Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin, 1994, **28**, N° 1, 19-31

EFFET DU POOL ENZYMATIQUE EXOCELLULAIRE DE *BOTRYTIS CINEREA* SUR LES CELLULES DE *VITIS VINIFERA*. APPLICATION A LA PELLICULE DU RAISIN

A. TOUZANI, J.P. MUNA et B. DONÈCHE

Institut d'Œnologie, Université de Bordeaux II,
351, cours de la Libération, 33405 Talence cedex (France)

Résumé : *Le développement de* Botrytis cinerea *s'accompagne de la production séquentielle de plusieurs activités enzymatiques exocellulaires. Par arrêt précoce de la culture, il est ainsi possible d'obtenir un extrait renfermant les principales activités impliquées dans la dégradation des parois cellulaires et exempt d'activité laccase. Cet extrait exerce une action létale sur les cellules de* Vitis vinifera *cultivées* in vitro. *Il provoque, sur les pellicules de raisin, une dissociation progressive du tissu pelliculaire. La digestion enzymatique des parois cellulaires isolées conduit à des protoplastes qui éclatent en libérant leur contenu cellulaire. Appliqué à une vendange rouge en microvinification, il permet une extraction plus importante des anthocyanes et une diminution de l'astringence des tanins.*

INTRODUCTION

Botrytis cinerea est un parasite nécrotrophe qui est incapable de se développer dans des tissus végétaux vivants. Il doit donc tuer les cellules au préalable en diffusant à l'extrémité des hyphes en croissance des sécrétions phytotoxiques (KAMOEN, 1989). Deux types de sécrétions sont principalement impliquées dans ce processus : des polyosides et des enzymes de dégradation des parois cellulaires (HEALE, 1985).

La mort rapide des cellules des tissus infectés facilite alors la croissance du champignon en mettant à sa disposition les métabolites produits ou stockés par les cellules. Il s'agit d'un phénomène très complexe et difficile à mettre en évidence *in situ* par observation microscopique du tissu parasité.

Dans le cas du raisin, PUCHEU-PLANTÉ et MERCIER (1983) ont constaté que le développement du champignon se fait essentiellement au niveau des lamelles moyennes des premières assises cellulaires situées sous la pellicule. Les parois cellulaires perdent leur cohésion et n'assurent plus l'intégralité de leurs fonctions, notamment pour la régulation en eau des cellules, et le raisin se déshydrate.

Pour comprendre le processus d'infection, de nombreux auteurs ont étudié les enzymes exocellulaires produites par *B. cinerea* et impliquées dans la dégradation des parois cellulaires végétales.

URBANEK et ZALEWSKA-SOBCZAK (1975), puis DRAWERT et KREFFT (1978) mettent en évidence des activités pectine estérases chez *B. cinerea* cultivé *in vitro*. Ces enzymes catalysent la déméthoxylation des pectines et autorisent l'action ultérieure des polygalacturonases, incapables d'hydrolyser un substrat méthylé. La présence de polygalacturonases dans le filtrat de culture de *B. cinerea* a été démontré dès 1947 par GAUMANN et BOHNI. VERHOEFF et LIEM (1978) indiquent la présence d'une endopolygalacturonase constitutive dans les conidies de *B. cinerea* avant et pendant leur germination. Mais ils précisent que la sécrétion est ensuite modulée par la nature et la concentration de la source de carbone du milieu de culture. GRASSIN (1987) montre que les enzymes de *B. cinerea* sont produites en quantité plus importante sur un milieu où la croissance du champignon est plus rapide.

La production de la cellulase a été signalée dès 1972 par VERHOEFF et WARREN. Sa présence dans les milieux de culture du champignon a été confirmée par DRAWERT et KREFFT (1978). Plus récemment, VERHOEFF et *al.* (1983) ont mis en évidence la présence du complexe cellulasique de *B. cinerea* dans le tissu végétal infecté. L'activité cellulolytique de *B. cinerea* semble cependant limitée *in vitro* (SHAMALA et SRECKANTIAH, 1986).

D'autres enzymes exocellulaires ont été signalées dans les milieux de culture de *B. cinerea*. C'est le cas de la cutinase (VERHOEFF et *al.*, 1979 ; RIJKENBERG et *al.*, 1980), dont la production est très variable selon les souches (SALINAS et *al.*, 1986). Il est également possible de mettre en évidence une protéase acide (MOVAHEDI et HEALE, 1990), des phospholipases (SHEPARD et PITT, 1976), des glucosidases (DUBOURDIEU, 1982), des 1,4-ß galactanases et des 1,3-ß glucanases (URBANEK et ZALEWSKA-SOBCZAK, 1986) et des glycosidases (GUNATA et *al.*, 1989).

Enfin, *B. cinerea* produit une polyphénol oxydase qui joue vraisemblablement un rôle de détoxification du milieu par oxydation des phénols de la plante, ou d'inactivation de ses phytoalexines (DUBERNET et RIBÉREAU-GAYON, 1973 ; MAYER, 1979). KOVAC (1979) montre qu'il existe de grandes différences dans la production de la laccase selon les souches et le milieu de culture. La laccase s'accumule dans le milieu de culture pendant la phase stationnaire de croissance du champignon (GRASSIN, 1987).

La majeure partie de ces enzymes exocellulaires de *B. cinerea* possèdent une stabilité remarquable vis-à-vis de la température, du pH et des conditions du milieu en général. Par exemple, elles conservent longtemps une activité notable dans un milieu riche en acides organiques et en composés phénoliques tel que le moût ou le vin.

Dans ce travail, nous avons essayé d'apporter quelques éléments de réponse sur le processus de mort des cellules du tissu infecté en faisant agir différents extraits protéiques du filtrat de culture de *B. cinerea* sur des cellules de *Vitis vinifera* cultivées *in vitro*.

Puis, nous avons testé la fraction protéique la plus active sur des pellicules de raisin et nous proposons une application possible de ce pool enzymatique en vinification.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

I — PRODUCTION ET EXTRACTION DES ENZYMES EXOCELLULAIRES DE *B. CINEREA*

La souche de *B. cinerea* C 77 4, appartenant à la collection de l'Institut d'Œnologie, a été utilisée dans toutes les expériences. Elle est conservée sur extrait de malt gélosé, incliné en tube, et repiquée à intervalles de temps réguliers.

Les cultures sont réalisées en fioles d'erlenmeyer de 1 litre contenant 250 ml de milieu de culture. Il s'agit du milieu préconisé par DRAWERT et KREFFT (1978) dont la composition est la suivante : K_2HPO_4, 1g/l ; $NaNO_3$, 3g/l ; $MgSO_4.7H_2O$, 0,5 g/l ; KCl, 0,5g/l ; $FeSO_4$, 0,01 g/l ; $CaCl_2$, 0,3 g/l ; Cellulose, 5 g/l ; pectine, 5 g/l ; lactose, 2,5 g/l ; Tween 80, 2,5 ml/l. Le pH est ajusté à 7,0 avec KOH N avant stérilisation à l'autoclave 15 minutes à 115°C.

L'ensemencement est réalisé avec une suspension contenant environ 2.000 conidies/ml; l'inoculum représentant 10 p. cent du milieu de culture. L'incubation est conduite sans agitation à 20°C avec une photopériode de 12 heures. Les cultures ont été arrêtées au bout de 3, 4, 5, 7, 10, 15 et 20 jours.

Le milieu de culture est séparé du mycélium par filtration sur laine de verre. Les protéines sont précipitées par addition de $(NH_4)_2SO_4$ à 90 p. cent de saturation et recueillies par centrifugation à 30.000 g pendant 15 minutes. Le culot protéique est dissous dans le minimum de volume de tampon phosphate 0,1 M pH : 7,0 et dessalé par filtration sur gel Sephadex G25. Les extraits protéiques sont ensuite lyophylisés.

Pour la détermination des activités enzymatiques, un aliquot de poudre est dissous dans du tampon phosphate 0,1 M de pH variable selon l'activité étudiée. L'activité pectine méthyl estérase est estimée par l'augmentation de l'acidité du milieu réactionnel, résultant de la libération des fonctions acides de la pectine, selon la méthode de BARON (1984). L'activité endo-polygalacturonase est mesurée selon la méthode SOMOGYI-NELSON (1952), par l'augmentation du pouvoir réducteur suite à l'hydrolyse de l'acide polygalacturonique.

L'activité protéase acide est évaluée selon la méthode de TANG (1970) en suivant la dégradation de l'hémoglobine par mesure de la densité optique à 280 nm. L'activité cellulase est déterminée par mesure à 595 nm de la libération d'un chromogène lié à la cellulose (HOTTEN et *al.*, 1983). L'activité laccase est mesurée par l'augmentation de la densité optique à 530 nm résultant de l'oxydation de la syringaldazine (DUBOURDIEU et *al.*, 1984).

Les teneurs en protéines des extraits sont déterminées par la méthode de SMITH et *al.* (1985).

II — PRODUCTION DES CELLULES DE *VITIS VINIFERA*

Les expériences ont été réalisées avec des cellules de *Vitis vinifera* cv Muscadelle.

Les cellules sont cultivées sur milieu liquide de Gamborg modifié, de composition suivante : KNO_3, 2,5 g/l ; $(NH_4)_2SO_4$, 134 mg/l ; $MgSO_4$, 250 mg/l ; NaH_2PO_4, 10 mg/l ; $CaCl_2$, 150 mg/l ; $MnSO_4$, 10 mg/l ; $FeSO_4$, 28 mg/l ; Na_2EDTA, 37,2 mg/l ; $CuSO_4$, 0,025 mg/l ; $ZnSO_4$, 2 mg/l ; $CoCl_2$, 0,025 mg/l ; KI, 0,75 mg/l ; Na_2MoO_4, 0,25mg/l ; H_3BO_3, 3 mg/l ; thiamine hydrochloride, 0,1 mg/l ; acide nicotinique, 0,01 mg/l ; pyridoxine hydrochloride, 0,01 mg/l ; myo-inositol, 100 mg/l ; caséine, 2,5 g/l ; polyvinylpyrrolidone, 20 g/l ; saccharose, 20 g/l ; acide ascorbique, 0,5 g/l. Le pH du milieu est ajusté à 5,8 et stérilisé par autoclavage à 120°C pendant 20 minutes. Il est supplémenté avec un antibiotique (généticine, 48 µg/l) et des hormones de croissance (2,4 D, 0,2 µg/l ; kinétine, 0,4 µg/l) sous forme de solutions stérilisées par filtration sur membrane de porosité 0,2 µm.

Les suspensions cellulaires sont entretenues dans des fioles d'erlenmeyer de 300 ml contenant 150 ml de milieu, sur agitateur rotatif (120 rpm). L'incubation est conduite à 26°C avec une photopériode de 12 heures, avec repiquage sur milieu neuf tous les 21 jours.

III — INCUBATION DES CELLULES DE VIGNE EN PRÉSENCE DES ENZYMES DE *B. CINEREA*

Les cellules de vigne sont récoltées puis lavées 3 fois à l'eau ultrapure par centrifugations successives à 6.000 g pendant 5 minutes. Le culot de cellules est remis en suspension dans une solution de sorbitol 0,2 M pH 5,0. Cette suspension est répartie en tubes, à raison de 2,5 ml par tube soit environ 250.000 cellules. Les quantités d'extraits enzymatiques lyophylisés, ajoutées à la suspension cellulaire, sont déterminées de façon à traiter les cellules avec une quantité constante de protéines fongiques (soit 0,1 mg protéines/g cellules). L'incubation est réalisée pendant 6 heures à 37°C.

A intervalles de temps réguliers, un aliquot de suspension cellulaire est prélevé et additionné d'un volume équivalent d'une solution de diacétate de fluorescéine à 0,25 mg/ml. Les cellules vivantes fluorescentes sont comptées par observation au microscope à fluorescence (filtre d'excitation : 470 nm, filtre d'émission : 520 nm). Les résultats présentés sont la moyenne statistique de 8 numérations pour chaque détermination. La teneur en sucres du milieu réactionnel a été déterminée par méthode enzymatique (BERGMEYER, 1974).

IV — EXPÉRIENCES SUR LES PELLICULES DE RAISIN

Une première série d'essais a été réalisée sur des pellicules isolées de Cabernet Sauvignon et de Merlot. Les pellicules sont détachées délicatement des baies de raisin, lavées 3 fois à l'eau ultrapure puis essuyées avec soin. Ces pellicules sont ensuite découpées en disques de 25 mm^2 à l'aide d'un emporte-pièce. Elles sont mises en suspension dans un tampon acétate 2,5 mM pH 5,0 additionné de l'extrait enzymatique le plus actif à raison de 40 mg d'extrait par g d'exocarpe, soit une proportion en protéines de 0,25 mg/g.

Une partie de cette préparation, additionnée de sorbitol 0,2 M et incubée à part, a permis de suivre la dissociation du tissu pelliculaire par observation microscopique. Le reste est placé dans un sac de dialyse, lui-même immergé dans du tampon acétate 2,5 mM pH 5,0. La conductivité de ce solvant de dialyse a été mesurée en permanence à l'aide d'électrodes de platine.

D'autres essais ont été effectués au cours de la phase de fermentation et macération de vendange rouge. 5 Kg de raisins sains, de cépage Merlot, ont été égrappés et foulés à la main. Après addition d'anhydride sulfureux (80 mg/l), la vendange a été séparée en 2 lots. Le premier lot (témoin) est mis à fermenter après addition de *Saccharomyces cerevisiae* (10^6 levures/ml). Le deuxième lot (enzymé) est, de plus, additionné d'extrait enzymatique de *B. cinerea* (0,5 g d'extrait par litre soit une teneur en protéines de 30 mg/l). Les deux lots sont incubés à 22°C. Au 6e jour, les matières solides sont éliminées et la fermentation alcoolique est poursuivie sur les deux lots en phase liquide jusqu'à son achèvement. Les vins (témoin et enzymé) sont alors filtrés et leur contenu en composés phénoliques a été déterminé selon les méthodes décrites par GLORIES (1984).

RÉSULTATS

I — CINÉTIQUE DE PRODUCTION DES PRINCIPALES ENZYMES EXOCELLULAIRES DE *B. CINEREA*

L'analyse des différents extraits protéiques, obtenus au cours du développement de *B. cinerea* sur le milieu de DRAWERT et KREFFT (1978), est reportée sur la figure 1. La majeure partie des enzymes exocellulaires étudiées est produite dès la germination des conidies mais, le plus souvent, les activités enzymatiques sont très faibles, ce qui rend difficile leur détection.

Leurs activités augmentent ensuite au cours du développement du champignon. Mais le maximum d'activité est obtenu de façon séquentielle pour les différentes enzymes. Ainsi le maximum d'activité enzymatique exocellulaire est obtenu :

- au cinquième jour pour le complexe cellulasique ;
- entre le huitième et le dixième jour pour la protéase acide et les pectine méthyl estérases ;
- vers le quinzième jour pour les endopolygalacturonases ;
- la laccase s'accumulant de façon régulière à partir du septième jour de culture.

II — EFFET DES ENZYMES DE *B. CINEREA* SUR LES CELLULES ISOLÉES DE *VITIS VINIFERA*

Les différents extraits protéiques, obtenus au cours du développement de *B. cinerea*, ont été testés sur des cellules de *Vitis vinifera* en pleine phase exponentielle de multiplication.

On constate sur la figure 2 que tous les extraits protéiques sont actifs à l'égard des cellules de vigne. Les extraits les plus actifs correspondent à un arrêt de la culture fongique après 4, 5 et 7 jours de développement.

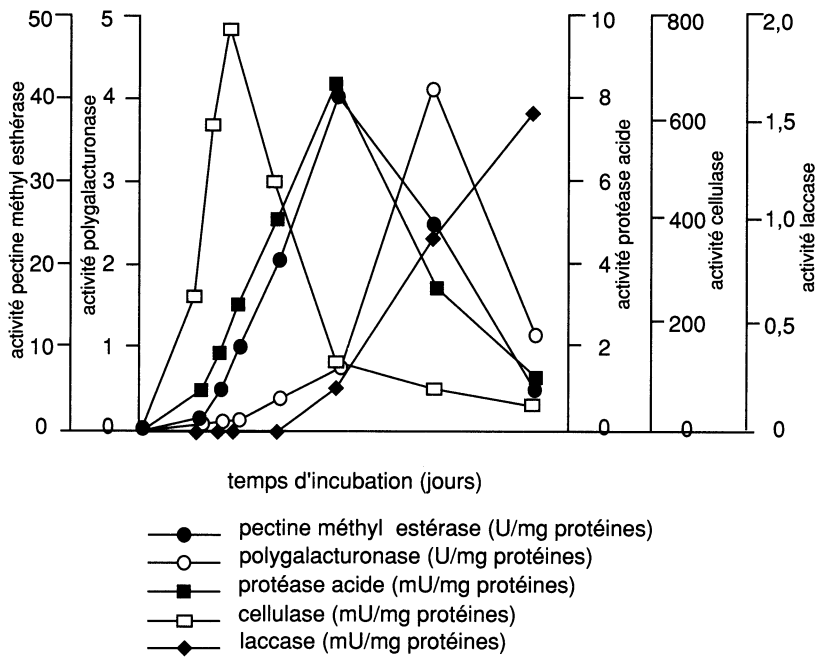


Fig. 1 — Cinétique de production des principales activités enzymatiques exocellulaires au cours du développement de *B. cinerea in vitro*

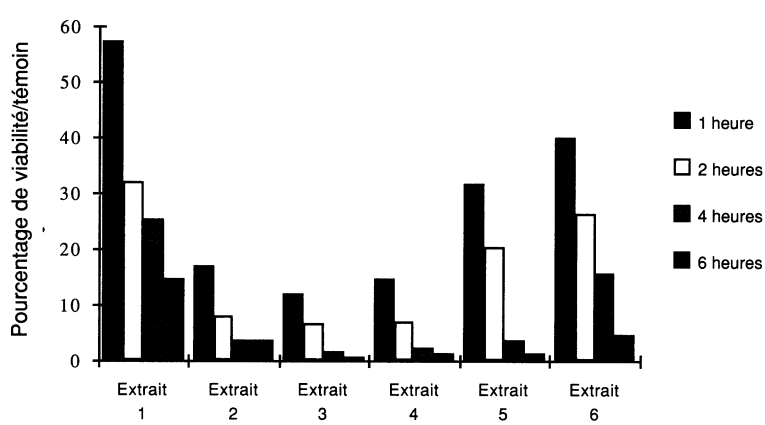


Fig. 2 — Influence des différents extraits enzymatiques exocellulaires de *B. cinerea* sur la viabilité des cellules de *Vitis vinifera*

extrait 1 = 3 jours de culture, extrait 2 = 4 jours, extrait 3 = 5 jours, extrait 4 = 7 jours, extrait 5 = 10 jours, extrait 6 = 15 jours

Dans tous les cas, de nombreuses cellules sont tuées dès la première heure d'incubation. L'observation microscopique montre que le nombre de protoplastes formés reste très faible au cours de l'incubation, malgré la présence d'un agent isotonique protecteur.

La mort des cellules est accompagnée d'une augmentation très importante de la concentration en sucres dans le milieu réactionnel (figure 3). La quantité de sucres libérés et leur nature (glucose, fructose) correspond davantage à la libération du contenu endocellulaire, par lyse des cellules, qu'à l'hydrolyse des polyosides des parois cellulaires.

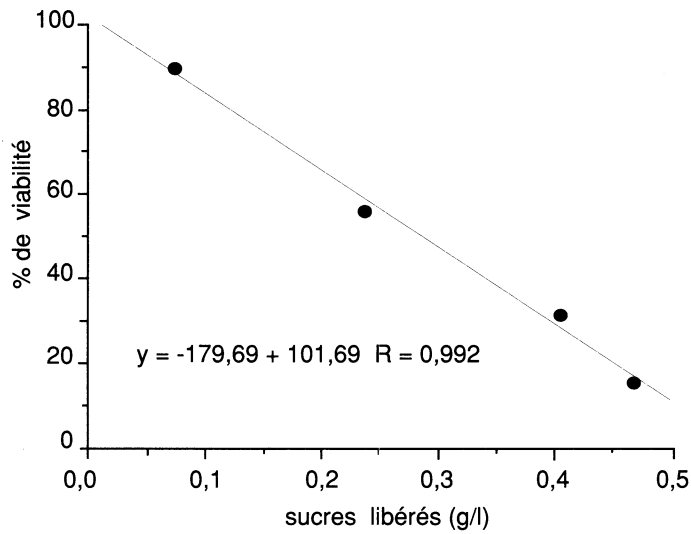


Fig. 3 — Relation entre la mort des cellules de *Vitis vinifera* et la libération des sucres endocellulaires sous l'action du pool enzymatique exocellulaire de *B. cinerea*

III — DISSOCIATION DU TISSU PELLICULAIRE PAR LES ENZYMES DE *B. CINEREA*

L'incubation de pellicules isolées de raisin, véritable tissu constitué de cellules associées par des lamelles moyennes, dans un milieu isotonique contenant l'extrait enzymatique de *B. cinerea* le plus actif se traduit par la libération dans le milieu de cellules dissociées dont un fort pourcentage conduit à des protoplastes après huit heures d'incubation (tableau I).

Cet extrait, le plus actif, correspond au filtrat de culture du champignon arrêté au cinquième jour d'incubation ; il renferme notamment les activités cellulase (4,85 U/mg de protéines), endopolygalacturonase (2,42 U/mg de protéines), pectine méthyl estérase (26,39 U/mg de protéines) et protéase acide (5,75 mU/mg de protéines).

Au cours de l'incubation, l'observation microscopique a permis de mettre en évidence la formation temporaire de sphéroplastes, structures cellulaires intermédiaires entre cellules normales et protoplastes, de forme sphérique en raison d'un début de dissociation de la paroi cellulaire.

TABLEAU I

Action du pool enzymatique exocellulaire de *B. cinerea* sur les fractions pelliculaires de raisins rouges (8 heures d'incubation)

	Cabernet Sauvignon	Merlot
Cellules libérées (10^3/ml du milieu réactionnel	69	83
Protoplastes formés (10^3/ml du milieu réactionnel	40	46

Il faut également noter que le nombre de cellules libérées est plus important dans le cas de pellicules de Merlot, dont les parois cellulaires paraissent plus sensibles à la digestion par les enzymes de *B. cinerea*.

En absence d'agent isotonique protecteur, ces protoplastes éclatent et libèrent leur contenu vacuolaire. Ceci se traduit par une augmentation de la conductivité du milieu qui atteint 25 µSiemens (équivalent à une concentration de 0,25 mM KCl) en moins de 15 heures d'incubation (figure 4).

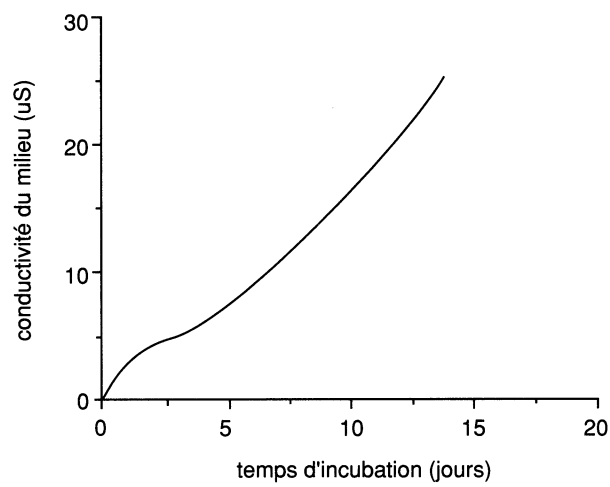


Fig. 4 — Libération d'ions par les cellules pelliculaires par action de l'extrait enzymatique de *B. cinerea* (exprimée par la différence de conductivité du milieu d'incubation par rapport au témoin non enzymé)

Parmi les substances libérées dans le milieu réactionnel, nous avons pu mettre en évidence la libération des anthocyanes pelliculaires (figure 5). L'action de l'extrait enzymatique se manifeste en début d'incubation, puis le phénomène diminue d'intensité pour s'annuler après 25 heures d'incubation, comme si l'extrait enzymatique perdait ensuite son activité en raison de l'inhibition provoquée par les produits libérés ou par dénaturation des molécules protéiques.

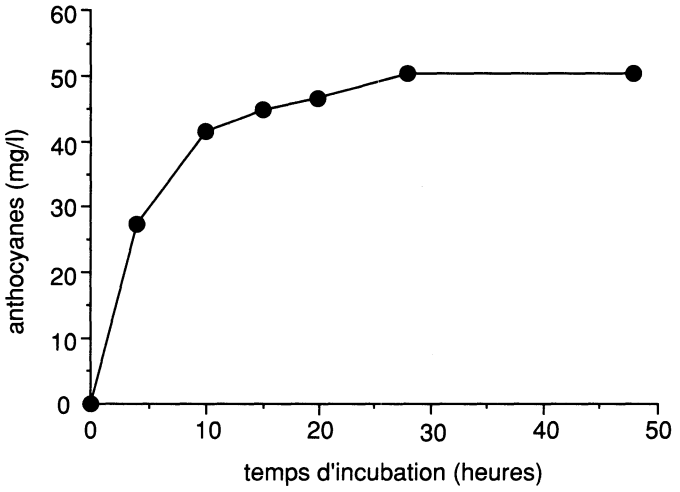


Fig. 5 — Effet du pool enzymatique de *B. cinerea* sur la libération d'anthocyanes à partir de pellicules de raisins rouges (exprimée par la différence de teneur en anthocyanes du milieu d'incubation par rapport au témoin non enzymé)

IV — EFFET DES ENZYMES DE *B. CINEREA* SUR LA LIBÉRATION DES COMPOSÉS PHÉNOLIQUES PELLICULAIRES

L'absence d'activité laccase dans l'extrait enzymatique le plus actif nous a permis d'étudier son intérêt éventuel au cours d'une microvinification réalisée dans des conditions proches de la pratique œnologique. Les résultats regroupés dans le tableau II donnent une idée exacte de l'effet du pool enzymatique de *B. cinerea* sur la libération des composés phénoliques pelliculaires pendant les premiers jours de la fermentation.

La mesure de la densité optique à 280 nm indique une extraction plus importante des composés phénoliques dans le vin enzymé. Les enzymes de *B. cinerea* facilitent surtout la libération des anthocyanes permettant d'obtenir, avec une durée de macération courte, des vins peu tanniques mais d'intensité colorante convenable.

Le vin ainsi obtenu est moins astringent (indice de gélatine plus faible), vraisemblablement par combinaison des tanins avec des résidus de constituants pariétaux. Les activités enzymatiques produites par *B. cinerea* ont également pour effet d'accélérer la clarification du vin par hydrolyse des polyosides des parois cellulaires. Le vin enzymé est donc plus limpide que le vin témoin et nous avons pu constater que sa filtrabilité est de plus meilleure.

DISCUSSION ET CONCLUSION

Le développement de *B. cinerea*, sur le milieu spécifique préconisé par DRAWERT et KREFFT (1978), conduit à la production séquentielle de diverses activités enzymatiques exocellulaires par le champignon.

TABLEAU II

Effet du pool enzymatique de *B. cinerea* sur la libération des composés phénoliques pelliculaires et sur la turbidité des vins dans le cas d'une microvinification

	Vin non enzymé	Vin enzymé
Anthocyanes (mg/l)	746	881
Tanins (g/l)	1,2	1,4
Intensité colorante	1,75	2,22
Teinte	0,44	0,39
D 280	42	51
Indice de gélatine (%)	50	34
Indice de PVPP (%)	42,8	41,8
Turbidité (NTU)	348	174

Il est difficile de relier l'ordre d'apparition de ces activités enzymatiques *in vitro* au processus de pathogénèse se produisant *in vivo*. Il correspond cependant à des évènements physiologiques se produisant au cours du développement du champignon. La protéase acide, le complexe cellulasique et les pectine méthyl estérases sont produits au cours de la phase exponentielle de croissance et disparaissent ensuite durant la phase stationnaire. La production d'endopolygalacturonase est alors maximale durant cette phase stationnaire, l'intensité de l'activité laccase traduisant uniquement l'âge de la culture. Cela nous a permis d'obtenir, par arrêt précoce de la culture, un ensemble d'enzymes d'hydrolyse des parois cellulaires végétales, dépourvu d'activité laccase, parmi lesquelles nous avons identifié les activités cellulase, polygalacturonase, pectine méthyl estérase et protéase acide.

L'effet létal exercé par cet ensemble d'enzymes sur des cellules isolées de *Vitis vinifera*, et la difficulté à obtenir des protoplastes intacts, permet de supposer que cet extrait contient également des activités enzymatiques non déterminées telles que l'activité phospholipase mise en évidence par SHEPARD et PITT (1976). L'altération des membranes internes perturbe le métabolisme vital des cellules bien avant leur lyse par dégradation des parois cellulaires. Il sera nécessaire de préciser ces mécanismes.

Inversement, l'action de cet ensemble d'enzymes est plus progressive sur le tissu pelliculaire qui est dissocié par dégradation des lamelles moyennes. Dans les conditions de la pratique œnologique, les protoplastes isolés éclatent après la lyse de la paroi cellulaire. En effet, pour éviter leur éclatement, il faudrait exercer une pression osmotique équivalente à une concentration en sucres au moins égale à 300 g/l, ce qui n'est pas le cas habituel du jus de raisin.

L'addition de l'extrait enzymatique améliore donc l'extraction des composés phénoliques pelliculaires et semble présenter un intérêt pour l'élaboration des vins souples type "primeur". Mais une expérimentation à plus grande échelle est nécessaire.

Manuscrit reçu le 25 novembre 1993 ; accepté pour publication le 28 janvier 1994

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

BARON A., 1984. *Norme française homologuée de détermination des substances pectiques. T2.* I/MGS/CSM, 1984, 0314 et 0607700.

BERGMEYER H.U., 1974. *Methods of enzymatic analysis.* Editeur Verlag Chemie Weinheim. Academic Press, New York. (2302 p).

DRAWERT F. and KREFFT M., 1978. Charakterisierung extrazellulärer proteine und enzyme aus pektinkulturfiltraten von *Botrytis cinerea. Phytochem.*, **17**, 887-890.

DUBERNET M. et RIBÉREAU-GAYON P., 1973. *Les polyphénoloxydases du raisin sain et du raisin parasité par* Botrytis cinerea. C.R. Acad. Sc. Paris, **277**, 975-978.

DUBOURDIEU D., 1982. Recherche sur les polysaccharides secrétés par *Botrytis cinerea* dans la baie de raisin. *Thèse Doctorat Etat*, Université de Bordeaux II.

DUBOURDIEU D., GRASSIN C., DERUCHE C. et RIBÉREAU-GAYON P., 1984. Mise au point d'une mesure rapide de l'activité laccase dans les moûts et les vins par la méthode à la syringaldazine. Application à l'appréciation de l'état sanitaire des vendanges. *Connaissance Vigne Vin,* **18**, n°4, 237-252.

GAUMANN E. and BOHNI E., 1947. Uber adaptative Enzyme bei parasitischen Pilzen. 1 *Helv. Chim. Acta*, **30**, 24-38.

GLORIES Y, 1984. La couleur des vins rouges. Les équilibres des anthocyanes et des tanins. *Connaissance Vigne Vin*, **18**, n°3, 195-217.

GRASSIN C., 1987. Recherches sur les enzymes extracellulaires secrétées par *Botrytis cinerea* dans les baies de raisin. Applications œnologiques et phytopathologiques. *Thèse Doctorat* d'Université, Université de Bordeaux II.

GUNATA Y.Z., BIRON C., SAPIS J.C. and BAYONOVE C., 1989. Glycosidase activities in sound and rotten grapes in relation to hydrolysis of grape monoterpenyl glycosides. *Vitis*, **28**, 191-197.

HEALE J.B., 1985. *The phytotoxicity of* Botrytis cinerea. In proceedings of EC Experts group meeting, Cavalloro ed., Balkema, Rotterdam, 277-299.

HOTTEN P.M., JONES K.L. and GRAINGER J.M., 1983. The application of a mathematical model to an appraisal of the cellulose-azur method for determining cellulase activity. *Eur. J. Appl. Microbiol.*, **18,** 344-349.

KAMOEN O., 1989. Phytopathological role of secretions from *Botrytis cinerea. Med. Fac. Landbouww Rijksuniv. Gent*, **54/2b**, 509-515.

KOVAC V., 1979. Effet des moisissures du genre *Penicillium* sur l'activité laccase du *Botrytis cinerea. Ann. Technol. Agric.*, **28**, n°3, 345-355.

MAYER A.M., 1979. Review: Polyphenol oxydases in plants. *Phytochem.*, **18**, 193-215.

MOVAHEDI S. and HEALE J.B., 1990. Purification and characterisation of aspartic proteinase secreted by *Botrytis cinerea* Pers ex Pers in culture and in infected carrots. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, **36**, 289-302.

PUCHEU-PLANTÉ B. et MERCIER M., 1983. Etude ultrastructurale de l'inter-relation hôte-parasite entre le raisin et le champignon *Botrytis cinerea* : exemple de pourriture noble en Sauternais. *Can. J. Botany*, **61**, n°6, 1785-1797.

RIJKENBERG F.H.J., De LEEUW G.T.N. and VERHOEFF K., 1980. Light and electron microscope studies on the infection of tomato fruits by *Botrytis cinerea. Can. J. Bot.*, **58**, 1394-1404.

SALINAS J., WARNAAR F. and VERHOEFF K., 1986. Production of action hydrolyzing enzymes by *Botrytis cinerea in vitro. J. phytopathology*, **116**, 299-307.

SHAMALA T.R. and SRECKANTIAH K.R., 1986. Production of cellulases and D-xylanase by some selected fungal isolates. *Enzyme Microb. Technol.*, **8**, 178-182.

SHEPARD D.V. and PITT D., 1976. Purification of a phospholipase from *Botrytis cinerea* and its effects on plant tissues. *Phytochem.*, **15**, 1465-1470.

SMITH P.K., KROHN R.I., HERMANSON G.T., MALLIA A.K., GARTNER F.H., PROVENZANO M.D., FUJIMOTO E.K., GOEKE N.M., OLSON B.J. and KLENK D.C., 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.*, **150**, 76-85.

SOMOGYI-NELSON M., 1952. Notes on sugar determination. *J. Biol. Chem.*, **195**, 19-23.

TANG J., 1970. Gastrecin and pepsin. In Methods in *Enzymology*. Colowick and Nelson eds, Academic Press, **19**, 406-407.

URBANEK H. and ZALEWSKA-SOBCZAK J., 1975. Polygalacturonases of *Botrytis cinerea* E-200. *Biochimica et biophysica acta*, **377**, 402-409.

URBANEK H. and ZALEWSKA-SOBCZAK J., 1986. 1,4-b-galactanases and 1,3-b-glucanases of Botrytis cinerea isolate infecting apple. *Biochem. Physiol. Pflanzen.*, **181**, 321-329.

VERHOEFF K. and LIEM J.I., 1978. Presence of endo-polygalacturonase in conidia of *Botrytis cinerea* before and during germination. *Phytophat. Z*, **91**, 110-115.

VERHOEFF K. and WARREN J.M., 1972. *In vitro* and *in vivo* production of cell-wall degrading enzymes by *Botrytis cinerea* from tomato. *Neth. J. Plant. Pathol.*, **78**, 179-185.

VERHOEFF K., WARNAAR F.J. and SCHIJVEN F.P.J., 1979. Infection of young tomato fruits by *Botrytis cinerea. Acta Bot. Neerl.*, **28**, 242 (Abstr.).

VERHOEFF K., LIEM J.I., SCHEFFER R.J. and SURYA I., 1983. Cellulolytic activity of *Botrytis cinerea in vitro* and *in vivo. Phytopath. Z.*, **106**, 97-103.