

## **DIFFERENCIATION DE PARCELLES DE CHENIN DU VAL DE LOIRE, A L'AIDE DE L'ETUDE DES FLORES FONGIQUES DES RAISINS, EN UTILISANT L'OUTIL DGGE**

**L. Guérin<sup>1</sup>, M. Bouix<sup>2</sup>, P. Poupault<sup>1</sup>, R. Laforgue<sup>1</sup>, P. Mallier<sup>3</sup>, A. Mallet<sup>3</sup>, J. Dupont<sup>4</sup>**

<sup>1</sup> IFV Tours, 46 avenue Gustave Eiffel, 37100 Tours, France, [laurence.guerin@vignevin.com](mailto:laurence.guerin@vignevin.com)

<sup>2</sup> AgroParisTech, Département de microbiologie industrielle, 1 avenue des Olympiades, 91744 Massy Cedex, France, [marielle.bouix@grignon.inra.fr](mailto:marielle.bouix@grignon.inra.fr)

<sup>3</sup> Chambre d'Agriculture d'Indre et Loire, 38 rue Augustin Fresnel, 37170 Chambray les Tours, France

<sup>4</sup> Muséum National d'Histoire Naturelle, Département Systématique et Evolution - Mycologie, 75005 Paris Cedex 05, France

### **RÉSUMÉ**

Depuis le millésime 2002, une étude est menée sur la diversité de la flore fongique de parcelles du cépage chenin, situées essentiellement sur les appellations de Vouvray et Montlouis ; deux appellations séparées par le fleuve nommé la Loire. Les parcelles se situent dans des conditions pédoclimatiques différentes, qui se retrouvent au travers des suivis de maturité et l'état sanitaire.

L'objectif est d'utiliser la flore fongique comme facteur de différenciation entre les parcelles, et d'évolution au cours de la maturité. C'est dans ce cadre qu'un outil d'écologie microbienne a été utilisé : Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE). Après une étude spécifique sur les moisissures des raisins, qui ont permis d'établir le référentiel, les échantillons complexes constitués de l'eau de lavage des baies de raisins, ont été analysés. Ainsi, nous avons pu analyser et différencier plusieurs parcelles de cépage chenin, situées dans des conditions pédoclimatiques différentes.

### **MOTS-CLÉ**

Flore fongique, état sanitaire, conditions pédoclimatiques, suivi maturité, outil moléculaire, DGGE.

### **ABSTRACT**

Since the vintage wine 2002, a study is led on the variety of the fungal flora of parcels of the Chenin vine, situated essentially on the controlled origin label of Vouvray and Montlouis; two controlled origin label separated by the river named the Loire. The parcels are situated in conditions different of soils and of climate, which meet through the follow-ups of maturity and the sanitary state.

The objective is to use the fungal flora as factor of differentiation between the parcels, and evolution during the maturity. It is in this frame that a tool of microbial ecology was used: Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE). PCR-DGGE is a molecular method which allows the direct analysis of DNA in complex samples without any culture step. This method is based on the separation in a denaturing gradient of double-strand DNA fragments which have the same length but different nucleotide sequences. After a specific study on fungus of grapes, which allowed establishing the reference table, the complex samples constituted by some water of wash of the berries of grapes, were analyzed. This tool will allow us to draw a parallel between the dynamic of fungal populations present in different conditions of soil and of climate.

PCR-DGGE showed its potentialities for a fast characterization of fungi in complex mixes.

**KEY-WORDS**

Fungal flora, sanitary state, conditions of soils and of climate, follows-up of maturity, molecular tool, DGGE.

**INTRODUCTION**

La microflore présente sur la surface de raisins est composée d'espèces diverses de levures, de bactéries et de moisissures filamenteuses. Certains de ces micro-organismes sont impliqués dans l'élaboration du vin en participant aux fermentations alcoolique et malolactique. Cependant, quelques autres peuvent avoir un impact négatif sur la qualité du vin. Par exemple, les moisissures filamenteuses peuvent être impliquées dans la production de mycotoxines (Battilani et al. 2003), dans les maladies de la vigne comme le mildiou et le black rot ou dans des défauts sensoriels comme les arômes de moisi ou terreux (La Guerche et al. 2004). L'écologie et la biodiversité des levures présentes à la surface des raisins a déjà été étudié en utilisant des méthodes microbiologiques conventionnelles ou des méthodes moléculaires (Prakitchaiwattana et al. 2004). La présence de moisissures filamenteuses sur des raisins a été étudiée avec des méthodes conventionnelles (Serra et al. 2005), montrant la prédominance d'appartenance aux genres *Botrytis*, *Penicillium* et *Aspergillus*. Cependant, les études basées sur des méthodes moléculaires sont rares (Doaré-Lebrun et al. 2006) et la communauté fongique des raisins reste mal connue. En effet, les méthodes de microbiologie conventionnelle peuvent échouer à décrire la diversité totale microbienne à cause de la prédominance de certaines espèces, les inhibitions entre espèces et l'incapacité de certaines d'entre elles à croître sur des milieux de culture gélosés (Head et al. 1998). Les méthodes moléculaires basées sur l'analyse directe de l'ADN environnemental sans étape de culture au préalable ont été développées pour étudier les communautés microbiennes. Parmi ces méthodes, la PCR couplée à un gradient dénaturant (PCR-DGGE) et la PCR couplée à un gradient de température (PCR-TTGE) (Muyzer et al. 1993) ont été largement utilisées pour définir des écosystèmes microbiens associés à l'environnement ou associés à l'alimentation. Ces méthodes ont montré être plus appropriées que les méthodes microbiologiques conventionnelles pour l'analyse des communautés fongiques (Doaré-Lebrun 2005).

Le but de cette étude est de déterminer l'utilisation de la PCR-DGGE, dans le cadre du suivi d'un réseau de sept parcelles du cépage Chenin, réparties sur les AOC Vouvray et Montlouis, depuis 2002, dont cinq sont définies comme étant sensibles à l'état sanitaire et plus particulièrement à ce qui est défini comme des déviations nommées goûts moisi-terreux (GMT).

**MATÉRIELS ET MÉTHODES**Réseau de parcelles :

- Sept parcelles de Chenin sont suivies depuis 2002 et sont nommées : Le Gard (sensible à l'état sanitaire), Fosses rouges (sensible à l'état sanitaire), Brosses 10 (sensible), Brosses 20 (non sensible), Cormier roux (sensible), Marronniers (sensible à l'état sanitaire), et Epinay (non sensible)

PCR-DGGE (détail dans l'article de Laforgue et al, 2009) :

- Les échantillons proviennent de l'eau de lavage de baies de raisins, ou de moûts. Ces échantillons sont incubés dans un milieu de culture (PDB), pendant 15 heures, avant

d'effectuer l'extraction d'ADN. L'ADN est amplifié grâce à des amorces de B-tubuline, permettant l'amplification des ascomycètes filamenteux, et une amorce spécifique à *Botrytis cinerea*. Pour ensuite effectuer l'analyse en gel d'électrophorèse en gradient dénaturant, deux différents gradients de dénaturant ont été utilisés : un premier de 20 à 70 % de solution dénaturante, et un second de 40 à 45 % de solution dénaturante. La solution dénaturante définie à 100% est un mélange de 40% (v/v) de formamide et d'urée à 7 mol/l. Les échantillons sont chargés sur le gel, et l'élution a lieu pendant 16 heures à 120V et 60°C. Après migration, le gel est observé sur une table UV, après coloration, à l'aide du bleu de bromure d'éthidium.

- Les photos de gels sont ensuite analysées à l'aide du logiciel Bionumerics, en comparaison d'un référentiel effectué à l'aide de 50 souches de moisissures issues de collections et/ou de raisins ; la comparaison est rendue possible à l'aide des souches dites 'marqueurs' introduites lors de la migration des échantillons dans le gradient de gel.

## RÉSULTATS ET DISCUSSION

### Les parcelles :

La plupart des sols étudiés dans ce réseau sont des sols bruns, sauf un qui est lessivé (bournais).

Quatre des six sols sont représentatifs des terroirs de leur AOC d'appartenance. Dans les deux autres, l'un est de type anthropique, l'autre est une perruche sableuse peu fréquente à Vouvray et davantage à Montlouis.

La majorité des sols présente vers 30 à 60 cm de profondeur un obstacle potentiel soit à la pénétration de l'eau, soit l'inverse à la remontée capillaire, soit à la pénétration des racines. Cet obstacle potentiel est parfois constaté.

Si le sol est une variable explicative de l'état sanitaire, alors il existe deux types de parcelles :

- celles réagissant sensiblement à l'effet sol comme les Brosses 10, le Gard ou modérément sensible comme les Marronniers. Le sol intervient à travers la circulation de l'eau.
- celles s'affranchissant de l'effet sol par une autre variable explicative dominante comme les Epinays, les Brosses 20.

Si le profil pédologique permet d'expliquer partiellement certaines situations, l'analyse physico-chimique confirme l'état de chaque sol avec peu d'écart entre parcelles.

Les mesures de résistivité complètent la caractérisation des sols des sept parcelles. Ces nouvelles mesures confirment le mauvais état de ressuyage des parcelles sensibles.

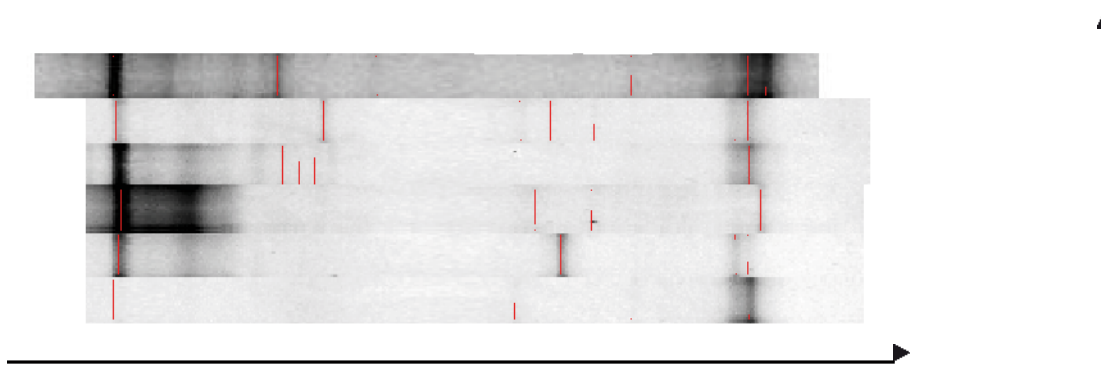
### Flore fongique :

Les six observations visuelles de l'état sanitaire, couplées aux analyses effectuées par PCR-DGGE des raisins, sont effectuées entre le 23/08 (fin véraison) et le 02/10 (sur-maturité et fin des vendanges). Lors de la première observation, la pourriture grise est bien présente sur l'ensemble des parcelles sauf les Brosses 10 et 20, avec parfois des moisissures vertes. L'intensité de *Botrytis* croît de façon quasi-linéaire entre le 23/08 et le 02/10. L'installation des moisissures vertes est décalée d'une semaine : leur présence est générale et marquée de la troisième à la sixième observation, sauf aux Brosses 10 et 20.

L'essentiel de la production de géosmine est mesuré entre le 09 et 25 septembre, soit quatre semaines après le dernier épisode pluvieux, et est marquée préférentiellement sur les parcelles : Marronniers et Epinays. Ce pic intervient pendant la phase stationnaire de développement des moisissures vertes, période pendant laquelle l'hygrométrie régresse sauf durant deux journées chaudes et humides les 6 et 17 septembre.

L'évolution qualitative de la flore fongique à partir du 06 septembre est perceptible sur l'image n°1 (gradient 20-70%), à laquelle est associée le détail des espèces détectées (tableau n°1), pour la parcelle 'Epinays' ; de même que pour la comparaison de l'ensemble des parcelles à une même date (image n°2 (gradient 20-70%), et tableau n°2 associé) du 12 Septembre où les teneurs en géosmine, pour les parcelles Marronniers et Epinays ont fortement augmenté. C'est ainsi que l'on peut observer cette variation qualitative de la flore fongique à la fois au cours des semaines, mais également entre les parcelles.

Image 1 : Gel 20-70% de la parcelle Epinays aux différentes dates de prélèvements



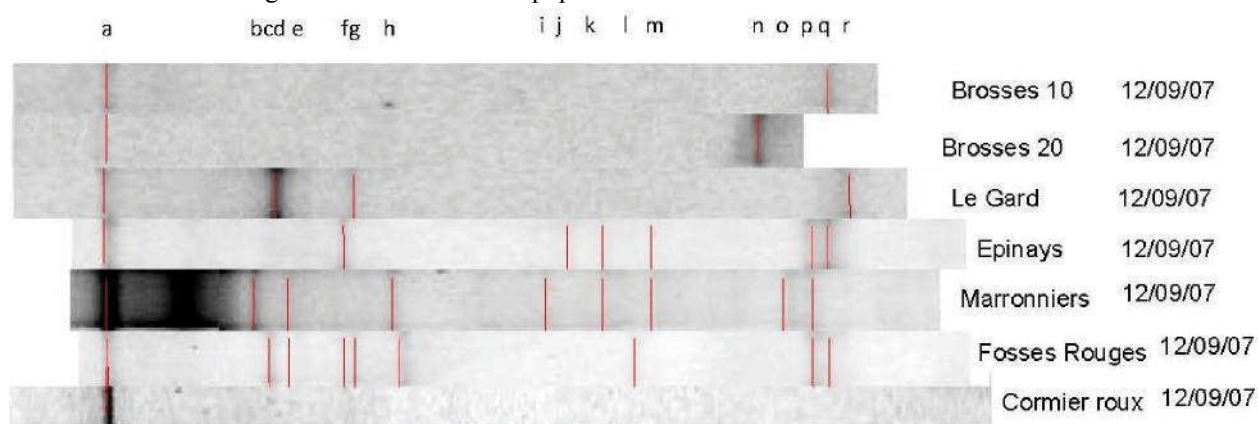
PARCELLE	DATE PRELEVEMENT	ESPECES DETECTEES ET IDENTIFICATION POTENTIELLE
Les Epinays	18/06/2007	a) <i>B. cinerea</i> 100% ; i) <i>P. implicatum</i> 100% ; o) <i>Sp. alborubescens</i> 100% ; q) inconnue a) <i>B. cinerea</i> 100% ; m) inconnue ; p) inconnue ; q) inconnue
Les Epinays	14/08/2007	Epinays 12/09/07
Les Epinays	28/08/2007	a) <i>B. cinerea</i> 100% ; k) <i>P. herquei</i> , <i>P. purpurescens</i> 100% ; n) <i>Kl. Thermotolerans</i> 100% ; r) inconnue Epinays
Les Epinays	06/09/2007	a) <i>B. cinerea</i> 100% ; b) inconnue ; c) <i>P. italicum</i> , <i>P. spinulosum</i> 100% ; d) <i>P. viridicatum</i> 100% ; e) <i>P. expansum</i> 100% ; g) <i>P. purpurescens</i> , <i>P. herquei</i> , <i>S. cerevisiae</i> 100% ; q) inconnue Epinays 18/06/07
Les Epinays	12/09/2007	a) <i>B. cinerea</i> 100% ; j) <i>P. herquei</i> 100% ; j) inconnue ; l) inconnue ; n) <i>Kl. Thermotolerans</i> 100% ; p) inconnue ; q) inconnue
Les Epinays	25/09/2007	a) <i>B. cinerea</i> 100% ; c) <i>P. italicum</i> 100% ; h) <i>P. thomii</i> 100% ; o) <i>Sp. alborubescens</i> 100% ; q) inconnue ; s) <i>A. japonicus</i> 100%

Tableau 1 : Correspondance entre les bandes identifiées sur le gel et les espèces détectées

PARCELLE	DATE PRELEVEMENT	ESPECES DETECTEES ET IDENTIFICATION
Brosses 10	12/09/2007	POTENTIELLE a) <i>B. cinerea</i> 100 % ; q) inconnue
Brosses 20	12/09/2007	a) <i>B. cinerea</i> 100% ; n) inconnue
Le Gard	12/09/2007	a) <i>B. cinerea</i> 100% ; d) <i>P. commune</i> 100% ; g) <i>S. cerevisiae</i> , <i>P. purpurescens</i> , <i>P. brevicompactum</i> 100% ; r) inconnue
Les Epinays	12/09/2007	a) <i>B. cinerea</i> 100% ; f) <i>P. herquei</i> 100 % ; j) inconnue ; k) inconnue ; m) <i>Kl. Thermotolerans</i> 100% ; p) inconnue ; q) inconnue
Les Marronniers	12/09/2007	a) <i>B. cinerea</i> 100% ; b) inconnue ; e) <i>P. italicum</i> 100 % ; h) <i>P. thomii</i> , <i>M. pulcherima</i> , <i>P. restrictum</i> 100% ; i) <i>P. implicatum</i> 100% ; k) inconnue ; m) inconnue ; o) inconnue ; p) inconnue
Fosses Rouges	12/09/2007	a) <i>B. cinerea</i> 100% ; c) inconnue ; e) <i>P. italicum</i> , <i>P. spinulosum</i> 100% ; g) <i>S. cerevisiae</i> , <i>P. brevicompactum</i> , <i>P. herquei</i> , <i>P. purpurescens</i> 100% ; g) <i>P. thomii</i> , <i>M. pulcherima</i> 100% ; j) inconnue ; n) inconnue ; o) inconnue
Cormier Roux	12/09/2007	a) <i>P. paxili</i> 100%, <i>B. cinerea</i> 54,5%

Tableau 2 : Correspondance entre les bandes identifiées sur le gel et les espèces détectées

Image 2 : Gel 20-70% des sept parcelles de Chenin à la même date du 12/09/2007



## CONCLUSIONS

Les conditions climatiques de l'été 2007 sont favorables à l'expression des GMT. L'analyse des facteurs confirme en 2007 le rôle principal du climat et de certaines moisissures. En résumé, la progression linéaire de *Botrytis* ne semble pas corrélérer directement à la production de géosmine. En effet, la cinétique de développement des moisissures vertes est croissante et parallèle à celle

de géosmine jusqu'au 18 septembre. Au-delà, les moisissures vertes stagnent tandis que la géosmine diminue, peut-être en raison de son caractère volatile, donc éphémère.

Ainsi, il est possible de pouvoir déterminer la flore fongique présente et spécifique à chaque parcelle. Cependant, aujourd'hui, la seule détection de souches appartenant au genre *Penicillium sp.* est nécessaire mais pas suffisante pour déterminer un niveau de risque GMT à la parcelle. C'est la raison pour laquelle, il est nécessaire de réaliser les dosages de géosmine. Cette étape de meilleure connaissance de la flore fongique est nécessaire afin de pouvoir déterminer les facteurs favorisant la production de cette molécule.

## BIBLIOGRAPHIE

- Battilani, P., Pietri, A., Bertuzzi, T., Languasco, L., Giorni, P. and Kozakiewicz, Z. (2003) Occurrence of ochratoxin A – producing fungi in grapes grown in Italy. *J Food Prot* **66**, 633-636.
- Doaré-Lebrun, E. (2005) Caractérisation de la microflore des raisins par méthodes FISH et PCR-TTGE- Application à la résolution des goûts terreux dans les vins. Ph.D. thesis, Université de technologie de Compiègne.
- Doaré-Lebrun, E., El Arbi, A., Charlet, M., Guerin, L., Pernelle J.J., Ogier J.C. and Bouix, M. (2006) Analysis of fungal diversity of grapes by application of temporal temperature gradient gel electrophoresis – potentialities and limits of the method. *J Appl Microbiol* **101**, 1340-1350.
- Head, I.M., Saunders, J.R. and Pickup, R.W. (1998) Microbial evolution, diversity and ecology: a decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms. *Microb Ecol* **35**, 1-21.
- Laforgue R., L. Guérin, J.J. Pernelle, C. Monnet, J. Dupont and M. Bouix. (2009). Evaluation of PCR-DGGE methodology to monitor fungal communities on grapes. *Journal of Applied Microbiology (JAM)*.107(4):1208-18.
- La Guerche, S., Garcia, C., Darriet, P., Dubourdieu, D. and Labarère, J. (2004) Characterization of *Penicillium* species isolated from grape berries by their internal transcribed spacer (ITS1) sequences and by gas chromatography - mass spectrometry analysis of geosmin production. *Curr Microbiol* **48**, 405-411.
- Muyzer, G., De Waal, E.C. and Uitterlinden, A.G. (1993) Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ Microbiol* **59**, 695-700.
- Prakitchaiwattana, C.J., Fleet, G.H. and Heard, G.M. (2004) Application and evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis to analyse the yeast ecology of wine grapes. *FEMS Yeast Res* **4**, 865-877.
- Serra, R., Braga, A. and Venancio, A. (2005) Mycotoxin-producing and other fungi isolated from grapes for wine production, with particular emphasis on ochratoxin A. *Res Microbiol* **156**, 515-521.