

3068 MISE 177-V513

Un kit simple et rapide pour détecter la pourriture des raisins

Ágnes DIENES-NAGY, Sandrine BELCHER, Fabrice LORENZINI et Katia GINDRO, Agroscope, 1260 Nyon

Renseignements: Ágnes Dienes-Nagy, e-mail: agnes.dienes-nagy@agroscope.admin.ch, tél. +41 22 363 43 34, www.agroscope.ch



Grappe atteinte de pourriture grise due à *Botrytis cinerea*.

Introduction

La pourriture grise des raisins est causée par le champignon *Botrytis cinerea*, dont la capacité d'adaptation importante lui permet de survivre sur divers substrats ou encore dans des conditions peu favorables. L'infection peut déjà avoir lieu durant la floraison et rester latente jusqu'à la véraison (Keller *et al.* 2003; Viret *et al.*

2004). Le développement de la maladie, lié aux conditions climatiques durant la maturation, altère la qualité des raisins et entraîne d'importantes pertes de récolte.

Différentes approches sont utilisées pour évaluer le degré d'infection et le développement de la pourriture grise. Les observations visuelles donnent de précieuses informations aux vignerons sur le développement de la maladie. Malheureusement, les premiers symptômes visuels ne se manifestent qu'à un stade où le champignon a déjà altéré la qualité du raisin. L'analyse des marqueurs chimiques, notamment les acides mucique, galacturonique, gluconique et le glycérol, fournit des informations sur l'importance de cette altération (Dienes-Nagy *et al.* 2011). Ces marqueurs sont essentiellement mesurés dans le moût aux vendanges pour évaluer l'état sanitaire de la récolte. La spectroscopie infrarouge (©WineScan) est une autre technique utilisée dans ce but, qui attribue un indice sanitaire au moût selon une calibration préalable (Versary *et al.* 2008). Cependant, celle-ci n'est pas forcément valable d'une région ou d'un cépage à l'autre. Il est donc préférable d'effectuer sa propre calibration, ce qui demande un grand nombre d'échantillons à différents degrés d'infection.

Les méthodes de biologie moléculaire, comme la PCR (Gindro *et al.* 2005), permettent de valider la présence, voire de quantifier le botrytis dans les baies, mais sans donner d'indication sur le stade de développement de la maladie.

Les tests immunologiques (Dewey *et al.* 2000) basés sur les anticorps spécifiques s'ajoutent à ces méthodes, proposant une alternative rapide et simple pour détecter la présence de *B. cinerea* dans le jus de raisin. Les kits contenant des anticorps fixés sur des bandelettes – comme les tests de grossesse – sont faciles à utiliser, aussi bien au vignoble qu'à la cave. Ils sont commercialisés depuis quelques années par deux fabricants principaux: EnviroLogix Inc et Pocket Diagnostic.

L'objectif de cette étude est d'évaluer la pertinence de ces tests, notamment sur différents cépages suisses comme le Gamaret ou la Petite Arvine, et de déterminer les informations fournies sur la qualité des raisins ou des vins.

Matériel et méthodes

Echantillons

Les échantillons de jus de raisin, provenant de l'étude au champ d'Agroscope à Changins/Nyon en 2012, ont été analysés par spectrométrie infrarouge (©WineScan), puis stockés à -20°C . Les échantillons de moûts provenaient des vendanges 2012 d'Agroscope et de différentes caves de la région de La Côte (Vaud, Suisse). Les échantillons de vins ont été fournis par la cave d'Agroscope à Changins. La liste des cépages étudiés est indiquée dans le tableau 1.

Etude au champ (2012)

L'essai a été conduit à Changins sur des parcelles de Gamay, Gamaret et Pinot noir. Les grappes ont été infectées à la floraison en vaporisant sur les fleurs (stade BBCH 65) une suspension aqueuse de conidies de *B. cinerea* (10^6 spores/ml). Les échantillons (trois grappes contaminées et trois témoins) ont été collectés une fois par semaine depuis la véraison jusqu'aux vendanges, pressés à l'aide d'un petit presseur hydraulique, centrifugés, puis analysés ou stockés à -20°C .

Mesure de la qualité

Chaque échantillon (moût, jus de raisin ou vin) a été analysé par spectrométrie infrarouge (©WineScan) à l'état frais. Les paramètres mesurés de façon indirecte par cette technique sont basés sur des calibrages développés et validés par ACW sur la matrice moût ou vin. Les échantillons des moûts ont été stockés à -20°C pour les analyses complémentaires (tabl. 2) et pour le test immuno-enzymatique (QuickStix™).

L'analyse statistique ANOVA est été effectuée à l'aide du logiciel XLStat (version 2010.2.03).

Tableau 1 | Liste des cépages analysés avec le test QuickStix™

Cépage	Essais
Gamay (contaminé et témoin)	Etude au champ + <i>in vitro</i>
Gamaret (contaminé et témoin)	Etude au champ + <i>in vitro</i>
Pinot noir (contaminé et témoin)	Etude au champ + <i>in vitro</i>
Chasselas	Etude au champ
Chardonnay	Moût
Cabernet franc	Moût
Cornalin	Moût + vin
Doral	Moût + vin
Humagne rouge	Moût + vin
Merlot	Moût + vin
Pinot gris	Moût + vin
Petite Arvine	Moût + vin
Sauvignon	Moût
Syrah	Moût

Résumé Des tests immunologiques rapides permettent de détecter la présence du champignon responsable de la pourriture grise des raisins en moins de dix minutes. Depuis quelques années, ces kits sont sur le marché aux Etats-Unis et en Europe. Agroscope a conduit une étude pour évaluer la pertinence de ces tests, notamment sur onze cépages suisses tels que le Gamaret, le Gamay, le Chasselas ou la Petite Arvine. Nos résultats confirment que le champignon peut être détecté dans le raisin, le moût ou le vin, indépendamment du cépage. Cependant, l'infection est détectée lorsqu'elle est déclarée, mais non à l'état latent. Une corrélation a été établie entre les résultats fournis par le test et la présence de marqueurs chimiques de la pourriture grise. Le test étudié se révèle donc utilisable pour caractériser l'état sanitaire d'une récolte.

Utilisation du test QuickStix™ Kit

Le principe de fonctionnement est le même pour tous les tests immunologiques, indépendamment du fabricant. Ils utilisent le même anticorps monoclonal, le BC-12.CA4 (Meyer *et al.* 2000), pour reconnaître l'antigène produit par *B. cinerea*. Les anticorps marqués se lient avec les antigènes et se fixent sur une bande, la ligne de test (fig.1). L'excès d'anticorps se fixe sur la

Tableau 2 | Méthodes analytiques appliquées dans l'étude

Paramètre	Méthode analytique	Référence
Acide gluconique	Méthode enzymatique	MSDA ¹
Glycérol	Méthode enzymatique	MSDA
Acides organiques	Chromatographie ionique	DIONEX Application Note 143 ²

¹Manuel suisse des Denrées alimentaires.

²DIONEX Corporation, www.dionex.com.

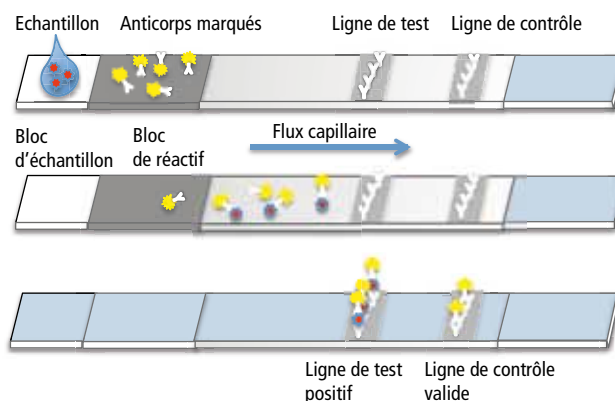


Figure 1 | Schéma de fonctionnement des tests immunologiques sur bandelette.

ligne de contrôle et valide le test. L'antigène du botrytis étant thermostable et non fermentescible, il se retrouve également dans le vin produit à partir de raisins contaminés et peut être détecté de la même manière. Les deux tests (EnviroLogix, kit QuickStix™ et Pocket Diagnostic) ne se différencient que sur des points de détail techniques. Toutefois, selon l'étude de Dewey *et al.* (2013) sur les vins de table et vins de dessert, les résultats obtenus par les deux tests sont parfaitement comparables.

Pour notre étude, seul le kit QuickStix™ a été utilisé en suivant les instructions du fabricant sans modification. Selon notre expérience, l'utilisation du kit est facile et la détection de la présence de *B. cinerea* est rapide.

Le kit immuno-enzymatique QuickStix™ (EnviroLogix Inc, Portland, Maine, USA) contient 25 bandelettes munies d'anticorps spécifiques permettant la détection de *Botrytis cinerea*, une solution tampon pour la dilution et des récipients pour effectuer les mesures. Après avoir enlevé la partie réactive, les bandelettes peuvent être stockées pour documenter les résultats durant au moins quatre mois. L'utilisation du



Figure 2 | Résultats du test QuickStix™ à la fin de l'analyse. A gauche, un échantillon sans pourriture (une seule ligne), à droite, un échantillon positif de la présence de *Botrytis cinerea* (deux lignes).

lecteur QuickStix Reader™ (EnviroLogix Inc, Portland, Maine, USA) permet d'obtenir des résultats semi-quantitatifs. Ceux-ci sont exprimés en intensité de signal (SI), une valeur relative donnée par rapport à l'intensité de coloration de la ligne de test et de la ligne de contrôle. L'interprétation de ces résultats semi-quantitatifs est basée sur le standard Dewey I-W, utilisant le jus de baies de Chardonnay pour calibrer le kit. Vingt baies moisisées et 80 baies saines sont pressées séparément. Le jus de baies infectées est ensuite dilué avec le jus issu des baies saines pour obtenir des concentrations plus faibles. Selon le degré d'infection, cinq groupes sont définis par incidence ou par poids. Un tableau contenant ces résultats est fourni avec chaque kit. Il est possible de développer ses propres standards et d'établir une corrélation entre l'incidence et l'intensité de signal (SI) en utilisant une dilution plus adéquate pour les matrices ou les cépages spéciaux. Dans notre étude, aucune optimisation n'a été faite, car le but était d'évaluer ce test tel quel pour une utilisation rapide et fiable sur le terrain par les praticiens.

Dans notre essai, les échantillons (moûts, vins, jus de raisin) ont été dilués à 1:40 avec la solution tampon (200 µl d'échantillon dans 7,8 ml de tampon). Après avoir été bien mélangée, une aliquote de solution (~500 µl) a été transférée dans le récipient de réaction et une bandelette placée dans le liquide. L'échantillon monte par capillarité dans la bandelette et réagit avec les anticorps. Une ligne bleue de contrôle doit être visible après quelques minutes pour indiquer que l'analyse est valide. Une deuxième ligne apparaît si l'échantillon a été contaminé par *B. cinerea* (fig. 2). Après dix minutes, la bandelette est placée dans le portoir du lecteur (fig. 3), qui mesure l'intensité du signal (SI).



Figure 3 | Le lecteur de QuickStix™ permet d'obtenir des résultats semi-quantitatifs.

Résultats et discussion

Etude au champ, analyses des raisins

Dans notre essai, les premiers symptômes de pourriture grise ont été observés à la mi-octobre sur le Gamay contaminé à la floraison (début juin) avec les spores de *B. cinerea*. Cet échantillon a fourni le premier résultat positif avec le kit QuickStix™, confirmant ainsi que le test ne détecte pas l'infection latente dans les raisins, mais seulement le champignon en cours de développement. La sensibilité du test est bonne, sans excès. Aux dilutions proposées par la méthode, une attaque de 1 % de pourriture observée à la vigne entraîne une faible réponse positive. Cette attaque doit dépasser 10 % pour donner lieu à une réponse marquée. Une bonne correspondance existe entre les observations visuelles et le SI (fig.4) pour tous les cépages étudiés (Gamay, Gamaret et Pinot noir).

En 2012, les conditions climatiques n'ont pas été favorables au développement de la pourriture à Changins. Pour obtenir des échantillons fortement pourris, surtout pour des cépages résistants comme le Gamaret, trois grappes infectées ont été gardées dans une boîte en plastique dans des conditions favorables au développement du champignon (100 % d'humidité à 25 °C) pendant deux semaines. Ces résultats, présentés comme essais *in vitro* dans la figure 4, suivent la tendance de l'étude au champ.

Le kit a aussi été testé sur un cépage blanc, le Chasselas, en comparant des grappes saines et fortement pourries. Cela a démontré que le cépage n'a aucune influence sur la détection de *B. cinerea* et qu'un faible impact sur sa quantification.

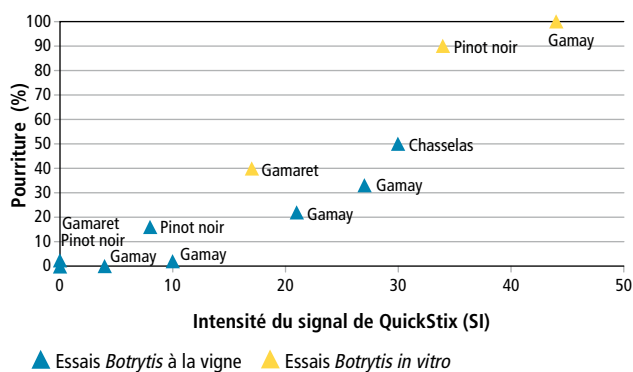


Figure 4 | Corrélation entre l'intensité du signal du test QuickStix™ et le pourcentage de baies pourries observé sur les grappes de l'étude au champ en 2012. La variante directement prise à la vigne est en bleu, la variante *in vitro*, placée dans des boîtes offrant des conditions favorables au champignon, est en jaune.

Corrélation entre les marqueurs chimiques et le test QuickStix™

La concentration des marqueurs chimiques de la pourriture grise, notamment l'acide galacturonique, l'acide mucique, le glycérol et l'acide gluconique, a été déterminée dans tous les échantillons de raisin pendant l'étude au champ et comparée avec les résultats du test QuickStix™ (fig.5). Elle a été au-dessous du seuil de détection dans les échantillons négatifs au test QuickStix™, confirmant ainsi que le test immunologique, tout comme les marqueurs chimiques, ne détecte pas l'infection latente.

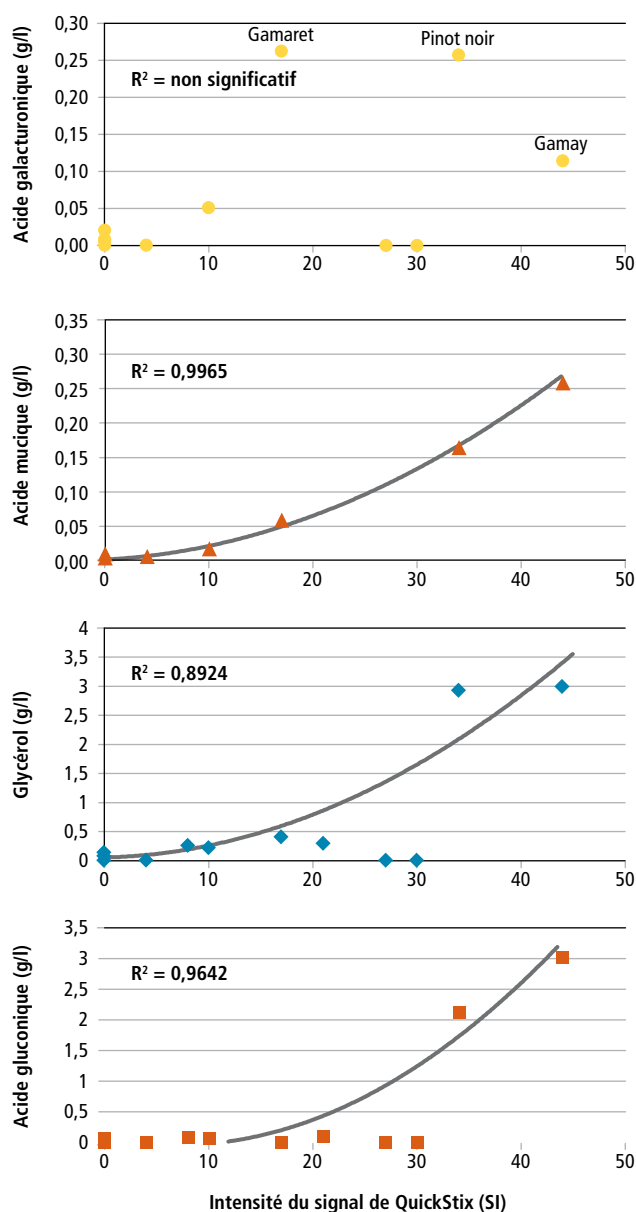


Figure 5 | Corrélation entre l'intensité du signal du test QuickStix™ et la concentration des marqueurs chimiques (acide galacturonique, acide mucique, glycérol et acide gluconique) dans les raisins de l'étude au champ en 2012.

Dans les échantillons positifs, l'analyse ANOVA montre une forte corrélation entre l'intensité du signal (SI) du test et les concentrations des marqueurs chimiques ($R^2 > 0,89$), excepté pour l'acide galacturonique (fig. 5). Les trois points possédant un SI supérieur à 15 représentent les résultats des essais *in vitro* sur grappes de Gamaret, Pinot noir et Gamay. Le Gamaret est beaucoup plus résistant que les deux autres cépages. L'infection sur la baie a un aspect différent et plus délimité. La concentration très élevée en acide galacturonique par rapport aux autres marqueurs laisse penser que l'attaque de botrytis est ralentie par le système de

défense du Gamaret. Ainsi, après hydrolyse de la pectine, le champignon n'arrive pas à oxyder l'acide galacturonique en acide mucique aussi rapidement que chez les deux autres cépages. Cette hypothèse doit néanmoins être vérifiée avec des essais plus spécifiques.

En élargissant l'étude sur les moûts de 11 cépages différents (tabl. 1), une forte corrélation ($R^2 = 0,91$) se confirme entre la concentration de l'acide mucique et le SI du test QuickStix™ (fig. 6). Le glycérol, l'acide galacturonique et l'acide gluconique lui sont également corrélés, mais dans une moindre mesure ($R^2 > 0,59$). Le test statistique ANOVA effectué sur ces résultats montre que le cépage n'a pas d'effet sur le test QuickStix™ ($p = 0,5$), ni sur les marqueurs chimiques ($p > 0,4$), excepté pour l'acide galacturonique ($p = 0,006$), comme le montraient déjà les essais *in vitro*.

Le test étudié constitue donc une alternative intéressante aussi bien pour la détection de *B. cinerea* dans les moûts que pour l'indication de l'altération de la qualité des raisins, et permet de remplacer les analyses coûteuses et laborieuses de certains marqueurs chimiques, notamment l'acide mucique. Selon nos résultats, un SI inférieur à 10 indique une altération faible, une altération moyenne entre 10 et 35 et forte au-dessus de 35.

Traçabilité du botrytis du moût au vin

Les marqueurs chimiques de la pourriture grise ne sont utilisables que dans les jus de raisin ou les moûts. Ils ne conviennent pas pour la détection dans le vin car ils pourraient résulter du processus fermentaire, à l'exemple du glycérol qui est également produit par les levures. La concentration en acide mucique, le marqueur le plus spécifique du botrytis parmi les quatre analysés, augmente également pendant la fermentation en raison de la libération de l'acide galacturonique à partir des pectines et de son oxydation.

En revanche, l'antigène est spécifique au botrytis et n'est pas dégradé au cours de la fermentation. On peut donc le retrouver dans le vin issu de vendanges altérées par la pourriture et insuffisamment débarrassées des grappes atteintes.

La présence de *B. cinerea* dans les moûts analysés dans cette étude est due au fait qu'ils sont issus de vendanges tardives ou passerillées. Dans ces conditions, le champignon peut évoluer en **pourriture noble** et contribuer à la qualité des vins, en particulier ceux de vendanges tardives. Dans ce type de vins, le test QuickStix™ peut ainsi mettre en évidence, si cela a été le cas, l'activité antérieure de *B. cinerea*. Son application pourrait permettre, par exemple, de différencier des vins doux produits par cryo-extraction de vins «botrytisés».

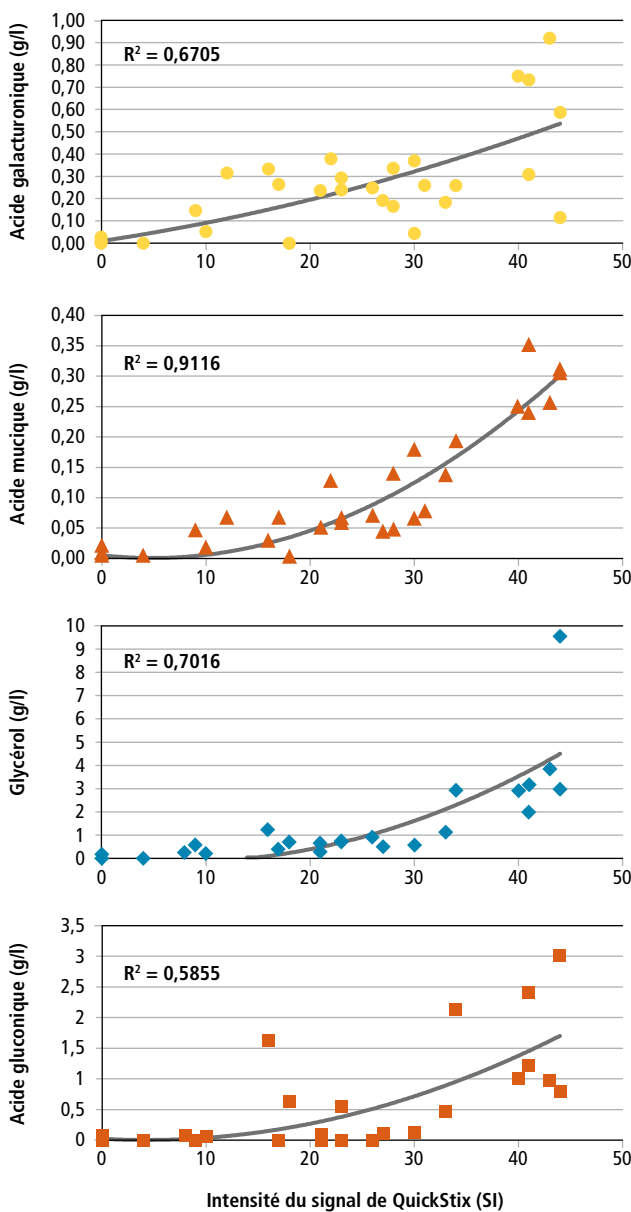


Figure 6 | Corrélation entre l'intensité du signal du test QuickStix™ et la concentration des marqueurs chimiques (acide galacturonique, acide mucique, glycérol et acide gluconique) dans les moûts en 2012.

Différents moûts positifs au test QuickStix™ ont été vinifiés par Agroscope (tabl. 3). Dans ces vins, le test détecte les antigènes du champignon et indique que le vin est «botrytisé». Les résultats semi-quantitatifs du vin montrent une bonne correspondance avec ceux des moûts. On ne peut, en revanche, établir un lien entre les résultats de ces tests et la qualité des vins. Pour y arriver, des travaux supplémentaires incluant des analyses sensorielles et chimiques sont encore nécessaires.

Tableau 3 | Intensité du signal (SI) du test QuickStix™ mesurée dans les moûts vinifiés

Cépage	Essais	SI dans le moût	SI dans le vin
Cornalin	Leytron	9	17
Humagne rouge 1	Leytron	30	26
Humagne rouge 2	Leytron	22	24
Humagne rouge 3	Leytron	30	30
Petite Arvine 1	Leytron	21	25
Petite Arvine 2	Leytron	26	29
Petite Arvine 3	Leytron	23	32
Petite Arvine 4	Leytron	31	32
Doral	Villeneuve	28	27
Merlot 1	Passerillage hors souche	12	15
Merlot 2	Passerillage hors souche	28	31
Pinot gris	Légèrement surmaturé	18	25

Remerciements

Nous remercions la société EnviroLogix Inc pour avoir mis à disposition le lecteur utilisé dans cette étude. Nous remercions également le personnel du laboratoire, notamment S. Kuyumcuyan, C. Monnard, F. Vuichard et D. Nardone pour les différentes analyses, ainsi que Ph. Duruz pour la coordination à la vigne et S. Jeannotat pour la relecture critique du manuscrit.

Bibliographie

- Dewey F. M., Ebeler S. E., Adams D. O., Noble A. C. & Meyer U. M., 2000. Quantification of *Botrytis* in grape juice determined by a monoclonal antibody-based immunoassay. *American Journal of Enology and Viticulture* **51** (3), 276–282.
- Dewey F. M., Steel C. C. & Gurr S. J., 2013. Lateral-Flow Devices to Rapidly Determine Levels of Stable Botrytis Antigens in Table and Dessert Wines. *American Journal of Enology and Viticulture* **64** (2), 291–295.
- Dienes-Nagy A., Belcher S., Gindro K. & Dubuis P.-H., 2011. Indices sanitaires et marqueurs chimiques pour évaluer l'état sanitaire du raisin. 2. Marqueurs chimiques de la pourriture grise. *Revue suisse Vitic., Arboric., Hortic.* **43** (4), 234–242.
- 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** (3), 139–142.
- Keller M., Viret O. & Cole F. M., 2003. *Botrytis cinerea* infection in grape flowers: Defense reaction, latency, and disease expression. *Phytopathology* **93** (3), 316–322.
- Meyer U. M. & Dewey F. M., 2000. Efficacy of different immunogens for raising monoclonal antibodies to *Botrytis cinerea*. *Mycological Research* **104**, 979–987.
- Versary A., Parpinello G. P., Mattioli A. U. & Galassi S., 2008. Determination of Grape Quality at Harvest using Fourier-Transform Mid-Infrared Spectroscopy and Multivariate Analysis. *American Journal of Enology and Viticulture* **59** (3), 317–322.
- Viret O., Keller M., Jaudzems V. G. & Cole F. M., 2004. *Botrytis cinerea* infection of grape flowers: Light and electron microscopical studies of infection sites. *Phytopathology* **94** (8), 850–857.

Conclusions

- Le test QuickStix™ détecte la présence de *Botrytis cinerea* dans le raisin, le moût et le vin, indépendamment du cépage. Il donne une faible réponse positive dès environ 1 % de pourriture grise observée.
- Le test ne détecte pas l'infection latente et ne devient positif qu'au moment où le champignon entre en activité.
- L'intensité du signal (SI) du QuickStix™ est corrélée avec la quantité des marqueurs chimiques de la pourriture grise dans le moût ($R^2 > 0,6$). L'acide mucique donne la meilleure corrélation ($R^2 = 0,91$).
- Le test n'est que semi-quantitatif. Cependant, dans le cas des moûts, la valeur de SI est utilisable pour la caractérisation de l'état sanitaire, car elle reflète le changement de la composition du moût lié à la pourriture grise.
- Le test détecte les antigènes du champignon également dans le vin et peut indiquer si celui-ci est «botrytisé» ou non. Les résultats semi-quantitatifs (SI) mesurés dans les vins offrent de plus une bonne correspondance avec ceux des moûts, ce qui permet une certaine traçabilité de l'infection.
- Actuellement, aucune corrélation n'est établie entre le résultat du test QuickStix™ et la qualité du vin. Des études supplémentaires sont nécessaires pour établir un lien entre la présence du champignon et les arômes caractéristiques de certains vins, notamment liquoreux. ■

Summary

Simple and fast test kit for the detection of grey mould in grapes

Through rapid immunological tests, the presence of a grey mould infection in grapes can be detected in less than 10 minutes. For a few years, such kits have been commercialized in United-States and Europa. The pertinence of these tests has been studied by Agroscope, in particular on 11 different Swiss grape varieties such as Gamaret, Gamay, Chasselas or Petite Arvine. Our results confirm that the grey mould can be detected in berries as well as in must or wine, independently of the grape variety. However, only active infection is detected, not its latency. A positive correlation was established between the results of the kit tests and the presence of chemical markers for grey mould. The tested kit appears then reliable for characterizing the sanitary conditions of a vintage.

Key words: *Botrytis cinerea*, lateral flow devices, grey mould, galacturonic acid, mucic acid.

Zusammenfassung

Nachweis von Fäulnisbefall der Trauben mit einem Schnelltest

Anhand von immunologischen Schnelltests kann die Anwesenheit des für die Graufäule verantwortlichen Pilzes in weniger als 10 Minuten festgestellt werden. Diese Schnelltests sind seit einigen Jahren in den Vereinigten Staaten und Europa auf dem Markt erhältlich. Um die Tauglichkeit eines solchen Produkts zu überprüfen hat Agroscope für Schweizer Rebsorten wie Gamaret, Gamay, Chasselas und Petite Arvine eine Studie durchgeführt. Unsere Ergebnisse bestätigen, dass der Pilz unabhängig von der Rebsorte sowohl auf der Traube und im Most als auch im Wein nachgewiesen werden kann. Hingegen kann nur ein offensichtlicher Befall erkannt werden aber nicht eine latente Infektion. Ein Zusammenhang zwischen den Testergebnissen und den nachweisbaren chemischen Markern der Graufäule konnte ebenfalls hergestellt werden. Dieser Schnelltest kann also zur Untersuchung des Gesundheitszustandes der Ernte benützt werden.

Riassunto

Un kit semplice e rapido per rilevare il marciume degli acini

Grazie ai rapidi test immunologici la presenza del fungo responsabile del marciume grigio degli acini può essere rilevata in meno di 10 minuti. Da alcuni anni, questi kit sono sul mercato negli Stati Uniti e in Europa. Agroscope ha condotto uno studio per valutare la pertinenza di questi test, in particolare su 11 vitigni svizzeri come Gamaret, Gamay, Chasselas o Petite Arvine. I nostri risultati confermano che il fungo può essere rilevato sia nell'acino, sia nel mosto o nel vino, indipendentemente dal vitigno. Solamente l'infezione conclamata può essere rilevata, ma non quella allo stato latente. Si è stabilita una correlazione tra i risultati forniti da questo test e la presenza di marcatori chimici del marciume grigio. Questo test si è rivelato dunque utilizzabile per caratterizzare lo stato sanitario di un raccolto.