



**Master 2<sup>ème</sup> année cohabilité : Université  
d'Angers, de Bretagne Occidentale de Nantes, de  
Poitiers, de Rennes 1, de Tours et Agrocampus  
Ouest**

**INRA, UMR1345 Institut de Recherche  
en Horticulture et Semences,  
49045 Angers, France**

**RAPPORT de STAGE EFFECTUE**

**par**

**Mathieu MARC**

**à**

**l'IRHS**

**INRA, UMR1345 Institut de Recherche en Horticulture et Semences, 49045 Angers, France  
en vue de l'obtention du**

**Master 2<sup>ème</sup> Année STS**

**Spécialité : Biologie Végétale Intégrative : Gène, Plante, Agrosystème (BioVIGPA)**

**(Responsable de stage :**

**Mathilde ORSEL, Chargée de recherche, INRA**

**Mickael DELAIRE, Maître de conférences, Agrocampus Ouest)**

**Titre du Sujet :**

**ÉTUDE DU DETERMINISME MOLECULAIRE DE L'ECHAUDURE SUPERFICIELLE  
CHEZ LA POMME**

**Soutenance devant le jury d'examen le 23 juin 2016**





**Master 2<sup>ème</sup> année cohabilité : Université  
d'Angers, de Bretagne Occidentale de Nantes, de  
Poitiers, de Rennes 1, de Tours et Agrocampus  
Ouest**

**INRA, UMR1345 Institut de Recherche  
en Horticulture et Semences,  
49045 Angers, France**

**RAPPORT de STAGE EFFECTUE**

**par**

**Mathieu MARC**

**à**

**l'IRHS**

**INRA, UMR1345 Institut de Recherche en Horticulture et Semences, 49045 Angers, France  
en vue de l'obtention du**

**Master 2<sup>ème</sup> Année STS**

**Spécialité : Biologie Végétale Intégrative : Gène, Plante, Agrosystème (BioVIGPA)**

**(Responsable de stage :**

**Mathilde ORSEL, Chargée de recherche, INRA**

**Mickael DELAIRE, Maître de conférences, Agrocampus Ouest)**

**Titre du Sujet :**

**ÉTUDE DU DETERMINISME MOLECULAIRE DE L'ECHAUDURE SUPERFICIELLE  
CHEZ LA POMME**

**Soutenance devant le jury d'examen le 23 juin 2016**



## Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Jean-Pierre Renou, directeur de l'unité IRHS, pour m'avoir accueilli au sein de l'institut et François Laurens pour m'avoir accueilli au sein de l'équipe Qualipom.

Je remercie le GIS Fruits pour avoir soutenu financièrement le stage.

Je remercie également Mathide Orsel et Mickael Delaire de m'avoir guidé tout au long de mon stage, de m'avoir transmis leur savoir et d'avoir été disponibles et à l'écoute.

Merci à Maryline Cournol qui m'a formé sur toutes les techniques en laboratoire, pour sa patience, sa bonne humeur et sa gentillesse. Merci également à Marie-Charlotte Guillou, Muriel Bahut, Elisa Ravon, Marie Noel Brisset, Matthieu Gaucher, qui m'ont accordé du temps et apporté leur aide.

Merci à tous pour cet accueil chaleureux. L'ambiance studieuse et amicale qui règne dans chaque équipe m'a permis de m'intégrer au mieux et de réaliser mon stage dans les meilleures conditions.

Et merci à Ellen, Alice, Pamela, Anaïs, Chloé et Jordan pour tous ces bons moments qu'on a passé ensemble, l'entraide, le partage, la joie et les rires.



# Table des matières

## Abréviations

### 1. Introduction bibliographique

1.1.Présentation du projet et problématique du stage.....1-2

1.2.Etat de la littérature.....3-7

### 2. Matériel et méthodes

2.1.Plan expérimental.....8

2.2.Analyse du transcriptome .....9-11

2.3.Analyses biochimiques.....12

### 3. Résultats

3.1.Effet des traitements et du mode de conservation sur la qualité des fruits .....13

3.2.Analyse du transcriptome des pelures de fruits.....14-15

3.3.Effet des traitements sur les activités anti-oxydantes dans l'épiderme du fruit.....16

### 4. Discussion

4.1. Incidence des symptômes de l'échaudure et efficacité des traitements .....17

4.2. Voies métaboliques induites par le MeJA .....17

4.3.Traitement au MeJA avance la maturité du fruit.....18

4.4.Action du MeJA sur l'apparition des symptômes de l'échaudure .....19

5. Conclusion .....20

6. Perspectives.....20

## Référence bibliographique





## **Abréviations**

AC : atmosphère contrôlée

Ctrl : contrôle

CT : triènes conjugués

Ctols : triénols conjugués

DMSO : diméthyl sulfoxyde

DPA : diphénylamine

Eth : éthylène

FN : froid normal

JA : acide jasmonique

MeJA : méthyl-jasmonate

MHO : 6-méthyle-5-heptène-2-one

MF : matière fraîche

Mt : millions de tonnes

PPO : polyphénol oxydase

POX : peroxydase

ROS : reactive oxygen species (Formes toxiques d'oxygène)

TA : température ambiante

Th : thérapie

ULO : ultra low oxygen

1-MCP : 1-méthylcycloprène



**Figure 1.** Pommes de la variété ‘Granny Smith’ présentant des symptômes d’échaudure superficielle (flèches) (d’après Marc, 2016)

*Année de production 2015, conservation en froid normal (FN), directement après transfert à température ambiante (TA).*

# 1. Introduction bibliographique

## 1.1. Présentation du projet et problématique du stage

### 1.1.1. Contextes scientifique et socio-économique de la problématique

La pomme est le troisième fruit le plus consommé dans le monde après les agrumes et la banane [1]. Sa production annuelle en 2014/2015 atteint près de 70 millions de tonnes (Mt) assurée pour moitié par la Chine (37,8 millions), loin devant l'Union Européenne (13,3 millions). La France, est le troisième pays européen producteur de pommes derrière la Pologne et l'Italie avec 1,55 Mt produites sur l'année 2014/2015 et se positionne comme 8ème pays producteur dans le monde [2]. La France exporte une grande partie de sa production (606 000 tonnes) principalement vers le Royaume-Uni et l'Espagne et importe des pommes en contre saison (183 000 tonnes) [2].

En France, la pomme est le fruit le plus apprécié par les ménages avec un niveau moyen d'achat sur l'année 2014/2015 de près de 18 kg par foyer [2]. Ces pommes sont à destination du marché du frais (pomme de table) et de l'industrie de la transformation (compote, purée et jus). Plusieurs variétés de pomme sont produites en France dont les trois principales sont 'Golden', 'Gala' et 'Granny Smith'. D'autres variétés dites 'du terroir français' sont également produites telles que 'Reine des Reinettes', 'Elstar', 'Canada grise', 'Belchard Chantecler' et 'Belle de Boskoop' [2]. Fermes, juteuses, croquantes, colorées, fibreuses, granuleuses, ces variétés constituent un large panel gustatif qui permet de répondre aux exigences des consommateurs.

La pomme est un fruit climatérique, c'est-à-dire que sa maturation est dépendante de l'éthylène. Aujourd'hui, la maîtrise des conditions de stockage (température, humidité relative, conditions atmosphériques : dioxygène et dioxyde de carbone) limite la sénescence des fruits et l'apparition de maladies. Toutefois, pour lutter contre les maladies et les désordres physiologiques qui peuvent apparaître en conservation, un certain nombre de produits phytosanitaires sont utilisés. Récemment, l'interdiction du diphénylamine (DPA), une substance chimique active aux propriétés anti-oxydantes, à provoquer la réémergence de désordres physiologiques liés à un stress oxydatif telle que l'échaudure superficielle.

L'échaudure superficielle (figure 1) est un désordre physiologique qui apparaît sur quelques variétés sensibles dont 'Granny Smith'. Suite à un brunissement de l'épiderme du fruit, elle déprécie la qualité visuelle du produit et le fragilise, le rendant ainsi plus sensible aux blessures et aux attaques par des pathogènes. Les fruits ne peuvent donc plus être vendus au marché du frais mais seulement au marché de la transformation ou jetés, ce qui engendre des pertes économiques importantes pour les producteurs. Actuellement, le 1-méthylcyclopropène (1-MCP), inhibiteur de la voie de signalisation de l'éthylène et donc de la maturation des fruits en conservation, permet



également de réduire l'apparition de la maladie. Cependant, le coût prohibitif du 1-MCP limite son utilisation (Jung et Watkins, 2008). Aujourd'hui, avec la conjoncture qui tend à réduire l'utilisation de produit phytosanitaire et le manque de méthode alternative pour lutter efficacement contre l'échaudure superficielle, la filière de la pomme en France risque d'être fortement impactée. Ainsi, face à cet enjeu économique majeur pour la filière, la compréhension des mécanismes mis en jeu dans l'apparition de cette maladie permettrait à terme d'identifier des leviers d'action possible.

### 1.1.2. Objectif du projet SCALD

Quelques études ont relié l'apparition de l'échaudure superficielle à un stress oxydatif induit par l'oxydation de l' $\alpha$ -farnésène dans l'épiderme du fruit (Lurie et Watkins 2012). Cependant, les voies métaboliques impliquées dans l'apparition de l'échaudure restent encore mal connues. C'est dans ce contexte qu'ont été initiés deux projets, Prédifruit 2013-2015 (MPIA Angers Technopole) et SCALD 2015-2017 (RFI Objectif Végétal, Région Pays de la Loire) portés par l'équipe QualiPom de l'UMR IRHS en collaboration avec la Station d'expérimentation de la Morinière. Ces projets visent à mieux comprendre les mécanismes menant à l'apparition de l'échaudure superficielle et d'en identifier les déterminants moléculaires. Un outil d'aide à la décision (OAD) pourra être proposé afin de prédire l'apparition de l'échaudure à partir de marqueurs moléculaires précoces. Des analyses transcriptomiques réalisées sur la variété 'Granny Smith' en 2013 et 2014 ont permis de mettre en évidence des voies métaboliques et des gènes candidats potentiellement impliqués dans l'apparition de l'échaudure, notamment, des gènes impliqués dans les voies de signalisation et de biosynthèse du méthyl jasmonate. Une troisième année d'expérimentation en 2015 a été réalisée pour tester l'impact de traitements chimiques ou physiques inhibiteurs de l'apparition des symptômes de l'échaudure.

## 1.2. Etat de la littérature

### 1.2.1. L'échaudure superficielle de la pomme

#### 1.2.1.1. Symptômes

L'échaudure superficielle aussi appelée échaudure de stockage, de prématurité ou « *superficial scald* » est un désordre physiologique lié à un stress oxydatif qui apparaît pendant ou après une longue période de conservation au froid (supérieure à 4 mois). Les symptômes sont caractérisés par un brunissement de l'épiderme sans affecter la chair des fruits (figure 1). Ils apparaissent sur la partie verte ou peu colorée du fruit selon la variété et uniquement dans les cellules contenant des chloroplastes. Une fois les fruits transférés à température ambiante (20°C), les symptômes progressent et peuvent affecter la partie colorée de l'épiderme, l'hypoderme et le



cortex adjacent. Les tissus échaudés ont également un aspect rugueux dû à une perte en eau importante (Emongor *et al.*, 1994 ; Lurie et Watkins, 2012).

#### 1.2.1.2. Facteurs de variabilité

##### 1.2.1.2.1. Effet du génotype

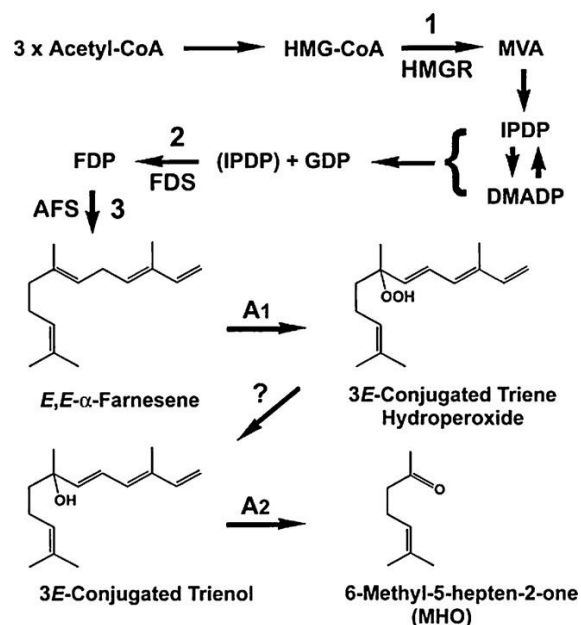
La sensibilité à l'échaudure superficielle n'est pas la même suivant les variétés. Certaines sont sensibles telles que 'Granny Smith', 'Cortland' 'Fuji' ou encore 'Delicious' alors que d'autres sont résistantes telles que 'Empire', 'Gala', 'Pink Lady' et 'Golden Delicious' (Lurie et Watkins, 2012). Barden et Bramlage (1994) ont montré chez les variétés 'Cortland' et 'Delicious' que la sensibilité à l'échaudure serait liée à une faible activité du système antioxydant avant la récolte qui ne permettrait pas de répondre au stress oxydant engendré par la mise en conservation au froid.

##### 1.2.1.2.2. Effet de l'environnement

Les conditions pédoclimatiques au cours de la période de croissance et de développement des fruits telles que l'humidité, la température ou encore l'ensoleillement ont une grande influence sur l'apparition de l'échaudure ainsi que la durée du stockage (Emongor *et al.*, 1994). L'apparition de la maladie est généralement plus importante lorsque les pommes subissent une période de sécheresse et de fortes températures quelques semaines avant la récolte. A l'inverse, une période plus froide et humide tend à diminuer l'échaudure (Filder, 1956). Des études montrent également que le nombre d'heure ou de jour dans le mois qui précède la récolte durant lesquels la température nocturne est inférieure à 10°C est corrélé à une diminution des risques d'apparition de l'échaudure. Cependant, des variations sont observées suivant les régions et les cultivars (Kupferman, 2001). Albrigo et Childers (1970) mettent également en évidence que l'échaudure superficielle est réduite sur les portions de fruits exposées à la lumière.

##### 1.2.1.2.3. Effets du management des vergers

Certains facteurs liés à la conduite des vergers comme la maturité des fruits liée à la date de récolte ou encore la nutrition minérale des arbres avant la récolte ont une grande influence sur l'apparition de la maladie pendant le stockage (Emongor *et al.*, 1994). La maturité des pommes pour une date de récolte optimale est déterminée par des indices tels que la régression de l'amidon (noté de 1 à 10), la couleur des pépins (vert à brun) ou le pourcentage d'acidité (Crouch et Taylor, 2013). Lorsque les fruits sont récoltés précocement ils tendent à être plus sévèrement touchés par l'échaudure. En revanche, une récolte plus tardive limite la durée de conservation au froid, mais l'apparition de l'échaudure est réduite (Erkan et Pekmezcü, 2004). La sensibilité à la maladie serait alors due à une faible efficacité du système antioxydant si les fruits sont récoltés trop précocement



**Figure 2.** Représentation schématique de la voie de biosynthèse et d'oxydation de l' $\alpha$ -farnésène chez les pommes (d'après Whitaker, 2004).

L' $\alpha$ -farnésène est synthétisé à partir de trois molécules d'Acetyl-CoA qui forment le 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA). Le HMG-CoA est réduit par l'enzyme hydroxymethylglutaryl-CoA reductase (HMGR) en acide mélavonique (MVA). L'isopentenyl diphosphate (IPDP) est condensé avec une molécule de GDP par l'enzyme farnesyl diphosphate synthase (FDS) pour former le farnesyl diphosphate (FDP) qui ensuite est transformé en  $\alpha$ -farnésène par l' $\alpha$ -farnesene synthase (AFS). A1 et A2 sont des étapes d'auto-oxydation de l' $\alpha$ -farnésène en triènes conjugués (CT) et 6-méthyle-5-hepten-2-one (MHO).



(Anet, 1972). Mainla (2013) et Lysiak (2013) ont pu déterminer respectivement chez les variétés 'Talvenauding' et 'Ligol' que l'apport en calcium ( $\text{CaCl}_2$ ) avant la récolte par vaporisation sur les feuilles permet de réduire l'apparition de l'échaudure. De plus, les rapports élevés de K/Ca, N/Ca, P/Ca et Mg/Ca au moment de la récolte sont corrélés à une augmentation de l'apparition de l'échaudure. Des études montrent également que l'application tardive de fertilisants azotés dans le verger augmente la sensibilité de plusieurs cultivars à l'échaudure (Emongor *et al.*, 1994).

### 1.2.2. Déterminisme moléculaire de l'échaudure superficielle : l'hypothèse $\alpha$ -farnésène

À ce jour, l'auto-oxydation de l' $\alpha$ -farnésène est l'hypothèse la plus acceptée pour expliquer l'apparition de l'échaudure superficielle chez la pomme (Busatto *et al.*, 2014).

La réduction de la maladie observée après la ventilation des lieux de stockage a mis en évidence l'implication d'un composé volatil qui s'accumulerait au cours du stockage (Lurie et Watkins, 2012). Suite à ces observations, l'acyclique sesquiterpène  $\alpha$ -farnésène (3,7,11-triméthyl,1,3,6,10-dodécatétraène) a été étudié pour son implication potentielle dans l'apparition de l'échaudure. L'accumulation de l' $\alpha$ -farnésène est négligeable durant les premiers stades de développement du fruit puis augmente parallèlement à la concentration de l'éthylène lorsque les fruits sont récoltés et placés au froid (Lurie et Watkins, 2012). Il existe une corrélation étroite entre la synthèse de l' $\alpha$ -farnésène et la production d'éthylène produit lors de la maturation du fruit (Pesis *et al.*, 2009). Une étude montre que l'éthylène peut induire l'expression du gène *MdAFS1* ( $\alpha$ -farnésène synthase 1) impliqué dans la voie de biosynthèse de l' $\alpha$ -farnésène (Busatto *et al.*, 2014). Cependant, Pesis *et al.*, (2009) ont montré que l' $\alpha$ -farnésène reste synthétisé dans des lignées mutées dans la voie de biosynthèse de l'éthylène ce qui suggère que d'autres mécanismes sont impliqués dans sa synthèse.

Des études ont mis en évidence que certains antioxydants et de faibles concentrations en dioxygène pendant le stockage limitent l'apparition de la maladie. Suite à ces observations, l'hypothèse de l'implication des triènes conjugués (CT), produits issus de l'auto-oxydation de l' $\alpha$ -farnésène, a été avancée (Lurie et Watkins, 2012). Les triènes conjugués sont majoritairement produits à partir de l'isomère E,E- $\alpha$ -farnésène (figure 2). Chez 'Granny Smith', après une conservation au froid, les triénols conjugués (CTols) représentent entre 96 et 99% des CT extraits (Whitaker, 2004). Rowan *et al.*, (2001), ont mis en évidence que les CTols induisent les symptômes de l'échaudure lorsqu'ils sont appliqués de manière exogène sur la peau de 'Granny Smith'. Cependant, Whitaker *et al.*, (2000) rapportent chez plusieurs lignées hybrides 'White Angel'×'Rome Beauty' que l'accumulation d' $\alpha$ -farnésène et des CTols ne sont pas indispensables pour l'apparition de la maladie lorsque le système antioxydant du fruit est déficient.



En revanche, les radicaux libres générés lors de l'oxydation de l' $\alpha$ -farnésène peuvent amplifier les symptômes de l'échaudure.

Les CTols peuvent également être auto-oxydé en 6-méthyle-5-hepten-2-one (MHO) (figure 2). Cependant, le MHO ne permet pas d'induire directement les symptômes de l'échaudure (Rowan *et al.*, 2001 ; Ju et Curry, 2002) et sa concentration est trop faible pour être l'agent causal de l'échaudure (Lurie et Watkins, 2012). Cette réaction génère la formation de radicaux libres qui provoquent un brunissement au niveau des cellules, caractéristique des symptômes de l'échaudure. Ce n'est donc pas la présence du MHO qui serait impliqué dans l'apparition de l'échaudure mais la production du MHO *via* la formation de radicaux libres qui amplifieraient les symptômes de l'échaudure (Lurie et Watkins, 2012).

#### 1.2.2.1. Luttés chimiques et physiques

##### 1.2.2.1.1. La lutte chimique : diphénylamine (DPA) et 1-méthylcyclopropène (1-MCP)

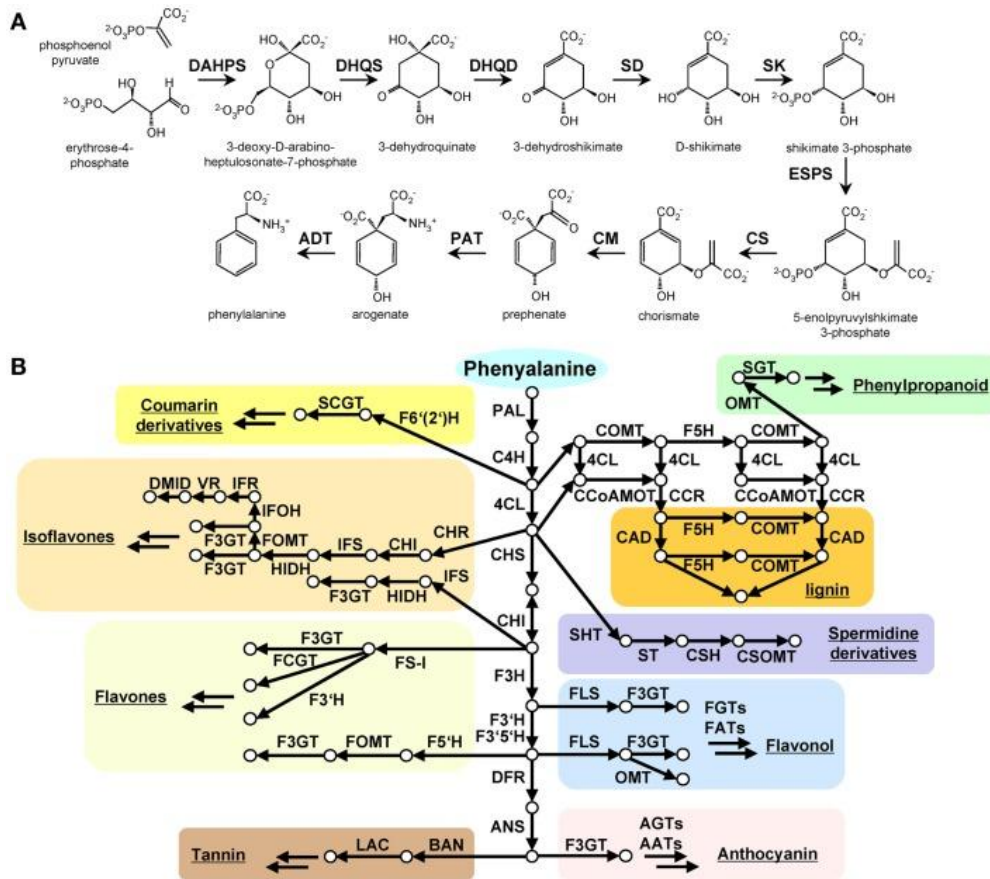
Le diphénylamine (DPA) a longtemps été utilisé par les industries de la pomme pour ces propriétés anti-oxydantes qui permettent de contrôler l'apparition de l'échaudure superficielle au cours du stockage au froid en bloquant l'auto-oxydation de l' $\alpha$ -farnésène (Jung et Watkins, 2008). Cependant, le DPA a été retiré de la vente en juin 2012 dans les pays membres de l'Union Européenne, à cause des résidus issus de sa dégradation telle que la nitrosamine identifiée pour avoir un effet cancérigène (Jakszyn, González, 2006). Désormais, la limite maximale de résidus du DPA a été fixée à 0,1 mg.kg<sup>-1</sup> contre 5 mg.kg<sup>-1</sup> précédemment [3].

Le 1-méthylcyclopropène (1-MCP) est une substance chimique, analogue de l'éthylène, qui permet de contrôler la maturité des fruits, de maintenir la qualité et d'étendre la période de conservation au froid (Blankenship et Dole, 2003). Des études menées par Fan *et al.*, (1999) ont mis en évidence la réduction de l'apparition de l'échaudure par l'application du 1-MCP en bloquant l'effet de l'éthylène. Le 1-MCP permet de retarder l'apparition de la maladie jusqu'à 180 jours de conservation en atmosphère contrôlée [4], mais son coût reste élevé.

##### 1.2.2.1.2. Les luttés physiques

###### 1.2.2.1.2.1. La conservation en chambre froide : FN, AC, ULO

La conservation en froid normal (FN) consiste à maintenir les fruits à basse température (autour de 0,5°C suivant les variétés). En atmosphère contrôlée (AC et ULO), la conservation se fait à très basse température (0,5°C) avec des teneurs en oxygène faibles et en dioxyde de carbone élevées (2% O<sub>2</sub> - 2% CO<sub>2</sub> en AC, et 0,7 à 1% O<sub>2</sub> - 0,8 à 1% CO<sub>2</sub> en ULO). L'apparition de l'échaudure superficielle est importante lorsque les pommes sont conservées en FN, réduite en AC



**Figure 3.** Représentation de la voie de biosynthèse des shikimates (A) et des phénylpropanoïdes (B) chez la pomme (d'après Tohge *et al.*, 2013) :

La biosynthèse des Shikimates, initiée à partir du phosphoenolpyruvate (PEP) et du D-erythrose4-phosphate, est décrite avec les métabolites intermédiaires et les gènes caractérisés. La voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes est représentée avec les métabolites intermédiaires (cercle) et les étapes enzymatiques (flèche).

DAHPS, 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate7-phosphatesynthase ; DQS, 3-dehydroquinate synthase ; DHQD/SD, 3-dehydroquinate déshydratase ; SK, shikimate kinase ; ESPS, 3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase ; CS, chorismate synthase ; CM, chorismate mutase ; PAT, prephenate aminotransférase ; ADT, aroenate déshydratase ; PAL, phenylalanine ammonia-lyase ; C4H, cinnamate-4-hydroxylase ; 4CL, 4-coumarate CoAligase ; CAD, cinnamoyl-alcohol déhydrogénase ; F5H, ferulate 5-hydroxylase ; C3H, coumarate 3-hydroxylase ; ALDH, aldehyde déhydrogénase ; CCR, cinnamoyl-CoA réductase ; HCT, hydroxycinnamoyl-Coenzyme A shikimate/quinatate hydroxycinnamoyltransferase ; CCoAOMT, cafféoyl/CoA-3-O-méthyltransferase ; CHS, chalcone synthase ; CHI, chalcone isomérase ; F3H, flavanone 3-hydroxylase ; F30H, flavonoid-30-hydroxylase ; F3GT, flavonoid-3-O-glycosyltransferase ; FS, flavone synthase ; FOMT, flavonoid O-méthyltransferase ; FCGT, flavone-C-glycosyltransferase ; FLS, flavonol synthase ; F3GT, flavonoid-3-O-glycosyltransferase ; DFR, dihydroflavonol réductase ; ANS, Anthocyanidinsynthase ; AGT, Flavonoid-O-glycosyltransferase ; AAT, anthocyanin acyltransferase ; BAN, oxidoreductase/dihydroflavonol réductase-like ; LAC, laccase.

et atteint un niveau très faible en ULO (Lurie et Watkins, 2012). Sabbin-Amin *et al.*, (2011) ont montré que lorsque les fruits sont conservés au froid à une très faible concentration d'oxygène ( $\leq 1\%$ ), la faible quantité de ROS dans les fruits est corrélée à une faible apparition de l'échaudure.

#### 1.2.2.1.2.2. Ventilation et traitement à la chaleur

Brooks *et al.*, (1923) ont montré que la ventilation des chambres froides permet de réduire l'apparition de l'échaudure superficielle. Cette technique permet d'éliminer des composés tel que l' $\alpha$ -farnésène (Coureau *et al.*, 2013). Une étude réalisée sur 'Granny Smith' par Lurie *et al.*, (1991) a pu mettre en évidence qu'un traitement à la chaleur de quatre jours à 38°C sur les pommes avant la mise au froid permet de réduire l'apparition de l'échaudure superficielle en diminuant l'accumulation de l' $\alpha$ -farnésène et des CTols. Cependant, l'efficacité du traitement est réduite après 5 ou 6 mois de conservation. Ce traitement pourrait ainsi se substituer à un traitement chimique pour des durées de conservation courte (Lurie *et al.*, 1991).

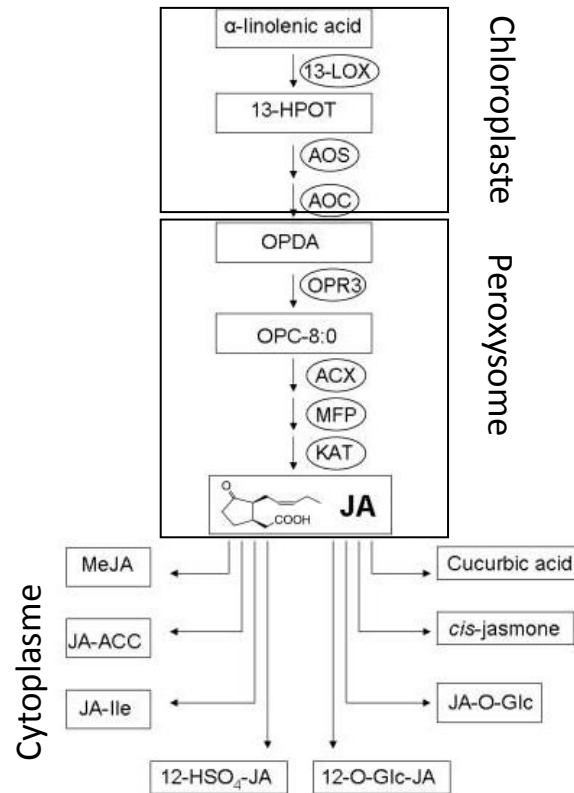
#### 1.2.3. Déterminisme moléculaire : nouvelles pistes

##### 1.2.3.1. Un brunissement induit par l'oxydation des composés phénoliques

Les composés phénoliques sont dérivés de la voie de biosynthèse des shikimates et du métabolisme des phénylpropanoïdes (Tohge *et al.*, 2013) (figure 3). Chez la pomme, les composés phénoliques sont regroupés en six classes : catéchines, procyanidines, proanthocyanines, acide hydroxycinnamique (acide chlorogénique), dihydrochalcone et flavonols. Les flavonols et les proanthocyanines sont trouvés essentiellement dans la peau tandis que les autres sont présents dans tout le fruit (Verdu *et al.*, 2014). Les composés phénoliques agissent comme substrats pour un grand nombre d'oxydoréductases telles que la polyphénoloxydase (PPO) ou les peroxydases (POX) (Robards *et al.*, 1999). L'acide chlorogénique et les catéchines sont les principaux substrats des PPO (Song *et al.*, 2007). L'oxydation enzymatique des composés phénoliques avec la PPO forme des quinones qui polymérisent pour générer un pigment brun (Robards *et al.*, 1999). Des récentes études ont montré que l'oxydation de l'acide chlorogénique par la PPO aurait un rôle prépondérant dans l'apparition des symptômes de brunissement des pommes (Busatto *et al.*, 2014). Toutefois, ceci suppose que les PPO, localisées dans la membrane des chloroplastes, puissent entrer en contact avec leurs substrats qui sont majoritairement localisés dans la vacuole. (Robards *et al.*, 1999).

##### 1.2.3.2. Hypothèse du stress oxydatif général

La conservation des fruits au froid après la récolte pendant une période prolongée peut engendrer un stress oxydatif dû à la production et l'accumulation de formes toxiques d'oxygène (ROS) (Suzuki et Mittler, 2006). En effet, le stress au froid altère des processus associés aux membranes telles que la



**Figure 4.** Représentation schématique de la voie de biosynthèse de l'acide jasmonique (d'après Balbi et Devoto, 2007) :

*l'acide jasmonique (JA) est synthétisé à partir d'une molécule d'acide linoléique au niveau de la membrane du chloroplaste par les enzymes 13-lipoxygénase (13-LOX), allène oxyde synthase (AOS) et allène oxyde cyclase (AOC) et au niveau du peroxyssome par les enzymes 12-oxo-phytodienoic acid reductase3 (OPR3), acyl-CoA oxidase (ACX), multifunctional protein (MFP) et 3-ketoacyl-CoA thiolase (KAT). Les composés intermédiaires (en rectangle) sont le 13-hydroperoxylinolenic acid (13-HPOT), le 3-oxo-2-(2'-pentenyl) cyclopentane-1-octanoic acid (OPC-8:0), le 12-oxo-phytodienoic acid (OPDA) et enfin jasmonic acid (JA). JA peut ensuite être métabolisé en différents composés suivant les modifications chimiques : méthyl jasmonate (MeJA), acide 1-aminocyclopropane-1-carboxylic (JA-ACC), acide aminé isoleucine (JA-Ile), acide jasmonique-sulfonated derivative of the 12-hydroxy- (12-HSO<sub>4</sub>-JA), acide jasmonique-glucosylé dérivé du 12-hydroxy (12-O-GlcJA), glycosylation dérivée de l'acide jasmonique (JA-O-Glc).*

photosynthèse ou la respiration. Les électrons sont alors transférés à une molécule d'oxygène pour former des ROS tels que les radicaux superoxyde ( $\cdot\text{O}_2^-$ ), l'hydroxyl ( $\cdot\text{OH}$ ) et du peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Les ROS dénaturent les protéines et provoquent la perte d'intégrité des membranes des organites par la peroxydation des lipides (Bolwell et Wotjtaszek, 1997). Une étude réalisée par Purvis et Gegogéine (2003) propose que l'apparition de l'échaudure soit induite lors de la mise au froid par la dégradation de la chaîne de transport d'électrons au niveau des mitochondries qui engendrerait la formation de radicaux libre (ROS). Le stress oxydatif généré induirait une dégradation de la membrane des organites et mettrait en contact les PPO et les composés phénoliques. L'oxydation de l' $\alpha$ -farnésène et des triénols conjugués ne serait qu'une conséquence de ce stress oxydatif mais participerait à amplifier les symptômes de l'échaudure (Whitaker, 2004).

#### 1.2.4. Interaction avec les voies de signalisation du MeJA

Des résultats préliminaires obtenus dans le cadre du projet Prédifruit en 2014 et 2015 ont mis en évidence des gènes impliqués dans les voies de signalisation du MeJA et leurs implications potentielles dans l'apparition de l'échaudure superficielle de la pomme.

Le MeJA est un composé dérivé de l'acide jasmonique (JA) qui est fortement étudié pour son implication dans les processus liés à l'induction à distance du système de défense chez les plantes notamment lors d'un stress oxydant provoqué par un stress biotique (Wasternack, 2007). La voie de biosynthèse du MeJA (figure 4) est liée à la voie de l'acide mélavonique (MVA) à partir de laquelle l' $\alpha$ -farnésène est synthétisé (Ninnemet *et al.*, 2013). Des études ont montré qu'après un traitement au MeJA les gènes impliqués dans la voie de biosynthèse des JA (Sasaki *et al.*, 2001) et la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes (Heredia et cisneros-Zevallos, 2009) sont induits. Rudelle et Mattheis (2002) ont montré chez la variété 'Fuji' que la quantité d'anthocyane et d'acide chlorogénique augmentait après un traitement au MeJA. L'action du MeJA sur l'apparition des symptômes restent toutefois inconnue.

#### Objectifs du stage

L'objectif du stage est d'identifier des gènes et des voies métaboliques impliqués dans l'apparition de l'échaudure superficielle à partir de l'analyse des transcriptomes de lots de pommes ayant subis des traitements post-récolte et des conditions de conservation différents et susceptibles d'influer sur l'apparition de la maladie. L'étude s'intéresse plus particulièrement à l'effet du méthyl-jasmonate sur le transcriptome de la pelure des fruits et l'apparition de la maladie. Des analyses biochimiques préliminaires ont également été réalisées afin d'étudier la capacité anti-oxydante des échantillons et l'activité d'enzymes susceptibles d'être impliqués dans l'apparition des symptômes.

**Tableau 1.** Traitements post-récolte des fruits

Traitements	Lieux	Concentrations	Durée/température	Méthodes d'application
<b>Ctrl</b>	x	x	x	x
<b>DPA</b>	IRHS Angers	8 g.l <sup>-1</sup>	1 min	trempage
<b>MeJA</b>	IRHS Angers	MeJA 1 mM DMSO 0.1%	x	aspersion
<b>DMSO (Contrôle MeJA)</b>	IRHS Angers	0.1%	x	aspersion
<b>1-MCP</b>	La Morinière	1 g.m <sup>-3</sup>	chambre froide	pulvérisation
<b>Th</b>	La Morinière	x	2 minutes/48°C	trempage

*Ctrl, contrôle ; DPA, diphénylamine ; MeJA, méthyl-jasmonate ; DMSO, diméthyl sulfoxyde ; 1-MCP, 1-méthylcyclopropène ; Th, thermothérapie. Pour faciliter l'entrée du MeJA exogène dans les cellules, il est appliqué avec du DMSO (tensioactif qui perméabilise les membranes cellulaires afin de stimuler le relargage ou l'entrée d'une molécule (Vu, 2008)). Un traitement au DMSO a donc été ajouté comme condition contrôle du traitement au MeJA.*



## 2. Matériel et méthodes

### 2.1. Plan expérimental

#### 2.1.1. Matériel végétal

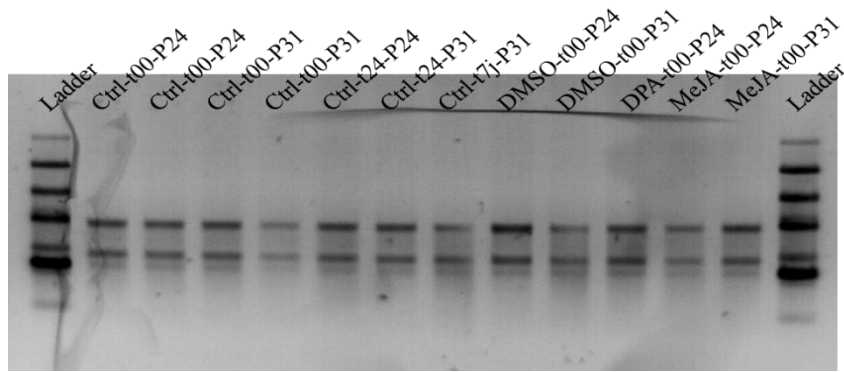
L'étude a été menée sur des pommes de la variété 'Granny Smith'. Seize lots de 130 à 150 fruits ont été récoltés le 6 octobre 2015, sur deux parcelles différentes P24 et P31 (répétitions biologiques) de la station d'expérimentation fruitière de La Morinière (37). Les arbres de la parcelle P24 ont été plantés en 2002 sur le porte greffe Pajam® 1, ceux de la parcelle P31 ont été plantés en 2013 sur le porte greffe M9 Emla. Les fruits ont été récoltés au stade dit « précoce », déterminé en fonction de la valeur de l'indice de régression (IR) de l'amidon (IR ~3) (Crouch et Taylor, 2013). 24 heures après récolte, des lots de fruits ont été traités au diphénylamine (DPA), méthyle-jasmonate (MeJA), diméthyl sulfoxyde (DMSO) ou par thermothérapie (tableau 1), puis mis en conservation en FN (2°C) 24 heures après traitement. Les fruits traités au 1-MCP ont d'abord été mis en FN à la station d'expérimentation de La Morinière directement après récolte et traités 2 jours après. En plus des traitements chimiques, des lots de fruits ont été conservés à la station de La Morinière en « *ultra low oxygen* » (ULO : 0.5°C, 1,5% O<sub>2</sub>, 1% CO<sub>2</sub>). Un système de piégeage de l'éthylène, encore en phase de test, a également été utilisé en ULO (ULO-Ethylène). Pour l'ensemble des traitements, les fruits ont été conservés pendant 5 mois.

#### 2.1.2. Echantillonnage

Un premier échantillonnage a été réalisé 24 heures après traitement (48 heures après la récolte) sauf pour les traitements 1-MCP et thermothérapie. Une seconde série d'échantillonnage a été effectuée en sortie de conservation directement (t00) ou après 24 heures (t24) et 7 jours (t7j) à température ambiante (« shelf-life, 18°C »). Les échantillons ont été prélevés sur 20 fruits par lot en sélectionnant 1/8 de fruits sur chacune des faces opposées par fruit. Les pelures et la chaire des fruits ont été congelées séparément directement dans l'azote liquide, broyées puis un aliquot a été conservé à -80°C.

#### 2.1.3. Phénotypage des symptômes d'échaudure superficielle

Le phénotypage a été réalisé après 5 mois de conservation sur 100 fruits par condition, directement (t00), et après 24 heures (t24) et 7 jours (t7j) à température ambiante. Le phénotypage repose sur le nombre de pommes qui développe des symptômes de l'échaudure et sur la surface moyenne du fruit couverte par ces symptômes suivant l'échelle de notation suivante : 1 (>0-25%), 2 (25-50%), 3 (50-75%), 4 (75-100%).



**Figure 5.** Gel de migration des ARN totaux des échantillons de fruits conservés 5 mois au froid. Pour chaque échantillon 400ng d'ARN ont été mélangés avec du tampon de charge 6X loading dye (Life technologie, USA), dénaturés 10 minutes à 65°C puis mis 1 minute sur glace avant d'être déposés sur un gel TAE1X-DEPC à 1,2% d'agarose. Le gel a été révélé au MIDORI GREEN. Ladder, RNA Ladder 0.5-10kb (Life technologie, USA).

Ctrl, contrôle ; DPA, diphénylamine ; MeJA, méthyl-jasmonate ; DMSO, diméthyl sulfoxide ; P24 : parcelle 24 ; P31 : parcelle 31. Les échantillons après 5 mois de conservation directement (t00), 24h après (t24) et 7 jours après (t7j) transfert à température ambiante.

## 2.2. Analyse du transcriptome

### 2.2.1. Puce à ADN AryANE\_v2

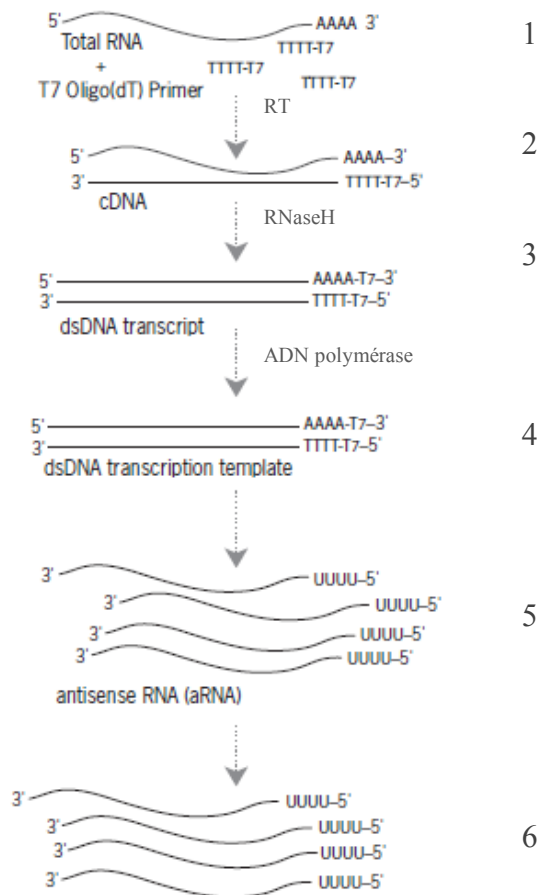
L'analyse du transcriptome des pelures de fruit a été réalisée avec la puce à ADN AryANE\_v2 (Agilent, code 70465). La puce comprend une sonde sens (S) et une sonde complémentaire anti-sens (AS) pour chacune des 60 000 séquences codantes annotées lors du premier séquençage du génome du pommier (Velasco *et al.*, 2010). Les séquences des sondes (oligomères de 60 bases) utilisées ont été décrites par Celton, Gaillard *et al.*, (2014). L'annotation des séquences repose principalement sur leur niveau de similarité avec les séquences d'*Arabidopsis thaliana*. Les lames de la version Agilent comprennent 4 puces (4-plex) de 150 000 sondes. Les sondes NA correspondent à des sondes non prédites par analyses bioinformatiques mais identifiées par RNAseq et rajoutées à la puce AryANE\_v2. Aucune information n'est connue sur les transcrits hybridés par les sondes.

### 2.2.2. Extraction des ARN totaux des pelures de fruits

Les ARN totaux ont été extraits à partir de 1 g MF de poudre re-broyé au mortier dans l'azote liquide, en utilisant le kit NucleoSpin®RNA Plant (Macherey-Nagel, USA) en suivant le protocole décrit par Rienth *et al.* (2014) avec les modifications suivantes : un deuxième lavage au chloroforme a été ajouté après l'extraction avec le tampon PR, puis les acides nucléiques sont précipités à -20°C pendant la nuit (jusqu'à 48h) en ajoutant 5 volumes d'éthanol 96% froid et 0,4 volume d'acétate de sodium 3M pH 5,2. Après centrifugation (10000g/10min/15°C), les culots ont été rincés avec 1 volume d'éthanol 96% froid et repris dans le tampon de lyse RAP modifié du kit NucleoSpin®RNA Plant. 1,5% de CTAB a été additionné au tampon de lyse RAP du kit et les volumes ont été doublés par rapport aux recommandations du fabricant.

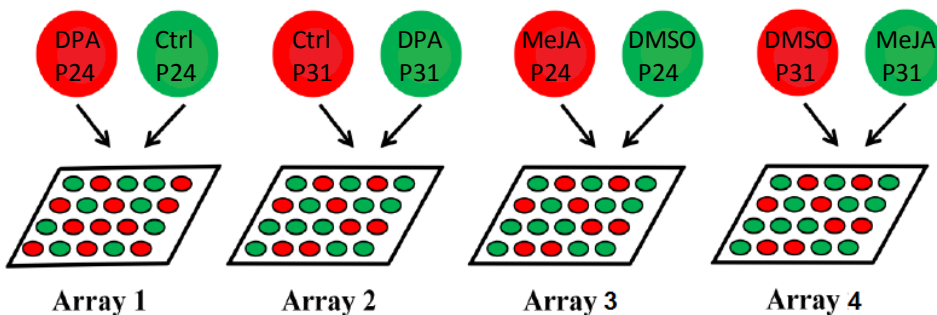
Les concentrations en ARN ont été estimées au spectrophotomètre à 260 nm (Nanodrop ND-1000). L'absorbance a également été mesurée à 230 et 280 nm afin de vérifier la pureté de l'échantillon. Le rapport 260/280 permet d'estimer la contamination protéique alors que le rapport 260/230 estime la contamination des sucres et polyphénols (ces rapports doivent être proches ou supérieurs à 2). L'intégrité des ARN extraits a ensuite été vérifiée par sur gel d'agarose par électrophorèse (figure 5) et conservés au congélateur à -80°C.

Une vérification supplémentaire de la qualité des ARN extraits a été réalisée pour certains échantillons avec le kit d'analyse Experion™ RNA (Bio-Rad, USA). Il permet de calculer un indicateur de qualité des ARN « RNA quality indicator » (RQI supérieur à 8), de calculer un ratio 28S/18S de quantité d'ARN ribosomiaux (indice de dégradation) et de générer un gel d'électrophorèse virtuel pour chaque échantillon.



**Figure 6.** Principe de l'amplification des ARN (*Kit AMBION MessageAmpII aARN*).

(1-2) La transcriptase inverse (RT) permet la synthèse des ADNc simple brin grâce à une amorce oligo(dT)-T7. (3) La RNaseH digère l'hétéroduplex et génère des amorces sur lesquelles l'ADN polymérase se fixe pour synthétiser le second brin d'ADNc. (4) Les ADNc sont purifiés à l'aide du *Kit AMBION DNAClear™*. (5) Tous les ADNc contiennent à une extrémité un oligo T7 permettant la fixation de l'ADN polymérase T7 pour la synthèse des ARN antisens (ARNa). (6) Les ARNa sont ensuite purifiés à l'aide du *Kit AMBION MEGAclean™*.



**Figure 7.** Plan d'hybridation en « dye-Switch » des échantillons avant conservation. Les échantillons correspondant à deux répétitions biologiques (P24 et P31) sont hybridés sur 2 « arrays » différentes avec inversion des fluorochromes Cy5 (rouge) et Cy3 (vert): Ctrl, contrôle ; DPA, diphénylamine ; MeJA, méthyljasmonate ; DMSO, diméthyl sulfoxyde ; P24 : parcelle 24 ; P31 : parcelle 31.

### 2.2.3. Amplification et marquage des ARN messagers (ARNm)

Pour chaque échantillon les ARNm ont été amplifiés à l'aide du *Kit AMBION MessageAmpII aARN Amplification#1751* (Life technologie, USA) à partir de 200 à 400 ng d'ARN totaux selon les recommandations du fabricant, en quart de volume. Le principe d'amplification des ARNm est décrit figure 6. Les ADNc ont été purifiés à l'aide du *Kit AMBION DNAClear<sup>TM</sup>* et les ARNa avec le *Kit AMBION MEGAClear<sup>TM</sup>* (Life technologie, USA). Les concentrations ont été estimées au spectrophotomètre à 260 nm (Nanodrop ND-1000). Le facteur d'amplification doit être au minimum de 50 et la quantité d'ARNa obtenue doit être supérieure à 5 µg. Les échantillons ont ensuite été vérifiés sur gel (500 ng d'ARNa déposé, TAE1X-DEPC, 1,2 % d'agarose, migration 40 minutes à 100V, révélation au MIDORI GREEN). La taille moyenne attendue est environ 1500 pb. 5 µg d'ARNa sont ensuite marqués avec les fluorochromes dCTP-Cy3 ou dCTP-Cy5 (Interchim, Montluçon, France) par rétro-transcription avec 200 u de Superscript II RT (Invitrogene) et des amorces de type « random nonamers » en suivant les instructions du fabricant. Les ADNc marqués sont purifiés à l'aide du Kit Qiaquick QIAGEN® (QIAGEN®, USA). L'estimation de la quantité d'ADNc marqué et de la concentration en cyanine incorporée est effectuée au spectrophotomètre (Nanodrop ND-1000). Le rendement d'incorporation des cyanines doit être supérieur à 0.80 pmol.ng<sup>-1</sup> d'ADNc. Les échantillons d'ADNc ont ensuite été vérifiés par un gel d'électrophorèse (15 pmol d'ADNc marqué, TAE1X-DEPC, 1,2% d'agarose, migration 40 minutes à 100V, révélation au MIDORI GREEN).

Les cibles sont ensuite mélangées deux à deux en suivant le plan d'hybridation présenté figure 7, en mélangeant un échantillon marqué au dCTP-Cy3 à un échantillon marqué au dCTP-Cy5. Ce mélange est normalisé par la quantité de fluorochrome incorporé (30 pmol de chaque échantillon). Le ratio des concentrations en DNAc des deux échantillons doit être inférieur à 2. Les mélanges de cibles sont précipités à l'éthanol 95 % en présence de 10 µg d'acrylamide et 80 mM d'acétate de sodium pH 5,2 puis rincés à l'éthanol 70 %, séchés et conservés au congélateur -20°C à l'abri de la lumière.

### 2.2.4. Hybridation et acquisition des données

L'hybridation des cibles a été réalisée avec le kit Gene Expression Hybridization selon les instructions du fabricant (Agilent technologie, USA). Brièvement, les cibles sont suspendues dans du tampon de fragmentation 25X (volume total de 110µL), dénaturées pendant 30 min à 60°C à l'abri de la lumière puis refroidies 1 min sur glace. Le tampon d'hybridation 2x Hi-RPM (55µL) est ajouté et 100 µl du mélange sont ensuite déposés sur une des puces de la lame. L'hybridation a été faite à 42°C pendant 17h dans le four à hybridation. La lame a ensuite été lavée à 31°C dans deux



solutions de lavage successives en présence de 12,5 mM d'ozone scavenger (Agilent technologie, USA), rapidement séchée et insérée dans le scanner à l'abri de la lumière.

Un scanner MS 200 Microarray scanner (Roche Nimblegen) est utilisé pour l'acquisition des signaux lumineux. Un pré-scan rapide à une résolution de 10  $\mu\text{m}$  a été réalisé à 532 nm (Cy3) et à 635 nm (Cy5) simultanément pour évaluer la qualité de l'hybridation, l'importance du bruit de fond et définir la zone d'étalonnage des capteurs pour régler leur sensibilité et éviter la saturation. La lame est ensuite scannée à haute sensibilité à 532 nm et 635 nm à une résolution de 2  $\mu\text{m}$ . Les deux images générées ont été analysées par le logiciel Agilent Feature Extraction pour générer des fichiers numériques.

### 2.2.5. Analyse statistiques des données

La normalisation des données et les analyses statistiques ont été réalisées comme décrit par Celton *et al* (2014) en utilisant le logiciel R selon le script rédigé par Sandra Pelletier (Equipe BioInfo, INRA, Angers). Brièvement, les données ont été normalisées par la méthode de Lowess, et l'analyse différentielle de l'expression a été faite en utilisant les fonctions lmFit (linéarisation des données), eBayes (test-t de Student) et kerfdr (test de Benjamini-Hochberg) avec le package R LIMMA (Bioconductor project). Afin d'estimer le niveau d'expression des transcrits, la valeur du bruit de fond a été retirée aux valeurs d'intensité normalisées. Le bruit de fond a été calculé en utilisant la moyenne plus deux écarts types des 40 000 sondes présentant la plus faible intensité de fluorescence. Un fichier Excel est alors généré avec pour chaque sonde de la puce le résultat de l'analyse différentielle et l'annotation de la séquence correspondante.

## 2.3. Analyses biochimiques

### 2.3.1. Test DPPH

L'activité anti-oxydante globale des échantillons a été mesurée par la réduction du DPPH (2,2-diphényl-1-picryl-hydrazyl), un radical libre dont la couleur change après réduction : Le protocole a été adapté à partir de celui décrit par Brand-Williams *et al.* (1995) de la manière suivante : 300 mg MF de poudre de pelures de pommes conservées au congélateur  $-80^{\circ}\text{C}$  ont été extraits avec 1mL de méthanol à 0,1% d'acide acétique, agité 15 min à 10 Hz. Le surnageant a été récupéré après 5 min de centrifugation à 13 000g à température ambiante.

Dans une microplaque, 30  $\mu\text{L}$  de DPPH à 3,2 mM ou DPPH 1,6 mM (d2) ont été ajoutés à 30  $\mu\text{L}$  d'extrait brut dans un volume final de 300  $\mu\text{L}$  (volume ajusté au méthanol à 0,1% d'acide acétique). Du trolox (acide  $(\pm)$ -6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylique) à 2 mM a été utilisé comme contrôle positif dans chaque microplaque. Pour chaque extrait et le témoin

**Tableau 2.** Solution pour le dosage de l'activité des polyphénols oxydases (PPO) et des peroxydases (POX)

	<b>Concentrations initiales</b>	<b>Test PPO (μL)</b>	<b>Test POX (μL)</b>
<b>Extrait enzymatique</b>	2,5 mg MF.ml <sup>-1</sup>	60	60
<b>Tampon Na-Acétate pH4,5</b>	100 mM		
<b>ou Na-Phosphate pH7,5</b>	50 mM	50	50
<b>4-MC</b>	12,4 mg MF.ml <sup>-1</sup>		
<b>ou Ac. Chlorogénique</b>	3,5 mg MF.ml <sup>-1</sup>	30	30
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	250 mM	x	10
<b>Volume final</b>	x	140	150



positif trolox, les réactions ont été faites en duplicata sur une gamme de dilution de 2 en 2 (non dilué, d2, d4, d8, d16, d32) pendant 40 min à température ambiante. L'absorbance a été mesurée à 515 nm (Brand-Williams *et al.*, 1995) et l'EC50 de chaque extrait a été calculée. L'EC50 correspond à la concentration en extrait permettant de réduire 50% du DPPH.

### 2.3.2. Activité des polyphénols oxydases (PPO) et des peroxydases

#### 2.3.2.1. Extraction et dosage des protéines

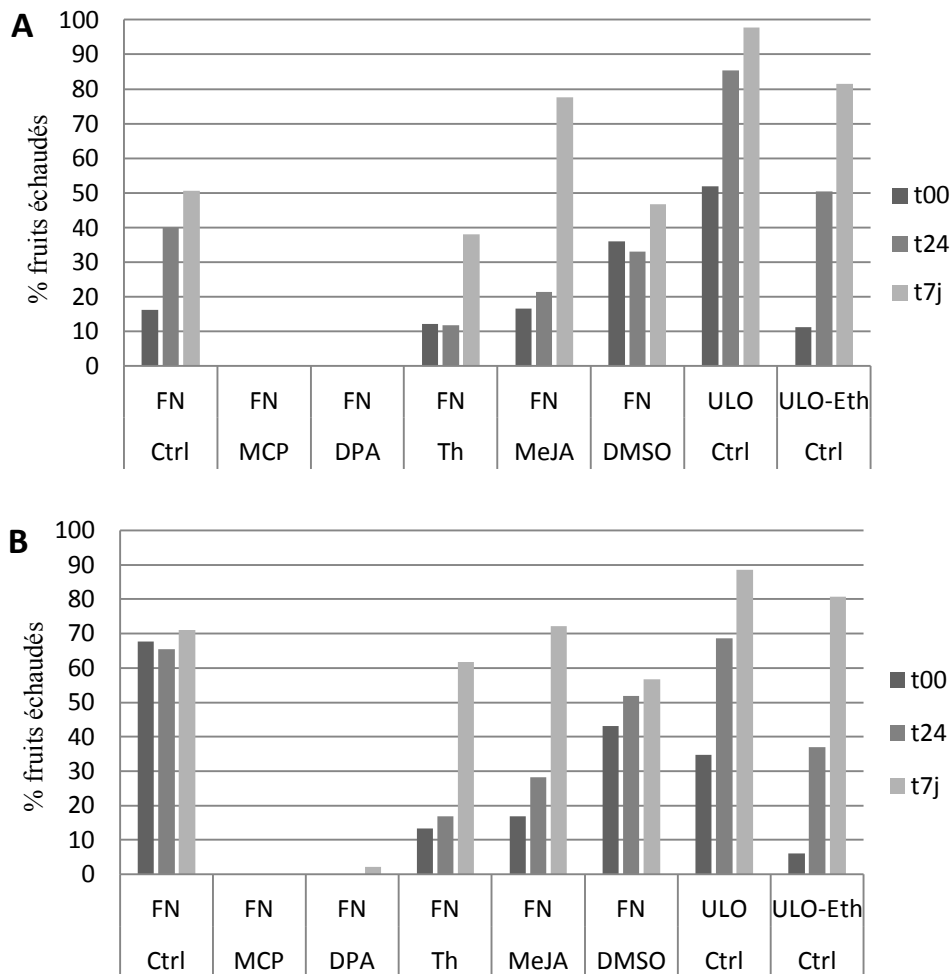
Les enzymes ont été extraites à partir d'un protocole décrit par Venisse *et al.*, (2001) avec les modifications suivantes : 2,5 g MF de poudre de pelures de pommes conservées au congélateur -80°C ont été extraits avec 1 ml de tampon d'extraction à pH 5,5 (1 mM PEG, 0,01% triton, 8% PVPP, 1 mM PMSF et 50 mM de tampon d'acétate de sodium à pH 5,5). L'extraction a été réalisée à pH 5,5 car l'activité de la polyphénol oxydase (PPO) est faible à ce pH (Rocha et Marais, 2001). Les extraits ont été centrifugés 20 min à 16 000 g à 4°C, les surnageant récupérés et centrifugés de nouveau 10 min à 16 000 g à 4°C. Les extraits sont conservés dans du glycérol 10 % au congélateur -20°C.

La quantité totale de protéines des extraits a ensuite été dosée en microplaque par la méthode de Bradford (1976). 250µl de réactif de Bradford (Sigma-Aldrich, USA) ont été ajoutés à 5µl d'extrait (triplicatas) et l'absorbance mesurée à 595 nm (µQuant BioTEK instruments, USA). La concentration en protéines des échantillons a été calculée par rapport à une gamme de 6 dilutions de 2 en 2 à partir d'une solution de sérum d'albumine de bovin à 2 mg.mL<sup>-1</sup>.

#### 2.3.2.2. Activité enzymatiques

L'activité des PPO a été dosés à pH 4,5 (tampon acétate de sodium, 100 mM) et pH 7,5 (tampon phosphate de sodium, 50 mM) avec comme substrat l'acide chlorogénique (substrat spécifique de certaines PPO) ou le 4-méthycatéchol (4-MC, substrat généraux des PPO). Le dosage a été réalisé en microplaque selon le protocole décrit par Sanchez-Ferrer (1988) (tableau 2). Les réactions ont été initiées par l'addition de l'acide chlorogénique ou du 4-MC préalablement réchauffés à 25 °C. L'absorbance a été mesurée à 405 nm toutes les 50 s pendant 15 min et l'activité calculée sur la partie linéaire de la cinétique.

L'activité des peroxydases a été dosée en ajoutant du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 250 mM) dans le mélange réactionnel lors de l'initiation de la réaction (tableau 2). L'absorbance a été mesurée à 470 nm toute les 50 s pendant 15 min. Les activités enzymatiques sont exprimées en uDO.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup> de protéines.



**Figure 8.** Incidence des symptômes d'échaudure en fonction des traitements post récolte et de la conservation.

Nombre de fruits présentant des symptômes en % du nombre total de fruits après 5 mois de conservation au froid (t00), 24 heures (t24) et 7 jours (t7j) après la sortie de conservation. Les fruits ont été récoltés sur deux parcelles P24 (A) et P31 (B). FN, froid normal ; ULO, « ultra low oxygen » ; ULO-Eth, « Ultra low oxygen » et piégeage de l'éthylène ; Ctrl, contrôle ; DPA, diphenylamine ; MeJA, méthyl-jasmonate et DMSO ; DMSO, dimethyl sulfoxide ; 1-MCP, 1-méthylcyclopropène ; Th, thermothérapie.



**Figure 9.** Couleur des fruits après 5 mois de conservation et 24 heures à température ambiante. Fruits non traités (A), traités au DMSO (A) ou au MeJA (B).

### 3. Résultats

#### 3.1. Effet des traitements et du mode de conservation sur la qualité des fruits

##### 3.1.1. Incidence des symptômes d'échaudure

Le pourcentage des pommes échaudées après 5 mois de conservation au froid a été déterminé pour mettre en évidence l'effet des différents traitements et des conditions de stockage sur l'apparition des symptômes (figure 8).

Les lots de pommes témoins conservés en froid normal (FN, Ctrl) présentent un pourcentage d'échaudure entre 16% et 68% en sortie de conservation qui augmente à 40% et 65% après 24 heures à température ambiante (TA) et atteint entre 51% et 71% après 7 jours respectivement pour les parcelles 24 et 31. On remarque une différence importante du pourcentage de fruits échaudés entre les deux parcelles qui est réduite après 24 heures et 7 jours à TA. Les lots de pommes traitées au 1-MCP et au DPA ne développent pas ou très peu de symptômes même après 7 jours à TA. En sortie de conservation entre 12 et 17% de fruits échaudés sont observés sur les lots de pommes traités en thermothérapie (Th). Le pourcentage de fruits atteints augmente après 7 jours à TA jusqu'à 38% et 62% respectivement pour les parcelles 24 et 31, mais reste inférieur aux témoins FN. En sorti de conservation et après 24 heures à TA, les lots traités au MeJA présentent moins de fruits échaudés que ceux traités au DMSO (témoin négatifs du MeJA) avec respectivement entre 17% à 28% et 36% à 52%. Après 7 jours à TA, la tendance s'inverse avec entre 72% et 78% pour MeJA et 47% et 57% pour DMSO. Les lots de pommes de la parcelle 24 conservés en ULO présentent un pourcentage de fruits échaudés de 52% en sortie de conservation qui augmente à 85% après 24 heures à TA pour atteindre presque 100% à 7 jours. Une réduction du pourcentage de pommes échaudées est observée en ULO-Eth comparé à la condition ULO mais le pourcentage reste supérieur au contrôle FN après à 7 jours à TA.

##### 3.1.2. Modifications de la couleur des fruits

Un jaunissement a été observé sur les lots de pommes traités au méthyl jasmonate après 5 mois de conservation comparé aux lots de pommes témoins traitées avec du DMSO (figure 9). Les lots de pomme qui ont subi les traitements DPA, 1-MCP, thermothérapie et les conservations en ULO et ULO-Eth ont gardé la coloration verte similaire à celle des lots contrôles non traités

#### 3.2. Analyse du transcriptome des pelures de fruits

L'ensemble des lots de pommes (Ctrl, DMSO, MeJA, DPA, 1-MCP, thermothérapie, ULO et ULO-Eth) des deux parcelles (P24 et P31) ont été échantillonnés et phénotypés. Ensuite les ARN

**Tableau 3.** Nombre de sondes différentiellement exprimées 24h après un traitement au MeJA

Nombres de sondes	Total	Sur exprimées	Sous exprimées
Sens	1975	965	1011
Anti-sens	427	167	260
NA	188	84	104
<b>Total</b>	<b>2590</b>	<b>1215</b>	<b>1375</b>

(Nombre totale de sondes = 133 709.  $p$ -value  $\leq 0.01$ )

**Tableau 4.** Gènes induits ou réprimés dans la pelure des fruits 24h après un traitement au MeJA

Identifiant <i>Malus domestica</i>	Description*	Fonction*	p-value	Log(ratio)
<b>Biosynthèse des shikimates et dérivés des phénylalanines</b>				
MDP0000478750	Polyphenol oxidase (PPO)	Oxydation des polyphénols	<0,001	2,20
MDP0000699845	Polyphenol oxidase (PPO)	Oxydation des polyphénols	0,003	2,17
MDP0000749719	2-dehydro-3-deoxyphosphoheptonate aldolase (DAHPS)	Biosynthèse/ac. aminé aromatique	<0,001	2,10
MDP0000145064	2-dehydro-3-deoxyphosphoheptonate aldolase (DAHPS)	Biosynthèse/acides aminés aromatiques	<0,001	2,08
MDP0000716496	4-coumarate-CoA ligase (4-CL)	Biosynthèse/phénylpropanoïdes/JA	0,001	1,81
MDP0000226045	Polyphenol oxidase (PPO)	Oxydation des polyphénols	0,002	1,71
MDP0000140609	Myb domain protein 12 (MYB12)	Synthèse flavonoïdes	0,002	1,56
MDP0000244469	Chorismate synthase (CS)	Biosynthèse/ac. aminé aromatique	0,001	1,55
MDP0000199192	Dihydroflavonol 4-reductase (DFR)	Synthèse des dihydroflavonols	0,001	1,51
MDP0000372674	Dihydroflavonol 4-reductase (DFR)	Synthèse des dihydroflavonols	0,003	1,40
MDP0000189326	Shikimate 5-dehydrogenase (SD)	Biosynthèse/ac. aminé aromatique	0,010	1,10
MDP0000257119	Chalcone synthase (CHS)	Synthèse Chalcone	0,003	0,93
MDP0000208899	Chalcone synthase (CHS)	Synthèse Chalcone	0,008	0,70
<b>Biosynthèse des isoprenoïdes/voie de l'acide mévalonique</b>				
MDP0000295452	Terpene synthase (TPS)	isoprenoïde/sesquiterpène	<0,001	6,84
MDP0000225361	Terpene synthase (TPS)	isoprenoïde/sesquiterpène	<0,001	6,19
MDP0000120176	Terpene synthase (TPS)	isoprenoïde/sesquiterpène	<0,001	6,14
MDP0000203143	Terpene synthase (TPS)	isoprenoïde/sesquiterpène	<0,001	6,11
MDP0000161084	Terpene synthase (TPS)	isoprenoïde/sesquiterpène	<0,001	4,91
MDP0000735507	Terpene synthase (TPS)	isoprenoïde/sesquiterpène	<0,001	4,29
MDP0000276976	Terpene synthase (TPS)	isoprenoïde/sesquiterpène	<0,001	2,56
MDP0000132723	Isopentenyl-diphosphate isomerase (IPP)	isoprenoïde/MVA/MEP	<0,001	4,09
MDP0000322688	Myrcene/ocimene synthase	isoprenoïde/monoterpène	0,009	3,14
MDP0000924612	Farnesyl diphosphate synthase 1 (FDS1)	isoprenoïde/MVA	0,001	2,31
MDP0000265913	Farnesyl diphosphate synthase 1 (FDS1)	isoprenoïde/MVA	0,001	2,30
MDP0000661951	Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase (HMG-CoA)	isoprenoïde/MVA	<0,001	1,57
MDP0000138071	Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase	isoprenoïde/MVA	<0,001	1,53
MDP0000135982	Mevalonate di-P decarboxylase (MDD)	isoprenoïde/MVA	0,006	1,47
MDP0000894066	Terpene synthase 3 (TPS3)	isoprenoïde/terpène	0,003	1,10
MDP0000025413	Mevalonate kinase (MK)	isoprenoïde/MVA	0,008	0,91

totaux des lots de pommes traités au DPA, Ctrl, MeJA et DMSO avant et après conservation ont été extraits pour les deux parcelles mais en raison de problèmes techniques seul le transcriptome avant conservation a été obtenu. Seuls les résultats de l'analyse transcriptomique pour les lots traités au MeJA et DMSO sont présentés ci-dessous.

### 3.2.1. Analyse différentielle de l'effet d'un traitement au MeJA avant conservation

Une analyse différentielle de l'expression des gènes des conditions MeJA vs DMSO avant la conservation a permis d'identifier 2590 sondes différentiellement exprimées. 1215 transcrits sont surexprimés et 1375 sont sous exprimés après application du MeJA sur les pommes (tableau 3). Seules les sondes « sens » ont été considérées pour la suite de l'analyse.

### 3.2.2. Gènes liés à la voie de biosynthèse des shikimates et des dérivées de la phénylalanine

Parmi les gènes surexprimés après le traitement au MeJA, quatre d'entre eux codent pour des enzymes impliquées dans la voie des shikimates (tableau 4), la 2-dehydro-3-deoxyphosphoheptonate aldolase (DAHPS), la shikimate 5-dehydrogenase (SD) et la chorismate synthase (CS). Cinq gènes codant pour des enzymes impliquées dans la synthèse des phénylpropanoïdes sont significativement surexprimés, la 4-coumarate-CoA ligase (OPCL1/4CL), la chalcone synthase (CHS) et la dihydroflavonol 4-reductase (DFR). Un facteur de transcription Myb domain protein 12 (MYB12) impliqué dans la biosynthèse des flavonoïdes est significativement surexprimé. Trois gènes codant pour des polyphénols oxydases (PPO) capables d'oxyder les composés phénoliques sont significativement surexprimés.

### 3.2.3. Gènes impliqués dans la voie de biosynthèse des isopropanoïdes par la voie de l'acide mélavonique

De nombreux gènes impliqués dans la voie de biosynthèse des isopropanoïdes sont très fortement surexprimés après un traitement au MeJA (tableau 4). Deux voies sont impliquées dans la biosynthèse des isopropanoïdes : la voie de l'acide mélavonique (MVA) qui conduit à la synthèse des sesquiterpènes (cytosol) et des squalènes (réticulum endoplasmique) et la voie du méthyl erythriol phosphate (MEP) qui aboutit à la synthèse des monoterpènes, diterpènes et caroténoïdes (chloroplaste). Sept gènes codant pour des enzymes impliquées dans la voie MVA sont fortement surexprimés : l'acetyl-CoA Thiolase 2 (AACT), l'hydroxyméthylglutaryl-CoA synthase (HMG-CoA), la mevalonate kinase (MK), la farnesyl diphosphate synthase 1 (FPS) et la mélavonate diphosphate decarboxylase. Un gène codant pour une enzyme impliquée dans la voie MEP est fortement surexprimé : la myrcene/ocimene synthase. L'expression du gène codant pour une enzyme impliquée dans les deux voies MEP et MVA, l'isopentenyl-diphosphate isomerase 1 (IPP),

**Tableau 4.** Gènes induits ou réprimés dans l'épiderme des fruits après un traitement au MeJA avant la conservation au froid (suite)

Identifiant <i>Malus</i>	Description*	Fonction*	p-value	Log(ratio)
<b>Biosynthèse de l'acide jasmonique/méthyljasmonate</b>				
MDP0000713234	Jasmonate carboxyl methyltransferase (JTM)	Biosynthèse/MeJA	<0,001	2,61
MDP0000941692	Jasmonate carboxyl methyltransferase (JTM)	Biosynthèse/MeJA	<0,001	2,59
MDP0000146677	Lipoxygenase 1 (LOX1)	Biosynthèse/JA	0,005	1,89
MDP0000423544	Lipoxygenase 1 (LOX1)	Biosynthèse/JA	0,004	1,85
MDP0000178268	Lipoxygenase 2 (LOX1)	Biosynthèse/JA	0,008	1,78
MDP0000312397	Lipoxygenase 1 (LOX2)	Biosynthèse/JA	0,007	1,72
MDP0000399594	OPDA-reductase 3 (OPR3)	Biosynthèse/JA	0,010	1,53
MDP0000132456	Allene oxide synthase (AOS)	Biosynthèse/JA	0,002	1,29
MDP0000273180	OPDA-reductase 3 (OPR3)	Biosynthèse/JA	0,002	1,24
MDP0000158694	OPDA-reductase 2 (OPR2)	Biosynthèse/JA	0,003	1,02
MDP0000119756	OPDA-reductase 2 (OPR2)	Biosynthèse/JA	0,009	1,00
MDP0000690110	OPDA-reductase 2 (OPR2)	Biosynthèse/JA	0,008	0,89
MDP0000235454	Acetyl-CoA Thiolase 2 (AACT2)	TCA / org transformation	<0,001	1,54
<b>Biosynthèse de l'éthylène</b>				
MDP0000453114	Ethylene forming enzyme (EFE)	Biosynthèse/Eth	0,002	3,40
MDP0000251295	Ethylene forming enzyme (EFE)	Biosynthèse/Eth	0,002	3,39
MDP0000689946	Ethylene response factor 2 (ERF2)	Facteur de transcription	<0,001	2,93
MDP0000447570	Ethylene response factor 1 (ERF1)	Facteur de transcription	0,001	2,75
MDP0000127134	Ethylene response factor 1 (ERF1)	Facteur de transcription	<0,001	2,50
MDP0000242413	Ethylene response sensor (ERS)	Récepteur	0,003	2,41
MDP0000235313	Ethylene response factor 1 (ERF1)	Facteur de transcription	<0,001	2,17
MDP0000752656	Ethylene response sensor (ERS)	Récepteur	0,001	1,91
MDP0000805422	Ethylene response factor 2 (ERF2)	Facteur de transcription	0,002	1,71
MDP0000231172	Ethylene insensitive 4 (EIN4)	Phosphorelay	0,002	1,67
MDP0000302747	Ethylene insensitive 2 (EIN2)	Phosphorelay	0,004	-1,11
MDP0000517262	Ethylene response factor 106 (ERF106)	Facteur de transcription	0,001	-1,36
<b>Voies métaboliques liées à la photosynthèse et à la respiration</b>				
MDP0000249767	Cytochrome P450 complex	Mitochondrie/transport d'électron	<0,001	3,98
MDP0000151003	Cytochrome P450 complex	Mitochondrie/transport d'électron	<0,001	3,32
MDP0000166668	Carbonic anhydrase 2 (CA2)	TCA / org transformation	<0,001	2,51
MDP0000259706	Light harvesting complex gene 1 (LHC1)	Photosystème	0,01	-1,69
MDP0000943426	Light harvesting complex gene 5 (LHC5)	Photosystème	0,01	-1,78
MDP0000193128	Light harvesting complex gene 4 (LHC4)	Photosystème	<0,001	-1,78
MDP0000259047	Phyb activation tagged suppressor (PHYB)	Mitochondrie/transport d'électron	<0,001	-1,80
MDP0000153663	Light harvesting complex gene 4 (LHC4)	Photosystème	<0,001	-2,00
MDP0000160559	Cytochrome P450 complex	Mitochondrie/transport d'électron	<0,001	-2,30
MDP0000531454	Cytochrome P450 complex	Mitochondrie/transport d'électron	0,01	-3,59

\*La description des gènes et les fonctions associées ont principalement été déterminées sur la base de leur similarité avec les gènes d'*Arabidopsis thaliana* décrits dans TAIR.

est induite. Sept gènes codant pour des terpène synthase (TPS), enzymes impliquées dans la biosynthèse des sesquiterpènes, sont significativement surexprimés avec des log ratios très élevés entre 2,56 et 6,84. Un gène codant une terpène synthase 3 (TPS3), impliquée dans la biosynthèse des terpènes, est significativement surexprimé.

#### 3.2.4. Gènes impliqués dans la voie de biosynthèse des JA

Après application du MeJA, la voie de biosynthèse des JA est induite (tableau 4). Les gènes codant pour les enzymes lipoxygénase 1 et 2 (LOX), OPDA-reductase 2 et 3 (OPR), allène oxydase synthase (AOS) et 4-coumarate-CoA ligase (4-CL) sont significativement induits. Le gène codant pour l'enzyme jasmonate carboxyl méthyltransférase (JTM) qui conduit à la synthèse du MeJA est également significativement induit. La 4-coumarate-CoA ligase est impliquée dans la voie de biosynthèse des jasmonates et des phénylpropanoïdes.

#### 3.2.5. Gènes impliqués dans la voie de biosynthèse de l'éthylène

Des gènes impliqués dans la voie de biosynthèse et de signalisation de l'éthylène sont différentiellement exprimés après un traitement au MeJA (tableau 4). Trois gènes codant pour des récepteurs de l'éthylène sont significativement induits tels que ethylene response sensor (ERS) et ethylene insensitive 4 (EIN4). Cinq facteurs de transcription sont significativement induits comme ethylene response facteur 1 et 2 (ERF1-2). Deux gènes codant pour ethylene forming enzyme (EFE) impliquée dans la voie de biosynthèse de l'éthylène sont induits. En revanche, ethylene insensitive (EIN2) et ethylene response facteur 106 (ERF106) sont significativement sous-exprimés.

#### 3.2.6. Gènes impliqués dans les voies métaboliques liées à la photosynthèse (PS) / respiration

Des gènes impliqués dans les voies métaboliques liées à la PS/respiration sont différentiellement exprimés après un traitement au MeJA (tableau 4). Deux gènes impliqués dans le transport des électrons au niveau des mitochondries, Cytochrome P450 complex, sont significativement induits alors que trois autres gènes impliqués le transport des électrons, cytochrome P450 complex et PHYB, sont significativement réprimés. Un gène impliqué dans le cycle de Calvin (CA2) est significativement induit. Quatre gènes impliqués dans la photosynthèse sont significativement réprimés comme light harvesting complex gene 1-4 et 5 (LHC1-4 et5).

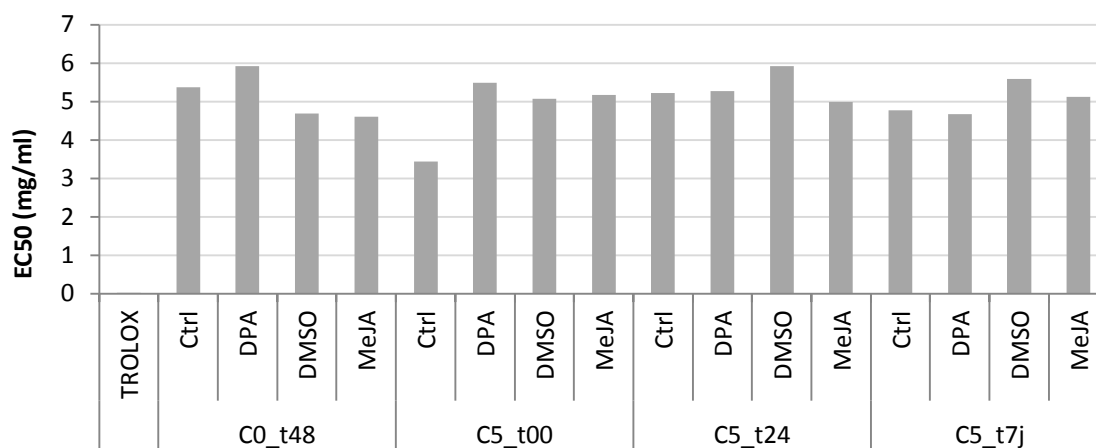
### 3.3.Effet des traitements sur les activités anti-oxydantes dans l'épiderme du fruit

Afin d'évaluer l'effet des traitements sur la balance oxydant/antioxydant de l'épiderme des fruits, deux types de tests ont été mis au point.

**Tableau 5.** Coefficient de régression linéaire ( $R^2$ ) de la quantité de DPPH réduite en fonction de la concentration de l'extrait brut testé

	6 points (ND à d32)	5 points (d2 à d32)	4 points (d4 à d32)
<b>Ctrl C0_t48</b>	0,60	0,73	0,90
<b>DPA C0_t48</b>	0,01	0,60	0,81
<b>Ctrl C5_t00</b>	0,06	0,34	0,84
<b>DPA C5_t00</b>	0,02	0,88	0,99

Tests réalisés sur une gamme de 6 dilutions de chaque extrait brut : non dilué (ND), d2, d4, d8, d16 et d32.



**Figure 10.** Activité anti-oxydante globale des échantillons évaluée par le test DPPH.

Concentration des échantillons ( $\text{mg MF.mL}^{-1}$ ) nécessaire pour réduire 50 % du DPPH ( $EC_{50}$ ) pour les échantillons de la parcelle P24 avant conservation (C0\_t48) et après 5 mois de conservation (C5\_t00), 24h après (C5\_t24) et 7 jours après (C5\_t7j).



### 3.3.1. Activités anti-oxydantes globales : test de réduction du DPPH

L'activité anti-oxydante globale des échantillons a été mesurée par la réduction du DPPH (2,2-diphényl-1-picryl-hydrazyl) et comparé à l'effet du trolox, un puissant antioxydant. L'activité est mesurée par le calcul de l'EC50, concentration en échantillon nécessaire pour réduire 50% du DPPH. Les tests préliminaires réalisés sur les échantillons d'une seule parcelle ont permis de déterminer la gamme de concentration à tester (tableau 5) : Six dilutions de deux en deux à partir de d4 pour chaque échantillon.

L'EC50 des échantillons est en moyenne de 5,08 mg MF.mL<sup>-1</sup>, beaucoup plus élevée que celle du trolox à 0,02 mg.mL<sup>-1</sup> (figure 10). Le nombre de répliques techniques doit être augmenté et les échantillons de la deuxième parcelle doivent être testés pour conclure.

### 3.3.2. Activités anti-oxydantes spécifiques : oxydation par les polyphénol oxydase (PPO) et peroxydation (POX)

Deux activités enzymatiques (PPO, POX) ont été dosées dans l'épiderme des fruits en présence de deux substrats (4-méthylcatéchol ou acide chlorogénique) à deux pH (4,5 et 7,5).

A pH 4,5, l'activité PPO mesurée est très faible avec une moyenne de 0,52 uDO.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup> de protéine pour le 4-méthylcatéchol et de 1,14 uDO.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup> de protéine pour l'acide chlorogénique. A pH 7,5 l'activité n'a pu être enregistrée. De même l'activité peroxydase n'a pu être déterminée pour aucun des substrats. En effet, une phase linéaire n'a pu être observée lors des réactions. Deux hypothèses sont envisagées, soit il n'y a pas d'activité, soit les réactions ont été très rapide et l'activité enzymatique n'a pu être enregistrée en phase linéaire. Dans le cadre de cette deuxième hypothèse, il s'agit maintenant de tester les extraits bruts dilués.



## 4. Discussion

### 4.1. Incidence des symptômes d'échaudure et efficacité des traitements

Après une période de conservation de cinq mois, les lots de pommes traités au DPA et 1-MCP ne présentent aucun symptôme d'échaudure ou très peu pour le DPA. Ces deux traitements ont été très efficaces pour stopper l'apparition de l'échaudure ce qui est cohérent avec les études menées par Jung et Watkins (2008). En revanche, la conservation en ULO n'a pas diminué l'incidence des symptômes comme attendu (Lurie et Watkins, 2012). Cependant, les fruits échaudés semblent être moins sévèrement atteints (résultats non présentés). De même, la thérapie n'a pas inhibé l'apparition des symptômes comme le montre Lurie *et al.*, (1991). Cela peut être expliqué par une année à très forte pression pour l'échaudure en 2015.

### 4.2. Les voies métaboliques induites par le MeJA

L'analyse comparative des transcriptomes a permis d'identifier des gènes induits impliqués dans presque toutes les étapes de la voie de biosynthèse de JA (LOX1 et 2, OPR2 et 3, AOS et 4-CL). L'induction de la voie de biosynthèse du JA par le MeJA a déjà été rapporté chez *Arabidopsis thaliana* (Sasaki *et al.*, 2001 ; Pauwels *et al.*, 2008). Les résultats obtenus semblent également montrer, en particulier l'induction de gènes codant pour des jasmonate carboxyl methyltransferases (JTM), que le MeJA induirait sa propre voie de biosynthèse.

L'induction des gènes impliqués dans la voie de biosynthèse et dans la voie de signalisation de l'éthylène suggère que le MeJA a un effet sur la production d'éthylène. Czapski et Saniewski (1992) ont montré chez *Lycopersicon esculentum* (tomate) que l'activité de l'« ethylene forming enzyme » (EFE) qui catalyse la dernière étape de la biosynthèse de l'éthylène ainsi que la production d'éthylène est stimulée après un traitement au MeJA.

Le MeJA induit des gènes codant des enzymes impliquées dans la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes (4-CL, CHS et DFR) et de leurs précurseurs les shikimates (DAHPS, SD et CS) (Tohge *et al.*, 2013). Cela suggère une induction de la biosynthèse des phénylpropanoïdes comme cela a déjà été montré chez *Arabidopsis thaliana* (Pauwels *et al.*, 2008). L'induction de l'expression du facteur de transcription MYB12 impliqué dans la biosynthèse des flavonoïdes suggère plus précisément l'induction de la biosynthèse des flavonols. Plusieurs gènes codant potentiellement pour des polyphénols oxydases (PPO), capables d'oxyder les composés phénoliques, sont également induits par application du MeJA sur les fruits.

Le MeJA induit l'expression de gènes impliqués dans presque toutes les étapes de la voie MVA (FDS, HGM-CoA, MDD, MK, IPP) et la voie MEP (IPP) conduisant à la synthèse des précurseurs des terpènes et sesquiterpènes. De plus, l'induction de l'expression des gènes codant



des TPS, myrcene/ocimene synthase et TPS3 impliqués dans la voie de biosynthèse des terpénoïdes suggère que la synthèse des sesquiterpènes (dont l' $\alpha$ -farnésène) et des monoterpènes est induite après application de MeJA. L'induction de la voie MVA et MEP par le MeJA a déjà été rapporté par Yang et al., (2012) chez *Salvia miltiorrhiza* (sauge).

La répression des gènes liés à l'activité photosynthétique (LHC1, LHC4, LHC5) suggère que le MeJA a un effet inhibiteur sur la photosynthèse. La réduction de la photosynthèse par le MeJA a été montrée par Cheong et Do Choi (2003) chez *Arabidopsis thaliana*. Cinq gènes liés au transport des électrons au niveau des mitochondries ont été identifiés après traitement au MeJA : PHYB (réprimé) et Cytochrome P450 complex (deux induits et deux réprimés). Ces résultats sont cohérents avec ceux obtenus par Zhang et Xing (2008) chez *Arabidopsis thaliana* montrant qu'un traitement au MeJA altère la photosynthèse et la dynamique des mitochondries, dont le transport des électrons.

#### 4.3. Le traitement au MeJA avance la maturité du fruit

Après avoir été transférés à température ambiante, les fruits traités au MeJA avaient une couleur jaune comparés aux fruits traités au DMSO qui restaient de couleur verte. Les données transcriptomiques montrent également l'induction de la voie de biosynthèse et de signalisation de l'éthylène par le MeJA avant la mise au froid, or l'éthylène est l'hormone majeure impliquée dans la maturation des fruits climatériques (Janssen *et al.*, 2008).

Chez 'Golden delicious', après induction par le MeJA, l'éthylène bloque la photosynthèse en induisant la dégradation de la chlorophylle et induit la synthèse des caroténoïdes connus pour faire passer la couleur du fruit de vert à jaune au cours de la maturation (Ampomah-dwamena, 2012 ; Pérez *et al.*, 1993 ; Fan et Mathieis, 1998). Nos données transcriptomiques montrent qu'un gène codant pour l'isopentenyl diphosphate (IPP), impliqué dans la synthèse des caroténoïdes par la voie du MEP (Ampomah-dwamena, 2012), est fortement induit par le traitement MeJA. En revanche, les gènes liés à l'activité photosynthétique sont réprimés. L'application de MeJA sur 'Granny Smith' induirait donc la synthèse de l'éthylène, accélérant ainsi la maturation et le changement de couleur des fruits récoltés précocement.

#### 4.4. Action du MeJA sur l'apparition des symptômes de l'échaudure : une hypothèse explicative

L'analyse du transcriptome de fruits traités au MeJA et les résultats de phénotypage permettent de proposer un modèle conceptuel pour le développement du brunissement des fruits (figure 11). L'hypothèse avancée pour expliquer la dynamique d'apparition des symptômes de l'échaudure après conservation repose sur l'équilibre entre la quantité de ROS générés par la mise au froid et la quantité d'antioxydants présents dans les tissus.



Lorsque les pommes récoltées prématurément et non traitées sont mises en chambre froide, la production de ROS augmente (Suzuki et Mittler, 2006). Or, chez des fruits immatures, l'efficacité du système antioxydant est faible (Anet, 1972) et les ROS s'accumuleraient alors dans les cellules. Ainsi au cours de la conservation au froid, ces ROS dégraderaient les membranes par peroxydation des lipides libérant ainsi les composés phénoliques contenus dans la vacuole et les PPO intégrées dans la membrane des chloroplastes (Robards *et al.*, 1999). Cependant, les faibles températures ralentissant le métabolisme et en particulier l'activité des PPO, aucun symptôme ne serait alors observé, sauf dans les cas les plus sévères. En sortie de conservation, lorsque les pommes sont transférées à température ambiante, la vitesse des réactions enzymatiques et chimiques augmentant, les PPO interagiraient avec les composés phénoliques, formant ainsi des quinones qui une fois polymérisées formeraient des pigments bruns, symptômes de l'échaudure superficielle (Busatto *et al.*, 2014). Les ROS pourraient également contribuer à l'auto-oxydation de l' $\alpha$ -farnésène générant des CT et des MHO, eux-mêmes composés oxydants, et participer à l'apparition de l'échaudure.

Lorsque les pommes récoltées prématurément et traitées au MeJA sont mises en chambre froide, la production et l'accumulation de ROS augmenteraient également. Cependant le traitement au MeJA induisant la synthèse de l'éthylène et donc la maturation des fruits avant leurs mises en conservation, l'efficacité de leur système antioxydant serait alors plus élevée que pour les fruits non traités (Barden et Bramlage, 1994). L'effet antioxydant de l'application du MeJA pourrait également être amplifié par une production accrue de composés phénoliques, connus pour leurs effets antioxydants (Heim *et al.*, 2002), comme le suggère l'induction de la voie des shikimates et des phénylpropanoïdes suite à l'application de MeJA. Dans ces conditions l'équilibre ROS *versus* système antioxydant serait en faveur du système antioxydant, ce qui expliquerait le peu de symptômes observés en sortie de conservation et 24 heures après par rapport aux fruits non traités au MeJA. En revanche, 7 jours après transfert à température ambiante, l'incidence de l'échaudure est plus importante pour les pommes traitées au MeJA par rapport au contrôle. Cette inversion pourrait être expliquée par une sénescence précoce des pommes traitées au MeJA conduisant à une accumulation de ROS participant à la régulation des processus physiologiques aboutissant à la mort cellulaire programmée (Qin *et al.*, 2009). Cette plus grande accumulation de ROS entraînerait d'une part une dégradation plus rapide des structures subcellulaires, libérant plus rapidement les PPO. D'autre part, comme le traitement au MeJA a induit les gènes impliqués dans la synthèse des composés phénoliques, ils sont potentiellement plus accumulés. Il y aurait donc plus de substrats oxyder par les PPO et donc plus de pigment brun accumulés. Les ROS contribueraient également à l'auto-oxydation de l' $\alpha$ -farnésène, augmentant ainsi la quantité globale de ROS. Ainsi, la quantité de composés phénoliques aux propriétés anti-oxydantes qui semble avoir un effet protecteur en





conservation deviendrait un amplificateur des symptômes de l'échaudure après 7 jours à température ambiante *via* une activité globale accrue des PPO.

## 5. Conclusion

Les résultats obtenus ont permis de mettre en avant des voies métaboliques potentiellement impliquées dans l'apparition de l'échaudure superficielle chez la pomme. L'analyse du transcriptome du lot de pommes ayant subi un traitement au MeJA montre que l'équilibre entre la quantité de radicaux libres générés par la mise au froid et la quantité d'antioxydants présents dans les tissus pourraient être à l'origine de l'apparition de la maladie. La voie de signalisation des jasmonates étant impliquée dans la réponse aux stress biotiques et abiotiques chez les plantes (Wasternack, 2007), cette balance oxydant/antioxydant pourrait être un système d'intégration d'un stress et également de l'évolution du fruit vers la sénescence (Busatto et al., 2014).

## 6. Perspectives

A court terme, il s'agit d'hybrider les puces à ADN pour les échantillons obtenus après conservation afin de vérifier notamment les hypothèses avancées sur la sénescence précoce des fruits traités au MeJA. L'ensemble des données transcriptomiques sera également validé par RTqPCR sur quelques gènes cibles. Puis, l'analyse du statut oxydant des échantillons sera poursuivi : (1) mesurer l'activité anti-oxydante globale (DPPH), (2) mesurer l'activité des polyphénols oxydase et des peroxydases, (3) doser les polyphénols.

A plus long terme, une quatrième année d'expérimentation est envisagée pour valider les résultats obtenus. Des traitements supplémentaires par rapport à 2015 pourrait être ajoutés pour valider l'implication des processus antioxydants dans la lutte contre de l'échaudure : (1) traiter avec un antioxydant puissant tel que la sieboldine (Dugé de Bernonville, 2010), (2) utiliser des inhibiteurs d'enzymes impliquées dans la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes telles que la PAL, ou plus spécifiquement un inhibiteur de la PPO tel que le chlorite de sodium (Lu et al., 2006).

Dans l'objectif de la création d'un outil de prédiction de l'apparition de la maladie dès la récolte, la corrélation entre la quantité d'antioxydants présents dans les tissus de pommes (transcriptomique et biochimie) avant la mise au froid et l'apparition de la maladie pourrait être étudiée.



## Références bibliographiques

- Albrigo, L.G., Childers, N.F.** (1970) Peel flavanols and their relationship to superficial scald in 'Stayman' apples. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, **95**, pp. 798–800.
- Anet E. F. L. J.**(1972) Superficial Scald, a Functional Disorder of Stored Apples : Effect of Maturity and Ventilation , *J. Sci. Fd Agric*, **23**, 763-769.
- Ampomah-Dwamena, C., Dejnopratt, S., Lewis, D., Sutherland, P., Volz, R.K. and Allan, A.C.** (2012) Metabolic and gene expression analysis of apple (*Malus x domestica*) carotenogenesis. *Journal of Experimental Botany*, **63**, 4497–4511.
- Balbi, V. and Devoto, A.** (2007) Jasmonate signalling network in *Arabidopsis thaliana*: crucial regulatory nodes and new physiological scenarios. *New Phytologist*, **177**, 301–318.
- Barden, C.L. and Bramlage, W.J.** (1994) Accumulation of antioxidants in apple peel as related to preharvest factors and superficial scald susceptibility of the fruit. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, **119**, 264–269.
- Blankenship, S.M. and Dole, J.M.** (2003) 1-Methylcyclopropene: a review. *Postharvest Biology and Technology*, **28**, 1–25.
- Bolwell, G.P., Wojtaszek, P.** (1997) Mechanisms for the generation of reactive oxygen species in plant defense: a broad perspective. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **51**, pp. 347-366.
- Bradford, M.M.** (1976) A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding, *Anal. Biochem.* **72**:248-254.
- Brand-Williams W., Cuvelier M.E. and Berset C.** (1995) Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensw.-Wiss. u.-Technol.*, **28**, pp. 25-30.
- Brooks, C., Cooley, J.S., and Fisher, D.F.,** (1923) Oiled wrappers, oils and waxes in the control of superficial scald, *J. Agric. Res*, **26**, 513–536.
- Busatto, N., Farneti, B., Tadiello, A., Vrhovsek, U., Cappellin, L., Biasioli, F., Velasco, R., Costa, G. and Costa, F.** (2014) Target metabolite and gene transcription profiling during the development of superficial scald in apple (*Malus x domestica* Borkh). *BMC plant biology*, **14**, 193.
- Celton J.M., Dheilly E., Guillou M.C., Simonneau F., Juchaux M., Costes E., Laurens F., Renou J.P.** (2014) Additional amphivasal bundles in pedicel pith exacerbate central fruit dominance and induce self-thinning of lateral fruitlets in apple, *Plant Physiology*, **164**(4):1930-51.
- Celton J.M., Gaillard S., Bruneau M., Pelletier S., Aubourg S., Martin-Magniette M.L., Navarro L., Laurens F., Renou J.P.** (2014) Widespread anti-sense transcription in apple is correlated with siRNA production and indicates a large potential for transcriptional and/or post-transcriptional control. *New Phytologist*, **203**(1):287-99.



- Cheong, J.-J. and Choi, Y.D.** (2003) Methyl jasmonate as a vital substance in plants. *Trends in Genetics*, **19**, 409–413.
- Coureau C., Tessier C., Mathieu-Hurtiger V., Bonny P., Landry P., Westercamp P., and Monteils G.** (2013) Nouvelles techniques de conservation contre l'échaudure de prématurité : trois ans d'expériences en réseau, Ctifl n°297.
- Crouch, I.J., M.A., Taylor** (2013) The impact of harvest maturity and cold storage duration on superficial scald development on Granny Smith apples. *ExperiCo (Agri-Research Solutions)*
- Czapski, J., Saniewski, M.** (1992) Stimulation of ethylene production and Ethylene-Forming Enzyme activity in fruits of the non-ripening nor and rin tomato mutants by methyl jasmonate, *J. Plant Physiol. Vol. 139*. pp. 265–268.
- Dugé de Bernonville, T., Guyot, S., Paulin, J.-P., Gaucher, M., Loufrani, L., Henrion, D., Derbré, S., Guilet, D., Richomme, P., Dat, J.F., and Brisset, M.-N.** (2010) Dihydrochalcones: Implication in resistance to oxidative stress and bioactivities against advanced glycation end-products and vasoconstriction. *Phytochemistry* **71**, 443-452.
- Emongor, V.E., Murr, D.P. and Lougheed, E.C.** (1994) Preharvest factors that predispose apples to superficial scald. *Postharvest Biology and Technology*, **4**, 289–300.
- Erkan, M. and Pekmezci, M.** (2004) Harvest date influences superficial scald development in Granny Smith apples during long term storage. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, **28**, 397–403.
- Fan, X.T., Mattheis J.P., and Blankenship S,** (1999) Development of apple superficial scald, soft scald, core flush, and greasiness is reduced by MCP, *J. Agric. Food Chem*, **47**:3063-3068.
- Fan, X.T., Mattheis J.P., Fellman, J.K.** (1998) responses of apple to postharvest jasmonate treatments , *Journal of the American Society for Horticultural Science*, **123**(3), pp. 421–425.
- Filder, J.C.** (1956) Scald and weather. *Food Sci. Abstr.*, **28**: 545-554.
- Heim, K.E., Tagliaferro, A.R. and Bobilya, D.J.** (2002) Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of nutritional biochemistry*, **13**, 572–584.
- Heredia, J.B. and Cisneros-Zevallos, L.** (2009) The effect of exogenous ethylene and methyl jasmonate on pal activity, phenolic profiles and antioxidant capacity of carrots (*Daucus carota*) under different wounding intensities. *Postharvest Biology and Technology*, **51**, 242–249.
- Jakszyn, P. and González, C.A.** (2006) Nitrosamine and related food intake and gastric and oesophageal cancer risk: a systematic review of the epidemiological evidence. *World journal of gastroenterology*, **12**, 4296.



- Janssen, B.J., Thodey, K., Schaffer, R.J., et al.** (2008) Global gene expression analysis of apple fruit development from the floral bud to ripe fruit. *BMC Plant Biology*, **8**, 16.
- Ju, Z.G., Curry, E.A.** (2002) Effects of 6-methyl-5-hepten-2-one vapor on peel browning of 'Delicious' and 'Granny Smith' apples: open vs. closed system. *Postharvest Biol. Technol.*, **25**, 265–272.
- Jung, S.-K. and Watkins, C.B.** (2008) Superficial scald control after delayed treatment of apple fruit with diphenylamine (DPA) and 1-methylcyclopropene (1-MCP). *Postharvest Biology and Technology*, **50**, 45–52.
- Kupferman, E.** (2001) Storage Scald of Apples. *Postharvest Information Network*
- Lu, S., Luo, Y., Feng, H.** (2006) Inhibition of apple polyphenol oxidase activity by sodium chlorite, *J Agric Food Chem*, **54** (10) : 3693-6
- Lurie, S., Klein, J.D. and Arie, R.B.** (1991) Prestorage Heat Treatment Delays Development of Superficial Scald on Granny Smith Apples. *HortScience*, **26**, 166–167.
- Lurie, S. and Watkins, C.B.** (2012) Superficial scald, its etiology and control. *Postharvest Biology and Technology*, **65**, 44–60.
- Lysiak, G.** (2013) The influence of harvest maturity and basic macroelement content in fruit on the incidence of diseases and disorders after storage of the "Ligol" apple cultivar. *Folia Horticulturae*, **25**.
- Mainla, L.** (2013) Changes in the biochemical composition of apple (*Malus domestica* Borkh.) fruits depending on rootstock and calcium treatment. *Estonian university of life sciences*
- Niinemets, Ü., Kännaste, A. and Copolovici, L.** (2013) Quantitative patterns between plant volatile emissions induced by biotic stresses and the degree of damage. *Frontiers in Plant Science*, **4**.
- Pauwels, L., Morreel, K., De Witte, E., Lammertyn, F., Van Montagu, M., Boerjan, W., Inzé, D. and Goossens, A.** (2008) Mapping methyl jasmonate-mediated transcriptional reprogramming of metabolism and cell cycle progression in cultured *Arabidopsis* cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **105**, 1380–1385.
- Pérez, A.G., Sanz, C., Richardson, D.G., and Olías, J.M.** (1993) Methyl jasmonate vapor promotes  $\beta$ -carotene synthesis and chlorophyll degradation in Golden Delicious apple peel, *Journal of Plant Growth Regul.*, **12**, pp. 163-167.
- Pesis, E., Ibáñez, A.M., Phu, M.L., Mitcham, E.J., Ebeler, S.E. and Dandekar, A.M.** (2009) Superficial Scald and Bitter Pit Development in Cold-Stored Transgenic Apples Suppressed for Ethylene Biosynthesis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **57**, 2786–2792.
- Purvis, A.C., Gegogine, J.W.** (2003) Diphenylamine inhibits respiration of green bell peppers, *Journal of the American Society for Horticultural Science*, **128**(6), pp. 924–929.





- Qin, G., Wang, Q., Liu, J., Li, B., Tian, S.** (2009) Proteomic analysis of changes in mitochondrial protein expression during fruit senescence, *Proteomics*, **9**, pp. 4241–4253.
- Rienth, M., Torregrosa, L., Kelly, M.T., Luchaire, N., Pellegrino, A., Grimplet, J. and Romieu, C.** (2014) Is Transcriptomic Regulation of Berry Development More Important at Night than During the Day? N. S. Foulkes, ed. *PLoS ONE*, **9**, e88844.
- Robards, K., Prenzler, P.D., Tucker, G., Swatsitang, P. and Glover, W.** (1999) Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food chemistry*, **66**, 401–436.
- Rocha, A. and Morais, A.** (2001) Characterization of polyphenoloxidase (PPO) extracted from “Jonagored” apple. *Food Control*, **12**, 85–90.
- Rowan D.D., Hunt M.B., Fielder S., Norris J., and Sherburn M.S.** (2001) Conjugated triene oxidation products of alpha-farnesene induce symptoms of superficial scald on stored apples. *J Agric Food Chem*, **49**:2780–2787.
- Rudelle, D.R., Mattheis J.P., Fan, X.T., and Fellman, J.K.** (2002) Methyl Jasmonate enhances anthocyanin accumulation and modifies production of phenolics and pigments in ‘Fuji’, *Journal of the American Society for Horticultural Science*, **127**(3), pp. 435–441.
- Sabban-Amin, R., Feygenberg, O., Belausov, E. and Pesis, E.** (2011) Low oxygen and 1-MCP pretreatments delay superficial scald development by reducing reactive oxygen species (ROS) accumulation in stored “Granny Smith” apples. *Postharvest Biology and Technology*, **62**, 295–304.
- Sanchez-Ferrer A., Bru R., Cabanes J., and Garcia-Carmona F.** (1988) Characterization of catecholase and cresolase activities of monastrell grape polyphenol oxidase, *Phytochemistry* **27**, 319-321.
- Sasaki, Y., Asamizu, E., Shibata, D., et al.** (2001) Monitoring of methyl jasmonate-responsive genes in Arabidopsis by cDNA macroarray: self-activation of jasmonic acid biosynthesis and crosstalk with other phytohormone signaling pathways. *Dna Research*, **8**, 153–161.
- Song Y., Yao Y., Zhai H., DuY., Chen F., Wei S.** (2007) Polyphenolic compound and the degree of browning in processing apple varieties, *AGRIC.SCI. CHINA*, **6**(5). 607-612
- Suzuki, N., Mittler, P.,** (2006) Reactive oxygen species and temperature stresses: A delicate balance between signaling and destruction, *Physiologia Plantarum*, **126**, 45-51.
- Tohge, T., Watanabe, M., Hoefgen, R. and Fernie, A.R.** (2013) Shikimate and Phenylalanine Biosynthesis in the Green Lineage. *Frontiers in Plant Science*, **4**.
- Velasco, R., Zharkikh, A., Affourtit, J., et al.** (2010) The genome of the domesticated apple (*Malus × domestica* Borkh.). *Nature Genetics*, **42**, 833–839.
- Venisse, J.-S., Gullner, G. and Brisset, M.-N.** (2001) Evidence for the involvement of an oxidative stress in the initiation of infection of pear by *Erwinia amylovora*. *Plant Physiology*, **125**, 2164–2172.



- Verdu, C.F., Childebrand, N., Marnet, N., Lebail, G., Dupuis, F., Laurens, F., Guilet, D. and Guyot, S.** (2014) Polyphenol variability in the fruits and juices of a cider apple progeny: Polyphenol variability in cider apples. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **94**, 1305–1314.
- Vu, T.D.** (2008) Effets de l'environnement et l'accumulation de métabolites secondaires chez *Datura innoxia* Mill. Cultivé en conditions hors sol ; impact des facteurs biotiques et abiotiques, *Institut national polytechnique de Lorraine*.
- Wasternack, C.** (2007) Jasmonates: An Update on Biosynthesis, Signal Transduction and Action in Plant Stress Response, Growth and Development. *Annals of Botany*, **100**, 681–697.
- Whitaker, B.D.** (2004) Oxidative stress and superficial scald of apple fruit. *HortScience*, **39**, 933–937.
- Whitaker, B.D., Nock, J.F., and Watkins, C.B.** (2000) Peel tissue  $\alpha$ -farnesene and conjugated trienol concentrations during storage of 'White Angel' and 'Rome Beauty' hybrid apple selections susceptible and resistant to superficial scald. *Postharvest Biology and Technology*, **20**, 231–241.
- Yang, D., Ma, P., Liang, X., Wei, Z., Liang, Z., Liu, Y. and Liu, F.** (2012) PEG and ABA trigger methyl jasmonate accumulation to induce the MEP pathway and increase tanshinone production in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots. *Physiologia Plantarum*, **146**: 173–183.
- Zhang, L., Xing, D.** (2008) Methyl Jasmonate Induces Production of Reactive Oxygen Species and Alterations in Mitochondrial Dynamics that Precede Photosynthetic Dysfunction and Subsequent Cell Death. *Plant Cell Physiol* **49** (7) : 1092-1111

## Webographie

[1] : Fiche technique sur la pomme française

<http://www.franceagroalimentaire.com/actualite-agro/fiche-technique-sur-la-pomme-francaise/>

[2] : La pomme 2014-2015 : Bilan de campagne, FranceAgriMer

<http://www.franceagrimer.fr/content/download/40897/381190/file/BIL-POMME-camp%202014-15.pdf>

[3] : José Manuel BARROS, les limites maximales applicables aux résidus de diphénylamine présents dans ou sur certains produits (2013)

[http://www.senat.fr/europe/textes\\_europeens/e8346.pdf](http://www.senat.fr/europe/textes_europeens/e8346.pdf)

[4] SmartFresh Technology®, 2010

<https://www.agrireseau.net/phytoprotection/documents/Smartfresh%20Technology%20Pears%20F.pdf>





## **Mathieu MARC, 2016. Etude du déterminisme moléculaire de l'échaudure superficielle chez la pomme.**

Equipe Qualipom INRA, UMR1345 Institut de Recherche en Horticulture et Semences, 49045 Angers, France

### **RESUME**

La pomme est un fruit climatérique dont les caractéristiques qualitatives résultant des processus de maturation doivent être préservées tout au long du stockage au froid. Cependant, en cours de conservation, des désordres physiologiques peuvent apparaître telle que l'échaudure superficielle de la pomme, phénomène encore mal connu.

Afin d'identifier des gènes et des voies métaboliques impliqués dans l'apparition de l'échaudure superficielle différents traitements post-récolte et conditions de conservation susceptibles d'influer sur l'apparition de la maladie ont été testés sur les fruits récoltés en 2015. Après 5 mois de conservation, les traitements au 1-MCP et DPA ont diminué presque totalement l'incidence de l'échaudure, contrairement aux traitements MeJA ou conservation en ULO. L'analyse du transcriptome de fruits 24h après un traitement au MeJA montre l'induction de gènes impliqués dans les voies de signalisation et biosynthèse de l'éthylène, biosynthèse des terpénoïdes dont l' $\alpha$ -farnésène, des composés phénoliques et des PPO.

Un modèle conceptuel est proposé : l'équilibre entre la quantité de radicaux libres générés par la mise au froid et la quantité d'antioxydants présents dans les tissus seraient l'élément clés pour expliquer l'apparition de l'échaudure superficielle chez la pomme.

**Mots clés :** *Malus x domestica*, échaudure superficielle, stress oxydatif, polyphénol oxydase, analyse transcriptomique

---

## **Mathieu MARC, 2016. Study of the molecular determinism of superficial scald in apples.**

Equipe Qualipom INRA, UMR1345 Institut de Recherche en Horticulture et Semences, 49045 Angers, France

### **ABSTRACT**

Apple is a climacteric fruit whose quality traits result from the maturation process and must be preserved during the cold storage period. However superficial scald, a physiological storage disorders still poorly understood, may occur during this period.

In order to identify genes and metabolic pathways involved in the apparition of superficial scald, different post-harvest treatments and storage conditions were tested on fruits harvested in 2015. After 5 months of cold storage, on the opposite to MeJA treatment or ULO storage conditions, 1-MCP and DPA treatments had inhibited almost completely the apparition of scald. Analysis of fruit transcriptome 24h after MeJA treatment shows the induction of genes involved in signaling pathways and biosynthesis of ethylene, biosynthesis of terpenoids including  $\alpha$ -farnesene, phenolic compounds and PPO.

Finally, we propose that the balance between the amount of free radicals generated by cold stress and the amount of antioxidants present in the fruit tissues might be the key elements to explain the appearance of superficial scald in apples.

**Keywords:** *Malus x domestica*, superficial scald, oxidative stress, polyphenol oxidase, transcriptome analysis