



Université Claude Bernard Lyon 1



INRAE

UR 1268 **bia** Biopolymères
Interactions
Assemblages



Mémoire de fin d'études

Master 2 - Biologie Végétale parcours phytoressources et
phytosciences

UE "Project in Industry or Academic Lab"

**Etude exploratoire de l'impact d'une conduite de vergers
cidricoles bas intrant sur la composition en polyphénols et
en protéines des pommes.**

THILLOY Emilie

Janvier 2023 à juin 2023

Laboratoire d'accueil : INRAE, Bat. 305, Domaine de la Motte, 35653 Le
Rheu

Équipe : Polyphénols Réactivité Procédés

Responsable Master : Gilles COMTE

Maître de stage : Sylvain GUYOT

Co-encadrant : Kevin Billet, Pascal Poupard

Remerciements

Je remercie mon laboratoire d'accueil qui m'a permis de réaliser ce stage. Chacune des personnes de l'équipe PRP a su m'aider de manière différente pour avancer sur mon sujet.

Dans un premier temps, je remercie mon tuteur, Sylvain Guyot, de m'avoir fait confiance pour travailler sur ce sujet.

Un grand merci à Kevin Billet, pour m'avoir soutenu tout au long du stage, d'avoir pris du temps pour répondre à mes questions, de m'avoir suivi et aidé lorsque j'en avais besoin.

Dans l'équipe IFPC, je remercie, Pascal Poupard, de m'avoir guidé sur le sujet et d'avoir alimenté ma réflexion.

Je remercie également l'IGEPP et plus particulièrement Florian Guilbaud et Youssef Bouargalne qui m'ont été d'une grande aide pour avancer sur l'étude des protéines.

Je remercie mes chers parents, qui ont toujours su me faire confiance et me soutenir.

Je remercie également, Angus, pour sa patience, sa confiance et surtout son soutien inconditionnel.

Merci également à mes amis, particulièrement à Lola, Lucie et Charline, qui ont été présentes tout au long de ce stage.

Financement : Ce stage a bénéficié d'un soutien financier de la part du GIS Fruit (<https://www.gis-fruits.org/>)

Table des matières

Table des abréviations.....	
Table des figures	
Introduction.....	1
Matériels et méthodes	3
Composés chimiques	3
Matériel	4
Méthodes	4
Préparation des différents échantillons	4
Extraction des polyphénols à partir du jus de pommes	4
Extraction de protéines à partir de poudres de pommes.....	5
Résultats.....	6
Protéines	6
Traitement des gels.....	6
Constitution du profil protéique après extraction	7
Polyphénols.....	9
Constitution du profil polyphénolique après extraction	9
Discussion	12
Conclusion.....	14
Perspective.....	14
Bibliographie.....	16
Annexes.....	18
Résumé	20
Abstract	20

Nombre de mots : 4675

Table des abréviations

AB : Agriculture biologique

AF : Acide formique

BSA : Albumine de sérum bovin (Bovine serum albumin)

DP : Degré de polymérisation

DTT : Dithiothréitol

EPS : Exopolysaccharides

EmPai : Exponentially modified protein abundance index

HCl : Acide chlorhydrique

IFC : Indicateur de fréquence de traitements

LC : Chromatographie liquide

MeOH : Méthanol

MS : Spectrométrie de masse (Mass spectrometry)

NaF : Fluorure de sodium

NH₄OAc : Acétate d'ammonium

PPO : Polyphénol oxydase

PR protéine : protéine liée à la pathogénicité (Pathogenesis-related protein)

PTFE : Polytétrafluoroéthylène

PVPP : Polyvinylpolypyrrolidone

SDS : Dodécylsulfate de sodium (Sodium dodecylsulfate)

SDS-PAGE : électrophorèse en gel de polyacrylamide contenant du dodécylsulfate de sodium

TCA : Acide trichloracétique

Tris-HCl : Tris-(hydroxyméthyl)-aminométhane chlorhydrate

Table des figures

Figure 1 : Analyse des gels

- **(A)** Analyse SDS-PAGE de 7,5 µg de protéines extraites de poudre de pommes.
- **(B)** Comparaison des intensités des bandes sélectionnées en fonction des variétés et mode de culture

Figure 2 : Comparaison de la quantité relative (EmPai) des 4 protéines retenues après application des paramètres de sélection.

Figure 3 : Analyse du profil polyphénolique

Introduction

Le plan Ecophyto II+ a été mis en place en 2018 à la suite de la directive Européenne 2009/128/CE (*Ecophyto II+*, s. d.). Ce plan national a pour but de diminuer de 50% l'utilisation des produits phytopharmaceutiques afin de diminuer leur impact environnemental. Une façon d'atteindre cet objectif est de privilégier l'agriculture biologique (AB). Depuis 2020, les surfaces en AB ont connu une hausse de 9%, ce qui équivaut à 2,78 millions d'hectares de plus cultivés de manière plus respectueuse de l'environnement (*Quels sont les chiffres du bio en 2021 ?*, s.d.). La pomme fait partie des fruits les plus consommés en France, sous forme de jus ou brute, pour une production de 1,5 million de tonnes en 2022. Sa culture en verger s'accompagne de nombreux traitements, pouvant être toxiques pour l'homme et l'environnement (Zhao *et al.*, 2023). En 2018, la pomme possédait un indice de fréquence de traitement (IFT) de 31,5 pour un verger conventionnel contre un IFT de 18,5 pour un verger biologique (*Enquête Pratiques phytosanitaires en arboriculture en 2018 : IFT et nombre de traitements.*, 2021). En AB, cet indice est divisé par deux, cependant la pomme reste sensible aux attaques de ravageurs, tels que les pucerons, les carpocapses ou champignons (tavelure et oïdium). La conversion des vergers conventionnels en AB ne semble pas accessible au « zéro phytosanitaire » du fait de la forte sensibilité de la pomme aux maladies. En culture conventionnelle, des produits fongicides (captane et trifloxystrobine ou fenbucozanole) permettent le traitement préventif/curatif de *Venturia inaequalis*, l'agent responsable de la tavelure. Ces produits phytosanitaires ne sont pas éligibles en AB, des huiles minérales sont utilisées ou de nouvelles techniques culturales comme le filet Alt'Carpo pour lutter contre le carpocapse sont mises en place. Des stimulateurs des défenses des plantes (Chitosan, EPS bactériens...) peuvent également être ajoutés à ces dispositions. La filière cidricole est aussi concernée par la transition écologique, puisque fin 2020 plus de 30% des surfaces ont été converties en AB et 10% sont en cours de conversion (*Production et consommation de cidres*, 2023). Le

passage de conventionnel à AB entraîne un surcoût pour le consommateur mais permet d'élargir la gamme commerciale et offre un potentiel de valorisation supérieur. L'avantage de la pomme à cidre par rapport à la pomme de table est que son esthétisme n'est pas un critère de sélection ou de qualité, au contraire de sa teneur en nutriments et en métabolites secondaires. Les polyphénols sont des métabolites qui influencent la qualité du jus de pomme. Leur teneur est variable selon les variétés et peut parfois dépasser les 5 g/kg pour les pommes à cidre. Les pommes à cidre possèdent des teneurs plus élevées en polyphénols que les pommes à couteau. À titre d'exemple, la variété cidricole « Avrolles » présente environ 3 g/kg pour moins d'1 g/kg pour la pomme de table « Golden Delicious » (Guyot *et al.*, 2014). Les données de la littérature sont contradictoires quant à l'effet du mode de culture sur les teneurs en polyphénols des produits végétaux (Valavanidis *et al.*, 2009). Toutefois, Głowacka *et al.* (2020) ont montré un accroissement des teneurs en polyphénols sur une culture de cerise acide convertie en AB. Les polyphénols sont des métabolites impliqués dans la défense du pommier lors de stress biotiques et abiotiques. Les composés phénoliques de la pomme sont des flavonoïdes répartis en 6 classes : les acides hydroxycinnamiques, les catéchines, les procyanidines (oligomères également appelés tanins), les flavonols et les anthocyanines. Les trois premières classes représentent 90% des polyphénols des pommes à cidre. Les trois autres sont faiblement accumulées mais jouent un rôle dans les propriétés organoleptiques des jus. De plus, les polyphénols ont des bienfaits antioxydants et sont valorisés pour cette activité dans de nombreux produits alimentaires et cosmétiques. Pour se défendre, le pommier peut également engager sa résistance systémique *via* la synthèse des protéines de défenses PR (pathogenesis related protein). Ces protéines sont fortement accumulées lors de la résistance induite et nécessitent la transcription de gènes. Actuellement, 17 classes de protéines PR aux fonctions différentes sont identifiées dans le règne végétal (Ali *et al.*, 2018). Dans une étude sur le vin, Tian *et al.* (2015) observent une augmentation des

composés polyphénoliques dû au rayonnement UV et une augmentation des protéines PR dans le raisin dû à l'infection par *Erysiphe necator*, l'agent responsable de l'oïdium. Cet article explore les réponses des cépages face aux contraintes environnementales sur la composition en métabolites secondaires des baies et en protéines PR. Notre étude inclut un facteur supplémentaire, le mode de culture : verger conventionnel ou verger AB. Suite à l'analyse de la bibliographie, nous faisons l'hypothèse d'une plus grande variation des teneurs en polyphénols des pommes à cidre issues des vergers AB. En AB, la hausse de la teneur en polyphénols liée aux mécanismes de défense de la plante est susceptible d'accroître la perception d'amertume et de l'astringence. Une augmentation de la concentration des protéines de défense peut également impacter la qualité des jus, puisque leur interaction avec les polyphénols peut former des troubles dans le jus (Millet *et al.*, 2020). Le projet de recherche « Verger Cidricole de Demain » dirigé par l'Institut Français des Productions Cidricoles (IFPC), depuis 2010, vise à produire des jus de pommes en limitant au maximum l'impact environnemental de sa production. Mon projet de stage, prend appui sur le projet SYDRA, projet DEPHY Expé (2019-2024) pilotés par l'IFPC et prend la suite du projet « Vergers de Demain ». Ce nouveau projet est collaboratif puisqu'il implique l'unité de recherche INRAE Biopolymères Interactions Assemblage (UR1268). Notre objectif est double : étudier l'influence du mode de culture sur la composition des jus de pommes ainsi que les teneurs, en polyphénols et en protéines.

Matériels et méthodes

Composés chimiques

L'acétone, le méthanol (MeOH), l'acétonitrile ont été obtenus de Carlo Erba Reagents (Val-de-Reuil, France). Le glycérol, le dodécylsulfate de sodium (SDS), le dithiothréitol (DTT), le phloroglucinol proviennent de Merck (Saint-Quentin Fallavier, France) ainsi que le tris-(hydroxyméthyl)-aminométhane chlorhydrate (Tris-HCl) et l'acide trichloracétique (TCA).

L'acétate d'ammonium (NH₄OAc) est un produit Normapur de VMR chemicals et l'albumine de sérum bovin (BSA) de Biotechnology Grade de VMR amresco. Le phénol a été acheté au sein de Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA).

Matériel

Les récoltes de pommes ont été faites sur un verger constitué de deux parcelles conduites selon deux modes de culture : conventionnel et biologique. Trois variétés ont été cultivées et ramassées au mois de novembre : Dabinett, Douce de l'Avent et Judor. Des lots ont ensuite été constitués pour chaque mode de culture et variété. Certains lots de pommes ont été transformés en jus, et d'autres ont été découpés, broyés puis lyophilisés. Tous les échantillons ont été stockés à -25°C jusqu'à analyse.

Méthodes

Préparation des différents échantillons

Le broyage a été effectué sous atmosphère inerte pour éviter l'oxydation des quartiers de pomme à cidre. Le vide a été fait à l'azote dans une boîte hermétique dédiée au broyage. Les poudres ont été mises en pot et stockées à -25°C.

Les jus ont été faits à partir de pommes pressées et ne sont pas microfiltrés. Le stockage s'est fait dans des tubes à hémolyse contenant du fluorure de sodium (NaF, 50 µg pour 500 µL de jus) permettant d'inhiber l'action de la polyphénol oxydase (PPO). Chaque tube contenait 500 µL de jus pour chaque mode de culture et variété puis ont été stockés à -25°C.

Extraction des polyphénols à partir du jus de pommes

Polyphénols simples

Les jus sont dilués dans une solution MeOH/H₂O/AF (50 : 50 : 0,1) puis mis en vials filtrant (0,45 µm). Les poudres subissent au préalable une extraction des polyphénols. Deux extractions méthanolique acidifié (0,5% v/v d'acide acétique) sont effectuées suivies de

deux extractions acétone/H₂O (40 : 60). L'extraction est effectuée sur 50 mg de poudre. Après ajout du solvant, une étape d'homogénéisation au vortex est réalisée suivie d'un bain ultrason, pendant 10 minutes (Branson 2800 ultrasonic cleaner, 40 kHz) puis centrifugé pendant 15 min x 22082 g. Le surnageant est récupéré dans un nouveau tube et le solvant est évaporé au flux d'azote pour récupérer la matière extraite. Ces étapes sont les mêmes pour chacune des extractions. En fin d'extraction, les échantillons sont lyophilisés sur la nuit. La matière sèche totale est obtenue et diluée dans 500 µL de MeOH/H₂O/AF (50 : 50 : 0,1) puis mise en vials filtrants pour l'analyse LC-MS/MS (UHPLC Vanquish couplée à la trappe d'ion linéaire LTQ-XL, ThermoFisher Scientific).

Tanins condensés

Les échantillons sont mis dans un milieu réactif MeOH/HCl 0,3 M couplé à un mélange Vitamine C et Phloroglucinol. Après incubation à 50°C (30 min), la réaction est stoppée avec de l'acétate de sodium 0,2 M. Après homogénéisation, les échantillons sont mis en vials filtrant pour l'analyse LC-MS/MS.

Extraction de protéines à partir de poudres de pommes

Extraction des protéines

Les protéines ont été extraites à partir d'une méthode : phénol, TCA/Acétone et méthanol. Ce protocole a été décrit par Wei Wang *et al.* (2006). Trois étapes de lavages sont effectuées : TCA 10%/Acétone, MeOH 80%/NH₄OAc 0,1M, Acétone 80%. Entre chaque étape un passage au vortex et une centrifugation (3 min x 15000 g) sont réalisés. Les surnageants sont jetés et pour la dernière étape de lavage les résidus de solvants sont évaporés sous flux d'azote. L'extraction est réalisée avec 800 µL de phénol et 800 µL de SDS buffer (30% glycérol, 2% SDS, 0,1m Tris-HCl, 60 mM de DTT, 1% PVPP). Après incubation (10 minutes, 25°C) et centrifugation (15 000 g, 4°C, 3 minutes) la phase phénolique, contenant les protéines, est récupérée. La précipitation des protéines est réalisée avec du MeOH/NH₄OAc 0,1M sur la nuit. Le lendemain, le culot est centrifugé

(15000 g, 4°C, 6 minutes) et lavé au MeOH puis à l'acétone 80%. Une fois séchées, les protéines sont réhydratées avec un tampon Tris/HCl.

Quantification

La concentration en protéines dans tous les extraits a été déterminée à l'aide d'un kit d'analyse de protéines (Coomassie Plus Assay Kit, Thermo Scientific), suivant la méthode de quantification par Bradford. Le standard utilisé est la BSA, avec une gamme allant de 200 à 1000 µg/mL. La concentration finale extraite en protéines a été ramenée à 600 µg/mL pour chacun des échantillons. Les protéines sont ensuite séparées par électrophorèse SDS-PAGE sur gel concentré à 15% d'acrylamide. Les gels sont scannés avec l'imageur ImageQuant 800, puis traités sur ImageJ afin de comparer l'intensité de certaines bandes.

Identification

L'identification des protéines par LC-MS/MS (U3000 RSLC couplée au QExactive HF, ThermoFisher Scientific) a été réalisée par la plateforme BIBS (INRAE, UR1268 BIA, Nantes). Les analyses protéomiques ont été réalisées sur des « pools » d'échantillons en triplicatas biologiques (un échantillon par variété et mode de culture). Ainsi un total de 6 extraits a été envoyé pour analyse. Ces échantillons « pools » ont été déposés sur gel d'électrophorèse de concentration (gel de stacking). Sur chaque piste de ce gel, une bande d'environ 1 cm a été découpée en 3 bandes verticales. Chacune a ensuite été hydrolysée à la trypsine puis analysée par LC-MS/MS. Les données obtenues ont été comparées à la base de données de *Malus Domestica* d'UniprotKB (UniProt, Taxon ID# 3750, 45,000 séquences environ, datée du 25-04-2023) à l'aide de X!Tandem pipeline.

Résultats

Protéines

Traitement des gels

Deux gels d'échantillons ont été réalisés, ils consistent en la migration de chacun des

réplicas biologiques pour un total de 18 échantillons. Ils ne montrent que peu de différences (annexe 1) avec le gel de pool (présenté en figure 1a). Ce gel de pool étant enrichi par les analyses protéomiques, nous ne considérerons que ce dernier, dans la suite de ces résultats. Le traitement par ImageJ (figure 1b) a pour but de comparer les différentes intensités de bandes obtenues pour chacune des conditions et variétés. À l'œil nu, seules quelques variations sont notables entre variétés. La différence de profil selon le mode de culture n'apparaît pas clairement sur le gel (figure 1a). Huit bandes ont été retenues pour la comparaison car ce sont les plus intenses et discernables. Une intégration a été faite pour chaque bande sélectionnée et les aires obtenues ont été retraitées sous forme de tableau, pour obtenir l'histogramme qui compare les différentes intensités (figure 1b). On constate que les intensités sont proches entre les modes de culture, mais on note une différence variétale. Les bandes 1, 2 et 4 sont celles qui présentent le plus de différences entre variétés. Pour une bande, plusieurs protéines de même taille peuvent être regroupées. Afin d'identifier les protéines les plus exprimées pour nos bandes d'intérêt, un traitement par LC-MS/MS a été réalisé.

Constitution du profil protéique après extraction

Après analyse par LC-MS/MS, les protéines trouvées dans chacun des échantillons ont été traitées par la base de données X!Tandem pipeline avec la banque de données de *Malus domestica*. Plus de 600 protéines ont été détectées dans chaque échantillon. Pour faire ressortir les principales protéines présentes dans chaque échantillon, trois paramètres ont été fixés : l'EmPai devait avoir une valeur supérieure à 40 %, le nombre de spectres devait être supérieur à 100 et le LogE inférieur à -150. L'EmPai correspond à l'abondance relative d'une protéine et se calcule en tenant compte du nombre de spectre et du nombre de peptides théoriques après digestion. Le LogE est une évaluation statistique qui reflète la fiabilité d'identification d'une protéine, plus il est faible et plus la chance d'avoir un faux

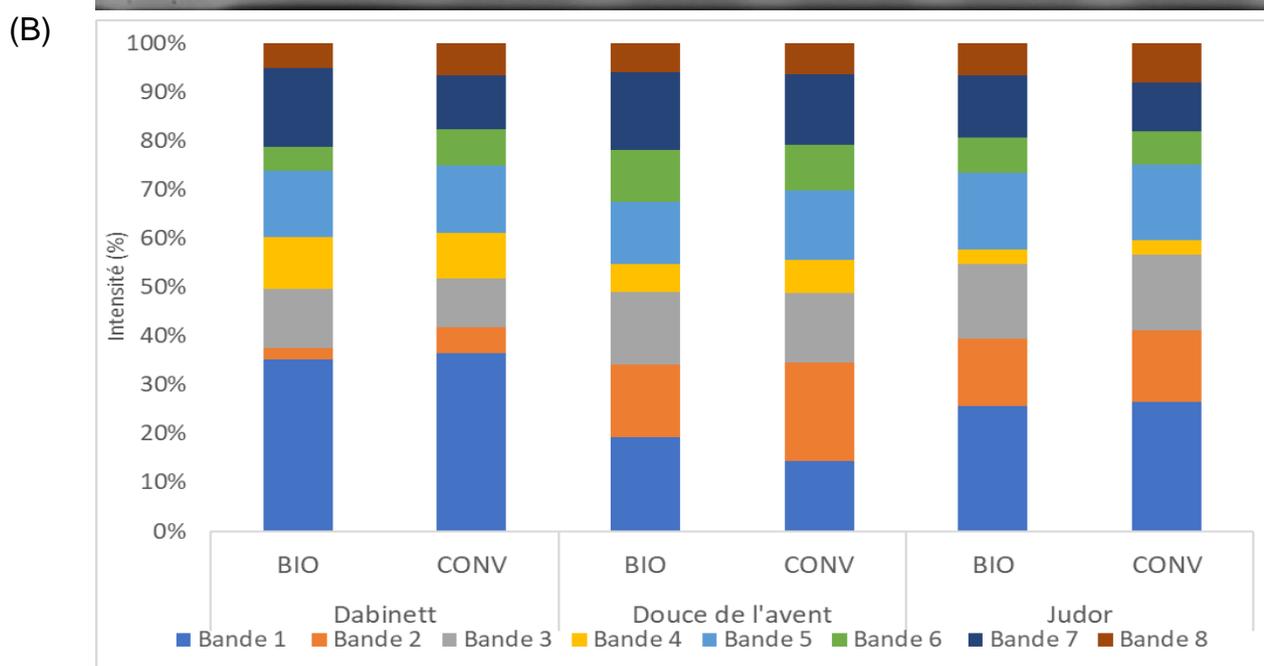
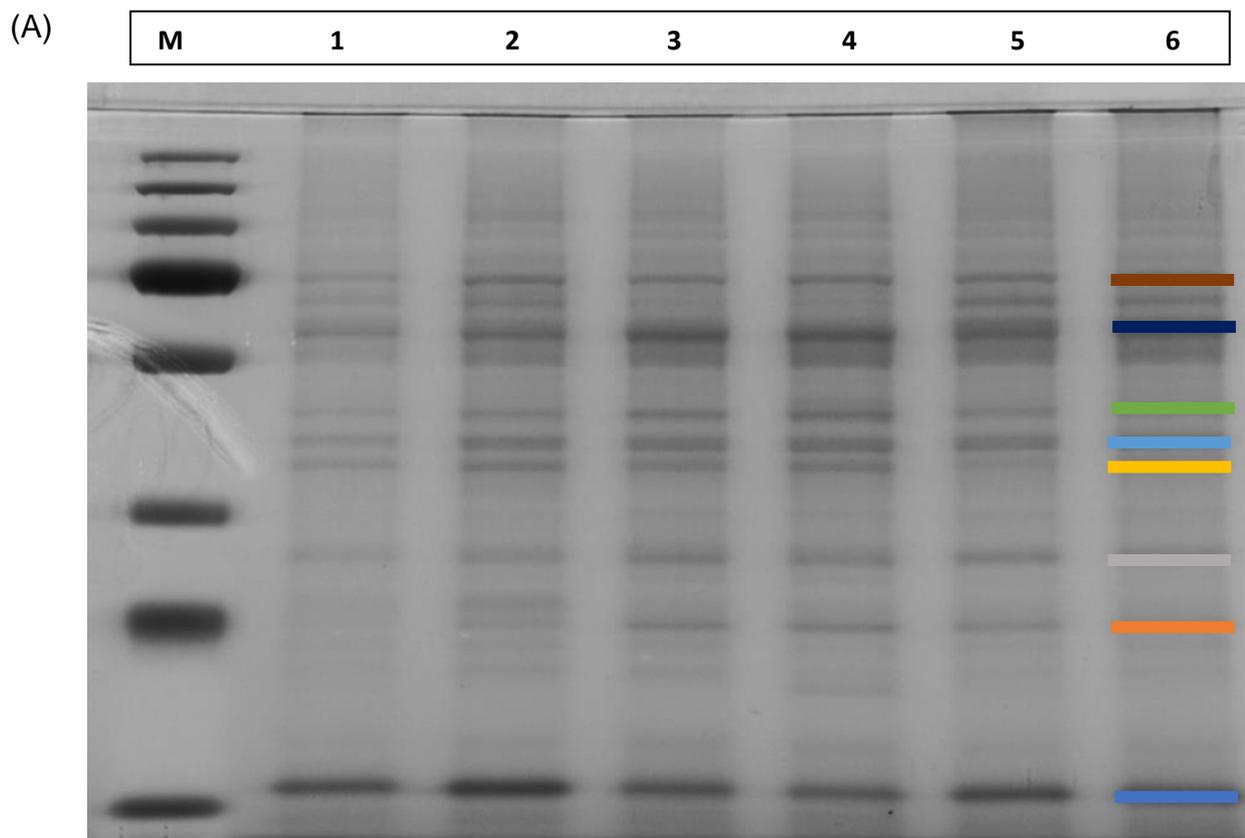


Figure 1 : Analyse des gels. (A) Analyse SDS-PAGE de 7,5 µg de protéines extraites de poudre de pommes. M : Marqueur de taille. 1 : Dabinett biologique ; 2 : Dabinett conventionnel ; 3 : Douce de l'avenant biologique ; 4 : Douce de l'avenant conventionnel ; 5 : Judor biologique ; 6 : Judor conventionnel **(B)** Comparaison des intensités des bandes sélectionnées (figure 1a) en fonction des variétés et modes de culture. Une bande représente la quantité relative de protéines ayant le même poids (kDa). Bande 1 (15 kDa, bleu) ; Bande 2 (25 kDa, orange) ; Bande 3 (30 kDa, gris) ; Bande 4 (40 kDa, jaune) ; Bande 5 (45 kDa, bleu clair) ; Bande 6 (50 kDa, vert) ; Bande 7 (60 kDa, bleu foncé) ; Bande 8 (70 kDa, marron)

positif est faible. Après application de ces paramètres, nous avons obtenus un total de 11 familles de protéines qui constituent autant de groupes. Chaque groupe est identifié par une même signature spectrale et peptidique pouvant se différencier par quelques peptides spécifiques. L'identification de ces spécificités peptidiques permet de constituer des sous-groupes au sein d'une même famille. Les paramètres ont permis d'identifier : Enzyme malique (64 kDa), Glutamine synthase (38kDa), Tyrosinase (74kDa), Glycéraldéhyde-3-phosphate (36kDa), MALD1 (17kDa), Thiamine thiazole (37kDa), MALD2 (25 kDa), Triosephosphate (27kDa), Acétyl-coenzyme A carboxylase (35 kDa), Déhydrine (31 kDa), Actine (43kDa). Les protéines que nous avons retenues sont : MALD1(17kDa), MALD2(25kDa), Déhydrine (31kDa) et la Tyrosinase (74kDa). Ses quatre protéines sont retenues car elles sont impliquées dans la défense lors d'un stress ou d'une attaque. Dans l'histogramme présenté en figure 2, on constate une différence entre variétés et également entre modes de culture. MALD1 présente un EmPai plus important pour le mode de culture biologique chez Douce de l'avent et Judor. MALD2 varie peu et a un EmPai de 65 en moyenne entre variété et condition, à part pour Dabinett conventionnel où elle semble plus s'exprimer (index de 214). La Déhydrine s'exprime chez Judor, dans les deux modes de culture mais plus en conventionnel, et seulement chez Douce de l'avent conventionnel. La tyrosinase s'exprime avec un EmPai moyen de 52, pour Dabinett et Douce de l'Avent et est légèrement plus élevée chez Judor (index de 158 en moyenne).

Polyphénols

Constitution du profil polyphénolique après extraction

Polyphénols simples

Trois familles de polyphénols ont été comparées en fonction du mode de culture et de la variété : les acides hydroxycinnamiques, les flavan-3-ols et les dihydrochalcones. Sur l'histogramme (figure 3), on constate qu'il n'y a pas de différence majeure entre les profils

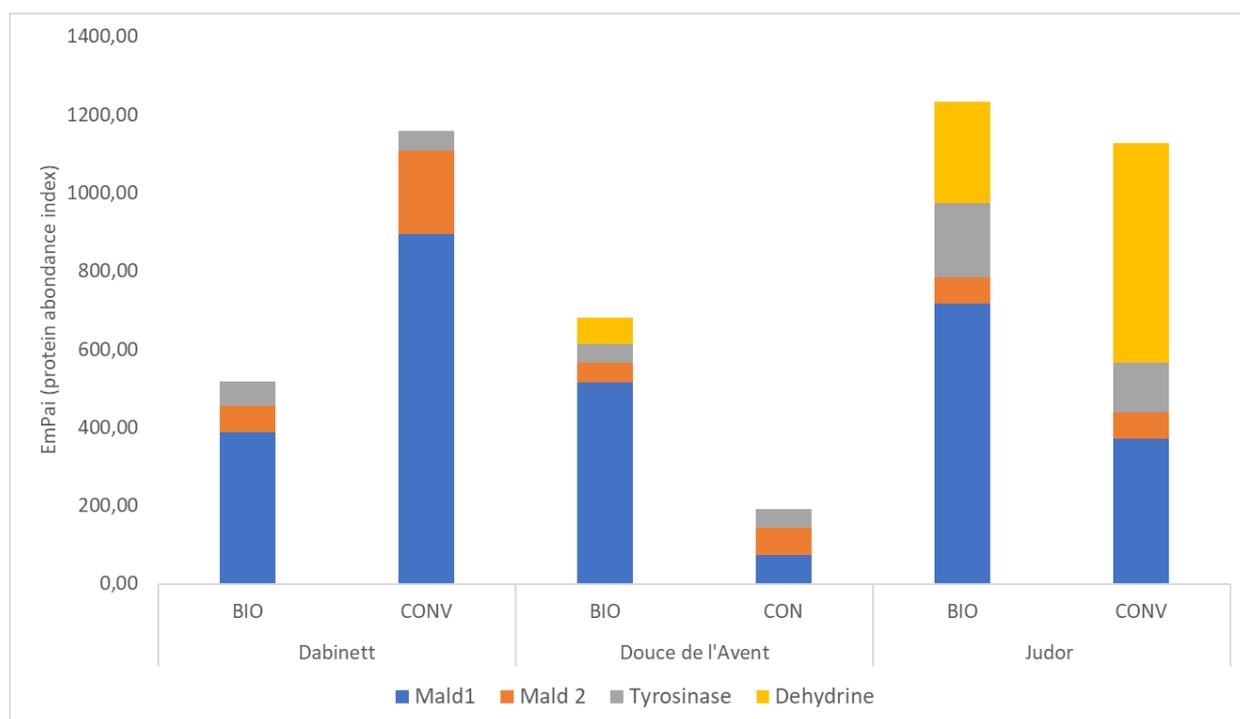


Figure 2 : Comparaison de la quantité relative (EmPai) des 4 protéines retenues après application des paramètres de sélection. MALD1/MALD2 : protéines de défenses ; Tyrosinase : PPO ; Déhydrine : Protéine induite par un stress abiotique. Représentation de l'EmPai (abondance relative d'une protéine) des 4 protéines sélectionnées en fonction de nos variétés et modes de culture.

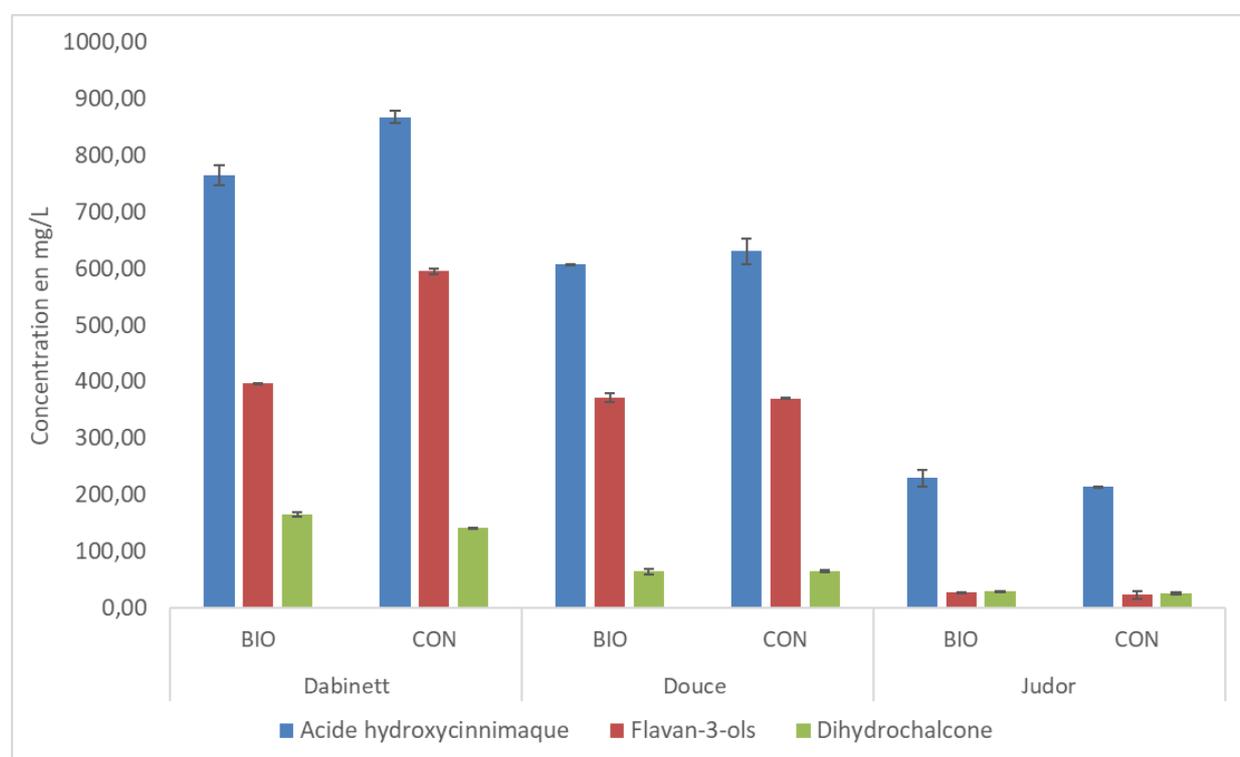


Figure 3 : Analyse du profil polyphénolique. Représentation de la concentration en mg/L de trois familles de polyphénols (Acide hydroxycinnamique (bleu), Flavan-3-ols (rouge), Dihydrochalcone (vert)) en fonction des variétés et du mode de culture.

polyphénoliques selon le mode de culture. Les différences sont en fonction de la variété considérée. Lorsque l'on fait la somme des concentrations des 3 familles de composés : Dabinett présente 1,4g/L en AB contre 1,6 g/L en conventionnel ; Douce de l'Avent possède 1,04 g/L en condition AB contre 1,6 g/L en conventionnel ; Douce de l'Avent possède 1,04 g/L en condition AB contre 1,06 g/L en conventionnel ; Judor 285 mg/L possède AB contre 262 mg/L en conventionnel.

Tanins condensés

Une analyse supplémentaire a été réalisée afin de quantifier les polyphénols plus complexes, les tanins. Ce sont des polymères de catéchines non hydrolysables, aussi appelés tanins condensés, qui ne sont pas accessibles par la méthode de quantification des polyphénols simples. Pour analyser la teneur de ces tanins, la phloroglucinolyse est utilisée. Elle consiste à former des carbocations depuis des tanins condensés grâce à un milieu réactionnel méthanolique acide et anhydre permettant l'hydrolyse acide de ces polymères de catéchine. Le phloroglucinol est alors capable de s'associer aux unités d'élongation pour former des dérivés de catéchine-phloroglucinol qui seront quantifiables en LC-UV-MS. Après traitement des données, des calculs ont été réalisés pour obtenir la concentration en procyanidines, ainsi que le degré de polymérisation moyen (Annexes 2 et 3). Les résultats obtenus suivent les résultats obtenus pour les polyphénols simples. Encore une fois, aucune différence culturelle n'est révélée entre modes de culture, seulement variétale. Dabinett possède une concentration élevée en procyanidine, avec une teneur moyenne de 1060 mg/mL. Douce de l'Avent a une teneur légèrement moins élevée, en moyenne 426 mg/mL et Judor une teneur faible, en moyenne 52 mg/mL. On constate que Dabinett possède 20 fois plus de polyphénols que Judor et 2,5 fois plus que Douce de l'Avent. Le degré de polymérisation (DP) a été calculé sur la base de cette concentration en procyanidines. Aucune différence n'a été constatée entre les variétés, en moyenne le DP se trouve à 3,57.

Discussion

Cette étude nous a permis d'établir le profil polyphénolique et protéique des variétés Dabinett, Douce de l'avent et Judor. Un total de 11 familles de protéines ont été retenues dans la poudre de pommes, après application des paramètres de sélection ($EmPAI > 40$, nb de spectre > 100 , $LogE < -150$). Les protéines ciblées sont liées aux réponses aux stress biotiques ou abiotiques, 2 protéines de la famille des protéines PR, MALD1 et MALD2 ainsi qu'une Tyrosinase et une Déhydrine ressortent comme indicatrices de la variété et/ou des modes de culture. Les protéines PR sont exprimées en réponse à une attaque de pathogène : MALD1 est impliquée dans la défense virale, MALD2 intervient contre les champignons (Master BV, L. Frayssinet, MSP). Suite à la prévalence de MALD1 chez Douce de l'avent et Judor en condition biologique, on peut supposer que ces pommes ont subi des attaques virales (mosaïque, virus du bois rayé...). Pour la variété Dabinett, on observe, au contraire, un $EmPai$ élevé chez MALD1 en condition conventionnel qu'en AB. Pour MALD2, aucune différence n'est observée chez Douce de l'Avent et Judor. Cependant, Dabinett a un $EmPai$ plus élevé en condition conventionnelle. Le traitement conventionnel a eu plus d'effet sur Douce de l'avent et Judor, que sur Dabinett, après étude du profil polyphénolique. Néanmoins, le gel de pool (figure 1b), montre une concentration de dépôt de protéines sur le gel, légèrement plus faible chez Dabinett biologique. La concentration en protéines a été calculée de façon à être égale pour chaque échantillon, et le même dépôt ($7,5\mu g$ de protéines) a été effectué pour chaque puit. Cette différence peut amener à un biais sur la proportion obtenue sur la figure 2, pour Dabinett en AB. Une nouvelle extraction et dépôt serait nécessaire pour confirmer une abondance moins élevée des protéines PR en AB chez Dabinett. La Déhydrine, est une protéine qui s'exprime lors d'un stress abiotique (sécheresse ou froid) et qui joue un rôle important dans la maturation de la graine (Sun *et al.*, 2021). Elle s'est exprimée seulement dans la variété Judor et Douce de l'Avent en AB. Dans notre verger, les pommes ont été confrontées à différents stress, cependant ils n'ont

pas eu les mêmes conséquences sur les variétés analysées. Les moyens de défense d'une plante sont multiples, et ils peuvent aussi différer selon les variétés. La plante peut mettre en place d'autres voies de biosynthèse qui vont engager d'autres métabolites secondaires (Zaynab *et al.*, 2018). La Tyrosinase est une protéine apparentée à la PPO. Son activité a été limitée dans nos expériences puisque les poudres ont été broyées à l'abri de l'oxygène et les jus mis en présence de NaF. Le but était d'obtenir un profil polyphénolique non oxydé, qui ne pouvait être obtenu qu'en bloquant l'activité de cette enzyme. Les profils polyphénoliques obtenus ne montrent aucune différence notable entre modes de culture mais seulement entre variétés. Dabinett possède beaucoup de polyphénols, on peut penser que l'un de ses moyens de défense passe par la voie de synthèse des polyphénols. En effet, dans cette variété, la Déhydrine n'a pas été retenue dans les protéines les plus exprimées. Pour Judor, on constate une très faible quantité de polyphénols. Au contraire de Dabinett, Judor a une tendance à déployer davantage l'expression de protéines lors d'une attaque, comme la Déhydrine. Les moyens déployés par chaque variété sont différents et spécifique à la variété et ses conditions de croissance (environnement biotique et abiotique). La différence variétale est prépondérante, la variété Dabinett, est celle qui possède les plus fortes concentrations en polyphénols. On remarque que sa teneur en polyphénols est moins élevée en condition AB. Cependant, le DP moyen ne montre aucune différence entre les modes de culture. Une étude plus approfondie sur plus de parcelles serait nécessaire. La répartition des moyens de défense chez une même plante peut varier, soit par les voies de biosynthèse qu'elle met en place, soit par les traitements qui ont été apportés. Pour les pommes, les modes de culture biologique subissent quand même l'apport de certains produits phytosanitaires admis en AB (cuivre, soufre, bicarbonate de potassium etc.). Chez la pomme, beaucoup de maladies sont référencées, ce sont des vergers sensibles qui demandent beaucoup de traitements. L'IFT est moins élevé en AB, cependant il reste important, cela peut être une cause de cette faible variabilité entre mode de culture.

Conclusion

La comparaison du profil polyphénolique et protéique est importante pour déterminer l'impact que peut avoir un changement de mode de culture. Dans cette étude, trois variétés de pomme à cidre ont été sélectionnées. Pour le profil protéique, les protéines les plus abondantes retenues sont de la même famille pour chacune des variétés et mode de culture, à part la Déhydrine qui est ressortie seulement chez Judor et Douce de l'Avent. Certaines abondances relatives de protéines sont différentes entre mode de culture, de ce fait une étude temporelle et une analyse quantitative de chaque échantillon et réplicas biologique permettrait d'affiner nos conclusions. Le profil polyphénolique n'affiche qu'une différence variétale. Dabinett en culture conventionnelle a une concentration légèrement supérieure à celle cultivée en AB, mais va à l'encontre de notre hypothèse. Une étude plus poussée est nécessaire pour confirmer cette légère différence. Notre hypothèse d'une sollicitation des polyphénols et protéines supérieures en AB ne peut être confirmée. On constate que les profils entre AB et conventionnel se rapprochent fortement.

Perspective

Pour améliorer cette étude, un suivi au cours du temps comme réalisé par Stracke *et al.* (2009), sur la pomme « *Golden Delicious* », permettrait d'obtenir plus de données pour avancer une différence entre modes de culture. Au fil des années, les plantes ne subissent pas les mêmes attaques, les traitements apportés et les défenses naturelles peuvent varier. La température, le stress hydrique sont des paramètres auxquels la plante doit s'acclimater et mettre des moyens de défense en place (Szepesi *et al.*, 2021). Cela peut être combiné à l'augmentation du nombre de variétés et de parcelles. Une étude sensorielle pourrait suivre, puisque la qualité du jus peut être impactée par le profil polyphénolique et protéique. Les polyphénols sont capables d'interagir avec les protéines, comme le démontre Castillo-Fraire *et al.* (2021). Les quantités supérieures dans les produits à base de pommes pourraient

ainsi présenter une amertume et une astringence augmentées (Li & Duan, 2019). Pour finir, une étude sur la capacité antioxydante des polyphénols, comme effectuée par Masi *et al.* (2017) sur des pommes de table pourrait être intéressante. Les pommes à cidre possèdent plus de polyphénols et peuvent avoir une capacité antioxydante plus élevée. Cependant, la protéine MALD1, est connue pour son caractère allergène. Cette allergie apparaît chez les personnes allergiques au pollen du bouleau (Betv1). Après réaction croisée des anticorps IgE de Betv1 avec Mald1, des symptômes apparaissent (Ahammer *et al.*, 2017). Beaucoup de sujets peuvent se relier sur l'étude des profils polyphénoliques et protéiques chez la pomme en AB. Obtenir des résultats concluants sur l'augmentation des métabolites secondaires et protéines de défense peut être un tremplin vers une transition environnementale plus durable.

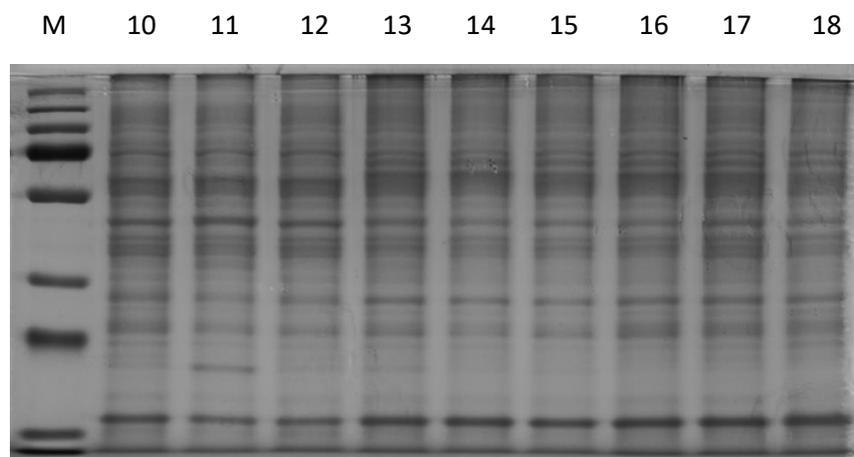
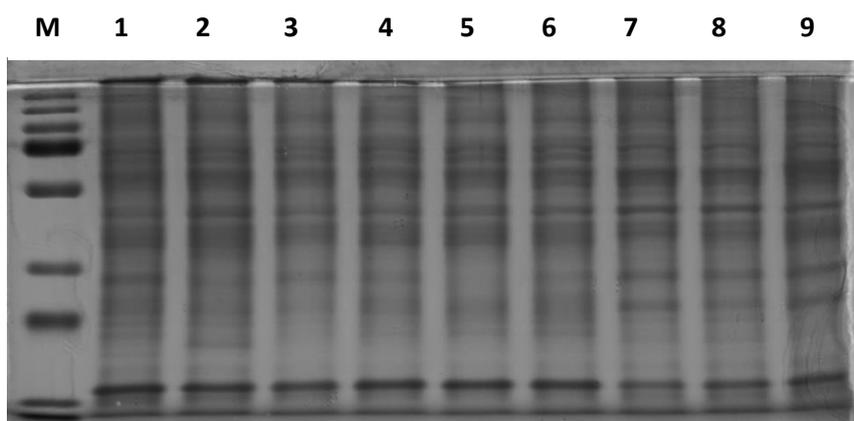
Bibliographie

- Ali, S., Ganai, B. A., Kamili, A. N., Bhat, A. A., Mir, Z. A., Bhat, J. A., Tyagi, A., Islam, T., Mushtaq, M., Yadav, P., Rawat, S., & Grover, A. (2018b). Pathogenesis-related proteins and peptides as promising tools for engineering plants with multiple stress tolerance. *Microbiological Research*, 212-213, 29-37. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.04.008>
- Ahammer, L., Grutsch, S., Kamenik, A. S., Liedl, K. R., & Tollinger, M. (2017). Structure of the Major Apple Allergen Mal d 1. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(8), 1606-1612. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b05752>
- Castillo-Fraire, C. M., Brandão, E., Poupard, P., Quére, J. L., Salas, E., De Freitas, V., Guyot, S., & Soares, S. (2021). Interactions between polyphenol oxidation products and salivary proteins : Specific affinity of CQA dehydrodimers with cystatins and P-B peptide. *Food Chemistry*, 343, 128496. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128496>
- ECOPHYTO II+. (s. d.). *sante.gouv.fr*. https://sante.gouv.fr/IMG/pdf/plan_ecophyto2_.pdf
- Enquête Pratiques phytosanitaires en arboriculture en 2018 : IFT et nombre de traitements. (2021, mai). *agreste.agriculture.gouv.fr*. https://agreste.agriculture.gouv.fr/agreste-web/download/publication/publie/Chd2108/cd2021-8_IFT-phytofruits_2018.pdf
- Głowacka, A., Rozpara, E., & Hallmann, E. (2020). The Dynamic of Polyphenols Concentrations in Organic and Conventional Sour Cherry Fruits : Results of a 4-Year Field Study. *Molecules*, 25(16), 3729. <https://doi.org/10.3390/molecules25163729>
- Guyot, S., Symoneaux, R., Le Quéré, JM., Bauduin R. (2014). *Les Polyphénols de la pomme aux cidres : diversité variétale et procédés, facteurs clé de la modulation des saveurs et des couleurs*. <https://hal.inrae.fr/hal-02629833>
- Li, S., & Duan, C. (2019). Astringency, bitterness and color changes in dry red wines before and during oak barrel aging : An updated phenolic perspective review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59(12), 1840-1867. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1431762>
- Masi, E., Taiti, C., Vignolini, P., Petrucci, A., Giordani, E., Heimler, D., Romani, A., & Mancuso, S. (2017). Polyphenols and aromatic volatile compounds in biodynamic and conventional 'Golden Delicious' apples (*Malus domestica* Bork.). *European Food Research and Technology*, 243(9), 1519-1531. <https://doi.org/10.1007/s00217-017-2861-y>
- Millet, M., Poupard, P., Guilois-Dubois, S., Poiraud, A., Fanuel, M., Rogniaux, H., & Guyot, S. (2020b). Heat-unstable apple pathogenesis-related proteins alone or interacting with polyphenols contribute to haze formation in clear apple juice. *Food Chemistry*, 309, 125636. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125636>

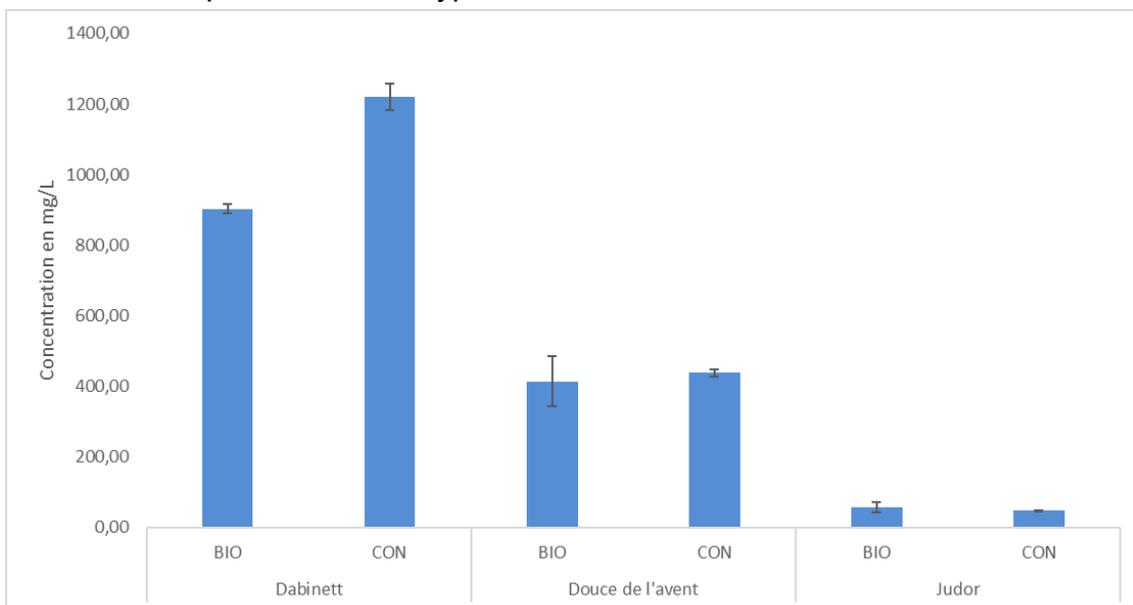
- Production et consommation de cidres.* (2023, 9 juin). <https://chambres-agriculture.fr/actualites/toutes-les-actualites/detail-de-lactualite/actualites/production-et-consommation-de-cidres/>
- Quels sont les chiffres du bio en 2021 ?* (s. d.). Ministère de l'Agriculture et de la Souveraineté alimentaire. <https://agriculture.gouv.fr/quels-sont-les-chiffres-du-bio-en-2021>
- Stracke, B., Rüfer, C. E., Weibel, F., Bub, A., & Watzl, B. (2009). Three-Year Comparison of the Polyphenol Contents and Antioxidant Capacities in Organically and Conventionally Produced Apples (*Malus domestica* Bork. Cultivar 'Golden Delicious'). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(11), 4598-4605. <https://doi.org/10.1021/jf803961f>
- Sun, Z., Li, S., Chen, W., Zhang, J., Zhang, L., Sun, W., & Wang, Z. (2021). Plant Dehydrins : Expression, Regulatory Networks, and Protective Roles in Plants Challenged by Abiotic Stress. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(23), 12619. <https://doi.org/10.3390/ijms222312619>
- Szepesi, Á. (2021). Plant Metabolites and Regulation under Environmental Stress. *Plants*, 10(10), 2013. <https://doi.org/10.3390/plants10102013>
- Tian, B., Harrison, R., Jaspers, M. V., & Morton, J. P. (2015). Influence of ultraviolet exclusion and of powdery mildew infection on Sauvignon Blanc grape composition and on extraction of pathogenesis-related proteins into juice. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 21(3), 417-424. <https://doi.org/10.1111/ajgw.12135>
- Valavanidis, A., Vlachogianni, T., Psomas, A., Zovoili, A., & Statis, V. (2009). Polyphenolic profile and antioxidant activity of five apple cultivars grown under organic and conventional agricultural practices. *International Journal of Food Science and Technology*, 44(6), 1167-1175. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2009.01937.x>
- Wang, W., Vignani, R., Scali, M., & Cresti, M. (2006). A universal and rapid protocol for protein extraction from recalcitrant plant tissues for proteomic analysis. *ELECTROPHORESIS*, 27(13), 2782-2786. <https://doi.org/10.1002/elps.200500722>
- Zaynab, M., Fatima, M., Abbas, S., Sharif, Y., Umair, M., Zafar, M., & Bahadar, K. (2018). Role of secondary metabolites in plant defense against pathogens. *Microbial Pathogenesis*, 124, 198-202. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.08.034>
- Zhao, H., Li, R., & Hu, J. (2023b). Frequently used pesticides and their metabolites residues in apple and apple juice from markets across China : Occurrence and health risk assessment. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 178, 114610. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2023.114610>

Annexes

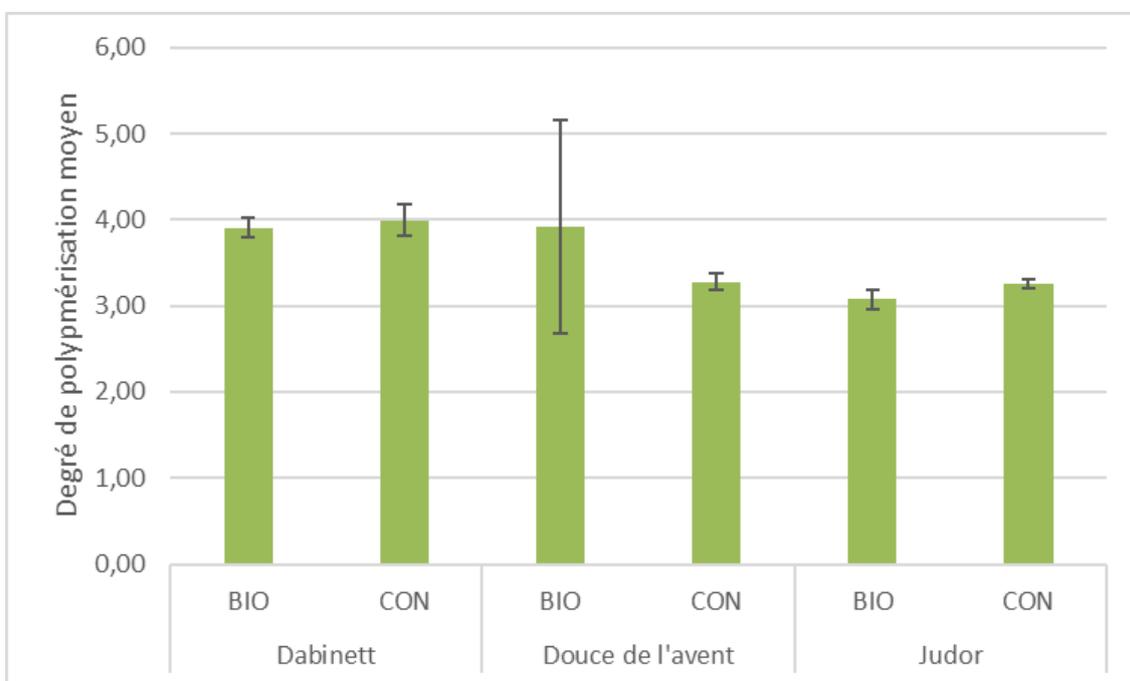
Annexe 1 : Gels SDS-PAGE représentant les 18 échantillons. Analyse des 18 échantillons sur gel SDS-PAGE de 5 µg de protéine extraite de poudre de pommes. M : Marqueur de tailles ; 1 : Dabinett biologique 1 ; 2 : Dabinett biologique 2 ; 3 : Dabinett biologique 3 ; 4 : Dabinett conventionnel 1 ; 5 : Dabinett conventionnel 2 ; 6 : Dabinett conventionnel 3 ; 7 : Douce de l'Avent biologique 1 ; 8 : Douce de l'Avent biologique 2 ; 9 : Douce de l'Avent biologique 3 ; 10 : Douce de l'Avent conventionnel 1 ; 11 : Douce de l'Avent conventionnel 2 ; 12 : Douce de l'Avent conventionnel 3 ; 13 : Judor biologique 1 ; 14 : Judor biologique 2 ; 15 : Judor biologique 3 ; 16 : Judor conventionnel 1 ; 17 : Judor conventionnel 2 ; 18 : Judor conventionnel 3.



Annexe 2 : Histogramme représentant la concentration en procyanidines. La concentration en procyanidines a été obtenue grâce à la phloroglucinyse. Elle est représentée en fonction des différentes variétés et modes de culture. Les barres d'erreur ont été calculées à partir de l'écart type.



Annexe 3 : Histogramme représentant le DP moyen. Le DP moyen est représenté en fonction des différentes variétés et modes de culture. Aucune différence entre modes de culture n'est retenue sur le DP moyen.



Résumé

Dans un mode de culture biologique, la plante va solliciter ses défenses naturelles en vue de la baisse des traitements phytosanitaires. Elle est soumise à des contraintes biotiques et abiotiques et doit s'adapter à son environnement. Les voies de synthèse des polyphénols et la concentration des protéines de défense peuvent contribuer à cette adaptation. Dans cette étude, le profil polyphénolique et protéique de trois variétés de pommes à cidre (Dabinett, Douce de l'Avent et Judor) a été comparé dans 2 modes de cultures : biologique et conventionnel. Une augmentation des teneurs en polyphénols et en protéines est attendue dans un mode de culture biologique. Le profil polyphénolique a été obtenu grâce à des techniques d'analyses élaborées par le laboratoire (INRAE, PRP). Une extraction des polyphénols natifs puis des tanins condensés a été effectuée et lancée en analyse LC-MS. Pour le profil protéique, la technique d'extraction au phénol a été inspirée des travaux de Wang *et al.* (2006). La révélation des protéines extraites a été effectuée sur gel d'électrophorèse SDS-PAGE puis une identification des protéines a été faite par LC-MS/MS. Aucune différence n'a été trouvée dans le profil polyphénolique. Le mode de culture n'a eu aucun impact, cependant une différence variétale a été montrée. Pour les protéines, certaines ont montré des teneurs différentes (MALD1, Déhydrine) selon le mode de culture, principalement pour Judor et Douce de l'Avent. En vue de la variabilité des conditions de culture et de l'environnement, une étude temporelle serait nécessaire. L'augmentation du nombre de variétés et de parcelles peut également être important à l'obtention de données robustes.

Mots-clés : Pommes à cidre, polyphénols, protéines, PR, biologique, conventionnel, gel SDS-page, LC-MS/MS

Abstract

In organic farming, the plant's natural defenses are put to the test, thanks to the reduction in phytosanitary treatments. It is subject to biotic and abiotic constraints and must adapt to its environment. Polyphenol synthesis pathways and the concentration of defense proteins can contribute to this adaptation. In this study, the polyphenol and protein profiles of three cider apple varieties (Dabinett, Douce de l'Avent and Judor) were compared under 2 cropping systems: organic and conventional. An increase in polyphenol and protein content is expected in organic cultivation. The polyphenolic profile was obtained using analytical techniques developed by the laboratory (INRAE, PRP). First, native polyphenols were extracted, then condensed tannins, using LC-MS analysis. For the protein profile, the Phenol extraction technique was inspired by the work of Wang *et al.* (2006). The extracted proteins were developed on SDS-Page gel electrophoresis and then identified by LC-MS/MS. No differences were found in the polyphenolic profile. Cultivation method had no impact, although a varietal difference was demonstrated. For proteins, some showed different proportions (MALD1, Dehydrin) according to cultivation method, mainly for Judor and Douce de l'Avent. In view of the variability of growing conditions and environment, a temporal study would be necessary. Increasing the number of varieties and plots may also be important in obtaining robust data.

Keywords : Cider apples, polyphenols, proteins, PR, organic, conventional, SDS-page gel, LC-MS/MS