



HAL
open science

Une application typique des outils de traçabilité : la filère merrain

Remy Petit, Sabine Dumas, François Feuillat

► **To cite this version:**

Remy Petit, Sabine Dumas, François Feuillat. Une application typique des outils de traçabilité : la filère merrain. Rendez-vous Techniques de l'ONF, 2004, hors-série 1, pp.71-79. hal-02680663

HAL Id: hal-02680663

<https://hal.inrae.fr/hal-02680663v1>

Submitted on 12 Jul 2024

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Une application typique des outils de traçabilité : la filière merrain



Tonnellerie François Frères Saint-Romain

Chauffe des tonneaux pour le cintrage et l'acquisition des arômes de cuisson...

Le contexte

Depuis 20 ans, la demande en merrain connaît une augmentation constante : c'est la conséquence du renouveau, tant en France qu'à l'étranger, de la pratique de l'élevage des vins en fûts neufs. Le chêne français est le plus réputé en tonnellerie, et singulièrement lorsqu'il est issu de certains « crus », tels que Tronçais dans l'Allier, mais encore Bertranges (Nièvre), Cîteaux (Côte de d'Or), Darney (Vosges), Jupilles (Sarthe)...

Sous la pression de la demande, on assiste à une diversification des approvisionnements en bois : chêne d'Europe centrale et orientale, chêne américain, chêne de forêts privées françaises. Dès lors, il peut devenir tentant pour des intermédiaires peu scrupu-

leux, de vendre pour du chêne français, voire même pour du « Tronçais », du chêne acheté en Europe de l'Est... On entend aussi parler de chêne de « type Tronçais », c'est-à-dire de chêne à « grain fin » (faibles accroissements annuels) mais dont l'origine géographique n'est pas précisée.

Face à cette confusion, des recherches ont été conduites en vue d'étudier l'impact de l'origine géographique et botanique du chêne sur les caractéristiques organoleptiques (odeur, goût, couleur, aspect) des vins élevés en fûts neufs. Les résultats de ces expérimentations ont montré des différences tout à fait perceptibles, confortant ainsi la demande de certains utilisateurs, qui souhaitent avoir une garantie de l'origine du bois utilisé en tonnellerie

(Chatonnet, 1995 ; Feuillat, 1996 ; Doussot, 2000 ; Naudin et Pauget, 2002 ; Richard, 2003). La principale demande de produits bien identifiés concerne l'origine géographique (chêne français, massifs forestiers), mais une différenciation des espèces (chêne sessile ou chêne pédonculé) est parfois envisagée et semble tout à fait justifiée, car le bois des deux chênes diffère sensiblement au niveau de leurs propriétés physiques et chimiques qui se manifestent au travers des caractéristiques sensorielles des vins élevés en fûts neufs (Feuillat, 1996 ; Doussot, 2000 ; Naudin et Pauget, 2002). Une valorisation pourrait être effectuée au travers de certifications type indication géographique protégée (IGP) ou de labels. On peut déjà citer la marque « fût de tradition française » certifiée

r é s u m é

Dans la filière forêt-bois, une application très concrète des outils moléculaires et des travaux de description de la diversité génétique des arbres est la contribution à une traçabilité du bois de chêne de ton-

nellerie, sous forme de tests ADN. Les travaux les plus avancés concernent la mise en place d'un test de conformité d'un lot de bois de merrain avec une origine géographique (origine française, voire conformité avec un massif forestier donné), grâce à l'utilisation de l'ADN résiduel présent dans le bois. Il est également envisageable de suivre des arbres individuellement ou d'identifier les essences botaniques. Toutes ces techniques devraient à terme, associées à un suivi « papier » plus classique de l'origine des lots de bois, permettre une meilleure valorisation du travail du forestier pour le bénéfice de la filière viti-vinicole.

geable de suivre des arbres individuellement ou d'identifier les essences botaniques. Toutes ces techniques devraient à terme, associées à un suivi « papier » plus classique de l'origine des lots de bois, permettre une meilleure valorisation du travail du forestier pour le bénéfice de la filière viti-vinicole.

* Voir glossaire p 117



F. Feuillat, ONF

Chêne sessile de qualité tranchage et merrain en forêt domaniale de Tronçais

par le Centre Technique du Bois et de l'Ameublement (CTBA) qui stipule notamment que les chênes utilisés doivent être d'origine française.

Dans ce contexte (risques de fraudes sur l'origine, choix du bois au travers de l'espèce et de l'origine géographique...), un besoin d'outils de traçabilité du bois est apparu, destiné non à se substituer à la traçabilité « documentaire » habituelle (identification par code et suivi papier des lots de bois de la forêt au tonneau) mais à la compléter (contrôle de traçabilité). Les chercheurs se sont particulièrement attachés à développer des tests génétiques, qui se sont progressivement imposés comme outils de traçabilité et d'identification. Parmi les trois questions susceptibles d'intéresser la filière : différenciation des grandes

zones géographiques à l'échelle de l'Europe, des massifs forestiers en France et des deux principales espèces de chênes européens, les efforts ont porté surtout jusqu'ici sur la conformité avec une origine française (encadré), à la demande notamment de la Fédération française de la tonnellerie qui a soutenu ces travaux. Mais des perspectives existent pour répondre aux autres demandes telles que l'identification de l'espèce ou la conformité avec la forêt d'origine. L'Office national des forêts et l'Inra de Bordeaux-Cestas ont cherché à mieux caractériser certains de ces grands massifs forestiers domaniaux et à améliorer la précision des tests existants. La présente contribution fait le point sur ces acquis et les limites des tests génétiques en vue de répondre à ces différentes questions.

Les tests génétiques sur bois de chêne

L'analyse de la diversité génétique* de l'ADN* des arbres a permis d'identifier les régions du génome* (noyau de la cellule ou chloroplaste*) les plus utiles pour ces travaux. Chez les chênes, le chloroplaste est caractérisé par une hérédité* maternelle (transmission par l'ovule et non par le pollen) et n'est donc disséminé d'une génération à l'autre que par les glands. Cette particularité se traduit par une différenciation génétique* très importante entre populations* et entre régions. Au contraire, l'ADN nucléaire provient des deux parents dont les caractères sont recombinés ; il est souvent très variable et se prête donc à l'identification d'individus. Toutefois, des combinaisons de plusieurs marqueurs nucléaires* mettent en évidence des structurations géographiques ou spéci-

ifiques parfois fortes de cette diversité génétique (Bodénès et al., 1996).

Une difficulté propre à ce type d'analyse à partir de merrain tient à la dégradation de l'ADN dans le bois. En effet, seul le duramen ou bois de cœur exclusivement constitué de tissus morts est utilisé lors de la fabrication des merrains. Dans le bois mort, il ne persiste que des fragments d'ADN dégradés, de petite taille. Cet ADN peut être isolé puis purifié et enfin multiplié afin de distinguer les différents variants*. La possibilité d'exploiter ces fragments d'ADN à partir de bois mort est une première mondiale du laboratoire de génétique de l'INRA Bordeaux Cestas (Dumolin-Lapègue et al., 1999 ; Deguilloux et al., 2003).

Possibilités d'application des tests ADN dans la filière « merrain »

Nous allons maintenant présenter les acquis et les limites actuelles des recherches sur le polymorphisme* génétique chez les chênes en vue de leurs applications à l'identification de l'origine géographique et botanique (ou au contrôle de traçabilité) des bois de merrain.

L'Inra a entrepris depuis plusieurs années une vaste campagne d'étude de la diversité génétique des chênes européens (Petit et al., 2002a). Chez ces espèces, l'analyse du polymorphisme de l'ADN a permis de révéler plusieurs régions génomiques pertinentes selon la question posée : identification d'espèces, conformité avec une origine géographique ou encore discrimination d'individus (arbres).

abstract

A concrete application of molecular tools and of population studies on genetic diversity in forest trees is the traceability of the oak wood used by the barrel industry, using newly deve-

loped DNA tests. The most advanced studies deal with the conformity of the geographic origin (conformity with a French origin or with a particular stand), using residual chloroplast DNA present in the wood. Identifying individual trees and species is also

conceivable. In the future, all these techniques, combined with traditional administrative monitoring of the origin of wood staves, should better valorise forest resources and their sustainable management for the benefit of wine production network.

* Voir glossaire

Principe du test de conformité

Le principe de ce test consiste à comparer l’empreinte génétique* d’un échantillon d’origine suspecte à celle d’autres échantillons de référence correspondant à l’origine annoncée, issus d’une base de données représentative de la variabilité des espèces. La pertinence du résultat du test est en grande partie dépendante de la représentativité de cette base de référence. Il est important de noter le caractère asymétrique de ces tests dits de « conformité ». L’hypothèse testée est : « *L’échantillon est-il conforme à l’origine annoncée ?* ». Il ne s’agit donc pas de répondre à la question : « *D’où vient cet échantillon ?* », bien qu’il soit parfois possible de circonscrire plus ou moins (par exemple à l’échelle du continent : Europe occidentale, centrale, orientale) l’origine géographique d’un lot. Si la conformité avec une origine donnée est rejetée, **alors la fraude est avérée**, et c’est bien cela qui est important (on peut chiffrer le risque pris en déclarant le lot non conforme).

A *contrario*, si l’hypothèse de conformité n’est pas rejetée, **aucune conclusion n’est possible** : on ne peut pas prouver que le lot vient bien de tel endroit. Évidemment, si le nombre d’origines est restreint, on peut aboutir à une attribution par « élimination » de toutes les alternatives. Une difficulté de ces tests est que l’on ne peut le plus souvent considérer qu’un lot de bois testé a été récolté de manière **représentative** dans un peuplement ou dans une région donnée. Cela signifie qu’on ne peut assimiler ce lot à un échantillon tiré de l’« urne France » dans laquelle on aurait auparavant bien mélangé tous les variants possibles. Nous verrons que la connaissance précise de la composition génétique des massifs forestiers permet d’augmenter sensiblement le pouvoir d’exclusion de ce test.

Conformité de l’origine géographique des chênes à merrain à l’échelle des grandes régions d’Europe : Europe de l’Ouest (chêne français) / Europe de l’Est.

L’étude de la variabilité de l’ADN chloroplastique* des chênes blancs, représentés en France par quatre espèces (chêne sessile, chêne pédonculé, chêne pubescent, chêne tauzin) et en Europe par huit espèces, a été conduite à l’échelle de l’aire de distribution européenne par un consortium de 16 laboratoires. Au total, 2 613 peuplements, dont 878 pour la France, ont été échantillonnés, permettant d’établir une carte génétique* de l’Europe avec un maillage d’au moins 50 x 50 km (Petit *et al.*, 2002a). Cette carte continue régulièrement à s’enrichir. Les résultats ont conduit à identifier 32 variants chloroplastiques ou « haplotypes* » indépendants de l’espèce et dont la répartition, ainsi que le montre la figure 1, obéit à une forte structuration géographique.

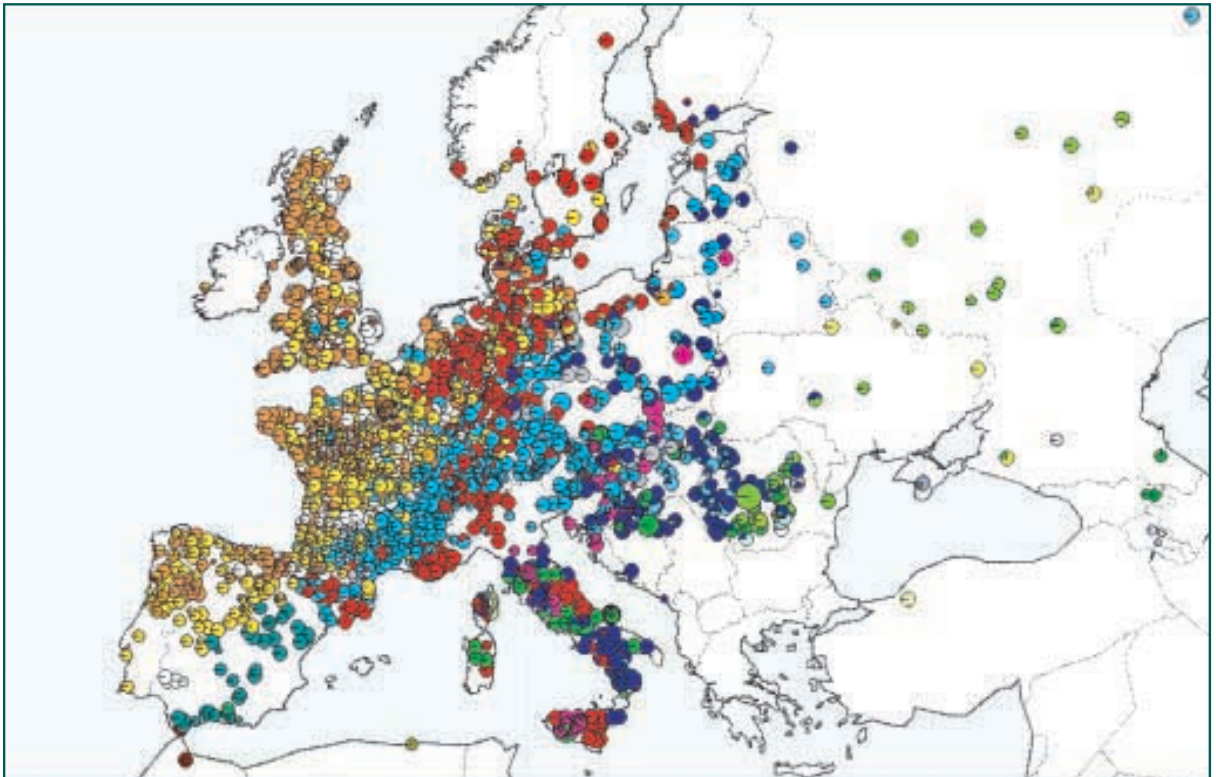


Fig. 1 : répartition des 32 variants chloroplastiques révélés en Europe chez les chênes blancs (d’après Petit *et al.*, 2002a)

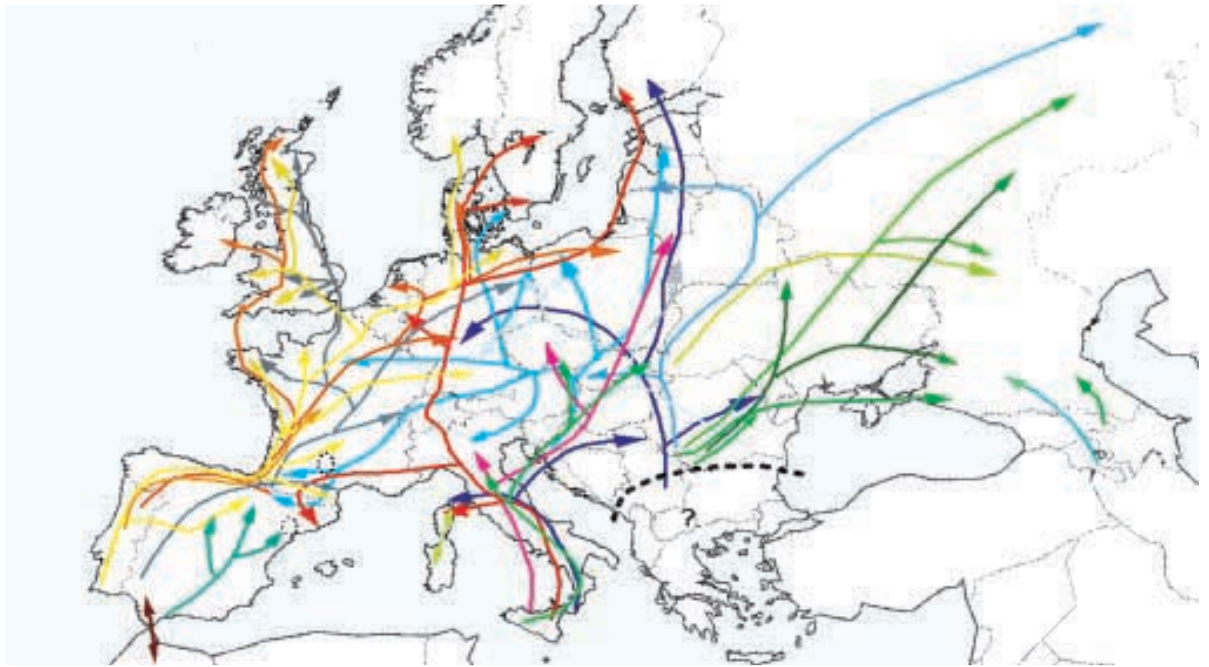


Fig. 2 : principales voies de recolonisation postglaciaire déduites des résultats de la carte 1 et des données concernant les pollens fossiles (d'après Petit et al., 2002b). Les ovales en pointillés sur la carte (en Catalogne, Midi-Pyrénées et Géorgie) indiquent des variants plus localisés

La répartition des haplotypes rend compte des voies suivies par les chênes lors de la recolonisation de l'Europe du Nord après les dernières glaciations (figure 2). Par exemple, les variants gris, jaune et orange sont originaires de la péninsule ibérique mais ont désormais une distribution Atlantique jusqu'en Scandinavie et en Écosse. Les mouvements de populations de chênes, notamment suite à la dernière glaciation, mais aussi plus anciens, lors de précédents réchauffements durant le Quaternaire, sont principalement orientés sud-nord, puisqu'ils sont liés à un réchauffement général de la planète, mais il existe aussi des cas de migration orientés est-ouest (variant rouge ou bleu clair) ou ouest-est (variants verts). L'intérêt pour la traçabilité est que les importations en France de merrains issus d'Ukraine ou de Russie notamment devraient être facilement identifiables, vu cette différenciation le long d'un gradient de longitude.

Un test a donc été mis au point dans ce but. Il permet de distinguer neuf variants (dont 5 sont présents en

France) en ciblant trois à cinq très petites parties de l'ADN chloroplastique (l'ADN étant dégradé dans le bois, il n'est pas possible d'étudier des portions plus longues d'ADN). Certains de ces neuf variants correspondent donc à plusieurs des 32 variants montrés sur la figure 1. Sur un lot de bois à tester, huit merrains verts (bois séché moins d'un an dans la tonnellerie) sont prélevés sur des piles différentes pour être le plus représentatif du lot et éviter notamment de prélever plusieurs merrains issus d'une même grume. Les analyses moléculaires sont ensuite effectuées en laboratoire. Une fois le typage effectué et le variant chloroplastique déterminé pour chacun des huit merrains, les informations sont saisies informatiquement. Un logiciel très simple, dans lequel ont été entrées les fréquences des neuf variants chloroplastiques en France, permet de calculer le risque pris en déclarant le lot étudié non-conforme avec une origine française. Si ce risque est suffisamment faible (en pratique, cela signifie qu'on a identifié au moins un, voire deux variants quasiment totalement absents

de France dans la base de données), on pourra être amené à émettre des soupçons sur l'origine française du lot concerné. Il est alors fortement conseillé de prélever un nouvel échantillon de huit merrains pour confirmer



Des crus de chêne pour des crus de vin...

F. Feuillat, ONF

ces soupçons. Les tonneliers intéressés pourraient se servir de ce test lors de l'achat d'un lot de bois, dans le cadre d'une procédure de traçabilité rigoureuse (ou de contrôle d'une chaîne de traçabilité).

Conformité de l'origine géographique des chênes à merrain à l'échelle des grands massifs forestiers domaniaux.

Les viticulteurs ne se satisfont toutefois pas toujours d'une simple confirmation de l'origine française. Étant par nature particulièrement attachés à la notion de terroir et de cru, certains souhaitent en effet connaître avec précision la forêt d'origine du bois utilisé pour confectionner les barriques dans lesquelles ils vont élever leur vin. À titre d'exemple, le prestigieux domaine de la Romanée Conti en Bourgogne demande exclusivement du chêne provenant de deux massifs : Tronçais et les Bertranges.

Dans son principe, le test expliqué ci-dessus est directement applicable à ce genre de question. Seul l'échantillon de référence change. Aux données de variation génétique de l'ADN chloroplastique correspondant à la France, il convient alors de substituer les données correspondant à la forêt ou à la région française concernée. L'échantillonnage utilisé est différent de celui utilisé pour tester une origine française : il doit comprendre un échantillonnage beaucoup plus ciblé et complet des principaux massifs

forestiers qui fournissent du bois à merrain.

Caractérisation de massifs domaniaux réputés

L'ONF a réalisé avec l'Inra Bordeaux-Cestas une étude sur six grandes forêts domaniales : Tronçais (Allier), Bertranges (Nièvre), Cîteaux (Côte d'Or), Saint-Palais (Cher), Darney (Vosges), Jupilles (Sarthe), pour préciser les variants chloroplastiques présents dans chaque massif, leur fréquence respective et par suite les possibilités de discriminer leur origine par rapport aux autres provenances françaises et européennes. Afin de discriminer les forêts qui présentent le même variant, il serait souhaitable d'améliorer la résolution en identifiant de nouveaux marqueurs permettant de subdiviser les variants chloroplastiques actuels en « sous-variants ». Cette possibilité a été testée sur des individus ayant le variant 10 (jaune), qui est le plus fréquent dans cet échantillon de six forêts (55 % des arbres) mais également en France (près de 40 % des individus de la base de donnée). Nous avons ainsi réussi à subdiviser ce variant en deux sous-variants 10-1 et 10-2. Les forêts de Tronçais et des Bertranges qui ne se distinguaient pas précédemment peuvent être désormais discriminées : tous les individus de Tronçais sont de sous-haplotype 10-2, alors que ceux des Bertranges sont (à l'exception d'un arbre) de sous-haplotype 10-1. En ce qui concerne

Saint Palais et Bercé, les individus d'haplotype 10 présentent (à l'exception d'un arbre à Saint Palais) le même sous-type 10-2 que Tronçais (tableau 1).

La révélation des haplotypes pour les six forêts fait apparaître les résultats suivants :

- un variant exclusif ou presque à Tronçais (10-2), à Bertranges (10-1) et à Cîteaux (7) ;
- un variant largement dominant à Darney (11) et à Saint Palais (10-2) ;
- un mélange de plusieurs variants à Jupilles (11, 10-2 et 12).

Nous avons vu que l'authentification d'origine fonctionne par exclusion d'hypothèse. Du bois est déclaré comme provenant d'une forêt donnée ; le test va permettre d'établir s'il y a cohérence ou non entre cette déclaration et le variant révélé. La puissance de l'outil dépend directement du nombre de variants présents dans la forêt et de leur répartition ailleurs en France et en Europe. Les résultats des tests d'exclusion sont présentés dans le tableau 2.

Dans les cas de non-conformité, la réponse du test est précise : « selon les bases de données établies, le bois ne peut provenir de l'origine déclarée ». La limite de la justesse du test est la précision de la caractérisation des forêts étudiées, la caractérisation génétique ayant été effectuée sur un échantillon supposé représentatif de la forêt mais bien entendu non exhaustif (une centaine d'arbres par massif).

Forêt (département)	Surface (hectares)	Nb. échantillons analysés	Fréquence de chaque variant				
			10-1 Jaune foncé	10-2 jaune	11 blanc	12 orange	7 bleu
Tronçais (03)	10500	100	-	100 %	-	-	-
Bertranges (58)	7650	101	99 %	1 %	-	-	-
Cîteaux (21)	3500	57	-	-	-	-	100 %
Darney (88)	8000	120	-	-	94 %	2 %	4 %
Saint Palais (18)	1950	58	2 %	93 %	-	5 %	-
Jupilles (72)	5400	98	0 %	34 %	58 %	8 %	-
Total	37 000	534	19 %	35 %	32 %	2 %	12 %

Tab. 1 : distribution des variants par forêt

Origine Déclarée	Résultats du typage					
	10-1	10-2	11	12	7	autres
Tronçais	non conforme	conforme	non conforme	non conforme	non conforme	non conforme
Bertranges	conforme	peu probable	non conforme	non conforme	non conforme	non conforme
Cîteaux	non conforme	non conforme	non conforme	non conforme	conforme	non conforme
Darney	peu probable	conforme	non conforme	peu probable	non conforme	non conforme
Saint Palais	non conforme	non conforme	conforme	peu probable	conforme	non conforme
Jupilles	non conforme	conforme	conforme	conforme	non conforme	non conforme

Tab. 2 : conclusion des tests d'exclusion effectués sur du bois d'origine déclarée

Dans les cas de conformité, le test ne prouve pas strictement que le bois provient bien de l'origine déclarée et les situations peuvent varier fortement d'une forêt à l'autre (tableau 3). Dans l'exemple de Tronçais, du bois déclaré comme provenant de cette forêt est testé. Si un variant autre que le variant 10 est révélé, le résultat est « non-conforme » et le bois ne provient très probablement pas de Tronçais. Si au contraire, le bois testé est caractérisé par le variant 10 (jaune), le résultat est conforme à la déclaration sans toutefois que l'on puisse prouver que le bois provient avec certitude de Tronçais (voir encadré). Un chêne sessile ou pédonculé français « tiré au hasard » a en effet 40 % de chances d'avoir le variant 10 et 60 % d'avoir un autre variant (tableau 3 ; ces résultats correspondent aux probabilités avant amélioration de l'outil de caractérisation). La subdivision du type jaune en deux « sous variants » devrait augmenter fortement le pouvoir d'exclusion du test. Il reste à étudier la répartition complète des deux sous-variants en France et en Europe. Dans l'hypothèse où 50 % des variants 10 (jaune) seraient de type 10-1 et 50 % seraient de type 10-2, il n'y aurait plus que 20 % de chances de tirer au hasard en France un chêne du type 10-2 conforme à Tronçais. La probabilité de tirer non pas un individu mais tout un lot ayant le type conforme à celui de

Tronçais est encore plus faible, surtout si ce lot provient de plusieurs forêts. Dans le cas de Jupilles, la puissance du test diminue nettement car cette forêt renferme les variants 10, 11 et 12 qui sont tous largement répandus en France. Un chêne français « tiré au hasard » a presque 3 chances sur 4 de présenter un variant présent à Jupilles. Quant à Darney et Saint-Palais, ces forêts présentent des situations intermédiaires car elles renferment un variant largement majoritaire.

La connaissance précise de la composition génétique (variants chloroplastiques) des principaux massifs forestiers fournissant des bois de merrain est donc un bon moyen d'augmenter le pouvoir d'exclusion des tests ADN. L'examen de la répartition des variants en France montre que quatre variants dominants sont présents dans la plupart des régions et qu'un lot de bois assemblé au hasard comportera plu-

sieurs de ces variants alors qu'un lot de bois de Tronçais, Bertranges ou Cîteaux devra être homogène. Seul Jupilles pose un réel problème du fait de son manque d'homogénéité.

Empreintes génétiques individuelles

La technique des empreintes génétiques individuelles a des applications humaines bien connues en criminologie et en recherche de paternité. Par ailleurs, le développement d'outils de contrôle de traçabilité dans la filière viande bovine, basés sur la technique des empreintes individuelles, est d'actualité. Le parallèle entre filière bovine et filière merrain mérite d'être approfondi. La vache à l'étable, comme l'arbre en forêt, est facile à identifier et à étiqueter. Les ruptures de traçabilité surviennent quand on découpe la vache ou quand on passe de la grume au merrain. L'empreinte génétique individuelle a le mérite de rester constante dans tous les morceaux ou fragments issus du même individu.

Qu'il s'agisse de l'homme, de l'animal ou de l'arbre, le principe d'identification de l'individu est le même et repose sur la révélation simultanée de plusieurs marqueurs hypervariables. Deux individus peuvent être par hasard identiques pour un marqueur donné. Si on multiplie les marqueurs révélés, la probabilité d'identité décroît très

Origine testée	Probabilité de conformité d'un chêne « tiré au hasard »
Tronçais	40 %
Bertranges	40 %
Cîteaux	25 %
Saint Palais	59 %
Darney	59 %
Jupilles	73 %

Tab. 3 : précision des situations de conformité pour la France

rapidement avec leur nombre et avoisine très vite zéro. Il est à noter que pour chaque marqueur microsatellite*, on révèle les deux allèles* présents (un ayant été transmis par le père, l'autre par la mère) et que chaque marqueur fournit déjà une double information par individu.

■ Validation du concept d'empreinte génétique individuelle

L'étude ONF/Inra a porté sur près de 100 individus échantillonnés dans cinq forêts (Tronçais, Bertranges, Jupilles, Cîteaux, Saint-Palais) sur des arbres proches (voisins de parcelle) ou apparentés (individus collectés dans une brosse de semis provenant d'un même arbre « mère »). Tous ces individus ont été étudiés à partir d'ADN extrait de feuilles pour six marqueurs microsatellites. Deux de ces marqueurs permettent de distinguer la majorité des individus et quatre sont nécessaires pour les distinguer en totalité.

■ Applications des marqueurs microsatellites au contrôle de traçabilité des bois de merrain

Les empreintes individuelles sont donc accessibles chez le chêne avec un nombre réduit de microsatellites (généralement 4). À partir de cet outil (sous réserve d'être capable de transférer la technique d'analyse à partir du bois et non de tissus frais), deux types d'applications pourraient être envisagées dans une optique de contrôle de traçabilité des bois de merrain :

- Typage individuel systématique

Dans le principe, il s'agit de typer individuellement tous les arbres à merrain constituant un lot d'une même origine (parcelle, ou regroupement de parcelles d'une même forêt). Sur un plan pratique, le matériel à analyser pourrait être des bourgeons (prélevés au moment de l'abattage), ou des fragments d'écorce contenant du cambium (prélevés à l'aide d'un emporte pièce). Les prélèvements seraient effectués par l'ONF après acquisition du lot par un acheteur (merrandier ou exploitant

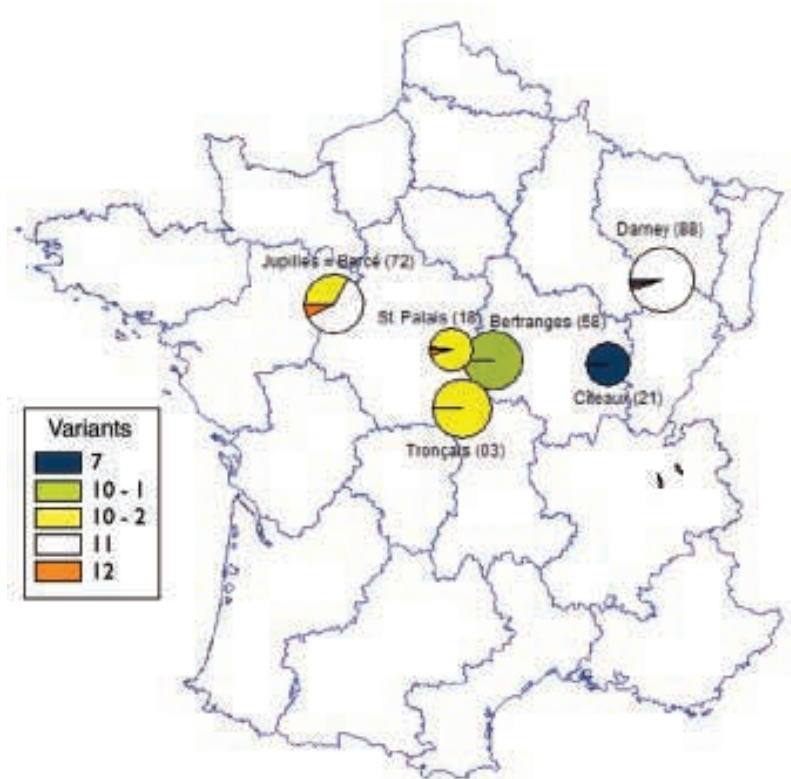


Fig. 3 : composition génétique de quelques forêts domaniales célèbres. Le diamètre des cercles est proportionnel au nombre d'échantillons analysés et les couleurs aux variants

forestier). Lors de l'achat des fûts par le viticulteur, le test consisterait alors à vérifier à partir d'un échantillon de quelques douelles (rabotage), que les « arbres » correspondants se trouvent bien dans le fichier d'empreintes individuelles établi en amont pour l'ensemble du lot. Cette procédure « lourde » pourrait être envisagée pour répondre à la demande de certains viticulteurs souhaitant acquérir des lots de grande valeur provenant de forêts prestigieuses (Tronçais, Jupilles...). Les surcoûts liés aux prélèvements d'échantillons et aux analyses devraient être pris en charge par le viticulteur.

- Typage d'individus traceurs

On peut également envisager le principe d'un ou de quelques individus traceurs, à mettre en œuvre au niveau de lots constitués d'une parcelle ou d'un ensemble de parcelles.

Ces individus repérés aux différents stades de la transformation du bois (grume, billon, merrain, douelle) pourraient servir à valider un système de traçabilité déjà en place.

Identification de l'origine botanique des chênes à merrain européens : chêne sessile / chêne pédonculé

Deux espèces de chênes autochtones sont utilisées pour le merrain en France : le chêne sessile et le chêne pédonculé. Du bois de chêne blanc américain (*Quercus alba*) est aussi importé pour la confection de fûts dans les tonnelleries françaises ; ces derniers sont alors surtout destinés à l'exportation. Comme le procédé de confection des fûts à partir de bois de chêne blanc américain est différent (les merrains sont sciés et non fendus), il y a peu de risque de confondre des fûts en chêne



F. Feuillat, ONF

Fente d'un billon en vue de la fabrication du merrain

européen et américain. De plus, le chêne américain confère aux vins une empreinte boisée très caractéristique (« coco », voire « résinique »), qui permet difficilement de le faire passer pour du chêne européen qui apporte des notes plus subtiles.

Par contre, différencier les deux espèces de chênes européens pourrait avoir un intérêt réel. Plusieurs travaux ont montré un effet notable de l'espèce sur les caractéristiques sensorielles du bois (Sauvageot *et al.*, 2002) et des vins élevés en fûts neufs (Chatonnet, 1995 ; Feuillat, 1996 ; Doussot, 2000). Plusieurs approches ont été tentées pour discriminer les deux espèces de chênes à partir de l'analyse du bois. La mesure de caractères anatomiques (proportions de gros vaisseaux et de fibres) par analyse d'image a permis, sur un échantillon d'une cinquantaine d'arbres issus de peuplements mélangés, d'identifier l'espèce avec un taux de réussite de 75 % (Feuillat *et al.*, 1997). Des travaux basés sur des variations de teneurs en extractibles (ellagitannins et whisky-lactone) ont montré, sur un échantillon de 288 chênes français, que le taux de discrimination était supérieur à 90 % (Leauté *et al.*,

en préparation). L'inconvénient de cette approche est que la composition chimique du bois n'est pas stable dans le temps, notamment entre le bois frais et le bois sec, voire après chauffage de la barrique.

Une troisième voie qui apparaît prometteuse concerne la distinction des espèces à l'aide de marqueurs situés dans certaines régions discriminantes du génome nucléaire (peu nombreuses au demeurant). Des travaux récents ont en effet permis de différencier le chêne sessile et le chêne pédonculé au niveau individuel par une combinaison de plusieurs marqueurs microsatellites (Muir *et al.*, 2000) alors que ces marqueurs n'avaient pas été particulièrement choisis pour leur pouvoir discriminant entre les deux espèces. Cependant, ces travaux n'ont porté à ce jour que sur des tissus frais : il reste donc à réaliser un important travail de transfert des techniques à de l'ADN extrait de bois.

Conclusions - Perspectives

Le test de caractérisation moléculaire basé sur les marqueurs chloroplastiques a montré ses intérêts et ses

limites. Il s'agit d'un test d'exclusion : un bois déclaré d'une origine donnée et dont le variant ne correspond pas à cette origine provient très probablement d'ailleurs.

Cet outil discrimine bien les grandes régions d'Europe, particulièrement les provenances atlantiques (chêne français) par rapport aux provenances orientales (chêne russe notamment), qui ne présentent pas les mêmes haplotypes. En ce qui concerne l'identification au niveau des grands massifs forestiers français, les résultats sont apparus contrastés. Certaines forêts présentaient un seul variant (Tronçais, Bertranges, Cîteaux), ou un variant largement majoritaire (Darney et Saint Palais) alors que d'autres (Jupilles) comportaient trois variants. La technique peut être améliorée par la subdivision de chaque variant en sous-variants. Ainsi, le variant 10 (jaune) fixé à Tronçais et Bertranges (et fréquent ailleurs en France) a été scindé en deux sous-types (10-1 à Tronçais et 10-2 à Bertranges) dont la répartition précise sur la France entière reste à établir. Il deviendra ainsi plus facile de repérer des lots d'origine quelconque vendus pour du « Tronçais ».

Un deuxième outil concerne les marqueurs microsatellites nucléaires, hypervariables, qui permettent de révéler des empreintes génétiques individuelles. La combinaison de quatre microsatellites suffit pour distinguer chaque individu avec un risque d'erreur faible. Cet outil permet d'envisager deux applications pour le contrôle de traçabilité :

- le typage systématique de lots d'arbres de haute qualité provenant de forêts prestigieuses telles que Tronçais ;
- l'utilisation d'individus traceurs intégrés dans les lots de bois.

En ce qui concerne la distinction des chênes sessile et pédonculé, les tests d'assignation d'un individu à une espèce sur la base d'une combinaison

de marqueurs microsatellites constituent une piste prometteuse. Ce concept de test d'assignation sur profil microsatellite pourrait être appliqué à l'identification de massifs forestiers mais nécessitera, pour être développé, la recherche des marqueurs les plus adaptés et la constitution de base de données de référence par forêt. Il n'en reste pas moins vrai que pour tous ces marqueurs nucléaires, le transfert au bois où l'ADN est fortement dégradé constitue encore un obstacle à franchir. À ce jour les applications semblent limitées à du bois prélevé sur les grumes ou sur merrain vert (avant maturation prolongée dans les parcs à bois des tonnelliers).

Les marqueurs chloroplastiques et microsatellites offrent finalement une palette d'outils potentiellement utilisables pour répondre aux besoins de la filière en matière de contrôle de traçabilité d'origine géographique et botanique des bois de merrain. Cependant, la mise en place de cette traçabilité ne peut se justifier que si elle conduit à valoriser les produits tracés, au travers de démarches collectives (type AOC ou labels) ou individuelles (certification d'entreprises).

Rémy J. PETIT

Inra, UMR Biodiversité,
Gènes et Écosystèmes
Pierroton
petit@pierroton.Inra.fr

Sabine DUMAS

Inra, UMR Biodiversité,
Gènes et Écosystèmes
Pierroton
dumas@pierroton.Inra.fr

François FEUILLAT

ONF, chargé de la mission
« merrain »,
Chalon-sur-Saône
francois.feuillat@onf.fr

Bibliographie

BODÉNÈS C., JOANDET S., LAIGRET F., KREMER A., 1997. Detection of genomic regions differentiating two closely related oak species *Quercus petraea* (Matt.) Liebl. and *Quercus robur* L. *Heredity*, vol. 78, n° 4, pp. 433-444

CHATONNET P., 1995. Influence des procédés de tonnellerie et des conditions d'élevage sur la composition et la qualité des vins élevés en fûts de chêne. Thèse de doctorat de l'Université de Bordeaux II.

DEGUILLOUX M.F., PEMONGE M.H., PETIT R.J., 2002. Novel perspectives in wood certification and forensics : dry wood as a source of chloroplast, mitochondrial and nuclear DNA. *Proceedings of the Royal Society of London : Biological Sciences*, vol. 269, n° 1495, pp. 1039-1046

DOUSSOT F., 2000. Variabilité des teneurs en extractibles des chênes sessile (*Quercus petraea* Liebl.) et pédonculé (*Quercus robur* L.). Influence sur l'élevage des vins. Thèse de doctorat de l'Université de Bordeaux I.

DUMOLIN-LAPÈGUE S., PEMONGE M.H., GIELLY L., TABERLET P., PETIT R.J., 1999. Amplification of DNA from ancient and modern oak wood. *Molecular Ecology*, vol. 8, n° 12, pp. 2137-2140.

FEUILLAT F., 1996. Contribution à l'étude des phénomènes d'échanges bois/vin/atmosphère à l'aide d'un « fût » modèle : relations avec l'anatomie du bois de chêne (*Quercus petraea* Liebl., *Quercus robur* L.). Thèse de doctorat de l'ENGREF Nancy.

FEUILLAT F., DUPOUEY J.L., SCIAMA D., KELLER R., 1997. A new attempt at discrimination between *Quercus petraea* and *Quercus robur* based on wood anatomy. *Canadian Journal of Forest Research*, vol. 27, n° 3, pp. 343-351

MUIR G., FLEMING C.C., SCHLÖTTERER C., 2000. Species status of hybridizing

oaks. *Nature*, vol. 405, n° 6790, p. 1016

NAUDIN R., PAUGET C., 2002. Élevage des vins en fûts de chêne. Influence de la qualité du bois sur la qualité du vin. Rapport de synthèse, ITV-Beaune.

PETIT R.J., CSAIKL U., BORDÁCS S., BURG K., COART E., COTTRELL J., VAN DAM B., DEANS J.D., GLAZ I., DUMOLIN-LAPÈGUE S., FINESCHI S., FINKELDEY R., GILLIES A., GOICOECHEA P.G., JENSEN J.S., KÖNIG A., LOWE A.J., MADSEN S.F., MÁTYÁS G., MUNRO R.C., OLALDE M., PEMONGE M.H., POPESCU F., SLADE D., TABBENER H., TAURCHINI D., ZIEGENHAGEN B., KREMER A., 2002a. Chloroplast DNA variation in European white oaks: phylogeography and patterns of diversity based on data from over 2600 populations. *Forest Ecology and Management*, vol. 156, n° 1-3, pp. 5-26

PETIT R.J., BREWER S., BORDÁCS S., BURG K., CHEDDADI R., COART E., COTTRELL J., CSAIKL U.M., VAN DAM B., DEANS J.D., ESPINEL S., FINESCHI S., FINKELDEY R., GLAZ I., GOICOECHEA P.G., JENSEN J.S., KÖNIG A.O., LOWE A.J., MADSEN S.F., MÁTYÁS G., MUNRO R.C., POPESCU F., SLADE D., TABBENER H., DE VRIES S.G.M., ZIEGENHAGEN B., DE BEAULIEU J.L., KREMER A., 2002b. Identification of refugia and post-glacial colonisation routes of European white oaks based on chloroplast DNA and fossil pollen evidence. *Forest Ecology and Management*, vol. 156, n° 1-3, pp. 49-74

RICHARD H., 2003. Chêne, Bourgogne et nez du vin. *L'amateur de Bordeaux*, pp. 42-46

SAUVAGEOT F., TESSIER C., FEUILLAT F., 2002. Variabilité (espèce, forêt, arbre, largeur de cernes et âge) de l'odeur du Chêne français de tonnellerie (*Quercus robur* L., *Quercus petraea* Liebl.) étudié par flairage de copeaux. *Annals of Forest Science*, vol. 59, n° 2, pp. 171-184