

G R A N D P R I X 2 0 0 1

René SIRET

ETUDE

du polymorphisme
génétique de la vigne
cultivée (*Vitis vinifera* L.)
à l'aide de marqueurs
microsatellites :
application
à la caractérisation
des cépages dans les vins.

ACADEMIE MORIM



PRÉFACE

Le Groupe Amorim, né du liège en 1870 au Portugal, a fondé les bases de son développement sur cette extraordinaire matière première, à travers la production de cet humble mais inséparable compagnon du Vin : le bouchon de liège.

Notre volonté de servir la cause du vin s'est toujours exprimée dans la recherche technologique sur la filière liège, base de notre activité.

En 1992, nous avons souhaité aller plus loin et nous engager davantage aux côtés des chercheurs en œnologie en créant l'Académie Amorim, un lieu de rencontre et d'échange entre œnologues, ingénieurs, professeurs, sommeliers, auteurs, artistes... tous animés d'une même passion du Vin. Chaque année, notre Académie encourage et soutient la recherche en œnologie par la remise d'un Prix à un chercheur ou à une équipe de chercheurs ayant fait paraître des travaux significatifs qui concourent à la défense et à la promotion de la qualité du Vin. Que soient ici saluées les personnalités, membres de cette Académie, qui contribuent si généreusement à cette mission. Je formule le vœux que cette collection, dédiée aux Lauréats du Grand Prix de l'Académie, devienne, au fil des ans, une référence et la mémoire vivante des efforts et des travaux engagés dans le monde entier pour servir la noble cause du Vin.

Americo Ferreira de AMORIM

Président du Groupe Amorim

LAURÉATS DE L'ACADÉMIE AMORIM

Grand Prix 2001 - René SIRET

"Etude du polymorphisme génétique de la vigne cultivée (Vitis vinifera L.) à l'aide de marqueurs microsatellites : application à la caractérisation des cépages dans les vins."

Coup de Cœur 2001 - Frédéric BROCHET

"La dégustation. Etude des représentations des objets chimiques dans le champ de la conscience."



Grand Prix 2000 - Takatoshi TOMINAGA

"Recherches sur l'arôme variétal des vins de Vitis vinifera L. cv. sauvignon blanc et sa genèse à partir de précurseurs inodores du raisin."

Coup de Cœur 2000 - Jean-Pierre GOT

"Le verre de vin dans la peinture hollandaise de l'Age d'Or. Les vins de Bergerac et les Provinces-Unis."



Grand Prix 1999 - Isabelle CUTZACH-BILLARD

"Etude sur l'arôme des vins doux naturels non muscatés au cours de leur élevage et de leur vieillissement. Son origine. Sa formation."

Prix Chêne-Liège 1999 - Noël HEYES

"La Perméabilité à l'oxygène de la cire de paraffine macrocristalline et sa conséquence sur les traitements de surface des bouchons en liège naturel destinés aux vins tranquilles."

Coup de Cœur 1999 - Julien PILLOT & Jean-Christian LAMBORELLE

"Le décret du 1^{er} décembre 1936 dit "code du vin" : étude critique."



Grand Prix 1998 - Virginie MOINE-LEDOUX

"Recherches sur le rôle des Mannoprotéines de levure vis à vis de la stabilité protéique et tartrique des vins."

Coup de Cœur 1998 - Marie-Laure CHAMUSSY-BOUTEILLE

"Colette : un vin d'écrivain."



Grand Prix 1997 - Valérie LAVIGNE-CRUEGE

"Recherche sur les composés soufrés formés par la levure au cours de la vinification et l'élevage des vins blancs secs."



Grand Prix 1996 - Sylvie BIAU

"Etude de la matière colorante des vins blancs de Bordeaux."

Prix Chêne-Liège 1996 - Guillem ROIG I JOSA - Héctor RIU SAVALL

Josep SANCHO I VALLS

"Traitement des résidus de l'industrie du liège par la culture des champignons".



Mention d'Honneur du Jury 1995 - P.L. TEISSEGRE - A.L. WATERHOUSE

R.L. WALZEM - J.-B. GERMAN - E.N. FRANKEL - A.J. CLIFFORD

"Composés phénoliques du raisin et du vin et santé."

Grand Prix 1995 - Samuel LUBBERS

"Etude des interactions entre les macromolécules d'origine levurienne du vin et les composés d'arôme."



Grand Prix 1994 - Ziya GÜNATA

"Etude et exploitation par voie enzymatique des précurseurs d'arôme du raisin, de nature glycosidique."



Grand Prix 1993 - Pierre-Louis TEISSEGRE

"Le plomb, du raisin au vin."



Grand Prix 1992 - Pascal CHATONNET

"Incidences du bois de chêne sur la composition chimique et les qualités organoleptiques des vins, applications technologiques."

Actualité et Innovation sont les deux mots qui viennent

spontanément pour caractériser les travaux de René Siret.

Actualité, car retrouver les cépages ayant permis l'élaboration

d'un vin présente un grand intérêt pour le producteur,

le consommateur ainsi que pour les organismes officiels de contrôle

et de protection du consommateur, tels que ceux de la DGCCRF.

Actualité encore, car dans le contexte actuel de mondialisation

des échanges et de lutte pour la conquête de parts de marchés

il devient très important pour le producteur ou le négociant de vin

de pouvoir certifier l'authenticité du ou des cépages utilisés dans ses vins.

Innovation, dans les moyens scientifiques mis en œuvre

pour rechercher et différencier les cépages dans les vins

à l'aide de l'analyse de l'ADN (Acide Désoxyribo Nucléique)

résiduel de *Vitis vinifera* contenu dans les moûts et les vins.

Innovation enfin, car les méthodes permettant d'obtenir ce genre

de résultats étaient quasi inexistantes et développer de telles techniques

apparaît important et prometteur pour l'avenir.

Bravo à notre lauréat du grand prix 2001 de l'Académie Amorim

pour la qualité de son travail et pour sa contribution

au développement de pistes nouvelles dans le domaine infini

de l'amélioration de la qualité des vins

Robert TINLOT

Président de l'Académie Amorim

ETUDE
du polymorphisme génétique
de la vigne cultivée
(*Vitis vinifera* L.)
à l'aide de marqueurs
microsatellites : application
à la caractérisation
des cépages dans les vins.

*Thèse présentée pour obtenir le grade de
Docteur de l'Université Montpellier I.*

René SIRET

I . Introduction

Ce travail de thèse a été effectué à Montpellier, au sein du Laboratoire Interrégional de la DGCCRF, en étroite collaboration avec l'Unité de Recherche de Génétique et Amélioration des Plantes (équipe Viticulture) de l'INRA à Montpellier et avec le Service de Bromatologie de la Faculté de Pharmacie à Montpellier. Ce projet financé par le Ministère de l'Économie et des Finances et par l'INRA, a pour objectif de développer une méthode permettant d'identifier et de caractériser les cépages dans les vins de cépage.

Retrouver les cépages ayant permis l'élaboration d'un vin peut présenter plusieurs intérêts, autant pour le producteur, le consommateur que pour les organismes officiels de contrôle et de protection du consommateur, tels que ceux de la DGCCRF. En effet, au niveau du producteur ou du négociant de vin, cela peut être un gage et un critère supplémentaire de qualité que de pouvoir certifier l'authenticité du ou des cépages utilisés dans ses vins. L'identité et le type de cépage employé auront une répercussion directe sur la qualité et la valeur du produit final. Cela est d'autant plus vrai pour les vins de cépage pour lesquels un seul cépage est utilisé. Certains problèmes peuvent aussi survenir lorsque la production vinicole est destinée à l'exportation et où dans certains cas, la marchandise peut être bloquée à la frontière par les autorités locales en cas de doute sur l'origine du ou des cépages annoncés sur l'étiquette, notamment quand il s'agit de vins de cépage. Or le marché des vins de Pays et plus précisément des vins de cépage connaît un essor important depuis quelques années, notamment dans la région Languedoc-Roussillon. Étant donné les enjeux économiques (les valeurs marchandes des moûts sont relativement différentes entre les cépages prestigieux et les cépages moins raffinés) et dans un souci de protection du consommateur, les services de contrôle de la DGCCRF ont par conséquent décidé de se doter d'une technique permettant l'identification variétale dans les vins de cépage. Les méthodes permettant d'obtenir ce genre de résultats sont peu nombreuses et développer de telles techniques apparaît important.

Pour parvenir à réaliser ce projet, 2 voies d'analyses impliquant des technologies totalement différentes, étaient envisagées au départ de ce travail de thèse. Les deux grands axes de recherche qui se sont présentés à nous étaient alors :

- Une voie d'analyse minérale consistant à caractériser les vins de cépage à l'aide d'une étude de leur composition en un grand nombre d'éléments minéraux.

- Une voie moléculaire basée sur l'analyse de l'ADN (Acide Désoxyribo Nucléique) résiduel de *Vitis vinifera* contenu dans les vins.

Considérant que les 2 types d'études ne pouvaient être menés parallèlement, les techniques et la façon d'appréhender le sujet étant radicalement différentes, un choix quant à la manière de poursuivre ce travail a dû être fait rapidement. Nous avons donc préféré nous orienter vers l'analyse de type moléculaire.

II. Présentation de la thèse, résultats et perspectives

II.1. GÉNÉRALITÉS

Afin de caractériser les vins de cépage, l'analyse des minéraux, basée sur l'utilisation de l'ICP/MS (Inductively Coupled Plasma/Mass Spectrometry), était prévue au début de notre étude. Bien que récent, cet outil analytique qui est présent au laboratoire de la DGCCRF à Montpellier, a permis de réaliser de nombreuses études sur les vins, notamment en recherchant le plomb (Augagneur *et al.*, 1997), mais peu de travaux ont été réalisés dans le but de trouver des marqueurs minéraux spécifiques de tel ou tel cépage. En effet, l'analyse de la composition en oligo-éléments d'un vin est très influencée par les facteurs édaphiques, géographiques et climatiques qui rendent encore plus difficile la recherche d'élément(s) minéral(aux) spécifique(s) de la présence d'un cépage particulier. Le but de cette étude minérale était donc de trouver, dans un premier temps, un oligo-élément ou une combinaison d'éléments minéraux spécifiques des différents cépages de cuve utilisés pour les vins de cépage. La difficulté aurait été de trouver des marqueurs indépendants de l'influence du facteur terroir sur la composition minérale du vin de cépage.

Une seconde voie, fondamentalement différente de la précédente car basée sur l'analyse et la détection de l'ADN résiduel des baies de raisin, encore présent dans les moûts ou les vins, était également envisagée. L'ADN est spécifique de l'organisme auquel il appartient et apparaît être le meilleur marqueur de l'identité d'un individu. Etant donné le grand nombre de cépages au sein du compartiment cultivé de l'espèce *Vitis vinifera*, plusieurs milliers selon Alleweldt et Possingham (1988), il est apparu nécessaire d'utiliser un outil qui permette un diagnostic sûr et efficace de l'identité des cépages. Le développement des technologies moléculaires (RFLP, RAPD, microsatellites) ouvre de nouvelles possibilités en matière d'identification variétale. En ce qui nous concerne, du fait de leur fort polymorphisme, de leur capacité à détecter de l'ADN en faible quantité et de leur spécificité, les marqueurs microsatellites d'après l'étude bibliographique nous ont semblé être les mieux adaptés pour répondre à nos besoins.

Après quelques tests effectués sur des vins provenant du réseau Syrah de l'INRA (Station de Pech Rouge à Gruissan), la voie minérale s'est avérée difficile et longue. L'analyse des minéraux dans les vins de cépage impliquait, pour ne pas tenir compte de l'effet terroir, de rassembler des vins réalisés à partir d'un même cépage mais élaborés sur différents terroirs pour tenter de révéler une composition minérale non pas spécifique d'un terroir mais plutôt spécifique du cépage. De plus, cette voie d'étude ne permettait de travailler que sur un petit nombre de cépages à la fois du fait de l'importance de l'échantillonnage. Considérant que les 2 types d'études ne pouvaient être menés parallèlement, la façon d'appréhender le sujet et les techniques étant radicalement différentes, le choix à propos de la manière d'aborder le sujet a rapidement été celui de la voie moléculaire. L'aspect moléculaire a donc été abordé en collaboration avec l'équipe Viticulture de l'INRA à Montpellier.

II.2. OBJECTIFS DE L'ÉTUDE

Le choix du ou des cépages est primordial pour la qualité d'un vin et pour certaines A.O.C. le cépage apparaît nominativement (vins d'Alsace, Clairette du Languedoc,...). De plus, comme nous avons pu le constater dans l'étude bibliographique de ce travail de thèse, depuis plus d'une vingtaine d'années le marché vitivinicole comprend un nouveau produit, le vin de cépage, dont l'impact sur l'économie mondiale des vins est important et croissant. Face à l'engouement des consommateurs pour ce type de produit, la question de savoir s'il était possible de confirmer la présence du cépage annoncé sur l'étiquette, dans un but de garantir la qualité du produit ou de protéger le consommateur, s'est alors posée.

L'étude bibliographique a révélé un nombre important de techniques scientifiques, ou de technologies, ayant le potentiel d'identifier les variétés de *Vitis vinifera* dans les vins (Gonzales-Larraina *et al.*, 1987 ; Martin *et al.*, 1988 ; Herrero et Médina, 1990 ; Latorre *et al.*, 1994, Day *et al.*, 1995 ; Ferreira *et al.*, 1995 ; Moio et Etiévant, 1995 ; Yunianta *et al.*, 1995 ; Augagneur *et al.*, 1997 ; Bouchilloux *et al.*, 1998). La plupart de ces méthodes donnent en général un profil (minéral ou autre) de cépage qui n'est pas uniquement spécifique de la variété mais qui peut aussi être influencé par les facteurs environnementaux ou par l'homme. Nous avons vu aussi qu'une combinaison de méthodes pouvait être possible afin d'approcher d'une manière qualitative, l'identification variétale des cépages de *Vitis vinifera* dans les vins. Au début de la mise en place de cette étude, 2 voies d'analyse étaient envisagées. Comme il a été dit dans les généralités, une décision rapide a dû être prise quant à la manière d'aborder l'identification des cépages dans les vins pour la durée du travail de thèse. Après quelques tests réalisés sur la composition minérale des vins de cépage, les recherches se sont orientées préférentiellement vers la 2^{ème} voie envisagée qui était alors de rechercher le(s) cépage(s) constitutif(s) d'un vin à partir de l'analyse et de l'identification de leur ADN résiduel dans le vin.

Pour pouvoir identifier les cépages à partir de l'analyse de leur ADN, il a fallu tout d'abord établir une empreinte génétique des différentes variétés du compartiment cultivé de *Vitis vinifera*. La réalisation de ces profils génétiques a nécessité de travailler sur des séquences d'ADN communes à tous les cultivars mais suffisamment polymorphes pour pouvoir mettre en évidence la diversité des variétés de l'espèce *Vitis vinifera*. Parmi les nombreux marqueurs moléculaires disponibles d'après la littérature, notre choix s'est par conséquent porté vers les microsatellites (Tautz et Renz, 1984 ; Morgante et Olivieri, 1993 ; Thomas et Scott, 1993 ; Cipriani *et al.*, 1994 ; Jarne et Lagoda, 1996 ; Bowers *et al.*, 1996 ; Bowers *et al.*, 1999). Afin de constituer la base de données génétiques il a aussi fallu choisir un pool de cépages représentatif des variétés cultivées en France. Pour constituer notre échantillon de travail, nous avons pu bénéficier de matériel végétal frais conservé au Domaine INRA de Vassal (Hérault, France) qui héberge la collection de référence au niveau mondial en matière de diversité variétale. La méthode et le matériel d'étude étant en place, les principaux points suivants ont été abordés au cours de notre travail :

- La réalisation d'une base de données microsatellites à partir d'ADN extrait de feuilles ou de bois provenant des principaux cépages cultivés en France et dans les proches pays du Sud et de l'Est de l'Europe. Les cépages les plus prestigieux ainsi que ceux rencontrés le plus couramment dans les vins de cépage ont alors été sélectionnés. Pour les besoins de notre étude, un échantillon de 110 cultivars, comportant 44 des principaux cépages cultivés français, a été sélectionné, regroupant aussi bien des cépages de cuve que des cépages de table. Ainsi, les résultats obtenus ont pu

être valorisés dans une application à l'identification variétale dans des conditions réelles au laboratoire de la DGCCRF sur des échantillons de raisins de table.

- La structuration de la diversité génétique du compartiment cultivé de l'espèce *Vitis vinifera* a ensuite été étudiée à partir du polymorphisme révélé par les marqueurs microsatellites. La base de données microsatellites nous a permis de rechercher l'existence d'une structuration des cépages étudiés sur la base de 2 facteurs de structuration connus que sont le type d'utilisation des cépages et leur origine géographique présumée.

- L'optimisation et l'adaptation de techniques d'extraction d'ADN dans les moûts ou les vins. A ces tests se sont ajoutés des essais d'optimisation des conditions d'amplification de la PCR par l'intermédiaire de modifications diverses au niveau des réactifs de la réaction enzymatique (*Taq* polymérase, $MgCl_2$, KCl) mais aussi par l'intermédiaire d'expérimentations réalisées sur les différentes phases de température de la PCR. Des microvinifications en monocépage et à partir de mélanges de 2 cépages différents ont été réalisées successivement pendant 2 années. Les essais d'extraction et d'identification de l'ADN résiduel de *Vitis vinifera* ont été effectués sur des modèles expérimentaux pour lesquels toutes les étapes de la vinification ont été contrôlées car il est difficile de trouver un grand nombre d'échantillons de vins commerciaux ayant été traités de manière identique. Notre étude bibliographique nous a montré par ailleurs, que les vins subissent un nombre relativement important de traitements variés ayant un effet fluctuant sur la composition du produit final. Les essais d'extraction de l'ADN dans les vins ont par conséquent été, ensuite, effectués sur divers types de vins de cépage issus du commerce, de microvinifications, de prélèvements effectués chez des producteurs et négociants par les contrôleurs de la DGCCRF, ou provenant du Domaine INRA de Pech Rouge à Gruissan dans l'Aude.

II.3. ETUDE EXPERIMENTALE

II.3.1. CHOIX DES MARQUEURS MOLÉCULAIRES

Dans le cadre de notre étude, 2 paramètres ont influencé le choix des marqueurs moléculaires. Le premier objectif a été de pouvoir identifier spécifiquement les cépages de *Vitis vinifera*. En effet, le compartiment cultivé de cette espèce comporte plusieurs milliers de cépages (Alleweldt et Possingham, 1988). Il a donc été nécessaire de choisir une technique moléculaire, très polymorphe et indépendante de la variabilité intra-variétale, permettant d'identifier spécifiquement un cultivar malgré cette importante diversité, mais donnant aussi une réponse relativement simple et facilement interprétable dans le cas où dans un même échantillon (de vin par exemple) plusieurs cépages seraient mélangés. Leur utilisation sur des ADN « difficiles » extraits à partir de vin doit aussi être prise en compte. De même, au cours de cette étude, un autre aspect auquel nous nous sommes intéressés, outre la diversité des cultivars de *Vitis vinifera*, a été les liens de parenté et l'origine probable des cépages cultivés en France et en Europe. Les marqueurs moléculaires choisis doivent donc être efficaces et permettre cette triple utilisation.

D'après notre étude bibliographique, les marqueurs microsatellites semblaient les mieux adaptés aux exigences de nos travaux. De plus, au commencement de nos recherches, quelques séquences microsatellites définies chez la vigne commençaient à être publiées ou avaient déjà été publiées dans la littérature et étaient par conséquent disponibles. Les microsatellites ont donc été la technique de base autour de laquelle sont venus se greffer l'étude de la diversité et de la structuration du compartiment cultivé chez la vigne ainsi que la recherche d'une technique d'extraction de l'ADN dans les vins efficace, justement pour obtenir un ADN en quantité suffisamment importante et bien conservé, pour pouvoir révéler ces marqueurs. En fin

d'étude, un autre type d'ADN a été exploité et des tests ont été effectués avec des marqueurs microsatellites mais qui ont cette fois été définis dans le génome chloroplastique. Les marqueurs chloroplastiques pourraient, en effet, être moins difficiles à détecter que des marqueurs nucléaires, l'ADN chloroplastique étant présent en de nombreuses copies dans une cellule.

II.3.2. ANALYSE DES MICROSATELLITES NUCLÉAIRES

Ces marqueurs résultent de l'amplification PCR d'une séquence constituée par la répétition en tandem de motifs mono-, di-, tri- ou tétranucléotidiques, les plus courants étant $(A)_n$, $(TC)_n$, $(GATA)_n$. Ces répétitions peuvent être de types différents suivant leur composition (Thomas *et al.*, 1994). Ainsi, nous pourrions trouver des microsatellites constitués de répétitions parfaites $(GA)_{22}$, imparfaites $(CAG)_5(CAC)_2(CAG)_7$ ou composées $(GTAT)_4(GT)_6$. Outre leur distribution sur l'ensemble du génome, ce qui fait l'intérêt des microsatellites, est leur polymorphisme extrêmement élevé, correspondant à une variation du nombre d'unités de répétitions d'un individu à l'autre au sein d'une même espèce (Figure 1). Comme les microsatellites sont très nombreux, la technique de la PCR va être mise à profit pour les révéler individuellement, fournissant des marqueurs spécifiques de locus, codominants et hautement polymorphes (Jarne et Lagoda, 1996). Il n'est pas rare d'observer des loci avec plus de 10 allèles et un taux d'hétérozygotie supérieur à 60% (Bowcock *et al.*, 1994). Si un microsatellite donné n'est pas spécifique d'un locus, les régions flanquantes, par contre le sont. Une paire d'amorces spécifiques de ces régions flanquantes amplifiera donc ce seul microsatellite dont le polymorphisme sera révélé en gel d'agarose ou d'acrylamide.

Le fort polymorphisme obtenu sur les marqueurs microsatellites provient de taux de mutation élevés (Edwards *et al.*, 1992 ; Bowcock *et al.*, 1994), de l'ordre de 10^{-3} à 10^{-5} , et est dû à des mécanismes de mutation particuliers, tel que le glissement (slip-page) ou les crossing-over inégaux au cours de la méiose. Des modèles d'évolution des microsatellites ont été proposés (Weber et Wong, 1993 ; Pépin *et al.*, 1995 ; Jarne et Lagoda, 1996 pour revue). Parmi ces modèles, nous pouvons citer l'*Infinite Allele Model* (IAM) dans lequel chaque nouvelle mutation crée un nouvel allèle, à la fréquence u , caractérisable par électrophorèse (Kimura et Crow, 1964) ou bien le *Stepwise Mutation Model* (SMM), modèle dans lequel les allèles ne mutent avec la même fréquence u que par la perte ou le gain d'une unité de répétition (Kimura et Ohta, 1978). Ces deux modèles représentent des situations extrêmes car, contrairement au modèle IAM, le modèle SMM prend en compte le phénomène d'homoplasie (Estoup *et al.*, 1995) qui correspond au fait que 2 allèles de même taille peuvent provenir de deux événements de mutation différents. Deux allèles sont identiques par descendance si seulement ils proviennent, sans mutations, d'un même allèle ancêtre commun. Cependant, deux allèles peuvent avoir la même taille, voire la même séquence, sans pour autant être identique par descendance. Ils peuvent en effet, provenir d'un même ancêtre mais par deux voies d'évolution différentes. Par exemple, une mutation peut ajouter une unité de répétition puis en retirer une autre sur le premier allèle alors que le 2^{ème} allèle n'a pas muté. En génétique des populations, ce phénomène lorsque l'on utilise des marqueurs microsatellites, peut provoquer une sous-estimation de la distance génétique entre deux individus le cas échéant. Un troisième modèle de mutation a été proposé sous le nom de *K-allele model* pour lequel k allèles possibles correspondent à un locus donné. Ainsi, la mutation pour un allèle donné, par rapport aux autres $k-1$ allèles, se produira avec une probabilité $u/(k-1)$. Enfin, Di Rienzo *et al.* (1994) proposèrent un 4^{ème} modèle appelé *Two-Phase Model* (TPM). Dans ce modèle, qui dérive du modèle SMM, les mutations modifient

la taille d'un allèle donné, d'une unité de répétition avec la probabilité P et de plusieurs unités avec la probabilité $1-P$. Ces marqueurs restent toutefois des marqueurs neutres de plus en plus utilisés dans les analyses de diversité et dans le cadre de l'identification variétale du fait de leur vitesse d'évolution.

La préparation des microsatellites est assez lourde car il faut cribler une banque génomique avec des sondes correspondantes à des motifs microsatellites, séquencer les clones positifs, définir des amorces dans les séquences uniques bordant le motif microsatellite, synthétiser les amorces et tester les paires d'amorces dans un échantillon d'individus. Les programmes importants de développement de marqueurs microsatellites (génome humain ou bovin) montrent que pour un microsatellite utilisable, environ cinq ont dû être séquencés. Différentes techniques de développement de marqueurs microsatellites chez les végétaux ont été décrites (par exemple Panaud *et al.*, 1995 et Edwards *et al.*, 1996).

II.3.3. CONSTITUTION DE LA BASE DE DONNÉES MICROSATELLITES

Afin de pouvoir identifier les différents cépages de cuve dans les vins, il était nécessaire de disposer d'une référence. Pour cela nous avons constitué une base de données microsatellites à partir d'ADN extrait de feuilles fraîches de vigne. En effet à partir d'un échantillon de cépages de référence, l'ADN a été extrait à partir des feuilles et des amplifications PCR ont été effectuées à l'aide de 11 paires d'amorces microsatellites nucléaires sélectionnées au cours de notre étude. Nous avons ainsi pu obtenir un profil caractéristique (ou génotype) des principaux cépages cultivés en France et en Europe, profil qui servira de référence lorsque nous voudrions identifier le (ou les) cépage(s) ayant servi à l'élaboration d'un vin.

Un premier échantillon a été effectué à partir des 44 principaux cépages de *Vitis vinifera* cultivés en France (Tableau 1, cépage n°1 à 44). Cet échantillon comporte une majorité de cépages de cuve (**C**) et quelques cépages ayant la double utilisation (**D**) table et cuve.

Un deuxième échantillon a ensuite été réalisé, complémentaire de la première sélection des principaux cépages cultivés en France, portant ainsi le nombre d'individus de référence à 110 (Tableau 1). Les 110 cultivars de notre échantillon ont également été classés suivant leur type d'utilisation en cépage de cuve (**C**), en cépage de table (**T**) ou en cépages ayant la double utilisation (**D**) table et cuve. Ce complément d'information permettra de réaliser, en augmentant l'échantillon, une analyse de la diversité et de la structuration des cultivars de l'espèce *Vitis vinifera* beaucoup plus rigoureuse et permettra d'étendre l'identification variétale à un plus grand nombre de cépages. C'est aussi un moyen de s'assurer que l'identification des principaux cépages cultivés en France ne conduira à aucune confusion possible avec d'autres cépages. En diversifiant l'échantillon à l'échelle mondiale nous assurons ainsi une certaine robustesse dans le cadre de l'analyse et de l'identification des principaux cépages cultivés.

II.3.4. APPLICATION DU POLYMORPHISME GÉNÉTIQUE DE LA VIGNE À LA CARACTÉRISATION DES CÉPAGES DANS LES VINS

Les marqueurs microsatellites nucléaires, comme nous l'avons vu précédemment, génèrent chez la vigne un polymorphisme important. Ils sont hautement spécifiques de l'espèce sur laquelle ils ont été définis, et enfin ils présentent une facilité de lecture puisque l'on a chez la vigne, qui est diploïde, en général 2 bandes par locus et par individu. Ces critères en font donc un outil de choix dans le cadre de l'identifica-

tion variétale, de l'analyse de la diversité et de la structuration des espèces. Les marqueurs microsatellites chloroplastiques d'autre part, révèlent un polymorphisme beaucoup plus faible mais au même titre que les marqueurs mitochondriaux, ces marqueurs chloroplastiques peuvent avoir un intérêt dans l'analyse de matrices difficiles ou transformées. En effet, malgré une faible diversité, ils permettent plus facilement la détection de très petites quantités d'ADN.

Afin de mieux comprendre et d'évaluer les possibilités de caractériser les cépages dans les vins à partir de l'analyse de l'ADN résiduel dans le liquide, nous avons d'abord travaillé sur des échantillons provenant de modèles expérimentaux. Consécutivement, sur les saisons 1998 et 1999, 2 séries de microvinifications ont été réalisées afin d'observer les possibilités d'extraire, avec cette technique, de l'ADN résiduel de *Vitis vinifera* dans des moûts en cours de fermentation ou dans des vins expérimentaux. Nous avons préféré travailler sur des microvinifications afin de se trouver dans des conditions d'élaboration contrôlées et de pouvoir vinifier plusieurs cépages (des blancs et des rouges) d'une manière homogène. La première année, les microvinifications ont été réalisées en monocépage tandis que la deuxième année des mélanges de 2 cépages ont été vinifiés expérimentalement au laboratoire. La première étape de cette étude a donc été de réaliser des microvinifications en monocépage afin de tester les méthodes d'extraction de l'ADN appliquées aux moûts et aux vins. Cependant, un des objectifs de ce travail de thèse étant la recherche de fraudes telles que les mélanges de cépages dans des vins annoncés monocépages, nous avons donc également travaillé à partir de microvinifications effectuées avec des moûts provenant de cépages mélangés. La dernière étape de ce travail a ensuite été d'appliquer les méthodes d'extraction et de détection de l'ADN mises au point précédemment à l'analyse et à la caractérisation des cépages de *Vitis vinifera* dans les vins finis et commercialisés.

II.3.4.A. APPLICATION SUR DES ÉCHANTILLONS ISSUS DE MICROVINIFICATIONS EN MONOCÉPAGES

Cette partie a fait l'objet d'un article (Siret *et al.*, 2000) dans lequel nous décrivons les possibilités de détection et d'identification des cépages dans des moûts en cours de fermentation à partir de l'analyse de leur ADN provenant essentiellement des baies de raisins. L'intérêt de cette étude est que les analyses et les observations ont été effectuées quotidiennement, à partir de microvinifications contrôlées, pendant la fermentation alcoolique jusqu'à l'obtention d'un vin.

Dans cette expérimentation, les conditions de vinification ont été choisies afin d'être similaires aux conditions réelles, et les principales étapes d'une vinification classique ont été suivies. Ainsi, nous avons traité les jus avec du SO₂, ensemencé avec des levures œnologiques et contrôlé la température et la densité des moûts pendant la fermentation. Six cultivars ont été vinifiés en monocépage (Clairette blanche, Chardonnay, Grenache noir, Merlot noir, Muscat blanc à petits grains et Syrah) et les microvinifications ont été menées dans des cuves en polyéthylène de 20 litres chacune.

Les 6 microvinifications en monocépage ont été conduites afin de suivre, quotidiennement pour chacun des 6 cépages, l'évolution de l'ADN dans les moûts au cours de la fermentation alcoolique. Ce suivi a été effectué pour les particules en suspension dans le prélèvement (analyse des culots) et sur la fraction hydroalcoolique débarrassée de ces particules (analyse des surnageants) durant toute la durée de la fermentation alcoolique. Cette durée a été variable pour les 6 cépages vinifiés. Au cours de cette expérimentation nous avons ainsi montré que, malgré l'ensemencement avec

des levures œnologiques, l'analyse de l'ADN de vigne était possible dans des moûts en train de fermenter. Aucune interférence avec du matériel génétique pouvant provenir des micro-organismes présents dans les échantillons prélevés au sein des cuves de microvinification n'a été constatée.

En appliquant le protocole d'extraction de l'ADN mis au point sur des échantillons provenant de microvinifications, nous avons aussi pu démontrer qu'il est possible de détecter et d'identifier de l'ADN, extrait à partir de moûts du début jusqu'à la fin de la fermentation, c'est à dire jusqu'à l'obtention de vin, à l'aide des marqueurs microsatellites nucléaires (Figure 2).

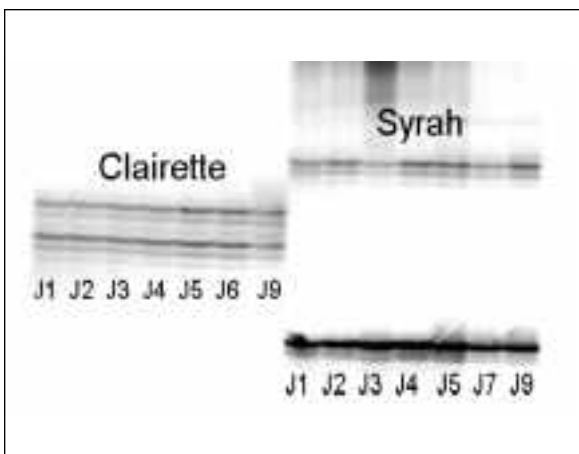


Figure 2 :
Exemple d'amplification microsatellite (locus VVMD32) sur des moûts au cours de la fermentation alcoolique (Jn = jour de prélèvement).

Cependant, nous avons pu constater une baisse notable de l'intensité d'amplification en fin de vinification pour les cépages Muscat blanc à petits grains et Grenache noir. La détection de l'ADN des 6 cépages vinifiés sur toute la durée de la fermentation n'a été possible que pour les extraits réalisés sur les fractions solides des échantillons (culots). L'amplification et la détection d'ADN des 6 cépages ont été beaucoup plus difficiles et aléatoires sur les fractions liquides (surnageants) des échantillons quotidiens avec par exemple apparition de bandes aspécifiques. Cette fraction liquide (ou hydroalcoolique) peut être assimilée après fermentation à un vin fini et traité puisque nous lui avons fait subir une centrifugation à haute accélération (10000g, 20 min, 4°C). Par conséquent, ces résultats présagent de la difficulté de détecter de l'ADN dans des vins commerciaux. Cependant, ce travail reste tout de même une des premières études (Siret *et al.*, 2000) mettant en évidence la possibilité d'extraire et d'amplifier de l'ADN de *Vitis vinifera* dans des moûts et des vins expérimentaux afin d'identifier spécifiquement les cépages à partir desquels les jus ont été obtenus.

L'analyse à l'aide de marqueurs chloroplastiques a permis de vérifier l'efficacité de ce type de marqueurs dans les mêmes conditions. La paire d'amorces microsatellites chloroplastiques utilisée dans notre étude a permis d'obtenir une amplification PCR spécifique de la vigne, quel que soit le cépage et la durée de la fermentation, sans toutefois discriminer les cépages du fait de l'absence de polymorphisme. Ces résultats témoignent d'une présence abondante, dans ces extraits, d'ADN chloroplastique (ADNcp) suffisamment bien conservé comparativement au génome nucléaire pour lequel l'amplification des loci microsatellites définis chez la vigne a donné des bandes de moindre intensité.

Les tests effectués à partir d'échantillons provenant de microvinifications monocépages ont permis de montrer que la caractérisation de vins bruts ou non purifiés est désormais possible grâce au protocole d'extraction que nous avons mis au point mais aussi grâce à l'utilisation des marqueurs microsatellites nucléaires et chloroplastiques. Aucune différence manifeste n'a été constatée entre les cépages vinifiés

en rouge et ceux vinifiés en blanc. Bien que cela ne soit pas encore des vins commerciaux nous pouvons cependant envisager une application concrète de ces résultats dans le cadre de contrôles effectués sur des échantillons de vins bruts provenant directement des cuves de vinification.

II.3.4.B. APPLICATION SUR DES ÉCHANTILLONS ISSUS DE MICROVINIFICATIONS EN MÉLANGES

Les microvinifications ont été réalisées sur des mélanges de cépages dont les jus ont été assemblés avant le départ en fermentation. Deux types de mélanges (blanc et rouge) ont été effectués entre les cépages Chardonnay et Clairette blanche d'une part et les cépages Syrah et Grenache noir d'autre part. Environ 20 à 30 kilos de raisins de chacun des 4 cépages ont été récoltés à la station INRA de Pech Rouge et ensuite éraflés. Pour chacun des 2 types de mélange Chardonnay/Clairette blanche et Syrah/Grenache noir, les cépages ont été mélangés respectivement en suivant les proportions 90/10, 70/30 et 50/50 (v/v). Pour chacun des 2 types de mélange, les cépages Chardonnay ou Syrah sont présents à hauteur de 90, 70 ou 50% alors que les cépages Clairette blanche ou Grenache noir sont présents à hauteur de 10, 30 ou 50 %. Les vinifications ont été réalisées sur des volumes de moûts oscillant entre 5 et 10 litres. Le mélange Chardonnay/Clairette blanche a été vinifié en blanc (sans macération des particules de la vendange) et le mélange Syrah/Grenache noir a été vinifié en rouge (avec macération des particules de la vendange). Les conditions de vinification sont les mêmes que celles présentées dans notre article (Siret *et al.*, 2000), c'est à dire ensemencement avec des levures œnologiques, addition de SO₂ et suivi quotidien de la densité et de la température des moûts dans chaque cuve. Les microvinifications ont été effectuées à température constante de 22°C jusqu'à l'obtention de vin.

Récemment, une étude a permis, à partir de marqueurs microsatellites, d'identifier dans un jus jusqu'à 4 cépages mélangés proportionnellement (Faria *et al.*, 2000). Ces travaux ont été effectués sur des moûts frais sans aucun départ de fermentation ni ensemencement avec des levures. Ces résultats corroborent ceux obtenus au cours de notre étude. Nous avons pu mettre en évidence la présence d'ADN de *Vitis vinifera* dans des moûts frais ou en cours de fermentation après avoir pressé des baies débarrassées de leurs rafles. Nous avons aussi pu donner une première estimation de la capacité des marqueurs microsatellites à caractériser un mélange de cépages dans un vin expérimental. A partir d'un moût brut, nous avons vu que la caractérisation des cépages mélangés est possible jusqu'à la fin de la fermentation pour un mélange 70/30 (v/v) dans nos conditions et donc jusqu'à l'obtention d'un vin. Il a cependant été difficile de détecter le mélange de 2 cépages en fin de fermentation à partir des extraits d'ADN réalisés sur les phases hydroalcooliques (surnageants) des échantillons prélevés. Les résultats obtenus pour ces surnageants, proches des vins commerciaux, surtout en fin de fermentation, préfigurent des difficultés d'utiliser les marqueurs microsatellites nucléaires pour caractériser les cépages à l'échelle des produits commerciaux. Il semblerait que malgré un polymorphisme élevé, les marqueurs microsatellites nucléaires testés ne soient pas suffisamment sensibles pour amplifier de l'ADN en faible quantité. Une analyse à l'aide des marqueurs chloroplastiques serait donc nécessaire afin de vérifier l'efficacité de ces marqueurs dans les mêmes conditions. Il n'en demeure pas moins qu'à l'issue de l'analyse d'un mélange de 2 cépages dans les proportions 70/30, il a été possible de détecter les 30 % de moût provenant du cépage « contaminant » jusqu'à la fin de la fermentation alcoolique. Dans le cadre de la détection d'un mélange de cépages ou d'une fraude dans un vin de cépage, il pourrait être envisagé par conséquent d'effectuer un prélèvement dans les cuves de vinification avant la mise en bouteille directement chez le producteur

ou le négociant. Le vin étant à l'état brut dans ce cas, notre technique permettrait de caractériser les cépages à l'aide des marqueurs microsatellites.

II.3.4.C. APPLICATION SUR DES ÉCHANTILLONS ISSUS DE VINS FINIS OU COMMERCIAUX

Plusieurs échantillons de vins ont été employés dans le but de valider les méthodes mises au point. Nous avons choisi des vins de cépage uniquement afin de faciliter l'éventuelle interprétation de résultats positifs, le problème des mélanges ayant été abordé en travaillant sur des microvinifications. Tous les cépages analysés correspondent à ceux intégrés dans notre base de données microsatellites. Le problème du millésime a été évité en travaillant avec des vins qui étaient du dernier millésime au moment où les tests d'extraction et de caractérisation des cépages ont été effectués. En effet, craignant un effet du temps et du milieu sur la conservation de l'ADN de vigne dans le vin, nous n'avons pas utilisé de millésimes anciens ou de vins ayant plus de 2 ans. Cet aspect important de la conservation du vin et de son effet sur l'état de l'ADN provenant du raisin restera encore un point important auquel une réponse devra être apportée. Une série d'extraction a été effectuée sur des vins du cépage Syrah provenant du réseau Syrah de l'INRA (origine Fronton, millésime 97), sur les vins embouteillés provenant des 6 microvinifications en monocépage (Clairette blanche, Chardonnay, Grenache noir, Merlot, Muscat blanc à petits grains et Syrah) et les dernières expérimentations ont été effectuées sur un vin rouge et un vin blanc provenant du commerce (cépage Merlot, Vin de Pays d'Oc, 1999, Sélection Carrefour et cépage Chardonnay, Vin de Pays d'Oc, 1999, Fortant de France) afin de comparer l'efficacité et le rendement des 2 protocoles d'extraction de l'ADN, à base de CTAB et à base d'hydroxyapatite, mis au point au cours de notre étude. Les tests d'extraction ayant été effectués sur de nombreux vins, nous avons choisi ces échantillons afin d'illustrer et de résumer les possibilités de caractériser les cépages dans les vins finis ou commerciaux en employant les marqueurs microsatellites.

Les différents volumes de vin que nous avons testé avec ces protocoles ont varié de quelques millilitres à plusieurs centaines de millilitres. Généralement, les volumes inférieurs à 100 mL de vin n'ont jamais donné de réponse positive avec les microsatellites nucléaires. Des volumes plus importants de vin ont alors été systématiquement analysés impliquant, pour pouvoir adapter les prises d'essai à ce protocole, d'effectuer une réduction de volume. Cette réduction du volume peut s'effectuer de plusieurs manières. Il existe dans le commerce des systèmes de concentration utilisant des membranes filtrantes ayant des seuils de coupure variables (exemple : système Microcon ou Centricon, Amicon, Millipore, Bedford, USA). Ces systèmes peuvent être intéressants pour les faibles volumes de liquide mais ils sont onéreux et à terme les membranes sont susceptibles de colmater lors de la concentration de gros volumes de vins. L'utilisation d'un lyophilisateur ou d'un évaporateur rotatif est aussi possible. Dans le cadre de nos travaux, nous avons utilisé préférentiellement un évaporateur rotatif, ce genre d'appareillage permettant de traiter simplement et rapidement tous types de volumes de vin, jusqu'à 1 litre dans notre étude.

Au cours de nos travaux, l'ensemble des analyses effectuées a bien confirmé le caractère aléatoire de la caractérisation des cépages dans des vins finis ou commerciaux à l'aide des marqueurs microsatellites nucléaires puisque des amplifications ont été obtenues pour les vins commerciaux avec certaines paires d'amorces microsatellites nucléaires et pas d'autres. Il semblerait donc, que la limite majeure soit la faible quantité, ou un état de dégradation élevé, de l'ADN encore présent dans le vin, plutôt que la présence de contaminant.

Au cours de cette étude nous avons également effectué des tests en utilisant des marqueurs microsatellites chloroplastiques. Les amplifications à l'aide du marqueur chloroplastique n'ont pas posé de problèmes contrairement à l'utilisation des marqueurs microsatellites nucléaires. Dans la mesure où les microsatellites nucléaires sont très polymorphes, il apparaît cependant important de continuer à les exploiter afin de caractériser les cépages dans les vins malgré les phénomènes d'*allelic dropout* (Taberlet *et al.*, 1999), ou d'amplification de produits non spécifiques que nous avons pu constater.

II.4. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Au moment où a débuté cette étude, aucune référence bibliographique ne faisait état de résultats sur la caractérisation des cépages dans les vins à l'aide de marqueurs moléculaires. Nos travaux sont par conséquent les premiers du genre.

Nous avons travaillé dans un premier temps sur des vinifications expérimentales qui ont permis de montrer la présence d'ADN de vigne dans les vins à l'issue de la fermentation alcoolique. Nous avons ainsi démontré la faisabilité des techniques d'extraction et de détection mises au point, tout en identifiant des facteurs limitants que sont la faible quantité de l'ADN dans les vins et sa dégradation partielle. De même, des tests ont été effectués sur de l'ADN extrait à partir de feuilles, afin de vérifier la possibilité de détecter des mélanges. Les marqueurs de type microsatellite ont ainsi permis de caractériser ces mélanges et de définir la limite de détection des allèles d'un cépage dilués dans l'ADN d'un autre. La possibilité de détecter des mélanges de moûts et de vins, de cépages différents, a également été vérifiée à partir d'échantillons provenant de microvinifications.

Les analyses ont ensuite été étendues à des vins commerciaux. Ces dernières, complexes et lourdes techniquement, ont révélé des problèmes de reproductibilité des résultats. S'il est possible d'identifier les cépages dans un moût ou un vin brut, il apparaît difficile à l'heure actuelle, d'appliquer dans le cadre d'une analyse en routine, la technique d'identification des cépages par amplification PCR de marqueurs microsatellites nucléaires sur de très nombreux échantillons de vins commerciaux.

Plusieurs perspectives peuvent donc être envisagées pour améliorer la reproductibilité des résultats :

1) AUGMENTER LE VOLUME DES PRISES D'ESSAI

Nous avons travaillé sur des volumes de vins inférieurs à un litre car techniquement il était difficile de traiter de plus gros volumes. En effet, il faut d'une part réduire le volume de vin et ensuite il faut éliminer les composés indésirables contenus dans le vin car l'analyse à l'aide des marqueurs microsatellites est basée sur l'utilisation de la PCR qui est très sensible aux inhibiteurs tels que les polyphénols. Mais augmenter le volume de la prise d'essai pourrait être une solution afin d'augmenter la quantité d'ADN matrice dans le vin. Si telle était la solution, une modification et une adaptation des techniques d'extraction mises au point seraient alors nécessaires.

2) DÉVELOPPER DES MARQUEURS MOLÉCULAIRES ADAPTÉS AUX FAIBLES QUANTITÉS D'ADN

Les protocoles d'extraction de l'ADN à partir de vins commerciaux qui ont été optimisés au cours de ce travail de thèse sont apparus très efficaces pour extraire de l'ADN chloroplastique de ces vins. Les premières analyses effectuées à partir des marqueurs de type chloroplastiques basés sur la PCR ont montré qu'ils permettaient, dans toutes les conditions testées, d'être détectés de façon reproductible dans les vins expérimen-

taux et commerciaux. De nombreuses publications témoignent de l'intérêt des marqueurs chloroplastiques et mitochondriaux dans le cadre d'analyses de phylogénies moléculaires d'espèces végétales (Gielly et Taberlet, 1994; Dietrich *et al.*, 1997). Malgré une faible diversité chez la vigne, les marqueurs chloroplastiques semblent, en effet, représenter l'avenir dans ce type d'analyse. De plus, le génome chloroplastique se trouve à l'état de multicopie dans les cellules végétales (Leaver et Gray, 1982 ; Lewin, 1987) et, comme l'ADN mitochondrial, il se présente sous forme circulaire ce qui lui confère une certaine stabilité. Ainsi, il nous semble que des travaux supplémentaires pourraient être effectués afin d'approfondir cette voie, notamment dans la recherche de polymorphisme révélé, chez la vigne, par ces marqueurs.

Nous pourrions par exemple confirmer l'intérêt des marqueurs cytoplasmiques et chloroplastiques pour analyser les cépages dans les vins, en utilisant le polymorphisme déjà disponible (par exemple révélé par PCR-RFLP ou par les marqueurs microsatellites). Nous pourrions également étendre les possibilités de leur utilisation par le développement de nouveaux marqueurs, en redéfinissant des amorces spécifiques au niveau des mutations, dans le cas où un polymorphisme de séquence serait détecté entre les différents cépages de l'échantillon testé.

3) ETUDIER, DANS LES VINS, LA CONSERVATION DE L'ADN DANS LE TEMPS

Dans notre étude nous n'avons pas pu étudier la conservation de l'ADN dans des vins de plus de 2 ans et cet aspect reste encore un point important auquel il serait intéressant d'apporter une réponse. D'après les premiers résultats obtenus à l'aide des marqueurs microsatellites chloroplastiques, un premier élément de réponse pourrait être donné à partir de l'analyse de vins issus de millésimes différents et élaborés dans les mêmes conditions.

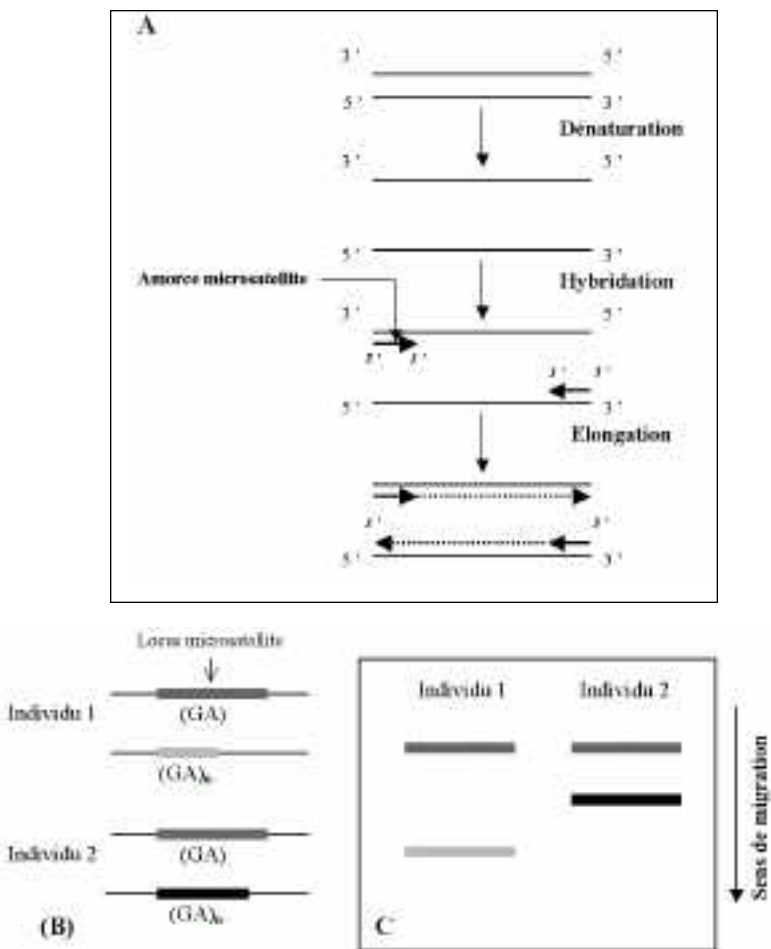


Figure 1 : Principe de la PCR (A), origine du polymorphisme révélé par les microsatellites (B) et description du gel d'électrophorèse après coloration (C).

Tableau 1: Liste alphabétique des cépages constituant la base de données microsateellites.

N° : n° d'ordre (n° 1 à 44 : principaux cépages cultivés en France),

Type : type d'utilisation, cuve (C), table (T) ou double utilisation cuve et table (D),

Origine : origine géographique supposée,

Nom : nom vernaculaire du cépage.

N°	Type	Origine	Nom
1	C	obt	Alicante H. Bouschet
2	C	bou	Aligoté
3	C	lpi	Aramon
4	C	lpi	Aubun
5	C	bou	Auxerrois
6	C	atl	Cabernet franc
7	C	atl	Cabernet-Sauvignon
8	C	ibe	Carignan
9	C	bou	Chardonnay
10	C	atl	Chenin
11	D	lpi	Cinsaut
12	C	lpi	Clairette
13	C	atl	Colombard
14	C	atl	Cot
15	C	bou	Gamay
16	C	cen	Gewurztraminer
17	C	ibe	Grenache noir
18	C	atl	Grolleau
19	C	atl	Gros Manseng
20	C	atl	Jurançon noir
21	C	ibe	Macabeu
22	C	rho	Marsanne
23	C	atl	Mauzac
24	C	bou	Melon
25	C	atl	Merlot
26	C	bou	Meunier
27	C	ibe	Mourvèdre
28	C	atl	Muscadelle
29	C	bal	Muscat à petits grains
30	D	bal	Muscat d'Alexandrie
31	C	bou	Pinot noir
32	C	cen	Riesling
33	C	rho	Roussanne
34	C	lpi	Sangiovese
35	C	atl	Sauvignon
36	C	atl	Sémillon
37	C	cen	Sylvaner
38	C	rho	Syrah
39	C	atl	Tannat
40	C	ibe	Tempranillo
41	C	lpi	Terret gris
42	C	lpi	Ugni blanc
43	D	lpi	Vermentino
44	C	rho	Viognier
45	T	ibe	Aledo
46	T	bal	Alphonse Lavallée
47	C	rho	Altesse
48	C	ibe	Alva
49	C	bou	Argant
50	C	cen	Arvine
51	C	bou	Beclan
52	T	lpi	Bicane
53	C	ibe	Bobal
54	C	rho	Bonne Vituaigne
55	C	bal	Braghina

N°	Type	Origine	Nom
56	C	bal	Cabasma alba
57	T	obt	Cardinal
58	T	obt	Carla
59	D	bou	Chasselas
60	C	rho	Chatus
61	C	bal	Crimposie
62	C	ibe	Crujillon
63	C	bal	Crvena slaubadic
64	T	obt	Danlas
65	T	obt	Danuta
66	C	bal	Dolosata
67	C	bou	Enfariné
68	C	ibe	Fernao Pires
69	D	cen	Frankenthal
70	C	cen	Furmint
71	C	bou	Gueuche blanc
72	C	ibe	Gorgollosa
73	C	bou	Gouget noir
74	C	cen	Harselevelu
75	T	obt	Italia
76	C	ibe	Jaen
77	C	cen	Kadarka torök
78	C	bal	Koritsanos rouge
79	C	bal	Kouroupitsa
80	C	cen	Kövidinka
81	T	obt	Lival
82	T	obt	Madeleine Celine
83	T	obt	Madina
84	T	obt	Matilde
85	T	obt	Michele Palieri
86	C	ibe	Monvedro
87	C	ibe	Morrastel
88	C	ibe	Mourisco tinto
89	T	bal	Muscat de Hambourg
90	T	ibe	Ohanes
91	T	bal	Olivette noire
92	T	obt	Ora
93	C	bal	Pamid
94	C	ibe	Parellada
95	T	obt	Perle de Csaba
96	T	obt	Perlette
97	C	bal	Plavai
98	C	bal	Posip
99	C	cen	Pozsonyi feher
100	T	obt	Prima
101	T	obt	Red Globe
102	T	obt	Ribol
103	C	bal	Romaico
104	T	bal	Santa Paula
105	C	rho	Serênêze de Moirans
106	D	lpi	Servant
107	T	obt	Sugra 5
108	C	ibe	Tinta Pinheira
109	C	ibe	Tinto Cao
110	C	ibe	Turrntes

Bibliographie

- ALLEWELDT, G.; POSSINGHAM, J.V. Progress in grapevine breeding. *Theor. Appl. Genet.* **1988**, *75*, 669-673.
- AUGAGNEUR, S.; MÉDINA, B.; GROUSSET, F. Measurement of lead isotope ratios in wine by ICP-MS and its application to the determination of lead concentration by isotope dilution. *Fresenius J. Anal. Chem.* **1997**, *357*, 1149-1152.
- BOUCHILLOUX, P.; DARIET, P.; HENRY, R.; LAVIGNE-CRUEGE, V.; DUBOURDIEU, D. Identification of volatile and powerful odorous thiols in Bordeaux red wine varieties. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 3095-3099.
- BOWCOCK, A.M.; RUIZ LINARES, A.; TOMFOHRDE, J.; MINCH, E.; KIDD, J.R.; CAVALLI-SFORZA, L.L. High resolution of human evolutionary trees with polymorphic microsatellites. *Nature* **1994**, *368*, 455-457.
- BOWERS, J.E.; DANGL, G.S.; MEREDITH, C.P. Development and characterization of additional microsatellite DNA markers for grape. *Am. J. Enol. Vitic.* **1999**, *50*, 243-246.
- BOWERS, J.E.; DANGL, G.S.; VIGNANI, R.; MEREDITH, C.P. Isolation and characterization of new polymorphic simple sequence repeat loci in grape (*Vitis vinifera* L.). *Genome* **1996**, *39*, 628-633.
- CIPRIANI, G.; FRAZZA, G.; PTERLUNGER, E.; TESTOLIN, R. Grapevine fingerprinting using microsatellite repeats. *Vitis* **1994**, *33*, 211-215.
- DAY, M.P.; ZHANG, B.; MARTIN, G.J. Determination of the geographical origin of wine using joint analysis of elemental and isotopic composition. II-Differentiation of the principal production zones in France for the 1990 vintage. *J. Sci. Food Agric.* **1995**, *67*, 113-123.
- DIETRICH, C.H.; WHITCOMB, R.F.; BLACK, W.C. Phylogeny of the grassland leafhopper Genus *Flexamia* based on mitochondrial DNA sequences. *Mol. Phyl. Evol.* **1997**, *8*, 139-149.
- DIRIENZO, A.; PETERSON, A.C.; GARZA, J.C.; VALDES, A.M.; SLATKIN, M.; FREIMER, N.B. Mutational processes of simple-sequence repeat loci in human populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 3166-3170.
- EDWARDS, A.; HAMMOND, H.A.; JIN, L.; CASKEY, C.T.; CHAKRABORTY, R. Genetic variation at five trimeric and tetrameric tandem repeat loci in four human population groups. *Genomics* **1992**, *12*, 241-253.
- EDWARDS, K.J.; BARKER, J.H.A.; DALY, A.; JONES, C.; KARP, A. Microsatellite libraries enriched for several microsatellite sequences in plants. *BioTechniques* **1996**, *20*, 758-760.
- ESTOUP, A.; TAILLIEZ, C.; CORNUET, J.M.; SOLIGNAC, M. Size homoplasmy and mutational processes of interrupted microsatellites in two bee species, *Apis mellifera* and *Bombus terrestris* (Apidae). *Mol. Biol. Evol.* **1995**, *12*, 1074-1084.
- FARIA, M.A.; MAGALHÃES, R.; FERREIRA, M.A.; MEREDITH, C.P.; FERREIRA MONTEIRO, F. *Vitis vinifera* must varietal authentication using microsatellite DNA analysis (SSR). *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 1096-1100.
- FERREIRA, V.; FERNANDEZ, P.; GRACIA, J.P.; CACHO, J.F. Identification of volatile constituents in wines from *Vitis vinifera* var *Vidadillo* and sensory contribution of the different wine flavour fractions. *J. Sci. Food Agric.* **1995**, *69*, 299-310.
- GIELLY, L.; TABERLET, P. The use of chloroplast DNA to resolve plant phylogenies: noncoding versus rbcL sequences. *Mol. Biol. Evol.* **1994**, *11*, 769-777.
- GONZALES-LARRAINA, M.; GONZALES, A.; MÉDINA, B. Les ions métalliques dans la différenciation des vins rouges des trois régions d'appellation d'origine Rioja. *Connaiss. Vigne Vin* **1987**, *21*, 127-140.
- HERRERO, C.; MÉDINA, B. Use of some mineral elements in differentiation of Galicia wines. *Connaiss. Vigne Vin* **1990**, *24*, 147-156.
- JARNE, P.; LAGODA, P.J.L. Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends Ecol. Evol.* **1996**, *11*, 424-429.
- KIMURA, M.; CROW, J.F. The number of alleles that can be maintained in a finite population. *Genetics* **1964**, *49*, 725-738.
- Kimura, M.; Ohta, T. Stepwise mutation model and distribution of allelic frequencies in a finite population. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1978**, *75*, 2868-2872.
- LATORRE, M.J.; GARCIA-JARES, C.; MÉDINA, B.; HERRERO, C. Pattern recognition analysis applied to classification of wines from Galicia (Northwestern Spain) with certified brand of origine. *J. Agric. Food Chem.* **1994**, *42*, 1451-1455.
- LEAVER, C.J.; GRAY, M.W. Mitochondrial genome organization and expression in higher plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **1982**, *33*, 373-402.
- LEWIN, B. GENES III. ED. JOHN WILEY AND SONS: New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore, **1987**, 761 p.
- MARTIN, G.J.; GUILLOU, C.; MARTIN, M.L.; CABANIS, M.T.; TEP, Y.; AERNY, J. Natural factors of isotope fractionation and the characterization of wines. *J. Agric. Food Chem.* **1988**, *36*, 316-322.
- MOIO, L.; ETIÉVANT P.X. Ethyl anthranilate, ethyl cinnamate, 2,3-dihydrocinnamate, and methyl anthranilate: four important odorants identified in Pinot noir wines of Burgundy. *Am. J. Enol. Vitic.* **1995**, *46*, 392-398.
- MORGANTE, M.; OLIVIERI, A.M. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. *Plant J.* **1993**, *3*, 175-182.
- PANAUD, O.; CHEN, X.; MC COUCH, S.R. Frequency of microsatellite sequences in rice (*Oryza sativa* L.). *Genome* **1995**, *38*, 1170-1176.
- PÉPIN, L.; AMIGUES, Y.; LÉPINGLE, A.; BERTHIER, J.L.; BENSALID, A.; VAILMAN, D. Sequence conservation of microsatellites between *Bos taurus* (cattle), *Capra hircus* (goat) and related species. Examples of use in parentage testing and phylogeny analysis. *Heredity* **1995**, *74*, 53-61.
- SIRET, R.; BOURSICQUOT, J.M.; MERLE, M.H.; CABANIS, J.C.; This, P. Toward the authentication of varietal wines by the analysis of grape (*Vitis vinifera* L.) residual DNA in must and wine using microsatellite markers. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 5035-5040.
- TABERLET, P.; WAITS, L.P.; LUIKART, G. Noninvasive genetic sampling look before you leap. *Trends Ecol. Evol.* **1999**, *14*, 323-327.
- TAUTZ, D.; RENZ, M. Simple sequences are ubiquitous components of eukariotic genomes. *Nucleic Acids Res.* **1984**, *12*, 4127-4138.
- THOMAS, M.R.; CAIN, P.; SCOTT, N.S. DNA typing of grapevines: a universal methodology and database for describing cultivars and evaluating genetic relatedness. *Plant Mol. Biol.* **1994**, *25*, 939-949.
- THOMAS, M.R.; SCOTT, N.S. Microsatellite repeats in grapevine reveal DNA polymorphisms when analysed as sequence-tagged sites (STSs). *Theor. Appl. Genet.* **1993**, *86*, 985-990.
- WEBER, J.L.; WONG, C. Mutation of human short tandem repeats. *Mol. Genet.* **1993**, *2*, 1123-1128.
- YUNIANTA; ZHANG, B.L.; MARTIN, G.J.; ASSELIN, C.; SCHAEFFER, M. Essai de caractérisation du cépage des vins par analyse isotopique des éléments légers. *J. Int. Sci. Vigne Vin* **1995**, *29*, 89-98.



ACADEMIE MORIM

11, Villa Wagram Saint-Honoré - 75008 Paris - France
Tel : 01 58 05 10 70 - Fax : 01 58 05 10 71 - Email : contact@academie-amorim.com

L'Académie AMORIM est sur INTERNET
www.academie-amorim.com

GRENWICH