profiles during grape berry ripening. Cloning and characterization of cDNAs encoding putative cell wall and stress response proteins." *Plant Physiol.*, **122**, 803-812.

Dean N., (1999), "Asparagine-linked glycosylation in the yeast golgi." *Biochim. Biophys. Acta*, **1426**, 309-322.

Références Bibliographiques

Doco T., Vuchot P., Cheynier V. et Moutounet M., (2003), "Structural modification of wine arabinogalactans during aging on lees." *Am. J. Enol. Vitic.*, **54**, 150-157.

Dolan L., Linstead P. et Roberts K., (1995), "An AGP epitope distinguishes a central metaxylem initial from other vascular initials in the *Arabidopsis* root." *Protoplasma*, **189**, 149-155.

Donèche B., (1993), "Botrytized wines." In : "Wine microbiology and biotechnology.", Fleet G. H., Ed. Harwood Academic Publisher: Chur, Switzerland, 327-351.

Dupin I., McKinnon B.M., Strockdale V. J., Ryan C., Boulay M., Markides A. J., Jones G. P., Williams P. J. et Waters E. J., (2000), "*Saccharomyces cerevisiae* mannoproteins that protect wine from protein haze: Their release during fermentation and lees contact and a proposal for their mechanism of action." *J. Agric. Food Chem.*, **48**, 3098-3105.

During H. et Alleweldt G., (1984), "Zür möglichen bedeutung der auscisinsäure bei der zückereinlagerung in de weinbeere." *Ver. Deutsch. Bot. Ges.*, **97**, 101-113.

E

Egertsdotter U. et von Arnold S., (1995), "Importance of arabinogalactan proteins for the development of somatic embryos of Norway spruce (*Picea abies*)." *Physiologia Plantarum*, **93**, 334-345.

Ehness R. et Roitsch T., (1997), "Co-ordinated induction of mRNAs for extracellular invertase and a glucose transporter in *Chenopodium rubrum* by cytokinins." *Plant J.*, **11**, 539-548.

Ettlinger C., Schindler J. et Lehle L., (1986), "Cell-cycle arrest of plant suspension cultures by tunicamycin." *Planta*, **168**, 101-105.

F

Faye L., Berjonneau C. et Rollin P., (1981), "Studies on β -fructosidase from radish seedlings. I. Purification and partial characterization." *Plant Sci. Letters*, **22**, 77-87.

Faye L et Chrispeels M.J., (1987), "Transport and processing of the glycosylated precursor of concanavaline A in jack-bean." *Planta*, **170**, 217-224.

Farias, M.E. et Manca de Nadra M.C., (2000), "Purification and partial characterisation of *Oenococcus oeni* exoprotease." *FEMS Microbiol. Lett.*, **185**, 263-266.

Ferreira R.B., Monteiro S., Piçarra-pereira M. A., Tanganho M. C., Loureiro V. B. et Teixeira A. R., (2000), "Characterization of the proteins from grapes and wines by immunological methods." *Am. J. Enol. Vitic.*, **51**, 22-28.

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." *Bull. O.I.V.*, **111**, 36-45.

Fitchette-Lainé A.C., Gomord V., Cabanes M., Michalski J.C., Saint-Macary M., Foucher B., Cavelier B., Hawes C., Lerouge P. et Faye L., (1997), "N-glycans harboring the lewis a epitope are expressed at the surface of plant cells." *Plant J.*, **12**, 1411-1417.

Fincher G.B., Stone B.A. et Clarke A.E., (1983), "Arabinogalactan-proteins : structure, biosynthesis and function." *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **34**, 47-70.

Freund J., (1956), "The method of action of immunologic adjuvant." *Adv. Tuberculosis Res.*, **7**, 130-148.

Frevert J. and Ballou C.E., (1985), "*Saccharomyces cerevisiae* structural cell wall mannoprotein." *Biochemistry*, **24**, 753-759.

Fukui M. et Yokotsuka K., (2003), "Content and origin of protein in white and red wines : Changes during fermentation and maturation." *Am. J. Enol. Vitic.*, **54**, 178-188.

G

Galili G., Sengupta-Gopalan C. et Ceriotti A., (1998), "The endoplasmic reticulum of plant cells and its role in protein maturation and biogenesis of oil bodies." *Plant Mol Biol.*, **38**, 1-29.

Gallagher J.A. et Pollock C.J., (1998), "Isolation and characterization of a cDNA clone from *Lolium temulentum* L. encoding for sucrose hydrolytic enzyme which shows alkaline/neutral invertase activity." *J. Exp. Bot.*, **49**, 789-795.

Gascon S., Norbert P., Neumann N.P. et Lampen J.O., (1968), "Comparative study of the properties of the purified internal and external invertases from yeast." *Biol. Chem.*, **243**, 1573-1577.

Geissmann M., Frey T. et Ruffner H.P. (1991), "Occurrence and properties of acid invertase in cultures of *botrytis cinerea*." *Mycol. Res.*, **95**, 1321-1327.

Gemmill T.R. et Trimble R.B., (1999), "Overview of N- and O-linked oligosaccharide structures found in various yeast species." *Biochim. Biophys. Acta*, **1426**, 227-237.

Gerbaud V., Gabas N., Bloiun J., Pellerin P. et Moutounet M., (1997), "Influence of wine polysaccharides and polyphenols on the crystallisation of potassium hydrogen tartrate." *J. Int. Sci. Vigne Vin.*, **31**, 65-83.

Gibeaut J.A., Karuppiyah N., Chang S.-R., Brock T.G., Vadlamudi B., Kim D., Ghoshed N.S., Rayle D.L., Carpita N.C. et Kaufman P.B., (1990), "Cell wall and enzyme changes during greivresponse of the leaf-sheat pulvinus of oat (*Avena sativa*)." *Plant Physiol.*, **94**, 411-416.

Références Bibliographiques

Godt D.E. et Roitsch T., (1997), "Regulation and tissue-specific distribution of mRNAs for three extracellular invertase isoenzymes of tomato suggest an important function in establishing and maintaining sink metabolism." *Plant Physiol.*, **115**, 273-282.

Gougeon R.D., Reinholdt M., Delmotte L., Mische-Brendle J., Chézeau J.M., Le Dred R., Marchal R. et Jeandet P., (2002), "Direct observation of polylysine side-chain interaction with clay interlayer surfaces through ^1H - ^{27}Al heteronuclear correlation nuclear magnetic resonance spectroscopy." *Langmuir, the American Chemical Society Journal of Surfaces and Colloids*, **18**, 3396-3398.

Gougeon R.D., Soulard M., Reinholdt M., Mische-Brendle J., Chézeau J.M., Le Dred R., Marchal R. et Jeandet P., (2003), "Polypeptide adsorption onto a synthetic montmorillonite: A combined solid-state nuclear magnetic resonance, X-ray diffraction, thermal analysis and N_2 adsorption study." *Eur. J. Inorg. Chem.*, **7**, 1366-1372.

Greiner S., Krausgrill S. et Rausch T., (1998), "Cloning of a tobacco apoplasmic invertase inhibitor." *Plant Physiol.*, **116**, 733-742.

H

Harvey D.J., (1993), "Quantitative aspects of the matrix-assisted laser desorption mass spectrometry of complex oligosaccharides." *Rapid Comm. Mass Spectrom.*, **7**, 614-619.

Hashizume H., Tanase K., Mori H. et Yamaki S., (2003), "Purification and characterization of two soluble acid invertase isozymes from Japanese pear fruit." *Phytochem.*, **63**, 125-129.

Hasilik A. et Tanner W., (1987), "Carbohydrate moiety of carboxypeptidase Y and perturbation of its biosynthesis." *Eur. J. Biochem.*

Hawker J.S., (1969a), "Changes in the activities of enzymes concerned with sugar metabolism during the development of grape berries." *Phytochemistry*, **8**, 9-17.

Hawker J.S., (1969b), "Insoluble invertase from grapes : an artefact of extraction." *Phytochemistry*, **8**, 337-344.

Herscovics A. et Orlean P., (1993), "Glycoprotein biosynthesis in yeast." *FASEB J.*, **7**, 540-550.

Hsu J.C. et Heatherbell D.A., (1987 a), "Isolation and characterization of soluble proteins in grape, grape juice, and wine." *Am. J. Enol. Vitic.*, **38**, 6-10.

Hsu J.C. et Heatherbell D.A., (1987 b), "Heat-unstable proteins in wine. I. Characterization and removal by bentonite fining and heat treatment." *Am. J. Enol. Vitic.*, **38**, 11-16.

I

Ishikawa N., Nakagawa H. et Ogura N., (1989), "Isoforms of invertase in grape berries." *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 837-838.

J

Jeandet P., Vasserot Y., Marchal R., Maujean A., Adrian M., Breuil A.C. et Bessis R., (1999), "Interaction entre la vigne et *Botrytis cinerea* : aspects phytopathologiques et œnologiques." *Rev. Fr. Oenol.*, **177**, 19-22.

Jensen O.N., Wilm M., Shevchenko A. et Mann M., (1997), "Protein Structure. A practical approach." Creighton T.E. ed., 29-57. IRL Press, Oxford.

Jensen O.N., Shevchenko A. et Mann M., (1999), "Methods in molecular biology. 2-D proteome analysis protocols." Humana Press, Totowa, NJ, **112**, 513-530.

Références Bibliographiques

Jigami Y. et Odani T., (1999), "Mannosylphosphate transfer to yeast mannan." *Biochim. Biophys. Acta*, **1426**, 335-345.

John M.E. et Keller G., (1995), "Characterization of mRNA for a proline-rich protein of cotton fiber." *Plant Physiol.*, **108**, 669-676.

Johnson K.D. et Chrispeels M.J., (1987), "Substrate specificities of N-acetylglucosaminyl-, fucosyl-, and xylosyltransferases that modify glycoproteins in the Golgi apparatus of bean cotyledons." *Plant Physiol.*, **84**, 1301-1308.

K

Kaushal G., Pastuszak I., Hatanaka K.I. et Elbein A.D., (1990a), "Purification to homogeneity and properties of glucosidase II from mung bean seedlings and suspension-cultured soybean cells." *J. Biol. Chem.*, **265**, 16271-16279.

Kaushal G., Szumilo T., Pastuszak I. et Elbein A.D., (1990b), "Purification to homogeneity and properties of mannosidase II from mung bean seedlings." *Biochem.*, **29**, 2168-2176.

Kieliszewski M., de Zacks R., Leykam J.F. et Lamport D.T.A., (1992), "A repetitive proline-rich protein from the gymnosperm Douglas Fir is a hydroxyproline-rich glycoprotein." *Plant Physiol.*, **98**, 919-926.

Kieliszewski M.J., Showalter A.M. et Leykam J.F., (1994), "Potato lectin : a modular protein sharing sequence similarities with the extensin family, the hevein lectin family, and snake venom disintegrins (platelet aggregation inhibitors)." *Plant J.*, **5**, 849-861.

Kieliszewski M.J., (2001), "Molecules of interest : The latest hype on Hyp-O-glycosylation codes." *Phytochem.*, **57**, 319-323.

Kliwer W.M., (1965), "Change in concentration of glucose, fructose, and total soluble solids in flowers and berries of *Vitis vinifera*." *Am. J. Enol. Vitic.*, **16**, 101-110.

Klionsky D.J., Banta L.M. et Emr S.D., (1988), "Intracellular sorting and processing of a yeast vacuolar hydrolase : proteinase A propeptide contains vacuolar targeting information." *Mol. Cell Biol.*, **8**, 2105-2116.

Klis F.M., (1994), "Review: cell wall assembly in yeast." *Yeast*, **10**, 851-869.

Kolarich D. et Altmann F., (2000), "N-glycan analysis by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of electrophoretically separated nonmammalian proteins : Application to peanut allergen ara h 1 and olive pollen Ole e 1." *Anal. Biochem.*, **285**, 64-75.

Konno Y., Vedwick T., Fitzmaurice L. et Mirkov T.E., (1993), "Purification, characterization, and subcellular localization of soluble invertase from tomato fruit." *J. Plant Physiol.*, **141**, 385-392.

Kornfeld R. et Kornfeld S., (1985), "Assembly of asparagine-linked oligosaccharides." *Annu. Rev. Biochem.*, **54**, 631-664.

Kozulic B., Barbaric S., Ries B. et Mildner P., (1984), "Study of the carbohydrate part of yeast acid phosphatase." *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **122**, 1083-1090.

Kratzer R., Eckerskorn C., Karas M. et Lottspeich F., (1998), "Suppression effects in enzymatic peptide ladder sequencing using ultraviolet-matrix assisted laser desorption/ionization-mass spectrometry." *Electrophoresis*, **19**, 1910-1919.

Krause E., Wenschuh H. et Jungblut P.R., (1999), "The dominance of arginine-containing peptides in MALDI-derived tryptic mass fingerprints of proteins." *Anal. Chem.*, **71**, 4160-4165.

Kreuger M. et van Holst G.J., (1993), " Arabinogalactan proteins are essential in somatic embryogenesis of *Daucus carota*." *Planta*, **189**, 243-248.

Références Bibliographiques

Kreuger M. et van Holst G.J., (1996), "Arabinogalactan proteins and plant differentiation." *Plant Mol Biol.*, **30**, 1077-1086.

Krishnan H.B. et Pueppke S.G., (1990), "An abundant cell-wall polypeptide from cherry fruits has antigenic homology to carrot β -fructosidase." *J. Plant Physiol.*, **137**, 190-195.

Küster B., Wheeler S.F., Hunter A.P., Dwek R.A. et Harvey D.J., (1997), "Sequencing of N-linked oligosaccharides directly from protein gels : In-gel deglycosylation followed by matrix-assisted laser desorption/ionisation mass spectrometry and normal-phase high-performance liquid chromatography." *Anal. Biochem.*, **250**, 82-101.

Küster B., Hunter A.P., Wheeler S.F., Dwek R.A. et Harvey D.J., (1998), "Structural determination of N-linked carbohydrates by matrix-assisted laser desorption/ionisation-mass spectrometry following enzymatic release within sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide electrophoresis gels : Application to species-specific glycosylation of α_1 -acid glycoprotein." *Electrophoresis*, **19**, 1950-1959.

L

Laemmli U.K., (1970), "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of Bacteriophage T4." *Nature*, **227**, 680-685.

Langan K.J. et Nothnagel E.A., (1997), "Cell surface arabinogalactan-proteins and their relation to cell proliferation and viability." *Protoplasma*, **196**, 87-98.

Lamport D.T.A., Katoma L. et Roerig S., (1973), "Galactosylserine in extensin." *Biochem. J.*, **133**, 125-132.

Ledoux V., Dulau L. et Dubourdiou D., (1992), "Interprétation de l'amélioration de la stabilité protéique des vins au cours de l'élevage sur lies. (An explanation for the improvement of protein stability of wines during aging on yeast lees)." *J. Int. Sci. Vigne Vin.*, **26**, 239-251.

Le Meste M., Colas B., Simatos D., Closs B., Courthaudon J.L. et Lorient D., (1990), "Contribution of protein flexibility to the foaming properties of casein." *J. Food Sci.*, **55**, 1445-1447.

Leroy M.J., Charpentier M., Duteurtre B., Feuillat M. et Charpentier C., (1990), "Yeast autolysis during Champagne aging." *Am. J. Enol. Vitic.*, **41**, 21-28.

Lerouge P., Fichette-Laine A.C., Chekkafi A., Avidgor V. et Faye L., (1996), "N-linked oligosaccharide processing is not necessary for glycoprotein secretion in plants." *Plant J.*, **10**, 713-719.

Lerouge P., Cabanes-Macheteau M., Rayon C., Fichette-Lainé A.C., Gomord V. et Faye L., (1998), "N-glycoprotein biosynthesis in plants : recent developments and future trends." *Plant Mol. Biol.*, **38**, 31-48.

Li X.-B., Kieliszewski M. et Lamport D.T.A., (1990), "A chenopod extensin lacks repetitive tetrahydroxyproline blocks." *Plant Physiol.*, **92**, 327-333.

Liger-Belair G., Marchal R., Robillard B., Vignes-Adler M., Maujean A. et Jeandet P., (1999), "Study of effervescence in a glass of Champagne: Frequency of bubble formation, growth rates and velocities of rising bubbles." *Am. J. Enol. Vitic.*, **50**, 317-323.

Liger-Belair G., Marchal R., Robillard B., Dambrouck T., Maujean A., Vignes-Adler M., et Jeandet P., (2000), "On the velocity of expanding spherical gas bubbles rising in line in supersaturated hydroalcoholic solutions: Application to bubble trains in carbonated beverages." *Langmuir, The American Chemical Society journal of Colloids and Surfaces*, **16**, 1889-1895.

Lipke P.N. et Kurjan J., (1992), " Sexual agglutination in budding yeasts : Structure, function, and regulation of adhesion glycoproteins." *Microbiol. Rev.*, **56**, 180-194.

Llaubères R.M., Dubourdieu D. et Villetaz J.C., (1987), "Exocellular polysaccharides from *Saccharomyces* in wine." *J. Sci. Food Agric.*, **41**, 277-280.

López-Barajas M., López-Tamames E., Buxaderas S. et De La Torre-Boronat M.C., (1998), "Effect of vinification and variety on foam capacity of wine." *Am. J. Enol. Vitic.*, **49**, 397-402.

Lubbers S., Leger B., Charpentier C. et Feuillat M., (1993), "Effet colloïde-protecteur d'extrait de parois de levures sur la stabilité tartrique d'une solution hydro-alcoolique modèle." *J. Int. Sci. Vigne Vin*, **27**, 13-22.

Lubbers S., Charpentier C., Feuillat M. et Voilley A., (1994), "Influence of yeast walls on the behavior of aroma compounds in amodel base wine." *Am. J. Enol. Vitic.*, **45**, 29-33.

Lugera C., Moreno-Arribas V., Pueyo E., Bartolomé B. et Polo M.C., (1998), "Fractionation and partial characterization of protein fractions present at different stages of the production of sparkling wines." *Food Chem.*, **63**, 465-471.

M

Malvy J., Robillard B. et Duteutre B., (1994), "Influence des protéines sur le comportement de la mousse des vins de champagne." *Sciences des Aliments*, **14**, 87-98.

Manca de Nadra M.C., Farias M.E., Moreno-Arribas V., Pueyo E. et Polo M.C., (1999), "A proteolytic effect of *Oenococcus oeni* on the nitrogenous macromolecular fraction of red wine." *FEMS Microbiology Letters*, **174**, 41-47.

Manteau S., Lambert B., Jeandet P. et Legendre L., (2003), "Changes in chitinase and thaumatin-like pathogenesis-related proteins of grape berries during the Champagne winemaking process." *Am. J. Enol. Vitic.*, **45**, 267-272.

Marchal R., (1995), "Contribution à l'étude des propriétés moussantes des vins de Champagne. Etude quantitative et qualitative des protéines des moûts et des vins de base champenois." Thèse de Doctorat, Université de Reims.

Références Bibliographiques

Marchal R., Bouquelet S. et Maujean A., (1996), "Purification and partial biochemical characterization of glycoproteins in a champenois chardonnay wine." *J. Agric. Food Chem.*, **44**, 1716-1722.

Marchal R., Seguin V. et Maujean A., (1997), "Quantification of interferences in the direct measurement of proteins in wines from the champagne region using the Bradford method." *Am. J. Enol. Vitic.*, **48**, 303-309.

Marchal R., Berthier L., Legendre L., Marchal-Delahaut L., Jeandet P. et Maujean A., (1998), "Effects of *Botrytis cinerea* infection on the must protein electrophoresis characteristics." *J. Agric. Food Chem.*, **46**, 4945-4949.

Marchal R., Valade M., Moncomble D., Tabary I., Viaux L., Robillard B. et Jeandet P., (2001), "Effects of *Botrytis cinerea* infection on Champagne wine foaming properties." *J. Sci. Food Agric.*, **81**, 1371-1378.

Marchal R., Chaboche D., Douillard R. et Jeandet P., (2002), "Influence of lysozyme treatments on Champagne base wine foaming properties." *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 1420-1428.

Margolis H.C., Nakagawa Y., Douglas K.T. et Kaiser E.T., (1978), "Multiple forms of carboxypeptidases Y from *Saccharomyces cerevisiae*." *J. Biol. Chem.*, **253**, 7891-7897.

Maujean A., Poinssaut P., Dantan H., Brissonnet F. et Cossiez E., (1990), "Etude de la teneur et de la qualité de mousse des vins effervescents. II. Mise au point d'une technique de mesure de la moussabilité, de la tenue et de la stabilité de la mousse des vins effervescents." "Study of the performance and quality of the foam in sparkling wines. II. Perfecting of a measuring technique for foaming ability performance and stability of the foam in sparkling wines." *Bull. O.I.V.*, **63**, 405-427.

Maujean A., Brun O., Vesselle G. et Sugot O., (1987), "Etude de la maturation des cépages champenois. Equation mathématique de l'accumulation des sucres dans la baie de raisin." "Study of the maturity of Champagne vine variety. Mathematical equation of sugar

Références Bibliographiques

accumulation in the grape berry. Application for the estimate of cumulative sugar at the date of the vine harvest." *Bull. O.I.V.*, **60**, 27-35.

Mellon J.E. et Helgeson J.P., (1982), "Interaction of a Hydroxyproline-rich glycoprotein from tobacco callus with potential pathogens." *Plant Physiol.*, **70**, 401-405.

Melo N.S., Nimtz M., Conradt H.S., Fevereiro P.S. et Costa J., (1997), "Identification of the human Lewis^a carbohydrate motif in a secretory peroxydase from a plant cell suspension culture (*Vaccinium myrtillus* L.)." *FEBS Lett.*, **415**, 186-191.

Millar D.J., Slabas A.R., Sidebottom C., Smith C.G., Allen A.K. et Bolwell G.P., (1992 a), "A major stress-inducible M_r-42 000 wall glycoprotein of French bean (*Phaseolus vulgaris* L.)." *Planta*, **187**, 176-184.

Millar D.J., Allen A.K., Smith C.G., Sidebottom C., Slabas A.R. et Bolwell G.P., (1992 b), "Chitin-binding proteins in potato (*Solanum tuberosum* L.) tuber. Characterization, immunolocalization and effects of wounding." *Biochem J.*, **283**, 813-821.

Miller G.L., (1959), "Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar." *Anal. Chem.*, **31**, 426-428.

Moine-Ledoux V., Perrin A., Paladin I. et Dubourdieu D., (1997), "First results of tartaric stabilisation by adding mannoproteins (Mannostab)." *J. Int. Sci. Vigne Vin.*, **31**, 23-31.

Moine-Ledoux V. et Dubourdieu D., (1999), "An invertase fragment responsible for improving the protein stability of dry white wines." *J. Sci. Food Agric.*, **79**, 537-543.

Monteiro S., Piçarra-Perreira M. A., Tanganho M. C., Rente J. P., Loureiro V. B., Teixeira A. et Ferreira R. B., (1999), "Preparation of polyclonal antibodies specific for wine proteins." *J. Sci. Food Agric.*, **79**, 772-778.

Références Bibliographiques

Monteiro S., Piçarra-Perreira M. A., Mesquita P. R., Loureiro V. B., Teixeira A. et Ferreira R. B., (2001), "The wide diversity of structurally similar wine proteins." *J. Agric. Food Chem.*, **49**, 3999-4010.

Moore P.J., Swords K.M.M., Lynch M.A. et Staehelin L.A., (1991), "Spatial organisation of the assembly pathway of glycoproteins and complex polysaccharides in the Golgi apparatus of plant." *J. Cell Biol.*, **112**, 589-602.

Moreno-Arribas V., Pueyo E., Nieto F.J., Martín-Álvarez P.J. et Polo M.C., (2000), "Influence of the polysaccharides and the nitrogen compounds on foaming properties of sparkling wines." *Food Chem.*, **70**, 309-317.

Moreno-Arribas V., Pueyo E. et Polo M.C., (2002), "Analytical methods for the characterization of proteins and peptides in wines." *Anal. Chim. Acta*, **458**, 63-75.

Morris D.A. et Arthur E.D., (1984), "Invertase activity, carbohydrate metabolism and cell expansion in the stem of *Phaseolus vulgaris* L." *J. Exp. Bot.*, **36**, 623-633.

Morris D.A. et Arthur E.D., (1985), "Invertase and auxin-induced elongation in internodal segments of *Phaseolus vulgaris*." *Phytochem.*, **23**, 2163-2167.

Mortz E., Sareneva T., Haebel S., Julkunen I. et Roepstorff P., (1996), "Mass spectrometric characterization of glycosylated interferon- γ variants separated by gel electrophoresis." *Electrophoresis*, **17**, 925-931.

Mullins M.G., Bouquet A. et Williams L.E., (1992), "Biology of the grapevine." Cambridge University Press, Cambridge.

N

Nakanishi K. et Yokotsuka K., (1990), "Characterization of thermostable invertase from wine grapes." *J. Ferment. Bioeng.*, **1**, 16-22.

Nakanishi K., Wu W. et Yokotsuka K., (1991), "Purification and some properties of thermostable invertase from wine." *J. Ferment. Bioeng.*, **1**, 66-68.

O

Ohyama A., Ito H., Sato T., Nishimura S., Imai T. et Hirai M., (1995), "Suppression of acid invertase activity by antisens RNA modifies the sugar composition of tomato fruit." *Plant Cell Physiol.*, **36**, 369-376.

Ohyama Y., Kasai K., Nomoto H. et Inoue Y., (1985), « Frontal affinity chromatographie of ovalbumin glycoasparagines on a Concanavaline A-sepharose column." *J. Biol. Chem.*, **260**, 6882-6887.

Oxley D., Munro S.L.A., Craik D.J. et Bacic A., (1996), "Structure of N-glycans on the S₃- and S₆- allele stylar self-incompatibility ribonucleases of *Nicotiana glauca*." *Glycobiology*, **6**, 611-618.

P

Packer H.N., Margaret A.L., Jardine D.R. et Redmond J.W., (1998), "A general approach to desalting oligosaccharides released from glycoproteins." *Glycoconjugate J.*, **15**, 563-570.

Paetzold M., Dulau L. et Dubourdieu D., (1990), "Fractionnement et caractérisation des glycoprotéines dans les moûts de raisins blancs." *J. Int. Sci. Vigne Vin.*, **24**, 13-28.

Pagny S., Denmat-Ouisse L.A., Gomord V. et Faye L., (2003), "Fusion with HDEL protects cell wall invertase from early degradation when N-glycosylation is inhibited." *Plant Cell Physiol.*, **44**, 173-182.

Références Bibliographiques

Pellerin P., Vidal S., Williams P. et Brillouet J.M., (1995), "Characterization of five type II arabinogalactan-protein complexes from red wine with increasing uronic acid content." *Carbohydr. Res.*, **277**, 135-143.

Pellerin P. et Cabanis J.C., (1998), "Les glucides." In "Œnologie – Fondements scientifiques et technologiques.", Flanzky C., Ed. Tech & Doc, Lavoisier, Paris, 40-92.

Pennell R.I., Knox J.P., Scofield G.N., Selvendran R.R. et Roberts K., (1989), "A family of abundant plasma membrane-associated glycoproteins related to the arabinogalactan proteins is unique to flowering plants." *J. Cell Biol.*, **108**, 1967-1977.

Pérez F.J. Gomez M., (2000), "Possible role of soluble invertase in the gibberellic acid berry-sizing effect in Sultana grape." *Plant Growth Regul.*, **30**, 111-116.

Péron N., Cagna A., Valade M., Marchal R., Maujean A., Robillard B., Aguié-Béghin V. et Douillard R., (2000), "Characterization by drop tensiometry and by ellipsometry of the adsorption layer formed at the air/Champagne wine interface." *Adv. Colloid Interface Sci.*, **88**, 19-36.

Pocock K.F., Hayasaka Y., Peng Z., Williams P.J. et Waters E.J., (1998), "The effect of mechanical harvesting and long-distance transport on the concentration of haze-forming proteins in grape juice." *Austr. J. Grape Wine Res.*, **4**, 23-29.

Pocock K.F., Hayasaka Y., McCarthy M.G. et Waters E.J., (2000), "Thaumatococcus-like proteins and chitinases, the haze-forming proteins of wine, accumulate during ripening of grape (*Vitis vinifera*) berries and drought stress does not affect the final levels per berry at maturity." *J. Agric. Food Chem.*, **48**, 1637-1643.

Porntaveewat W., Takayanagi T. et Yokotsuka K., (1994), "Purification and properties of invertase from Muscat Bailet A grapes." *J. Ferment. Bioeng.*, **4**, 288-292.

Priem B., Solo-Kwan J., Wieruszkeski J.M., Strecker G., Nazih H. et Morvan H., (1990a), "Isolation and characterization of free N-glycans of the oligomannoside type from the extracellular medium of a plant cell suspension." *Glycoconjugate J.*, **7**, 121-132.

Priem B., Morvan H., Hafez A.M.A. et Morvan C., (1990b), "Influence of a plant glycan of the oligomannoside type on the growth of flax plantlets." *CR Acad. Sc. Paris*, **311**, 411-416.

Priem B. et Gross K.C., (1992), "Mannosyl- and xylosyl-containing glycans promote tomato fruit ripening." *Plant Physiol.*, **98**, 399-401.

Priem B., Gitti R., Bush C.A. et Gross K.C., (1993), "Structure of ten free N-glycans in ripening tomato fruit." *Plant Physiol.*, **102**, 445-458.

Pueyo E., Martin-Alvarez P.J. et Polo M.C., (1995), "Relationship between foam characteristics and chemical composition in wines and cava (sparkling wines)." *Am. J. Enol. Vitic.*, **46**, 518-524.

Puff N., Marchal R., Aguié-Béghin V. et Douillard R., (2001) "Is grape invertase a major component of the adsorption layer formed at the air/Champagne interface?" *Langmuir, The American Chemical Society journal of Colloids and Surfaces*, **17**, 2206-2212.

Puig-Deu M., López-Tamames E., Buxaderas S. et Torre-Boronat M.C., (1999), "Quality of base and sparkling wines as influenced by the type of fining agent added pre-fermentation." *Food Chem.*, **66**, 35-42.

R

Ramloch-Lorenz K., Knudsen S. et Sturm A., (1993), "Molecular characterization of the gene for carrot cell wall β -fructosidase." *Plant J.*, **4**, 545-554.

Raz R., Cretin C., Puigdomenech P. et Martinez-Izquierdo J.A., (1991), "The sequence of a hydroxyproline-rich glycoprotein gene from *Sorghum vulgare*." *Plant Mol Biol.*, **16**, 365-367.

Références Bibliographiques

Riebe D. et Thorn W., (1991) "Influence of carbohydrate moieties of human serotransferrin on the determination of its molecular mass by polyacrylamide gradient gel electrophoresis and staining with PAS reagent." *Electrophoresis*, **12**, 287-293.

Ricardo C.P.P. et Ap Rees T., (1970), "Invertase activity during the development of carrot roots." *Phytochemistry*, **9**, 239-247.

Roberts R.T., (1975), "Glycoproteins and beer foam." *J. Inst. Brew.*, 454-464.

Roberts R.T., (1977), "Colloidal aspects of beer foam." *The Brewers Digest*, 50-58.

Roitsch T., Bittner M. et Godt D.E., (1995), "Induction of apoplastic invertase of *Chenopodium rubrum* by D-glucose and α D-glucose analog and tissue-specific expression suggest a role in sink-source regulation." *Plant Physiol.*, **108**, 285-294.

Roitsch T., Balibrea M.E., Hofmann M., Proels R. et Sinha A.K., (2003), "Extracellular invertase : key metabolic enzyme and PR protein." *J. Exp. Bot.*, **54**, 513-524.

Rosenfeld J., Capdevielle J, Guillemot J.C. et Ferrara P., (1992), "In-Gel digestion of proteins for internal sequence analysis after one- or two-dimensional gel electrophoresis." *Anal. Biochem.*, **203**, 173-179.

Rudin A.D., (1957), "Measurement of the foam stability of beers." *J. Inst. Brew.*, **63**, 506-509.

Ruffner H.P., Geissmann M. et Rast D.M., (1992), "Plant and fungal invertases in grape berries infected with *botrytis cinerea*." *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, **40**, 181-189.

Ruffner H.P., Hürlimann M. et Skrivan R., (1995), "Soluble invertase from grape berries: purification, deglycosylation and antibody specificity." *Plant Physiol. Biochem.*, **33**, 25-31.

Ruiz-Larrea F., Lopez R., Santamaria M., Ruiz M. C., Zarazaga M., Gutierrez A. R. et Torres C., (1998), "Soluble proteins and free amino nitrogen content in must and wine of cv. Viura in La Rioja." *Vitis.*, **37**, 3, 139-142.

Ruiz E. et Ruffner H.P., (2002), "Immunodetection of *Botrytis*-specific invertase in infected grapes." *J. Phytopathol.*, **150**, 76-85.

S

Sarry J.E., Sommerer N., Sauvage F.X., Bergoin A., Rossignol M., Albagnac G. et Romieu C., (2004), "Grape berry biochemistry revisited upon proteomic analysis of the mesocarp." *Proteomics*, **4**, 201-215.

Salts Y., Wachs R., Gruissem W. et Barg R., (1991), "Sequence coding for a novel proline-rich protein preferentially expressed in young tomato fruit." *Plant Mol Biol.*, **17**, 149-150.

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.

Scheres B., van de Wiel C., Zalensky A., Horvath B., Spaink H., van Eck H., Zwartkruis F., Wolters A.M., Gludemans T., van Kammen A., et Bisseling T., (1990), "The ENOD12 gene product is involved in the infection process during the pea-Rhizobium interaction." *Cell*, **60**, 281-294.

Schindler T., Bergfeld R. et Schopfer P., (1995), "Arabinogalactan proteins in maize coleoptiles: developmental relationship to cell death during xylem differentiation but not to extension growth." *Plant J.*, **7**, 25-36.

Sebkova V., Unger C., Hardegger M. et Sturm A., (1995), "Biochemical, physiological and molecular characterization of sucrose synthase from *Daucus carota*." *Plant Physiol.*, **108**, 75-83.

Références Bibliographiques

Sequeira L. et Graham T.L., (1977), "Agglutination of avirulent strains of *Pseudomonas solanacearum* by potato lectin." *Physiol. Plant Pathol.*, **11**, 43-54.

Shaanan B., Lis H. et Sharon N., (1991), "Structure of a legume Lectin with an ordered N-linked carbohydrate in complex with lactose." *Science*, **254**, 862-866.

Shevchenko A., Wilm M., Vorm O. et Mann M., (1996), "Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels." *Anal. Chem.*, **68**, 850-858.

Shevchenko A., Wilm M., Vorm O. et Mann M., (1996), "Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels." *Anal. Chem.*, **68**, 850-858.

Showalter A.M., (1993), "Structure and function of plant cell wall proteins.", *Plant Cell*, **5**, 9-23.

Showalter A.M. et Varner J.E., (1989), "Plant hydroxyproline-rich glycoproteins." In "The Biochemistry of Plants : A comprehensive treatise." Ed. Marcus A., New York, Academic Press, p 485-520.

Slack P.T. et Bamforth C.W., (1983), "The fractionation of polypeptides from barley and beer by hydrophobic interaction chromatography : the influence of their hydrophobicity on foam stability." *J. Inst. Brew.*, **89**, 397-401.

Smith J.J., Muldoom E.P., Willard J.J. et Lamport D.T.A., (1986), "Tomato extensin precursors P1 and P2 are highly periodic structures." *Phytochem.*, **25**, 1021-1030.

Sommer-Knudsen J., Clarke A.E. et Bacic A., (1996), "A galactose-rich, cell-wall glycoprotein from styles of *Nicotiana glauca*." *Plant J.*, **9**, 71-83.

Sommer-Knudsen J., Bacic A. et Clarke A.E., (1998), "Hydroxyproline-Rich plant glycoproteins." *Phytochem.*, **47**, 483-497.

Références Bibliographiques

Stafstrom J.P. et Staehelin L.A., (1986), "The role of carbohydrate in maintaining extensin in an extended conformation." *Plant Physiol.*, **81**, 242-246.

Stiefel V., Ruiz-Avila L., Raz R., Pilar Valles M., Gomez J., Pages M., Martinez-Izquierdo J.A., Ludevid M.D., Langdale J.A., Nelson T. et Puigdomenech P., (1990), "Expression of a maize cell wall hydroxyproline-rich glycoprotein gene in early leaf and root vascular differentiation." *Plant Cell*, **2**, 785-793.

Stommel J.R., (1992), "Enzymic components of sucrose accumulation in the wild tomato species *Lycopersicon peruvianum*." *Plant Physiol.*, **99**, 324-328.

Strupat K., Karas M. et Hillenkamp F., (1992), "2, 5-hydroxybenzoic acid : a new matrix for laser desorption-ionization mass spectrometry." *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes*, **27**, 156-158.

Sturm A., (1999), "Invertases. Primary structures, functions, and roles in plant development and sucrose partitioning." *Plant Physiol.*, **121**, 1-7.

Sturm A., (1996), "Molecular characterization and functional analysis of sucrose-cleaving enzymes in carrot (*Daucus carota* L.)." *J. Exp. Bot.*, **47**, 1187-1192.

Sturm A., (1995), "N-glycosylation of plant proteins." In : J. Montreuil, H. Schachter et J.F.G. Vliegenthart, *Glycoproteins*, Amsterdam, Elsevier, p521.

Sturm A., (1991), "Heterogeneity of the complex N-linked oligosaccharides at specific glycosylation sites of two secreted carrot glycoproteins." *Eur. J. Biochem.*, **25**, 388-395.

Sturm A., Hess D., Lee H.-S. et Lienhard S., (1999), "Neutral invertase is a novel type of sucrose-cleaving enzyme." *Physiol. Plant.*, **107**, 159-165.

Sturm A. et Tang G.-Q., (1999), "The sucrose-cleaving enzymes of plants are crucial for development, growth and carbon partitioning." *Trends Plant Sci.*, **4**, 401-407.

Références Bibliographiques

Sturm A., Sebková V., Lorenz K., Hardegger M., Lienhard S. et Unger C., (1995), "Development- and organ-specific expression of the genes for sucrose synthase and three isoenzymes of acid β -fructofuranosidase in carrot." *Planta*, **195**, 601-610.

Sturm A. et Chrispeels M.J., (1990), "cDNA cloning of carrot extracellular β -fructosidase and its expression in response to wounding and bacterial infection." *Plant Cell*, **2**, 1107-1119.

Swords KM. et Staehelin L.A., (1989), "Plant fibers.", eds H.F. Linskens et J.F. Jackson. Springer Verlag, Berlin, p 219.

Szumilo T., Kaushal G.P. et Elbein A.D., (1986), " Purification to homogeneity and properties of glucosidase I from mung bean seedlings." *Arch. Biochem. Biophys.*, **247**, 313-316.

T

Tezuka K., Hayashi M., Ishihara H., Akazawa T. et Takahashi N., (1992), "Studies on synthetic of xylose-containing N-linked oligosaccharides deduced from substrate specificities of the processing enzymes in sycamore cells (*Acer pseudoplatanus* L.)" *Eur. J. Biochem.*, **203**, 401-413.

Towbin H., Staehelin T. et Gordon J., (1979), "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets : procedure and some applications." *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **76**, 4350-4354.

Trimble R.B., Maley F. et Chu F.K., (1983), "Glycoprotein biosynthesis in Yeast : Protein conformation affects processing in high mannose oligosaccharides on carboxypeptidase Y and invertase." *J. Biol. Chem.*, **298**, 2562-2567.

Tusseau D. et van Laer S., (1993), "Etude des macromolécules des vins de Champagne." *Sci. Alim.*, **13**, 463-482.

Tymowska-Lalanne Z. et Kreis M., (1998), "The plant invertases : physiology, biochemistry and molecular biology." *Adv. Bot. Res.*, **28**, 71-117.

U

Unger C., Hofsteenge J. et Sturm A., (1992), "Purification and characterization of a soluble β -fructofuranosidase from *Daucus carota*." *Eur. J. Biochem.*, **204**, 915-921.

Unger C., Hardegger M., Lienhard S. et Sturm A., (1994), "Soluble acid β -fructofuranosidase and comparison with the cell wall isoenzyme." *Plant Physiol.*, **104**, 1351-1357.

V

van Holst G.J. et Varner J.E., (1984), "Reinforced polyproline II conformation in a hydroxyproline-rich cell wall glycoprotein from carrot root." *Plant Physiol.*, **74**, 247-251.

van Holst G.J. et Fincher G.B., (1984), "Polyproline II confirmation in the protein component of arabinogalactan-protein from *Lolium multiflorum*." *Plant Physiol.*, **75**, 1163-1164.

van Holst G.J. et Clarke A.E., (1985), "Quantification of arabinogalactan-protein in plant extracts by single radial gel diffusion." *Anal Biochem.*, **148**, 446-450

van Holst G.J., Martin S.R., Allen A.K., Ashford D., Desai N.N. et Neuberger A., (1986) "Protein conformation of potato (*Solanum tuberosum*) lectin determined by circular dichroism." *Biochem J.*, **233**, 731-736.

van Ree R., Cabanes-Macheteau M., Akkerdaas J., Milazzo J.P., Loutelier-Bourhis C., Rayon C., Villalba M., Koppelman S., Aalberse R., Rodriguez R., Faye L. et Lerouge P.,

Références Bibliographiques

(2000) "Beta(1,2)-xylose and alpha(1,3)-fucose residues have a strong contribution in IgE binding to plant glycoallergens." *J. Biol. Chem.*, **275**, 11451-11458.

Voelker T.A., Hermann E.M. et Chrispeels M.J., (1989), "In vitro mutated phytohemagglutinin genes expressed in tobacco seeds : role of glycans in protein targeting and stability." *Plant Cell*, **1**, 95-104.

W

Waite J.H., (1992), "Structure, Cellular Synthesis and Assembly of Biopolymers.", ed. S.T. Case. Springer, Berlin, p 27.

Waters E. J., Wallace W. et Williams P. J., (1992), "Identification of heat-unstable wine proteins and their resistance to peptidases." *J. Agric. Food Chem.*, **40**, 1514-1519.

Waters E. J., Wallace W., Tate M. E. et Williams P. J., (1993), "Isolation and partial characterization of a natural haze protective factor from wine." *J. Agric. Food Chem.*, **41**, 724-730.

Waters E. J., Pellerin P. et Brillouet J.-M., (1994 a), "A *Saccharomyces* mannoprotein that protects wine from protein haze." *Carbohydr. Polym.*, **23**, 185-191.

Waters E. J., Pellerin P. et Brillouet J.-M., (1994 b), "A wine arabinogalactan-protein that reduces heat-induced wine protein haze." *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **58**, 43-48.

Waters E.J., Peng Z., Pocock K.F. et Williams P.J., (1995), "Proteins in white wines, II : Their resistance to proteolysis is not due to either phenolic complexation or glycosylation." *Aust. J. Grape Wine Res.*, **1**, 94-99.

Waters E. J., Shirley N. J. et Williams P. J., (1996), "Nuisance proteins of wine are grape pathogenesis-related proteins." *J. Agric. Food Chem.*, **44**, 3-5.

Références Bibliographiques

Weil M., Krausgrill S., Schuster A. et Rausch T., (1994), "A 17 kDa *Nicotiana tabacum* cell-wall peptide acts as an in-vitro inhibitor of the cell-wall isoform of acid invertase." *Planta*, **193**, 438-445.

Willats W.G. et Knox J.P., (1996), "A role for arabinogalactan-proteins in plant cell expansion: evidence from studies on the interaction of beta-glucosyl Yariv reagent with seedlings of *Arabidopsis thaliana*." *Plant J.*, **9**, 919-925.

Wilson I.B. et Altmann F., (1998), "Concanavalin A binding and endoglycosidase D resistance of beta1,2-xylosylated and alpha1,3-fucosylated plant and insect oligosaccharides." *Glycoconj J.*, **15**, 203-206.

Wilson I.B., Harthill J.E., Mullin N.P., Ashford D.A. et Altmann F., (1998) "Core alpha1,3-fucose is a key part of the epitope recognized by antibodies reacting against plant N-linked oligosaccharides and is present in a wide variety of plant extracts." *Glycobiology*, **8**, 651-661.

Winkler A., Cook J., Lider J.A. et Kliever W.M., (1974), *General Viticulture*. University of California Press. Berkeley.

Wojtaszek P., Smith C.G. et Bolwell G.P., (1999), "Ultrastructural localization and further biochemical characterization of prolyl 4-hydroxylase from *Phaseolus vulgaris* : comparative analysis." *Int. J. Biochem. Cell B.*, **31**, 463-477.

Wray W., Bouloukas T., Wray V. et Hancock R., (1981), "Silver staining of proteins in polyacrylamide gels." *Anal. Biochem.*, **118**, 197-203.

Wu L.-L., Mitchell J.P., Cohen N.S. et Kaufman P.B., (1993), "Gibberellin (GA₃) enhances cell wall invertase activity and mRNA levels in elongating dwarf pea (*Pisum sativum*) shoots." *Int. J. Plant Sci.*, **154**, 280-289.

X

Xu J., Avigne W.T., McCarty D.R. et Koch K., (1996), "A similar dichotomy of sugar modulation and developmental expression affects both path of sucrose metabolism : evidence from a maize invertase gene family." *Plant Cell*, **8**, 1209-1220.

Y

Yariv, J., H. Lis, et Katchalski, E., (1967), "Precipitation of arabic acid and some seed polysaccharides by glycosylphenylazo dyes." *Biochem J* **105**, 1C-2C.

Yokoi S., Maeda K., Xiao R., Kamada K. et Kamimura M., (1989), "Characterization of beer proteins responsible for the foam of beer." *E.B.C. Congress*, 593-600.

Yokotsuka K., Ebihara T. et Sato T., (1991), "Comparaison of soluble proteins in juice and wine from koshu grapes." *J. Ferment. Bioeng.*, **71**, 248-253.

Yokotsuka K., Nozaki K. et Takayanagi T., (1994), "Characterisation of soluble glycoproteins in red wine." *Am. J. Enol. Vitic.*, **45**, 410-416.

Yokotsuka K. et Singleton V. L., (1997), "Glycoproteins: Characterization in a hybrid grape variety (Muscat Bailey A) juice, fermenting must, and resultant red wine." *Am. J. Enol. Vitic.*, **48**, 100-114.

Z

Zaccharius R.J., Zell T.E., Morrison J.H. et Woodlock J.J., (1969), "Glycoprotein staining following electrophoresis on acrylamide gels." *Anal. Biochem.*, **31**, 148-152.

Références Bibliographiques

Zeleny R., Altmann F. et Praznik W., (1999), "Structural characterization of the N-linked oligosaccharides from tomato fruit." *Phytochem.*, **51**, 199-210.

Zeng Y., Bannon G., Thomas Hayden V., Rice K., Drake R. et Elbein A., (1997), "Purification and specificity of β 1, 2-xylosyltransferase, a enzyme that contributes to the allergenicity of some plant proteins." *J. Biol. Chem.*, **272**, 31340-31347.

Zeng C. et Biemann K., (1999), "Determination of N-linked glycosylation of yeast external invertase by matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry." *J. Mass Spectrom.*, **34**, 311-319.

ARICLES ET
COMMUNICATIONS

L'ensemble de mes travaux de troisième cycle (DEA et Thèse) a porté sur l'étude des glycoprotéines (animales et végétales) et quelques unes de leurs applications. Ces recherches ont conduit aux articles et communications suivants :

ARTICLE :

Dambrouck T., Marchal R., Marchal-Delahaut L., Parmentier M., Maujean A. and Jeandet P., (2003), "Immunodetection of proteins from grapes and yeast in a white wine." *J. Agric. Food Chem.*, **51**, 2727-2732.

Cebo C., Dambrouck T., Maes E., Laden C., Strecker G., Michalski J.C. and Zanetta J.P., (2001), "Recombinant human interleukins IL-1alpha, IL-1beta, IL-4, IL-6, and IL-7 show different and specific calcium-independent carbohydrate-binding properties." *J. Biol. Chem.*, **276**,: 5685-5691.

Liger-Belair G., Marchal R., Robillard B., Dambrouck T., Vignes-Adler M. and Jeandet P., (2000), "On the velocity of expanding spherical gas bubbles rising in line in supersaturated hydroalcoholic solutions : Application to bubbles trains in carbonated beverages." *Langmuir*, **16**, 1889-1895.

COMMUNICATION AFFICHÉE :

Marchal R., Dambrouck T., Marchal-Delahaut L., Maujean A and Jeandet P., "Immunodétection des protéines végétales et levuriennes dans un vin de base champenois." 7^e Symposium International d'Œnologie. Arcachon, 19-21 juin 2003.

COMMUNICATION ORALE :

Dambrouck T., Flahaut C., Marchal R., Parmentier M., Zanetta JP and Jeandet P., "Hétérogénéité de glycosylation de l'invertase de raisin : une glycoprotéine du vin." 7^e Symposium International d'Œnologie. Arcachon, 19-21 juin 2003.

Résumé

Les propriétés de mousse des vins de Champagne restent encore mal connues et donc mal maîtrisées. Cependant, certains composés ont été décrits comme ayant une action stabilisante sur la mousse des vins effervescents. Ainsi, les protéines, et plus particulièrement les glycoprotéines, même si elles sont présentes en de faibles quantités, semblent jouer un rôle primordial dans la stabilisation de la mousse.

Ce travail s'inscrit dans la continuité des travaux réalisés au sein du laboratoire d'Oenologie et Chimie Appliquée et apporte une contribution à l'étude des protéines des moûts et des vins de Champagne.

La première partie de cette étude a été consacrée à la détermination de l'origine des protéines du vin. La connaissance de l'origine des protéines est, en effet, essentielle pour comprendre et maîtriser des phénomènes telles que les propriétés moussantes des vins de Champagne. Une technique immunospécifique a été mise en œuvre pour démontrer sans ambiguïté la présence, dans le vin, de protéines végétales et levuriennes. La grande majorité des protéines du vin provient du raisin et la plupart d'entre elles sont de nature glycoprotéique. Quant aux protéines levuriennes libérées lors de la fermentation alcoolique, elles semblent être dans leur ensemble de nature glycoprotéique et peuvent être rapprochées des mannoprotéines levuriennes décrites par certains auteurs. Cette étude n'a pas révélé, en revanche, la présence de macromolécules bactériennes dans le vin.

La deuxième partie de ce travail a porté sur l'étude d'une glycoprotéine majeure des vins de Champagne, l'invertase de raisin. Les premiers résultats démontrent que l'invertase du moût de Chardonnay provient de la séquence GIN1. Le site contenant l'asparagine 101 semble ne pas être glycosylé. L'invertase présente une forte hétérogénéité de glycosylation, avec, cependant, la présence d'un glycanne majeur, le glycanne de type paucimannosidique.

Nous avons ensuite cherché à quantifier spécifiquement l'invertase de raisin afin de suivre son évolution tout au long du schéma de vinification d'un vin en rapport, notamment, avec l'évolution des protéines totales, utilisant une technique immunospécifique (ELISA). Les résultats montrent que les traitements utilisés pour le collage des vins provoquent une diminution de la quantité d'invertase qui semble être corrélée avec une perte en protéines totales. La diminution du contenu du vin en protéines, qu'il s'agisse de l'invertase ou du pool protéique global, entraîne une minoration des propriétés moussantes des vins ainsi traités.

Les propriétés de mousse des vins de Champagne restent encore mal connues et donc mal maîtrisées. Cependant, certains composés ont été décrits comme ayant une action stabilisante sur la mousse des vins effervescents. Ainsi, les protéines, et plus particulièrement les glycoprotéines, même si elles sont présentes en de faibles quantités, semblent jouer un rôle primordial dans la stabilisation de la mousse.

Ce travail s'inscrit dans la continuité des travaux réalisés au sein du laboratoire d'Oenologie et Chimie Appliquée et apporte une contribution à l'étude des protéines des moûts et des vins de Champagne.

La première partie de cette étude a été consacrée à la détermination de l'origine des protéines du vin. La connaissance de l'origine des protéines est, en effet, essentielle pour comprendre et maîtriser des phénomènes telles que les propriétés moussantes des vins de Champagne. Une technique immunospécifique a été mise en œuvre pour démontrer sans ambiguïté la présence, dans le vin, de protéines végétales et levuriennes. La grande majorité des protéines du vin provient du raisin et la plupart d'entre elles sont de nature glycoprotéique. Quant aux protéines levuriennes libérées lors de la fermentation alcoolique, elles semblent être dans leur ensemble de nature glycoprotéique et peuvent être rapprochées des mannoprotéines levuriennes décrites par certains auteurs. Cette étude n'a pas révélé, en revanche, la présence de macromolécules bactériennes dans le vin.

La deuxième partie de ce travail a porté sur l'étude d'une glycoprotéine majeure des vins de Champagne, l'invertase de raisin. Les premiers résultats démontrent que l'invertase du moût de Chardonnay provient de la séquence GIN1. Le site contenant l'asparagine 101 semble ne pas être glycosylé. L'invertase présente une forte hétérogénéité de glycosylation, avec, cependant, la présence d'un glycanne majeur, le glycanne de type paucimannosidique.

Nous avons ensuite cherché à quantifier spécifiquement l'invertase de raisin afin de suivre son évolution tout au long du schéma de vinification d'un vin en rapport, notamment, avec l'évolution des protéines totales, utilisant une technique immunospécifique (ELISA). Les résultats montrent que les traitements utilisés pour le collage des vins provoquent une diminution de la quantité d'invertase qui semble être corrélée avec une perte en protéines totales. La diminution du contenu du vin en protéines, qu'il s'agisse de l'invertase ou du pool protéique global, entraîne une minoration des propriétés moussantes des vins ainsi traités.
