

Institut Jules Guyot

UNIVERSITE DE BOURGOGNE

Institut Universitaire de la Vigne et du Vin (Institut Jules Guyot)

THÈSE

Pour obtenir le grade de
Docteur de l'Université de Bourgogne
Discipline : Sciences de l'Alimentation

par
Camelia Filofteia DIGUTA

le 16 décembre 2010

Ecologie des moisissures présentes sur baies de raisin

Directrice de thèse
Dr Michèle GUILLOUX-BÉNATIER
Co-directeur de thèse
Pr Gheorghe CAMPEANU

Co-encadrante de thèse
Dr Sandrine ROUSSEAUX

Membres du jury

Pr Nicolas Rozès
Pr Calina-Petruta Cornea
Dr Fabienne Remize
Dr Michèle Guilloux-Bénatier
Pr Gheorghe Campeanu
Dr Sandrine Rousseaux
Mme Béatrice Vincent

Facultat d'Enologia, Tarragona
USAMV, Bucharest
CTCPA, Avignon
Université de Bourgogne, Dijon
USAMV, Bucharest
Université de Bourgogne, Dijon
IFV, Beaune

Rapporteur
Examinatrice
Rapporteur
Directrice de thèse
Co-directeur de thèse
Co-encadrante de thèse
Membre invité

A la mémoire de mon père

REMERCIEMENTS

Ces travaux de thèse ont été effectués à l'Institut Universitaire de la Vigne et du Vin « Jules Guyot » de l'Université de Bourgogne (Dijon, France) en cotutelle avec l'Université de Sciences Agronomiques et Médecine Vétérinaire (Bucarest, Roumanie) sous la co-direction du Dr. Michèle Guilloux-Benatier et du Pr. Gheorghe Campeanu avec le co-encadrement du Dr. Sandrine Rousseaux. Je leur exprime toute ma reconnaissance et tout mon respect pour leur disponibilité, leur soutien, pour leur gentillesse et pour leur encouragement pendant la période de réalisation de la thèse.

Je tiens à manifester toute ma reconnaissance au Pr. Hervé Alexandre pour m'avoir accueillie au sein du Laboratoire de Recherche en Vigne et Vin (EA ReVV) de l'IUVV qu'il dirige. Je le remercie très vivement pour ses conseils avisés, sa disponibilité et son soutien tout au long de ma thèse.

Je tiens à adresser toute ma gratitude à Madame Michèle Guilloux-Benatier, pour m'avoir accueillie au sein de l'IUVV et avoir accepté de diriger cette thèse. Sa générosité, sa disponibilité, son attention, ses conseils scientifiques et ses encouragements m'ont été très précieux.

J'exprime également mes remerciements et ma reconnaissance au Pr. Gheorghe Campeanu pour avoir accepté de co-diriger cette thèse. Son soutien moral et professionnel, ses encouragements pendant la thèse mais aussi pendant toutes les années d'études m'ont permis de progresser dans mon travail.

Je voudrais remercier tout particulièrement Madame Sandrine Rousseaux. Malgré «quelques différences», je n'oublierai jamais son soutien, ses conseils, ses encouragements et sa grande patience. J'ai beaucoup appris professionnellement grâce à elle.

Je remercie Monsieur Nicolas Rozès, Professeur à la Faculté d'Œnologie de Tarragone et Madame Calina-Petruta Cornea, Professeur à la Faculté de Biotechnologies de Bucarest pour avoir accepté d'évaluer ce travail en qualité de rapporteurs.

Je remercie également le Dr Fabienne Remize d'avoir accepté la charge de juger ce travail.

Mes sincères remerciements s'adressent à Mme Béatrice Vincent (IFV, Beaune, France) pour sa collaboration et pour tout le travail réalisé en parallèle de mes expérimentations.

Je remercie l'Agence Universitaire de la Francophonie (AUF) pour le soutien financier et la confiance accordée à mon travail.

Je tiens également à exprimer ma sincère reconnaissance aux toujours disponibles Lydie Guzzo, Vanessa David et Stéphanie Weidmann. Leur soutien constant, leur présence, leurs conseils, leur encouragement et leur bonne humeur (plus particulièrement Vanessa) quand le besoin s'en faisait sentir, ont été très positifs pour moi.

Il m'est aussi agréable d'exprimer mes remerciements au Pr. Stefana Jurcoane et au Dr. Florentina Radoi Matei qui ont contribué par leur soutien et leurs conseils au bon déroulement de mes travaux, et particulièrement pour mes premiers pas dans le monde de la recherche.

Les mots me manquent en parlant de ma «presque» meilleure amie, Huong. Tu étais toujours à mes côtés et toujours disponible pour m'écouter, trouvant les mots qu'il faut quand ça n'allait pas, en m'accordant

toute l'aide possible. Nos discussions sur ce qui est important dans la vie, ta bonne humeur et ta cuisine vietnamienne, je ne les oublierai jamais. Ton amitié m'est très chère et je suis sûre qu'elle continuera pour longtemps, malgré la distance géographique entre nous...

J'adresse également mes remerciements à Tziana Nardi pour toute son aide et les conseils précieux qu'elle m'a donnés.

Je remercie également Guillaume Cardiet, Dragos Pascu et Nicolas Bretin qui m'ont apportés une aide importante dans mon travail.

Je tiens enfin à remercier toute l'équipe ReVV et toutes les personnes avec qui j'ai partagé des bons moments et qui ont rendu agréable mon séjour au sein de cette équipe : Remi, Lemia, Matilde, Aurélie, Laurence, Virginie, Maryse, Florian et Daniela.

Je ne saurai oublier d'adresser un grand merci, à ma famille, ma mère et mon frère, pour leur soutien moral et financier, leurs conseils, leurs encouragements et pour tous les efforts et les sacrifices qu'ils n'ont cessés de faire pendant toute la période de réalisation de cette thèse.

RESUME

La microflore des raisins est importante d'un point de vue technologique car elle conditionne en partie la qualité du vin. Or, la diversité des flores fongiques présentes sur baies de raisin ainsi que leur potentiel de contamination du produit final ne sont pas encore pleinement connus. Dans ce cadre, la caractérisation des flores fongiques cultivables présentes sur baies de raisin a été réalisée par PCR ITS-RFLP. 41 espèces de moisissures différentes sur les 43 étudiées appartenant à 11 genres différents ont été caractérisées de façon fiable. Seules les espèces *Penicillium thomii* et *Penicillium glabrum* ont présenté le même profil. Ainsi 96.3% des souches étudiées ont été caractérisées avec au maximum 4 enzymes de restriction et 41.5% des souches ont pu l'être avec seulement 2 enzymes de restriction. Ces résultats ont permis d'enrichir les bases de données, moyennement pourvues en séquences ITS caractéristiques de genres ou d'espèces de moisissures présentes sur baies de raisin. De plus, une étude exhaustive des moisissures présentes sur baies de raisin en Bourgogne a permis, par PCR ITS-RFLP, d'identifier 199 souches au niveau de l'espèce et ce quelque soit le genre. *Penicillium spinulosum* est l'espèce majoritaire isolée pour le millésime 2008 en Bourgogne.

Parallèlement, la quantification de *Botrytis cinerea*, choisi comme micro-organisme modèle, a été réalisée par qPCR. La technique qPCR décrite dans ce travail présente (i) une bonne sensibilité avec une limite de détection de 6.4 pg d'ADN correspondant à 540 spores, (ii) l'originalité de travailler en échantillons naturellement contaminés et la fiabilité d'utiliser un standard interne. L'évaluation de l'efficacité de différentes stratégies de traitements anti-*Botrytis* a confirmé l'importance de la prophylaxie (effeuillage) dans la lutte contre *Botrytis cinerea*.

Mots clés : Moisissures, *B. cinerea*, baies de raisins, PCR ITS-RFLP, qPCR

ABSTRACT

Microbial population of grapes is important from a technological point of view because it determines the quality of wine. But few studies have focused on fungal populations of grapes. A better knowledge of the fungal diversity on grapes, particularly as concerns species responsible for wine defects, may help efforts to control their development. We report the development of a PCR ITS-RFLP method as a fast and easy technique for identifying species of fungal genera present on grapes. By this method, 41 different fungal species among 43 studied species belonging to 11 genera were characterized at the species level. Only *P. thomii* remained indistinguishable from *P. glabrum*. Using this PCR-ITS-RFLP, 96.3% strains tested could be differentiated to the species level with only four enzymes and 41.5% only with two enzymes. Moreover this work has contributed to the enriching of the database of fungal ITS sequences. Thus 199 isolated strains were on grapes in Burgundy vineyard were characterized at species level independently of the genus by this method. *P. spinulosum* was the most frequently isolated species of *Penicillium* in Burgundy for 2008 vintage.

Parallely, the quantification of *Botrytis cinerea*, used as model, was developed by qPCR. The assay contained an internal amplification control to compensate for variations in DNA extraction and the various compounds from grapes, had high efficiency and the limit of detection was estimated to be 6.3 pg DNA (corresponding to 540 spores). This method was applied to assess the effects of various treatment strategies against *Botrytis* in the vineyard and demonstrates the importance of the prophylactic method.

Keywords : Fungal species, *B. cinerea*, grape, PCR ITS-RFLP, qPCR

Table des matières

LISTE DES ABREVIATIONS

LISTE DES FIGURES

LISTE DES TABLEAUX

Introduction Générale	1
Chapitre 1 - Etude Bibliographique	
1. Ecologie microbienne sur baies de raisin.....	4
1.1. Les levures	4
1.2. Les bactéries	6
1.3. Les moisissures.....	7
1.3.1. Principales moisissures d'altération présentes sur baies de raisin	9
1.3.1.1 <i>Botrytis cinerea</i>	9
1.3.1.2 Le genre <i>Penicillium</i>	10
1.3.1.3 Le genre <i>Aspergillus</i>	11
1.3.2. Autres moisissures.....	12
2. Métabolites secondaires produits par les moisissures du raisin	13
2.1. Métabolites volatils.....	13
2.1.1. La géosmine	14
2.1.2. Le 2-méthylisobornéol	18
2.1.3. Autres molécules	19
2.2. Mycotoxines	20
2.2.1. Ochratoxine A (OTA)	21
2.2.2. Autres mycotoxines.....	23
3. Méthodes de lutte	26
3.1. Traitements œnologiques.....	26
3.1.1. Actions vis-à-vis de la géosmine.....	26
3.1.2. Actions vis-à-vis de l'ochratoxine (OTA).....	27
3.2. Lutte au vignoble	28
3.2.1. Influence des facteurs environnementaux	28
3.2.1.1 Les facteurs abiotiques.....	28
3.2.1.2 Les facteurs biotiques.....	29
3.2.2. Les mesures prophylactiques.....	29

3.2.3. La lutte chimique.....	29
3.2.4. La lutte biologique	31
4. Identification des moisissures	32
4.1. Développement.....	32
4.2. Techniques d'identification	34
4.2.1. Critères d'identification macroscopique	34
4.2.2. Critères d'identification microscopique	35
4.2.3. Tests biochimiques.....	35
4.3. Méthodes d'identification par biologie moléculaire.....	36
4.3.1. Les régions d'ADN cibles.....	37
4.3.2. Méthodes moléculaire « culture dépendante »	39
4.3.3. Méthodes moléculaire « culture indépendante »	45
4.4. Méthodes de détection et de quantification moléculaire « culture indépendante ».....	47

Chapitre 2 - Matériels et Méthodes

1. Milieux de cultures.....	50
2. Souches utilisées	50
3. Echantillonnage.....	51
3.1. Parcelles viticoles	51
3.2. Prélèvements.....	52
4. Identification de la microflore fongique.....	53
4.1. Obtention des moisissures	53
4.2. Dénombrement de la microflore fongique cultivable	53
4.3. Identification par méthode classique	53
4.4. Identification par méthode moléculaire	54
4.4.1. Extraction d'ADN	54
4.4.2. Dosage de l'ADN	55
4.4.3. PCR ITS-RFLP	55
4.4.3.1 Région cible, amorces et condition de PCR.....	55
4.4.3.2 Séquençage.....	56
4.4.3.3 Enzymes de restriction.....	57
4.4.3.4 Obtention des profils PCR ITS-RFLP.....	58
5. Quantification de la microflore fongique.....	59
5. 1. Micro-organismes cibles.....	59

5.2. Préparation des spores de <i>Botrytis cinerea</i> et <i>Penicillium expansum</i> et courbe standard.....	59
5.3. <i>Brettanomyces bruxellensis</i> et courbe standard.....	60
5.4. Standard interne d'extraction d'ADN et de quantification.....	60
5.4.1 Standard interne.....	60
5.4.2. Courbe standard.....	60
5.5. qPCR amplification.....	61
5.5.1. Régions cibles et amorces.....	61
5.5.2. Quantification.....	61
5.5.3. Analyses statistiques.....	63

RESULTATS

Chapitre 3 : Développement d'une méthode PCR ITS RFLP fiable pour la caractérisation de la microflore présente sur baies de raisin

Article 1: "PCR ITS-RFLP: a useful method for identifying fungal isolates on grapes".....64

Chapitre 4 : Quantification de *Botrytis cinerea* sur grappe de raisin par qPCR

Article 2 : "Development of a qPCR assay for specific quantification of *Botrytis cinerea* on grapes"
.....84

Conclusion générale et Perspectives.....101

Références bibliographiques.....108

LISTE DES ABREVIATIONS

A : adénine

ACF : arômes de champignons frais

ADN(r) : acide désoxyribonucléique (ribosomal)

ARN(r) : acide ribonucléique (ribosomal)

ARS (NRRL) : Agricultural Research Service Collection (USA)

ATCC : American Type Culture Collection (USA)

BET : bromure d'éthydiu

C : cytosine

Ct : cycle threshold/ crossing point

DGCCRF : Direction générale de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes

dNTP : désoxynucléotide triphosphate

DRBC : Milieu Dichloran Rose Bengale Chloramphénicol

EDTA : éthylène diamine tétra-acétate

EMBL: European Molecular Biology Laboratory / Laboratoire Européen de Biologie Moléculaire

G : guanine

GMT : goûts moisi-terreux

IFV : Institut Français de la Vigne et du Vin

IGS : intergenic spacer

ITS : internal transcribed spacers

IUVV: Institut Universitaire de la Vigne et du Vin

LB : Milieu Luria –Bertani

MEA : Milieu Malt Extract Agar

MI: Université de Sciences Agronomiques et Médecine Vétérinaire Bucarest

MUCL : Mycothèque de l'Université Catholique de Louvain

NCB I : National Center for Biotechnology Information

OIV : Organisation International de la Vigne et du Vin

OT α : ochratoxine α

OTA : ochratoxine A

PCR : polymerase chain reaction/réaction de polymérisation en chaîne

PDA : Milieu Potato Dextrose Agar

PDB :Milieu Potato Dextrose Broth

qPCR: PCR quantitative

RF₁LP: restriction fragment length polymorphism

Rnase : ribonucléase

T : thiamine

TAE : tampon tris-acétate-EDTA

TE : tampon tris-EDTA

Tris : trihydroxyméthylaminométhane

Tween : polyoxyéthylène-sorbitane-monooléate

YPD : Mileu Yeast extract Peptone glucose

LISTE DES FIGURES

Chapitre 1

Figure 1 : Pourriture noble de la vigne due à *Botrytis cinerea*

Figure 2 : Pourriture grise de la vigne due à *Botrytis cinerea*

Figure 3 : Répartition d'espèces du genre *Penicillium* spp. isolées de différentes régions viticoles françaises pour le millésime 2004

Figure 4 : Développement d'*Aspergillus carbonarius* sur une blessure de baie de raisin

Figure 5 : Développement d'*Aspergillus carbonarius* sur grappe de raisin

Figure 6 : Evolution des isolats totaux et ochratoxinogènes d'*Aspergillus* au cours du développement de la baie

Figure 7 : Structure chimique de la géosmine

Figure 8 : Voie de biosynthèse de la (-)géosmine à partir du diphosphate d'isopentényle (IPP) et du diphosphate de diméthylallyle

Figure 9 : Structure chimique du 2-méthylisobornéol (MIB)

Figure 10 : Structure chimique des autres molécules

Figure 11 : Structure chimique de l'ochratoxine A

Figure 12 : Voie hypothétique de la biosynthèse de l'OTA

Figure 13 : Structures chimiques de trois mycotoxines

Figure 14 : Stades de développement de la vigne

Figure 16 : Différents modes de groupement des spores de moisissures

Figure 17 : Observations macroscopiques de genres fongiques isolés sur raisins

Figure 18 : Observations microscopiques de genres fongiques isolés sur raisins

Figure 19 : Exemple de profil phénotypique en plaque Biolog

Figure 20 : Alignement de séquences ITS pour différentes espèces de *Penicillium* et identité de séquence

Figure 21 : Représentation schématique des principales amorces utilisées pour l'amplification de la région ITS1-5.8S- ITS2

Figure 22 : Principe de la technique RFLP

Figure 23 : Principe de la technique RAPD

Figure 24 : Principe de la technique AFLP

Figure 25 : Principe de la technique PCR-RFLP

Figure 26 : Principe de la technique TTGE

Figure 27 : Principe de la technique DGGE

Figure 28 : Principe de la technique qPCR-Marquage non spécifique SYBR Green

Chapitre 3

Figure 1: PCR amplification of DNA from reference strains of various genera with primers ITS1 and ITS4.

Figure 2: Examples of ribosomal DNA restriction patterns after digestion with the restriction endonucleases *SduI*, *HinfI*, *MseI* and *HaeIII*. Lanes MW correspond to the 100 bp molecular weight marker.

Figure 3: Ribosomal DNA restriction patterns for reference strains after digestion with the restriction endonucleases *SduI*, *HinfI*, *MseI* and *HaeIII*.

Figure 4: Diversity of the culturable fungal microflora on grapes at harvest on Burgundy vineyards.

Chapitre 4

Figure 1 : Standard curve generated from the amplification of ten-fold dilutions of target genomic *Botrytis cinerea* DNA. This curve revealed a good linear relationship ($R^2=0.99$) between the Log_{10} value of the starting DNA concentration and the threshold cycle.

Figure 2 : Standard curve generated from the amplification of ten-fold dilutions of target genomic *Yarrowia lipolytica* DNA. This curve revealed a good linear relationship ($R^2=0.99$) between the Log_{10} value of the starting cell concentration and the threshold cycle.

Figure 3: DNA concentration of *Botrytis cinerea* on grape berries determined by qPCR. DNA concentration was determined for each trial described table I. Values followed by * ($P < 0.05$) or ** ($P < 0.001$) were significantly different from the control with the ANOVA test. nd : no detection (inferior to the detection limit : 6.3 pg DNA (corresponding to 540 spores)).

LISTE DES TABLEAUX

Chapitre 1

Tableau I : Les principaux vins élaborés à partir de raisins botrytisés

Tableau II : Espèces du genre *Penicillium* isolées sur baies de différentes régions viticoles

Tableau III : Espèces du genre *Aspergillus* isolées sur baies de raisin de différentes régions viticoles

Tableau IV : Principales molécules produites par des moisissures responsables de déviations organoleptiques (GMT et ACF)

Tableau V : Les principales mycotoxines et les champignons responsables de leur production trouvés sur les raisins ou dans le vin

Tableau VI : Matières actives homologuées en viticulture contre la pourriture grise

Chapitre 2

Tableau VII : Composition des milieux de culture

Tableau VIII : Souches utilisées dans cette étude

Tableau IX : Parcelles d'étude

Tableau X : Différents stratégies anti-botrytis : stade d'application et matières actives utilisées

Tableau XI : Amorces utilisées en PCR quantitative

Chapitre 3

Table 1 : Reference strains and isolates of the various fungal species used in this study

Table 2 : Ribosomal restriction patterns and composite patterns exhibited by the reference strains and isolates analysed

Table 3 : Strains accession number

Table 4 : Fungal species isolated on grapes and identified by different methods

Chapitre 4

Table 1: Treatment in trials to evaluate the effects of different strategies for control of grey mould (*Botrytis cinerea*) in vineyards with *Pinot Noir* grapes.

Conclusion et perspectives

Tableau XII: Genres majoritaires isolés dans différents vignobles mondiaux

Tableau XIII : Espèces majoritaires isolées dans différents vignobles français appartenant au genre *Penicillium*

Introduction Générale

La microflore des raisins est importante d'un point de vue technologique car elle conditionne la qualité du vin. Si l'écologie des levures et des bactéries présentes sur baies a fait l'objet de nombreuses études, il en est autrement pour les moisissures. Une des raisons de ce manque d'études est l'absence de méthodes fiables et rapides d'identification et le nombre limité de chercheurs spécialisés dans ce domaine dans la filière. Or à l'heure actuelle, le viticulteur doit faire face non seulement aux attaques de *Botrytis cinerea*, un des pathogènes majeurs sur baie mais également, depuis quelques années, à l'émergence de nouvelles altérations affectant la qualité sanitaire et sensorielle du moût de raisin et/ou du vin. Nous pouvons citer la présence de mycotoxine telle que l'ochratoxine A (OTA) ou de déviations aromatiques qualifiées de terreuses et moisies (GMT). Ces altérations étant perceptibles au niveau de la grappe, la production des molécules responsables est donc précoce et réalisée par des agents présents sur baies. Divers micro-organismes sont susceptibles de produire de l'OTA comme les moisissures du genre *Aspergillus*, *Penicillium*, ou des molécules responsables de GMT comme des actinomycètes (*Streptomyces*), des moisissures (*Aspergillus*, *Botrytis*, *Penicillium*...).

Afin de pouvoir limiter ces altérations, il apparaît nécessaire de détecter et d'identifier les micro-organismes responsables, dans le but de limiter leur présence et leur développement sur baie.

Si *Botrytis cinerea* est connu depuis l'Antiquité comme étant l'agent responsable de la pourriture grise, la lutte contre ce micro-organisme est toujours d'actualité. A l'heure actuelle, la lutte chimique préconise l'application de fongicides à quatre stades précoces de développement de la vigne en prévention du développement de la pourriture. Des mesures prophylactiques tels que l'effeuillage sont préconisées en complément de cette lutte chimique contre *B. cinerea* et des alternatives à la lutte chimique sont en cours de développement afin de diminuer les intrants dans le cadre du Grenelle de l'Environnement et du plan Ecophyto 2018.

Afin d'anticiper le développement de *B. cinerea*, il serait intéressant de pouvoir détecter et quantifier précocement l'agent sur baie. Mais les méthodes classiques de détection ne sont pas suffisamment sensibles, demandent une certaine expertise et ne peuvent pas être appliquées en routine au vignoble. Le développement de méthodes moléculaires de détection et de quantification telle que la PCR quantitative pourrait être un outil intéressant d'aide à la décision en matière de lutte.

De la même manière, les connaissances actuelles sur les facteurs responsables de l'émergence d'altérations et sur l'identité des moisissures productrices de ces molécules ne permettent pas de mettre en place une lutte efficace afin de limiter leur développement au vignoble. En effet, les méthodes d'identification classiques des moisissures présentes dans différents écosystèmes se réalisent selon l'observation de critères morphologiques macro et microscopiques, ce qui rend la caractérisation longue, fastidieuse et ne permet pas une identification fiable des espèces. Le développement de méthodes de biologie moléculaire d'identification basées sur l'analyse de l'ADN ont permis d'avoir un meilleur accès à l'identification des micro-organismes d'un écosystème. La technique PCR-ITS RFLP basée sur l'analyse du polymorphisme de la région 5.8ITS a été largement appliquée dans l'identification d'un ou plusieurs micro-organismes de différents écosystèmes tels que le sol, l'eau, dans le milieu médical ou en agroalimentaire. Mais à l'heure actuelle, peu d'études ont appliquées ces techniques sur l'étude des populations fongiques présentes sur baies et notamment les moisissures.

Ainsi l'objectif de ce travail est de mieux connaître les moisissures présentes sur baies de raisin en améliorant les techniques d'identification et de détection afin d'apporter des solutions de luttés contre ces moisissures.

Le premier chapitre de ce manuscrit est consacré à l'étude bibliographique du sujet qui s'efforcera d'établir un état des lieux de l'écologie microbienne sur baies de raisins en se focalisant sur les principales moisissures d'altération et les molécules responsables de ces altérations. De même, un état des lieux des méthodes moléculaires utilisées en écologie microbienne sera présenté et les stratégies de lutte contre ces contaminants seront exposées.

Les matériels et méthodes utilisés dans ce travail sont décrits dans le deuxième chapitre.

Les résultats sont ensuite présentés sous forme d'articles scientifiques publiés ou soumis à des revues scientifiques à comité de lecture. Le premier article, qui correspond au troisième chapitre, concerne le développement et l'application d'une méthode fiable et rapide d'identification des moisissures présentes sur baies : la PCR ITS-RFLP (article soumis à International Journal of Food Microbiology, N° FOOD-D-10-00973)

Le second article, qui correspond au quatrième chapitre, porte sur le développement de la qPCR comme méthode sensible de détection de *B. cinerea* sur baies. (article accepté dans FEMS Microbiology Letters)

Enfin, une synthèse critique des résultats obtenus et les perspectives proposées pour compléter ce travail seront données dans la conclusion générale.

Chapitre 1

Etude Bibliographique

1. Ecologie microbienne sur baies de raisin

La microflore des raisins est composée d'une grande variété de micro-organismes : levures, bactéries et moisissures. Leur présence et leur pourcentage à la surface des raisins sont influencés par plusieurs facteurs: le cépage, les conditions climatiques, le sol, les pratiques culturales, la localisation géographique. De nombreuses études écologiques ont permis d'identifier les diverses populations levuriennes et bactériennes présentes sur le raisin et que l'on retrouve ou non ensuite dans le moût de raisin en fermentation. Les études concernant les moisissures sont moins nombreuses, plus récentes, et se focalisent plus spécifiquement sur les moisissures responsables d'altération.

1.1. Les levures

Les levures, micro-organismes unicellulaires, appartiennent à trois familles : les ascomycètes, les basidiomycètes et les deutéromycètes. En œnologie, on les sépare en levures fermentaires capables de réaliser la fermentation alcoolique en partie ou en totalité et en levures oxydatives, non-fermentaires. On peut les classer aussi en levures *Saccharomyces* et en non-*Saccharomyces*.

A la vigne, les populations levuriennes cultivables sont faibles de 10^2 à 10^3 UFC.g⁻¹ sur les raisins immatures puis croissent jusqu'à 10^3 - 10^5 UFC.g⁻¹ sur les raisins au moment de la récolte, en lien avec l'augmentation de la surface pouvant être colonisée suite au grossissement de la baie de raisin (Prakitchaiwattana *et al*, 2004; Renouf, 2006). Les populations dénombrées sur des baies en surmaturation ou sur des raisins atteints de pourriture sont plus élevées et peuvent atteindre des valeurs comprises entre 10^5 et 10^7 UFC.g⁻¹ (Nisiotou et Nychas, 2007; Barata *et al*, 2008b).

La représentation des différentes levures varie au cours du développement de la baie de raisin avec une augmentation de la diversité des genres ou espèces rencontrés. Ceci dépend beaucoup des auteurs en raison vraisemblablement de la localisation géographique des grappes récoltées pour l'étude.

Dans le Bordelais, Renouf (2006) identifie *Aureobasidium pullulans* et *Rhodotorula mucilaginosa* comme étant des espèces majoritaires sur les raisins non vérées. Leur proportion diminue ensuite très fortement jusqu'à devenir indétectable à maturité. Par contre, en Australie, Prakitchaiwattana *et al* (2004) retrouve *Aureobasidium pullulans* tout au long de la maturation des baies de raisin. Doaré-Lebrun (2005) a identifié toutes les levures présentes sur des baies mûres récoltées dans 4 vignobles français sur 2 millésimes et montre ainsi que *Torulaspota globosa*, *Pichia anomala*, *Kloeckera* spp. et *Candida* spp. sont très représentées alors que *Pichia membranifaciens*, *Issatchenkia terricola*, *Debaryomyces caronii* et *Metschnikowia pulcherrina* le sont beaucoup moins. Dans le vignoble de la Napa, ce sont surtout des levures *Hanseniaspora uvarum*/*Kloeckera apiculata*, *Candida oleophila* et *Metschnikowia* spp. qui sont détectées (Pallmann *et al*, 2001). Barata *et al* (2008b) trouvent surtout la levure *Hanseniaspora uvarum* au Portugal alors que Li *et al* (2010) détectent, dans un vignoble chinois, 70 levures différentes appartenant aux 7 genres suivants : *Hanseniaspora*, *Cryptococcus*, *Pichia*, *Candida*, *Zygosaccharomyces*, *Issatchenkia*, *Metschnikowia* et à l'espèce *Sporidiobolus pararoseus* caractérisée pour la première fois sur des raisins. Cette diversité augmente encore lorsque les raisins sont atteints de pourriture. Ainsi Barata *et al* (2008a) montrent que sur 22 genres identifiés sur des raisins, 17 le sont seulement après isolement à partir de raisins pourris. On y retrouve notamment les levures d'altération appartenant au genre *Zygosaccharomyces* responsables de refermentation sur vin. Dans toutes les études réalisées, *Saccharomyces cerevisiae*, principale levure impliquée dans la fermentation alcoolique, n'est pas prédominante sur les raisins. Elle est même indétectable pour certains auteurs (Combina *et al*, 2005; Raspor *et al*, 2006) ou présente à des niveaux très bas de l'ordre de 10 à 100 UFC.mL⁻¹ pour d'autres (Pallmann *et al*, 2001; Prakitchaiwattana *et al*, 2004; Renouf *et al*, 2007). Sa présence augmente sur des raisins endommagés (Mortimer et Polsinelli, 1999).

Si certaines levures comme *Candida*, *Hanseniaspora*, *Pichia* peuvent contribuer favorablement à la complexité aromatique du vin futur (Romano *et al*, 2003), d'autres par contre sont considérées comme des levures d'altération. C'est le cas notamment pour la levure du genre *Dekkera*/*Brettanomyces* qui est responsable de l'apparition de déviations organoleptiques marquées (odeur animale, gouache, cuir, sueur de cheval)

en raison de la production de phénols volatils (en particulier l'éthyl-4-phénol et l'éthyl-4-gaïacol), ce qui engendre une diminution non négligeable de la qualité des produits et des pertes économiques conséquentes. Actuellement, cette levure est considérée comme une levure de contamination du chai et du matériel vinaire car elle est détectée à tous les stades de la vinification et lors de la conservation des vins (Gerbaux *et al*, 2000; Suárez *et al*, 2007). Or sa présence sur le raisin dès la phase de véraison est maintenant acquise (Renouf et Lonvaud-Funel, 2007). Compte tenu des altérations engendrées par ce micro-organisme et de sa capacité à passer dans un état VNC (viable non cultivable), de nombreuses études sont en cours à la fois pour détecter le plus tôt possible leur présence dans les moûts et/ou les vins et pour élucider cet état VNC (Serpaggi *et al*, 2010).

1.2. Les bactéries

Les populations bactériennes apparaissent, tout au long du développement du raisin, avec des niveaux de populations beaucoup moins élevés que ceux des levures à la surface des baies. Sur les baies non vérées, les populations sont très faibles de l'ordre de 10^1 à 10^2 UFC. g^{-1} et elles augmentent avec la maturation du raisin. Au moment des vendanges, elles peuvent atteindre des valeurs comprises entre 10^2 et 10^4 UFC. g^{-1} et il semble que leur niveau soit inversement corrélé à celui des levures (Renouf, 2006). Leur population augmente lorsque les raisins sont atteints de pourriture (Bae *et al*, 2006).

Peu d'études ont été conduites sur l'origine des bactéries lactiques, bactéries anaérobies à gram positif, malgré leur importance dans la fermentation malolactique des vins. Différentes espèces de *Lactobacillus* (*L. plantarum*, *L. casei*, *L. brevis*) et de *Leuconostoc* ont été identifiées à partir de raisins français (Lafon-Lafourcade *et al*, 1983), suisse (Maret et Sozzi, 1979) et espagnol (Sieiro *et al*, 1990). Paradoxalement alors que l'espèce *Oenococcus oeni* est la principale bactérie du vin, une seule étude identifie cette bactérie sur les raisins dès les premiers stades de leur développement (nouaison) (Renouf, 2006). Malgré l'utilisation de la technique d'enrichissement, Bae *et al* (2006) ne détectent jamais *Oenococcus oeni* tout en mettant par contre en évidence la présence de *Lactobacillus lindneri*, *Lactobacillus kunkeei* et *Lactococcus lactis* sur les raisins mûrs. La présence de bactéries acétiques, bactéries aérobies à

Gram négatif, a été reportée pour la première fois sur des baies de raisin par Joyeux *et al* (1984). Lorsque les baies sont atteintes de pourriture, le nombre des bactéries acétiques augmente fortement et peut atteindre jusqu'à 5.10^6 UFC.mL⁻¹ ce qui conduit alors à des teneurs excessives en acide acétique dans le moût de raisin et quelquefois à des difficultés de stabilisation des vins (Barbe *et al*, 2001).

Bien que *Gluconobacter oxydans* et *Acetobacter aceti* soient souvent identifiées comme les espèces acétiques majoritaires en œnologie présentes sur les baies de raisin, *Gluconobacter hansenii* peut être aussi présente sur des baies de raisin, entre 0 et 5% (Gonzalez *et al*, 2005). Le genre *Acetobacter* a été détecté en forte proportion par Renouf (2006) puisqu'il a trouvé jusqu'à 60% des bactéries acétiques appartenant à ce genre et ce sur des raisins sains. Les résultats des travaux de Prieto *et al* (2007) se démarquent des autres études. En effet, pour ces auteurs, il n'y a pas ou peu de coexistence sur le raisin des espèces de *Gluconobacter* et de *Acetobacter* et leur distribution apparaît clairement dépendre de la latitude de culture de la vigne chilienne.

D'autres bactéries ont été aussi identifiées sur des grappes de raisin mais sans jamais être retrouvées dans le moût de raisin jusqu'à présent. C'est le cas de *Stenotrophomonas maltophilia* (Prieto *et al*, 2007) capable de dégrader certains herbicides, de *Bacillus* spp., *Micrococcus* spp., *Sporolactobacillus* spp., *Enterococcus* spp., *Lactococcus* spp. et *Weissella* spp. (Bae *et al*, 2006) et aussi de certaines espèces de *Streptomyces* (La Guerche *et al*, 2005), genre décrit dans la littérature comme producteur de géosmine (Gerber et Lechevalier, 1965).

1.3. Les moisissures

La microflore fongique est très diversifiée même sur des raisins d'apparence saine, et est présente en abondance et à des fréquences importantes. Une étude menée en Californie sur les pourritures présentes sur baies a permis de mettre en évidence plus de 70 espèces fongiques appartenant à 30 genres différents (Hewitt, 1974 cité par La Guerche, 2004). Dans son étude bibliographique, Doaré-Lebrun (2005) a recensé plus de 50 genres différents isolés de baies de raisin. Parmi eux, 7 genres sont

plus fréquemment retrouvés sur raisins : *Alternaria* spp., *Aspergillus* spp., *Botrytis* spp., *Cladosporium* spp., *Epicoccum* spp., *Penicillium* spp. et *Rhizopus* spp.

D'autres genres et/ou espèces ont cependant été isolés mais dans des proportions généralement plus faibles : *Acremoniella* spp., *Acremonium* spp., *Aureobasidium pullulans.*, *Chaetomium* spp., *Chrysonilia* spp., *Cunninghamella* spp., *Curvularia* spp., *Drechslera* spp., *Emericella* spp., *Eurotium* spp., *Fusarium* spp., *Gliocladium* spp., *Monilia* spp., *Mucor* spp., *Neurospora tetrasperma*, *Nigrospora* spp., *Phoma* spp., *Pithomyces chartarum*, *Sphaeropsis* spp., *Stemphylium* spp., *Trichoderma* spp., *Trichotecium roseum*, *Truncatella* spp., *Ulocladium* spp. etc. En fonction des régions viticoles : vignobles septentrionaux (France) ou méridionaux (Espagne, Portugal, Tunisie), les genres majoritaires précédemment cités ne sont pas isolés à la même fréquence (Abrunhosa *et al*, 2001; Sage *et al*, 2002 et 2004; Bau *et al*, 2005a; Serra *et al*, 2005 et 2006a; Bejaoui *et al*, 2006a; Gómez *et al*, 2006; Lasram *et al*, 2007; Melki Ben Fredj *et al*, 2007) :

- *Alternaria* spp. entre 13% et 75%
- *Aspergillus* spp. entre 8% et 80%
- *Botrytis* spp. entre 1 % et 23%
- *Cladosporium* spp. entre 4% et 25%
- *Penicillium* spp. entre 2% et 20%

Les facteurs environnementaux (climat, pratiques culturales...) sont à l'origine de cette variabilité, ce qui rend difficile toute généralisation. Le nombre restreint de travaux, ayant étudié la diversité fongique des raisins, se sont focalisés plus spécifiquement sur les moisissures productrices de mycotoxines et/ou responsables d'altération de la vendange à savoir : *Aspergillus* spp., *Botrytis* spp. et *Penicillium* spp. qui représentent les contaminants les plus présents sur baies de raisin et qui peuvent être la cause de pertes économiques importantes.

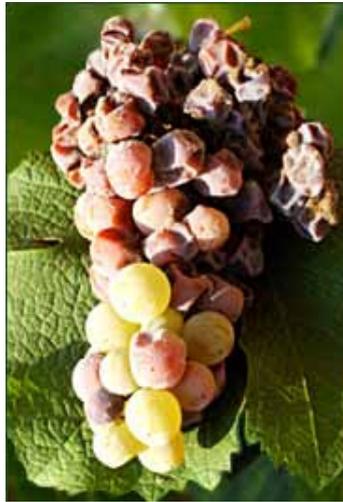


Figure 1 - Pourriture noble de la vigne due à *Botrytis cinerea*
(Photo Julien-René Jacques)



Figure 2 - Pourriture grise de la vigne due à *Botrytis cinerea*
(Photo Anne-Sophie Walker ©)

1.3.1. Principales moisissures d'altération présentes sur baies de raisins

1.3.1.1 *Botrytis cinerea*

B. cinerea (forme anamorphe de *Botryotinia fuckeliana*) se situe à la frontière entre le saprophytisme et le parasitisme. Sa présence est parfois souhaitée dans diverses régions viticoles pour son évolution en pourriture noble suite à des conditions climatiques particulières (humidité de l'air, brouillards matinaux et fort ensoleillement l'après-midi), contribuant à l'élaboration de vins liquoreux (Ribéreau-Gayon *et al*, 2004a) (Tableau I et Fig. 1).

Tableau I - Les principaux vins élaborés à partir de raisins botrytisés

Pays	Régions viticoles
France	Bordelais (Sauternes, Barsac, Sainte-Croix-du-Mont, Loupiac, Cadillac, Cérons, Monbazillac) Val de Loire (Coteaux du Layon, Coteaux de l'Aubance, Bonnezeaux, Quarts de Chaume, Vouvray, Montlouis-sur-Loire); Alsace; Mâconnais
Roumanie	Cotnari (connu comme perle de Moldavie)
Allemagne	Rheingau
Hongrie	Tokay
Autriche	Wachau; Burgenland
Espagne	Navarre
Slovénie	Ljutomer

Mais lorsque les conditions climatiques sont défavorables (humidité principalement), la présence de *B. cinerea* est redoutée car il est l'agent responsable de la pourriture grise (Fig. 2). Cette maladie ancienne connue depuis l'Antiquité est la plus largement répandue dans le monde, sur un grand nombre de plantes incluant des légumes (*e.g.* tomate, concombre), des plantes ornementales (*e.g.* rose, gerbera), des bulbes (*e.g.* oignon) et des fruits (*e.g.* fraise, pomme, raisin). Sur vigne, le développement de *B. cinerea* occasionne des dégâts sur feuilles (tâches brunes), les rafles se nécrosent et les baies pourrissent et flétrissent (Dubos, 2002). Les attaques de *B. cinerea* apparaissent majoritairement après la véraison, période au cours de laquelle le raisin devient sensible à cette maladie. Des blessures occasionnées sur les baies de raisins ainsi que des conditions humides permettent le développement et la propagation de *B. cinerea*.

Tableau II - Espèces du genre *Penicillium* isolées sur baies de différentes régions viticoles

<i>Penicillium</i> spp.	Origine	Références
<i>P. adametzoïdes</i>	France	Bejaoui <i>et al</i> , 2006a
<i>P. aurantiogriseum</i>	France, Portugal	Sage <i>et al</i> , 2004; Serra <i>et al</i> , 2005
<i>P. bilaiae</i>	Portugal	Serra <i>et al</i> , 2005
<i>P. brevicompactum</i>	Espagne, France, Portugal, Tunisie	Sage <i>et al</i> , 2002; 2004; Bau <i>et al</i> , 2005a, Serra <i>et al</i> , 2005, Doaré-Lebrun, 2005, Bejaoui <i>et al</i> , 2006a, La Guerche <i>et al</i> , 2006, Guérin <i>et al.</i> , 2008 ; Melki Ben Fredj <i>et al</i> , 2009
<i>P. brocae</i>	Espagne	Martínez-Culebras et Ramón, 2007
<i>P. canescens</i>	Espagne, France, Portugal	Sage <i>et al</i> , 2002, 2004, Bau <i>et al</i> , 2005a, Serra <i>et al</i> , 2005, Doaré-Lebrun, 2005
<i>P. carneum</i>	France	La Guerche <i>et al</i> , 2006
<i>P. chrysogenum</i>	Amérique latine, Espagne, France, Portugal, Tunisie	Sage <i>et al</i> , 2002; 2004, Bau <i>et al</i> , 2005a, Serra <i>et al</i> , 2005, Chulze <i>et al</i> , 2006, Martínez-Culebras et Ramón, 2007, Melki Ben Fredj <i>et al</i> , 2009
<i>P. citrinum</i>	Espagne, France, Portugal	Sage <i>et al</i> , 2002, 2004, Bau <i>et al</i> , 2005a, Serra <i>et al</i> , 2005, Doaré-Lebrun, 2005, Bejaoui <i>et al</i> , 2006a, Martínez-Culebras et Ramón 2007
<i>P. citreonigrum</i>	France	Sage <i>et al</i> , 2002, 2004, La Guerche <i>et al</i> , 2006
<i>P. claviforme</i>	France	La Guerche <i>et al</i> , 2006
<i>P. commune</i>	Espagne	Martínez-Culebras et Ramón, 2007
<i>P. corylophilum</i>	Espagne, France, Portugal	Sage <i>et al</i> , 2004, Bau <i>et al</i> , 2005a, Serra <i>et al</i> , 2005, La Guerche <i>et al</i> , 2006
<i>P. crustosum</i>	France, Portugal	Sage <i>et al</i> , 2004, Serra <i>et al</i> , 2005, Bejaoui <i>et al</i> , 2006a
<i>P. decumbens</i>	Espagne, France, Portugal	Bau <i>et al</i> , 2005a, Serra <i>et al</i> , 2006a, La Guerche <i>et al</i> , 2006
<i>P. echinulatum</i>	Portugal	Serra <i>et al</i> , 2005
<i>P. expansum</i>	Espagne, France, Portugal, Tunisie	Sage <i>et al</i> , 2002, 2004, La Guerche, 2004, Serra <i>et al</i> , 2005, Doaré-Lebrun, 2005, Bejaoui <i>et al</i> , 2006a, Guérin <i>et al.</i> , 2008, Melki Ben Fredj <i>et al</i> , 2009
<i>P. fellutanum</i>	Portugal	Serra <i>et al</i> , 2005
<i>P. funiculosum</i>	France, Portugal	Sage <i>et al</i> , 2004, Serra <i>et al</i> , 2005, Doaré-Lebrun, 2005
<i>P. glabrum</i>	Espagne, France, Portugal, Tunisie	Sage <i>et al</i> , 2002, 2004, Bau <i>et al</i> , 2005a; Serra <i>et al</i> , 2005, Doaré-Lebrun, 2005, Bejaoui <i>et al</i> , 2006a, Martínez-Culebras et Ramón, 2007, Melki Ben Fredj <i>et al</i> , 2009
<i>P. glandicola</i>	Portugal	Bejaoui <i>et al</i> , 2006a
<i>P. griseofluvum</i>	Portugal	Sage <i>et al.</i> , 2002, 2004, Serra <i>et al</i> , 2005
<i>P. griseoroseum</i>	Espagne	Martínez-Culebras et Ramón, 2007
<i>P. herquei</i>	France	Sage <i>et al</i> , 2004, Doaré-Lebrun, 2005
<i>P. islandicum</i>	France	Sage <i>et al</i> , 2004, Doaré-Lebrun, 2005
<i>P. implicatum</i>	France, Espagne, Portugal	Serra <i>et al</i> , 2005, Doaré-Lebrun, 2005, Bau <i>et al</i> , 2005a
<i>P. janczewskii</i>	Portugal	Sage <i>et al</i> , 2004, Serra <i>et al</i> , 2005

<i>P. lividum</i>	Espagne	Sage <i>et al</i> , 2004, Bau <i>et al</i> , 2005a
<i>P. miczynskii</i>	France, Portugal	Sage <i>et al</i> , 2002, 2004, Serra <i>et al</i> , 2005, La Guerche <i>et al</i> , 2006
<i>P. minoluteum</i>	Amérique latine, Espagne, France, Portugal, Tunisie	Sage <i>et al</i> , 2002,2004, Doaré-Lebrun, 2005, Chulze <i>et al</i> , 2006, Serra <i>et al</i> , 2006a, Martínez-Culebras <i>et al</i> Ramón, 2007, Melki Ben Fredj <i>et al</i> , 2009
<i>P. novae-zelandiae</i>	Portugal	Serra <i>et al</i> , 2005
<i>P. olsonii</i>	Portugal	Serra <i>et al</i> , 2005
<i>P. oxalicum</i>	Espagne, France, Portugal	Sage <i>et al</i> , 2002, Bau <i>et al</i> , 2005a, Serra <i>et al</i> , 2005, Bejaoui <i>et al</i> , 2006a
<i>P. pinophilum</i>	Espagne, France, Portugal	Bau <i>et al</i> , 2005a, Serra <i>et al</i> , 2005, La Guerche <i>et al</i> , 2006
<i>P. purpurogenum</i>	Espagne, France, Portugal	Sage <i>et al</i> , 2002, 2004, Bau <i>et al</i> , 2005a, Serra <i>et al</i> , 2005, La Guerche <i>et al</i> , 2006, Doaré-Lebrun, 2005
<i>P. raistrckii</i>	France, Portugal	Sage <i>et al</i> , 2004, Serra <i>et al</i> , 2005, Doaré-Lebrun, 2005
<i>P. restrictum</i>	France, Portugal	Sage <i>et al</i> , 2004, Serra <i>et al</i> , 2005, Doaré-Lebrun, 2005
<i>P. roquefortii</i>	France, Portugal	Doaré-Lebrun, 2005, Serra <i>et al</i> , 2006a
<i>P. rubrum</i>	France	La Guerche <i>et al</i> , 2006
<i>P. rugulosum</i>	Portugal	Sage <i>et al</i> , 2002, Serra <i>et al</i> , 2005
<i>P. sclerotiorum</i>	Espagne, Portugal	Bau <i>et al</i> , 2005a, Serra <i>et al</i> , 2005
<i>P. simplicissimum</i>	Portugal	Sage <i>et al</i> , 2004, Serra <i>et al</i> , 2005
<i>P. spinulosum</i>	France, Portugal	Sage <i>et al</i> , 2002,2004, Serra <i>et al</i> , 2006a, Bejaoui <i>et al</i> , 2006a, Doaré-Lebrun, 2005
<i>P. solitum</i>	Portugal	Serra <i>et al</i> , 2005
<i>P. sumatrense</i>	Espagne	Martínez-Culebras <i>et al</i> Ramón, 2007
<i>P. thomii</i>	Espagne, France, Portugal	Sage <i>et al</i> , 2002,2004, Bau <i>et al</i> , 2005a, Serra <i>et al</i> , 2005, Doaré-Lebrun, 2005, La Guerche <i>et al</i> , 2006
<i>P. variable</i>	Espagne, France, Portugal	Sage <i>et al</i> , 2004, Bau <i>et al</i> , 2005a, Serra <i>et al</i> , 2005, La Guerche <i>et al</i> , 2006
<i>P. verrucosum</i>	Espagne	Bau <i>et al</i> , 2006
<i>P. verruculosum</i>	Portugal, Tunisie	Serra <i>et al</i> , 2005, Melki Ben Fredj <i>et al</i> , 2009
<i>P. waksmanii</i>	Portugal	Serra <i>et al</i> , 2005

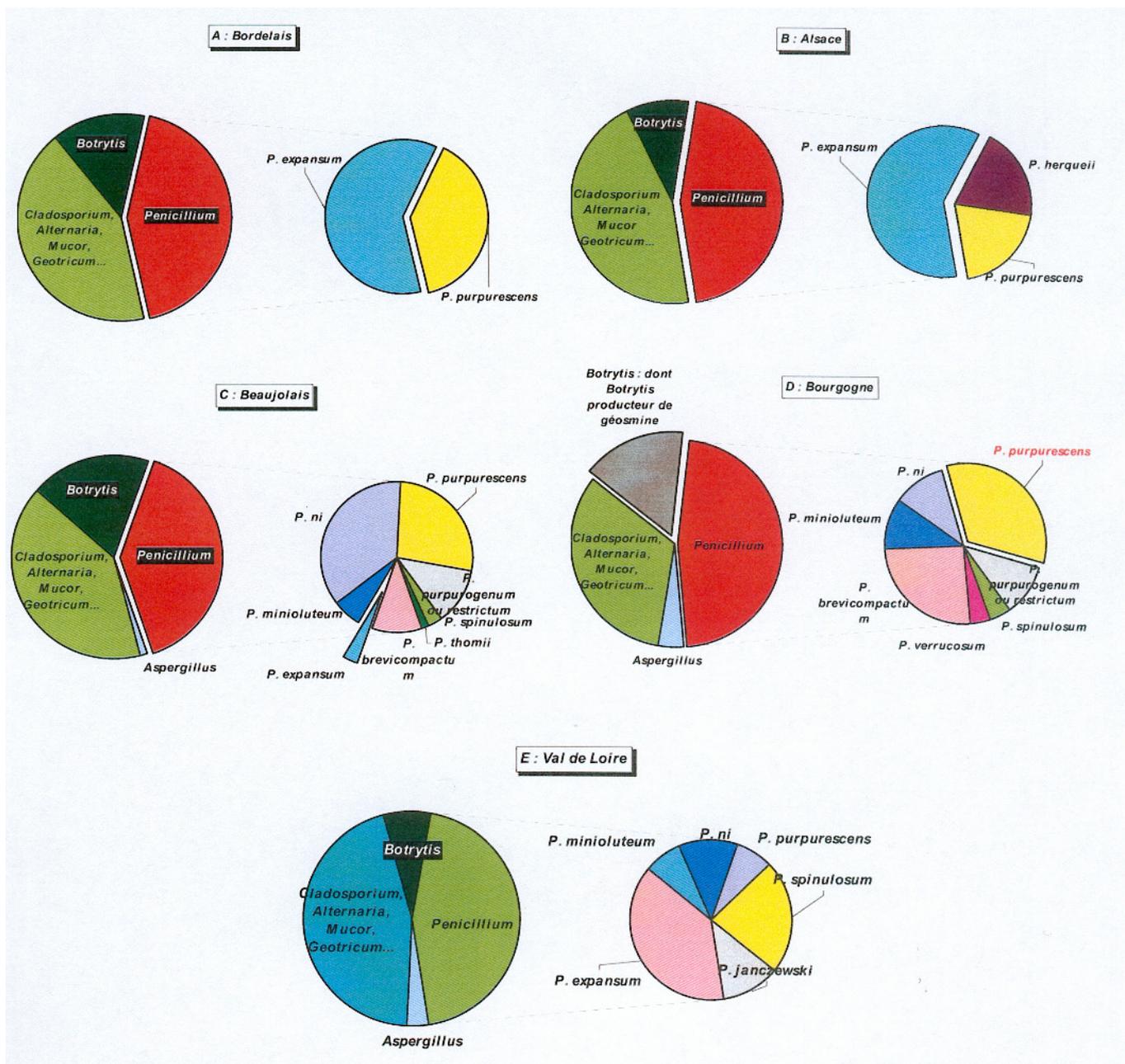


Figure 3 - Répartition d'espèces du genre *Penicillium* spp. isolées de différentes régions viticoles françaises pour le millésime 2004 (Vincent, 2005 ; Guérin et al, 2007)

Le champignon produit une polyphénoloxydase, la laccase, responsable de la casse oxydasique des moûts de raisin et des vins (brunissement et oxydation). De plus, le métabolisme du champignon dans la baie aboutit à la formation de polysaccharides exocellulaires (glucanes) qui engendrent ensuite dans le vin des problèmes de filtrabilité. Ainsi *B. cinerea* est très dommageable tant au niveau quantitatif qu'au niveau qualitatif : ces pertes sont estimées en France entre 15 et 40% (<http://www.cns.fr/sppip/Botrytis-cinerea-pertes-de-vigne.html>).

1.3.1.2. Le genre *Penicillium*

La présence de *Penicillium* spp. sur raisins est décrite depuis longtemps. Ces champignons occasionnent une pourriture bleue verte, entraînant une perte de couleur des moûts et une diminution de leur concentration en sucres. L'émergence de défauts organoleptiques (goûts moisi-terreux dits GMT) depuis les années 2000 a donné lieu à la mise en place d'études sur les origines de ces défauts et plus particulièrement sur les populations fongiques potentiellement responsables. Des suivis de ces populations au vignoble et des isollements ont conduit au recensement de 51 espèces de *Penicillium* isolées sur baies de raisin (Tableau II).

Pour le millésime 2004 marqué par ces défauts, Guérin *et al* (2008) montrent que l'espèce *P. expansum* est retrouvée majoritairement dans les vignobles de Bordeaux, d'Alsace et du Val de Loire, mais cette espèce est plus faiblement représentée en Beaujolais et est absente en Bourgogne (Fig. 3). Pour ces deux dernières régions, l'une des espèces majoritaires est *P. purpurescens*. On remarque également une plus grande diversité des espèces de *Penicillium* pour les vignobles du Beaujolais, de Bourgogne et du Val de Loire avec la présence de *P. minioluteum*, *P. brevicompactum*, *P. spinulosum*, *P. janczewski* et *P. purpurogenum* ou *restrictum* (Fig. 3). Cette représentativité variable d'un vignoble à l'autre semble liée aux facteurs géographiques, climatiques et variétaux (cépages).

Etant donné (i) la répartition variable des espèces de *Penicillium* en fonction de la région viticole, (ii) que les micro-organismes responsables ne sont pas les mêmes d'une région viticole à l'autre et/ou d'un millésime à l'autre et (iii) que les molécules impliquées dans les défauts aromatiques produits par ces micro-organismes

sont

différentes et parfois non encore identifiées (cf paragraphe 2), il en résulte une difficulté quant à la généralisation de la gestion et de la lutte contre ces défauts.

1.3.1.3. Le genre *Aspergillus*

Le genre *Aspergillus* fait partie de la flore épiphyte des raisins et peut s'installer sur baies blessées ou à la suite d'une altération de la pellicule, provoquant une pourriture noire. Il se développe préférentiellement à l'intérieur de la grappe dès la véraison et ce jusqu'au moment des vendanges (Fig. 4 et Fig. 5).



Figure 4 - Développement d'*Aspergillus carbonarius* sur une blessure de baie de raisin
(Photo : B. Molot, ITV France)



Figure 5 - Développement d'*Aspergillus carbonarius* sur grappe de raisin
(Photo : L. Sage, Université de Grenoble)

Tableau III - Espèces du genre *Aspergillus* isolées sur baies de raisin de différentes régions viticoles

<i>Aspergillus</i> spp.	Origine	Références
<i>A. aculeatus</i>	Argentine, Australie, Espagne, France, Portugal	Sage <i>et al</i> , 2002, 2004, Doaré-Lebrun, 2005, Serra <i>et al</i> , 2005, Leong <i>et al</i> , 2007, Martínez-Culebras et Ramón, 2007, Ponsone <i>et al</i> , 2007
<i>A. alliaceus</i>	Portugal	Serra <i>et al</i> , 2005
<i>A. auricomus</i>	Portugal	Serra <i>et al</i> , 2005
<i>A. awamori</i>	Argentine	Ponsone <i>et al</i> , 2007
<i>A. carbonarius</i>	Argentine, Chili, Australie, Espagne, France, Grèce, Italie, Liban, Portugal, Tunisie	Sage <i>et al</i> , 2002, 2004, Doaré-Lebrun, 2005, Bau <i>et al</i> , 2005a, Bejaoui <i>et al</i> , 2006a, Battilani <i>et al</i> , 2006, Chulze <i>et al</i> , 2006, Gómez <i>et al</i> , 2006, Tjamos <i>et al</i> , 2006, Leong <i>et al</i> , 2007, Ponsone <i>et al</i> , 2007, Martínez-Culebras et Ramón, 2007, Melki Ben Fredj <i>et al</i> , 2007, Oliveri <i>et al</i> , 2008, El Khoury <i>et al</i> , 2008, Díaz <i>et al</i> , 2009
<i>A. carneus</i>	Portugal	Serra <i>et al</i> , 2005
<i>A. candidus</i>	Portugal	Serra <i>et al</i> , 2005
<i>A. clavatus</i>	Portugal	Serra <i>et al</i> , 2005
<i>A. foetidus</i>	Argentine	Ponsone <i>et al</i> , 2007
<i>A. flavipes</i>	Portugal	Sage <i>et al</i> , 2004, Serra <i>et al</i> , 2005
<i>A. flavus</i>	France, Espagne, Liban, Tunisie, Portugal	Bau <i>et al</i> , 2005a, Bejaoui <i>et al</i> , 2006a, Serra <i>et al</i> , 2005, Melki Ben Fredj <i>et al</i> , 2007, El Khoury <i>et al</i> , 2008
<i>A. fumigatus</i>	Espagne, France, Portugal	Sage <i>et al</i> , 2002, 2004, Bau <i>et al</i> , 2005a, Doaré-Lebrun, 2005, Bejaoui <i>et al</i> , 2006a, Serra <i>et al</i> , 2005
<i>A. ibericus</i>	Portugal	Serra <i>et al</i> , 2005
<i>A. japonicus</i>	Argentine, France, Italie, Liban, Portugal	Doaré-Lebrun, 2005, Serra <i>et al</i> , 2005, Bejaoui <i>et al</i> , 2006a, Ponsone <i>et al</i> , 2007, Oliveri <i>et al</i> , 2008, El Khoury <i>et al</i> , 2008
<i>A. japonicus var aculeatus</i>	Espagne, Amérique latine	Bau <i>et al</i> , 2005a, Chulze <i>et al</i> , 2006, Gómez <i>et al</i> , 2006
<i>A. melleus</i>	Espagne	Bau <i>et al</i> , 2005a, Gómez <i>et al</i> , 2006
<i>A. niger</i> agrégats	Australie, Chili, Grèce, Espagne, France, Liban, Portugal, Italie, Tunisie	Sage <i>et al</i> , 2004, Bau <i>et al</i> , 2005a, Doaré-Lebrun, 2005, Serra <i>et al</i> , 2005, Battilani <i>et al</i> , 2006, Bejaoui <i>et al</i> , 2006a, Chulze <i>et al</i> , 2006, Tjamos <i>et al</i> , 2006, Gómez <i>et al</i> , 2006, Leong <i>et al</i> , 2007, Martínez-Culebras et Ramón, 2007, Melki Ben Fredj <i>et al</i> , 2007, Oliveri <i>et al</i> , 2008, El Khoury <i>et al</i> , 2008, Díaz <i>et al</i> , 2009
<i>A. nidulans</i>	Espagne	Martínez-Culebras et Ramón, 2007
<i>A. niveus</i>	Chili	Díaz <i>et al</i> , 2009
<i>A. ochraceus</i>	Espagne, France	Bau <i>et al</i> , 2005a, Gómez <i>et al</i> , 2006, Bejaoui <i>et al</i> , 2006, Martínez-Culebras et Ramón, 2007
<i>A. ostianus</i>	Portugal	Serra <i>et al</i> , 2005
<i>A. paradoxus</i>	Chili	Díaz <i>et al</i> , 2009

<i>A. prasilicus</i>	Espagne, France	Sage <i>et al</i> , 2004, Bau <i>et al</i> , 2005a, Bejaoui <i>et al</i> , 2006a, Gómez <i>et al</i> , 2006
<i>A. tamarii</i>	Espagne	Bau <i>et al</i> , 2005a, Gómez <i>et al</i> , 2006, Martínez-Culebras <i>et Ramón</i> , 2007
<i>A. terreus</i>	Espagne, Portugal	Sage <i>et al</i> , 2002, 2004, Bau <i>et al</i> , 2005a, Serra <i>et al</i> , 2005, Gómez <i>et al</i> , 2006 Martínez-Culebras <i>et Ramón</i> , 2007
<i>A. ustus</i>	Espagne, Portugal	Sage <i>et al</i> , 2002, 2004, Bau <i>et al</i> , 2005a, Serra <i>et al</i> , 2005
<i>A. versicolor</i>	Chili, Espagne, Portugal	Sage <i>et al</i> ., 2004, Bau <i>et al</i> , 2005a, Serra <i>et al</i> , 2005, Díaz <i>et al</i> , 2009
<i>A. wentii</i>	Chili, Espagne, Portugal	Serra <i>et al</i> , 2005, Gómez <i>et al</i> , 2006, Díaz <i>et al</i> , 2009, Martínez-Culebras <i>et Ramón</i> , 2007
<i>A. westerdijkiae</i>	Chili	Díaz <i>et al</i> , 2009

Récemment, l'attention particulière portée à ce genre et à son potentiel ochratoxinogène a donné lieu à de nombreux travaux qui ont permis d'isoler, sur baies de raisins de différents vignobles, 29 espèces appartenant au genre *Aspergillus* (Tableau III).

L'évolution d'*Aspergillus* au cours du développement de la baie a été suivie par Bejaoui *et al* (2006a) ; on note une augmentation des isolats du genre *Aspergillus* au cours de la maturation du raisin ainsi qu'une augmentation des isolats ochratoxinogènes au moment de la récolte (Fig. 6).

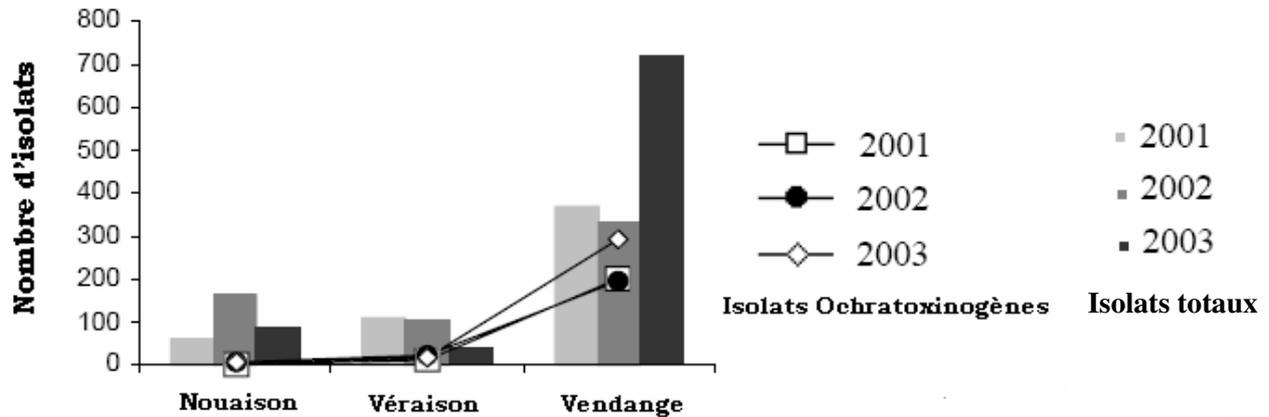


Figure 6 - Evolution des isolats totaux et ochratoxinogènes d'*Aspergillus* au cours du développement de la baie (Bejaoui *et al*, 2006a).

1.3.2 Autres moisissures

Parmi les moisissures, les plus fréquemment isolées des raisins, on retrouve aussi le genre *Alternaria* et surtout l'espèce *Alternaria alternata*, qui est à l'origine d'une pourriture brune pouvant gagner l'ensemble des grappes. Les spores d'*Alternaria* sont considérées comme les principales aéroallergènes qui sont associés à des maladies respiratoires et à l'asthme chez l'homme et les animaux (Downs *et al*, 2001; Breitenbach et Simon-Nobbe *et al*, 2002; Salo *et al*, 2006).

Quant au genre *Cladosporium* spp., fréquemment isolé, en se développant il donne lieu à une pourriture vert olive et occasionne le dessèchement du fruit.

2. Métabolites secondaires produits par les moisissures du raisin

2.1. Métabolites volatils

Depuis les années 2000, des déviations aromatiques, qui jusqu'alors n'étaient que ponctuelles, apparaissent en moût de raisin mais aussi en vin avec une fréquence nettement plus élevée. Il s'agit des goûts moisi-terreux dits GMT et des arômes de champignons frais dits ACF qui posent un problème important pour la filière vitivinicole tant au niveau technique qu'au niveau économique. Ces déviations sont retrouvées en France sur divers cépages (Sémillon, Cabernet Sauvignon, Gamay, Pinot noir) issus de différentes régions viticoles (Val-de-Loire, Alsace, Beaujolais, Bourgogne, Jura) et sont dues au développement non maîtrisé d'espèces fongiques sur le raisin (Le Roux *et al*, 2005; Drouillard *et al*, 2005).

Les molécules synthétisées proviennent du métabolisme secondaire des champignons et ne sont pas reliées directement à leur croissance ou à leur reproduction (Paterson *et al*, 2007). Les principales molécules identifiées à ce jour sont rassemblées dans le tableau IV.

Tableau IV - Principales molécules produites par des moisissures responsables de déviations organoleptiques (GMT et ACF)

Molécule	Défaut olfactif
(-)-géosmine	Moisi, terreux
2-méthylisobornéol	Moisi, terreux, camphré
Certains alcools et cétones	Champignon frais
2-isopropyl-3-méthoxypyrazine	Pomme de terre, asperge, terre
2-méthoxy-3,5-diméthylpyrazine	Moisi, champignon

Certains de ces composés, détectés sur des raisins et des moûts, ne sont pas retrouvés en vin (2-méthylisobornéol) alors que d'autres le sont et pourraient donc être préjudiciables à la qualité du vin (géosmine).

2.1.1. La géosmine

La géosmine (trans-1,10-diméthyl-trans-9-decalol) est la principale molécule responsable des odeurs de terre, moisi, terre humide ou betterave rouge dans les moûts de raisin ou dans les vins (Darriet *et al*, 2000). D'un point de vue structural, il s'agit d'un dérivé sesquiterpène de formule chimique $C_{12}H_{22}O$ qui peut être présent sous deux formes énantiomères (+) et (-) (Fig. 7). La forme (-) serait 11 fois plus odorante que la forme (+) (Polak et Provasi, 1992). Or seule la forme (-) est retrouvée dans les moûts et les vins à des concentrations pouvant aller jusqu'à plusieurs centaines de $ng.L^{-1}$ (Darriet *et al*, 2001). Ce composé est très odorant car il présente en effet un seuil de perception très bas : environ $10 ng.L^{-1}$ dans l'eau, $40 ng.L^{-1}$ en solution vin modèle et $60-65 ng.L^{-1}$ en vin rouge (Polak et Provasi, 1992).

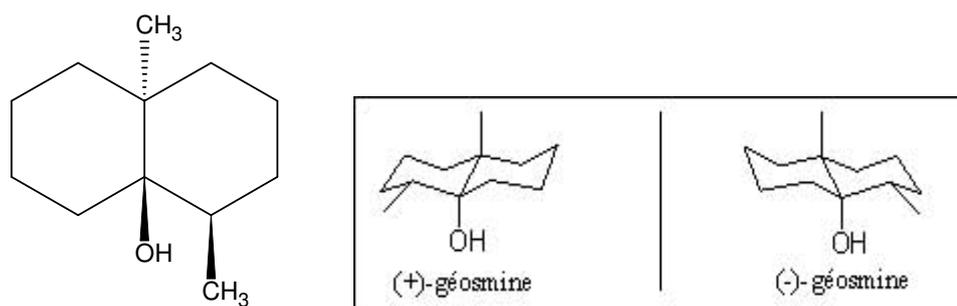


Figure 7 – Structure chimique de la géosmine

La (-)-géosmine est un composé assez stable dans le vin suite aux températures basses de conservation utilisées (10-15°C). Après 2 mois de conservation à 10°C, on note seulement une diminution de 50% de sa teneur (Ribéreau-Gayon *et al*, 2004b). Par contre 90% de sa teneur disparaît en solution modèle après 24 h à 90°C.

La transformation chimique de la géosmine conduit à un composé beaucoup moins odorant, l'argotisme (Paterson *et al*, 2007).

La géosmine est un métabolite secondaire produit par beaucoup de bactéries filamenteuses appartenant au genre *Streptomyces*, par des algues, par des cyanobactéries (Gerber et Lechevalier, 1965; Izaguirre et Taylor, 2004; Chen *et al*, 2010) mais aussi par des moisissures. Elle a été isolée initialement à partir de quatre espèces de *Streptomyces* (Gerber et Lechevalier, 1965) puis caractérisée chimiquement et son origine microbiologique confirmée (Gerber, 1968). Différentes espèces de *Streptomyces* ont été détectées sur les baies de raisin, mais leur extrême sensibilité au pH acide du raisin constitue un paramètre très limitant de leur développement et donc de leur potentialité à synthétiser cette molécule sur les baies de raisin (La Guerche *et al*, 2005).

C'est Mattheis et Roberts (1992) qui identifient pour la première fois *Penicillium expansum* comme producteur de géosmine. Beaucoup de souches appartenant à d'autres espèces du genre *Penicillium* sont cependant capables de produire cette molécule. C'est le cas de *P. carneum*, *P. chrysogenum*, *P. citrinum*, *P. crustosum*, *P. decumbens*, *P. funiculosum*, *P. glabrum*, *P. islandicum*, *P. miczynskii*, *P. miniolutem*, *P. pinophilum*, *P. purpurogenum*, *P. restrictum*, *P. roquefortii*, *P. spinulosum*, *P. thomii* et *P. variable* (Pisarnitskii et Egorov, 1988; Larsen et Frisvad, 1995; La Guerche *et al*, 2004; Doaré-Lebrun, 2005). Parmi toutes ces espèces, *Penicillium expansum* reste la plus importante. D'autres moisissures comme *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus parasiticus* et *Trichoderma spp.* ont été aussi identifiées pour être productrices de géosmine ainsi que certaines souches de *Botrytis cinerea* (Doaré-Lebrun, 2005).

Une grande variété de moisissures présentes à la surface des raisins est donc susceptible de conduire à la synthèse non voulue de cette molécule odorante. Cependant, compte-tenu des divergences obtenues dans les études réalisées, la capacité de production semble être plus souche dépendante que caractéristique d'une espèce. Selon La Guerche *et al* (2005), la synthèse de géosmine requiert la présence tout d'abord de *Botrytis cinerea* puis ensuite de *Penicillium expansum* sur les baies de raisin. En conditions de laboratoire (jus de raisin), ces auteurs mettent ainsi en

évidence le rôle potentiel de *B. cinerea* dans l'induction de la synthèse de géosmine par *P. expansum*. Au cours de son développement localisé sur la baie, *B. cinerea* dégraderait les acides aminés présents dans les assises pelliculaires et placerait *P. expansum* dans une situation physiologique impliquant la production de géosmine ou d'autres métabolites. Un nombre limité de souches de *B. cinerea* notées (bot+) favoriserait cette production de géosmine. A l'inverse, les souches de *B. cinerea* notées (bot-), synthétiseraient un polysaccharide inhibant alors la synthèse de géosmine chez *P. expansum* (La Guerche *et al*, 2007).

Il semble cependant que certaines souches de *Penicillium* soient capables de produire de la géosmine sur des raisins non contaminés.

En plus du manque de connaissance sur les facteurs qui influencent la production de géosmine par *Penicillium*, on en sait peu sur les voies de synthèse et le métabolisme de la géosmine chez *Penicillium*. Darriet *et al* (2001) montrent que seule la forme (-) est synthétisée par des cultures pures de *Streptomyces* spp. ou *Penicillium* spp. Chez *Streptomyces* spp., la voie de biosynthèse de la géosmine est étroitement liée à celle des terpénoïdes (sesquiterpènes). Deux voies sont possibles. La première utilise la voie du mévalonate, la deuxième celle du 2-C-méthyl-D-érythritol-4-phosphate (Bentley et Meganathan, 1981 ; Rohmer *et al*, 1993). La première voie conduit à la formation du diphosphate de diméthylallyle et la deuxième à ce produit mais aussi au diphosphate d'isopentényle (IPP). Suite à l'action de deux enzymes est alors synthétisé le diphosphate de farnésyle ou farnésyl pyrophosphate (FPP) considéré comme le précurseur universel du métabolisme des dérivés de sesquiterpènes. Ce FPP est transformé en germacradiénol puis ensuite en géosmine par l'action de la germacradiénol/géosmine synthase (Jiang et Cane, 2007). Cette enzyme catalyse la cyclisation du FPP chez *S. coelicolor* (Cane et Watt, 2003). Gust *et al* (2003) montre que le gène SCO 6073 (*cyc2*) de *S. coelicolor* est impliqué dans la synthèse de la géosmine. La délétion de la totalité du gène ou de la partie codant pour le domaine N-terminal donne des mutants incapables de synthétiser la géosmine alors que la délétion de la partie codant pour le domaine C-terminal n'a aucun impact sur cette synthèse. En présence du cofacteur Mg^{2+} , le substrat FPP est transformé dans un mélange de 85:15

en germacradiénol et en D-germacrène. Puis, le germacradiénol produit est ensuite transformé en géosmine (Fig. 8) (Cane *et al*, 2006; Jiang et Cane, 2007).

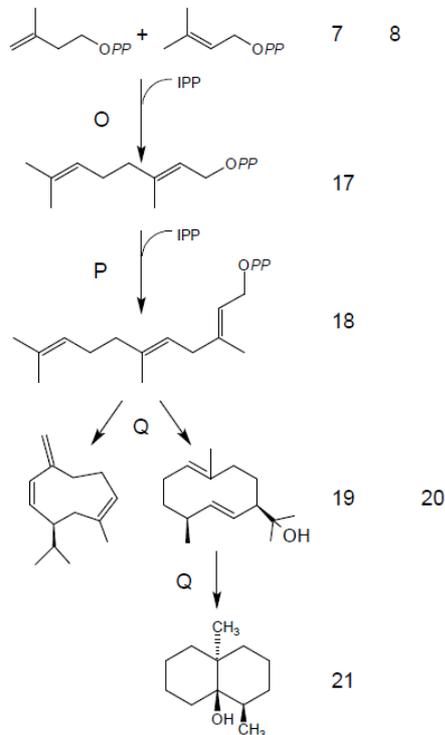


Figure.8 : Voie de biosynthèse de la (-)géosmine à partir du diphosphate d'isopentényle (IPP) et du diphosphate de diméthylallyle, d'après Rohmer et al (1993)

7 : diphosphate d'isopentényle (IPP); 8 : diphosphate de diméthylallyle ; 17 : diphosphate de géranyl; 18 : diphosphate de farnésyle; 19 : D-germacrène; 20 : germacrediènl; 21 : (-)géosmine
; O : prényl transférase; P : farnésyl diphosphate synthase; Q : germacradiènl/geosmine synthase

Pour l'instant, à notre connaissance, la voie de biosynthèse de la géosmine n'a pas encore caractérisée chez les moisissures.

2.1.2. Le 2-méthylisobornéol

Le 2-méthylisobornéol ou MIB (1,2,7,7-tétraméthylbicyclo[2.2.1]heptan-2-ol) de formule chimique $C_{11}H_{20}O$ contribuerait beaucoup aux notes terreuses, camphrées, moisies retrouvées principalement dans les raisins noirs atteints de pourriture grise. Sa structure moléculaire est représentée sur la figure 9.

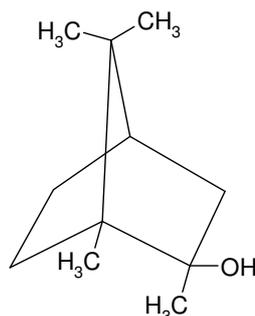


Figure 9 - Structure chimique du 2-méthylisobornéol (MIB)

C'est un alcool terpénique dont le seuil de perception est de 12 ng.L^{-1} dans l'eau (Ribéreau-Gayon *et al*, 2004b), de 40 ng.L^{-1} en solution vin modèle et de 30 à 40 ng.L^{-1} dans le vin (Amon *et al*, 1989; La Guerche, 2004). La contamination du moût de raisin par le MIB apparaît limitée dans le temps puisqu'il est totalement dégradé au cours de la fermentation alcoolique (La Guerche *et al*, 2006). En milieu acide, le MIB peut se déshydrater en donnant du 2-méthyl-bornane ou du 2-méthyl-bornène. Ces deux composés ont des seuils de perception de l'odeur terreuse plus élevés que le MIB (Drouillard *et al*, 2005). Le MIB peut cependant réapparaître dans le vin suite à une contamination de micro-organismes dans les bouchons de liège.

Le MIB est produit par des *Streptomyces*, des cyanobactéries notamment du genre *Oscillatoria* (Schultz et Dickschat, 2006) mais aussi par beaucoup de moisissures appartenant au genre *Penicillium* (*P. crustosum*, *P. commune*, *P. expansum*, *P. funiculosum*, *P. glabrum*, *P. miniolutem*, *P. spinulosum* et *P. thomii*), au genre *Aspergillus* (*A. fumigatus*, *A. niger*, *A. parasiticus*) (Larsen et Frisvad, 1995; Doaré-Lebrun, 2005; La Guerche *et al*, 2006). Certaines souches de *Botrytis cinerea* sont aussi décrites comme productrices de MIB (Harris *et al*, 1986; Doaré-Lebrun, 2005; La Guerche *et al*, 2006).

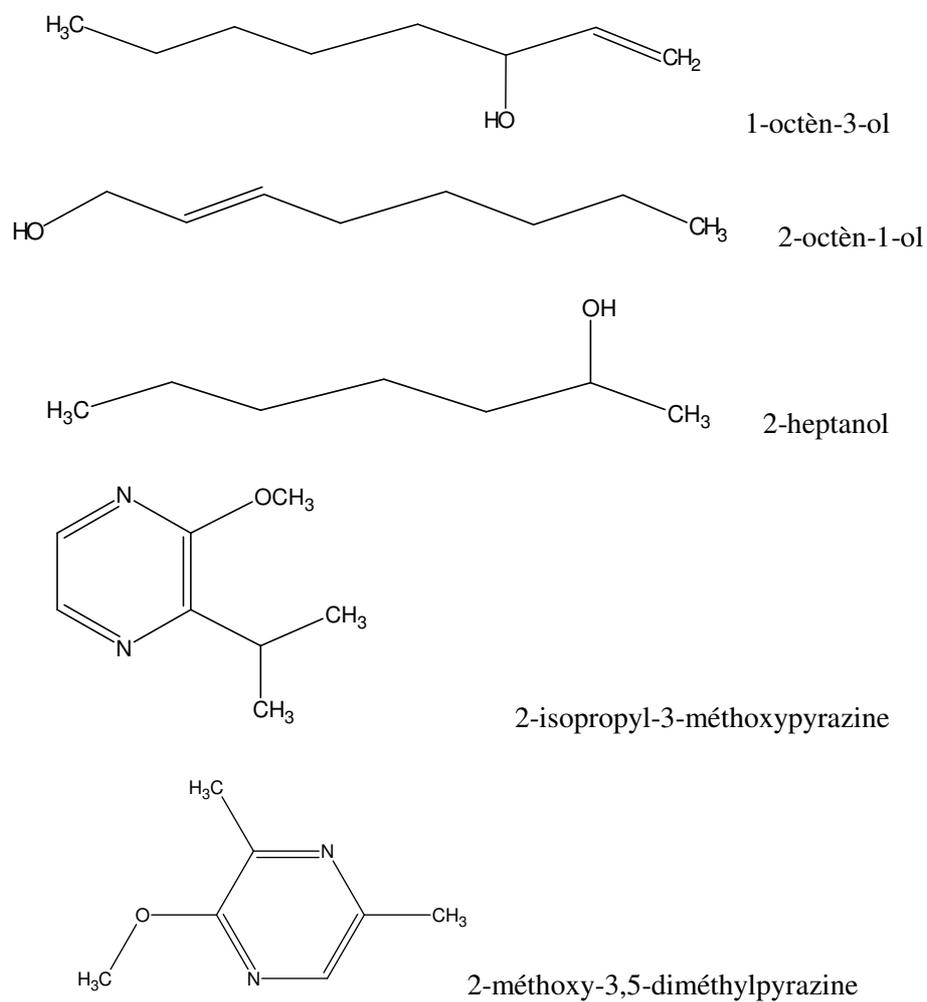


Figure 10 – Structure chimique des autres molécules

Quelques souches de *Penicillium* peuvent ne produire que du MIB : c'est le cas de *P. bilaiae* et de *P. crustosum* sur Pinot noir (Bourgogne) et de *P. sclerotiorum* sur Gamay (Beaujolais) et sur Sémillon (Bordelais) (Drouillard *et al*, 2005). Sur les 200 souches de *Penicillium* étudiées, 21% sont productrices de géosmine et 40% de MIB.

La synthèse du 2-méthylisobornéol provient du mévalonate via un monoterpène en C₁₀ auquel s'ajoute en C₂ un méthyl provenant de la L-méthionine. L'acide folique par l'intermédiaire de la S-adenosyl-méthionine intervient dans la méthylation du MIB (Bentley et Meganathan, 1981).

2.1.3. Autres molécules

Certains alcools et cétones à 8 atomes de carbone (1-octèn-3-ol et 2-octèn-3-ol (C₈H₁₆O), 1-octèn-3-one (C₈H₁₄O)) mais aussi le 2-heptanol (C₇H₁₆O) ont été trouvés dans des raisins atteints de pourriture grise (La Guerche *et al*, 2006 ; Dauphin *et al*, 2007 ; Vacher *et al*, 2008) (Fig. 10). Les seuils de perception dans l'eau sont pour les alcools de 2 µg.L⁻¹ pour le 1-octèn-3-ol, de 20 µg.L⁻¹ pour le 2-octèn-3-ol et de 70 µg.L⁻¹ pour le 2-heptanol. Le seuil de perception du 1-octèn-3-one est estimé à 3 ng.L⁻¹ (Ribéreau-Gayon *et al*, 2004b). Tous ces composés présentent une odeur caractéristique de champignons frais. La molécule 1-octèn-3-one est réduite pendant la fermentation alcoolique par *Saccharomyces cerevisiae* en 3-octanone, composé 1000 fois moins odorant (Wanner et Tressi, 1998). Ces composés sont produits par beaucoup de moisissures appartenant aux genres *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Alternaria* (Doaré-Lebrun, 2005). Ils proviennent de la dégradation des lipides et notamment de l'acide linoléique (Simpson, 1990). La 2-isopropyl-3-méthoxypyrazine (IPMP) de formule chimique C₈H₁₂N₂O est une molécule qui possède une odeur évoquant le germe de pomme de terre, l'asperge voire la terre (Fig. 10). Cette molécule est extrêmement odorante avec un seuil de perception de l'ordre de 0,3 à 1,5 ng.L⁻¹ en vin blanc et de 1 ng.L⁻¹ en vin rouge. Ce seuil de perception est très variable selon le vin et peut être différent en ortho- et rétronasal. Pickering *et al* (2007) montre par exemple qu'il est de 0,32 ng.L⁻¹ en orthonasal et de 1,35 ng.L⁻¹ en rétronasal sur du chardonnay alors que l'écart est plus faible pour du gewürztraminer de 1,56 ng.L⁻¹ en orthonasal et de 1,15 ng.L⁻¹ en rétronasal.

Tableau V - Les principales mycotoxines et les champignons responsables de leur production trouvés sur les raisins ou le vin

Mycotoxines	Moisissures	Références
Ochratoxine A	<i>A. aculeatus</i> <i>A. alliaceus</i> <i>A. awamorii</i> <i>A. carbonarius</i> <i>A. foetidus</i> <i>A. japonicus</i> <i>A. japonicus var. aculeatus</i> <i>A. melleus</i> <i>A. niger aggregatus</i> <i>A. ochraceus</i> <i>A. ostianus</i> <i>A. tubingiensis</i> <i>A. wentii</i> <i>A. westerdijkiae</i> , <i>P. expansum</i> <i>P. citrinum</i> <i>P. verrucosum</i>	Cabanes <i>et al</i> , 2002, Rosa <i>et al</i> , 2002, Sage <i>et al</i> , 2002, 2004 Battilani <i>et al</i> , 2003 et 2006, Bau <i>et al</i> , 2005a et 2006, Serra <i>et al</i> , 2005 et 2006a, Bejaoui <i>et al</i> , 2006, Belli <i>et al</i> , 2006, Gómez <i>et al</i> , 2006, Chulze <i>et al</i> , 2006, Leong <i>et al</i> , 2007, Perrone <i>et al</i> , 2006, Lasram <i>et al</i> , 2007, Martínez-Culebras et Ramón, 2007, Ponsone <i>et al</i> , 2007, El Khoury <i>et al</i> , 2008, Chiotta <i>et al</i> , 2009, Melki Ben Fredj <i>et al</i> , 2007 et 2009, Díaz <i>et al</i> , 2009
Aflatoxine B1	<i>A. flavus</i> <i>A. parasiticus</i>	Bau 2005a, Serra <i>et al</i> , 2005, El Khoury <i>et al</i> , 2008, Melki Ben Fredj <i>et al</i> , 2009
Trichothécènes	<i>Fusarium spp</i> <i>Trichotecium roseum</i>	Serra <i>et al</i> , 2005
Patuline	<i>P. expansum</i> <i>P. griseofulvum</i> <i>P. funiculosum</i> <i>P. novae-zeelandiae</i> <i>P. roqueforti</i>	Abrunhosa <i>et al</i> , 2001, Serra <i>et al</i> , 2005, Bau <i>et al</i> , 2005a, Bragulat <i>et al</i> , 2008
Citrinine	<i>P. expansum</i> <i>P. verrucosum</i>	Bau <i>et al</i> , 2006, Serra <i>et al</i> , 2005, Bragulat <i>et al</i> , 2008

Cette molécule est stable dans le vin (Pickering *et al*, 2005). Elle est souvent présente suite à l'incorporation de la coccinelle asiatique *Harmonia axyridis* dans le jus ou les grappes de raisin. Cette molécule peut cependant être synthétisée par des bactéries (Schulz et Dickschat, 2006) et par quelques moisissures : certaines espèces de *Penicillium* comme *P. crustosum*, *P. expansum*, *P. funiculosum*, *P. glabrum*, *P. miniolutem*, *P. spinulosum* ainsi que certaines espèces d'*Aspergillus* comme *A. niger* et *A. parasiticus* (Doaré-Lebrun, 2005).

La biosynthèse des pyrazines est mal connue. La 2-isopropyl-3-méthoxypyrazine proviendrait de la O-méthylation de la 2-hydroxy-3-alkylpyrazine à partir de la valine (Hashizume *et al*, 2001).

La 2-méthoxy-3,5-diméthylpyrazine de formule chimique $C_7H_{10}N_2O$ a été aussi trouvée dans des vins blancs présentant un goût de moisi, champignon. Son seuil de perception serait en vin blanc de $2,1 \text{ ng.L}^{-1}$ (Simpson *et al*, 2004).

2.2. Mycotoxines

Les mycotoxines sont des métabolites fongiques retrouvés dans les aliments (céréales, légumes, fruits) et dans les boissons suite au développement de certaines moisissures (en particulier *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., *Fusarium* spp. et l'espèce *Trichotecium roseum* (Tableau V). Les mycotoxines appartiennent le plus souvent au groupe polycétones des métabolites secondaires qui provoquent de nombreuses maladies chez l'homme et l'animal. Ces molécules dérivent de l'acétate par la voie des polycétoacides, voie de dérivation de la synthèse des acides gras. Ces molécules, à froid ou à chaud, sont très stables et sont électriquement neutres. Les pratiques œnologiques telles que la flash détente, la thermovinification ou le collage ont donc peu d'influence sur leurs concentrations dans les moûts de raisin (Crespy, 2005).

2.2.1. Ochratoxine A (OTA)

L'ochratoxine A (OTA) est la principale mycotoxine impliquée dans la chaîne alimentaire humaine en raison de ses effets néphrotoxiques, tératogènes, immunotoxiques et cancérigènes. Découverte dans les années soixante par Van der Merwe *et al* (1965) elle est classée comme cancérigène du groupe 2B. L'alimentation est le vecteur essentiel de l'exposition de l'homme à cette molécule.

L'OTA ($C_{20}H_{18}O_6NCl$) est constituée d'une molécule de 3-méthyl-5-chloro-8-hydroxy-3,4dihydroisocoumarine liée par une liaison peptidique, au niveau de son groupement carboxyle en C₇, au groupement amine de la phénylalanine.

Elle appartient à la famille des polycétones et sa structure chimique est représentée sur la figure 11.

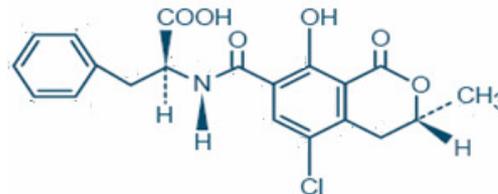


Figure 11 - Structure chimique de l'ochratoxine A

La présence d'OTA a été surtout détectée dans des céréales, le café, les épices et dans les produits de fermentation (bière) et les produits d'origine animale (porc, volaille, lait). Après les céréales, le vin est considéré comme la deuxième grande source d'exposition humaine à l'OTA en Europe. C'est en 1996, que fut signalée pour la première fois la présence d'OTA dans le vin et le moût (Zimmerli et Dick, 1996). Depuis, la présence de cette molécule a été trouvée dans diverses régions viticoles d'Europe : Espagne (Bau *et al*, 2005a; Belli *et al*, 2006; Gómez *et al*, 2006), France (Sage *et al*, 2002; Bejaoui *et al*, 2006a), Portugal (Serra *et al*, 2006b) et Italie (Battilani *et al*, 2006), d'Afrique : Tunisie (Lasram *et al*, 2007; Melki Ben Fredj *et al*, 2007 et 2009) ou d'Amérique latine (Chulze *et al*, 2006; Chiotta *et al*, 2009).

Compte tenu de sa toxicité, l'Union Européenne a récemment fixé une teneur maximale en OTA de 10 µg par kg pour les raisins secs (raisins de Corinthe, sultanines...) et de 2 µg par kg pour le vin (rouge, blanc et rosé) et les autres boissons à base de vin et/ou de moût de raisins, pour le jus de raisin (ingrédients à base de jus de raisin dans d'autres boissons y compris le nectar de raisin et le jus de raisin concentré reconstitué) et pour le moût de raisins et le moût de raisins concentré reconstitué, destinés à la consommation humaine directe (Règlement (CE) N° 123/2005).

L'ochratoxine A est produite par différentes espèces appartenant aux genres *Aspergillus* (*A. ochraceus*, *A. carbonarius*, *A. niger*...), *Penicillium* spp., *Fusarium* spp. et *Trichotecium roseum* (Tableau V). La faible présence d'*A. ochraceus* sur les raisins (Bau *et al*, 2006; Gómez *et al*, 2006; Bejaoui *et al*, 2006a) ne représente qu'une faible part dans la contamination des vins avec l'OTA. Par contre, la forte présence d'*A. carbonarius* sur les grappes et son fort potentiel ochratoxigénique (entre 78 et 100%) en fait la moisissure responsable de la présence de cette mycotoxine en moût de raisin (Belli *et al*, 2006). L'espèce *A. carbonarius* est, de plus, très résistante aux rayons ultraviolets et peut croître jusqu'à des valeurs de 40°C (Pitt et Hocking, 2006). Cette particularité explique pourquoi les teneurs en OTA des vins élaborés dans les régions méditerranéennes sont supérieures à celles dosées dans les vins provenant de zones tempérées (Battilani *et al*, 2006). Atoui *et al* (2007) ont mis en évidence une corrélation positive entre la quantité d'ADN extrait d'*A. carbonarius* et la teneur en OTA dans 72 échantillons de baies de raisin. Ces auteurs montrent ainsi qu'une valeur inférieure à 10 pg ADN par mg de baie assure une bonne sécurité puisqu'elle correspond à une valeur en OTA produite inférieure à la limite maximale fixée par l'Union Européenne. *A. niger* aggregate pourrait avoir un impact ochratoxinogène important dans les vignobles mais une forte présence de moisissures sur les grappes n'est pas toujours corrélée avec un fort potentiel ochratoxigénique. Bau *et al* (2005a) montrent ainsi que 92% des souches d'*Aspergillus* isolées appartiennent à *A. niger* aggregate et à *A. carbonarius*. Mais seules les souches d'*A. carbonarius* ont été en mesure de produire de l'OTA (1,92 à 195,46 µg.g⁻¹).

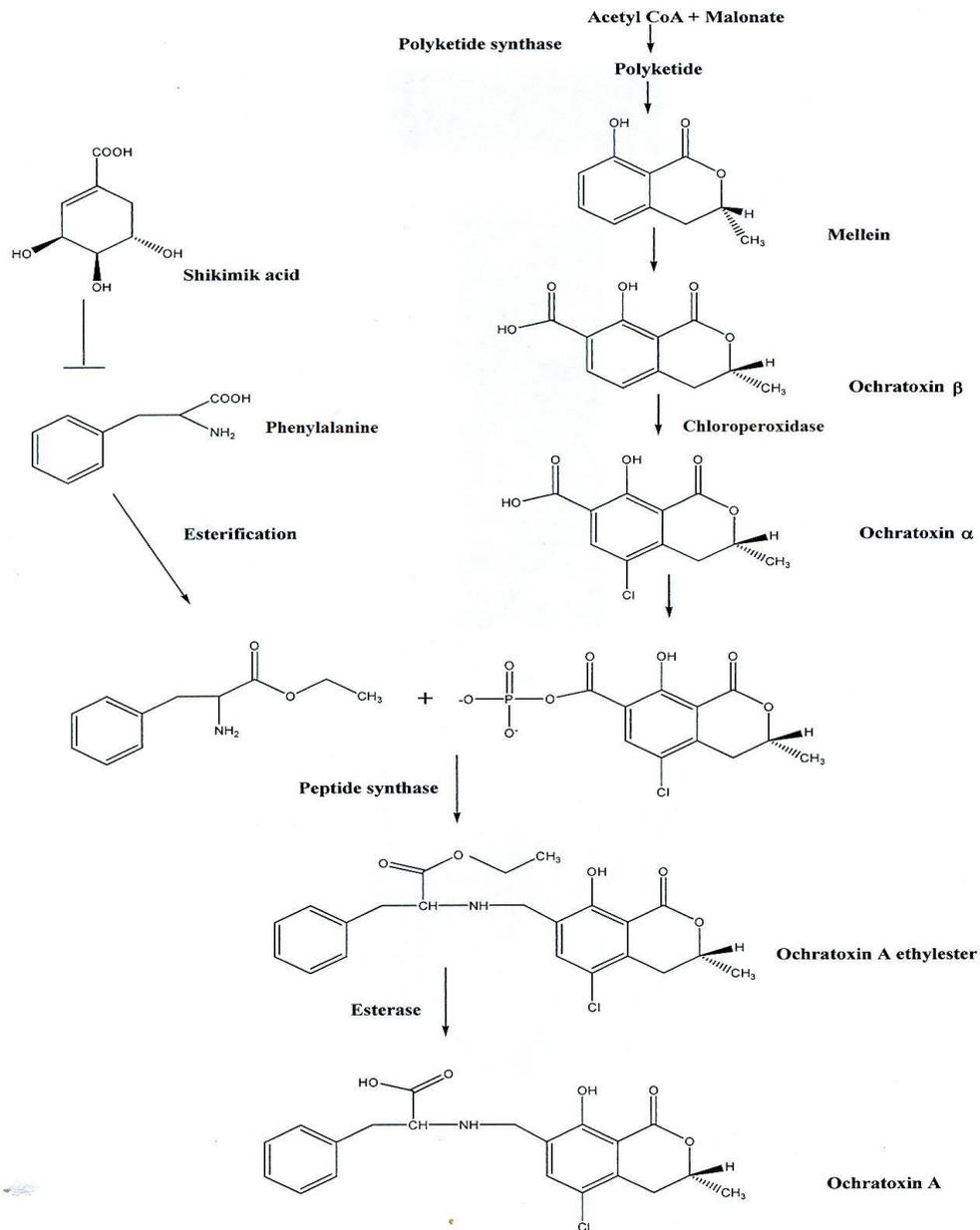


Figure 12 - Voie hypothétique de la biosynthèse de l'OTA proposée par Huff and Hamilton (1979)

Pour Lasram *et al* (2007), 63% des souches isolées à partir des raisins sont des *A. niger* aggregate mais seulement 3% de ces souches sont capables de produire de l'OTA alors que 97% des souches d'*A. carbonarius* en produisent. Des résultats similaires sont obtenus par Melki Ben Fredj *et al* (2009).

D'autres souches d'*Aspergillus* spp. comme *A. tubingiensis* (Perrone *et al*, 2006), *A. japonicus* (Bejaoui *et al*, 2006a; Ponsone *et al*, 2007), *A. japonicus* var. *aculeatus* (Gómez *et al*, 2006), *A. alliaceus*, *A. ochraceus*, *A. ostianus* et *A. melleus* (Bau *et al*, 2006), *A. aculeatus*, *A. awamorii* et *A. foetidus* (Ponsone *et al*, 2007), *A. wentii* et *A. westerdijkiae* (Díaz *et al*, 2009) ont été aussi ponctuellement détectées sur des grappes de raisin et seraient capables de synthétiser l'OTA.

D'après Huff et Hamilton (1979), trois étapes distinctes se produisent dans la biosynthèse de l'OTA (Fig. 12) : la première partie est la synthèse de polycétones par une polycétone synthase (PKS) puis de melleine ; la deuxième étape comprend l'addition d'un groupe carboxylique conduisant à la synthèse d'OT β ; la troisième étape correspond à l'incorporation d'un atome de chlore sous l'action d'une chloroperoxydase conduisant à l'OT α puis à l'OTA par fixation de phénylalanine. Actuellement, on sait que la biosynthèse de ces polycétones est catalysée par des groupes d'enzymes polycétone synthase (PKS) et par des hybrides entre la polycétone synthase et les peptides synthetases non ribosomiaux (PKS-NRPS) (Bacha *et al*, 2009). Un gène (*otapksppN*) codant pour la PKS a été identifié chez *A. ochraceus* (O'Callaghan *et al*, 2003), chez *P. nordicum* (Geisen *et al*, 2004) et chez *A. carbonarius* (Atoui *et al*, 2006).

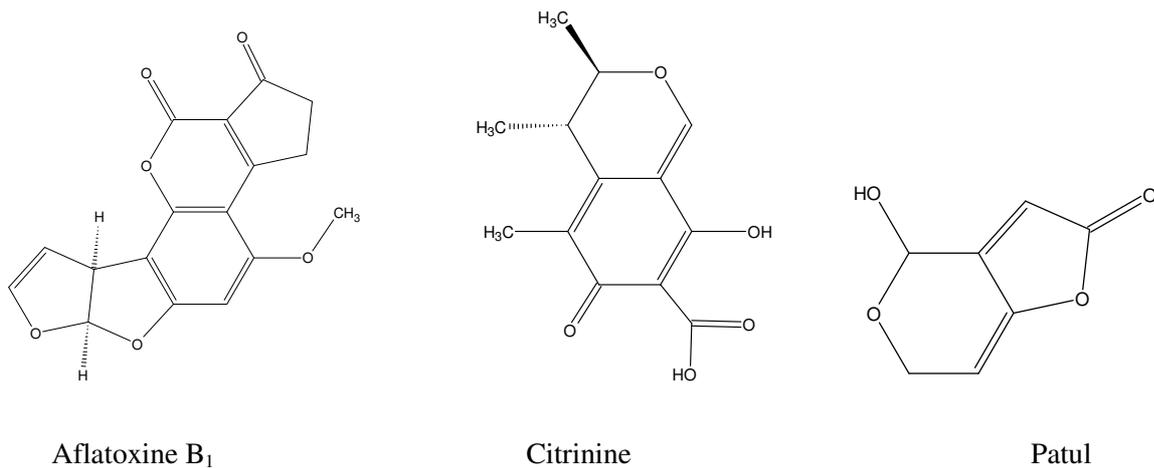
2.2.2. Autres mycotoxines

De toutes les mycotoxines, **les aflatoxines**, en principal B1, sont étudiées pour leur caractère fortement hépatotoxique. La structure de la molécule C₁₇H₁₂O₆ est donnée sur la figure 13. Certaines espèces du genre *Aspergillus* et notamment *A. flavus* sont productrices de cette mycotoxine. Au Portugal, 27 souches productrices ont été isolées sur des raisins (Serra *et al*, 2005) ; au Liban ces souches peuvent atteindre 43.1% des souches isolées du raisin (El Khoury *et al*, 2008) et 23% en Tunisie (Melki Ben Fredj *et al*, 2009).

Il semble que les conditions climatiques ou le stade de maturation soient les facteurs principaux de la contamination du vin. Les teneurs en cette molécule sont très variables selon les auteurs : 22,6 mg.g⁻¹ de milieu pour El Khoury *et al* (2008) et seulement 21 à 54 µg.g⁻¹ pour Melki Ben Fredj *et al* (2009).

La patuline est une lactone de formule C₇H₆O₄ (Fig. 13) qui a été testée comme antibiotique vis-à-vis des champignons. Mais compte tenu de ses propriétés cancérigènes chez les animaux elle ne peut donc être utilisée d'un point de vue pharmaceutique. La patuline inhibe la levure de fermentation *Saccharomyces cerevisiae* mais elle est dégradée en partie par le dioxyde de soufre et totalement au cours de la fermentation alcoolique (Ough et Corison, 1980). Sa présence dans les vins est donc peu probable.

Cette mycotoxine est produite par plusieurs espèces appartenant aux genres *Penicillium* et *Aspergillus*. L'espèce *P. expansum* est connue pour être la responsable majeure de la synthèse de cette mycotoxine sur les raisins (Abrunhosa *et al*, 2001; Bragulat *et al*, 2008). *Penicillium griseofulvum*, espèce productrice de patuline a été aussi trouvée sur vignes (Bau *et al*, 2005a; Serra *et al*, 2005; Bragulat *et al*, 2008).



Figure

13 – Structures chimiques de trois mycotoxines

La citrinine dont la formule est $C_{13}H_{14}O_5$ (Fig. 13) a été isolée pour la première fois à partir de *Penicillium citrinium*. La citrinine est produite majoritairement par des espèces appartenant aux genres *Penicillium* spp. et *Aspergillus* spp. (*A. terreus*, *A. niveus*). *Penicillium citrinum*, principal producteur de la citrinine, a été isolé sur raisins (Bau *et al*, 2005a; Serra *et al*, 2006a; Bragulat *et al*, 2008). *Penicillium verrucosum*, fréquemment isolé dans les céréales, a également été ponctuellement signalé sur baies de raisin (Bau *et al*, 2005a; Bragulat *et al*, 2008) et est capable de produire cette mycotoxine (Samson et Frisvad, 2004; Bau *et al*, 2006; Bragulat *et al*, 2008). Cette dernière n'est pas dégradée au cours de la fermentation alcoolique et peut être très faiblement présente dans les vins. Toutefois, la présence faible des moisissures productrices sur les raisins ne constitue donc pas une source importante pour la contamination des vins.

3. Méthodes de lutte

Deux aspects de lutte peuvent être envisagés : les traitements œnologiques après constatation d'une vendange ou d'un moût contaminés ou les interventions au vignoble en prévention du développement des flores d'altérations.

3.1. Traitements œnologiques

Compte tenu d'une part de l'impact négatif de certains métabolites produits par les moisissures du raisin sur la qualité organoleptique (géosmine principalement) ou hygiénique (ochratoxine) et d'autre part de la dose réglementaire maximale autorisée dans les jus de raisin et vins de cette mycotoxine, il est nécessaire de trouver des moyens d'éliminer ou de diminuer la concentration de ces molécules dans le produit fini.

3.1.1. Actions vis-à-vis de la géosmine.

Aucune méthode œnologique curative et efficace n'est à ce jour autorisée par la législation européenne. Aussi une attention particulière doit être portée par le vinificateur aux opérations préfermentaires : tri de la vendange, réduction des phases de macération en vinification en rouge et pressurage direct des raisins sans macération pelliculaire en vinification en blanc. Le débourbage du moût ainsi obtenu avec la non réincorporation des bourbes permet de diminuer la concentration en (-)-géosmine. En rouge, la macération pré-fermentaire à chaud suivie d'un pressurage direct ou la macération finale à chaud permettent de réduire la concentration en géosmine des vins car la chaleur facilite l'hydrolyse de cette molécule en milieu acide (pH 3-4 du vin) (ITV France, 2005). Le lait entier à la dose de 1,5 litre par hL permet d'éliminer jusqu'à 60% des teneurs en géosmine du vin et l'huile de pépins de raisin à la dose de 0,5 litre par hL jusqu'à 80% (La Guerche, 2004). Ces deux traitements présentent une bonne efficacité mais ne sont pas autorisés par la réglementation européenne (Règlement (CE) N° 606/2009).

Ils ont été autorisés à titre expérimental par la DGCCRF en France, mais leur non-sélectivité occasionne des pertes aromatiques importantes dans les vins traités. Ils ne peuvent donc constituer qu'une mesure ponctuelle après autorisation préalable et en aucun cas une solution curative courante.

L'utilisation de charbon œnologique en cours de la fermentation alcoolique permet aussi de réduire la concentration en géosmine. Certains charbons peuvent être efficaces sans diminution trop importante de la couleur du vin.

Très récemment, des biomasses levuriennes utilisées comme biosorbants de la géosmine ont montré une réelle efficacité sélective dans la diminution de sa concentration. Selon la nature de la souche de levure et selon les traitements appliqués sur la biomasse récoltée, on peut avoir des taux de sorption de plus de 50% (Pradelles *et al*, 2009). Cette technique pourrait devenir une alternative intéressante mais des essais en conditions naturelles doivent maintenant être réalisés.

3.1.2. Actions vis-à-vis de l'ochratoxine (OTA)

Le débouillage des moûts de raisins et la fermentation alcoolique permettent de réduire la concentration en OTA du vin jusqu'à des valeurs de 50% (Cecchini *et al*, 2006) voire 86% (Ponsone *et al*, 2009). Comme aucune métabolisation de cette molécule n'a lieu pendant la fermentation, cette diminution de la teneur en OTA est supposée se faire par adsorption sur les levures. A ce jour, différents essais de sorption de l'OTA sur les parois des micro-organismes du vin sont à l'étude en milieu modèle. Les parois de levures préalablement traitées thermiquement à 85°C adsorbent significativement l'OTA du milieu (Numez *et al*, 2008). Les bactéries lactiques du vin peuvent aussi adsorber sur leurs parois 8 à 28% de l'OTA présent dans le milieu (Del Prete *et al*, 2007).

La capacité des espèces *Aspergillus niger* et *Aspergillus japonicus* à éliminer l'OTA a été montrée par sa dégradation en ochratoxine alpha (Ota), composé moins toxique (Bejaoui *et al*, 2006b) et par adsorption sur les spores mortes ou vivantes (Bejaoui *et al*, 2005).

Le collage a peu d'effet significatif sur la teneur en OTA (Rousseau, 2003). Les traitements des vins à l'aide de charbons œnologiques ou à l'aide de caséinate de potassium permettent d'éliminer jusqu'à 80% de la teneur en OTA (Castellari *et al.*, 2001). Mais ces traitements sont interdits en vins rouges et entraînent par ailleurs une diminution importante de la qualité organoleptique des vins traités.

Le traitement à l'aide de chitosane ou de chitane glucane d'origine fongique jusqu'à 500 g par hL est admis par l'OIV (Code International des pratiques œnologiques, 2010) afin de réduire la teneur en OTA des vins. Ce traitement n'est pas encore autorisé par la législation européenne.

D'une manière générale, le tri manuel de la vendange consistant à éliminer les grains contaminés par les moisissures permet de réduire la contamination du jus de raisin par ces métabolites secondaires ainsi que toutes les pratiques qui respectent au mieux l'intégrité des baies de raisin en évitant les macérations pré-fermentaires. Mais comme aucun traitement œnologique curatif n'est efficace à 100%, il apparaît donc primordial de limiter la contamination à tous les stades de la chaîne de production et principalement en luttant au vignoble le plus précocement possible par une limitation du développement des micro-organismes responsables (*Aspergillus* spp., *B. cinerea*, *Penicillium* spp.).

3.2. Lutte au vignoble

3.2.1. Influence des facteurs environnementaux

3.2.1.1 Les facteurs abiotiques

Le climat semble jouer un rôle essentiel sur le développement des champignons et notamment sur *B. cinerea*. Une pluviométrie importante pendant et après la floraison conditionnerait très précocement l'état physiologique de la pellicule la rendant plus vulnérable aux attaques de *Botrytis*. La grêle et les pluies violentes peuvent également occasionner des blessures sur baies qui peuvent être alors colonisées par différentes moisissures (Dubos, 2002).

Les vignobles septentrionaux, en raison de leurs conditions climatiques, semblent plus concernés par la contamination par *Penicillium* spp. que d'autres vignobles. De plus, ces contaminations peuvent varier à l'échelle de la micro-parcelle (mouillères, zones humides...). Les périodes chaudes (25°C) et humides (> 80%) 10 jours avant vendanges et pendant la récolte sont très favorables à l'apparition des *Penicillium* (ITV France, 2005). Par ailleurs, Belli *et al* (2006) ont mis en évidence une corrélation positive entre l'infection par *Aspergillus carbonarius* (entre 78 et 100% des isolats) et les températures dans le mois précédant l'échantillonnage. Par contre, aucune corrélation n'a été mise en évidence entre la pluviométrie, l'humidité et la présence de ces moisissures sur grappes.

3.2.1.2. Les facteurs biotiques

Les blessures parasitaires (tordeuses de la grappe, oïdium, guêpes, oiseaux), physiologiques (éclatement de baies lors de fortes pluies, maturité avancée), mécaniques (projection de débris lors de travaux mécaniques, rognage, effeuillage) peuvent permettre aux champignons d'altération de s'installer sur les baies blessées.

3.2.2. Les mesures prophylactiques

Des mesures prophylactiques peuvent être mise en place afin de limiter les facteurs favorisant le développement de ces champignons. Ainsi un palissage et un effeuillage bien menés peuvent permettre une diminution de l'entassement de la végétation et ainsi éviter la formation d'un microclimat favorable au développement de micro-organismes tels que *B. cinerea*, *Penicillium* spp.. Une lutte efficace contre les autres maladies ou ravageurs (oïdium, tordeuses de la grappe) générant des portes d'entrées pour ces micro-organismes sur la baie doit être envisagée.

3.2.3. La lutte chimique

Si la prophylaxie n'est pas suffisante, une lutte chimique doit être mise en place. A l'heure actuelle, 9 matières actives fongicides sont homologuées spécifiquement contre l'agent de la pourriture grise (Tableau VI). Les matières actives doivent être alternées au cours de la campagne de traitement.

Tableau VI : Matières actives homologuées en viticulture contre la pourriture grise

(source : Index phytosanitaire Acta, 2010 et e-phy.agriculture.gouv.fr)

Matière active	Familles chimiques	Stades d'application	Mode d'action
Boscalid	Carboxamides	Fin floraison ou fermeture de la grappe ou début véraison ou 3 semaines avant vendanges	Inhibition transport mitochondrial des électrons (succinate déshydrogénase)
Cyprodinil	Anilino-pyrimidines	Fin floraison ou fermeture de la grappe	Inhibition d'élongation des tubes germinatifs et des hyphes mycéliens
Fenhexamid	Hydroxy anilides	Fin floraison ou fermeture de la grappe ou début véraison ou 3 semaines avant vendanges	Inhibition croissance du tube germinatif-destruction apicale des filaments mycéliens
Fluazinam	Aminopyridines	Fin floraison ou fermeture de la grappe ou début véraison ou 3 semaines avant vendanges	Inhibition germination de spores (désorganisation production énergie au niveau des mitochondries)
Fludioxonil	Phenylpyrroles	Fin floraison ou fermeture de la grappe	Perturbation régulation du métabolisme cellulaire (inhibition d'une protéine kinase)
Iprodione	Imides cycliques	Fermeture de la grappe	Inhibition germination de spores ou développement du mycélium
Mepanipyrim	Anilino-pyrimidines	-	Perturbation croissance mycélienne
Pyriméthanol	Anilino-pyrimidines	Fin floraison ou fermeture de la grappe ou début véraison	Inhibition sécrétion enzymes nécessaires au processus d'infection
Thiophanate-méthyl	Benzimidazoles	-	Destruction du mycélium- stérilisation des formes fructifères

Les programmes de traitement varient selon les conditions météorologiques, les cépages et le stade de développement de la vigne. Pour obtenir une efficacité optimale contre *B. cinerea*, les traitements fongicides sont généralement appliqués aux quatre stades phénologiques du développement de la vigne reconnus pour être sensibles aux attaques du champignon : stade A : fin floraison - début de la nouaison, stade B : fermeture de la grappe, stade C : véraison, stade D : 3 à 4 semaines avant les vendanges (Fig. 14) :



Floraison



Nouaison



Fermeture de la grappe



Véraison

Figure 14 : Stades de développement de la vigne

Si, aucune substance active n'est homologuée sur moisissures, certaines matières actives utilisées pour lutter contre *Botrytis cinerea* peuvent limiter leur développement. En conditions de laboratoire (tests en boîtes de Pétri ou grappes contaminées), les matières actives cyprodinil ($C_{14}H_{15}N_3$), fluazinam ($C_{13}H_4Cl_2F_6N_4O_4$) et fludioxonil ($C_6H_{12}F_2N_2O_2$) ont présenté une efficacité sur des espèces de *Penicillium*. Au vignoble, les traitements réalisés avec ces mêmes matières actives permettent de réduire les teneurs en géosmine et en 2-isopropyl-3-méthoxypyrazine (IPMP) dans les vins (Drouillard *et al*, 2005). Grosbon *et al* (2009) ont également observé après étalement sur boîte une présence moins importante de moisissures sur raisins traités avec des anti-botrytis.

L'utilisation de fongicides de synthèse peut engendrer d'une part des risques pour l'homme et les organismes non cibles et, d'autre part l'apparition de résistance de certaines souches au vignoble (Leroux *et al*, 2002).

3.2.4. La lutte biologique

La lutte biologique consiste en l'utilisation d'organismes vivants ou de produits issus de ces organismes pour lutter contre les micro-organismes d'altération. Ces agents biologiques décrits dans la littérature sont principalement représentés par des bactéries appartenant aux genres *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Pantoea* et *Pseudomonas* et par des champignons non phytopathogènes (*Trichoderma* spp.), capables d'avoir une efficacité contre *B. cinerea* et/ou en même temps d'induire des réactions de défense de la vigne (Masih *et al*, 2001; Magnin-Robert *et al*, 2007; Trotel-Aziz *et al*, 2008; Gabriolotto *et al*, 2009). Ces agents non phytopathogènes peuvent agir directement sur l'agent phytopathogène, (i) par production de substances antibiotiques qui interfèrent avec la sporulation et la croissance mycélienne d'un large spectre de champignons, (ii) par compétition physique ou nutritionnelle (sucre, éléments minéraux...), (iii) par parasitisme ou (iv) bien indirectement par stimulation des réactions de défense de la plante.

A l'heure actuelle, seule une préparation est homologuée en lutte biologique contre *B. cinerea* ; il s'agit de Sérénade® Biofungicide à base de *Bacillus subtilis*.

4. Identification des moisissures

L'identification des nombreuses espèces fongiques susceptibles de coloniser les raisins est une étape importante afin d'estimer les populations présentes et d'évaluer les risques potentiels d'altération de la qualité des raisins (déviations organoleptiques ou production de mycotoxines).

4.1. Développement

Sous le terme non scientifique de « moisissures » on désigne des mycètes, plus particulièrement, des champignons filamenteux microscopiques, hétérotrophes. Les moisissures sont également saprophytes se développant sur et au détriment de matériaux inertes très variés (papiers, bois, aliments...). Le développement d'une moisissure comprend **une phase végétative** de croissance et de nutrition, et presque simultanément, **une phase reproductive** au cours de laquelle se forment des spores qui assurent la dispersion. La germination des spores est à l'origine de la forme végétative.

L'appareil végétatif, qui permet la croissance et le développement, **le thalle**, est composé de filaments appelés **hyphes** dont l'ensemble constitue un réseau: **le mycélium** (Fig. 15).

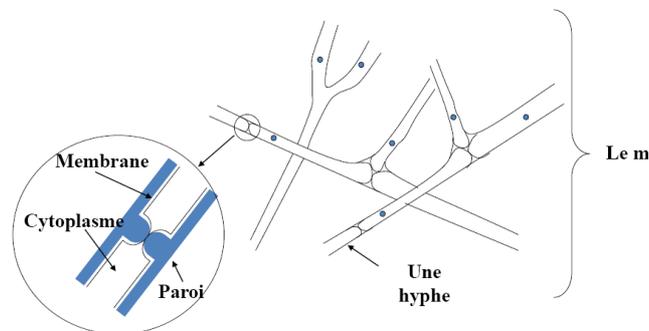


Figure 15 - Appareil végétatif des champignons microscopiques

([www.perigueux.u-](http://www.perigueux.u-bordeaux4.fr/gb/geniebio/microbio/tp8.pdf)

[bordeaux4.fr/gb/geniebio/microbio/tp8.pdf](http://www.perigueux.u-bordeaux4.fr/gb/geniebio/microbio/tp8.pdf))

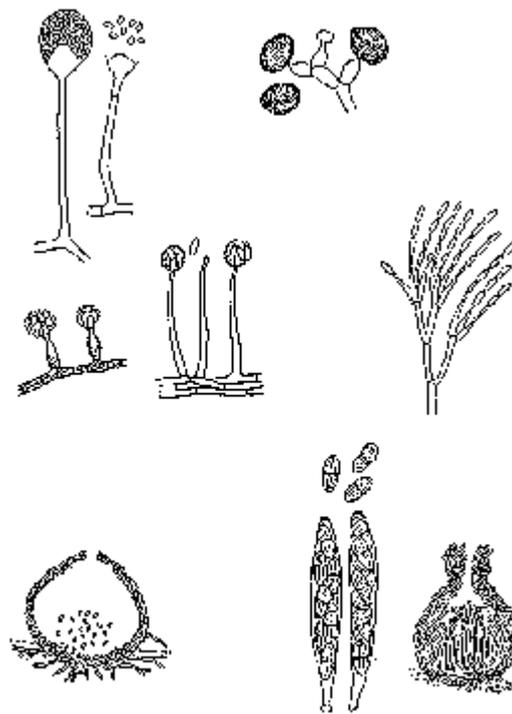
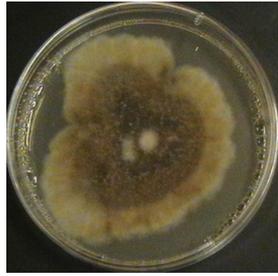


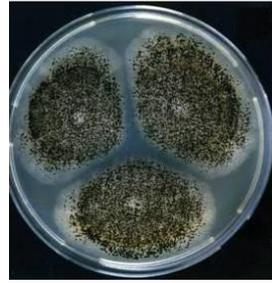
Figure 16 - Différents modes de groupement des spores de moisissures
(M- F Roquebert Muséum national d'histoire naturelle, 1997)

Celui-ci est parfois visible sous forme de petites tâches colorées à la surface de substrats moisissés. La colonisation du substrat est réalisée par extension et ramification des hyphes. L'accroissement de celles-ci s'effectue par le sommet, ou apex, siège des réactions de synthèse et dégradation du métabolisme dit "primaire", indispensable à la construction de la cellule du champignon. Les régions apicales des hyphes sont caractérisées par la présence de nombreuses vésicules cytoplasmiques contenant les enzymes et les précurseurs de synthèses de nouveaux polymères. Les produits du métabolisme "secondaire" non indispensables au fonctionnement de la cellule, sont plutôt stockés en région subapicale.

La reproduction des moisissures s'effectue par la formation de spores de manière sexuée et/ou asexuée. Les spores asexuées se forment au sein d'un même individu sans fusion de noyaux provenant de cellules différentes. Les spores sexuées sont, quant à elles, le résultat d'une reproduction sexuée. Les spores sont des cellules déshydratées au métabolisme réduit, entourées de parois protectrices épaisses qui les isolent du milieu ambiant. Elles peuvent survivre très longtemps, plusieurs mois à plusieurs années. C'est sous cette forme qu'elles sont dispersées puis se déposent sur de nouveaux supports. Lorsque les conditions environnementales deviennent favorables (augmentation de l'humidité principalement), elles germent et redonnent du mycélium qui reformera, à son tour, des spores. Certaines nécessitent un stimulus, généralement thermique, pour germer (Madelin, 1966). De simples petits fragments de mycélium peuvent également se régénérer et redonner une colonie. Les spores se forment à partir du mycélium selon des processus plus ou moins différenciés mais en tous cas très variés. Elles peuvent être solitaires, groupées en chaînes ou en têtes, portées à la surface du mycélium ou contenues dans des enveloppes cellulaires (Fig. 16). L'identification des moisissures repose principalement sur leur mode de formation et de groupement sur le mycélium.



Alternaria spp.



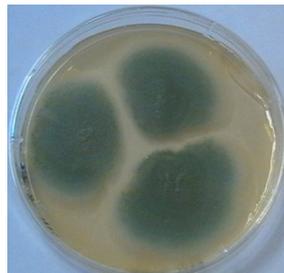
Aspergillus spp.



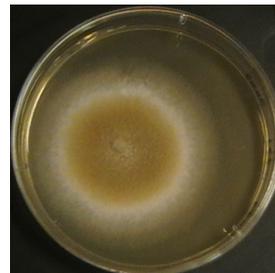
Botrytis spp.



Cladosporium spp.



Penicillium spp.



Epicoccum spp.



Fusarium spp.



Trichoderma spp.

Figure 17 - Observations macroscopiques de genres fongiques isolés sur raisins (source personnelle)

Dans la mesure où toutes les espèces n'ont pas les mêmes caractères physiologiques ni les mêmes exigences écologiques, leur identification précise est très importante. Elle peut donner des indications précieuses sur l'origine de la contamination et par la suite permettre d'adapter un traitement efficace.

4.2. Techniques d'identification

Conventionnellement, l'identification des genres fongiques repose sur l'observation de critères morphologiques : d'une part par l'observation macroscopique du mycélium (aspect, couleur et odeur des colonies) et d'autre part, par une observation microscopique des structures reproductrices.

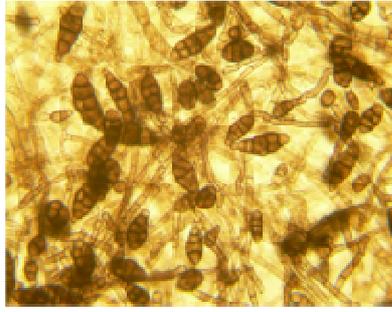
4.2.1. Critères d'identification macroscopique

L'aspect des colonies : les colonies peuvent être duveteuses (*Epicoccum* spp., *Alternaria* spp.), laineuses, cotonneuses, veloutées (*Cladosporium* spp.), poudreuses ou granuleuses; parfois certaines colonies peuvent avoir une apparence glabre (absence ou pauvreté du mycélium aérien) (Fig. 17).

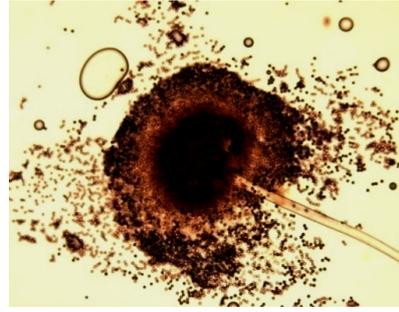
Le relief des colonies : les colonies peuvent avoir un aspect plat (*Cladosporium* spp.) ou plissé (*Aspergillus* spp., *Penicillium* spp.) et la consistance des colonies est variable (molle, friable, élastique ou dure).

La taille des colonies: les colonies peuvent être petites 3-3.5 cm (*Cladosporium* spp.) ou étendues 4-5 cm (*Aspergillus* spp., *Penicillium* spp.), envahissantes (*Botrytis* spp., *Fusarium* spp., *Trichoderma* spp.) (Fig. 17).

La couleur des colonies est un élément très important d'identification; les colonies peuvent être de couleur blanche, crème, jaune, orange, verte, brune allant jusqu'au noir (Figure 17). Les pigments peuvent être localisés au niveau du mycélium (*Aspergillus* spp., *Penicillium* spp.) ou diffuser dans le milieu de culture (*Fusarium* spp.).



Alternaria spp.



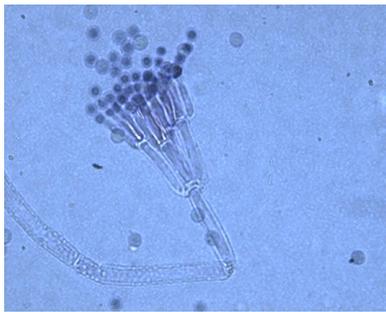
Aspergillus spp.



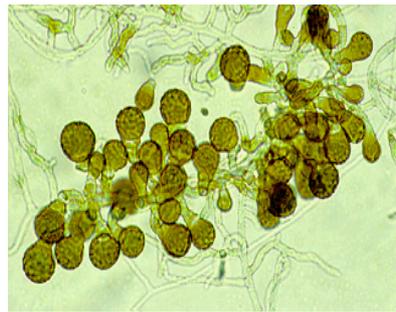
Botrytis spp.



Cladosporium spp.



Penicillium spp.



Epicoccum spp.



Fusarium spp.



Trichoderma spp.

Figure 18 -Observations microscopiques de genres fongiques isolés sur raisins
(www.wikipedia.org)

4.2.2. Critères d'identification microscopique

L'examen microscopique d'une colonie fongique se fait après réalisation d'un étalement entre lame et lamelle. Généralement, un examen à l'objectif 40 est suffisant pour mettre en évidence la plupart des éléments importants à identifier. Les observations microscopiques permettant l'identification des moisissures sont fondées sur les types de spores. En laboratoire, la plupart des organismes ne produisent que des spores axesuées, l'identification est fondée sur l'examen de ces dernières.

Les spores peuvent être unicellulaires et de petite taille (*Penicillium* spp., *Aspergillus* spp.), bicellulaires (*Trichothecium* spp.), pluricellulaires à cloisons transversales et longitudinales (*Alternaria* spp.) ou étroites, effilées, incurvées et cloisonnées transversalement (*Fusarium* spp.) (Fig. 18).

Cette identification sur critères morphologiques nécessite une expérience confirmée dans la taxonomie des champignons et s'avère longue et fastidieuse. De plus, les caractéristiques morphologiques et physiologiques sont influencées par les conditions de culture et peuvent amener à de mauvaises identifications. Une identification plus complète peut-être obtenue par séquençage.

4.2.3. Tests biochimiques

Des tests biochimiques peuvent également être utilisés pour caractériser les moisissures tels que les tests en galerie API (20C ou ID 32C) ou les tests en plaque BiologTM. La technologie BiologTM utilise des microplaques 96 puits prêtes à l'emploi avec 95 substrats carbonés de 6 à 8 classes différentes pour une meilleure discrimination. La capacité d'un isolat à métaboliser chaque substrat est mesurée par la présence ou l'absence d'une coloration rouge pour les champignons filamenteux. Cette coloration est due à l'oxydation du iodinitrotetrazolium par la respiration cellulaire des micro-organismes (Fig. 19). Le virage de certains puits crée une empreinte phénotypique qui est analysée par le logiciel pour identifier ou caractériser un organisme.

Mais l'utilisation de ces tests Biolog s'accompagne souvent d'observations macroscopiques et microscopiques.

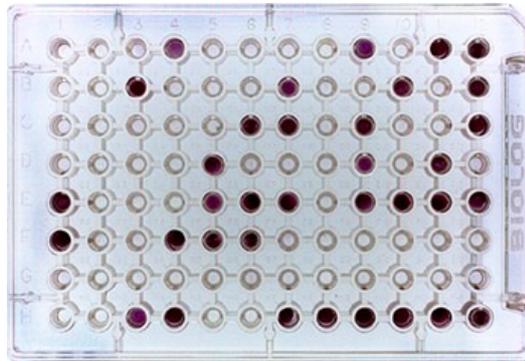


Figure 19 - Exemple de profil phénotypique en plaque Biolog

L'identification conventionnelle ou biochimique des moisissures ne permet pas une identification fiable et nécessite souvent une confirmation d'identification par séquençage. C'est pourquoi, de nombreuses méthodes moléculaires d'identification ont été développées afin de permettre une meilleure spécificité d'identification des moisissures et de diminuer la durée de l'identification sans passer par une étape de séquençage.

4.3. Méthodes d'identification par biologie moléculaire

L'apparition de la biologie moléculaire basée sur l'analyse directe de l'ADN a permis de développer des méthodes d'identification des micro-organismes plus fiables et plus spécifiques.

Ces méthodes moléculaires sont universellement applicables et permettent d'explorer le polymorphisme à différents niveaux (genre, espèces, souches). Les avantages de ces techniques sont les suivants : rapidité, discrimination et reproductibilité, certaines permettent même une quantification des micro-organismes. De plus, ces méthodes ne sont pas influencées par les conditions de cultures des micro-organismes

4.3.1. Les régions d'ADN cibles

Afin d'être le plus discriminant possible, il est nécessaire de choisir des régions cibles d'ADN comportant des séquences conservées chez tous les micro-organismes d'intérêts pouvant être utilisées pour l'hybridation des amorces mais également des séquences variables spécifiques d'un genre, d'une espèce voire d'une souche. La difficulté repose également sur le fait que chez les mycètes, certains genres tels *Penicillium* ou *Aspergillus* sont très conservés (91-99% d'identité de séquence, Fig. 20) augmentant ainsi les difficultés pour leur différenciation.

SeqA Name	Len(nt)	SeqB Name	Len(nt)	Score
1 AF218786_P.expansum	584	2 AY213669_P.chrysogenum	585	98
1 AF218786_P.expansum	584	3 AY373915_P.glabrum	578	91
1 AF218786_P.expansum	584	4 AY373933_P.spinulosum	576	92
1 AF218786_P.expansum	584	5 AJ877045_P.brevicompactum	576	93
2 AY213669_P.chrysogenum	585	3 AY373915_P.glabrum	578	93
2 AY213669_P.chrysogenum	585	4 AY373933_P.spinulosum	576	93
2 AY213669_P.chrysogenum	585	5 AJ877045_P.brevicompactum	576	94
3 AY373915_P.glabrum	578	4 AY373933_P.spinulosum	576	99
3 AY373915_P.glabrum	578	5 AJ877045_P.brevicompactum	576	92
4 AY373933_P.spinulosum	576	5 AJ877045_P.brevicompactum	576	92

Figure 20 - Alignement de séquences ITS pour différentes espèces de *Penicillium* et identité de séquence (<http://srs.ebi.ac.uk>)

Bien que l'ADNr 18S présente ces caractéristiques et permette de différencier des champignons de différents groupes taxonomiques, cette région ne semble pas appropriée pour une bonne différenciation des espèces au sein d'un même genre (Bruns *et al*, 1991). En effet, cette région entraîne des biais dans l'interprétation étant donné que des séquences de l'ADNr 18S présente une importante similarité avec d'autres Eucaryotes n'appartenant pas aux champignons (Smith *et al*, 1999 ; Anderson *et al*, 2003).

Ainsi la région ITS (Internal Transcribed Spacers) est préférentiellement utilisée par les taxonomistes pour une identification des espèces fongiques (Bruns *et al*, 1991 ; Hibbett *et al*, 2005 ; Geiser *et al*, 2007).

La séquence ITS1-5.8S-ITS2, décrite par White *et al* (1990) a été utilisée par de nombreux auteurs car elle présente une région conservée chez la majorité des espèces fongiques et des régions variables qui permettent son utilisation pour des études de population et/ou de phylogénie des champignons filamenteux (White *et al*, 1990 ; Accensi *et al*, 1999; Skouboe *et al*, 1999; Henry *et al.*, 2000; Colombo *et al*, 2003; La Guerche *et al*, 2004; González-Salgado *et al*, 2005; Patiño *et al*, 2005; Doaré-Lebrun *et al*, 2006; Dupont *et al*, 2006; Martínez-Culebras et Ramon, 2007; Dachoupankan *et al*, 2009; Gil-Serna *et al*, 2009) (Fig. 21).

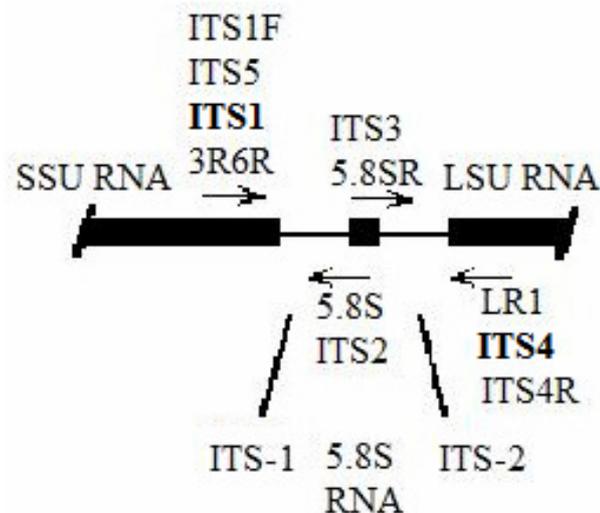


Figure 21 - Représentation schématique des principales amorces utilisées pour l'amplification de la région ITS1-5.8S- ITS2

(Source <http://www.biology.duke.edu/fungi/mycolab/primers.htm>)

Plus récemment, d'autres régions cibles ont été utilisées, notamment des séquences de la région correspondant au gène de la β -tubuline (*benA*) riches en introns où le taux de variabilité semble approprié pour une discrimination au sein de genres conservés tels que *Aspergillus* ou *Penicillium* (Geiser *et al*, 2000 ; Samson *et al*, 2004 ; Varga *et al*, 2007 ; Laforgue *et al*, 2009).

Seifert *et al* (2007) ont décrit l'application d'un système de « DNA barcoding region » (mitochondrial cytochrome c oxydase *COI*) développé chez les animaux et applicable pour l'identification de champignons du genre *Penicillium*. Marek *et al* (2003) ont utilisé une séquence du gène *pepg1* (polygalacturonase gene) pour détecter spécifiquement *P. expansum*.

Concernant la détection spécifique de champignons mycotoxinogènes, des régions cibles correspondant à des gènes impliqués dans la voie de biosynthèse des mycotoxines ont été utilisées. Le gène *otapksppN* (ochratoxine polyketide synthase) impliqué dans la production d'OTA a été identifié chez *A. ochraceus* (O'Callaghan *et al*, 2003), *P. nordicum* (Geisen *et al*, 2004) et *A. carbonarius* (Atoui *et al*, 2006). A partir de ce gène, Dao *et al* (2005) ont pu détecter soit spécifiquement *A. ochraceus*, soit à la fois des producteurs d'ochratoxine A et des producteurs de citrinine. D'autres auteurs ont utilisé ce gène afin de détecter et quantifier *A. carbonarius* présent sur baies de raisins (Atoui *et al*, 2007 ; Selma *et al*, 2008).

4.3.2. Méthodes moléculaire « culture dépendante »

Par la seule amplification d'une région cible, différentes moisissures peuvent être discriminées. Ainsi, avec l'utilisation d'amorces spécifiques de la séquence ITS1-5.8S-ITS2, plusieurs espèces du genre *Aspergillus* appartenant à la section *Nigri* (*A. japonicus*, *A. heteromorphus*, *A. ellipticus*) et deux espèces morphologiquement difficiles à différencier (*A. niger* et *A. tubingensis*) ont pu être discriminées (González-Salgado *et al*, 2005). De même, les travaux de Patiño *et al* (2005) ont permis la différenciation de deux espèces ochratoxigènes appartenant au genre *Aspergillus* : *A. ochraceus* et *A. carbonarius*.

A partir de la même région cible (ITS1), La Guerche *et al* (2004) ont caractérisé, par PCR suivi d'un séquençage, différentes espèces de *Penicillium* isolées de baies de raisins.

A partir de deux paires de primers CARBO1/2 et JAPO1/2 issus du gène codant pour la calmoduline, Perrone *et al* (2004) ont pu détecter et différencier sur raisins *A. carbonarius* et *A. japonicus*, espèces productrices d'OTA.

Toutefois, la seule amplification d'une région cible ne permet pas de distinguer spécifiquement différentes espèces fongiques ou, avec en complément, une étape de séquençage et de recherche dans les bases de données pour finaliser l'identification.

A partir de ce constat, d'autres techniques moléculaires plus discriminantes ont été développées. Ne seront détaillées ici que les principales techniques utilisées pour l'identification des mycètes.

- La technique *Restriction Fragment Length Polymorphisms (RFLPs)* est une technique basée sur la présence ou non de sites de restriction. Après extraction d'ADN, celui-ci est digéré par une endonucléase et les fragments obtenus sont séparés par électrophorèse. Après transfert sur membrane, l'hybridation avec une sonde spécifique permet d'obtenir des profils et d'analyser le polymorphisme. De Valk *et al* (2008) ont montré le pouvoir discriminant de cette technique au sein du genre *Aspergillus*.

Bien que robuste avec un bon pouvoir discriminant, reproductible et ne nécessitant pas de connaître précisément les séquences d'ADN, la technique RFLP nécessite des quantités importantes d'ADN, une certaine technicité et une banque de sondes appropriée. Cette technique est assez coûteuse et consommatrice de temps (Fig. 22).

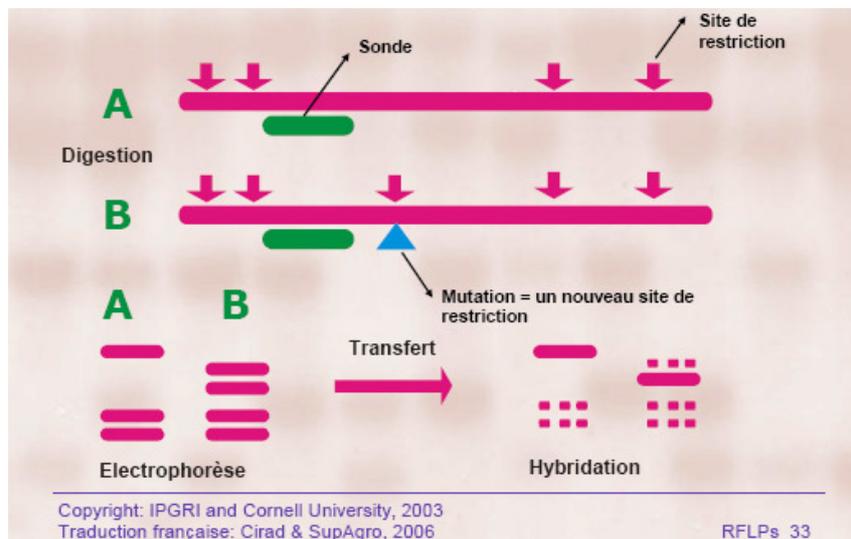


Figure 22 - Principe de la technique RFLP

- La technique *Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)* est une technique de PCR aléatoire permettant d'amplifier des segments d'ADN génomique avec des amorces d'oligonucléotides non spécifiques. Une seule amorce (6 à 10 mers) peut-être utilisée et la taille de l'élongation est aléatoire (Fig. 23). Cette méthode a été décrite pour différencier plusieurs souches de *Penicillium roquefortii* en industrie fromagère (Geisen *et al*, 2001), pour différencier des souches d'*A. carbonarius* productrices et non-productrices d'OTA (Bau *et al*, 2005b) ou pour différencier *A. carbonarius* de *A. niger* aggregat (Dachoupakan *et al*, 2009).

La technique RAPD bien que facile de mise en œuvre, ne nécessitant pas de quantités importantes d'ADN ni le besoin de connaître la séquence de l'ADN cible, présente une faible résolution et une reproductibilité moyenne. Elle nécessite la standardisation de la méthode d'extraction d'ADN, d'amplification et de la visualisation des fragments obtenus.

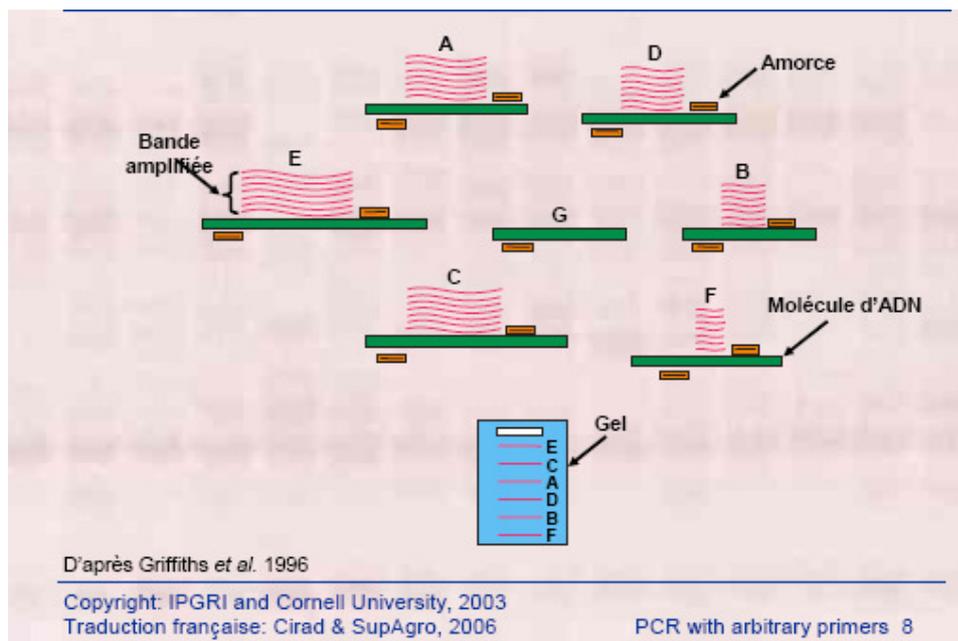
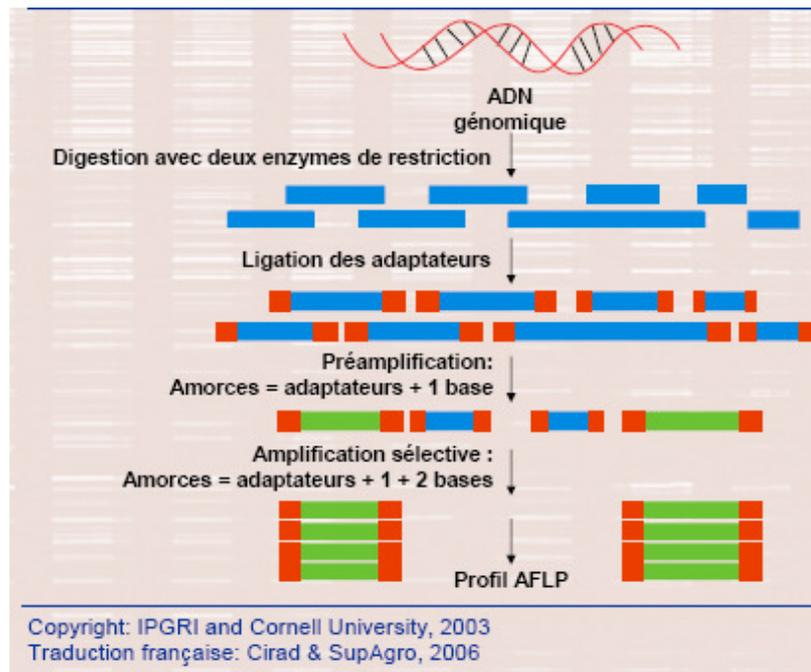


Figure 23 - Principe de la technique RAPD

- La technique *Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)* est une combinaison des techniques PCR et RFLP. Après digestion par deux endonucléases, l'ADN génomique subit une ligation d'adaptateurs spécifiques compatibles avec les extrémités générées par les digestions enzymatiques. Ces adaptateurs permettent ensuite l'hybridation d'amorces spécifiques. On obtient ainsi des profils constitués de plusieurs dizaines de bandes distinctes, analysés par exemple sur gel de polyacrylamide (Fig. 24).



Perrone *et al* (2006) ont évalué, par cette méthode, le lien génétique entre différentes espèces du genre *Aspergillus* (*A. carbonarius*, *A. tubingensis* et *A. niger*) isolées à partir de raisins. Oliveri *et al* (2008) ont développé une technique AFLP fluorescente (fAFLP) pour l'analyse de 40 souches du genre *Aspergillus* spp. (*A. niger*, *A. tubingensis*, *A. carbonarius* et *A. japonicus*) afin de discriminer différentes espèces ou de vérifier la présence de populations mixtes dans une même région viticole.

L'AFLP permet un balayage rapide du génome complet pour identifier des polymorphismes.

La mise en œuvre ne nécessite pas d'information préalable au niveau des séquences d'ADN et les résultats sont reproductibles. En revanche, cette technique génère des quantités d'informations importantes pouvant nécessiter des technologies informatiques (automatisation) et demande une technicité élevée.

- La technique *PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP)* ou *Cleaved Amplified Polymorphic Sequence (CAPS)* consiste à amplifier un fragment d'ADN génomique qui est ensuite digéré par des enzymes de restriction : des profils électrophorétiques polymorphes sont ainsi obtenus et peuvent être comparés (Fig. 25).

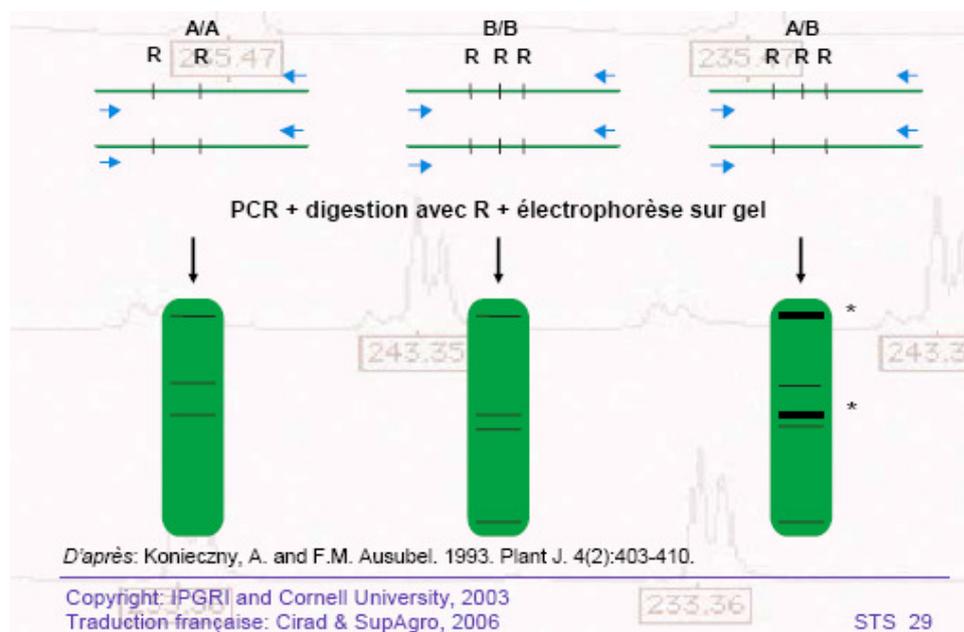


Figure 25 - Principe de la technique PCR-RFLP

Cette technique, plus particulièrement ciblée sur la région ITS (PCR ITS-RFLP) a été largement décrite pour discriminer différents mycètes. A l'aide de 3 endonucléases, Esteve-Zarzoso *et al* (1999) ont discriminé 132 espèces levuriennes appartenant à 25 genres différents. 173 souches de *Apergillus niger agrégats*, isolées de différentes régions ont pu être différenciées en utilisant une endonucléase (Bau *et al*, 2006).

Martínez-Culebras et Ramón (2007) ont discriminé les espèces *A. niger*, *A. tubingensis*, *A. carbonarius* et *A. aculeatus* par PCR ITS-RFLP à l'aide de 3 endonucléases.

Dean *et al* (2005) ont utilisé une combinaison de 4 endonucléases pour discriminer les genres *Stachybotrys*, *Penicillium*, *Aspergillus* et *Cladosporium* au niveau de l'espèce. Par cette technique PCR ITS-RFLP (en utilisant une combinaison de 5 enzymes de restriction), 60 souches représentant 13 espèces de *Penicillium* ont été étudiées. 35 souches ont été identifiées spécifiquement. Mais certaines d'entre elles demeurent non différenciables : *Penicillium purpurogenum* var. *rubrisclerotium* et *P. funiculosum* par exemple (Dupont *et al*, 2006).

L'étude du polymorphisme d'une séquence du gène de la β -tubuline a permis de discriminer *P. camembertii* de *P. chrysogenum* tandis que *P. nalgiovenses* n'a pu être différencié de *P. chrysogenum* (Dupont *et al*, 1999).

Garcia *et al* (2006) ont développé un test, le test CAPS, basé sur la différenciation d'espèces de *Penicillium* en fonction de profils de restriction d'une sous-unité de l'ADNr mitochondrial. Grâce à ce test, il est possible de distinguer spécifiquement *P. expansum* des autres espèces.

La PCR-RFLP est une technique robuste permettant d'obtenir des résultats précis, reproductibles et simples à analyser. Mais elle requiert un minimum d'informations sur les séquences cibles afin de définir des amorces spécifiques et de choisir des endonucléases les plus discriminantes.

Les techniques décrites ci-dessus peuvent être appliquées pour l'identification de champignons après culture et isolement sur milieux de culture. Cette étape de culture peut cependant sous-estimer la diversité de l'échantillon à analyser en ne révélant que la microflore viable et cultivable. Certains micro-organismes peuvent se retrouver dans l'incapacité à se développer en dehors de leurs milieux naturels. Ainsi par ces techniques, la diversité fongique ne peut-être évaluée (prédominance, inhibition...).

D'autres méthodes ont ainsi été développées pour étudier la diversité des communautés fongiques dans leur environnement.

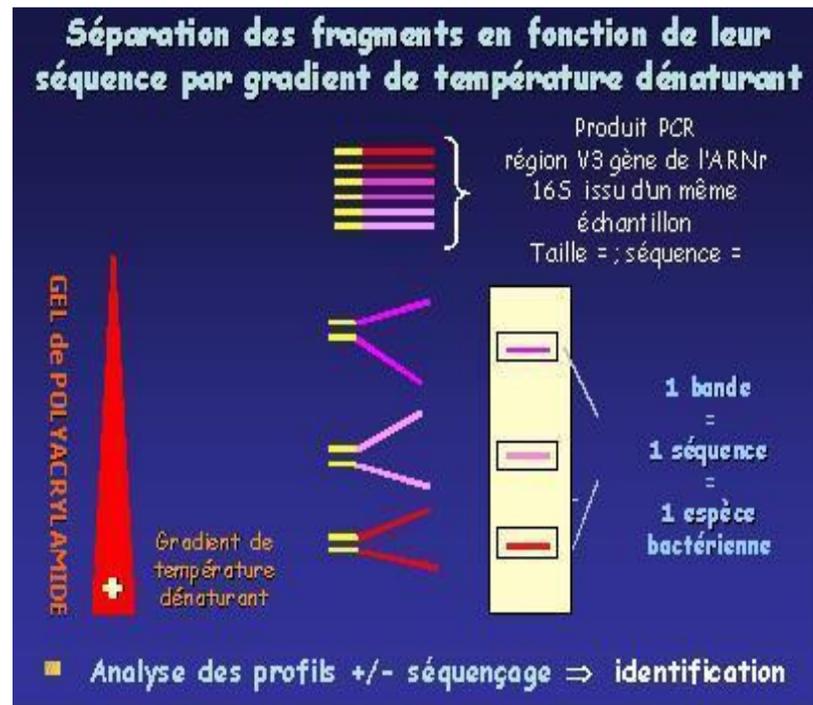


Figure 26 –Principe de la technique TTGE

4.3.3. Méthodes moléculaire « culture indépendante »

Des méthodes moléculaires basées sur l'analyse directe de l'ADN sans étape de culture ont été développées pour étudier les communautés microbiennes : la technique PCR-TTGE (Temporal Temperature Gel Electrophoresis) et la PCR-DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) (Muyzer *et al*, 1993). Ces 2 techniques ont pour principe de séparer par électrophorèse en conditions dénaturantes des fragments d'ADN double brin amplifiés ayant la même taille mais de séquences nucléotidiques différentes. Des profils contenant un certain nombre de bandes correspondant au nombre d'espèces prédominantes de l'échantillon sont ainsi obtenus. Afin d'obtenir des informations supplémentaires sur les communautés présentes, les bandes peuvent être excisées du gel et séquencées (Ferris *et al*, 1996) ou transférées sur membrane de nylon et hybridées avec des sondes spécifiques (Muyzer *et al*, 1993). Ces techniques ont été utilisées dans un premier temps pour décrire des écosystèmes bactériens tels que le sol, l'eau mais aussi les produits laitiers, carnés (Muyzer *et al*, 1995; Felske *et al*, 1996; Cocolin *et al*, 2001; Ogier *et al*, 2002). Plus récemment, ces techniques ont été appliquées à l'étude des communautés fongiques dans des écosystèmes tels que le sol, la rhizosphère, le compost et le vin (Smith *et al*, 1999; Van Elsas *et al*, 2000; Marshall *et al*, 2003; Prakitchaiwattana *et al*, 2004).

- La technique *PCR-TTGE* consiste en une migration de fragments d'ADN sur gel d'acrylamide et la dénaturation en fonction d'un gradient de température (Fig. 26). Cette méthode a été utilisée pour étudier la diversité d'espèces levuriennes en milieu vin (Hernán-Gómez *et al*, 2000). Récemment, Doaré-Lebrun *et al* (2006) ont étudié par PCR-TTGE (région ITS1) la diversité d'espèces fongiques, en particulier de différentes espèces de *Penicillium* spp., présentes à la surface de baies de raisins.

- La technique *PCR-DGGE* consiste, quant à elle, en une migration d'ADN sur gel d'acrylamide et la dénaturation en fonction d'un gradient chimique d'urée-formamide (Fig. 27). Cette technique a été utilisée pour étudier les populations fongiques présentes sur vitraux (Schabereteir-Gurtner *et al*, 2001) ou sur des objets d'art (Möhlenhoff *et al*, 2001) et pour caractériser l'impact d'un fongicide sur la population microbienne du sol (Sigler et Turco, 2002). Renouf *et al* (2007) a utilisé la PCR-DGGE dans l'étude de l'évolution de la microflore bactérienne et levurienne durant l'élaboration du vin. Récemment, Laforgue *et al* (2009) ont étudié, par PCR-DGGE (gène *benA*) les communautés fongiques présentes sur grappes.

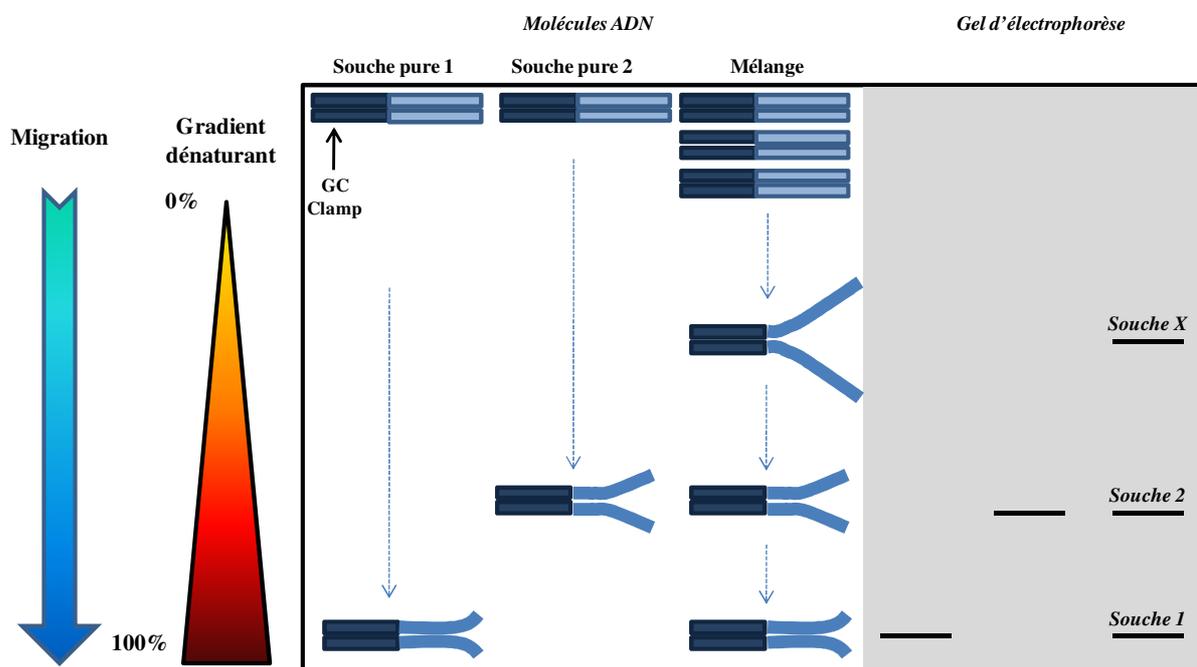


Figure 27 - Principe de la technique DGGE

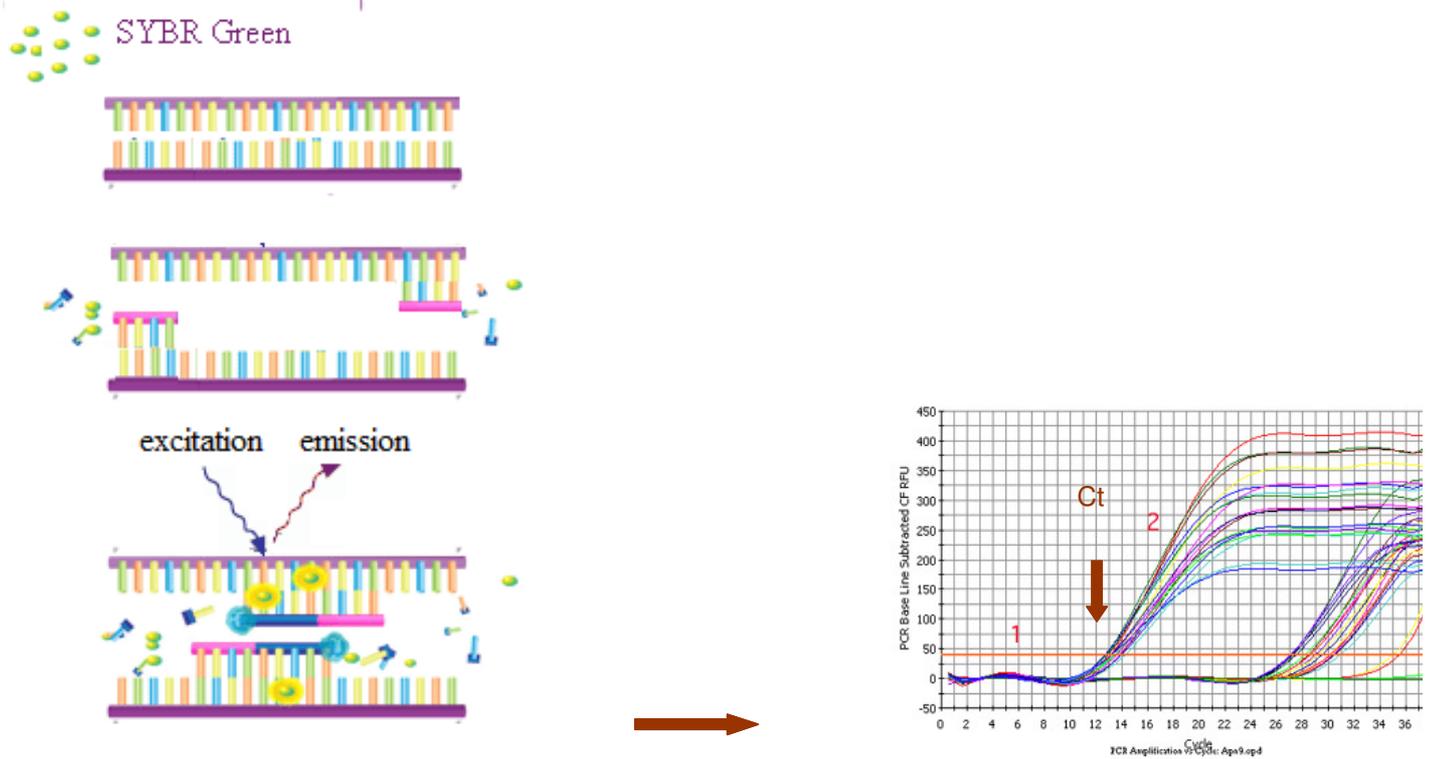


Figure 28 - Principe de la technique qPCR-Marquage non spécifique SYBR Green
(Source www.sigmaaldrich.com)

Ces deux méthodes présentent l'avantage de pouvoir avoir accès à la diversité de micro-organismes dans leur environnement sans passer par des étapes de culture. Le choix de l'ADN cible est primordial pour obtenir un fort pouvoir discriminant (Laforgue *et al*, 2009). Concernant l'étude plus spécifique des communautés fongiques, notamment des moisissures présentes sur baies de raisins, des incertitudes d'identification (co-migration de fragments) subsistent et peu d'études ont été entreprises. Ces méthodes demandent une certaine technicité dans l'interprétation des profils et un investissement important (appareillage, réactifs).

4.4. Méthodes de détection et de quantification moléculaire « culture indépendante »

Afin de pouvoir anticiper le développement de flores susceptibles d'altérer la qualité de la vendange ou du moût, il est non seulement nécessaire de pouvoir identifier les micro-organismes responsables d'altération ou de défauts organoleptiques mais également de pouvoir les détecter précocement et de les quantifier afin d'estimer les risques.

La PCR en temps réel ou *PCR quantitative* (qPCR) permet de répondre à ces attentes. En effet, cette technique est basée, après extraction, sur la détection et la quantification d'un reporter fluorescent dont l'émission est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons générés pendant la réaction de PCR. (Fig. 28). L'aspect quantitatif réside dans la détermination du Ct (« *cycle threshold* » ou « *crossing point* ») qui correspond au nombre de cycle à partir duquel le signal de fluorescence dépasse le bruit de fond du détecteur de fluorescence (Fig. 28). Il existe deux principes généraux pour la détection quantitative des amplicons : les agents se liant à l'ADN double brin (ex. SYBR Green I) et les sondes fluorescentes. La PCR en temps réel est un outil puissant à l'heure actuelle largement utilisée dans différents domaines (expression de gènes, détection de mutations, génotypage, détection et quantification d'agents pathogènes, quantification d'ADN et d'ARN). Plus spécifiquement, la PCR quantitative a été utilisée afin de détecter et quantifier *Botrytis cinerea* présent dans les tissus de plantes infectés (Suarez *et al*, 2005).

En milieu vin, cette technique a été aussi utilisée afin de détecter et quantifier les populations levuriennes présentes (Hierro *et al*, 2006) ou de quantifier spécifiquement la levure d'altération *B. bruxellensis* (Agnolucci *et al*, 2007; Tessonnière *et al*, 2009). Cette technique a été aussi appliquée à la détection et la quantification de flores fongiques d'altération telles que *A. carbonarius* sur baies de raisins (Mulè *et al*, 2006; Atoui *et al*, 2007; Selma *et al*, 2008), *A. ochraceus* et *A. westerdijkiae* sur baies et grains de café vert (Gil-Serna *et al*, 2009). Le Dréan *et al* (2010) ont développé cette technique pour détecter *Penicillium camemberti* et *Penicillium roqueforti* et pour surveiller la croissance et la dynamique de croissance du mycélium au cours de la maturation du caillé et à la surface des fromages.

La qPCR est une méthode largement employée, robuste et reproductible. Elle nécessite toutefois une étape de calibration (standard interne, courbes étalons) et un investissement en matériel. De plus, étant donnée que cette technique s'applique sur du matériel génétique extrait directement à partir d'échantillon, l'amplification se réalise sur du matériel issu de micro-organismes aussi bien vivants que morts. Il semble nécessaire de pouvoir mettre en corrélation les résultats obtenus avec des analyses de microbiologie classique afin de s'affranchir d'une détection et d'une quantification surestimées.

Une perte de récolte liée à la propagation de moisissures sur baies ou l'altération de moûts de raisin suite à la présence de composés odorants ou toxinogènes ne peut être tolérée en vinification car ceci conduit à des pertes économiques pouvant être importantes. La lutte contre les défauts organoleptiques causés par le développement des moisissures doit être abordée au vignoble car en cuverie les traitements œnologiques diminuent trop souvent les qualités organoleptiques des vins traités. Or peu de données existent actuellement sur les moisissures présentes sur baies de raisin à la fois sur leur nombre et sur les espèces présentes. En effet, les études scientifiques d'écologie microbienne sur raisin ont surtout portées sur les micro-organismes d'intérêt technologique : levures de vinification, *Saccharomyces*, non-*Saccharomyces*, *Oenococcus*...) ou des levures d'altération telle *Brettanomyces*.

La caractérisation et l'identification des moisissures restent encore difficiles par les techniques classiques de microbiologie, il apparaît donc nécessaire de développer des outils moléculaires d'identification et de détection de ces micro-organismes. Une connaissance précoce des espèces de moisissures présentes sur les baies au cours de la maturation du raisin et leur quantification permettrait à la filière vitivinicole de pouvoir lutter plus efficacement contre ces micro-organismes.

Pour ces raisons, nous avons axé nos recherches sur l'identification et la détection des moisissures présentes sur baies de raisins.

Chapitre 2

Matériels et Méthodes

Tableau VII - Composition des milieux de culture

Milieux	DRBC	MEA	PDA/PDB	YPD	LB
	Dichloran Rose Bengale Chloramphénicol Agar	Malt-Extract Agar		Yeast extract Peptone glucose	Luria-Bertani
Utilisation	Dénombrement des moisissures	Isolement et conservation des moisissures	Culture et conservation des moisissures	Culture et conservation des levures	Culture cellules compétentes <i>E. coli</i>
Composition pour 1L	Glucose 10 g Hydrogénophosphate dipotassique 1 g Bacto-peptone 5 g Sulfate de magnésium, 7 H ₂ O 0.5 g Dichloran 2 mg Rose Bengale 3 mg Molybdate de potassium 16.6 mg Borate de sodium, 10 H ₂ O 16.6 mg Nitrate de cobalt, 6 H ₂ O 16.6 mg Sulfate de cadmium, H ₂ O 16.6 mg Sulfate de cuivre, 5 H ₂ O 16.6 mg Sulfate de zinc, 7 H ₂ O 16.6 mg Sulfate de manganèse, H ₂ O 16.6 mg Perchlorure de fer, 6 H ₂ O traces Agar 15 g Eau distillée q.s.p. 1 L	Glucose 20 g Bacto-peptone 1 g Extrait de malt 20 g Agar 20 g Eau distillée q.s.p. 1 L	Extrait de pomme de terre 5 g Glucose 20 g Agar (PDA) 17 g Eau distillée q.s.p. 1 L	Glucose 20 g Yeast extract 10 g Peptone 10 g Agar 17 g Eau distillée q.s.p. 1 L pH final à 5.6	Tryptone 10 g Yeast extract 5 g NaCl 10 g Agar 15 g Eau distillée q.s.p. 1 L pH final à 7.0
Spécificité	Inhibition des bactéries Croissance lente des moisissures (Rose Bengale) Inhibition de la croissance des <i>Rhizopus</i> (Dichloran)		PDB : croissance mycélienne PDA : conservation des souches		ampicilline 100 µg.mL ⁻¹ X-Gal 40 µg.mL ⁻¹ (sélection des cellules transformées)

1. Milieux de cultures

Plusieurs milieux de culture ont été utilisés pour le dénombrement, l'isolement et la conservation des micro-organismes testés dans ce travail. La composition et l'emploi de ces milieux sont donnés dans le Tableau VII.

2. Souches utilisées

Quatre vingt quinze souches de moisissures ont été utilisées comme souches de référence : trente deux souches de moisissures provenant des collections ARS (NRRL), ATCC et MUCL, quarante huit souches de moisissures provenant de la collection de l'IFV de Beaune isolées de différentes parcelles bourguignonnes et quinze souches isolées de grappes ou de feuilles et provenant de la Collection de l'Université de Sciences Agronomique et Médecine Vétérinaire Bucarest (Roumanie) (tableau VIII). De plus, les souches de levures *Yarrowia lipolytica* W29 et *Brettanomyces bruxellensis* LO2E2 ont également été utilisées comme souches de référence. Les autres souches listées dans le tableau VIII ont été isolées au cours de ce travail à partir de différentes parcelles viticoles (cf paragraphe 3.1) localisées en Bourgogne. Ces 199 souches ont été référencées dans la collection de l'Institut Universitaire de la Vigne et du Vin (IUVV).

Tableau VIII : Souches utilisées dans cette étude

Souches	Origine
<i>Acremonium alternatum</i>	IUVV 07-522 (raisin)
<i>Alternaria alternata</i>	IFV M08/201 (raisin); IFV M08/207 (raisin); IFV M08/217 (raisin); IFV M08/232 (raisin); IUVV 03-112 (raisin); IUVV 14-321 (raisin); IUVV D1P4-11 (raisin); IUVV D6P3-131 (raisin); IUVV D6P3-231 (raisin); IUVV D7P3-121 (raisin); IUVV D9P4-211 (raisin); IUVV D9P5-231 (raisin)
<i>Aspergillus aculeatus</i>	MUCL 6225 (litière)
<i>Aspergillus carbonarius</i>	MUCL 44624 (origine inconnue)
<i>Aspergillus fumigatus</i>	MUCL 14312 (rhizosphère, <i>Picea</i> sp.)
<i>Aspergillus japonicus</i>	MI-FA3 Buc (raisin); IFV M08/209 (raisin); IFV M08/417 (raisin)
<i>Aspergillus niger</i>	MUCL 745 (pépin, <i>Gossypium hirsutum</i>)
<i>Aspergillus wentii</i>	IFV M05/018 (raisin)
<i>Aspergillus terreus</i>	ATCC 20516 (sol)
<i>Botrytis cinerea</i>	MUCL 28920 (origine inconnue); MI-Aligote Husi (raisin); IFV M08/408 (raisin); IUVV 01-311 (raisin); IUVV 01-321 (raisin); IUVV 01-331 (raisin); IUVV 05-431 (raisin); IUVV 07-431 (raisin); IUVV 10-321 (raisin); IUVV D1P3-313 (raisin); IUVV D1P4-211 (raisin); IUVV D2AP3-321 (raisin); IUVV D2AP5-311 (raisin); IUVV D2BP3-211 (raisin); IUVV D2BP4-331 (raisin); IUVV D2BP4-41 (raisin); IUVV D2BP5-331 (raisin); IUVV D4P3-322 (raisin); IUVV D4P3-411 (raisin); IUVV D4P4-13 (raisin); IUVV D4P5-12 (raisin); IUVV D5P3-111 (raisin); IUVV D5P3-221 (raisin); IUVV D6P3-112 (raisin); IUVV D6P4-42 (raisin); IUVV D7P3-232 (raisin); IUVV D7P4-212 (raisin); IUVV D7P4-41 (raisin); IUVV D7P5-13 (raisin); IUVV D8P5-11 (raisin); IUVV D9P3-12 (raisin); IUVV D9P4-421 (raisin); IUVV D9P5-331 (raisin)
<i>Brettanomyces bruxellensis</i>	LO2E2 (IFV vin)
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	MUCL 30838 (cerise); IFV M08/202 (raisin); IFV M08/208 (raisin); IFV M08/216 (raisin); IFV M08/218 (raisin); IFV M08/229 (raisin); IFV M08/246 (raisin); IUVV 03-521 (raisin); IUVV 05-421 (raisin); IUVV 08-322; (raisin); IUVV 12-521 (raisin); IUVV D1P3-211 (raisin); IUVV D1P3-221 (raisin); IUVV D1P4-311 (raisin); IUVV D1P5-211 (raisin); IUVV D2AP3-331 (raisin); IUVV D2AP4-212 (raisin); IUVV D2AP4-213 (raisin); IUVV D2AP4-233 (raisin); IUVV D2BP3-212 (raisin); IUVV D2BP3-222 (raisin); IUVV D2BP3-311 (raisin); IUVV D6P3-132 (raisin); IUVV D6P3-221 (raisin); IUVV D6P4-11 (raisin); IUVV D6P4-232 (raisin); IUVV D6P4-312 (raisin); IUVV D6P4-313 (raisin); IUVV D6P5-311 (raisin); IUVV D6P5-312 (raisin); IUVV D7P4-311 (raisin); IUVV D7P4-331 (raisin); IUVV D8P4-212 (raisin); IUVV D8P4-213 (raisin); IUVV D8P4-231 (raisin); IUVV D8P4-331 (raisin); IUVV D9P4-311 (raisin)
<i>Cladosporium herbarum</i>	IUVV 01-521 (raisin); IUVV 01-531(raisin)
<i>Epicoccum nigrum</i>	IFV M08/203 (raisin); IUVV D1P4-231 (raisin); IUVV D1P4-232 (raisin); IUVV D2AP3-111 (raisin); IUVV D2AP4-231 (raisin); IUVV D2BP3-121 (raisin); IUVV D2BP3-122 (raisin); IUVV D2BP5-231 (raisin); IUVV D4P3-111 (raisin); IUVV D4P3-231 (raisin); IUVV D7P3-221 (raisin); IUVV D7P3-231 (raisin)
<i>Fusarium oxysporum</i>	MUCL 792 (sol) IUVV D8P4-11 (raisin)
<i>Penicillium aurantiogriseum</i>	MUCL 47586 (chicorée); MUCL 14350 (sol); IUVV 4 (raisin)

<i>Penicillium bilaiae</i>	IFV M06/002 (raisin)
<i>Penicillium brevicompactum</i>	MUCL 14171 (origine inconnue); IFV M05/031 (raisin); IUVV D4P4-42 (raisin)
<i>Penicillium chrysogenum</i>	MI-210 (raisin); MI-F11 (raisin leaf); MI-F19 (feuille de vigne); IUVV D1P3-331 (raisin)
<i>Penicillium commune</i>	MUCL 28651 (origine inconnue); MUCL 47241 (origine inconnue)
<i>Penicillium corhylophilum</i>	MI-F1 (feuille de vigne); MI-F10 (feuille de vigne); IFV M04/127 (raisin)
<i>Penicillium expansum</i>	MUCL 29192 (fruit, <i>Malus sylvestris</i>); MI-BB Husi (raisin); IFV M04/111 (raisin); IFV M05/012 (raisin); IFV M06/054 (raisin); IFV M08/221 (raisin); IFV M08/231 (raisin); IFV M08/409 (raisin); IUVV 1 (raisin); IUVV 02-221 (raisin); IUVV 02-311 (raisin); IUVV 02-331 (raisin); IUVV 02-332 (raisin); IUVV 02-411 (raisin); IUVV 02-521 (raisin); IUVV 03-121 (raisin); IUVV 03-122 (raisin); IUVV 03-232 (raisin); IUVV 05-111 (raisin); IUVV 05-131 (raisin); IUVV 05-132 (raisin); IUVV 05-411 (raisin); IUVV 07-221 (raisin); IUVV 07-231 (raisin); IUVV 10-331 (raisin); IUVV 11-331 (raisin); IUVV 12-111 (raisin); IUVV D1P5-41 (raisin); IUVV D1P5-331 (raisin); IUVV D4P4-211 (raisin); IUVV D4P4-212 (raisin); IUVV D5P5-321 (raisin); IUVV D5P5-322 (raisin); IUVV D5P5-323 (raisin); IUVV D5P5-331 (raisin); IUVV D5P5-411 (raisin); IUVV D5P5-422 (raisin); IUVV D7P4-11 (raisin); IUVV D7P4-12 (raisin); IUVV D9P5-11 (raisin); IUVV D9P5-12 (raisin)
<i>Penicillium fellutanum</i>	IFV M04/161 (raisin)
<i>Penicillium glabrum</i>	MUCL 35034 (bois)
<i>P. glabrum/P. thomii</i>	IUVV 5 (raisin); IUVV 6 (raisin); IUVV D2BP5-311 (raisin); IUVV D7P3-331 (raisin); IUVV D7P3-331 (raisin);
<i>Penicillium herquei</i>	MUCL 14047 (sol); MUCL 29224 (bois)
<i>Penicillium islandicum</i>	MUCL 14074 (sol)
<i>Penicillium italicum</i>	MUCL 14256 (<i>Citrus limonia</i>)
<i>Penicillium minioluteum</i>	MUCL 28666 (origine inconnue); IFV M04/029 (raisin); IFV M04/058 (raisin); IFV M06/021 (raisin); IFV M08/228 (raisin); IFV M08/233 (raisin); IFV M08/402 (raisin); IUVV 05-231 (raisin); IUVV 07-421 (raisin); IUVV 07-422 (raisin); IUVV 07-521 (raisin); IUVV 07-523 (raisin); IUVV 07-531 (raisin); IUVV 08-311 (raisin); IUVV D1P3-131 (raisin); IUVV D4P3-311 (raisin); IUVV D5P3-322 (raisin); IUVV D7P5-311 (raisin); IUVV D7P5-312 (raisin); IUVV D7P5-331 (raisin); IUVV D7P5-332 (raisin); IUVV D7P5-333 (raisin); IUVV D7P5-41 (raisin); IUVV D8P5-311 (raisin); IUVV D8P5-313 (raisin); IUVV D8P5-331 (raisin);
<i>Penicillium oxalicum</i>	MI-F21 (feuille de vigne)
<i>Penicillium paneum</i>	MUCL 40611 (pain de seigle); IUVV 7 (raisin)
<i>Penicillium paxilli</i>	MUCL 38787 (instrument optique)
<i>Penicillium raistrickii</i>	MI-F5 (feuille de vigne); MI-F25 (feuille de vigne); IUVV D9P3-321 (raisin)
<i>Penicillium roqueforti</i>	NRRL 849 (aliment, fromage français Roquefort)
<i>Penicillium simplicissimum</i>	MUCL 14375 (sol)

<i>Penicillium spinulosum</i>	MUCL 13911 (air); MUCL 35033 (bois en séchage à l'air, <i>Quercus sp.</i>); IFV M04/032 (raisin); IFV M04/065 (raisin); IFV M04/087 (raisin); IFV M05/026 (raisin); IFV M06/050 (raisin); IFV M06/176 (raisin); IFV M08/220 (raisin); IFV M08/227 (raisin); IFV M08/245 (raisin); IFV M08/403 (raisin); IFV M08/404 (raisin); IFV M08/405 (raisin); IFV M08/410 (raisin); IFV M08/411 (raisin); IUVV 8 (raisin); IUVV 05-311 (raisin); IUVV 07-432 (raisin); IUVV 08-321 (raisin); IUVV 08-331 (raisin); IUVV 08-411 (raisin); IUVV 11-311 (raisin); IUVV 12-431 (raisin); IUVV D1P3-312 (raisin); IUVV D1P3-332 (raisin); IUVV D1P5-321 (raisin); IUVV D1P5-332 (raisin); IUVV D2AP3-311 (raisin); IUVV D2AP4-331 (raisin); IUVV D2AP5-42 (raisin); IUVV D2BP4-11 (raisin); IUVV D2BP4-221 (raisin); IUVV D2BP5-211 (raisin); IUVV D2BP5-41 (raisin); IUVV D4P4-221 (raisin); IUVV D4P4-41 (raisin); IUVV D4P4-412 (raisin); IUVV D4P4-421 (raisin); IUVV D4P5-411 (raisin); IUVV D4P5-412 (raisin); IUVV D6P3-01 (raisin); IUVV D6P3-133 (raisin); IUVV D6P3-134 (raisin); IUVV D6P4-41 (raisin); IUVV D7P3-131 (raisin); IUVV D7P3-132 (raisin); IUVV D9P3-312 (raisin); IUVV D9P3-331 (raisin); IUVV D9P3-333 (raisin); IUVV D9P3-411 (raisin); IUVV D9P3-412 (raisin); IUVV D9P4-321 (raisin); IUVV D9P5-311 (raisin);
<i>Penicillium thomii</i>	MUCL 31204 (pomme de pin); MI-F6 (feuille de vigne); IFV M04/028 (raisin); IFV M06/044 (raisin); IUVV D7P3-333 (raisin);
<i>Penicillium verrucosum</i>	MUCL 28674 (origine inconnue)
<i>Penicillium verruculosum</i>	IUVV D2AP5 11 (raisin); IUVV D2AP5 41 (raisin); IUVV D2AP5 431 (raisin); IUVV D4P5 4311 (raisin); IUVV D4P5 431 (raisin);
<i>Pilidiella diplodiella</i>	MUCL 47330 (<i>Vitis vinifera</i>); IUVV D2BP3-221 (raisin); IUVV D8P4-321 (raisin);
<i>Thanatephorus cucumeris</i> (<i>Rhizoctonia solani</i>)	IUVV 13-411 (raisin)
<i>Trichoderma harzianum</i>	MUCL 29707 (sol)
<i>Trichoderma koningiopsis</i>	IUVV 07-211 (raisin); IUVV D5P4-11 (raisin); IUVV D5P4-231 (raisin); IUVV D5P4-311 (raisin); IUVV D8P5 312 (raisin); IUVV D9P3-311 (raisin);
<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	MUCL 44915 (sol brun de forêt)
<i>Yarrowia lipolytica</i>	W29 (ATCC 20460) (sol)

MUCL: Mycothèque de l'Université Catholique de Louvain (Belgique); **ATCC:** American Type Culture Collection (USA); **ARS (NRRL):** Agricultural Research Service Collection (USA) **IUVV:** Collection de l'Institut Universitaire de la Vigne et du Vin (France); **IFV :** Collection de l'Institut Française de la Vigne et du Vin (IFV Beaune, France); **MI:** Collection de l'Université de Sciences Agronomique et Médecine Vétérinaire Bucarest (Roumanie).

3. Echantillonnage

3.1. Parcelles viticoles

Des prélèvements de baies au cours de la maturation du raisin, ont été réalisés dans différentes parcelles viticoles situées en Bourgogne durant la campagne 2008 (Tableau IX). Ces parcelles viticoles sont des parcelles d'étude gérées par l'IFV (Beaune) dans le cadre de suivis de maturité du raisin ou d'essais de traitements *anti-botrytis* et sont localisées sur les appellations Aloxe-Corton, Gevrey-Chambertin, Givry, Ladoix, Mercurey, Pernand-Vergelesses et Volnay.

Tableau IX : Parcelles d'étude

Nom parcelle	Localisation	Cépages	Essai	Prélèvements
D1	Gevrey Chambertin (Bourgogne, 21)	Pinot Noir	Suivi maturité	baies
D2a	Gevrey Chambertin (Bourgogne, 21)	Pinot Noir	Suivi maturité	baies
D2b	Gevrey Chambertin (Bourgogne, 21)	Pinot Noir	Suivi maturité	baies
D4	Ladoix (Bourgogne, 21)	Pinot Noir	Suivi maturité	baies
D5	Volnay (Bourgogne, 21)	Pinot Noir	Suivi maturité	baies
D6	Mercurey (Bourgogne, 71)	Pinot Noir	Suivi maturité	baies
D7	Givry (Bourgogne, 71)	Pinot Noir	Suivi maturité	baies
D8	Pernand-Vergelesses (Bourgogne, 21)	Pinot Noir	Suivi maturité	baies
D9	Gevrey Chambertin (Bourgogne, 21)	Pinot Noir	Suivi maturité	baies
AB	Aloxe-Corton (Bourgogne, 21)	Pinot Noir	Essai <i>anti-botrytis</i>	baies

Pour la parcelle correspondant à l'essai *anti-botrytis*, le tableau X présente les différentes stratégies de traitements appliqués aux différents stades phénologiques de la vigne reconnus pour être sensibles aux attaques de *Botrytis cinerea*.

Tableau X - Différents stratégies anti-botrytis : stade d'application et matières actives utilisées

Modalité	Stade A (fin floraison) (kg.ha ⁻¹)	Stade B (fermeture de la grappe) (kg.ha ⁻¹)	Stade B + 10 (fermeture+10 j) (kg.ha ⁻¹)	Stade C (début véraison) (kg.ha ⁻¹)
AB 1	Témoin			
AB 2	Fludioxonil (1)	Boscalid (1.2)	-	Pyriméthanol (2.5)
AB 3	Fenhexamid (1.5)	Boscalid (1.2)	-	Pyriméthanol (2.5)
AB 4	Fenhexamid (1.5)	-	Boscalid (1.2)	-
AB 5	Fenhexamid (1.5)	-	Pyriméthanol (2.5)	-
AB 6	Fenhexamid (1.5)	Effeuillage	Pyriméthanol (2.5)	-
AB 7	Fenhexamid (1.5)	-	Pyriméthanol (2.5)	<i>Bacillus subtilis</i> (5)
AB 8	Fenhexamid (1.5)	-	<i>Bacillus subtilis</i> (5)	<i>Bacillus subtilis</i> (5)
AB 9	Boscalid (1.2)	-	-	-
AB 10	-	Boscalid (1.2)	-	-
AB 11	-	-	Boscalid (1.2)	-
AB 12	-	-	-	Boscalid (1.2)
AB 13	Boscalid (1.2)	-	<i>Bacillus subtilis</i> – 5	<i>Bacillus subtilis</i> (5)
AB 14	Argile bentonitique (25)	Argile bentonitique (25)	-	-

Chaque programme de traitements a été réalisé en triplicat.

3.2. Prélèvements

Les échantillons de baies de raisin sont prélevés stérilement à l'aide d'une paire de ciseaux préalablement nettoyée à l'alcool dénaturé et sont directement placés, sans aucun contact direct avec le manipulateur, dans des sacs stériles de prélèvement, et conservés en glacière jusqu'à l'arrivée au laboratoire, puis conservés à 4°C avant utilisation.

4. Identification de la microflore fongique

La microflore fongique présente sur baies de raisin a été analysée par méthodes culturale et moléculaire.

4.1. Obtention des moisissures

À partir des échantillons de baies récoltées précédemment, 200 baies sont lavées avec 200 ml de solution physiologique stérile (0.9% (m/v) de NaCl) contenant 0.2% (v/v) de Tween 80. Le mélange obtenu est passé aux ultra-sons pendant une minute et agité pendant 30 min afin de récupérer le maximum de micro-organismes présents sur raisins. Après agitation, cette solution de lavage est utilisée pour dénombrer et isoler les micro-organismes cultivables présents sur baies.

4.2. Dénombrement de la microflore fongique cultivable

Des suspensions diluées au $1/10^{\text{ème}}$ de chaque solution de lavage ont été réalisées dans la solution physiologique NaCl 0.9% contenant 0.2% Tween 80. Chacune des dilutions est déposée à raison de 100 μ l sur milieu DRBC à raison de 3 répétitions par dilution. Les boîtes de Pétri sont ensuite incubées à l'obscurité entre 5 à 7 jours à une température de 25°C afin de dénombrer les populations de moisissures. De plus, en vue de leur identification, les moisissures présentes sur boîtes ont été isolées. Parce qu'il a été impossible d'isoler et d'identifier la totalité des moisissures présentes pour chaque échantillon analysé, une sélection a été effectuée. Toutes les moisissures considérées comme pouvant représenter différentes espèces après observation visuelle ont alors été isolées et transférées sur milieu MEA pour leur identification. Les spores de ces moisissures ont été également conservées à -80°C dans une solution de glycérol stérile à 40% (v/v).

4.3. Identification par méthode classique

Dans un premier temps, une identification des moisissures isolées a été réalisée sur critères morphologiques (aspect, forme, relief, couleur) et sur critères microscopiques

(thalle, spores...) (cf paragraphe 3.1 chapitre I) afin de réaliser un premier screening permettant de classer les différentes souches isolées selon leur genre.

4.4. Identification par méthode moléculaire

4.4.1. Extraction d'ADN

A partir d'une culture de 1 à 2 semaines en milieu solide (PDA, MEA), 5 mL d'eau distillée stérile contenant 0.05% (v/v) Tween 80 sont ajoutés et la surface du milieu est raclée doucement à l'aide d'un inoculateur stérile à usage unique. Cette étape est répétée afin de récupérer le plus de spores possible. Le dénombrement des spores est effectué à l'aide d'une cellule de Malassez. Les spores sont ensuite collectées dans un tube contenant de l'eau stérile avant extraction de l'ADN.

L'extraction d'ADN peut également être réalisée à partir de cultures incubées 4 jours à 28°C en milieu liquide (6 mL de culture en milieu PDB). Le mycélium est alors récupéré et broyé dans de l'azote liquide. Le broyat est ensuite placé dans de l'eau stérile. Dans les deux cas, la suspension obtenue est centrifugée (10000 g, 10 minutes) afin d'obtenir un culot de spores ou de mycélium broyé compris entre 150 mg et 200 mg en poids frais. Le culot de spores compris entre 150 et 200 mg est repris dans 2 mL d'eau stérile.

Une extraction d'ADN a été également réalisée à partir de 2 mL de lessivats de baies collectées dans l'essai *anti-botrytis*.

Ainsi l'extraction d'ADN a été réalisée à partir de 2 ml d'une suspension de spores ou de 2 mL de lessivat de baies en utilisant le kit extraction d'ADN de champignons Miniprep EZNA® (Omega Bio-tek, Doraville, USA) selon les instructions du fabricant. Plus précisément, 2 mL de suspension de spores ou de lessivat de baie sont à 10000g pendant 20 min. Puis le culot est incubé avec 600 µL de tampon FG1 et 5 µL RNase (20 mg/mL) pendant 1 min. Puis 10 µL 2-mercaptoethanol sont ajoutés et le mélange est incubé à 65°C pendant 5 min. 140 µL tampon FG2 sont ajoutés et le tout est incubé sur la glace pendant 5 minutes. Après une centrifugation de 10 min à 10,000 x g, le surnageant est transféré et ½ volume de tampon FG3 et un volume ethanol absolu sont ajoutés. Pour l'étape suivante, l'ADN est élué avec 100 µl H₂O à l'aide des colonnes Hi-bond®spin.

4.4.2. Dosage de l'ADN

Le dosage et le contrôle de la qualité des ADN extraits sont réalisés avant chaque utilisation par spectrophotométrie à l'aide d'un biophotomètre (Eppendorf, Le Pecq, France). Les rapports des DO (260nm/280nm et 260nm/230nm) sont déterminés afin d'évaluer la qualité des échantillons.

La qualité des ADN extraits est également contrôlée par électrophorèse sur gel d'agarose à 1% (migration 15 minutes à 110 Volts). Les ADN sont ensuite conservés à -20°C avant analyse.

4.4.3. PCR ITS-RFLP

4.4.3.1. Région cible, amorces et condition de PCR

La région ITS (Internal Transcribed Spacers) largement décrite par différents travaux (White *et al* 1990; Bruns *et al*, 1991; Hibbett *et al*, 2005; Geiser *et al*, 2007) a été choisie comme région cible pour une identification des espèces fongiques. Plus précisément, la séquence ITS1-5.8S-ITS2 présente une région conservée chez la majorité des espèces fongiques et des régions variables qui permettent son utilisation pour des études de population. Les amorces ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') et ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') décrites comme amorces universelles par White *et al.* (1990) ont été utilisées pour cette étude.

Les conditions de PCR retenues ainsi que la réalisation du mélange réactionnel sont données ci-dessous: l'amplification est réalisée dans le thermocycleur (MyCycler thermal cycler, BIO RAD, Hercules, USA) selon le programme décrit par Phalip *et al* (2004):

Première étape : - Dénaturation initiale à 94°C pendant 3 minutes;

Deuxième étape : - Dénaturation à 94°C pendant 1,5 minutes;

- Hybridation à 55°C pendant 1,5 minutes;

- Elongation à 72°C pendant 2 minutes;

}
x 34
}

Troisième étape: - Elongation finale à 72°C pendant 15 minutes

Etape finale: - 1X ∞ 4°C

La composition du mélange réactionnel (volume final 50 μ l) est la suivante:

	C initiale de la solution mère	V prélevé	C finale dans le mélange réactionnel
Eau MilliQ		26.35 μ L	
5 X Green GO Taq® Flexi Buffer (Promega)		5 μ L	
MgCl ₂ 6 H ₂ O	25 mM	3 μ L	1,5 mM
dNTP	25 mM (chaque)	0,4 μ L	0,2 mM
ITS1	10 μ M	2.5 μ L	0,5 μ M
ITS4	10 μ M	2.5 μ L	0,5 μ M
Taq polymerase (Promega)	5 U. μ L ⁻¹	0,25 μ L	0,025 U. μ L ⁻¹
ADN	100-150 ng. μ L ⁻¹	10 μ L	20-30 ng. μ L ⁻¹

Les produits de PCR sont contrôlés par électrophorèse (migration pendant 45 minutes à 90 volts) en gel d'agarose à 2% + 5 μ l de bromure d'éthidium à 10 mg.mL⁻¹ (BET, Promega) dans un tampon d'électrophorèse TAE 1X (Tris-Acétate-EDTA).

4.4.3.2. Séquençage

Dans le but de valider la méthode d'identification, un séquençage des fragments d'ADN obtenus est réalisé.

Les fragments d'ADN amplifiés sont extraits du gel d'agarose et purifiés à l'aide du kit «QIAquick Gel Extration Kit» Qiagen (conformément aux recommandations du fabricant). Les fragments ainsi extraits et purifiés sont ensuite clonés à l'aide du kit TOPO TA Cloning (Invitrogen).

Après ligation, le vecteur est inséré dans des cellules compétentes (Chemically Competent *E. coli* Mach1TM-T1^R) par un choc thermique, puis les cellules compétentes transformées sont étalées sur boîtes LB agar contenant de l'ampicilline (100 μ g.mL⁻¹) et du X-Gal (40 μ g.mL⁻¹) et incubées une nuit à 37 °C. Après incubation, les clones positifs blancs sont analysés par PCR en utilisant le couple d'amorce M13 Forward/ M13 Reverse.

Les produits de PCR positifs peuvent alors être séquencés. Le séquençage des fragments d'intérêt est réalisé par la plate-forme Beckman Coulter Genomics, Royaume Uni. Les séquences obtenues sont ensuite analysées par comparaison avec des séquences existant dans les bases de données (GenBank) à l'aide du programme Blast du serveur NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). Les alignements des séquences sont effectués avec le logiciel <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>. Seules les séquences ayant un pourcentage d'identité supérieur à 98% ont été retenues. Les numéros d'accèsion sont donnés dans le chapitre 3.

4.4.3.3. Enzymes de restriction

Dans le but d'identifier les différentes espèces de moisissures et d'être le plus discriminant possible, des séquences ITS1-5.8SrDNA-ITS2 de moisissures provenant de la base de données EMBL (<http://srs.ebi.ac.uk>) ont été utilisées dans un programme de restriction théorique (<http://biotools.umassmed.edu/tacg4/>). Quatre enzymes de restriction (4 bases) *HaeIII*, *HinfI*, *MseI* et *SduI* ont ainsi été retenues, comme étant les plus discriminatives pour notre étude. Une quatrième enzyme a été utilisée dans certains cas pour affiner la discrimination: *MaeII*, *BfmI*, *Cfr9I*, *Hpy188I* ou *PspGI*.

Site de coupure des enzymes retenues :

-<i>HaeIII</i>:	-<i>HinfI</i>:	-<i>MseI</i>:	-<i>SduI</i>:
5'...GG [^] CC...3'	5'...G [^] ANTC...3'	5'...T [^] TAA...3'	5'...GdGCh [^] C...3'
3'...CC [^] GG...5'	3'...CTNA [^] G...5'	3'...AAT [^] T...5'	3'...C [^] hCGdG...5'
-<i>BfmI</i>:	-<i>MaeII</i>:	-<i>Cfr9I</i>:	
5'...C [^] TRYA G...3'	5'... ACGT [^] ...3'		5'...C [^] CCGGG...3'
3'...G AYRT [^] C...5'	3'... [^] TGCA ...5'		3'...GGGCC [^] C...5'
-<i>Hpy188I</i>:	-<i>PspGI</i>:		
	5'...TCN [^] GA...3'		5'... [^] CCWGG...3'
	3'...AG [^] NCT...5'		3'... GGWCC [^] ...5'

Le mélange réactionnel est réalisé de la manière suivante :

Produit de PCR	10 μ L
Eau milliQ stérile	7 μ L
Tampon	2 μ L
Enzyme 10 U. μ L ⁻¹	1 μ L

Le volume final du mélange réactionnel est de 20 μ L.

Le mélange réactionnel est placé dans un bain-marie 4 h à température optimale : 37°C pour *SduI*, *HinfI*, *HaeIII*, *Cfr9I*, *BfmI* (Fermentas, France) et *Hpy188I* (New England Biolabs, Royaume Uni), 65°C pour *MseI*; *MaeII* (Fermentas, France) et 75°C pour *PspGI* (New England Biolabs, Royaume Uni).

4.4.3.4. Obtention de profils PCR ITS-RFLP

Après restriction, les profils de restriction sont obtenus par électrophorèse (migration pendant 60 minutes à 90 volts) en gel d'agarose à 3% (m/v) (5 μ l de BET à 10 mg.mL⁻¹ et TAE 1X). La taille des fragments d'ADN est estimée par comparaison avec un marqueur de taille (GeneRuler 100bp DNA Ladder, Fermentas, France) et les profils sont analysés à l'aide du programme Quantity One 4.6.5 Bio-Rad.

5. Quantification de la microflore fongique

Afin de pouvoir anticiper le développement de flores susceptibles d'altérer la qualité de la vendange ou du moût, il apparaît nécessaire de pouvoir détecter précocement ces flores et de les quantifier afin d'estimer les risques.

Dans le cadre de cette étude, la mise au point d'une méthode rapide, spécifique, de détection au vignoble de micro-organismes d'altération a été réalisée par PCR quantitative.

5. 1. Micro-organismes cibles

La détection et la quantification sur baies de trois micro-organismes responsables d'altérations et/ou de déviations organoleptiques ont été réalisées par qPCR. Nous avons retenu deux moisissures (*Botrytis cinerea* et *Penicillium* spp.) et une levure (*Brettanomyces bruxellensis*).

5.2. Préparation des spores de *Botrytis cinerea* et *Penicillium expansum* et courbe standard

Botrytis cinerea MUCL 28920 et *Penicillium expansum* MUCL 29192 ont été cultivés sur gélose PDA et incubés 1 à 2 semaines à 25°C. Après incubation, 5 mL d'eau distillée stérile contenant 0.05% (v/v) de Tween 80 sont ajoutés. La surface du milieu est raclée doucement à l'aide d'un inoculateur stérile à usage unique. Cette étape est répétée afin de récupérer le plus de spores possible. Le dénombrement des spores est effectué à l'aide d'une cellule de Malassez. A partir d'une solution de travail à 10^7 spores.mL⁻¹ (*Botrytis cinerea*) ou 10^9 spores.mL⁻¹ (*Penicillium expansum*), des suspensions dilutions au dixième ont été réalisées (10^1 à 10^9 spores.mL⁻¹) et l'ADN a été extrait selon le protocole d'extraction du kit Miniprep E.Z.N.A (Omega Bio-tek, Doraville, USA) décrit dans le paragraphe 4.4.1. Les différentes quantités d'ADN obtenues ont été utilisées pour générer une courbe standard ($Ct=f(\log\text{ADN})$) pour chaque micro-organisme par qPCR.

5.3. *Brettanomyces bruxellensis* et courbe standard

Brettanomyces bruxellensis LO2E2 a été cultivée en milieu liquide YPD à 28°C pendant 60 h. Après incubation, la suspension cellulaire est centrifugée (20 min à 9000 rpm) et le culot est repris afin d'obtenir une suspension de travail à 10^8 UFC.mL⁻¹. Des suspensions dilutions au dixième ont été réalisées (10^1 à 10^8 UFC.mL⁻¹) et l'ADN a été extrait selon le protocole d'extraction du kit Miniprep E.Z.N.A décrit dans le paragraphe 4.4.1. Les différentes quantités d'ADN obtenues ont été utilisées pour générer une courbe standard ($Ct=f(\log CFU)$) par qPCR.

5.4. Standard interne d'extraction d'ADN et de quantification

5.4.1 Standard interne

La quantification des micro-organismes *Botrytis cinerea*, *Brettanomyces bruxellensis* et *Penicillium* spp. a été réalisée à partir des lessivats de baies de l'essai *antibotrytis* (paragraphe 3.1 et Tableau X). Afin de s'affranchir des variabilités liées à l'extraction et à l'amplification, un standard interne a été utilisé. Nous avons choisi la levure *Yarrowia lipolitica* W29 (ATCC 20460) comme standard interne, levure isolée du sol et naturellement non présente sur baies de raisin (Tessonnière *et al*, 2009). Ainsi pour chaque lessivat (2 mL), 8×10^6 UFC de *Y. lipolitica* ont été ajoutés. Puis l'ADN de chaque lessivat ainsi contaminé artificiellement a été extrait selon le protocole d'extraction du kit Miniprep E.Z.N.A décrit dans le paragraphe 4.4.1. Puis une PCR quantitative a été réalisée sur chaque échantillon afin de détecter la présence dans chaque lessivat des micro-organismes *Botrytis cinerea*, *Brettanomyces bruxellensis* ou *Penicillium* spp.

5.4.2. Courbe standard

Pour préparer la courbe standard de *Yarrowia lipolitica*, la souche de levure a été cultivée en milieu liquide YPD sous agitation 140 rpm. Après 48 h d'incubation, à partir d'une solution de travail à 10^{10} UFC.mL⁻¹, des suspensions dilutions au dixième ont été réalisées (10^1 à 10^8 UFC.mL⁻¹) et l'ADN a été extrait selon le protocole d'extraction du kit Miniprep E.Z.N.A décrit dans le paragraphe 4.4.1.

Les différentes quantités d'ADN obtenues ont été utilisées pour générer une courbe standard ($C_t=f(\log\text{UFC})$) par qPCR.

5.5. qPCR amplification

5.5.1. Régions cibles et amorces

Le tableau XI présente les gènes cibles et les séquences des amorces utilisées pour la quantification.

Tableau XI : Amorces utilisées en PCR quantitative

Micro-organisme cible	Gène cible	Amorces	Séquence (5'→3')	Taille (bp)	Référence
<i>B. cinerea</i>	IGS spacer	Bc3F	5'-GCTGTAATTTCAATGTGCAGAATC-3'	95	Suarez <i>et al</i> (2005)
		Bc3R	5'-GGAGCAACAATTAATCGCATTTC-3'		
<i>B. bruxellensis</i>	RAD4	BRETF	5'-GTTACACAATCCCCTCGATCAAC-3'	108	Tessonnière <i>et al</i> (2009)
		BRETR	5'-TGCCAAGTCCGAATGTTCTC-3'		
<i>Penicillium</i> sp.	Pepg1	PEFR2	5'-GGTGATGAAGATACTGGATGC-3'	91	Marek <i>et al</i> (2003)
		PEF	5'-ATCGGCTGCGGATTGAAAG-3'		
<i>Y. lipolytica</i>	LIP4	YAL F	5'-ACGCATCTGATCCCTACCAAGG-3'	106	Tessonnière <i>et al</i> (2009)
		YAL R	5'-CATCCTGTCGCTCTTCCAGGT-3'		

La spécificité des amorces a été contrôlée par PCR classique. Les différents programmes sont les suivants :

Les amplifications ont été réalisées dans le thermocycleur (MyCycler thermal cycler, BIO RAD, Hercules, USA) selon les programmes suivants:

- Première étape : Dénaturation initiale à 94°C pendant 3 minutes;
- Deuxième étape : Dénaturation à 94°C pendant 30 secondes;
- Hybridation à T°C* pendant 30 secondes;
- Elongation à 72°C pendant 30 secondes;
- Troisième étape: Elongation finale à 72°C pendant 5 minutes
- * T°C = 64.6°C pour *B. bruxellensis* et *Y. lipolytica*
- * T°C = 62°C pour *Botrytis cinerea*
- * T°C = 60°C pour *Penicillium* spp.

}
x 40
}

5.5.2. Quantification

La quantification de *Botrytis cinerea*, *Yarrowia lipolytica*, *Brettanomyces bruxellensis* et *Penicillium* spp. a été réalisée à l'aide du thermocycleur Biorad iQ5 real-time PCR iCycler Bio-rad, (Bio-Rad, Hercules, CA, Etats-Unis). Toutes les réactions ont été réalisées en triplicat à partir de 3 extractions d'ADN de lessivats indépendantes. Les conditions de qPCR ainsi que les programmes d'amplification (reportés dans le matériel et méthode de l'article du chapitre 4) sont les suivantes :

La composition du mélange réactionnel, pour un volume final de 25 µl, est la suivante:

iQ™ SYBER® GREEN Supermix.....	12.5 µL
Amorces (7 pmol.µL ⁻¹).....	2 µL
Eau RNase-free.....	5.5 µL
ADN.....	5 µL

Première étape : - Dénaturation initiale à 95°C pendant 3 minutes;

Deuxième étape : - Dénaturation à 95°C pendant 15 s;

- Hybridation à 62°C pendant 15 s;

}
x 40
}

Une courbe de fusion est établie par diminution de la température entre 90°C et 0.5°C toutes les 10 s.

Le cycle seuil (Ct) a été défini automatiquement en utilisant le logiciel Bio-rad avec une ligne de base placée à 100 unités de fluorescence relative (RFU). L'efficacité de PCR (E) a été calculée selon la

formule $E = [10^{-1/\text{pente}} - 1] \times 100$, où la valeur de la pente est extraite de chaque courbe standard $Ct = f(\log Q)$ avec Q égale à la quantité d'ADN (*B. cinerea*, *P. expansum*) ou de cellules (*B. bruxellensis* ou *Y. lipolitica*).

5.5.3. Analyses statistiques

Des analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel Sigma Stat 3.0. Une étude ANOVA (analyses de variance) associée au test de Holm-Sidack a permis d'analyser les différences observées lors des études de PCR quantitative. Les valeurs de probabilité $P \leq 0.001$ ou ≤ 0.05 ont été considérées comme statistiquement différentes.

RESULTATS

Chapitre 3

Développement d'une méthode PCR ITS RFLP
fiable pour la caractérisation de la microflore
présente sur baies de raisin

Article 1 :” **PCR ITS-RFLP: a useful method for identifying fungal isolates on grapes**”

Soumis à International Journal of Food Microbiology

N° de soumission : FOOD-D-10-00973

Afin de s'affranchir des biais d'identification des moisissures engendrés par l'utilisation de méthodes classiques d'observation, des méthodes de biologie moléculaire ont été développées afin d'identifier des moisissures pathogènes pour l'homme ou des contaminants de divers environnements tels que le sol, l'eau, le milieu agroalimentaire. Ce chapitre s'intéresse à la caractérisation des moisissures présentes sur baies de raisins, flore jusqu'alors peu étudiée. La technique PCR ITS-RFLP a été retenue parmi les techniques décrites dans la littérature pour son pouvoir discriminant et sa facilité de mise en œuvre. Dans un premier temps, des analyses de restriction théoriques de séquences de la région ITS1-5.8rRNA-IST2 de moisissures contenues dans la base de données EMBL ont été réalisées afin de choisir des enzymes de restriction les plus discriminantes. Les endonucléases *HaeIII*, *HinfI*, *MseI* et *SduI* ont été retenues. Quatre-vingt seize souches de moisissures de référence représentant 11 genres et espèces différentes ont été utilisées pour le développement de la méthode. Des profils de restriction pour chaque souche de référence ont été obtenus après amplification de la région ITS1-5.8rRNA-IST2 à l'aide d'amorces universelles et digestion par les enzymes de restriction retenues. Les profils individuels ainsi obtenus ont été comparés aux profils théoriques obtenus à partir de séquences ITS de la banque de données EMBL. De plus, pour valider cette méthode, le séquençage de la région ITS1-5.8rRNA-IST2 a été réalisé pour certaines souches. Puis, pour chaque souche de référence, les profils individuels sont combinés pour obtenir un profil composite permettant de caractériser une souche. Ainsi les 43 espèces différentes de moisissures étudiées ont été caractérisées par 42 profils composites uniques. Par cette méthode, seul *P. thomii* et *P. glabrum* ne peuvent être distingués.

Comparées aux autres méthodes PCR ITS-RFLP, le choix des enzymes s'est avéré crucial et a permis la meilleure discrimination possible avec un minimum d'enzymes puisque 41% des souches de référence testées peuvent être discriminées au niveau de l'espèce avec seulement 2 enzymes de

restriction et que 96.3% des souches étudiées sont discriminées avec 4 enzymes au maximum.

Dans une seconde partie, cette méthode a été appliquée à l'étude de la flore fongique présente sur des baies de raisins prélevées dans différentes parcelles du vignoble bourguignon. Les prélèvements ont été réalisés par l'IFV (Beaune) et 199 souches de moisissures ont été isolées. Le genre majoritaire est le genre *Penicillium* (58%) suivi des genres *Cladospora*, *Botrytis*, *Epicoccum* et *Alternaria*. Ces résultats sont en accord avec ceux de la littérature. Dans cette étude, l'espèce de moisissures la plus isolée est *P. spinulosum*. Ce résultat confirme que d'une région à l'autre et en fonction du millésime, les espèces de moisissures présentes sur baies sont différentes, plus particulièrement pour le genre *Penicillium*. En comparaison avec des méthodes de biologie moléculaire « culture indépendante » telle que la PCR-TTGE ou PCR-DGGE, cette méthode PCR ITS-RFLP permet une identification fiable d'un nombre de moisissures plus important au niveau de l'espèce.

De plus si la plupart des genres et espèces isolés et identifiés dans cette étude ont déjà été décrits dans d'autres travaux, cette méthode nous a permis une identification fiable au niveau de l'espèce. Cette méthode nous a également permis d'identifier pour la première fois, sur baies de raisin, les espèces *Fusarium oxysporum*, *Penicillium paneum*, *Thanatephorus cucumeris* et *Trichoderma koningiopsis*.

PCR ITS-RFLP: a useful method for identifying fungal isolates on grapes

C.F. Diguta¹, B. Vincent², M. Guilloux-Benatier¹, H. Alexandre¹, S. Rousseaux^{1*}

¹ Laboratoire REVV, Institut Universitaire de la Vigne et du Vin, Jules Guyot, Université de Bourgogne, BP 27877 21078 Dijon Cedex France.

² Institut Français de la Vigne et du Vin, 21200 Beaune France.

Keywords: Fungal microflora, PCR ITS-RFLP, Identification, Grapes

*sandrine.rousseau@u-bourgogne.fr. ph: +33(0)3.80.39.62.61 ; fax : +33 (0)3.80.39.62.65

Institut Universitaire de la Vigne et du Vin, Jules Guyot, BP 27877 21078 Dijon Cedex France

ABSTRACT

The identification of filamentous fungi has traditionally been based on morphological, physiological and biochemical traits but this approach may fail to describe the breadth of fungal diversity. In recent years, various molecular biology techniques have been developed for highly specific identification. However, they have not been extensively exploited to describe and identify fungal communities on grapes. We report the development of a PCR ITS-RFLP method as a fast and easy technique for identifying species of fungal genera present on grapes. We used reference strains from different genera to develop the method based on the region spanning the internal transcribed spacers (ITS1 and ITS2) and the 5.8S rRNA gene. ITS PCR products were digested with restriction endonucleases *SduI*, *HinfI*, *MseI* and *HaeIII*. Endonucleases *BfmI*, *Cfr9I*, *Hpy188I*, *MaeII* or *PspGI* were used as necessary to complete discrimination. Restriction patterns were compared with restriction patterns deduced from ITS sequences in data libraries and the 5.8ITS sequences of some strains were determined. The 43 species studied generated 42 different composite profiles. Only the species *P. thomii* and *P. glabrum* gave the same composite profile. Using this PCR-ITS-RFLP, 96.3% strains tested could be differentiated to the species level with only four enzymes. This method was then applied to describe the fungal diversity on grapes sampled from various vineyards in Burgundy. Hundred ninety nine strains were isolated. *Penicillium* (58.5%) was the genus the most frequently isolated and no strains of the genus *Aspergillus* was isolated. *P. spinolusum* was the most isolated species of *Penicillium* (22.70%). The species *C. cladosporioides* (15.10%), *B. cinerea* (15.10%), *E. nigrum* (5.50%), *A. alternata* (4.00%), *T. koningiopsis* (3.00%), *P. diplodiella* (1.00%), *C. herbarum* (1.00%), *A. alternatum* (<1%), *T. cucumeris* (<1%), and *F. oxysporum* (<1%) were also isolated. This technique is a rapid and reliable method appropriate for routine identification of fungi. This can be used to screen large numbers of isolates in a short time. This is the first exhaustive study of fungal diversity at species level in vineyard.

1. Introduction

The grape microbial ecosystem is composed of a large diversity of microorganisms including yeasts, bacteria and fungi. Most relevant studies have focused on yeasts, particularly *Saccharomyces*, or lactic acid bacteria (LAB), notably *Oenococcus oeni*, because of their involvement in the transformation of grape must into wine during alcoholic and malolactic fermentations, respectively (Alexandre et al. 2004; Lonvaud-Funel, 1999; Nielsen and Richelieu, 1999; Prakitchaiwattana et al. 2004; Versavaud et al. 1995; Sabate et al. 2002). Although these microorganisms are widely regarded as the principal agents of wine fermentations, other positive indigenous yeasts, for example non-*Saccharomyces*, have been studied (Zott et al. 2008). Indeed, there has been interest in some other species of yeast and LAB, including *Brettanomyces* sp and *Pediococcus* sp, because they are often referred to as agents which can spoil wine (Chatonnet et al. 1992; Dias et al. 2003; Renouf et al. 2007; Romano et al. 2003; Suarez et al. 2007; Tchobanov et al. 2008). In recent years, the emergence of novel alterations to wine and grape juice has been reported. They greatly influence the health safety or sensory quality of wine. They include the presence of mycotoxins, like Ochratoxin A (OTA) (Battilani and Pietri, 2002; Bau et al. 2005a; Bejaoui et al. 2006; Belli et al. 2006; Chulze et al. 2006; Sage et al. 2002; Serra et al. 2005) and musty or earthy aromas called GMT in French (Darriet et al. 2000; La Guerche, 2004; La Guerche et al. 2004). Geosmin (trans-1, 10-dimethyl-trans-9-decalol) is the major compound responsible for the earthy-musty aroma. Some *Penicillium* species producing this characteristic have been described, and a correlation between earthy-musty aroma and the presence of *Penicillium* spp. on grapes has been demonstrated (Guérin et al. 2007; Drouillard et al. 2005; La Guerche, 2004; La Guerche et al. 2006, 2007;). The distribution of fungi producing GMT presumably differs between vineyards (Guérin et al. 2007; La Guerche et al. 2006, 2007). The microorganisms responsible for the production of GMT and the molecules involved have not been fully identified (Vacher et al. 2008). A major reason why the origin of some of the GMT taint is unknown is the lack of knowledge about grape fungi.

The most frequent fungal genera reported to be on grapes are *Alternaria*, *Aspergillus*, *Botrytis*, *Cladosporium* and *Penicillium* (Bau et al. 2005a; Bejaoui et al. 2006; Serra et al. 2005). However, the diversity of fungi on grapes have not been extensively investigated at species level (Doaré-Lebrun et al. 2006; Guérin et al. 2007; Laforgue et al. 2009; La Guerche et al. 2006). Cultivation-dependent methods with macroscopic and microscopic examination are traditionally used to identify filamentous fungi, but may fail to identify the complete diversity of fungi present. Morphological and physiological characteristics are influenced by culture conditions and consequently this approach can provide incomplete or ambiguous results. Moreover, these methods are also time consuming and laborious. Therefore, numerous molecular methodologies have been developed for highly specific identification.

Among these techniques, random amplified polymorphisms DNA (RAPD) method was applied to identify *Penicillium* starter cultures (Dupont et al. 1999; Geisen et al. 2001) or *A. carbonarius* strains from grapes (Bau et al. 2005b). De Valk et al. (2008) have used a Restriction Fragment Length Polymorphisms (RFLPs) technique to discriminate species among the *Aspergillus* genus. Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) method was described to identify strains of the *A. niger* aggregate (Accensi et al. 1999, Bau et al. 2006), *Aspergillus* isolates producing OTA in grapes (Martínez-Culebras and Ramón, 2007; Medina et al. 2005), *P. aurantiogriseum* from foods (Colombo et al. 2003), medically relevant fungi (Dean et al. 2005a), *Penicillium* subgenus *Bivertillium* (Dupont et al. 2006) or to differentiate *P. expansum* among fungal grape species (Garcia et al. 2006). Amplified Fragment Length Polymorphism technique (AFLP) or fluorescent AFLP (fAFLP) analysis were used to characterize *Aspergillus* section *Nigri* from grapes or to identify ochratoxin A-producing black *Aspergillus* isolates (Oliveri et al. 2008; Perrone et al. 2006). Dean et al. (2005b) have developed a multiplex PCR method to identify *Stachybotrys chartarum*, *Aspergillus versicolor*, *Penicillium purpurogenum* and *Cladosporium* spp.. PCR-temporal temperature gradient gel electrophoresis (PCR-TTGE) or PCR-denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE) methods were applied to describe fungal communities of grapes (Doaré-Lebrun et al. 2006, Laforgue et al. 2009).

Real-time PCR (RT-PCR) was developed for the detection of *A. carbonarius* in grapes (Mulè et al. 2006; Selma et al. 2008). Most of the developed methods are based on the analysis of the internal transcribed spacer (ITS) region. ITS sequences including the 5.8S rRNA gene (the coding region which is conserved) and two flanking regions ITS1 and ITS2 (non coding and variable) show low intraspecific polymorphism and high interspecific variability and have proved useful for identification of different fungi and yeasts (Accensi et al. 1999; Esteve-Zarzoso et al. 1999; La Guerche et al. 2004; Lee and Taylor, 1992).

Most of the methods described in the literature have been used for the identification of specific fungi present on grapes or in other environments, but few techniques have been developed for describing and identifying the fungal communities present on grapes.

Here, we describe a PCR ITS-RFLP method that we have developed to be a fast and easy method for identifying species of fungal genera present on grapes. We also report the use of this method to describe fungal diversity on grapes collected from different vineyards in Burgundy and to realize an exhaustive study on fungal communities on grapes.

2. Materials and Methods

2.1. Grapes sampling procedure and reference strains

Samples were taken at the harvesting stage from various vineyards in Burgundy area (Aloxe Corton, Gevrey-Chambertin, Givry, Ladoix, Mercurey, Pernand-Vergelesses and Volnay, France).

Two hundred grape berries were harvested from each vineyard in fragments of bunches into plastic bags in aseptic conditions and conserved at 4°C before analysis. Two hundred millilitres of sterile 0.9% NaCl solution containing 0.2% Tween 80 was added to each sample. The mixtures were sonicated for 1 min and then shaken for 30 min to release the microorganisms into suspension. The suspension was transferred to sterilized flasks and stored at 4°C until use. The suspension was serially diluted and dilutions were plated on Dichloran Rose-Bengale Chloramphenicol (DRBC) medium.

Table 1 : Reference strains and isolates of the various fungal species used in this study

Strains	Origin
<i>Acremonium alternatum</i>	IUVV 07-522 (grape)
<i>Alternaria alternata</i>	IFV M08/201 (grape); IFV M08/207 (grape); IFV M08/217 (grape); IFV M08/232 (grape); IUVV 03-112 (grape); IUVV 14-321 (grape); IUVV D1P4-11 (grape); IUVV D6P3 131 (grape); IUVV D6P3 231 (grape); IUVV D7P3 121 (grape); IUVV D9P4 211 (grape); IUVV D9P5 231 (grape);
<i>Aspergillus aculeatus</i>	MUCL 6225 (litter)
<i>Aspergillus carbonarius</i>	MUCL 44624 (unknown)
<i>Aspergillus fumigatus</i>	MUCL 14312 (rhizosphere in soil, <i>Picea</i> sp.)
<i>Aspergillus japonicus</i>	MI-FA3 Buc (grape); IFV M08/209 (grape); IFV M08/417 (grape)
<i>Aspergillus niger</i>	MUCL 745 (seed, <i>Gossypium hirsutum</i>)
<i>Aspergillus terreus</i>	ATCC 20516 (soil)
<i>Aspergillus wentii</i>	IFV M05/018 (grape)
<i>Botrytis cinerea</i>	MUCL 28920 (unknown); MI-Aligote Husi (grape); IFV M08/408 (grape); IUVV 01-311 (grape); IUVV 01-321 (grape); IUVV 01-331 (grape); IUVV 05-431 (grape); IUVV 07-431 (grape); IUVV 10-321 (grape); IUVV D1P3-313 (grape); IUVV D1P4-211 (grape); IUVV D2AP3-321 (grape); IUVV D2AP5-311 (grape); IUVV D2BP3-211 (grape); IUVV D2BP4-331 (grape); IUVV D2BP4-41 (grape); IUVV D2BP5-331 (grape); IUVV D4P3-322 (grape); IUVV D4P3-411 (grape); IUVV D4P4-13 (grape); IUVV D4P5-12 (grape); IUVV D5P3-111 (grape); IUVV D5P3-221 (grape); IUVV D6P3-112 (grape); IUVV D6P4-42 (grape); IUVV D7P3-232 (grape); IUVV D7P4-212 (grape); IUVV D7P4-41 (grape); IUVV D7P5-13 (grape); IUVV D8P5-11 (grape); IUVV D9P3-12 (grape); IUVV D9P4-421 (grape); IUVV D9P5-331 (grape)
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	MUCL 30838 (cherry fruit); IFV M08/202 (grape); IFV M08/208 (grape); IFV M08/216 (grape); IFV M08/218 (grape); IFV M08/229 (grape); IFV M08/246 (grape); IUVV 03-521 (grape); IUVV 05-421 (grape); IUVV 08-322; (grape); IUVV 12-521 (grape); IUVV D1P3 211 (grape); IUVV D1P3 221 (grape); IUVV D1P4 311 (grape); IUVV D1P5 211 (grape); IUVV D2AP3-331 (grape); IUVV D2AP4-212 (grape); IUVV D2AP4 213 (grape); IUVV D2AP4 233 (grape); IUVV D2BP3 212 (grape); IUVV D2BP3 222 (grape); IUVV D2BP3 311 (grape); IUVV D6P1 11 (grape); IUVV D6P1 232 (grape); IUVV D6P1 312 (grape); IUVV D6P3 132 (grape); IUVV D6P3 221 (grape); IUVV D6P4 313 (grape); IUVV D6P5 311 (grape); IUVV D6P5 312 (grape); IUVV D7P4 311 (grape); IUVV D7P4 331 (grape); IUVV D8P4 212 (grape); IUVV D8P4 213 (grape); IUVV D8P4 231 (grape); IUVV D8P4 331 (grape); IUVV D9P4 311 (grape);
<i>Cladosporium herbarum</i>	IUVV 01-521 (grape); IUVV 01-531 (grape)
<i>Epicoccum nigrum</i>	IFV M08/203 (grape); IUVV D1P4-231 (grape); IUVV D1P4 232 (grape); IUVV D2AP3 111 (grape); IUVV D2AP4 231 (grape); IUVV D2BP3 121 (grape); IUVV D2BP3 122 (grape); IUVV D2BP5 231 (grape); IUVV D4P3 111 (grape); IUVV D4P4 231 (grape); IUVV D7P3 221 (grape); IUVV D7P3 231 (grape);
<i>Fusarium oxysporum</i>	MUCL 792 (soil); IUVV D8P4 11 (grape);
<i>Penicillium aurantiogriseum</i>	MUCL 47586 (cossette, chicory); MUCL 14350 (soil); IUVV 4 (grape)
<i>Penicillium bilaiae</i>	IFV M06/002 (grape)
<i>Penicillium brevicompactum</i>	MUCL 14171 (unknown); IFV M05/031 (grape); IUVV D4P4 42 (grape);
<i>Penicillium chrysogenum</i>	MI-210 (grape); MI-F11 (grape leaf); MI-F19 (grape leaf); IUVV D1P3-331 (grape);
<i>Penicillium commune</i>	MUCL 28651 (unknown); MUCL 47241 (unknown)
<i>Penicillium corhylophilum</i>	MI-F1 (grape leaf); MI-F10 (grape leaf); IFV M04/127 (grape)
<i>Penicillium crustosum</i>	MUCL 14155 (unknown); MI-AA Buc (grape); MI-FA2 Buc (grape); MI-FA4 Buc (grape); IFV M06/058 (grape); IUVV 2 (grape); IUVV 3 (grape);
<i>Penicillium expansum</i>	MUCL 29192 (fruit, <i>Malus sylvestris</i>); MI-BB Husi (grape); IFV M04/111 (grape); IFV M05/012 (grape); IFV M06/054 (grape); IFV M08/221 (grape); IFV M08/231 (grape); IFV M08/409 (grape); IUVV 1 (grape); IUVV 02-221 (grape); IUVV 02-331 (grape); IUVV 02-311 (grape); IUVV 02-332 (grape); IUVV 02-411 (grape); IUVV 02-521 (grape); IUVV 03-121 (grape); IUVV 03-122 (grape); IUVV 03-232 (grape); IUVV 05-111 (grape); IUVV 05-131 (grape); IUVV 05-132 (grape); IUVV 05-411 (grape); IUVV 07-221 (grape); IUVV 07-231 (grape); IUVV 10-331 (grape); IUVV 11-331 (grape); IUVV 12-111 (grape); IUVV D1P5 41 (grape); IUVV D1P5 331 (grape); IUVV D4P4 211 (grape); IUVV D4P4-212 (grape); IUVV D5P5 321 (grape); IUVV D5P5 322 (grape); IUVV D5P5 323 (grape); IUVV D5P5 331 (grape); IUVV D5P5 411 (grape); IUVV D5P5 422 (grape); IUVV D7P4 11 (grape); IUVV D7P4 12 (grape); IUVV D9P5 11 (grape); IUVV D9P5 12 (grape);
<i>Penicillium fellutanum</i>	IFV M04/161 (grape)
<i>Penicillium glabrum</i>	MUCL 35034 (wood);
<i>Penicillium glabrum/thomii</i>	IUVV 5 (grape); IUVV 6 (grape); IUVV D2BP5 311 (grape); IUVV D7P3 331 (grape); IUVV D7P3 332 (grape);
<i>Penicillium herquei</i>	MUCL 14047 (soil); MUCL 29224 (wood)
<i>Penicillium islandicum</i>	MUCL 14074 (soil)

<i>Penicillium italicum</i>	MUCL 14256 (Citrus limonia)
<i>Penicillium minioluteum</i>	MUCL 28666 (unkown); IFV M04/029 (grape); IFV M04/058 (grape); IFV M06/021 (grape); IFV M08/228 (grape); IFV M08/233 (grape); IFV M08/402 (grape); IUVV 05-231 (grape); IUVV 07-421 (grape); IUVV 07-422 (grape); IUVV 07-521 (grape); IUVV 07-523 (grape); IUVV 07-531 (grape); IUVV 08-311 (grape); IUVV D1P3-131 (grape); IUVV D4P3 311 (grape); IUVV D5P3-322 (grape); IUVV D7P5-311 (grape); IUVV D7P5 312 (grape); IUVV D7P5 331 (grape); IUVV D7P5 332 (grape); IUVV D7P5 333 (grape); IUVV D7P5 41 (grape); IUVV D8P5-311 (grape); IUVV D8P5 313 (grape); IUVV D8P5-331 (grape); MI-F21 (grape leaf)
<i>Penicillium oxalicum</i>	MI-F21 (grape leaf)
<i>Penicillium paneum</i>	MUCL 40611 (mouldy rye bread); IUVV 7 (grape)
<i>Penicillium paxilli</i>	MUCL 38787 (optical instrument)
<i>Penicillium raistrickii</i>	MI-F5 (grape leaf); MI-F25 (grape leaf); IUVV D9P3 321 (grape);
<i>Penicillium roqueforti</i>	NRRL 849 (food, French roquefort cheese)
<i>Penicillium simplicissimum</i>	MUCL 14375 (soil)
<i>Penicillium spinulosum</i>	MUCL 13911 (air); MUCL 35033 (wood in process of drying in the open air, Quercus sp.); Ifv M04/032 (grape); IFV M04/065 (grape); IFV M04/087 (grape); IFV M05/026 (grape); IFV M06/050 (grape); IFV M06/176 (grape); IFV M08/220 (grape); IFV M08/227 (grape); IFV M08/245 (grape); IFV M08/403 (grape); IFV M08/404 (grape); IFV M08/405 (grape); IFV M08/410 (grape); IFV M08/411 (grape); IUVV 8 (grape); IUVV 05-311 (grape); IUVV 07-432 (grape); IUVV 08-321 (grape); IUVV 08-331 (grape); IUVV 08-411 (grape); IUVV 11-311 (grape); IUVV 12-431 (grape); IUVV D1P3 312 (grape); IUVV D1P3 332 (grape); IUVV D1P5-321 (grape); IUVV D1P5 332 (grape); IUVV D2AP3 311 (grape); IUVV D2AP4-331 (grape); IUVV D2AP5-42 (grape); IUVV D2BP4 221 (grape); IUVV D2BP4 11 (grape); IUVV D2BP5 41 (grape); IUVV D2BP5 211 (grape); IUVV D4P4 41 (grape); IUVV D4P4-412 (grape); IUVV D4P4 221 (grape); IUVV D4P4 421 (grape); IUVV D4P5 411 (grape); IUVV D4P5 412 (grape); IUVV D6P3 01 (grape); IUVV D6P3 133 (grape); IUVV D6P3 134 (grape); IUVV D6P4-41 (grape); IUVV D7P3 131 (grape); IUVV D7P3 132 (grape); IUVV D9P3-312 (grape); IUVV D9P3 321 (grape); IUVV D9P3 331 (grape); IUVV D9P3 333 (grape); IUVV D9P3 411 (grape); IUVV D9P3-412 (grape); IUVV D9P5-311 (grape);
<i>Penicillium thomii</i>	MUCL 31204 (pine cone); MI-F6 (grape leaf); IFV M04/028 (grape); IFV M06/044 (grape); IUVV D7P3-333 (grape);
<i>Penicillium verrucosum</i>	MUCL 28674 (unkown)
<i>Penicillium verruculosum</i>	IUVV D2AP5 11 (grape); IUVV D2AP5 41 (grape); IUVV D2AP5 431 (grape); IUVV D4P5 431 (grape); IUVV D4P5 432 (grape);
<i>Pilidiella diplodiella</i>	MUCL 47330 (<i>Vitis vinifera</i>) IUVV D2BP3 221 (grape); IUVV D8P4 321 (grape);
<i>Thanatephorus cucumeris</i> (<i>Rhizoctonia solani</i>)	IUVV 13-411 (grape)
<i>Trichoderma harzianum</i>	MUCL 29707 (soil)
<i>Trichoderma koningiopsis</i>	IUVV 07-211 (grape); IUVV D5P4-11 (grape); IUVV D5P4 231 (grape); IUVV D5P4 311 (grape); IUVV D8P5 312 (grape); IUVV D9P3 311 (grape);
<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	MUCL 44915 (brown forest soil)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	BM 45 (Lallemand SA Blagnac France)

MUCL: Mycothèque de l'Université Catholique de Louvain (Belgium); **ATCC :** American Type Culture Collection (USA); **ARS (NRRL):** Agricultural Research Service Collection (USA) **IUVV:** Collection of the Institut Universitaire de la Vigne et du Vin (France); **IFV :** Collection of Institut Français de la Vigne et du Vin (IFV Beaune, France); **MI:** Collection of University of Agronomical Sciences and Veterinary Medicine Bucharest (Romania)

Plates were incubated for 4 days at 25°C, and each fungal colony considered to represent different genera and species was isolated and conserved on malt-extract agar (MEA). The isolates were screened by macroscopic and microscopic observations and the identifications were confirmed by PCR ITS-RFLP and 5.8-ITS sequencing. Isolated fungal strains have been deposited in the Institut Universitaire de la Vigne et du Vin culture collection.

The reference strains used included: 33 strains from the ARS (NRRL), ATCC and MUCL collections; 48 strains from the IFV collection (Beaune, France) that had been isolated from different vineyards in Burgundy; and 15 strains from the Collection of the University of Agronomical Sciences and Veterinary Medicine, Bucharest, Romania (MI) isolated from grapes or leaves (Table 1).

2.2 DNA preparation

All fungal strains were grown on potato-dextrose broth (Difco, Fisher Bioblock Scientific, Illkirch, France) at 28°C for 5 days. Cultures were centrifuged to collect the mycelium which was frozen in liquid nitrogen and ground to a fine powder. About 150 mg-200 mg of frozen mycelium was used for DNA extraction using the commercial EZNA Fungal DNA kit (Omega bio-teck, Doraville, USA) according to the manufacturer's instructions.

2.3. PCR reaction and DNA digestions

The 5.8S-ITS region was amplified by PCR using universal fungal primers ITS1 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3' and ITS4 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' (White et al. 1990). PCR reactions were performed in 50 µl of 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTPs, 0.5 µM of each primer, 0.025 U of Taq polymerase (Promega Corp., USA) and 10-30 ng of fungal DNA. Reactions were performed on MyCycler thermal cycler (BIO RAD, Hercules, USA) using a program described by Phalip et al. (2004).

PCR products were digested with the restriction enzymes *SduI*, *HinfI*, *MseI* and *HaeIII* (Fermentas, France). These endonucleases were chosen after analysis of ITS sequences deposited in the EMBL (European Molecular Biology Laboratory) data library as allowing to differentiate between isolates.

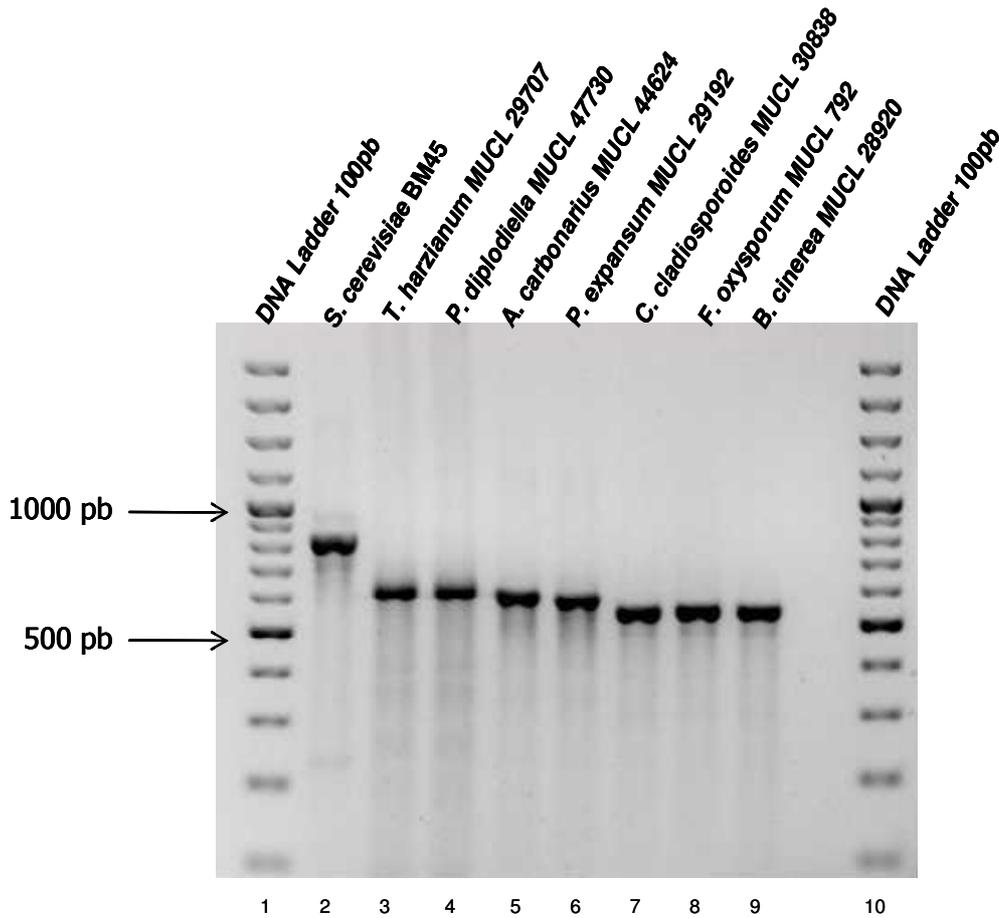


Figure 1: PCR amplification of DNA from reference strains of various genera with primers ITS1 and ITS4.

Lanes 1 and 10: DNA ladder 100 bp. Lane 2: *Saccharomyces cerevisiae* BM45 (840 bp); lane 3: *Trichoderma harzianum* MUCL 29707 (610 bp); lane: 4 *Pilidiella diplodiella* MUCL 47730 (610 bp); lane: 5 *Aspergillus carbonarius* MUCL 44624 (580 bp); lane 6: *Penicillium expansum* MUCL 29192 (570 bp); lane 7: *Cladosporium cladosporoides* MUCL 30838 (540 bp); lane 8: *Fusarium oxysporum* MUCL 792 (540 bp); lane 9: *Botrytis cinerea* MUCL 28920 (540 bp).

An additional endonuclease was used in some cases to complete discrimination: *MaeII*, *Cfr9I*, (Fermentas, France), *Hpy188I* or *PspGI* (New England Biolabs, United Kingdom). The PCR products and their restriction fragments were analyzed in 2% and 3% agarose gels, respectively. After electrophoresis, gels were stained with ethidium bromide ($14 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) and DNA bands were visualized under UV light. Sizes were estimated by comparison with DNA size markers (GeneRuler 100bp DNA Ladder, Fermentas, France) with the computer program Quantity One 4.6.5 Bio-Rad.

2.4. DNA sequencing and sequence analysis

Sequencing was performed on 5.8ITS DNA fragments generated by PCR. The primers ITS1/ITS4 were used. Beckman Coulter Genomics (England) sequenced the PCR products in both orientations. The nucleotide sequences have been deposited in GenBank database (the accession numbers for partial sequences of the 5.8ITS gene are listed in Table 3). The sequences obtained were compared with sequences available in the EMBL database using the **Basic Local Alignment Search Tool** (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). These sequences were aligned with ClustalW (2) and restriction fragments with the <http://biotools.umassmed.edu/tacg4/> program.

3. Results

3.1. Molecular characterization

The main objective of this work was to develop a fast and easy method for identifying species of fungal genera present on grapes. Identification was based on PCR-RFLP of the 5.8S-ITS region. The ITS1 and ITS4 primers described by White et al., 1990 were used to amplify the ribosomal region, which includes the non-coding ITS1 and ITS2 and the 5.8S rRNA gene and which shows low intraspecific polymorphism and high interspecific variability.

The size of the amplified PCR products differs between genera and allows to distinguish, for example, a strain of the genus *Aspergillus* (580 bp) from a strain of the genus *Cladosporium* (540 bp) (Fig. 1.). However, a single PCR was unable to discriminate between some genera, for example between *Cladosporium-Fusarium-Bortrytis*, between *Aspergillus-Penicillium* and between *Trichoderma-Pilidiella*.

A single PCR was also unable to distinguish between some species within a genus, for example *Penicillium*, due to a sequence identity of the amplified region between 90 and 99% (data not shown). We therefore analysed ITS sequences deposited in the EMBL (European Molecular Biology Laboratory) data library to select restriction endonucleases that could be used to differentiate among isolates. The restriction enzymes *SduI*, *HinfI*, *MseI* and *HaeIII* were chosen. Representative ribosomal DNA restriction patterns for reference strains obtained with these restriction endonucleases are shown in Fig. 2.

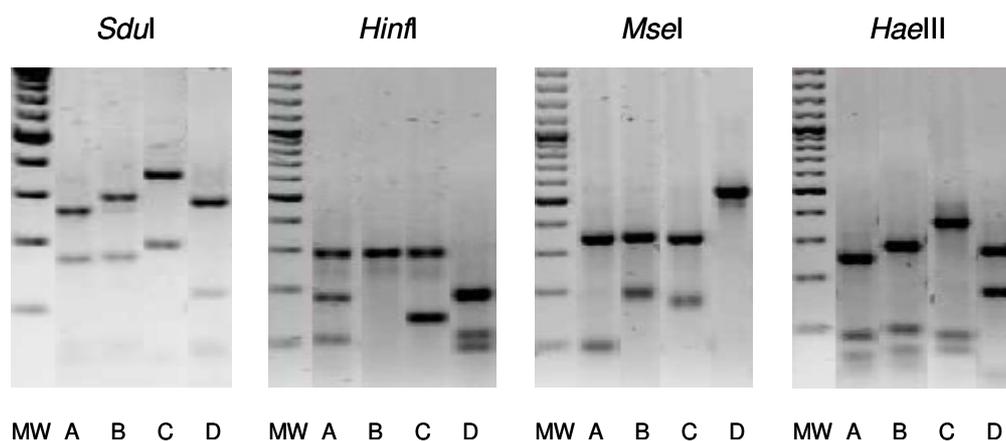


Figure 2: Examples of ribosomal DNA restriction patterns after digestion with the restriction endonucleases *SduI*, *HinfI*, *MseI* and *HaeIII*. Lanes MW correspond to the 100 bp molecular weight marker.

The profiles obtained with one restriction endonuclease were designated with letters as follows: *SduI*: 16 different profiles from A to R; *HinfI*: 6 different profiles from A to F, *MseI*: 9 different profiles from A to I; *HaeIII*: 9 different profiles from A to I (Table 2). These endonucleases were discriminant, especially *SduI* which generates 16 different profiles with the reference strains.

Table 2 : Ribosomal restriction patterns and composite patterns exhibited by the reference strains and isolates analysed

Strains	Number of strains	Amplified products (bp)	Restriction fragments (letter of individual profile)				Composite restriction pattern
			SduI (pb)	HinfI (pb)	MseI (pb)	HaeIII or other enzyme (pb)	
<i>Penicillium expansum</i>	41	584	257+164 (A)	285 +181+106 (A)	364+101+101 (A)	328+ 271 (A, MaeII)	I
<i>Penicillium italicum</i>	1	584	262+170 (A)	290+180+110 (A)	352+102+102 (A)	322+195+83 (B MaeII)	II
<i>Penicillium aurantiogriseum</i>	3	586	262+168 (A)	289+173+ 113 (A)	366+204 (B)	586 (A, BfmI)	III
<i>Penicillium verrucosum</i>	1	585	260+168 (A)	297+180+110 (A)	360+205 (B)	480+ 114 (B, BfmI)	IV
<i>Pencillium chrysogenum</i>	4	585	257+167 (A)	285+285 (B)	362+97+97 (A)	277+180+130 (A, Cfr9I)	V
<i>Penicillium crustosum</i>	7	586	263+169 (A)	293+293 (B)	362+98+98 (A)	191+174+174 (A, Hpy188I)	VI
<i>Penicillium commune</i>	2	586	260+164 (A)	285+285 (B)	353+101+101 (A)	178+178+143 (B, Hpy188I)	VII
<i>Penicillium raistrickii</i>	3	582	259+164 (A)	306 +306 (B)	359+206 (B)	-	VIII
<i>Penicillium oxalicum</i>	1	590	264+170 (A)	313 +313 (B)	316 +207 (E)	-	IX
<i>Penicillium paxilli</i>	1	584	259+170 (A)	297+ 297 (B)	247+133+74 (G)	-	X
<i>Penicillium roqueforti</i>	1	583	285+165 (B)	273+171+101 (A)	359+99+99 (A)	-	XI
<i>Penicillium fellutanum</i>	1	581	294+173 (B)	272 +272 (B)	353+197 (B)	268+ 223+110 (A, PspGI)	XII
<i>Penicillium simplicissimum</i>	1	587	290+172 (B)	278+278 (B)	361+203 (B)	336 +213 (B, PspGI)	XIII
<i>Penicillium corylophilum</i>	3	584	292+164 (B)	282+282 (B)	361+207 (B)	584 (C, PspGI)	XIV
<i>Penicillium bilaiae</i>	1	584	279 +171 (B)	287 +287 (B)	368+207 (B)	328 +276 (D, PspGI)	XV
<i>P. glabrum/P. thomii</i>	11	578	358+194 (C)	290+139+139 (C)	366+206 (B)	-	XVI
<i>Penicillium paneum</i>	2	582	290+121 (D)	284+180+110 (A)	368+203 (B)	-	XVII
<i>Penicillium brevicompactum</i>	3	581	348+164 (E)	287+287 (B)	352+186 (C)	-	XVIII
<i>Penicillium spinulosum</i>	54	576	350+165 (E)	290+136+136 (C)	354+200 (B)	-	XIX
<i>Penicillium verruculosum</i>	5	583	450 (F)	300+300 (B)	550 (D)	-	XX
<i>Penicillium minioluteum</i>	26	601	453 (F)	290+204+104 (E)	573 (F)	-	XXI
<i>Penicillium herquei</i>	2	587	295+170+95 (G)	290+ 290 (B)	293+203+72 (I)	-	XXII
<i>Penicillium islandicum</i>	1	599	320+72 (H)	185+185+120+95 (D)	365+211 (B)	-	XXIII
<i>Aspergillus fumigatus</i>	1	594	265+171 (A)	289+289 (B)	-	-	XXIV
<i>Aspergillus niger</i>	1	599	291+175 (B)	289+289 (B)	-	-	XXV
<i>Aspergillus carbonarius</i>	1	599	285+175 (B)	284+195+113 (E)	-	-	XXVI
<i>Aspergillus terreus</i>	1	608	287+174+98 (G)	296+199+105 (E)	371+215 (B)	-	XXVII
<i>Aspergillus wentii</i>	1	589	289+167+97 (G)	285+195+108 (E)	252+200+65 (H)	-	XXVIII
<i>Aspergillus japonicus</i>	3	575	362+99 (J)	283+283 (B)	-	-	XXIX
<i>Aspergillus aculeatus</i>	1	574	357+99 (J)	269+185+112 (F)	-	-	XXX
<i>Botrytis cinerea</i>	33	539	539 (K)	-	-	433+111 (A, HaeIII)	XXXI
<i>Fusarium oxysporum</i>	2	540	540 (K)	-	-	340+110+90 (B, HaeIII)	XXXII
<i>Epicoccum nigrum</i>	12	545	545 (K)	-	-	545 (C, HaeIII)	XXXIII
<i>Acremonium alternatum</i>	1	576	576 (L)	-	-	290+168+85 (D, HaeIII)	XXXIV
<i>Alternaria alternata</i>	12	570	570 (L)	-	-	433+137 (E, HaeIII)	XXXV
<i>Trichoderma harzianum</i>	1	619	620 (M)	-	-	434+180 (I, HaeIII)	XXXVI
<i>Trichoderma koningiopsis</i>	6	605	600 (R)	-	-	437+168 (I, HaeIII)	XXXVII
<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	1	637	623 (M)	-	-	461+90 (G, HaeIII)	XXXVIII
<i>Pilidiella diplodiella</i>	3	616	299+138+96 (N)	-	-	440+172 (I, HaeIII)	XXXIX
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	37	551	418+126 (O)	-	-	544 (C, HaeIII)	XL
<i>Cladosporium herbarum</i>	2	550	421+123 (O)	-	-	510 (F, HaeIII)	XLI
<i>Thanatephorus cucumeris</i>	1	626	477 (P)	-	-	507+119 (H, HaeIII)	XLII

The individual profiles obtained were combined into composite restriction patterns characteristic of a strain (Table 2). Each reference strain analyzed (ATCC, NRRL, MUCL, MI or IFV collection and for a total of 96 strains) was then assigned to its composite profile. The restriction patterns obtained were compared with restriction patterns deduced for ITS sequences in the EMBL data library. To validate the method, the 5.8ITS sequences of some isolates were determined (Tableau 3).

Table 3 : Strains accession number

Strains	Accession number
<i>Acremonium alternatum</i> IUVV 07-522	FR670315
<i>Alternaria alternata</i> IUVV 03-112	FR670316
<i>Alternaria alternata</i> IUVV D1P4-11	FR670317
<i>Aspergillus japonicus</i> MI-FA3 Buc	FR670318
<i>Aspergillus terreus</i> ATCC 20516	FR670307
<i>Aspergillus wentii</i> IFV M05/018	FR670319
<i>Botrytis cinerea</i> MI-Aligote Husi	FR670320
<i>Epicoccum nigrum</i> IUVV D1P4-231	FR670321
<i>Penicillium aurantiogriseum</i> MUCL 14350	FR670308
<i>Penicillium bilaiae</i> IFV M06/002	FR670325
<i>Penicillium commune</i> MUCL 47241	FR670309
<i>Penicillium corylophilum</i> MI-F1	FR670326
<i>Penicillium corylophilum</i> MI-F10	FR670327
<i>Penicillium corylophilum</i> IFV M04/127	FR670328
<i>Penicillium crustosum</i> MI-AA Buc	FR670329
<i>Penicillium crustosum</i> MI-FA2 Buc	FR670330
<i>Penicillium chrysogenum</i> MI-F11	FR670322
<i>Penicillium chrysogenum</i> MI-F19	FR670323
<i>Penicillium expansum</i> MI-BB Husi	FR670324
<i>Penicillium fellutanum</i> IFV M04/161	FR670331
<i>Penicillium herquei</i> MUCL 29224	FR670310
<i>Penicillium islandicum</i> MUCL 14074	FR670311
<i>Penicillium italicum</i> MUCL 14256	FR670312
<i>Penicillium minioluteum</i> IFV M04/029	FR670332
<i>Penicillium oxalicum</i> MI-F21	FR670333
<i>Penicillium raistrickii</i> MI-F5	FR670334
<i>Penicillium raistrickii</i> MI-F25	FR670335
<i>Penicillium simplicissimum</i> MUCL 14375	FR670313
<i>Penicillium spinulosum</i> MUCL 35033	FR670314
<i>Penicillium spinulosum</i> IFV M04/032	FR670336
<i>Penicillium spinulosum</i> IFV M06/176	FR670337
<i>Penicillium thomii</i> IUVV D7P3-333	FR670338
<i>Penicillium thomii</i> MI-F6	FR670339
<i>Penicillium verruculosum</i> IUVV D4P5-431	FR670340
<i>Thanatephorus cucumeris</i> IUVV 13-411	FR670341
<i>Trichoderma koningiopsis</i> IUVV D5P4-11	FR670342

Figure 3

Panel A

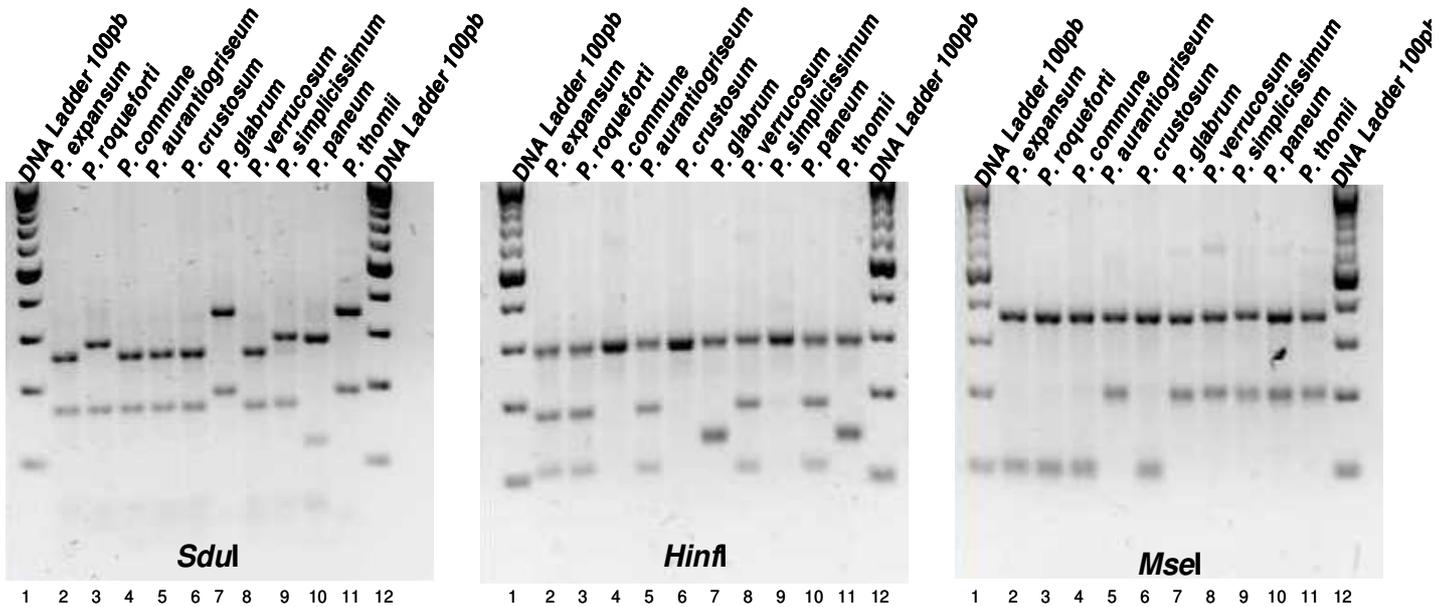


Figure 3: Ribosomal DNA restriction patterns for reference strains after digestion with the restriction endonucleases *SduI*, *HinfI*, *MseI* and *HaeIII*.

Panel A.

SduI Lanes 1 and 12: DNA ladder 100 bp (GeneRuler™ 100 pb DNA ladder); lane 2: *Penicillium expansum* MUCL 29192 (profile A); lane 3: *Penicillium roqueforti* NRRL 849 (profile B); lane 4: *Penicillium commune* MUCL 47241 (profile A); lane 5: *Penicillium aurantiogriseum* MUCL 14350 (profile A); lane 6: *Penicillium crustosum* MUCL 14155 (profile A); lane 7: *Penicillium glabrum* MUCL 35034 (profile C); lane 8: *Penicillium verrucosum* MUCL 28674 (profile A); lane 9: *Penicillium simplicissimum* MUCL 14375 (profile B); lane 10: *Penicillium paneum* MUCL 40611 (profile D); lane 11: *Penicillium thomii* MUCL 31204 (profile C).

HinfI Lanes 1 and 12: DNA ladder 100 bp (GeneRuler™ 100 pb DNA ladder); lane 2: *Penicillium expansum* MUCL 29192 (profile A); lane 3: *Penicillium roqueforti* NRRL 849 (profile A); lane 4: *Penicillium commune* MUCL 47241 (profile B); lane 5: *Penicillium aurantiogriseum* MUCL 14350 (profile A); lane 6: *Penicillium crustosum* MUCL 14155 (profile B); lane 7: *Penicillium glabrum* MUCL 35034 (profile C); lane 8: *Penicillium verrucosum* MUCL 28674 (profile A); lane 9: *Penicillium simplicissimum* MUCL 14375 (profile B); lane 10: *Penicillium paneum* MUCL 40611 (profile A); lane 11: *Penicillium thomii* MUCL 31204 (profile C).

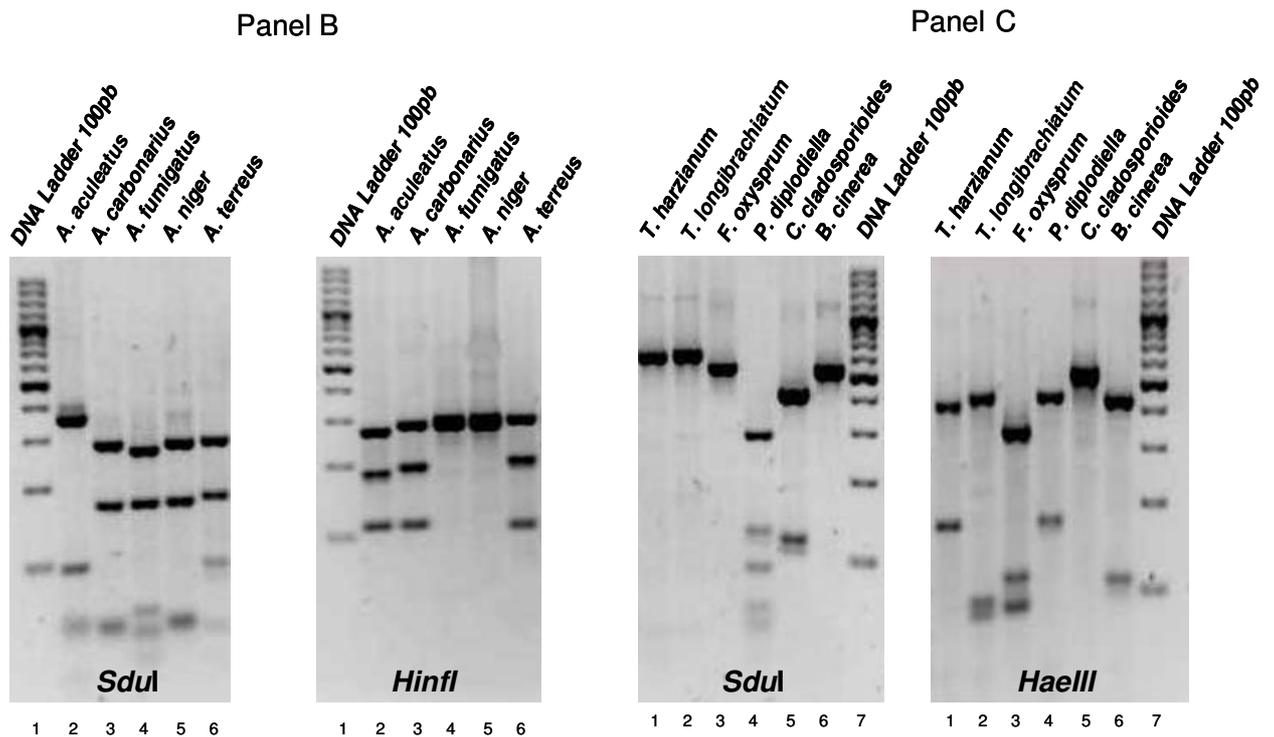
MseI Lanes 1 and 12: DNA ladder 100 bp (GeneRuler™ 100 pb DNA ladder); lane 2: *Penicillium expansum* MUCL 29192 (profile A); lane 3: *Penicillium roqueforti* NRRL 849 (profile A); lane 4: *Penicillium commune* MUCL 47241 (profile A); lane 5: *Penicillium aurantiogriseum* MUCL 14350 (profile B); lane 6: *Penicillium crustosum* MUCL 14155 (profile A); lane 7: *Penicillium glabrum* MUCL 35034 (profile B); lane 8: *Penicillium verrucosum* MUCL 28674 (profile B); lane 9: *Penicillium simplicissimum* MUCL 14375 (profile B); lane 10: *Penicillium paneum* MUCL 40611 (profile B); lane 11: *Penicillium thomii* MUCL 31204 (profile B)

For the genus *Penicillium*, 24 different species were analysed and 22 gave different composite profiles. The species *P. thomii* and *P. glabrum* were the only two different species to give the same composite profile XVI (Fig. 3A. and Table 2). The combination of three endonucleases (*SduI*, *HinfI* and *MseI*) differentiated 11 different species of *Penicillium*: *P. brevicompactum*, *P. herquei*, *P. islandicum*, *P. minioluteum*, *P. oxalicum*, *P. paneum*, *P. paxilli*, *P. raistrickii*, *P. roqueforti*, *P. spinulosum* and *P. verruculosum* (Figure 3A and Table 2). In some cases, a fourth enzyme was used to complete discrimination: *MaeII* (*P. expansum* and *P. italicum*), *PspGI* (*P. fellutanum*, *P. simplicissimum*, *P. corylophilum* and *P. bilaiae*), and *Cfr9I* or *Hpy188I* (*P. chrysogenum*, *P. crustosum* and *P. commune*) (Table 2).

For the genus *Aspergillus*, the seven different species analysed were each assigned to a unique composite profile (Fig. 3B. and Table 2). The endonucleases *SduI* and *HinfI* were sufficient to discriminate between *A. aculeatus*, *A. carbonarius*, *A. fumigatus*, *A. niger* and *A. japonicus*. The use of a third enzyme *MseI* permitted the differentiation of *A. terreus* and *A. wentii* (Table 2).

Two endonucleases (*SduI* and *HaeIII*) were used to differentiate twelve different strains belonging to the genera *Acremonium*, *Alternaria*, *Botrytis*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Epicoccum*, *Pilidiella*, *Thanatephorus* and *Trichoderma*. These two endonucleases also permitted differentiation between *C. cladosporioides* and *C. herbarum* and between *T. harzianum*, *T. koningiopsis* and *T. longibrachiatsum* (Fig. 3C. and Table 2).

Figure 3

**Panel B.**

SduI Lane 1: DNA ladder 100 bp (GeneRuler™ 100 pb DNA ladder); lane 2: *Aspergillus aculeatus* MUCL 6225 (profile J); lane 3: *Aspergillus carbonarius* MUCL 44624 (profile B); lane 4: *Aspergillus fumigatus* MUCL 14312 (profile A); lane 5: *Aspergillus niger* MUCL 745 (profile B); lane 6: *Aspergillus terreus* ATCC 20516 (profile G).

HinfI Lane 1: DNA ladder 100pb (GeneRuler™ 100 pb DNA ladder); lane 2: *Aspergillus aculeatus* MUCL 6225 (profile F); lane 3: *Aspergillus carbonarius* MUCL 44624 (profile E); lane 4: *Aspergillus fumigatus* MUCL 14312 (profile B); lane 5: *Aspergillus niger* MUCL 745 (profile B); lane 6: *Aspergillus terreus* ATCC 20516 (profile E).

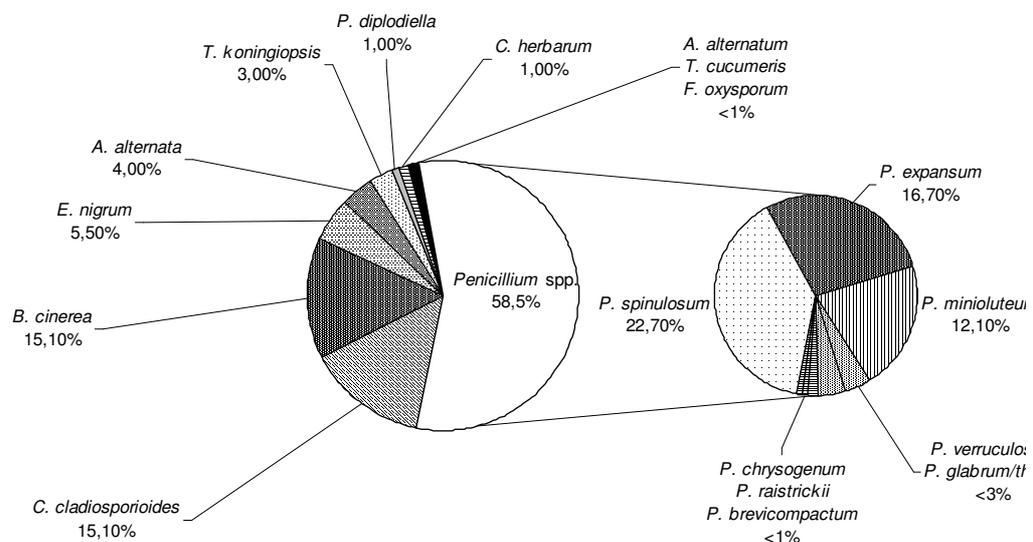
Panel C.

SduI Lane 1: *Trichoderma harzianum* MUCL 29707 (profile M); lane 2: *Trichoderma longibrachiatum* MUCL 44915 (profile M); lane 3: *Fusarium oxysporum* MUCL 792 (profile K); lane 4: *Pilidiella diplodiella* MUCL 47330 (profile N); lane 5: *Cladosporium cladosporioides* MUCL 30838 (profile O); lane 6: *Botrytis cinerea* MUCL 28920 (profile K), lane 7: DNA ladder 100 bp.

HaeIII Lane 1: *Trichoderma harzianum* MUCL 29707 (profile I); lane 2: *Trichoderma longibrachiatum* MUCL 44915 (profile G); lane 3: *Fusarium oxysporum* MUCL 792 (profile B); lane 4: *Pilidiella diplodiella* MUCL 47330 (profile I); lane 5: *Cladosporium cladosporioides* MUCL 30838 (profile C); lane 6: *Botrytis cinerea* MUCL 28920 (profile A), lane 7: DNA ladder 100 bp.

3.2. Fungal diversity on grapes

This PCR ITS-RFLP was applied to identify the fungi collected from grapes in various Burgundy vineyards. One hundred and ninety nine fungal strains were isolated and identified at species level by PCR ITS-RFLP. The restriction patterns obtained were compared with restriction patterns of reference strains (ATCC, NRRL, MUCL, MI or IFV collection). The most prevalent mycobiota were *Penicillium* species, constituting 58.50% of all isolates (Fig. 4.). No *Aspergillus* species was isolated (Fig. 4.). The species *C. cladosporioides*, *B. cinerea* and *E. nigrum* were isolated and constituted 15.10%, 15.10% and 5.50% of all isolates, respectively. The species *A. alternata* and *T. koningiopsis* were also isolated although at low frequencies (4.00%) and the species *P. diplodiella*, *C. herbarum*, *A. alternatum*, *T. cucumeris* and *F. oxysporum* constituted 1% or less of all isolates. Among the *Penicillium* species isolated, *P. spinulosum* was the most frequent (22.70%); *P. expansum* and *P. minioluteum* were isolated at frequencies of 16.70% and 12.10%, respectively. *P. verruculosum*, *P. glabrum/thomii* were isolated at low frequencies (<3%) and *P. chrysogenum*, *P. raistrickii* and *P. brevicompactum* constituted 1% or less of all isolates.



4. Discussion

Microbial population of grapes is important from a technological point of view because it determines the quality of wine. If the ecology of yeasts and lactic acid bacteria has been studied extensively, few studies have focused on fungal populations of grapes. One reason is the lack of reliable and rapid methods: methods currently used to detect and identify fungal strains on grapes are time consuming, laborious and may fail to reveal the extent of fungal diversity. A better knowledge of the fungal diversity on grapes, particularly as concerns species responsible for wine defects, may help efforts to control their development. Indeed, the main objective in this work was to test the effectiveness of PCR ITS-RFLP as a fast, easy and reliable method for identifying fungal genera present on grapes. We therefore tested a large number of isolates, including reference strains, of 43 species belonging to 11 genera: *Alternaria*, *Acremonium*, *Aspergillus*, *Botrytis*, *Cladosporium*, *Epicoccum*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Pilidiella*, *Thanatephorus* and *Trichoderma* were studied. The PCR ITS-RFLP technique gave 42 different composite profiles for the 43 species. Only *P. thomii* remained indistinguishable from *P. glabrum*. Thus, 96.3% of the tested strains could be discriminated using our method. The combination of two endonucleases (41% of the total composite profiles), three endonucleases (33% of the total composite profiles) or four endonucleases (26% of the total composite profiles) enabled identification of these fungal strains at the species level. Dean et al. (2005b) reported a PCR ITS-RFLP method using a combination of four restriction enzymes (*EcoRI*, *HaeIII*, *MspI*, and *HinfI*) to discriminate the genera *Stachybotrys*, *Penicillium*, *Aspergillus* and *Cladosporium* at the species level. In our study, the combination of only two endonucleases was sufficient to differentiate the genera *Acremonium*, *Alternaria*, *Botrytis*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Epicoccum*, *Pilidiella*, *Thanatephorus* and *Trichoderma* at the species level. Discrimination within the genus *Penicillium* required the largest number of endonucleases because of the substantial sequence identity of the amplified region, but our method nevertheless differentiated 22 of 24 species in a set of 175 strains. Dupont et al. (2006) have used a combination of 5 endonucleases to discriminate 12 species of *Penicillium* subgenus *Biverticillium* among 60 isolates. But *P. purpurogenum* remained indistinguishable from *P. funiculosum*. Moreover, our method successfully classified seven species of the genus *Aspergillus* with a combination of only two (71% of the total composite profiles) or three endonucleases (29% of the total composite profiles).

Table 4 : Fungal species isolated on grapes and identified by different methods

Genus	Species	Identification Method	Reference
<i>Acremonium</i>	nd	classical method	Bau et al. 2005a; Serra et al. 2005
<i>Acremonium</i>	<i>alternatum</i>	classical method	Sage et al. 2002
	other species	PCR ITS-RFLP classical method	In this study Sage et al. 2004
<i>Alternaria</i>	nd	classical method	Abrunhosa et al. 2001; Bau et al. 2005a; Guérin et al. 2007; Serra et al. 2005
<i>Alternaria</i>	<i>alternata</i>	classical method PCR ITS-RFLP	Sage et al. 2002; 2004 In this study
<i>Cladosporium</i>	nd	classical method	Abrunhosa et al. 2001; Bau et al. 2005a; Guérin et al., 2007; Serra et al. 2005
<i>Cladosporium</i>	<i>cladosporioides</i>	classical method PCR ITS-RFLP	Sage et al. 2002; 2004 In this study
<i>Cladosporium</i>	<i>herbarum</i>	classical method PCR ITS-RFLP	Sage et al. 2004 In this study
<i>Epicoccum</i>	<i>nigrum</i>	classical method PCR ITS-RFLP	Sage et al. 2002; Serra et al. 2005 In this study
<i>Fusarium</i>	nd	classical method	Abrunhosa et al. 2001; Serra et al. 2005
<i>Fusarium</i>	<i>oxysporum</i>	PCR ITS-RFLP	In this study
	other species	classical method	Sage et al. 2002; 2004
<i>Penicillium</i>	<i>aurantiogriseum</i>	classical method PCR ITS-RFLP	Abrunhosa et al. 2001; Sage et al. 2004; Serra et al. 2005 In this study
<i>Penicillium</i>	<i>brevicompactum</i>	classical method sequencing PCR ITS-RFLP	Abrunhosa et al. 2001; Bau et al. 2005a; Béjaoui et al. 2006; Guérin et al. 2007; Sage et al. 2002; 2004; Serra et al. 2005 La Guerche et al. 2006 In this study
<i>Penicillium</i>	<i>chrysogenum</i>	classical method PCR ITS-RFLP	Sage et al., 2002; 2004; Bau et al., 2005a; Serra et al., 2005 In this study
<i>Penicillium</i>	<i>crustosum</i>	classical method PCR ITS-RFLP	Bau et al. 2005a; Sage et al. 2004; Serra et al. 2005 Béjaoui et al. 2006 In this study
	<i>expansum</i>	classical method	Abrunhosa et al. 2001; Béjaoui et al. 2006; Guérin et al. 2007; Sage et al. 2002; 2004; Serra et al. 2005 Doare-Lebrun et al. 2006
<i>Penicillium</i>	<i>expansum/digitatum</i>	PCR-TTGE	Garcia et al. 2006; La Guerche et al. 2006
	<i>expansum</i>	CAPS/sequencing	In this study
	<i>expansum</i>	PCR ITS-RFLP	
<i>Penicillium</i>	<i>glabrum</i>	classical method	Abrunhosa et al. 2001; Bau et al. 2005a; Béjaoui et al. 2006; Sage et al. 2002; 2004 Serra et al. 2005
<i>Penicillium</i>	<i>glabrum/spinulosum</i>	classical method	In this study
	<i>glabrum/thomii</i>	PCR ITS-RFLP	
<i>Penicillium</i>	<i>minioluteum</i>	classical method PCR ITS-RFLP	Abrunhosa et al. 2001; Guérin et al. 2007; Sage et al. 2002;2004; Serra et al. 2005 In this study
<i>Penicillium</i>	<i>paneum</i>	PCR ITS-RFLP	In this study
<i>Penicillium</i>	<i>raistrickii</i>	classical method PCR ITS-RFLP	Sage et al. 2004; Serra et al. 2005 In this study
<i>Penicillium</i>	<i>spinulosum</i>	classical method PCR-DGGE PCR ITS-RFLP	Abrunhosa et al. 2001; Béjaoui et al. 2006; Guérin et al. 2007; Sage et al. 2002; 2004; Laforgue et al., 2009 In this study
<i>Penicillium</i>	<i>thomii</i>	classical method sequencing PCR ITS-RFLP	Abrunhosa et al. 2001; Bau et al. 2005a; Guérin et al. 2007; Sage et al. 2002; 2004; Serra et al. 2005 La Guerche et al. 2006 In this study
<i>Penicillium</i>	<i>verruculosum</i>	classical method PCR ITS-RFLP	Serra et al. 2005 In this study

<i>Pilidiella</i>	<i>diplodiella</i>	classical method PCR ITS-RFLP	Sage et al. 2004 In this study
<i>Thanatephorus</i>	<i>cucumeris</i>	PCR ITS-RFLP	In this study
<i>Trichoderma</i>	nd	classical method	Bau et al. 2005a; Serra et al. 2005
<i>Trichoderma</i>	<i>koningiopsis</i>	PCR ITS-RFLP	In this study
	other species	classical method	Sage et al. 2002; 2004

Classical method : macroscopic and microscopic morphological examination

nd : non determined

Martinez-Culebras and Ramon, (2007) reported that three endonucleases were necessary to differentiate *A. niger*, *A. tubingensis*, *A. carbonarius* and *A. aculeatus*. Thus, the PCR-ITS-RFLP method we developed appears to be highly discriminant and required fewer endonucleases than previously described techniques.

We used this method to identify 199 strains isolated from grapes from different vineyards in Burgundy. *Penicillium* was dominant (58.5% of all isolates). *Penicillium* species are more common in temperate and cold climates such as in northern Europe, whereas *Aspergillus* species are commonly associated with warmer and tropical regions (Pitt and Hocking, 1997; Serra et al. 2006). Indeed, no strain of *Aspergillus* was isolated in this study. Guérin et al. 2007 observed a similar distribution in other French vineyards (Alsace, Beaujolais, Bordeaux, Burgundy and Val de Loire), except that few strains of *Aspergillus* were isolated in Beaujolais and Burgundy. In our study, *P. spinulosum* was the most frequently isolated species of *Penicillium*, followed by *P. expansum* and *P. miniluteum*. Guerin et al. 2007 observed that the predominant species of *Penicillium* isolated differed between vineyards: *P. expansum* (Alsace, Bordeaux, Val de Loire) and *P. purpurescens* (Beaujolais and Burgundy). La Guerche et al. 2004 reported that *P. expansum* was the predominant species isolated from Bordeaux vineyards.

The strains *Cladosporium cladosporioides* and *Botrytis cinerea* were the most frequently isolated microorganisms other than members of the genus *Penicillium*. This is consistent with previous reports which indicate that seven genera are frequently identified on grapes: *Alternaria* spp., *Aspergillus* spp., *Botrytis* spp., *Cladosporium* spp., *Epicoccum* spp., *Penicillium* spp. et *Rhizopus* spp. (Abrunhosa et al. 2001; Bau et al. 2005a; Bejaoui et al. 2006; La Guerche et al. 2006 ; Sage et al. 2002 and 2004; Serra et al. 2005 and 2006). While most genera isolated in this study have already been described in other work, our method allows reliable identification at the species level and the following species identified in this study are described for the first time on grapes: *Fusarium oxysporum*, *Penicillium paneum*, *Thanatephorus cucumeris* and *Trichoderma koningiopsis* (Table 4).

Our method is culture dependent. Nevertheless, culture independent methods, such as PCR-TTGE or PCR-DGGE (Doaré-Lebrun et al. 2006, Laforgue et al. 2009), do not reveal genera and species other than those we have identified.

Indeed, our method allows the identification of a greater number of species than these culture independent methods (Table 4). This is the first exhaustive study of fungal diversity on grapes using a reliable and rapid molecular method. Moreover this work has contributed to the enriching of the database of fungal ITS sequences.

In conclusion, the PCR ITS-RFLP method we describe facilitates rapid and easy identification of fungal species isolated from grapes without sequencing. This assay is a routine, sensitive and reliable compared to morphological identification and can be used to screen vast numbers of isolates in a short time. Consequently, it could be very useful for studies comparing a large samples of isolates where sequencing cannot reasonably be undertaken. This method could be applied to study the impact of pesticide treatments or cultural practices on the fungal flora of grapes. Moreover, this method allows thorough investigations of fungal diversity on grapes, and particularly the distribution and the identification of *Penicillium* and *Aspergillus* species responsible for the production of musty or earthy aromas and mycotoxins.

Acknowledgements

This study was supported by the Agence Universitaire de la Francophonie (AUF).

Références

- Abrunhosa, L., Paterson, R.R., Kozakiewicz, Z., Lima, N. Venancio, A., 2001. Mycotoxin production from fungi isolated from grapes. *Letters in Applied Microbiology* 32: 240-242.
- Accensi, F., Cano, J., Figuera L., Abarca, M.L., Cabañas, F.J., 1999. New PCR method to differentiate species in the *Aspergillus niger* aggregate. *FEMS Microbiology Letters* 180, 191-196.
- Alexandre, H., Costello, P.J., Guzzo, J., Remize, F. Guilloux-Benatier, M., 2004. Yeast-Bacteria Interaction in wine: Current knowledge and perspectives. *International Journal of Food Microbiology* 93, 141-154.
- Battilani, P., Pietri, A., 2002. Ochratoxin A in grapes and wine. *European Journal of Plant Pathology* 108, 639-643.
- Bau, M., Bragulat, M.R., Abarca, M.L., Mínguez, S., Cabanes, F.J., 2005a. Ochratoxigenic species from Spanish wine grapes. *International Journal of Food Microbiology* 98, 125-130.
- Bau, M., Castella, G., Bragulat, M.R., Cabanes, F.J., 2005b. DNA-based characterization of ochratoxin-A-producing and non-producing *Aspergillus carbonarius* strains from grapes. *Research in Microbiology* 156, 375-381.
- Bau, M., Castella, G., Bragulat, M.R., Cabanes, F.J., 2006. RFLP characterization of *Aspergillus niger* aggregate species from grapes from Europe and Israel. *International Journal of Food Microbiology* 111, S18-S21.
- Bejaoui, H., Mathieu, F., Taillandier, P., Lebrihi, A., 2006. Black aspergilli and ochratoxin A production in French vineyards. *International Journal of Food Microbiology* 111, S46-S52.
- Bellí, N., Bau, M., Marín, S., Abarca, M.L., Ramos, A.J., Bragulat, M.R., 2006. Mycobiota and ochratoxin A producing from Spanish wine grapes. *International Journal of Food Microbiology* 111, S40-S45.
- Chatonnet, P., Dubourdieu, D., Boidron, J., Pons, M., 1992. The origin of ethylphenols in wines. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 62, 191-202.
- Chulze, S.N., Magnoli, C.E., Dalcerro, A.M., 2006. Occurrence of ochratoxin A in wine and ochratoxigenic mycoflora in grapes and dried vine fruits in South America. *International Journal of Food Microbiology* 111, S5-S9.
- Colombo, F., Vallone, L., Giaretti, M., Dragoni, I., 2003. Identification of *Penicillium aurantiogriseum* species with a method of polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. *Food Control* 14, 137-140.
- Darriet, P., Pons, M., Lamy, S., Dubourdieu, D., 2000. Identification and quantification of geosmin, a powerful earthy odorant contaminating wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48, 4835-4838.
- Dean, T.R., Kohan, M., Betancourt, D., Menetrez, M.Y., 2005a. A simple polymerase chain reaction/restriction fragment length polymorphism assay capable of identifying medically relevant filamentous fungi. *Molecular Biotechnology* 31, 21-27.
- Dean, T.R., Ropp, B., Betancourt, D., Menetrez, M.Y., 2005b. A simple multiplex polymerase chain reaction assay for the identification of four environmentally fungal contaminants. *Journal of Microbiological Methods* 61, 9-16.
- De Valk, H.A., Klaassen, C.H.W., Meis, J.F.G.M., 2008. Molecular typing of *Aspergillus* species. *Mycoses* 51, 463-476.
- Dias, L., Dias, S., Sancho, T., Stender, H., Querol, A., Malfeito-Ferreira, M., Loureiro, V., 2003. Identification of yeasts isolated from wine-related environments and capable of producing 4-ethylphenol. *Food Microbiology* 20, 567-574.
- Doaré-Lebrun, E., El Arbi, A., Charlet, M., Guérin, L., Pernelle, J.J., Ogier, J.C., Bouix, M., 2006. Analysis of fungal diversity of grapes by application of temporal temperature gradient gel electrophoresis – potentialities and limit of the method. *Journal of Applied Microbiology* 101, 1340-1350.
- Drouillard, J.B., Martins-Gueunier, M., Knauf-Beiter, G., 2005. Goûts moisi-terreux dans les vins: premiers résultats pratiques d'un partenariat filière. *Revue des Oenologues* 214, 18-23.
- Dupont, J., Magnin, S., Marti, A., Brousse, M., 1999. Molecular tools for identification of *Penicillium* starter cultures used in the food industry. *International Journal of Food Microbiology* 49, 109-118.
- Dupont, J., Dennetière, B., Jacquet, C., Roquebert, M.F., 2006. PCR-RFLP of ITS rDNA for the rapid identification of *Penicillium* subgenus *Biverticillium* species. *Revista Iberoamericana Micología* 26, 145-150.
- Esteve-Zarzoso, B., Belloch, C., Uruburu, F., Querol, A., 1999. Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *International Journal of Systematic Bacteriology* 49, 329-337.

- Garcia, C., La Guerche, S., Mouhamadou, B., Férandon, C., Labarère, J., Blancard, D., Darriet, P., Barroso, G., 2006. A CAPS test allowing a rapid distinction of *Penicillium expansum* among fungal species collected on grape berries, inferred from the sequence and secondary structure of the mitochondrial SSU-rRNA. *International Journal of Food Microbiology* 111: 183-190.
- Geisen, R., Cantor, M.D., Hansen, T.K., Hozapfel, W.H., Jakobsen M., 2001. Characterization of *Penicillium roqueforti* strains used as cheese starter cultures by RAPD typing. *International Journal of Food Microbiology* 65, 183-191.
- Guérin, L., Guyot, F., Vincent, B., Lempereur, V., 2007. 8ième Symposium International d'œnologie, Bordeaux, Juin. In : Lonvaud A, Gery L, Miettn-Peuchot M, Darriet P, Lucas P, de Revel G, Teissedre PL. oeno 2007. Tome 1. Vigne et Vin Publications Internationales Ed., Villeneuve d'Ornon, p. 76-78.
- La Guerche, S., 2004. Recherches sur les déviations organoleptiques des moûts et des vins associées au développement de pourritures sur les raisins. Etude particulière de la géosmine. Thèse de Doctorat, Université Bordeaux 2.
- La Guerche, S., Gracia, C., Darriet, P., Dubourdieu, D., Labarère, J., 2004. Characterization of *Penicillium* species isolated from grape berries by their internal transcribed spacer (ITS1) sequences and by gas chromatography-mass spectrometry analysis of geosmin production. *Current Microbiology* 48, 405-411.
- La Guerche, S., Dauphin, B., Pons, M., Blancard, D., Darriet, P., 2006. Characterization of some mushroom and earthy off-odors microbially induced by the development of rot on grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 9193-9200.
- La Guerche, S., Blancard, D., Dauphin, B., Sauris, P., Darriet, P. 2007. 8ième Symposium International d'œnologie, Bordeaux, Juin. In : Lonvaud A, Gery L, Miettn-Peuchot M, Darriet P, Lucas P, de Revel G, Teissedre PL. oeno 2007. Tome 1. Vigne et Vin Publications Internationales Ed., Villeneuve d'Ornon, p. 102-104.
- Laforgue, R., Guérin, L., Pernelle, J.J., Monet, C., Dupont, J., Bouix M., 2009. Evaluation of PCR-DGGE methodology to monitor fungal communities on grapes. *Journal of Applied Microbiology* 107, 1208-1218.
- Lee S.L., Taylor, J.W., 1992. Phylogeny of five like protocistan *Phytophthora* species inferred from the internal transcribed spacers of ribosomal DNA. *Molecular Biology and Evolution* 9, 636-653.
- Lonvaud-Funel, A., 1999. Lactic acid bacteria in the quality improvement and depreciation of wine. *Antonie van Leeuwenhoek* 76, 317-331.
- Martínez-Culebras, P.V., Ramón, D., 2007. An ITS-RFLP method to identify black *Aspergillus* isolates responsible for OTA contamination in grapes and wine. *International Journal of Food Microbiology* 113, 147-153.
- Medina, A., Mateo, R., Laura Lopez-Ocana, L., Valle-Algarra, F.M., Jimenez M., 2005. Study of Spanish Grape Mycobiota and Ochratoxin A Production by Isolates of *Aspergillus tubingensis* and Other Members of *Aspergillus* Section *Nigri*. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 4696-4702.
- Mule, G., Susca, A., Logrieco, A., Stea, G., Visconti, A., 2006. Development of a quantitative real-time PCR assay for the detection of *Aspergillus carbonarius* in grapes. *International Journal of Food Microbiology* 111, S28-S34.
- Nielsen, J.C., Richelieu, M., 1999. Control of flavor development in wine during and after malolactic fermentation by *Oenococcus oeni*. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 740-745.
- Oliveri, C., Torta, L., Catara, V., 2008. A polyphasic approach to the identification of ochratoxin A-producing black *Aspergillus* isolates from vineyards in Sicily. *International Journal of Food Microbiology* 127, 147-154.
- Phalip, V., Hatsch, D., Jeltsch, J.M., 2004. Application of yeast method for DNA extraction associated with database interrogations for the characterization of various filamentous fungi from diseased hop. *Biotechnology Letters* 26, 409-413.
- Perrone, G., Susca, A., Epifani, F., Mulè, G., 2006. AFLP characterization of southern Europe population of *Aspergillus* section *Nigri* from grapes. *International Journal of Food Microbiology* 111, S22-S27.
- Pitt, J.I., Hocking, A.D., 1997. *Fungi and Food Spoilage*, 2nd edn. Blackie Academic and Professional, London.
- Prakitchaiwattana, C.J., Fleet, G.H., Heard, G.M., 2004. Application and evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis to analyse the yeast ecology of wine grapes. *FEMS Yeast Research* 4, 865-877.
- Renouf, V., Olivier, C., Lonvaud-Funel, A., 2007. Inventory and monitoring of wine microbial consortia. *Applied Microbiology and Biotechnology* 75, 149-164.

- Romano, P., Fiore, C., Paraggio, M., Caruso, M., Capece, A., 2003. Function of yeast species and strains in wine flavour. *International Journal of Food Microbiology* 86, 169-180.
- Sabate, J., Cano, J., Esteve-Zarzoro, B., Guillamon, J.M., 2002. Isolation and identification of yeasts associated with vineyard and winery by RFLP analysis of ribosomal genes and mitochondrial DNA. *Microbial Research* 157, 267-274.
- Sage, L., Krivobok, S., Delbos, E., Seigle-Murandi, F., Creppy, E.E., 2002. Fungal flora and ochratoxin A production in grapes and musts from France. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 1306-1311.
- Sage, L., Garon, D., Egle-Murandi, F., 2004. Fungal microflora and ochratoxin a risk in French vineyards. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52, 5764-5768.
- Selma, V.M., Martínez-Culebras, P.V., Aznar, R., 2008. Real-time based procedures for detection and quantification of *Aspergillus carbonarius* in vine grapes. *International Journal of Food Microbiology* 122, 126-134.
- Serra, R., Bragab, A., Venâncio, A., 2005. Mycotoxin-producing and other fungi isolated from grapes for wine production, with particular emphasis on ochratoxin A. *Research in Microbiology* 156, 515-521.
- Serra, R., Lourenço, A., Alipio, P., Venancio, A., 2006. Influence of the region of origin on the mycobiota of grapes with emphasis on *Aspergillus* and *Penicillium* species. *Mycological Research* 110, 971-978.
- Suárez, R., Suárez-Lepe, J.A., Morata, A., Calderon, F., 2007. The production of ethylphenols in wine by yeasts of the genera *Brettanomyces* and *Dekkera*. A review. *Food Chemistry* 102, 10-21.
- Tchobanov, I., Gal, L., Guilloux-Benatier, M., Remize, F., Nardi, T., Guzzo, J., Serpaggi, V., Alexandre, H., 2008. Partial vinylphenol reductase purification and characterization from *Brettanomyces bruxellensis*. *FEMS Microbiology Letters* 284, 213-217.
- Vacher, B., Pons, M., Dauphin, B., La Guerche, S., Blancard, D., Sauris, P., Darriet, P., 2008. Déviations organoleptiques des moûts et des vins associées aux pourritures des raisins. *Revue des Oenologues* 129, 9-13.
- Versavaud, A., Courcoux, P., Roulland, C., Dulau, L., Hallet, J.N., 1995. Genetic diversity and geographical distribution of wild *Saccharomyces cerevisiae* strains from the wine-producing area of Charentes, France. *Applied and Environmental Microbiology* 61, 3521-3529.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J., 1990. Amplification and direct sequencing of fungi ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., White, T.J., White, T.J. (Eds.), *PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, San Diego, CA, pp. 315-322.
- Zott, K., Miot-Sertier, C., Claisse, O., Lonvaud-Funel, A., Masneuf-Pomarede, I., 2008. Dynamics and diversity of non-*Saccharomyces* yeasts during the early stages in winemaking. *International Journal of Food Microbiology* 125, 197-203.

Chapitre 4

Quantification de *Botrytis cinerea* sur grappe de raisin par qPCR

Article 2 : **”Development of a qPCR assay for specific quantification of *Botrytis cinerea* on grapes”**

In press FEMS Microbiology Letters

La vigne est sujette à de nombreuses maladies cryptogamiques et notamment la pourriture grise dont l’agent responsable est *Botrytis cinerea*. Cette maladie conduit non seulement à des dégâts considérables à tous les stades du développement de la vigne avec une diminution sensible du volume de récolte (pouvant aller jusqu’à 40% de réduction du rendement), mais aussi à d’importantes altérations de la qualité organoleptique des vins produits.

La pourriture grise est une maladie ancienne, connue depuis l’antiquité, qui est particulièrement préoccupante en vignobles septentrionaux en raison d’un climat propice à son développement. La lutte contre ce pathogène s’effectue principalement au moyen de produits phytosanitaires de synthèse. Les fongicides sont généralement appliqués, selon une méthode conventionnelle, aux quatre stades phénologiques du développement de la plante reconnus pour être très sensibles aux attaques du champignon (stade A : fin floraison – début de la nouaison ; stade B : fermeture de la grappe : stade C : véraison ; stade D : 3 à 4 semaines avant les vendanges). La plupart des fongicides anti-*Botrytis* utilisés ont une action directe sur le champignon. L’utilisation intensive de tels produits se trouve aujourd’hui remise en cause : matières actives retirées du marché, réduction des doses de traitements, collectivité soucieuse d’un environnement sain. La prophylaxie (effeuillage) est devenue une pratique courante et les alternatives à la lutte chimique se développent tout en ne pouvant pas encore remplacer totalement l’utilisation de fongicides.

Ce chapitre porte sur le développement d’une technique de détection du pathogène, *Botrytis cinerea*, au vignoble afin d’anticiper son développement. Différentes méthodes de détection existent, basées sur une quantification au microscope, par réaction immunologique, mais ces techniques parfois coûteuses et fastidieuses ne peuvent être appliquées en routine au vignoble. Le développement de la biologie moléculaire a permis l’accès à de nouvelles méthodes de détection et de quantification telle que la PCR quantitative. Ainsi, nous avons développé une méthode de quantification de *Botrytis cinerea* par qPCR en utilisant la technologie SYBR Green I.

Dans un premier temps, à l'aide d'amorces spécifiques de *Botrytis cinerea*, une courbe de calibration a été réalisée à partir de quantités connues d'ADN de *Botrytis cinerea*. L'efficacité de PCR a été estimée à 97% avec un R^2 égal à 0,99 et la limite de détection évaluée à 6.3 pg d'ADN.

Dans un second temps, afin de s'affranchir (i) des problèmes d'extraction d'ADN, (ii) des problèmes de sous- et/ou sur-estimation liés à la quantification du pathogène à partir d'échantillons prélevés au vignoble, nous avons utilisé un standard interne. Ainsi, la levure *Yarrowia lipolytica*, isolée du sol et non présente sur la baie de raisin, a été retenue comme standard interne. Une courbe de calibration de *Yarrowia lipolytica* a été réalisée à partir de quantités de cellules connues à l'aide d'amorces spécifiques. L'efficacité de la PCR a été estimée à 93% avec un R^2 égal à 0,99. Les paramètres obtenus (efficacité, T_m , R^2 ...) pour les différentes courbes de calibration montrent que les conditions choisies sont adaptées à la quantification.

Dans un troisième temps, pour chaque échantillon à analyser, une quantité connue de cellules d'*Y. lipolytica* est ajoutée à celui-ci avant extraction d'ADN et quantification. Tous les C_t obtenus pour *Y. lipolytica* sont ramenés à une valeur de 29,4 correspondant à la quantité de cellules de *Y. lipolytica* ajoutée dans les échantillons et calculée à partir de la courbe de calibration. Le facteur de correction ainsi introduit permet de normaliser les valeurs de C_t obtenues pour *B. cinerea* dans les échantillons prélevés au vignoble.

Par cette méthode, nous avons ainsi pu estimer l'impact de différentes stratégies de traitement anti-*Botrytis* appliqués au vignoble.

Les résultats obtenus montrent (i) une bonne corrélation entre la quantification de *B. cinerea* par qPCR et par dénombrement réalisé par méthode classique et (ii) l'importance de l'utilisation d'un standard interne. De plus, par cette méthode, l'agent pathogène a été quantifié à des valeurs différentes en fonction des stratégies de traitements démontrant (i) l'efficacité et la sensibilité de la méthode, (ii) l'importance du choix de la ou des matières actives et de la date de traitement. L'utilisation de cette méthode dans le contexte de notre étude a permis également de confirmer l'importance de la prophylaxie dans la lutte contre l'agent de la pourriture grise.

Development of a qPCR assay for specific quantification of *Botrytis cinerea* on grapes.

Camélia Filofteia Diguta, Sandrine Rousseaux, Stéphanie Weidmann, Nicolas Bretin, Béatrice Vincent¹, Michèle Guilloux-Benatier & Hervé Alexandre*

Institut Universitaire de la Vigne et du Vin Jules Guyot, Université de Bourgogne, rue Claude Ladrey, BP 27877-21078 Dijon Cedex, France.

1-Institut Français de la Vigne et du Vin Pôle Bourgogne-Beaujolais-Jura-Savoie 6 rue du 16^{ème} Chasseurs, 21200 BEAUNE, France

Correspondence to:

H. Alexandre: Tel 33.(0)3.80.39.63.93 Fax 33.(0)3.39.62.65 Email rvalex@u-bourgogne.fr

Keywords: qPCR, *Botrytis cinerea*, quantification, grapes

Running title: qPCR detection and quantification of *Botrytis cinerea*.

Abstract

The aim of this study was to develop a system for rapid and accurate real time quantitative PCR (qPCR) identification and quantification of *Botrytis cinerea* one of the major pathogen present on grapes. The intergenic spacer region (IGS) of the nuclear ribosomal DNA was used to specifically detect and quantify *Botrytis cinerea*. A standard curve was established to quantify this fungus. The qPCR reaction was based on the simultaneous detection of a specific IGS sequence and also contained an internal amplification control to compensate for variations in DNA extraction and the various compounds from grapes that inhibit PCR. In these conditions, the assay had high efficiency (97%) and the limit of detection was estimated to be 6.3 pg DNA (corresponding to 540 spores). Our method was applied to assess the effects of various treatment strategies against *Botrytis* in the vineyard. Our qPCR assay proved to be rapid, selective and sensitive and may be used to monitor *Botrytis* infection in vineyards.

Introduction

Many fungal and bacterial organisms, of which *Botrytis cinerea* is the most important, can infect grapes and cause in a “bunch rot” (Keller et al., 2003). The disease caused by *B. cinerea*, also known as "grey mould", is arguably the most significant disease problem confronting the wine industry world-wide. The presence of grey mould on grapes is undesirable, as it lowers the quality of wines. Depending on the vintage, fungal infection rates can reach 15–25% of grapes and wines prepared from infected grapes usually exhibit organoleptic defects, such as color oxidation or the appearance of typical aromatic notes (“moldy”, “rotten”), which are not appreciated by consumers (Cilindre et al, 2007). The color of red and white wines is affected, with the main acids like tartaric and malic acid degraded together with aromatic compounds. Concerning the colour, the fungus *Botrytis cinerea* can attack the grape berry and introduce the oxidative enzyme called laccase into the berry and hence grape juice. Laccase targets phenolics such as the red color compounds in red wine and oxidizes them into brown-colored compounds. Furthermore, the association of *Botrytis cinerea* with other, less visible, fungi frequently leads to the development of organoleptic defects in grapes and sometimes in wines (La Guerche et al., 2006).

The strategy most widely adopted by winegrowers to reduce the impact of grey mould is the systematic application of chemical fungicides, based on a preset calendar that takes into account the phenological growth stages of the grapevine. Such reduction policy will have an impact of *Botrytis* resistance to fungicides (Leroux, 2004) and on environment. Indeed, the contamination of agricultural soils with inorganic (Cu-based) and organic pesticides (including their residues) presents a major environmental and toxicological concern (Komarek et al., 2010). Although there are alternative methods to synthetic fungicides, such as the application of antagonistic microorganisms and the application of natural antimicrobial substances, it is essential to monitor the disease development and particularly concentration of fungal spores. Indeed, monitoring disease development will allow a better disease management, will reduce cost and improve grape quality.

Spores can be identified and quantified by light-microscopy (Aylor, 1998; Hunter et al., 1999). However, this is not a straightforward technique.

Indeed, it is a time-consuming technique that needs expertise for the accurate identification of spores. Antibody immunoassays have been used for early detection of *Botrytis cinerea* (Kennedy et al., 2000). However, taking into account the low sensitivity and the limited dynamic range of the method it is not well adapted for quantification although it can be used to confirm the nature of the agent (Suarez et al. 2005). Molecular techniques for the identification of spores have been already published (West et al., 2008), most of which are based on detection by standard PCR methods (Zhou et al., 2000; Calderon et al., 2002; Chew et al., 2006). However, under these conditions, quantification is not precise. One way to assess for the presence of specific spores more accurately and to avoid some of the problems that accompany the other methodologies is quantitative real-time PCR (qPCR). Numerous quantitative assays utilizing real-time PCR have been developed to specifically detect microbial targets in many types of samples including but not limited to moulds (Luo et al., 2010; Alaei 2009; Carisse et al., 2009).

Advantages of utilizing qPCR for spore enumeration over classic culture-based methods include its enhanced specificity and reduced processing time leading to quicker results. Cadle-Davidson (2008) reported a qPCR method based on Taqman chemistry for monitoring *Botrytis cinerea* infection. However, this protocol uses a long freezing assay protocol and do not include internal control. Celik et al. (2009) have also developed a quantitative analysis of *Botrytis* by qPCR but only on artificially contaminated table grapes. We developed a quantitative assay for the enumeration of *Botrytis cinerea* utilizing the fluorescent dye SYBR Green I and PCR primers designed to specifically target *Botrytis cinerea* DNA. This method was then applied to assess different control strategies against *Botrytis* in vineyard.

Materials and methods

Strains and culture conditions

Various fungal strains were used in this study: *Aspergillus carbonarius* MUCL 44624, *Botrytis cinerea* MUCL 28920, *Cladosporium cladosporoides* MUCL 30838, *Fusarium oxysporum* MUCL 792, *Penicillium crustosum* MUCL 14155, *Penicillium expansum* MUCL 29192, *Penicillium minioluteum* MUCL 28666, *Penicillium spinulosum* MUCL 13911, *Penicillium thomii* MUCL 31204 and *Trichoderma harzianum* MUCL 29707.

Table 1: Treatment in trials to evaluate the effects of different strategies for control of grey mould (*Botrytis cinerea*) in vineyards with *Pinot Noir* grapes.

Treatment	Timing of Treatment			
	Stage F (Flowering)	Stage L (Bunch closure)	Stage L + 10 (Bunch closure +10 days)	Stage M (véraison)
AB 1 = control	-	-	-	-
AB 2	fludioxonil ^a	boscalid ^b		pyrimethanil ^a
AB 3	fenhexamid ^a	boscalid		pyrimethanil
AB 4	fenhexamid		boscalid	
AB 5	fenhexamid		pyrimethanil	
AB 6	fenhexamid	Thinning out of leaves (Defoliation)	pyrimethanil	
AB 7	fenhexamid		pyrimethanil	<i>Bacillus subtilis</i>
AB 8	fenhexamid		<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
AB 9	boscalid			
AB 10		boscalid		
AB 11			boscalid	
AB 12				boscalid
AB 13	boscalid		<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i> ^c
AB 14	bentonite clay	bentonite clay		

a:Fludioxonil, Pyrimethanil and Fenhexamid : contact fungicide ; b:Boscalid : systemic fungicide;
c:*Bacillus subtilis*,biofungicid

All fungi were grown on potato-dextrose-agar (PDA, Difco, Fisher Bioblock Scientific, Illkirch, France) dishes at 25°C and maintained by monthly transfer of mycelia plugs onto fresh dishes.

Two yeasts were also used: *Saccharomyces cerevisiae* BM 45 (Lallemand SA Blagnac France) as a reference strain and *Yarrowia lipolytica* W29 (ATCC 20460), a strain found in soil, as internal control in qPCR assays. These two yeasts were maintained and grown on yeast peptone dextrose (YPD) medium at 28°C for 24 to 72h.

Samples and washing of grapes

Grape samples (*Pinot noir* grape variety) were collected at technological maturity from vineyards of the Burgundy area. A total of 14 control strategies against *Botrytis cinerea* with different combinations of fungicides were applied in vineyard. Fungicide applications were done at various phenological stages of vine: after flowering, at bunch closure, 10 days after bunch closure and at the beginning of veraison (colour change) corresponding to stages I, L, L+10 and M respectively on the international Baggiolini scale (Table 1). For each plot, several bunches of grapes were cut at random with shears sterilized with ethanol. The bunches were collected in sterilized plastic bags without any hand contact and put in a cooler at 4°C until laboratory analysis (2 to 4 hours after harvest). Each field trial was realized in triplicate : the 200 berries sampled were an average sample.

Spores and/or mycelium were released from the surface of berries using previously described protocol (Doaré-Lebrun et al. 2006, Laforgué et al. 2009) the following solution: 200 mL sterile distilled water containing 0.9% (w/v) NaCl and 0.2% (v/v) Tween 80 to wash 200 berries. This mix was sonicated for 1 min and then shaken for 30 min to put the microorganisms in suspension. The washing suspension took place in sterilized flasks at 4°C before used. *Botrytis* populations ranging between 2.10^6 and $1.6.10^4$ CFU/200 berries in function of different strategies were recovered by direct plating.

Preparation of spores of *Botrytis cinerea* for the qPCR standard curve.

To prepare the standard curve, *Botrytis cinerea* strains were grown on PDA at 25°C for 2 weeks and collected off the agar plate using sterile distilled water containing 0.05% (w/v) Tween 80. The number of spore was counted under a light microscope at 400x magnification. A working solution of 10^7 spores mL⁻¹ was generated and stored at 4°C.

Spore concentrations between 10^2 and 10^7 mL⁻¹ were obtained by 10-fold serial dilutions. DNA was extracted and used to generate spore standard curve by qPCR.

Internal control for DNA extraction and amplification

An internal control was included in the assay by adding 8×10^6 CFU of the yeast *Yarrowia lipolytica* to 2 mL of washing solution of grape as described before (Tessonniere et al., 2009). The yeast was added to the sample before DNA extraction to ensure that controls for DNA preparation and PCR amplification were available.

To prepare the cell standard curve, *Yarrowia lipolytica* was grown on YPD (Yeast extract 0.5% w/v, Peptone 1% w/v, Dextrose 2% wV) at 28°C at 140 rpm. After 48h of incubation, a working solution of 10^{10} CFU mL⁻¹ was generated and cell suspension concentrations ranging from 10^1 to 10^8 mL⁻¹ were obtained by 10 fold serial dilutions. DNA was extracted and used to generate cell standard curve by qPCR.

DNA extraction

DNA extraction from *Botrytis cinerea* spores, *Yarrowia lipolytica* cells and washing suspension was performed using a fungal DNA kit (EZNA®, Omega-Biotek). In detail, 2 mL of spore or cell solutions or 2 mL of the washing solution were centrifuged at 10000g for 20 min. The pellet was incubated with 600 µL Buffer FG1 and 5 µL RNase (20 mg/mL) for 1 min. 10 µL 2-mercaptoethanol was added and the mix was incubated at 65°C for at least 5 min. Then 140 µL Buffer FG2 was added and the mix incubated on ice for 5 minutes. After a centrifugation at 10,000 x g for 10 min, the supernatant was transferred and ½ volume of Buffer FG3 and one volume of absolute ethanol were added. The following steps implies DNA clean-up through Hi-bond®spin column. In the final step, DNA was eluted in 100 µL of deionized H₂O.

Real-time PCR amplification

Specific *Botrytis cinerea* primers targeting ribosomal region between 28S and 18S genes (IGS spacer) reported by Suarez et al (2005) were used: Bc3F (5'-GCTGTAATTTCAATGTGCAGAATCC-3') and Bc3R (5'-GGAGCAACAATTAATCGCATTTTC-3'). *Yarrowia lipolytica* specific primers YALF (5'-ACGCATCTGATCCCTACCAAGG-3') and YALR (5'-CATCCTGTGCTCTTCCAGGTT-3'), were selected from *LIP4* gene (AJ549517) and were used to amplify a 106 bp fragment (Tessonière et al, 2009). All primers were purchased from Invitrogen (Cergy, France). 5 µL of the DNA sample was mixed in a final volume of 25 µL with 10× *Botrytis cinerea* or *Yarrowia lipolytica* primer mixture containing 0.56 µM of either, 2× IQ™SYBR Green supermix (Bio-rad, Marnes-la-coquette, France) and water. Reactions were performed in a Biorad iQ5 real-time PCR iCycler apparatus. We used a program of: 3 min at 95 °C followed by 40 cycles of 15 s at 95 °C and 30 s at 62 °C. A melting curve was established by decreasing the temperature from 90 °C by 0.5 °C every 10 s. All reactions were performed in triplicate. The cycle threshold (Ct), or the PCR cycle where fluorescence first occurred, was determined automatically using Bio-rad software after setting the baseline to 100. The efficiency (E) of the PCR assay was calculated using the formula, $E = [10^{-1/\text{slope}} - 1] \times 100$, where the slope was extracted from the curve $Ct = f(\log Q_0)$ and Q_0 is the initial DNA or cell population in the assay. E was expressed as a %.

Statistics

All values are expressed as the mean ± SD. All data were analyzed by SigmaStat 3.0 statistical software from SYSTAT Inc. Differences between groups were analyzed by One-way ANOVA program (compare many groups). *Post hoc* comparisons were conducted using the Holm-Sidak comparison test as suggested by Zar (1996). A *P* value ≤ 0.001 or 0.05 was considered statistically significant.

Results

Specificity

The specificity of the primers Bc3F and Bc3R was studied by conventional PCR using *Botrytis cinerea* MUCL 28920 strain and other genera and species of fungi potentially present on grapes.

A single fragment of about 95 bp was amplified from *Botrytis cinerea* genomic DNA. No product was observed with genomic DNA from isolates of the other species tested (Data not shown).

Specific primers for *LIP4* gene were used as described in a previous study (Tessonnière et al., 2009), in which primers were already tested against *Brettanomyces* but not against fungi. So, in our study, the specificity of *LIP4* primers was checked against a number of genera and species of different fungi from various origins. Apart for *Yarrowia lypolitica*, no amplification was observed for the tested microorganisms (Data not shown)

Calibration curves

Botrytis cinerea

Genomic DNA obtained from strain *Botrytis cinerea* MUCL 28920 was used as a template for qPCR with primers Bc3F and Bc3R. As expected, the PCR product melting temperature was $83^{\circ}\text{C}\pm 0,5^{\circ}\text{C}$. The standard curve generated with the Bc3F/Bc3R pair in the conditions described above is shown in Figure 1.

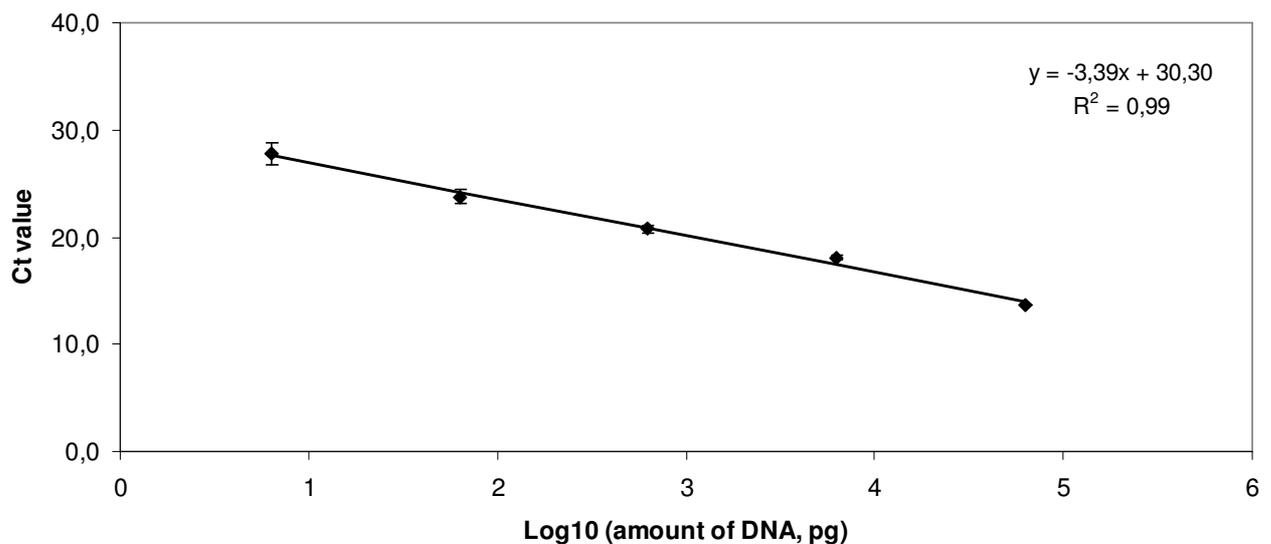


Figure 1 : Standard curve generated from the amplification of ten-fold dilutions of target genomic *Botrytis cinerea* DNA. This curve revealed a good linear relationship ($R^2=0.99$) between the Log_{10} value of the starting DNA concentration and the threshold cycle.

Standard curve for *Botrytis cinerea* was generated by plotting the log of DNA (pg) against the Ct value determined by qPCR. Linearity was observed across the whole range used and the very high correlation coefficient ($R^2 = 0.99$) indicated very low inter-assay variability. The slope of the standard curve was -3.3887 which corresponds to an amplification efficiency of 97 %.

The limit of detection was defined as the lowest population of the microorganisms that could be detected using our sybergreen qPCR method. Under conditions that include sybergreen, the maximum Ct value which could be used was 30 which correspond to a DNA concentration of 6.3 pg.

Yarrowia lipolitica

Yarrowia lipolitica genomic DNA extracted from ten-fold serial dilutions of *Yarrowia lipolitica* cells ranging from $8 \cdot 10^3$ to $8 \cdot 10^7$ cells per mL, were used as template. Ct values were plotted against the logarithm of cell concentration. In these conditions, PCR efficiency was 93% with a correlation coefficient of 0.99. Tm of the product was $85^\circ\text{C} \pm 0,5^\circ\text{C}$. (Figure 2).

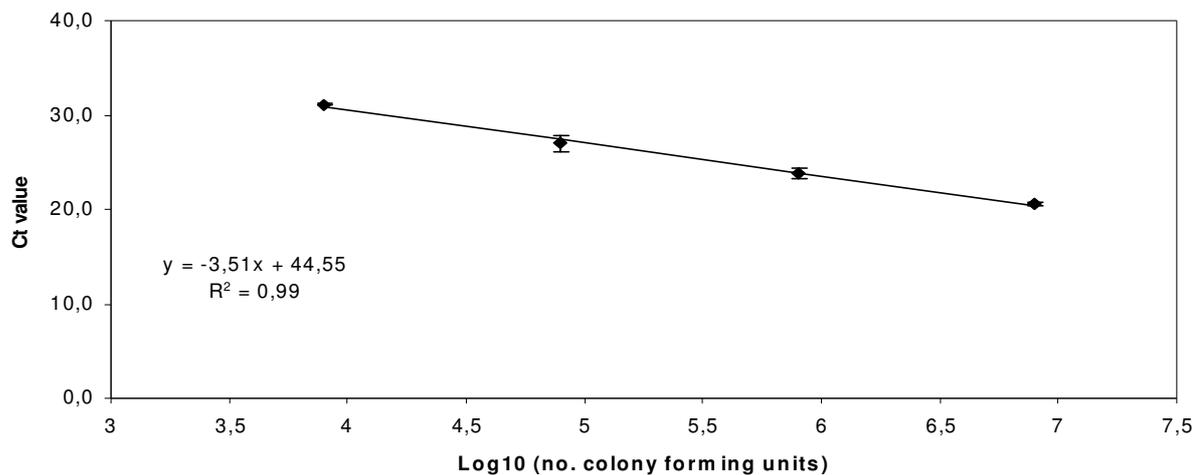


Figure 2 : Standard curve generated from the amplification of ten-fold dilutions of target genomic *Yarrowia lipolitica* DNA. This curve revealed a good linear relationship ($R^2=0.99$) between the Log_{10} value of the starting cell concentration and the threshold cycle

Internal control for the detection and quantification of *Botrytis cinerea* on grapes

In order to get an accurate estimate of the target molecules in the grape sample, different controls were needed: controls to test the efficiency of the PCR itself (PCR positive control) and controls for the effect of the grape matrix, which includes natural inhibitory compounds, on the recovery of DNA from the *Botrytis cinerea*, as well as its effects on PCR. To achieve these goals, 2 mL samples were spiked with $8 \cdot 10^6$ cells of *Yarrowia lipolytica*, a microorganism that is absent from grapes prior to nucleic acid extraction. *LIP4* gene from *Yarrowia lipolytica* was used as an internal control. From the calibration curve of *Yarrowia lipolytica* obtained previously, DNA extracted from 8×10^6 CFU/2mL of the yeast *Yarrowia lipolytica* gave a Ct of $29,4 \pm 0.631$.

We used this Ct value as a normalizer for the quantification of *Botrytis cinerea* DNA-concentration on grapes. Ct values obtained from *Botrytis cinerea* were normalized according to the following equation:

normalized Ct *Botrytis* = $(29.4 / \text{Ct } Yarrowia \text{ in grape sample}) \times \text{Ct } Botrytis \text{ in grape sample}$.

Based on this protocol, *Botrytis cinerea* Ct values for unknown samples were normalized according to the above equation.

Resultant Ct values were converted into DNA concentrations by extrapolation to a standard curve generated from qPCR analysis using ten-fold dilutions of between 10^2 to 10^6 pg *Botrytis cinerea* DNA (Figure 1).

Application of the *Botrytis cinerea* quantification method to assess the effects of various antibotrytis treatments on vine.

A total of 14 strategies which included various fungicide treatments for controlling *Botrytis cinerea*, were applied to grapes at different growing stages: flowering, bunch closure, ten days after bunch closure and veraison (colour change) (Table 1). In each experimental plot, grape berries microflora were assessed at harvest. Our qPCR method was used to assess the level of *Botrytis cinerea* contamination in each treatment (spore and mycelium). The DNA concentration of *Botrytis cinerea* presents in each sample (200 berries) for each strategy is given Figure 3. The type of treatment had a clear impact on *Botrytis cinerea* contamination.

In our case, the best strategy appeared to be AB6 which led to a significant decrease in *Botrytis cinerea* contamination. This treatment used at least two chemical products during grape development with thinning out leaves. This prophylactic method increases the efficiency of the treatment strategy as compared to AB5, in which the same chemical product was used (fenhexamid and pyrimethanil) but without thinning out of leaves. Nevertheless, AB10 treatment in which only one chemical product was used also appeared to be efficient i.e low level of *Botrytis cinerea* DNA detected. The low significant level of *Botrytis cinerea* DNA concentration observed for strategy AB8 demonstrated that association of a chemical product together with *Bacillus subtilis* improves anti-*Botrytis* treatment. Our trial underlined that bentonite clay (AB14) did not protect grapes from *Botrytis cinerea* contamination.

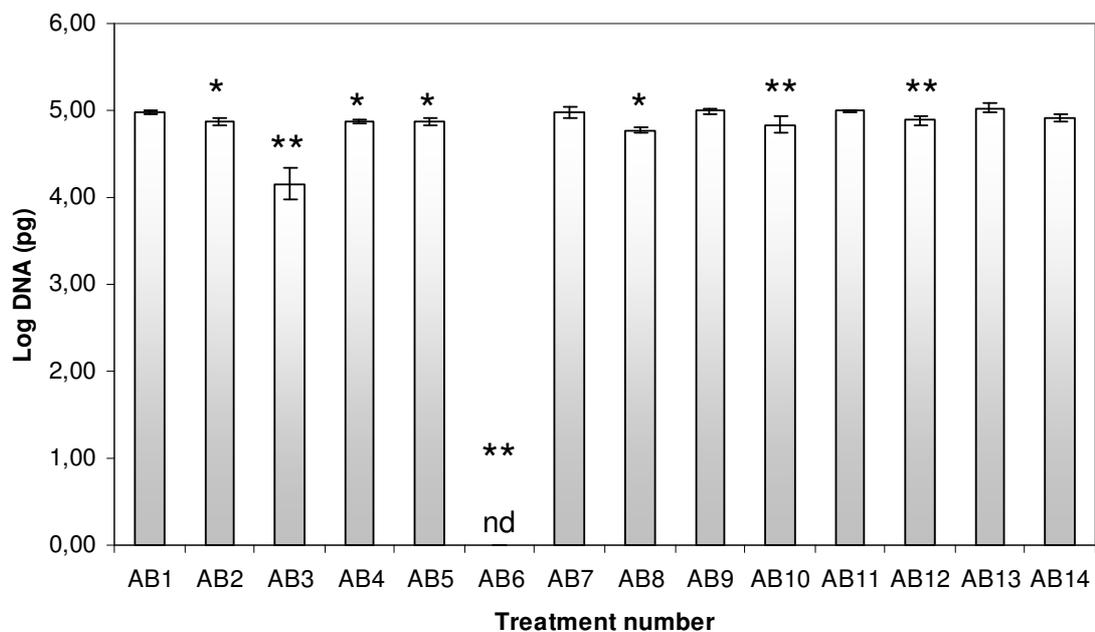


Figure 3

concentration was determined for each trial described table 1. values followed by * ($\alpha < 0.05$) or ** ($\alpha < 0.001$) were significantly different from the control with the ANOVA test.

nd : no detection (inferior to the detection limit : 6.3 pg DNA (corresponding to 540 spores)).

Discussion

We developed a highly specific and sensitive qPCR protocol for the detection and quantification of *Botrytis cinerea* contamination in grapes. This method was developed to serve as an alternative to the various conventional methods; 1- counting spores with microscope which is time consuming and has a low detection limit; 2- spread plate culture method which underestimates the number of spores (Martinez et al., 2010); 3- classical methods such as isolation on selective media, which are useful but subject to limitations, i.e., many pathogens are masked by overgrowth of faster growing fungi; 4-use of antibodies which has proven reliable for detection and quantification of *Botrytis cinerea* in juice and wine (Dewey and Meyer, 2004; Meyer et al., 2000) but lacks sensitivity to detect small quantities of fungal biomass; 5- PCR which has also been used successfully to detect low levels of *Botrytis cinerea* (Gindro et al., 2005), lacks precision for quantification. Thus, a rapid, selective method to detect and quantify *Botrytis cinerea* was clearly required.

Our qPCR assay clearly distinguishes between *Botrytis cinerea* and other fungi and even yeast present on grapes. The fungal DNA was isolated using a commercially available kit which is an efficient and simple method, allowing the routine analysis of more samples per day. The robustness of our assay relies on our normalization procedure. Indeed, one of the main issues that arises when detecting fungi by PCR, using DNA as the target, is inhibition of the amplification reaction because of components of the matrix being tested (Hartman et al. 2005). False-negative results due to expired reagents, poor technique and other causes could be eliminated by using DNA standard. Therefore, it is imperative for these types of assays to include an internal amplification control (IAC) in each PCR reaction tube. This IAC also ensures that variations in the efficiency of the DNA extraction are taken into account. We used exogenous DNA from *Yarrowia lipolytica* in our assay. These applications highlight the value of this IAC in the detection of inhibitors in samples without indeed affecting the detection and provide a relatively simple solution to the issue of unforeseen false-negative reactions in PCR.

We used our assay to compare various treatment strategies. Our results demonstrate that qPCR could be useful to compare and choose the most efficient treatment. Furthermore, our qPCR assay could serve as a decision-making tool in vineyards whereby the data obtained helps winegrowers to assess the risk of contamination.

Indeed, our protocol could be used to monitor the evolution of *Botrytis cinerea* attack during the season and consequently to optimize the number of sprays and the concentration of fungicides used.

References:

- Alaei H, Baeven S, Maes M, Höfte M & Heungens K (2009) Molecular detection of *Puccinia horiana* in *Chrysanthemum x morifolium* through conventional and real-time PCR. *J. Microbiol Methods* **76**: 136-145.
- Aylor AE (1998) The aerobiology of apple scab. *Plant Dis* **82**: 838-849.
- Cadle-Davidson L (2008) Monitoring pathogenesis of natural *Botrytis cinerea* infections in developing grape berries. *Am. J. Enol. Vitic.* **59**: 387-395.
- Calderon C, Ward E, Freeman J & McCartney A (2002) Detection of airborne fungal spores sampled by rotating-arm and Hirst-type spore traps using polymerase chain reaction assays. *J Aerosol Sci* **33**: 283-296.
- Carisse O, Tremblay DM, Lévesque CA, Gindro K, Ward P & Houde A (2009) Development of a TaqMan Real-Time PCR assay for quantification of airborne Conidia of *Botrytis squamosa* and management of *Botrytis* leaf blight of onion. *Phytopathology* **99**: 1273-1280.
- Celik M, Kalpulov T, Zutahy Y, Ish-shalom S, Lurie S, Lichter A (2009) Quantitative and qualitative analysis of *Botrytis* inoculated on table grapes by qPCR and antibodies. *Postharvest Biol Tech* **52**: 235-239.
- Chew GL, Wilson J, Rabito FA, Grimsley F, Iqbal S, Reponen T, Muilenberg ML, Thorne PS, Dearborn DG & Morley RL(2006) Mold and endotoxin levels in the aftermath of hurricane Katrina: a pilot project of homes in New Orleans undergoing renovation. *Environ. Health Perspect* **114**: 1883-1889.
- Cilindre A, Castro AJ, Clément C, Jeandet P & Marchal R (2007) Influence of *Botrytis cinerea* infection on Champagne wine proteins (characterized by two-dimensional electrophoresis/immunodetection) and wine foaming properties. *Food Chem* **103**: 139-149.
- Dewey FM & Meyer U (2004) Rapid, quantitative tube immunoassays for on-site detection of *Botrytis*, *Aspergillus* and *Penicillium* antigens in grape juice. *Anal Chim Acta* **513**: 11-19.
- Doaré-Lebrun E, El Arbi A, Charlet M, Guérin L, Pernelle JJ, Ogier JC, Bouix M (2006) Analysis of fungal diversity of grapes by application of temporal temperature gradient gel electrophoresis - potentialities and limits of the method. *J Appl Microbiol.* **101**:1340-50
- Gindro K, Pezet R, Viret O & Richter H (2005) Development of a rapid and highly sensitive direct-PCR assay to detect a single conidium of *Botrytis cinerea* Pers:Fr in vitro and quiescent forms in planta. *Vitis* **44**:139-142.
- Hartman LJ, Coyne SR & Norwood DA (2005) Development of a novel internal positive control for Taqman based assays. *Mol Cell Probes* **19**: 51-59.

- Hunter T, Coker RR & Royle DL (1999) The teleomorph stage, *Mycosphaerella graminicola*, in epidemics of *Septoria tritici* blotch on winter wheat in UK. *Plant Pathol* **48**:51–57.
- Keller M, Viret O & Cole FM (2003) *Botrytis cinerea* infection in grape flowers: defense reaction, latency, and disease expression. *Phytopathology* **93**:316–322.
- Kennedy R, Wakeham AJ, Byrne KG, Meyer UM & Dewey FM (2000) A new method to monitor airborne inoculums of the fungal plant pathogens *Mycosphaerella brassicicola* and *Botrytis cinerea*. *Appl Environ Microbiol* **66**: 2960-3000.
- Komárek M, Cadková E, Chrastrný V, Bordas F, Bollinger JC (2010) Contamination of vineyard soils with fungicides: a review of environmental and toxicological aspects. *Environ Int.***36**:138-51.
- Laforge R, Guérin L, Pernelle JJ, Monnet C, Dupont J, Bouix M (2009) Evaluation of PCR-DGGE methodology to monitor fungal communities on grapes. *J Appl Microbiol* **107**:1208-18.
- La Guerche S, Dauphin B, Pons M, Blancard D, Darriet P (2006) Characterization of some mushroom and earthy off-odors microbially induced by the development of rot on grapes. *J Agric Food Chem.* **54**:9193-200.
- Leroux P (2004) Chemical control of *Botrytis* and its resistance to chemical fungicides. In *Botrytis: Biology, Pathology and Control* ed. Elad Y, Williamson B, Tudzynski P, Delen N pp. 195–222. Dordrecht, Netherlands: Kluwer Academic Publishers.
- Luo Y, Gao W, Doster M & Michailides TJ (2010) Quantification of conidial density of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* in soil from almond orchards using real-time PCR. *J Appl Microbiol* **106**: 1649-1660.
- Martinez J, Simon V, Gonzalez B & Conget P (2010) A real-time PCR-Based strategy for the detection of *Paenibacillus* larvae vegetative cells and spores to improve the diagnosis and the screening of American foulbrood. *Lett Appl Microbiol* **50**: 603-610.
- Meyer UM, Spotts RA & Dewey FM (2000) Detection and quantification of *Botrytis cinerea* by ELISA in pear stems during cold storage. *Plant Dis* **84**:1099-1103.
- Rigotti S, Gindro K, Richter H & Viret O (2002) Characterization of molecular markers for specific and sensitive detection of *Botrytis cinerea* Pers.: Fr. in strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) using PCR. *FEMS Microbiol Lett* **209**:169-174.
- Suarez BM, Walsh K, Boonham N, O'Neill T, Pearson S & Barker I (2005) Development of real-time PCR (TaqMan) assays for the detection and quantification of *Botrytis cinerea* in planta. *Plant Physiol Biochem* **43**: 890-899.
- Tessonniere H, Vidal S, Barnavon L, Alexandre H & Remize F (2009) Design and performance of a real-time PCR assay for sensitive and reliable direct quantification of *Brettanomyces* in wine. *Inter J Food Microbiol* **129**: 237-243.
- West JS, Atkins SD, Emberlin J & Fitt BDL (2008) PCR to predict risk of airborne disease. *Trends Microbiol* **16**: 380-387.
- Zar J H (1996). *Biostatistical Analysis*. Prentice-Hall, Upper Saddle River, NJ.
- Zhou G, Whong WZ, Ong T & Chen B (2000) Development of a fungus-specific PCR assay for detecting low-level fungi in an indoor environment. *Mol Cell Probes* **14**: 339–348.

Conclusion générale et Perspectives

Les travaux menés au cours de cette étude ont permis d'accroître les connaissances sur l'écologie des moisissures présentes sur baies de raisin. Or cette population microbienne est importante d'un point de vue technologique car elle conditionne en partie la qualité du vin produit. Si l'écologie levurienne et bactérienne est largement documentée, il en est autrement pour les moisissures. Une meilleure connaissance de la microflore fongique permettra donc de mieux maîtriser les risques de contamination et d'altération engendrés par leur développement.

I- Caractérisation de la microflore fongique

Peu de méthodes ont été développées afin d'améliorer l'identification de la population totale des moisissures présentes sur baies de raisin, traditionnellement basée sur des observations macro et microscopique. Les méthodes moléculaires décrites dans la littérature se focalisent généralement sur un genre voire une espèce, tel que *Aspergillus* section *Nigri* (Bau *et al* 2006 ; Martinez-Culebras et Ramon, 2007) ou *Penicillium expansum* (Garcia *et al* 2006) mais ne permettent pas une identification globale des flores fongiques. Toutefois, certaines méthodes « culture indépendante » (PCR-DGGE, PCR-TTGE) ont été développées et appliquées à l'écologie fongique de la baie de raisin (Doaré-Lebrun *et al* 2006 ; Laforgue *et al* 2009). Ces techniques présentent l'avantage de s'affranchir d'une étape de culture parfois longue, mais elles ne permettent pas une identification de toutes les moisissures présentes dans un échantillon donné par manque d'un référentiel complet ou en raison de problèmes de co-migration de séquences différentes, de chimères ou d'hétéroduplexes.

Au cours de ce travail, la technique PCR ITS-RFLP a été retenue comme technique fiable et rapide d'identification de moisissures cultivables au niveau de l'espèce (Chapitre 3). Bien que cette technique nécessite une étape de culture, elle a permis de caractériser de façon fiable 41 espèces de moisissures différentes sur les 43 étudiées appartenant à 11 genres différents. Seules les espèces *Penicillium thomii* et *Penicillium glabrum* ont présenté le même profil composite. Ainsi 96.3% des souches étudiées ont été caractérisées avec au maximum 4 enzymes de restriction et 41.5% des souches ont pu l'être avec seulement 2 enzymes de restriction. Ceci a été rendu possible par une analyse théorique précise de séquences ITS de moisissures contenues dans la base de données EMBL. Cette analyse théorique a permis de choisir les enzymes de restriction les plus discriminantes et d'obtenir ainsi une identification fiable.

Grâce aux résultats obtenus au cours de cette étude, les bases de données, moyennement pourvues en séquences ITS caractéristiques de genres ou d'espèces de moisissures présentes sur baies de raisin, ont ainsi pu être enrichies.

La technique PCR ITS-RFLP peut donc être appliquée en routine pour l'analyse de la flore fongique cultivable présente sur baies de raisin mais pourrait être aussi utilisée pour caractériser des contaminants fongiques dans d'autres environnements (agroalimentaire, médical). Elle peut aussi permettre des analyses comparatives afin d'estimer par exemple l'impact de différentes pratiques culturales sur la microflore fongique et plus particulièrement la flore responsable d'altération dans le vin (production de toxines telle l'ochratoxine A ou de molécules responsables de déviations aromatiques : goûts moisi-terreux dits GMT et arômes de champignons frais dits ACF). Certaines pratiques culturales telles l'enherbement n'influenceraient-elles pas le développement de ce type de flore ? Certaines molécules de synthèse appliquées au vignoble ne favoriseraient-elles pas la présence de moisissures d'altération aux dépens d'autres flores ? L'utilisation de la technique PCR ITS-RFLP pourrait apporter des éléments de réponse.

II- Diversité de la microflore fongique sur baies de raisin

La technique PCR ITS-RFLP développée dans ce travail a permis également de réaliser une étude exhaustive des moisissures présentes sur baies de raisin au niveau de l'espèce (Chapitre 3). Peu d'études ont été réalisées dans ce domaine. Quand cette caractérisation a été entreprise, elle a été réalisée selon les critères classiques d'observation macro et microscopique, connus pour ne pas être fiables à 100% en terme d'identification, ou bien, elle s'est faite sur un petit nombre de souches par séquençage (impossible d'envisager en routine une caractérisation de la diversité fongique sur baies de raisin par séquençage).

Au cours de ce travail, 199 souches, isolées à partir de prélèvements de baies de raisin récoltées au moment de la maturité dans différents vignobles de la région viticole Bourgogne, ont été identifiées. L'étude réalisée a ainsi confirmé la prédominance de certains genres fongiques, déjà décrits dans la littérature, sur les baies de raisin.

Tableau XII : Genres majoritaires isolés dans différents vignobles mondiaux

Vignobles	Genres majoritaires isolés					Références
	<i>Alternaria</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Botrytis</i>	<i>Cladosporium</i>	<i>Penicillium</i>	
Espagne (Barcelone Tarragone, Valence et Murcia)	75.6%	17.3%	<2%	22.5%	2.3%	Bau <i>et al</i> , 2005a
Espagne (Cadiz, Cordoba et Girone)	13.4%	79.7%	nr	4.4%	8%	Gomez <i>et al</i> , 2006
France (Alsace, Languedoc-Roussillon, Poitou-Charentes et PACA)	nd	80%	nr	nr	20%	Béjaoui <i>et al</i> , 2006
France (Bourgogne)	4%	ni	15.1%	15.1%	58.5%	Dans cette étude
France (Aude)	<10%	10%	<10%	<10%	31%	Sage <i>et al</i> , 2002
Portugal (Alentejo, Douro, Ribatejo and Vinhos Verdes)	24%	8%	15%	25%	9%	Serra <i>et al</i> , 2005
Tunisie (Baddar, Belli, Regueb, Rjim Maatoug)	12.8%	33.3%	23.3%	10.5%	8.3%	Melki Ben Fredj <i>et al</i> , 2007

nr : non recherché ; ni : non isolé

Tableau XIII : Espèces majoritaires isolées dans différents vignobles français appartenant au genre *Penicillium*

Vignobles (Millésisme)	Espèces majoritaires isolées appartenant au genre <i>Penicillium</i>	Référence
Alsace (2004)	<i>P. expansum</i> ; <i>P. Purpurescens</i> ; <i>P. herqueii</i>	Guérin <i>et al</i> , 2007
Aude (nc)	<i>P. brevicompactum</i>	Sage <i>et al</i> , 2002
Beaujolais (2004)	<i>P. purpurescens</i>	Guérin <i>et al</i> , 2007
Bordeaux (Médoc et Sauternes) (1999, 200, 2001)	<i>P. expansum</i>	La Guerche <i>et al</i> , 2004
Bordeaux (2004)	<i>P. expansum</i> ; <i>P. purpurescens</i>	Guérin <i>et al</i> , 2007
Bourgogne (2004)	<i>P. purpurescens</i> ; <i>P. brevicompactum</i>	Guérin <i>et al</i> , 2007
Bourgogne (2008)	<i>P. spinolusum</i> ; <i>P. Expansum</i> ; <i>P. minioluteum</i>	Dans cette étude
Alsace, Beaujolais, Côtes du Rhône, Languedoc, Bordeaux (nc)	<i>P. brevicompactum</i> ; <i>P. simplicissimum</i>	Sage <i>et al</i> , 2004

nc : non communiqué

Les genres majoritaires varient cependant selon la localisation géographique, les pratiques culturales, le millésime et le cépage (Tableau XII). De plus, au sein d'un même genre, en particulier chez *Penicillium*, genre connu pour son implication dans la production de molécules responsables de déviations aromatiques, une variabilité des espèces majoritaires isolées est observée (Tableau XIII). Dans notre étude, *Penicillium spinulosum* est l'espèce majoritaire isolée pour le millésime 2008 en Bourgogne tandis qu'en 2004 Guérin *et al* (2007) isolaient majoritairement *Penicillium purpurescens* dans cette même région viticole. Cette variabilité dans les espèces rencontrées complique beaucoup la lutte contre les déviations aromatiques, étant donné qu'au sein d'un même vignoble, les espèces productrices potentielles ne sont pas les mêmes en fonction des années. Cette prédominance de *P. spinulosum* que nous avons observée sur toutes les parcelles étudiées est donc peut-être liée au millésime. La diversité des espèces fongiques dans ces parcelles et plus particulièrement des espèces de *Penicillium* doit être étudiée sur plusieurs millésimes, afin de confirmer ou non cette prédominance.

Les déviations aromatiques apparues depuis les années 2000 en Bourgogne (Vacher *et al*, 2008, communication IFV-BIVB) se caractérisent par des défauts de champignons frais dits ACF (molécules impliquées : alcools et cétones, Chapitre 1 et Tableau IV). A la lecture du Tableau Y, *P. expansum* connu pour produire de la géosmine, molécule responsable de GMT, n'est pas l'espèce la plus isolée en Bourgogne selon nos travaux et ceux de Guérin *et al* (2007). Existe-t-il une relation entre la présence de molécules de type ACF et l'isolement de souches de *Penicillium* autres que *P. expansum* ? Afin de confirmer ou non cette hypothèse, une étude sur la capacité des espèces de *Penicillium* isolées au cours de ce travail (*P. spinulosum*, *P. minioluteum*) à produire des molécules de type ACF pourrait être envisagée, ce qui permettrait d'obtenir des éléments de réponse quant aux souches productrices et quant aux molécules impliquées.

Cette étude est la première étude exhaustive de la flore fongique sur baies de raisin réalisée en Bourgogne. Elle a permis de caractériser les 199 souches isolées au niveau de l'espèce et ce quelque soit le genre.

III- Détection et quantification de *Botrytis cinerea*

Dans la première partie de ce travail (Chapitre 3), nous nous sommes attachés à développer une technique rapide et fiable d'identification des moisissures permettant d'avoir accès à la diversité fongique sur grappe. Cet objectif a été atteint : la méthode mise au point a répondu à nos exigences. En revanche, cette technique PCR ITS-RFLP, de part son étape de culture, ne pouvait être utilisée comme outil de détection direct de moisissures au vignoble. Ainsi dans une seconde partie de ce travail, nous avons choisi de développer une méthode de détection directe spécifique et sensible de flores d'altération présentes sur baies (Chapitre IV, article 2). Notre choix s'est porté sur le développement d'une méthode de détection par qPCR en Syber Green I, technologie répandue et fiable.

La vigne subit de nombreuses attaques dont celle de *Botrytis cinerea*, agent responsable de la pourriture grise. Nous avons ainsi choisi de mettre au point cette méthode pour détecter ce micro-organisme. En outre, nous disposons d'informations nécessaires au développement de la méthode : informations génétiques permettant le choix d'un gène cible et d'amorces spécifiques, présence de *B. cinerea* au vignoble...

Cette méthode de détection de *B. cinerea* est spécifique et présente une bonne sensibilité avec une limite de détection de 6.4 pg d'ADN correspondant à 540 spores (Chapitre 4, article 2). L'originalité et la fiabilité de cette méthode, comparée à d'autres méthodes de détection de ce pathogène, réside dans le fait que (i) nous avons travaillé sur des échantillons naturellement contaminés et que (ii) nous avons utilisé un standard interne permettant de palier aux problèmes de variabilité liée à l'extraction d'ADN et à l'amplification. Comme pour les travaux de Tessonnière *et al* (2009), nous avons utilisé comme standard interne une levure isolée du sol et non présente sur baie de raisin, *Yarrowia lipolytica*. L'ensemble des résultats obtenus montre que la méthode mise au point est fiable, spécifique et utilisable sur des échantillons naturellement contaminés.

Grâce à cette méthode, nous avons pu détecter et quantifier *B. cinerea* en condition de vignoble et estimer l'impact de différentes stratégies de traitements anti-*Botrytis* sur le phytopathogène (Chapitre 4, article 2). Les résultats obtenus au cours de cette étude ont confirmé l'intérêt de la prophylaxie dans la lutte contre *B. cinerea*, l'importance du choix de la matière active et de sa date d'application.

Peu d'études comparatives sur l'effet de différentes stratégies de traitements anti-*Botrytis* sont reportées dans la littérature. Dans notre travail, la matière active Boscalid, utilisée seule ou en mélange, présente une très bonne efficacité contre *Botrytis cinerea* et confirment les observations de Gabriolotto *et al* (2009).

B. cinerea n'est cependant pas le seul phytopathogène de la vigne. La méthode mise au point au cours de ce travail pourrait être développée à la détection d'autres phytopathogènes tels que *Plasmopara viticola*, agent du mildiou, *Erysiphe necator*, agent de l'oïdium ou encore des moisissures du genre *Penicillium* (données non montrées). La méthode qPCR choisie pour cette étude a utilisé la technologie Syber Green I. Il pourrait être intéressant de développer un kit de détection « multi- pathogènes » en utilisant la qPCR multiplex et la technologie Molecular Beacon où plusieurs phytopathogènes cibles pourraient alors être quantifiés au sein d'un même échantillon grâce à l'utilisation de sondes spécifiques.

IV- Evaluation des risques de contamination des raisins

Dans la seconde partie de ce travail (Chapitre 4), nous avons développé une méthode de détection et de quantification spécifique et sensible de *B. cinerea* sur des échantillons prélevés à la récolte, période où la pourriture grise ainsi que d'autres maladies cryptogamiques peuvent déjà avoir réalisé des dégâts. Pour une meilleure gestion des risques d'attaque et de contamination de la récolte, la technique développée dans cette étude pourrait être appliquée à des stades précoces de développement de la vigne afin de détecter la présence ou non des phytopathogènes. De plus, dans le contexte socio-économique actuel (viticulture durable, réduction des intrants, plan Ecophyto 2018), la détection et la quantification précoce de pathogènes de la vigne, seront, dans un futur proche, des outils importants d'aide à la gestion des calendriers de traitements phytosanitaires.

Afin d'optimiser au mieux cet outil de détection pour évaluer les risques potentiels de contaminations, la technique, mise au point dans ce travail, pourrait être adaptée afin de détecter spécifiquement les flores « actives » productrices d'OTA ou de molécules responsables de déviations aromatiques (goûts moisissés, champignons frais). En effet, il ne suffit pas de détecter sur raisins, par exemple, *A. carbonarius*, *A. ochraceus*, *P. verrucosum*, *P. thomii*... pour avoir la présence d'OTA ou de

GMT/AFC sur ces mêmes raisins car la capacité de production de ces métabolites semble être plus souche dépendante que caractéristique d'une espèce.

Concernant les champignons mycotoxinogènes, le gène *otapksppN* (ochratoxine polyketide synthase) impliqué dans la production d'OTA a été identifié chez *A. ochraceus* (O'Callaghan *et al*, 2003), *P. nordicum* (Geisen *et al*, 2004) et *A. carbonarius* (Atoui *et al*, 2006) et ensuite utilisé afin de détecter et quantifier les souches de *A. carbonarius* productrices d'OTA présentes sur baies de raisin (Atoui *et al*, 2007; Selma *et al*, 2008).

Concernant les moisissures potentiellement productrices de déviations organoleptiques (GMT, ACF), les voies de biosynthèse de ces molécules ne sont pas encore établies avec précision (Chapitre 1). La majorité des travaux portant sur les GMT se sont focalisés sur la voie de biosynthèse de la géosmine et étudient des espèces appartenant au genre *Streptomyces*, premier micro-organisme producteur identifié. Deux gènes *cyc2* (SCO6073) et *geoA* (SAV2163) impliqués dans la voie de biosynthèse de la géosmine et présentant une identité de séquence de 83%, ont été identifiés respectivement chez *Streptomyces coelicolor* (Gust *et al*, 2003) et chez *Streptomyces avermitilis* (Cane *et al*, 2006).

Une suite logique à ce travail de thèse serait d'identifier chez les moisissures des gènes impliqués dans la synthèse de ces molécules génératrices d'altérations organoleptiques et particulièrement en prenant modèle sur les gènes précédemment cités. Mais ceci demande au préalable d'identifier l'ensemble des molécules responsables de ces déviations et de caractériser leurs voies de biosynthèse. Une fois l'identification d'un gène impliqué dans la voie de biosynthèse de ces molécules, notre technique de détection et de quantification pourrait être affinée pour développer un outil de détection et d'évaluation de leur présence potentielle sur grappe de raisin.

En conclusion, il apparaît que la diversité fongique sur baies de raisin est très variable, particulièrement les genres et /ou espèces responsables de déviations aromatiques et que cette diversité est fonction de facteurs environnementaux multiples, rendant toute généralisation de lutte impossible. Une attention particulière doit être portée à la microflore fongique impliquée dans la production de GMT/ACF, défaut émergent depuis une dizaine d'années et pour lequel beaucoup de questions restent sans réponse :
molécules impliquées ? Genres ou espèces productrices ?

Aux regards des pertes économiques que ces défauts peuvent engendrés, du peu de moyens de lutte mis à disposition, il est indispensable de limiter le développement de cette flore au vignoble.

Grâce à ce travail de recherche, des outils de caractérisation et de détection de la microflore fongique présente sur baie de raisin ont été mis au point. Ces outils de caractérisation et de détection associés à une meilleure compréhension des facteurs et mécanismes impliqués dans la production de ces défauts devraient permettre dans l'avenir la mise en place d'outils de lutte et de prédiction répondant aux attentes, non seulement de la filière vitivinicole, mais également du consommateur soucieux de sa santé et de son environnement.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

A

- Abrunhosa L, Paterson RR, Kozakiewicz Z, Lima N et Venancio A (2001). Mycotoxin production from fungi isolated from grapes. *Letters in Applied Microbiology* 32: 240-242
- Accensi F, Cano J, Figuera L, Abarca ML et Cabañes FJ (1999). New PCR method to differentiate species in the *Aspergillus niger* aggregate. *FEMS Microbiology Letters* 180(2): 191-196
- Agnolucci M, Scarano S, Rea E, Toffanin A et Nuti M (2007). Detection of *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis* in pressed sangiovese grapes by real time PCR. *Italian Journal of Food Science* 19(2): 153-164
- Amon JM, Vandeppeer JM et Simpson RF (1989). Compounds responsible for cork taint in wine. *Australian and New Zealand Wine Industry Journal* 4: 62-69
- Anderson IC, Campbell CD et Prosser JI (2003). Potential bias of fungal 18S rDNA and internal transcribed spacer polymerase chain reaction primers for estimating fungal biodiversity in soil. *Environmental Microbiology* 5(1): 36-47
- Atoui A, Dao HP, Mathieu F et Lebrihi A (2006). Amplification and diversity analysis of ketosynthase domains of putative polyketide synthase genes in *Aspergillus ochraceus* and *Aspergillus carbonarius* producers of ochratoxin A. *Molecular Nutrition and Food Research*, 50(6): 488-493
- Atoui A, Mathieu F et Lebrihi A (2007). Targeting a polyketide synthase gene for *Aspergillus carbonarius* quantification and ochratoxin A assessment in grapes using real-time PCR. *International Journal of Food Microbiology* 115(3): 313-318

B

- Bacha N, Atoui A, Mathieu F, Liboz T et Lebrihi A (2009). *Aspergillus westerdijkiae* polyketide synthase gene "aoks1" is involved in the biosynthesis of ochratoxin A. *Fungal Genetics and Biology* 46, 77-84.
- Bae S, Fleet GH et Heard GM (2006). Lactic acid bacteria associated with wine grapes from several Australian vineyards. *Journal of Applied Microbiology* 100(4): 712-727

- Barata A, Gonzalez S, Malfeito-Ferreira M, Querol A et Loureiro V (2008a). Sour rot-damaged grapes are sources of wine spoilage yeasts. *FEMS Yeast Research* 8(7):1008-1017
- Barata A, Seborro F, Belloch C, Malfeito-Ferreira M et Loureiro V (2008b). Ascomycetous yeast species recovered from grapes damaged by honeydew and sour rot. *Journal of Applied Microbiology* 104(4):1182-91
- Barbe JC, De Revel G, Joyeux A, Bertrand A et Lonvaud-Funel A (2001). Role of botrytized grape microorganisms in SO₂ binding phenomena. *Journal of Applied Microbiology* 90(1): 34-42
- Battilani P, Giorni P et Pietri A (2003). Epidemiology of toxin-producing fungi and ochratoxin A occurrence in grape. *European Journal of Plant Pathology* 109(7): 715-722
- Battilani P, Giorni P, Bertuzzi T, Formenti S et Pietri A (2006). Black aspergilli and ochratoxin A in grapes in Italy. *International Journal of Food Microbiology* 111: S53-S60
- Bau M, Bragulat MR, Abraca ML, Minguez S et Cabañes FJ (2005a). Ochratoxigenic species from Spanish wine grapes. *International Journal of Food Microbiology* 98: 125-130
- Bau M, Castella G, Bragulat MR et Cabañes FJ (2005b). DNA-based characterization of ochratoxin-A-producing and non-producing *Aspergillus carbonarius* strains from grapes. *Research in Microbiology* 156(3): 375-381
- Bau M, Castella G, Bragulat MR et Cabañes FJ (2006). RFLP characterization of *Aspergillus niger* aggregate species from grapes from Europe and Israel. *International Journal of Food Microbiology*, 111: S18-S21
- Bejaoui H, Mathieu F, Taillandier P et Lebrihi A (2005). Conidia of black aspergilli as new biological adsorbents for ochratoxin A in grape juices and musts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53(21): 8224-8229
- Bejaoui H, Mathieu F, Taillandier P et Lebrihi A (2006a). Black aspergilli and ochratoxin A production in French vineyards. *International Journal of Food Microbiology* 111: S46-S52

- Bejaoui H, Mathieu F, Taillandier P et Lebrihi A (2006b). Biodegradation of ochratoxin A by *Aspergillus* section *Nigri* species isolated from French grapes: a potential means of ochratoxin A decontamination in grape juices and musts. *FEMS Microbiology Letters* 255(2): 203-208
- Bellí N, Bau M, Marín S, Abarca ML, Ramos AJ et Bragulat MR (2006). Mycobiota and ochratoxin A producing fungi from Spanish wine grapes. *International Journal of Food Microbiology* 111: S40-S45
- Bentley R et Meganathan R (1981). Geosmin and methylisoborneol biosynthesis in streptomycetes. Evidence for an isoprenoid pathway and its absence in non-differentiating isolates. *FEBS Letters* 125(2): 220-222
- Bragulat MR, Abarca ML et Cabañes FJ (2008). Low occurrence of patulin- and citrinin-producing species. *Letters in Applied Microbiology* 47: 286-289
- Breitenbach M et Simon-Nobbe B (2002). The allergens of *Cladosporium herbarum* and *Alternaria alternata*. *Fungal Allergy and Pathogenicity, Chemical Immunology* 81: 48-72
- Bruns TD, White TJ et Taylor JW (1991). Fungal molecular systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics* 22: 525-564

C

- Cabanés FJ, Accensi F, Bragulat MR, Abarca ML, Castella G, Mínguez S et Pons A (2002). What is the source of ochratoxin A in wine? *International Journal of Food Microbiology* 79(3): 213-215
- Cane DE et Watt RM (2003). Expression and mechanistic analysis of a germacradienol synthase from *Streptomyces coelicolor* implicated in geosmin biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(4): 1547-1551
- Cane DE, He X, Kobayashi S, Omura S et Ikeda H (2006). Geosmin biosynthesis in *Streptomyces avermitilis*. Molecular Cloning, Expression, and Mechanistic Study of the Germacradienol/Geosmin Synthase. *The Journal of Antibiotics* 59(8): 471-479

- Castellari M, Versari A, Fabiani A, Parpinello GP et Galassi S (2001). Removal of ochratoxin A in red wines by means of adsorption treatments with commercial fining agents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49(8): 3917-3921
- Cecchini F, Morassut M, Garcia Moruno E et Stefano R (2006). Influence of yeast strain on ochratoxin A content during fermentation of white and red must. *Food Microbiology* 23(5): 411-417
- Chen YM, Hobson P, Burch MD et Lin TF (2010). In situ measurement of odor compound production by benthic cyanobacteria. *Journal of Environmental Monitoring* 12(3): 769-775
- Chiotta M, Ponsone ML, Combina M, Torres AM et Chulze SN (2009). *Aspergillus* section *Nigri* species isolated from different wine-grape growing regions in Argentina. *International Journal of Food Microbiology* 136(1): 137-141
- Chulze SN, Magnoli CE et Dalcero AM (2006). Occurrence of ochratoxin A in wine and ochratoxigenic mycoflora in grapes and dried vine fruits in South America. *International Journal of Food Microbiology* 111: S5-9
- Cocolin L, Manzano M, Cantoni C et Comi G (2001). Denaturing gradient gel electrophoresis analysis of the 16S rRNA gene V1 region to monitor dynamic changes in the bacterial population during fermentation of Italian sausages. *Applied and Environmental Microbiology* 67(11): 5113-5121
- Code International des pratiques œnologiques OIV (2010) (www.oiv.org/fr/accueil)
- Colombo F, Vallone L, Giaretti M et Dragoni I (2003). Identification of *Penicillium aurantiogriseum* species with a method of polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. *Food Control* 14(3): 137-140
- Combina M, Mercado L, Borgo P, Elia A, Jofre V, Ganga A, Martinez C et Catania C (2005). Yeasts associated to Malbec grape berries from Mendoza, Argentina. *Journal of Applied Microbiology* 98: 1055-1061
- Crespy A (2005). A propos de la norme ochratoxine A à 2 µg/L de vin : quelles conséquences sur la filière ? *Revue des œnologues*, 111: 7-9.

D

- Dachoupakan C, Ratomahenina R, Martinez V, Guiraud JP, Baccou JC et Schorr-Galindo S (2009). Study of the phenotypic and genotypic biodiversity of potentially ochratoxigenic black aspergilli isolated from grapes. *International Journal of Food Microbiology* 132: 14-23
- Dao HP, Mathieu F et Lebrihi A (2005). Two primer pairs to detect OTA producers by PCR method. *International Journal of Food Microbiology* 104: 61-67
- Darriet P, Pons M, Lamy S et Dubourdieu D (2000). Identification and quantification of geosmin, an earthy odorant contaminating wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48(10): 4835-4838
- Darriet P, Lamy S, La Guerche S, Pons M, Dubourdieu D, Blancard D, Steliopoulos P et Mosandl A (2001). Stereodifferentiation of géosmine in wine. *European Food Research and Technology* 213: 122-125
- Dauphin B, La Guerche S, Pons M et Darriet P (2007). Caractérisation de composés carbonylés très odorants impliqués dans des déviations organoleptiques des vins. *In: Lonvaud A, Geny L, Mietton-Peuchot, Darriet Ph, Lucas P, de Revel G et PL Teissedre, Oeno 2007 Tome 2, 8^{ème} Symposium International d'Œnologie de Bordeaux, 586-588*
- Dean TR, Kohan M, Betancourt D et Menetrez MY (2005). A simple polymerase chain reaction/restriction fragment length polymorphism assay capable of identifying medically relevant filamentous fungi. *Molecular Biotechnology* 31(1): 21-27
- Del Prete V, Rodriguez H, Carrascosa AV, De Las Rivas B, Garcia-Moruno E et Munoz R (2007). In vitro removal of ochratoxin A by wine lactic acid bacteria. *Journal of Food Protection* 70(9): 2155-2160
- De Valk HA, Klaassen CHW et Meis JFGM (2008). Molecular typing of *Aspergillus* species. *Mycoses* 51(6):463-476
- Díaz Ga, Torres R, Vega M et Latorre BA (2009). Ochratoxigenic *Aspergillus* species on grapes from Chilean vineyards and *Aspergillus* threshold levels on grapes. *International Journal of Food Microbiology* 133: 195-199

- Doaré-Lebrun E (2005). Caractérisation de la microflore des raisins par méthodes FISH et PCR-TTGE - Application à la résolution des goûts terreux dans les vins. *Thèse de doctorat*, UTC et ENSIA
- Doaré-Lebrun E, El Arbi A, Charlet M, Guérin L, Pernelle JJ, Ogier JC et Bouix M (2006). Analysis of fungal diversity of grapes by application of temporal temperature gradient gel electrophoresis – potentialities and limits of the method. *Journal of Applied Microbiology* 101(6): 1340-1350
- Downs SH, Mitakakis TZ, Marks GB, Belousova EG, Leüppi JD, Xuan W, Downie SR, Tobias A et Peat JK (2001). Clinical importance of *Alternaria* exposure in children. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 164(3): 455-459
- Drouillard J-B, Martins-Gueunier M, Knauf-Beiter G, Lebrihi A, Mathieu F, Guerin L, Guerin-Schneider R, Dumoulin M, Riboulet J-M, Arioli X et Treilhou M (2005). Goûts moisi-terreux dans les vins: premiers résultats pratiques d'un partenariat filière. *Revue Française d'Œnologie* 214: 18-23
- Dubos B (2002). Maladies cryptogamiques de la vigne. 174 pages, Ed. Féret, Bordeaux
- Dupont J, Magnin S, Marti A et Brousse M (1999). Molecular tools for identification of *Penicillium* starter cultures used in the food industry. *International Journal of Food Microbiology* 49(3): 109-118
- Dupont J, Denetiere B, Jacquet C et Roquebert M-F (2006). PCR-RFLP of ITS rDNA for the rapid identification of *Penicillium* subgenus *Biverticillium* species. *Revista Iberoamericana Micologia* 26: 145-150

E

- El Khoury A, Rizk T, Lteif R, Azouri H, Delia ML et Lebrihi A (2008). Fungal contamination and aflatoxin B1 and ochratoxin A in Lebanese wine–grapes and musts. *Food and Chemical Toxicology* 46: 2244-2250
- Esteve-Zarzoso B, Belloch C, Uruburu F et Querol A (1999). Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *International Journal of Systematic Bacteriology* 49: 329-337

F

- Felske A, Engelen B, Nubel U et Backhaus H (1996). Direct ribosome isolation from soil to extract bacterial rRNA for community analysis. *Applied and Environmental Microbiology* 62(11): 4162-4167
- Ferris MJ, Muyzer G et Ward DM (1996). Denaturing gradient gel electrophoresis profiles of 16S rRNA-defined populations inhabiting a hot spring microbial mat community. *Applied and Environmental Microbiology* 62(2): 340-346

G

- Gabriolotto C, Monchiero M, Negre M, Spadaro D et Gullino ML (2009). Effectiveness of control strategies against *Botrytis cinerea* in vineyard and evaluation of the residual fungicide concentrations. *Journal of Environmental Science and Health Part B* 44(4): 389-396
- Garcia C, La Guerche S, Mouhamadou B, Férandon C, Labarère J, Blancard D, Darriet P et Barroso G (2006). A CAPS test allowing a rapid distinction of *Penicillium expansum* among fungal species collected on struguri berries, inferred from the sequence and secondary structure of the mitochondrial SSU-rRNA. *International Journal of Food Microbiology* 111(3): 183-190
- Geisen R, Cantor MD, Hansen TK, Holzapfel WH et Jakobsen M (2001). Characterization of *Penicillium roqueforti* strains used as cheese starter cultures by RAPD typing. *International Journal of Food Microbiology* 65(3): 183-191
- Geisen R, Mayer Z, Karolewicz A et Farber PF (2004). Development of a real time PCR system for detection of *Penicillium nordicum* and for monitoring ochratoxin A production in foods by targeting the ochratoxin polyketide synthase gene. *Systematic and Applied Microbiology* 27(4): 501-507
- Geiser DM, Harbinski FM et Taylor JW (2000). Molecular and analytical tools for characterizing *Aspergillus* and *Penicillium* species at the intra- and interspecific levels. In: *Integration of Modern Taxonomic Methods for Penicillium and Aspergillus Classification* ed.

- Geiser DM, Klich MA, Frisvad JC, Peterson SW, Varga J et Samson RA (2007). The current status of species recognition and identification in *Aspergillus*. *Studies in Mycology* 59: 1-10
- Gerbaux V, Jeudy S et Monamy C (2000). Etude des phenols volatils dans les vins de Bourgogne. *Bulletin O.I.V.* 73: 581-599
- Gerber NN (1968). Geosmin, from microorganisms, is trans-1, 10-dimethyl-trans-9-decalol. *Tetrahedron Letters* 9: 2971-2974
- Gerber NN et Lechevalier HA (1965). Geosmin an earthy-smelling substance isolated from actinomycetes. *Applied Microbiology* 13: 935-938
- Gil-Serna J, González-Salgado A, González-Jaén MT, Vázquez C et Patiño B (2009). ITS-based detection and quantification of *Aspergillus ochraceus* and *Aspergillus westerdijkiae* in grapes and green coffee beans by real-time quantitative PCR. *International Journal of Food Microbiology* 131(2-3): 162-167
- Gómez C, Bragulat MR, Abarca ML, Minguez S et Cabañes FJ (2006). Ochratoxin A-producing fungi from grapes intended for liqueur wine production. *Food Microbiology* 23: 541-545
- Gonzalez A, Hierro N, Poblet M, Mas A et Guillamon JM (2005). Application of molecular methods to demonstrate species and strain evolution of acetic acid bacteria population during wine production. *International Journal of Food Microbiology* 102: 295-304
- Gonzalez-Salgado A, Patiño B, Vazquez C et Gonzalez-Jaen MT (2005). Discrimination of *Aspergillus niger* and other *Aspergillus* species belonging to section *Nigri* by PCR assays. *FEMS Microbiology Letters* 245(2): 353-361
- Grosbon P, Brun D et Martin A (2009). Effet conjugué de la protection anti-Botrytis et d'itinéraires de vinification sur les micro-organismes indésirables d'un vin issu d'une parcelle à risque. *Revue des œnologues* 133: 28-31
- Guérin, L., Guyot, F., Vincent, B., Lempereur, V., 2007. 8ième Symposium International d'œnologie, Bordeaux, Juin. In : Lonvaud A, Gery L, Miettn-Peuchot M, Darriet P, Lucas P, de Revel G, Teissedre PL. oeno 2007. Tome 1. Vigne et Vin Publications Internationales Ed., Villeneuve d'Ornon, p. 76-78.

Gust B, Challis GL, Fowler K, Kieser T et Chater KF (2003). PCR-targeted *Streptomyces* gene replacement identifies a protein domain needed for biosynthesis of the sesquiterpene soil odor geosmin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(4): 1541-1546

H

Harris ND, Karahadian C et Lindsay RC (1986). Musty aroma compounds produced by selected molds and actinomycetes on agar and whole wheat bread. *Journal of Food Protection* 49: 964-970

Hashizume K, Tozawa K, Hiraga Y et Aramaki I (2001). Purification and characterization of a O-methyltransferase capable of methylating 2-hydroxy-3-alkylpyrazine from *Vitis vinifera* L. (cv. Cabernet Sauvignon). *Bioscience, biotechnology and biochemistry* 65(10): 2213-2219

Henry T, Iwen PC et Hinrichs SH (2000). Identification of *Aspergillus* species using internal transcribed spacer regions 1 and 2. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(4): 1510-1515

Hernan-Gómez S, Espinosa JC et Ubeda JF (2000). Characterization of wine yeast by temperature gradient gel electrophoresis TGGE. *FEMS Microbiology Letters* 193(1): 45-50

Hibbett DS, Nilsson RH, Snyder M, Fonseca M, Costanzo J et Shonfeld M (2005). Automated phylogenetic taxonomy: an example in the homobasidiomycetes (mushroom-forming fungi). *Systematic Biology* 54(4): 660-668

Hierro N, Esteve-Zarzoso B, Gonzalez A, Mas A et Guillamon JM (2006). Real-time quantitative PCR (QPCR) and reverse transcription-QPCR for detection and enumeration of total yeasts in wine. *Applied and Environmental Microbiology* 72(11): 7148-7155

Huff WE et Hamilton PB (1979). Mycotoxin-their biosynthesis in fungi: ochratoxin metabolites of combined pathways. *Journal of Food Protection* 42: 815-820

I

ITV France (2005). Caractères moisi-terreux des vins : origine et prévention. Editions ITV France, Juillet

Izaguirre G et Taylor WD (2004). A guide to geosmin- and MIB-producing cyanobacteria in the United States. *Water Science and Technologie* 49(9): 19-24

J

Jiang J, He XF et Cane DE (2007). Biosynthesis of the earthy odorant geosmin by bifunctional *Streptomyces coelicolor* enzyme. *Nature Chemical Biology* 3(11): 711-715

Joyeux A, Lafon-Lafourcade S et Ribereau-Gayon P (1984). Evolution of acetic acid bacteria during fermentation and storage of wine. *Applied and Environmental Microbiology* 48: 153-156

L

Lafon-Lafourcade S, Carre E et Ribereau-Gayon P (1983). Occurrence of lactic acid bacteria during the different stages of vinification and conservation of wines. *Applied and Environmental Microbiology* 46(4): 874-880

Laforgue R, Guérin L, Pernelle JJ, Monet C, Dupont J et Bouix M (2009). Evaluation of PCR-DGGE methodology to monitor fungal communities on grapes. *Journal of Applied Microbiology* 107(4): 1208-1218

La Guerche S (2004). Recherches sur les déviations organoleptiques des moûts et des vins associées au développement de pourritures sur les raisins. Etude particulière de la géosmine. *Thèse de doctorat*, Université de Bordeaux 2

La Guerche S, Gracia C, Darriet P, Dubourdieu D et Labarère J (2004). Characterization of *Penicillium* species isolated from grapes berries by their internal transcribed spacer (ITS1) sequences and by gas chromatography-mass spectrometry analysis of geosmin production. *Current Microbiology* 48(6): 405-411

- La Guerche S, Chamont S, Blancard D, Dubourdiou D et Darriet P (2005). Origin of (-)-geosmin on grapes: on the complementary action of two fungi, *Botrytis cinerea* and *Penicillium expansum*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 88(2): 131-139
- La Guerche S, Dauphin B, Pons M, Blancard D et Darriet P (2006). Characterization of some mushroom and earthy off-odors microbially induced by the development of rot on grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54(24): 9193-9200
- La Guerche S, De Senneville L, Blancard D et Darriet P (2007). Impact of the *Botrytis cinerea* strain and metabolism on (-)-geosmin production by *Penicillium expansum* in grape juice. *Antonie van Leeuwenhoek* 92(3):331-341
- Larsen TO et Frisvad JC (1995). Characterization of volatile metabolites from 47 *Penicillium*-taxa. *Mycological Research* 99: 1153-1166
- Lasram S, Bellí N, Chebil S, Nahla Z, Ahmed M, Sanchis V et Ghorbel A (2007). Occurrence of ochratoxigenic fungi and ochratoxin A in grapes from a Tunisian vineyard. *International Journal of Food Microbiology* 114: 376-379
- Le Drean G, Mounier J, Vasseur V, Arzur D, Habrylo O et Barbier G (2010). Quantification of *Penicillium camemberti* and *Penicillium roqueforti* mycelium by real-time PCR to assess their growth dynamics during ripening cheese. *International Journal of Food Microbiology* 138(1-2): 100-107
- Le Roux C, Carsouille J, Lempereur V et Berger J-L (2005). Goûts terreux : observation au vignoble et mise au point d'un test prédictif. *Revue Française d'œnologie* 214: 7-11
- Leong SL, Hocking AD et Scott ES (2007). *Aspergillus* species producing ochratoxin A: isolation from vineyard soils and infection of Semillon bunches in Australia. *Journal of Applied Microbiology* 102: 124-133
- Leroux P, Fritz R, Debieu D, Albertini C, Lanen C, Bach J, Gredt M et Chapeland F (2002). Mechanisms of resistance to fungicides in field strains of *Botrytis cinerea*. *Pest Management Science* 58(9): 876-888
- Li SS, Cheng C, Chen JY, Yan BZ, Reeves M (2010). Yeast species associated with wine grapes in China. *International Journal of Food Microbiology* 138(1-2): 85-90

M

- Madelin MF (1966). The fungus spore. Ed. Butterworths, London
- Magnin-Robert M, Trotel-Aziz P, Quantinet D, Biagianti S et Aziz A (2007). Biological control of *Botrytis cinerea* by selected grapevine-associated bacteria and stimulation of chitinase and β -1,3 glucanase activities under field conditions. *European Journal of Plant Pathology* 118(1): 43-57
- Marek P, Annamalai T et Venkitanarayanan K (2003). Detection of *Penicillium expansum* by polymerase chain reaction. *International Journal of Food Microbiology* 89(2-3): 139-144
- Maret R et Sozzi T (1979). Flore malolactique des moûts et des vins du Canton de Valais (Suisse). *Annales de Technologie Agricole* 28(1): 41-55
- Marshall MN, Cocolin L, Mills DA et Vandergheynst JS (2003). Evaluation of PCR primers for denaturing gradient gel electrophoresis analysis of fungal communities in compost. *Journal of Applied Microbiology* 95(5): 934-948
- Martínez-Culebras PV et Ramón D (2007). An ITS-RFLP method to identify black *Aspergillus* isolates responsible for OTA contamination in grapes and wine. *International Journal of Food Microbiology* 113: 147-153
- Masih EI, Slezack-Deschaumes S, Marmaras I, Barka EA, Vernet G, Charpentier C, Adholeya A et Paul B (2001). Characterisation of the yeast *Pichia membranifaciens* and its possible use in the biological control of *Botrytis cinerea*, causing the grey mould disease of grapevine. *FEMS Microbiology Letters* 202(2): 227-232
- Mattheis JP et Roberts RG (1992). Identification of geosmin as a volatile metabolite of *Penicillium expansum*. *Applied and Environmental Microbiology* 58(9): 3170-3172
- Melki Ben Fredj S, Chebil S, Lebrihi A, Lasram S, Ghorbel A et Mliki A (2007). Occurrence of pathogenic fungal species in Tunisian vineyard. *International Journal of Food Microbiology* 113: 245-250

- Melki Ben Fredj S, Chebil S et Mliki A (2009). Isolation and characterization of ochratoxin A and aflatoxin B1 producing fungi infecting grapevines cultivated in Tunisia. *African Journal of Microbiology Research* 3(9): 523-527
- Mohlenhoff P, Muller L, Gorbushina AA et Petersen K (2001). Molecular approach to the characterization of fungal communities: methods for DNA extraction, PCR amplification and DGGE analysis of painted art objects. *FEMS Microbiology Letters* 195(2): 169-173
- Mortimer R et Polsinelli M (1999). On the origins of wine yeast. *Research in Microbiology* 150: 199–204
- Mulè G, Susca A, Logrieco A, Stea G et Visconti A (2006). Development of a quantitative real-time PCR assay for the detection of *Aspergillus carbonarius* in grappes. *International Journal of Food Microbiology* 111: S28-S34
- Muyzer G, De Waal EC et Uitterlinden AG (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* 59(3): 695-700
- Muyzer G, Teske A, Wirsen CO et Jannasch HW (1995). Phylogenetic relationships of *Thiomicrospira* species and their identification in deep-sea hydrothermal vent samples by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA fragments. *Archives of Microbiology* 164(3): 165-171

N

- Nisiotou AA et Nychas GJE (2007). Yeast populations residing on healthy *Botrytis*-infected grapes from a vineyard in Attica, Greece. *Applied and Environmental Microbiology* 73(8): 2765-2768
- Nunez YP, Pueyo E, Carrascosa AV et Martinez-Rodriguez AJ (2008). Effects of aging and heat treatment on whole yeast cells and yeast cell walls and on adsorption of ochratoxin A in a wine model system. *Journal of Food Protection* 71(7): 1496-1499

O

- O'Callaghan J, Caddick MX et Dobson ADW (2003). A polyketide synthase gene required for ochratoxin A biosynthesis in *Aspergillus ochraceus*. *Microbiology* 149: 3485-3491
- Ogier JC, Son O, Gruss A, Tailliez P et Delacroix-Buchet A (2002). Identification of the bacterial microflora in dairy products by temporal temperature gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology* 68(8): 3691-3701
- Oliveri C, Torta L et Catara V (2008). A polyphasic approach to the identification of ochratoxin A-producing black *Aspergillus* isolates from vineyards in Sicily. *International Journal of Food Microbiology* 127: 147-154
- Ough CS et Corison CA (1980). Measurement of patulin in grapes and wines. *Journal of Food Science* 45(3): 476-478

P

- Pallmann CL, Brown JA, Olineka TL, Cocolin L, Mills DA et Bisson LF (2001). Use of WL medium to profile native flora fermentations. *American Journal of Enology and Viticulture* 52(3): 198-203
- Paterson RRM, Venincio A et Lima N (2007). Why do food and drink smell like earth ? *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*, A. Mendez-Vilas Ed. 120-128
- Patiño B, González-Salgado A, González-Jaén MT et Vázquez C (2005). PCR detection assays for the ochratoxin-producing *Aspergillus carbonarius* and *Aspergillus ochraceus* species. *International Journal of Food Microbiology* 104(2): 207-214
- Perrone G, Susca A, Stea G et Mulè G (2004). PCR assay for identification of *Aspergillus carbonarius* and *Aspergillus japonicus*. *European Journal of Plant Pathology* 110(5-6): 641-649
- Perrone G, Susca A, Epifani F et Mulè G (2006). AFLP characterization of southern Europe population of *Aspergillus* section *Nigri* from grapes. *International Journal of Food Microbiology* 111: S22-S27

- Phalip V, Hatsch D et Jeltsch JM (2004). Application of a yeast method for DNA extraction associated with database interrogations for the characterization of various filamentous fungi from diseased hop. *Biotechnology Letters* 26(5): 409-413.
- Pickering GJ, Lin JY, Reynolds A, Soleas G, Riesen R et Brindle I (2005). The influence of *Harmonia axyridis* on wine composition and aging. *Journal of Food Science* 70(2): 128-135
- Pickering A, Karthik D, Inglis M, Sears M et Ker K (2007). Determination of Ortho- and Retronasal Detection Thresholds for 2-Isopropyl-3-Methoxypyrazine in Wine. *Sensory and Nutritive Qualities of Food* 72(7): 468-472
- Pisarniskii AF et Egorov IA (1988). Low molecular weight metabolites produced by various *Penicillium* species. *Prikladnaia Biohimimiia Mikrobiologiia* 24: 760-764
- Pitt JI et Hocking AD (2006). Mycotoxins in Australia: biocontrol of aflatoxin in peanuts. *Mycopathologia* 162(3): 233-243
- Polak EH et Provasi J (1992). Odor sensitivity to geosmin enantiomers. *Chemical Senses* 17(1): 23-26
- Ponsone ML, Combina M, Dalcero A et Chulze S (2007). Ochratoxin A and ochratoxigenic *Aspergillus* species in Argentinean wine grapes cultivated under organic and non-organic systems. *International Journal of Food Microbiology* 114: 131-135
- Ponsone ML, Chiotta ML, Combina M, Dalcero AM et Chulze SN (2009). Fate of ochratoxin A content in Argentinian red wine during a pilot scale vinification. *Revista de Argentina* 41(4): 245-250
- Pradelles R, Alexandre H et Chassagne D (2009). Oenological yeast walls: a new biosorbant of (□) geosmin in wine. XXVII International specialized symposium on yeasts, Paris, Août 2009
- Prakitchaiwattana CJ, Fleet GH et Heard GM (2004). Application and evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis to analyse the yeast ecology of wine grapes. *FEMS Yeast Research* 4: 865-877

Prieto C, Jara C, Mas A et Romero J (2007). Application of molecular methods for analyzing the distribution and diversity of acetic acid bacteria in Chilean vineyards. *International Journal of Food Microbiology* 115: 348-355

Raspor P, Milek DM, Polanc J, Smole Mozina S et Cadez N (2006). Yeasts isolated from three varieties of grapes cultivated in different locations of the Dolenjska vine-growing region, Slovenia. *International Journal of Food Microbiology* 109: 97-102

R

Renouf V (2006). Description et caractérisation de la diversité microbienne durant l'élaboration du vin : interactions et équilibres – relation avec la qualité du vin. *Thèse de doctorat*, Institut National Polytechnique de Toulouse.

Renouf V et Lonvaud-Funel A (2007). Development of an enrichment medium to detect *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis*, a spoilage wine yeast, on the surface of grape berries. *Microbiological Research* 162(2): 154-167

Renouf V, Claisse O et Lonvaud-Funel A (2007). Inventory and monitoring of wine microbial consortia. *Applied Microbiology and Biotechnology* 75: 149-164

Ribereau-Gayon P, Dubourdieu D, Doneche B et Lonvaud A (2004a). *Traité d'œnologie. 1. Microbiologie du vin, vinifications*. Ed. La Vigne, Dunod

Ribereau-Gayon P, Glories Y, Maujean A et Dubourdieu D (2004b). *Traité d'œnologie. 2. Chimie du vin, stabilisations et traitements*. Ed. La Vigne, Dunod

Rohmer M, Knani M, Simonin P, Sutter B et Sham H (1993). Isoprenoid biosynthesis in bacteria: a novel pathway for the early steps leading to isopentenyl diphosphate. *Biochemical Journal* 295: 517-527

Romano P, Fiore C, Paraggio M, Caruso M et Capece A (2003). Function of yeast species and strains in wine flavour. *International Journal of Food Microbiology* 86: 169-180

Rosa Cad, Palacios V, Combina M, Fraga ME, Rekson AD, Magnoli CE et Dalcero AM (2002). Potential ochratoxin A producers from wine grapes in Argentina and Brazil. *Food Additives and Contaminants* 19(4): 408-414

Rousseau J (2003). Etude des facteurs de prévention et de réduction de la teneur en OTA dans les vins. 7^{ème} *Symposium International d'œnologie de Bordeaux*, Arcachon, Juin 2003

S

Sage L, Krivobok S, Delbos E, Seigle-Murandi F et Creppy EE (2002). Fungal flora and ochratoxin A production in grapes and musts from France. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 1306-1311

Sage L, Garon D et Seigle-Murandi F (2004). Fungal microflora and ochratoxin a risk in French vineyards. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52(18): 5764-8

Salo PM, Arbes SJ Jr, Sever M, Jaramillo R, Cohn RD, London SJ et Zeldin DC (2006). Exposure to *Alternaria alternata* in US homes is associated with asthma symptoms. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 118(4): 892-898

Samson RA et Frisvad JC (2004). *Penicillium* subgenus *Penicillium*: new taxonomic schemes and mycotoxins and other extrolites. *Studies in Mycology* (49): V-V

Samson RA, Seifert KA, Kuijpers AFA, Houbraken JAMP et Frisvad JC (2004). Phylogenetic analysis of *Penicillium* subgenus *Penicillium* using partial β -tubulin sequences. *Studies in Mycology* 49: 175-200

Schabereteir-Gurtner C, Pinar G, Lubitz W et Rolleke S (2001). Analysis of fungal communities on historical church window glass by denaturing gradient gel electrophoresis and phylogenetic 18S rDNA sequence analysis. *Journal of Microbiological Methods* 47(3): 345-354

Schulz S et Dickschat JS (2006). Bacterial volatiles: the smell of small organisms. *Natural Products Reports* 24: 814-842

- Seifert KA, Samson RA, Dewaard JR, Houbraeken J, Levesque CA, Moncalvo JM, Louis-Seize G et Hebert PDN (2007). Prospects for fungus identification using CO1 DNA barcodes with *Penicillium* as a test case. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104(10): 3901-3906
- Selma Mv, Martínez-Culebras PV et Aznar R (2008). Real-time PCR based procedures for detection and quantification of *Aspergillus carbonarius* in wine grapes. *International Journal of Food Microbiology* 122(1-2): 126-134
- Serpaggi V, Remize F, Grand AS et Alexandre H (2010). Specific identification and quantification of the spoilage microorganism *Brettanomyces* in wine by flow cytometry: A useful tool for winemakers. *Cytometry A* 77(6): 497-499
- Serra R, Braga A et Venâncio A (2005). Mycotoxin-producing and other fungi isolated from grapes or wine production, with particular emphasis on ochratoxin A. *Research in Microbiology* 156: 515-521
- Serra R, Lourenço A, Alipio P et Venâncio A (2006a). Influence of the region of origin on the mycobiota of grapes with emphasis on *Aspergillus* and *Penicillium* species. *Mycological Research* 110: 971-978
- Serra R, Mendonca C et Venâncio A (2006b). Ochratoxin A occurrence and formation in Portuguese wine grapes at various stages of maturation. *International Journal of Food Microbiology* 111: S35-S39
- Sieiro C, Cansado J, Agrelo D, Velazquez JB et Villa TG (1990). Isolation and enological characterization of malolactic bacteria from the vineyards of northwestern Spain. *Applied and Environmental Microbiology* 56(9): 2936-2938
- Sigler WV et Turco RF (2002). The impact of chlorothalonil application on soil bacterial and fungal populations as assessed by denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied Soil Ecology* 21(2): 107-118
- Simpson RF (1990). Cork taint in wine : a review of causes. *Australian and New Zealand Wine Industry Journal* 5: 286-296

- Simpson RF, Capone DL et Sefton MA (2004). Isolation and identification of 2-methoxy-3,5-dimethylpyrazine, a potent musty compound from wine corks. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52(17): 5425-5430
- Skouboe P, Frisvad JC, Taylor JW, Lauritsen D, Boysen M et Rossen L (1999). Phylogenetic analysis of nucleotide sequences from the ITS region of terverticillate *Penicillium* species. *Mycological Research* 103(7): 873-881
- Smith E, Leeflang P, Glandorf B, Van Elsas JD et Wernars K (1999). Analysis of fungal diversity in the wheat rhizosphere by sequencing of cloned PCR-amplified genes encoding 18S rRNA and temperature gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology* 65(6): 2614-2621
- Suarez MB, Walsh K, Boonham N, O'Neill T, Pearson S et Barker I (2005). Development of real-time PCR (TaqMan®) assays for the detection and quantification of *Botrytis cinerea* in planta. *Plant Physiology and Biochemistry* 43(9): 890-899
- Suárez R, Suárez-Lepe JA, Morata A et Calderon F (2007). The production of ethyphenols in wine by yeasts of the genera *Brettanomyces* and *Dekkera*. A review. *Food Chemistry* 102: 10-21

T

- Tessonnière H, Vidal S, Barnavon L, Alexandre H et Remize F (2009). Design and performance testing of a real-time PCR assay for sensitive and reliable direct quantification of *Brettanomyces* in wine. *International Journal of Food Microbiology* 129(3): 237-243
- Tjamos SE, Antoniou PP et Tjamos EC (2006). *Aspergillus* spp., distribution, population composition and ochratoxin A production in wine producing vineyards in Greece. *International Journal of Food Microbiology* 111: S61-S66
- Trotel-Aziz P, Couderchet M, Biagianti S et Aziz A (2008). Characterization of new bacterial biocontrol agents *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Pantoea* and *Pseudomonas* spp. mediating grapevine resistance against *Botrytis cinerea*. *Environmental and Experimental Botany* 64(1): 21–32

V

- Vacher B, Pons M, Dauphin B, La Guerche S, Blancard D, Sauris P et Darriet P (2008). Déviations organoleptiques des moûts et des vins associées aux pourritures des raisins. Progression dans la connaissance des molécules odorantes mises en cause et des mécanismes de leur formation. *Revue des Œnologues*, 129: 9-13
- Van Der Merwe KJ, Steyn PS, Fourie L, De Scott B et Theron JJ (1965). Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus* Wilh. *Nature* (London) 205, 1112
- Van Elsas JD, Duarte GF, Keijzer-Wolter A et Smit E (2000). Analysis of the dynamics of fungal communities in soil via fungal-specific PCR of soil DNA followed by denaturing gradient gel electrophoresis. *Journal of Microbiological Methods* 43(2): 133-151
- Varga J, Kocsube S, Toth B, Frisvad JC, Perrone G, Susca A, Meijer M et Samson RA (2007). *Aspergillus brasiliensis* sp nov., a biseriata black *Aspergillus* species with world-wide distribution. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiol* 57(8): 1925-1932
- Vincent B (2005) Maladies émergentes et molécules indésirables ? EUROVITI DEC 2005

W

- Wanner P et Tressi R (1998). Purification and characterization of two enone reductases from *Saccharomyces cerevisiae*. *European Journal of Biochemistry* 255(1): 271-278
- White TJ, Bruns T, Lee S et Taylor J (1990). Amplification and direct sequencing of fungi ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Ninsky JJ, White TJ (Eds.), *PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, San Diego, CA, pp. 315-322

Z

- Zimmerli B et Dick R (1996). Ochratoxin A in table wine and grape-juice: occurrence and risk assessment. *Food Additives and Contaminants* 13(6): 655-66

